

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 近藤 秀裕

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。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℃ 付近から夏の 30℃ 以上まで広い温度域に生息可能である。さらに、培養細胞を用いた研究においても、キンギョのそれは 20℃ から 37℃ 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。本論文はこのような背景の下、広温度域性のキンギョを対象に、尾鰭から調製した線維芽細胞につき種々の培養温度における増殖速度、培養温度依存的に発現量が変化する遺伝子の探索、増殖可能な上限温度を明らかにした。

まず、キンギョ尾鰭から線維芽細胞を調製し、5% ウシ胎児血清および 5% コイ血清を含む培地中、20℃、25℃、30℃ および 35℃ で培養したところ、それぞれ 36、35、20 および 18 時間の集団倍加時間で増殖した。また、本細胞の培養温度を変化させると、速やかに各温度に特異的な増殖速度で増殖した。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。コイ血清について分子量 1 万以下の低分子画分および一万以上の高分子画分に分画し細胞増殖活性を調べたところ、両画分の共存が細胞増殖に必須であった。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分画したところ、コイ血清リポタンパク質が細胞増殖活性を示した。

次に、20℃ および 35℃ 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℃ 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 $\alpha 1$ 、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。ノーザンプ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℃ および 25℃ で培養した細胞に比べ、30℃ では約 1.5 倍、35℃ では約 5 倍高い mRNA 蓄積量を示した。

さらに、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。20℃ および 35℃ で培養した細胞においても 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、その増加率は 35℃ で培養した細胞において 20℃ のものにくらべ高い値を示した。また、培養温度を 20℃ から 35℃ へ移行し培養した場合、I 型コラーゲン α 鎖 mRNA 蓄積量の増加率は、35℃ で継続的に培養したものに近い値を示した。一方、培養温度を 35℃ から 20℃ へ移行し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℃ で継続的に培養したものに近い増加率で増大した。次に、20℃ と 35℃ で培養した細胞の増殖速度が等しくなるよう、コイ血清濃度を調製したときの I 型コラーゲン mRNA 蓄積量の変化を調べたところ、35℃ で 2% コイ血清を含む培地中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℃で 20%コイ血清を含む培地中で培養した細胞のものに比べ著しく高かった。

次に、キンギョ培養細胞の培養上限温度を明らかにし、その温度域における細胞内成分の変化を調べた。キンギョ尾鰭由来培養細胞は培養温度が 40℃に達すると増殖を停止し、45℃に上昇させると死滅した。培養温度の上昇に伴う細胞内タンパク質成分の変化を SDS-PAGE で解析したところ、40℃に移行した細胞において 70kDa 成分が顕著に観察された。本 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、HSP70 の mRNA の蓄積は培養温度を 40℃へ上昇させた場合のみならず、20℃から 35℃へ培養温度を移行した細胞においてもみられた。さらに、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を DSC 分析に供したところ、40℃付近から熱変性に伴う吸熱反応がみられた。

以上本論文は、キンギョ培養細胞は 20℃から 35℃までの幅広い温度で増殖可能であるが、30℃や 35℃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を明らかにした。また、細胞は 40℃で増殖が停止し、45℃で細胞死が誘導されることを示した。さらに、HSP70 が 40℃で著しく蓄積することを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。