

論文内容の要旨

論文題目

Effects of High Temperature Stress on Insect Cell Cycle

(高温ストレスが昆虫の細胞周期に及ぼす影響)

氏名

木内 隆史

【序論】

昆虫は変温動物であり、さらに体のサイズが小さいことも加わって外界の温度に敏感に反応する。温度は、行動、代謝、成長、発生、生殖と様々な局面で昆虫に多大な影響を与えている。中でも、成長とは密接な関係があり、外気温と発育ゼロ点（昆虫が成長できる最低温度）を利用して昆虫の成長度合いを計算し、発生予定日を的確に求めることも可能である。すなわち、昆虫の成長は温度に制御されているといっても過言ではない。

昆虫と温度との関係についての知見は多く、先に挙げた5つの局面に対する影響を調べた実験をはじめ、昆虫特有の現象である休眠に関する研究が盛んである。しかし、これらの研究は一律に昆虫生体への影響に迫るものが主であり、細胞レベルの研究はあまり進んでいるとはいえない。

さて、古くから人間の生活と馴染みが深いカイコは、人工飼料を用いて安定に飼育する方法が確立されており、研究材料としても扱いやすい。そこで、カイコの体重増加と温度との関係を調べてみると、温度増加に伴う成長の促進がみられたが、一定の温度を越えると体重増加はむしろ抑制された。この成長が抑制される温度は恒温動物である哺乳類では体温に近い温度であり、このような温度域で成長が阻害されることは、昆虫に特有の温度影響が存在する可能性を示していると考えた。この影響を今までとは異なるアプローチで調べるために、私は昆虫培養細胞を利用した。昆虫培養細胞は由来昆虫の性質を反映しており、培養細胞系を用いることで生体での複雑に絡まりあう温度反応が単純化され、細胞レベルにおける影響を詳細に解析できると考えた。

本研究では、温度ストレスに応じた昆虫培養細胞の細胞周期進行に関わる制御機構を発見し、そのメカニズムの解明に迫った。さらに、生体の細胞においても同様な機構が働いている可能性を追求した。

【結果と考察】

1. 温度ストレスによる昆虫培養細胞の細胞周期 G2 期停止

温度が昆虫に与える影響を細胞レベルで調べるために、カイコ培養細胞（BmN 株）を様々な温度で培養し、増殖・形態・生存率への影響を調べた。その結果、10°Cで増殖は停止し、10°C以上

では温度依存的な増殖率の向上がみられた。この増殖率の促進は 30°C 付近で頭打ちとなり、34°C では増殖はむしろ抑制され、そして 38°C では停止した。増殖が抑制される温度では、細胞形態に異常が見られたがトリパンブルー染色法によりその生存率を調べると、ほぼすべての細胞が生存していることがわかった。細胞が生存しながら増殖を停止するという結果は、細胞周期の途中で停止している可能性を示唆していた。そこで、各温度下で 72 時間培養した細胞における細胞周期の割合をレーザーキャニングサイトメーター (LSC) により解析した (図 1)。その結果、増殖が抑制される温度下で培養した細胞では G2 期の割合が増加していた。このような現象は、他の昆虫培養細胞である Sf9 細胞においても確認された。さらに、温度ストレスにより G2 期に停止した細胞を常温で再び培養することにより、細胞増殖の復帰と G2 期停止の解消をみた。以上の結果は、昆虫細胞が不適な温度条件下に置かれたとき、細胞周期を一時的に G2 期に停止する機構を持つことを示唆した。

2. 高温ストレスによるカイコ培養細胞の G2 期停止機構の解明

細胞周期の G2 期から M 期への進行に関わる因子と細胞周期の制御機構は酵母からヒトにいたるまでよく保存されている。細胞周期が M 期に進行するためには、CDK 複合体を形成する Cyclin B と結合した Cdc2 の不活性化リン酸化状態が、Cdc25 の脱リン酸化作用により活性化状態となる必要がある。そこで、高温ストレスによるカイコ培養細胞の G2 期停止に関しても同様な機構が働いていると考え、Cdc2 のリン酸化状態を Western Blotting により調べることにした。その結果、高温下 (38°C) で培養した細胞の Cdc2 は、常温下 (26°C) と比較しリン酸化レベルが高く不活性化状態にあることがわかった (図 2)。この結果は、高温下で G2 期停止が生じる原因が Cdc2 の不活性化にあることを示している。

