ISSN 2186-5647

5-21

ヤマトヒメミミズ再生のゲノム・エピゲノム解析
－再生時におけるテロメラーゼ活性の変化－

日大生産工(院)　○小澤　要
日大生産工　野呂　知加子

1. 背景と目的

真核生物の染色体の先端にはテロメアと呼ばれる構造があり、染色体の安定化に寄与している。DNA は二重らせん構造をもつが、テロメア末端では D-ループといわれる三重鎖構造をとり、DNA 末端を分解や修復から保護している。テロメアはグアニンとチミンに富んだ特殊な反復配列テロメア DNA と、それに結合してテロメアの形成・保護・長さ調節に関わる種々のタンパク質等から成る。中でもテロメラーゼは、テロメアの維持・伸長に関わる酵素であり、テロメア DNA の鋳型となる RNA と逆転写酵素活性をもつ触媒サブユニット、およびその他の制御サブユニットから構成されている。この RNA 成分の一部には、ヒトなどの脊椎動物では TTAGGG 繰り返し配列の相補鎖に相当する配列が存在し、この部分がテロメア DNA 配列を合成する際の鋳型として用いられる。テロメアの塩基配列は、真核生物間では保存性が高い。テロメアタンパク質成分は､鋳型 RNA と結合、酵素の活性中心、活性の調節などの機能をもっている。

テロメアやテロメラーゼは、細胞の老化や不死化およびがん化に重要な役割を持つと考えられている。ヒトやマウスの体細胞初代培養細胞には、細胞分裂回数に限りがあることが知られているが、これは DNA ポリメラーゼの性質から細胞分裂の度に DNA 最末端のプライマー結合部位が複製できず、テロメアが自然に短縮すること（末端複製問題）と関連している。このためヒト体細胞の場合 DNA 複製のたび 5’末端が短くなるため、細胞分裂回数に限りがある。そのため細胞分裂回数が増えるほどテロメアが短縮し、5kb ぐらいまで短縮することで、遺伝子変異の増加、染色体融合、アポトーシスの誘導などを引き起こされる。一方、生殖細胞ではテロメラーゼの活性が高く、ヒト体細胞のテロメアが 10kb 以下であるのに対し､生殖細胞では 15-20kb と長いことがわかっている｡また無限に増殖するがん細胞ではテロメラーゼ活性が高く、テロメアの長さも長いことが知られている。最近再生医療で注目されている iPS 細胞や ES 細胞などの未分化万能細胞および成体の体性幹細胞では、がん細胞と同様にテロメラーゼ活性が高いことが知られ、その増殖能との関連が示唆されている。

哺乳類以外のテロメアに関する研究では、ハエン大学（スペイン）のロリテらやロスアラモス国際研究所のジュリアンメイエンらによる様々な生体中の DNA 抽出液とテロメアリピートをラベリングした抗体とハイブリダイズさせサザンブロッティングして、脊椎動物や昆虫の一部にテロメアリピートが存在することが報告されている [1,2]。

今回実験で使用した生物は、ヤマトヒメミミズ（*Enchytraeus Japonensis*）という、1993 年に東北農業試験場で発見された全長 1~1.5cm ほどで半透明のヒメミミズ科に属する環形動物である。このミミズは非常に高い再生能力を有することが最大の特徴であり、切断した際に失った表皮、筋肉、血管、神経、脳、消化器官などのすべての組織･器官が完全に再生することが

Epigenetic Analysis of Stem Cell in *E.Japonensis*
－ Telomerase Activity during Regeneration Process －
Kaname Ozawa, Chikako YOSHIDA-NORO

できる。世界中に様々なヒメミミズが生息しているが、ほぼ全身再生するヒメミミズはまだ数種類しか確認されていない。再生は主に、砕片分離と再生による無性生殖を行い、自身で体を引きちぎり数片の断片となり、3-4 日ほどで頭と肛門が前後に再生し、2 週間で元の大きさまで成長して数倍の個体数に増殖することを繰り返す。

