

氏名 (本籍)	上 野 修 (千葉県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1305 号
学位授与日付	平成 14 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	The pulse heat shock method induces cellular decomposition process in cell death of <i>Tetrahymena</i>
審査委員	(主査) 教授 中 島 茂 (副査) 教授 高 橋 優 三    教授 藤 原 久 義

### 論文内容の要旨

繊毛虫類に属する単細胞原生動物テトラヒメナ (*Tetrahymena*) は、古くから無菌培養および完全合成培地が確立しており、細胞内共生菌をもたず、簡便な温度処理によって細胞周期の同調化が可能であるといった理由により、細胞分裂、増殖、膜形成、細胞運動をはじめとする多くの研究のモデル細胞として利用されている。テトラヒメナを栄養培地にて無菌的恒温振盪培養によって生育させると、世代時間約3時間の対数増殖期を経て、最大密度  $1-2 \times 10^6$  (cell/ml) の定常期に至る。この後さらに恒温振盪培養を続けると、培養開始から約10日後から総細胞数は減少を始め、約2週間後には全ての細胞は死滅しホモジネート状にまで分解する。従来この現象は、自己消化 (Autolysis)、すなわち酸素の欠乏、栄養源の枯渇、老廃物の蓄積といった環境条件の悪化によって誘導される受動的な自然崩壊過程として認識されてきた。一方、従来多細胞生物において受動的な自然崩壊過程と認識されてきた Necrosis について、プログラム性の関与を示唆する所見が近年報告されてきており、単細胞生物についても Autolysis をプログラム性の関与の可能性といった視点から検討し直す必要が生じてきている。特に、単細胞生物は一細胞一個体であり、その細胞死はすなわち個体死を意味することから、個体死研究のモデル生物としての価値も高い。しかし、定常期末期後に自然に見られる解体現象は、総細胞数の減少開始から解体終了まで数日を要するほど進行が緩慢であり、かつ進行度合いの不均質性が高いため、解体過程の各段階における分析的検討が困難である。さらに、生存細胞が分解過程のほぼ終末期まで共存し続けるため、こうした共存するテトラヒメナ生細胞の働きが他細胞の分解に寄与している可能性も否定できない。本研究では、単細胞生物テトラヒメナの細胞死とそれに伴う解体現象について、プログラム性にもとづく何らかの生化学的過程の存在を検討する誘導方法の開発を目的とした実験研究を行い、以下の結果を得た。

- 1) テトラヒメナ細胞を短時間の適切な高温刺激に曝露することによって、急速かつ一様な細胞解体現象を誘導する方法「パルス熱ショック法」を確立した。すなわち、26℃30分34℃30分の温度処理を8回繰り返す常法に従い細胞周期の同調化をおこなったS期のテトラヒメナ細胞に、半致死の高温刺激を短時間曝露 (パルス熱ショック) した後、元の最適培養環境に戻す方法である。パルス熱ショックの温度と時間の様々な組み合わせについて、パルス熱ショック曝露8時間後の細胞数を検討した結果、90%以上の細胞が解体する曝露時間が各熱ショック温度で見出された。この最適解体誘導条件は、パルス熱ショックの温度が高くなるほど短時間となる傾向があった。実験に用いた *Tetrahymena pyriformis* W株において半致死とされる39℃と、その温度における最適の解体誘導時間である21分を、パルス熱ショック条件として以後の実験に用いることとした。
- 2) パルス熱ショック法によって誘導される解体過程を経時的に観察するため、39℃、21分のパルス熱ショックによって誘導される細胞解体現象について各種指標を経時的に測定した。その結果パルス熱ショック開始後約2時間を境として各種指標に明瞭な差が認められた。a) 2時間後までの初期段階は総細胞数に顕著な減少は認めら

れず、ほとんどの細胞が運動停止、膨潤球状化、空胞形成という特徴的な形態変化を示した。また細胞死の指標として測定した乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)活性の細胞外流出はほとんど見られず、DNAの分解もほとんど見られなかった。b)これに対してパルス熱ショック処置開始3時間目以降は、細胞の解体が急速に進み、8時間後にはほぼ全細胞がホモジネート状にまで解体した。また総細胞数の減少に伴って細胞外流出したLDH活性は増加した。DNA分解は、180分後まではほとんど見られないのに対して、その20分後の200分後には急激に進行し、AutolysisあるいはNecrosisと類似のスミア状の分解を呈した。

3) パルス熱ショック法で誘導される細胞死に伴う細胞解体现象に何らかの生化学的過程が関与している可能性を検討するため、パルス熱ショック処置後の培養条件に、生化学的過程を阻害する操作を加える各種実験を行った結果、以下の知見を得た。a)パルス熱ショック後に、26℃の最適培養環境に戻す代わりに、テトラヒメナに対するストレス応答および増殖阻害を誘導する温度である34℃に戻したところ、細胞の運動停止のみが誘導され解体は顕著に阻害された。b)酸素要求性過程の関与について検討するため、パルス熱ショック後の細胞培養液を密栓し26℃にて恒温振盪を続けたところ、細胞の解体のみ顕著に阻害された。c)リソソームの解体活性の関与を検討するため、リソソーム指向性アミンであるクロロキン(1mM)の投与によってリソソーム内の酸性状態を中和したところ、細胞解体が顕著に阻害された。

以上の結果から、本研究で確立したパルス熱ショック法によって、原生動物テトラヒメナの細胞死とそれに伴う解体现象を一斉かつ急速に誘導し、さらにこの解体過程が運動細胞の共存がごく僅かな状態で進行する事が見いだされた。この手法を用いることにより、定常期末期後の自然な解体现象に見られる諸問題、すなわち解体進行度合いの不均質性や共存する運動細胞の関与の可能性といった問題が解決され、解体過程に関わる生化学的過程の検討を効果的に行うことが確認された。さらに、パルス熱ショック法によって誘導される細胞解体现象は、パルス熱ショック処置後に最適培養温度に戻すことによって急激に進行するのに対して、ストレス応答誘導温度や酸素供給制限条件に戻すことにより顕著に阻害された。このような解体のみ阻害された細胞は洋梨状の原形のまま運動を停止しており、26℃の最適恒温振盪培養環境に戻しても運動や増殖を再開しないため生命活動を停止しているものと判断される。これらの所見は、少なくとも細胞解体の初期段階においては、最適生存温度および酸素供給によって促進される何らかの生化学的過程が関与している可能性を示唆するものと考えられる。特にクロロキン投与によるリソソーム内酸性状態の中和が解体過程を顕著に阻害した事から、この解体過程にはリソソーム起源酸性加水分解酵素群の解体活性が関与している可能性を示唆する。

パルス熱ショック法の確立によって、テトラヒメナの細胞死に伴う解体過程について、能動性あるいはプログラム性を改めて検討する可能性が拓かれた点で、今後の原生動物の細胞生物学研究に寄与しうると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 上野 修は、原生動物テトラヒメナの細胞死に伴う解体過程を生化学的分子生物学的に検討しうる誘導方法であるパルス熱ショック法を開発し、それによって誘導される原生動物の解体现象に、リソソーム起源酸性加水分解酵素群の分解系を含むエネルギー要求性の生化学的過程が関与する可能性を示した。

本研究は単細胞生物テトラヒメナの細胞死に伴う解体過程の解明に有意義な知見を提供するものであり、原生動物の細胞生物学の発展に新しい知見をもたらしたものと認められる。

---

[主論文公表誌]

The pulse heat shock method induces cellular decomposition process in cell death of *Tetrahymena*

岐阜大学医紀 2002 ; 50 : 10~19