次に、この Cdc2 を不活化する機構について推測した。現在までに、ある種のストレスや紫外線等による DNA 傷害を受けた細胞は、G2/M 期チェックポイント機構が働き細胞周期の進行を停止することが知られている。近年、ATM/ATR を介した経路に加え MAPK ファミリーに属する p38 もこの機構の一員であるとする報告がされている。さらに、キイロショウジョウバエでは、高温ストレスによりこの p38 がリン酸化され活性化するという知見があることから、高温下における G2 期停止機構への p38 の関与を推測した。この推測に関して、まずカイコ培養細胞においても高温ストレスにより p38 の活性化が見られることを確かめた (図 3A)。さらに、p38 特異的阻害剤 SB202190 を用いて、G2 期停止の抑制を試みた。この結果、不活性化リン酸化 Cdc2 の減少に伴い、高温下での細胞増殖、そして G2 期にある細胞数の低下がみられた (図 3B、C、D)。以上より、高温ストレスを受けた昆虫細胞ではチェックポイント機構が働くことで、細胞周期を積極的に停止していると考察した。

図 3. 高温ストレスによる G2 期停止機構における p38MAPK の関与

(A) 高温ストレスによる p38 のリン酸化。26°C もしくは 38°C で BmN 細胞を培養し、各時間でタンパク質を抽出した。抗リン酸化 p38 抗体で検出した。(B) p38 阻害剤による不活性化 Cdc2 の減少。SB202190 (SB) を 10 μM 加えて 1 時間前培養を行ったのち各温度で細胞を 24 時間培養した。(C) p38 阻害剤による高温下における細胞増殖の回復。SB を加えて 26°C もしくは 38°C で細胞を 24 時間培養し、細胞数をカウントした。無添加を 1 として相対値で示した。(D) 高温ストレスによる G2 期停止に対する p38 阻害剤の抑制効果。SB を加えて 38°C で 24 時間培養した細胞の細胞周期を LSC により解析した。

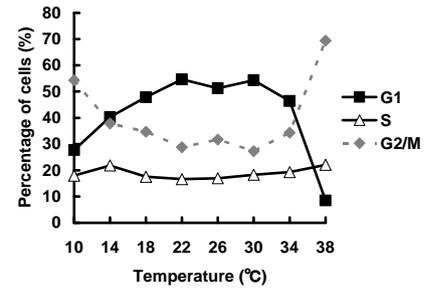


図 1. 様々な培養温度でのカイコ培養細胞の細胞周期の割合

カイコ培養細胞 BmN 株を各温度で 72 時間培養し、スライドガラスに固定後 Propidium iodide (PI) で核染色した。レーザーキャニングサイトメーター (LSC) で核内の DNA 量 (蛍光量) を測定し、細胞周期を解析した。

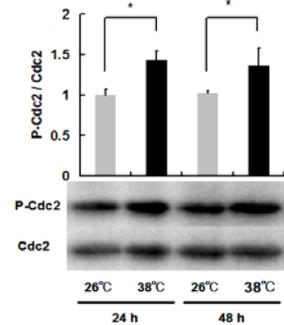
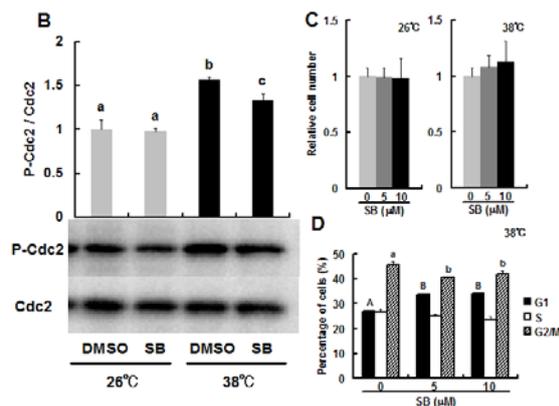


図 2. Cdc2 リン酸化レベルの検出

高温下での Cdc2 リン酸化レベル。26°C もしくは 38°C で BmN 細胞を培養した。抗リン酸化 Cdc2 抗体 (上段)、抗 Cdc2 抗体 (下段) でそれぞれ Western Blotting を行い、イメージソフトでバンドを定量化した。



