

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 12 年度博士課程 進学

氏 名 近藤 秀裕

指導教官 渡部 終五

論文題目 キンギョ培養細胞増殖の温度依存性に関する研究

魚類は変温動物でその体温は環境水温とほぼ等しい。温度は代謝反応に大きな影響を及ぼすことから、水温は魚類の生息範囲を決定する大きな要因となる。冷水性、温帯性、熱帯性の魚種が存在するのはこのような理由による。しかしながら例外も存在し、温帯域の閉鎖系水域に生息するキンギョ *Carassius auratus* やコイ *Cyprinus carpio* は冬の 0°C 付近から夏の 30°C 以上まで広い温度域に生息可能である。このような魚類の種特異的な温度反応の機構を解明するために多くの試みがなされて、培養細胞を用いた研究も行われた。その結果によると、魚類の培養細胞は、恒温動物のそれと同様に、一般的にはその体温、すなわち魚類の場合は生息水温とほぼ等しい温度域で増殖可能である。ところが、幅広い温帯域に生息するキンギョの培養細胞は 20°C から 37°C までの広い温度域で増殖可能であることが報告された。しかしながら、このような魚類培養細胞の増殖温度を決定する分子機構は未だ不明である。

本研究はこのような背景の下、広温度域性のキンギョを対象に、まず尾鰭から線維芽細胞を調製した。次に、得られた培養細胞につき、20°C、25°C、30°C および 35°C での培養条件を検討した。また、キンギョ培養細胞において培養温度依存的に発現量に変化する遺伝子を探索した。さらに、キンギョ培養細胞の増殖可能な上限温度を明ら

かにし、このときの細胞の分子レベルの変化を調べたもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. 培養細胞の温度依存的増殖パターン

キンギョ成魚の尾鰭から線維芽細胞を調製した。この培養細胞を 5% ウシ胎児血清および 5% コイ血清を含む培地中、20°C、25°C、30°C および 35°C で培養したところ、各温度における集団倍加時間はそれぞれ、約 36、35、20 および 18 時間であった。次に、20°C で培養した細胞を 35°C へ移したところ、20°C で継続的に培養した細胞に比べ増殖速度は増大した。一方、35°C で培養した細胞を 20°C へ移したところ、35°C で継続的に培養した細胞に比べ増殖速度は著しく低下した。さらに、20 および 35°C で培養した細胞につき、2、10 および 20% コイ血清を含む培地を添加し細胞増殖を観察したところ、いずれの温度においても、血清濃度の上昇に伴い増殖速度は大きく増大した。また、20°C、20% コイ血清を含む培地で培養した細胞の増殖は、35°C、2% コイ血清を含む培地で培養した細胞とほぼ同じ増殖能を示した。

次に、キンギョ培養細胞の増殖を促進するコイ血清中の成分を調べた。コイ血清を限外濾過により分画したところ、分子量 1 万以下およびそれ以上の両画分の成分とも単独では細胞増殖活性を示さず、両画分の共存が細胞増殖に必須であることが明らかとなった。さらに、分子量 1 万以上の高分子成分画分につき超遠心分離で血清リボタンパク質画分を調製し、その細胞増殖活性を調べたところ、本リボタンパク質画分は細胞増殖活性を示した。また、血清リボタンパク質を除いた 66kDa 成分を主成分とする画分にも細胞増殖活性が認められた。なお、本研究で調製したいずれのコイ血清画分においても、その細胞増殖活性は培養温度の影響を受け、20°C での培養増殖速度は 35°C のそれに比べて明らかに低かった。

2. 培養温度依存的に発現変動する遺伝子の探索

キンギョ培養細胞の温度適応機構を明らかにする目的で、20°C および 35°C で培養した細胞につき、cDNA-RDA 法を用い mRNA 蓄積量に差のある成分を検索した。その結果、ニジマスの I 型コラーゲン α 鎖と相同性をもつ cDNA 断片が 35°C で発現量が多い遺伝子としてクローン化された。本 DNA 断片は 106 塩基からなり、ニジマス I 型コラーゲン α 1、2 および 3 鎖とそれぞれ 73.6、49.1 および 75.5% の塩基同一率を示した。ノーザンブロット法によりキンギョ培養細胞における本 I 型コラーゲン α 鎖遺伝子の発現量の培養温度依存的な変化を調べたところ、20°C および 25°C で培養した細胞に比