従って、この生物は再生幹細胞研究に最適な実験モデル動物である。本研究では、この再生能力の高い環形動物について、哺乳類で知られている幹細胞増殖能とテロメラーゼ活性やテロメアの長さの関連があるかどうかについて、調べることを目的とする。

2. 材料と方法

アガロースゲル上で温度一定の状態で、無性生殖を繰り返しているヤマトヒメミミズを使用した。十分な長さのミミズを 5~10 体節の長さにメスで切断後、0h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h 再生させたサンプルと 0h, 3h,6h,12h の再生初期のサンプルをそれぞれ 6 断片ずつ、用意した。各サンプルのテロメラーゼ活性を、Telo TAGGG テロメラーゼ PCR ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics) を用いて測定した。まず、サンプルを溶解バッファで溶解させ、分光光度計を用いて紫外吸光法でタンパク質濃度を測定して、実験に用いる各サンプルのタンパク量を合わせた。続いてテロメラーゼ反復配列増幅法（TRAP 法）と呼ばれる方法を使って、各サンプル中のテロメラーゼ活性を測定した。真核細胞のテロメア DNA に多く存在する TAGGG 配列をプライマーとして、プライマーエクステンション法を行うと、溶解液中のテロメラーゼによりプライマーに TAGGG 配列が添加される。この添加された長さとテロメラーゼ活性の強さが比例するが、検出感度を上げるために、さらに PCR 法で増幅し、固相に結合させた後、DIG 抗体標識テロメア配列とハイブリダイズさせ、POD 標識抗 DIG 抗体と反応後、POD 活性を発色で検出し、ELISA 装置(Molecular Devices SPECTRA max)を使って吸光度を測定した。吸光度は PCR 産物の長さに比例する。

3. 結果と考察

ELISA 装置での吸光度測定結果を fig.1 に示した。切断してから 1 日目まではテロメラーゼ活性の上昇が認められ、3 日目には活性が元に戻ることがわかった。再生時の幹細胞分裂は、2ー3 日目がピークであることから、幹細胞分裂に伴ってテロメラーゼ活性も上り、分裂後に元の活性値に戻ったと考えられる。さらに再生過程を細かくわけた検討を行うとともに、さらに再生過程を細かくわけた検討を行うとともに、サザンブロットを用いたテロメアの長さの検定なども行い、検討している。

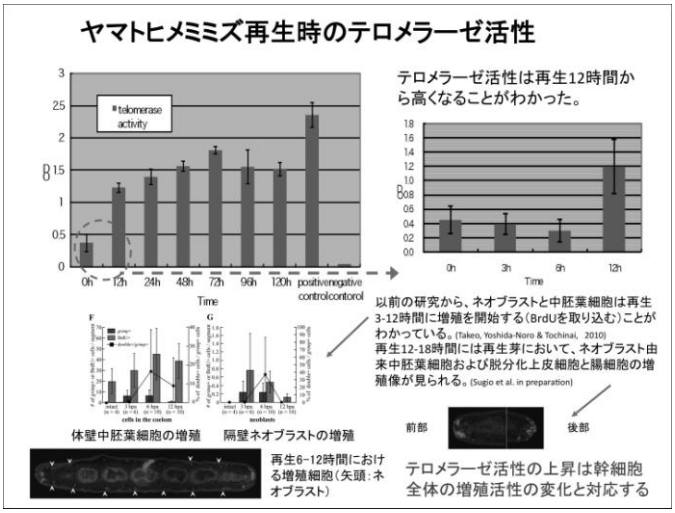

fig.1 再生時間におけるテロメラーゼ活性の変化

参考文献

1). J Meyne et al., “Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)n among vertebrates”, PNAS, 1988, 85 (18) 6622-6626,

2). Lorite et al.,”Conservation of (TTAGG) n Telomeric Sequences Among Ants (Hymenoptera, Formicidae)”, Journal of Heredity, 2002, 93 (4) 282-285.