べ、30°Cでは約 1.5 倍、35°Cでは約 5 倍高い mRNA 蓄積量を示した。

哺乳類培養細胞の I 型コラーゲン α 鎖の mRNA 蓄積量は培養日数の経過とともに増大することが知られている。そこで、20°Cおよび 35°Cでキンギョ培養細胞における I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量の経時変化を調べた。まず、培養開始後 1 日目の細胞における I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量は 20°Cの細胞に比べて 35°Cのものが著しく高い値を示した。いずれの培養温度においても I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量は培養日数の経過に伴い上昇したが、35°Cで培養した細胞における I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量は 20°Cのものに比べ、いずれの時点においても高い値を示した。また、培養温度を 20°Cから 35°Cへ移行し培養した場合、I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量の上昇率は、20°Cで継続的に培養したものに比べ著しく高かった。一方、培養温度を 35°Cから 20°Cへ移行し培養した細胞では、I 型コラーゲン mRNA 蓄積量は移行前のものとはほとんど変わらなかった。

35°Cで培養した細胞の増殖速度が 20°Cで培養したものに比べ著しく高いことから、I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量の経時的な変化は細胞の増殖能と関係することが考えられた。そこで、35°Cで 2%コイ血清を含む培地および 20°Cで 20%コイ血清を含む培地を用いることで、異なる温度で増殖速度をそろえたキンギョ培養細胞につき I 型コラーゲン mRNA 蓄積量の変化を調べた。その結果、前者の 35°Cで培養した細胞の I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量は、後者の 20°Cで培養した細胞のそれに比べ著しく高かった。一方、2%および 20%コイ血清を含む培地中 35°Cで培養した細胞の間で比較したところ、後者の 20%コイ血清で培養した細胞は前者の細胞に 2%コイ血清で培養した細胞に比べて増殖速度が大きかったにも関わらず、I 型コラーゲン mRNA 蓄積量は若干高い値を示したに過ぎなかった。したがって、キンギョ培養細胞での I 型コラーゲンの発現は増殖速度に依存したのではなく、培養温度に依存して増大することが明らかとなった。

3.培養上限温度付近における細胞内タンパク質成分の変化

キンギョ培養細胞が幅広い温度域で増殖可能である理由の一つに、その細胞の培養上限温度がニジマスなどの冷水性魚類の培養細胞のものに比べて高いことが考えられる。このようなキンギョ培養細胞の特性を解明するため、培養上限温度を明らかにし、そのときの細胞内タンパク質成分の変化を調べた。まず、キンギョ尾鰭由来培養細胞は培養温度が 40°Cに達すると増殖を停止することが示された。培養温度をさらに 45°Cに上昇させると細胞は数時間のうちに死滅した。次に、20°Cで培養した細胞の培養温

度を 35°C および 40°C へ上昇させたときの細胞内タンパク質成分の変化を SDS-PAGE で解析した。その結果、細胞内に 70kDa 成分が持続的に発現し、30kDa 成分の一過的な発現が観察された。両成分とも培養温度を 20°C から 35°C へ上昇させたときにはほとんど観察されなかった。なお、培養温度を 40°C へ上昇させたときに観察された 70kDa 成分について、部分アミノ酸配列を決定したところ、HSP70 であることが明らかとなった。

そこで、キンギョ HSP70 をコードする cDNA 断片をクローニングし、これをプローブとして培養温度の上昇に伴う HSP70 mRNA 蓄積量の変化をノーザンブロット法により調べた。その結果、20°C から 35°C へ培養温度を上昇させた場合、温度移行 1 時間後から 2 時間後まで mRNA のわずかな蓄積がみられた。次に、培養温度を 20°C から 40°C へ移行したときには、温度移行 1 時間後から 4 時間後まで著しい蓄積がみられた。一方、35°C で培養した細胞につき培養温度を 35°C から 40°C へ上昇させたときには、温度移行 1 時間後から 2 時間後まで HSP70 mRNA の蓄積がみられた。これらの HSP70 mRNA の蓄積は、いずれの温度条件においても先述の HSP70 の蓄積より早い段階で生じた。

ある程度の高温以上になると細胞内タンパク質は変性する。そこで、キンギョ培養細胞内成分の熱安定性を調べるため、キンギョ尾鰭由来培養細胞について示差走査熱量分析 (DSC 分析) を行った。すなわち、キンギョ培養細胞を HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 中に懸濁し、毎分 1°C の昇温速度で 5°C から 110°C までの DSC 分析に供したところ、5°C から 35°C 付近までは吸熱ピークはみられなかった。その後、35°C から 40°C 付近より吸熱反応が始まり、50°C 付近には極大ピークがみられた。さらに、50°C 以上の温度においてもいくつかのピークが確認された。

以上、本研究により、キンギョ培養細胞は 20°C から 35°C までの幅広い温度で増殖可能であるが、30°C や 35°C で培養したときの増殖速度が大きく、I 型コラーゲン α 鎖の mRNA 蓄積量も高くなることが明らかにされた。また、細胞は 40°C で増殖が停止し、45°C で細胞死が誘導されることが示された。一方、HSP70 の発現は培養温度が 35°C ではほとんどみられず、40°C となったときに著しく蓄積することが明らかにされた。これらの成果は魚類の温度適応機構の一端を示したもので、比較生理生化学上に資するところが大きいものと考えられる。