さらに、高温ストレスの実態に迫った。過去の論文を紐解くと、高温ストレスと酸化ストレスの密接な関係が浮き上がる。そこで、高温下で培養した細胞における活性酸素種の発生状態を、 H_2O_2 の蓄積を指標として調べた。 H_2O_2 特異的蛍光試薬 2',7'-dichlorofluorescein diacetate を用いた蛍光顕微鏡下の観察により、 $38^\circ C$ で培養した細胞における時間依存的な H_2O_2 の蓄積をみた(図4)。この H_2O_2 の蓄積と p38 のリン酸化および G2 期停止機構との関係を調べるために、抗酸化剤であるアスコルビン酸を培地に添加した状態で高温処理を行った。すると、アスコルビン酸の添加により p38 の活性化は遅延し、それに伴う細胞増殖の回復、細胞周期停止からの復帰を確認した(図5)。これらの結果、高温下における酸化ストレスの蓄積が G2/M 期チェックポイント機構を制御している可能性が示唆された。

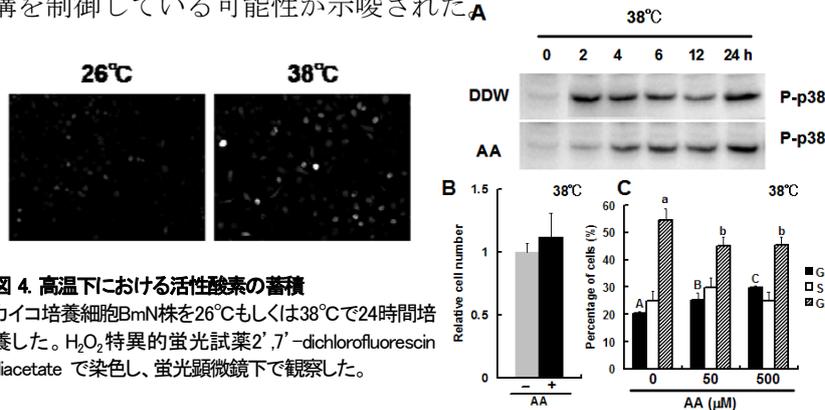


図4. 高温下における活性酸素の蓄積
カイコ培養細胞BmN株を $26^\circ C$ もしくは $38^\circ C$ で24時間培養した。 H_2O_2 特異的蛍光試薬2',7'-dichlorofluorescein diacetate で染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

図5. 高温ストレスによるG2期停止機構における抗酸化剤の影響

(A) 抗酸化剤添加によるp38のリン酸化抑制。BmN細胞に $500 \mu M$ のAscorbic acid (AA)を添加して $26^\circ C$ で24時間の前培養を行った。その後、 $26^\circ C$ もしくは $38^\circ C$ に移し、各時間でタンパク質を抽出、抗リン酸化p38抗体で検出した。(B) 抗酸化剤添加による高温下における細胞増殖の回復。 $500 \mu M$ のAAを加えて $38^\circ C$ で細胞を培養し、細胞数をカウントした。(C) 高温ストレスによるG2期停止に対する抗酸化剤の抑制効果。AAを加えて $38^\circ C$ で24時間培養した細胞の細胞周期をLSCにより解析した。

3. カイコ血球における高温ストレスの影響

培養細胞で明らかとなった高温ストレスによる昆虫細胞の増殖への影響を、カイコ生体内の細胞に対しても確認するために、細胞の単離が容易な血球を用いて解析を行った。まず、4齢幼虫に脱皮した未摂食のカイコを0日齢とし、次の脱皮準備に入る4日齢までを対象として血球数の変化を調べた。血球密度と体重から求めた体液中の総血球数は、 $26^\circ C$ で飼育したカイコ4齢幼虫では食餌開始後から飛躍的に増加するが、脱皮準備に入ると血球の増殖は停止することがわかった。一方、 $38^\circ C$ で飼育したカイコでは、初期に体重増加はみられるものの血球数に大きな変化はみられなかった(図6A)。また、4齢期の途中で温度を変えた場合にも、高温は血球増殖を抑制し、常温飼育に戻すことで再び増殖は開始した。これらの結果は、培養細胞で見られた現象と一致するものであった。次に、血球数の変化が細胞分裂によるものであることを確かめるために、細胞分裂のM期特異的にリン酸化されるヒストンH3のリン酸化抗体を用い、免疫染色法による有糸分裂血球の検出を行った。その結果、血球数の増加する時期に、血球分裂が比較的盛んに起こっていることを確認した(図6B)。

さらに、血球に対してもLSCを用いた細胞周期の解析を行った(図7)。昆虫の細胞には染色体の高倍数化が起こっていることが知られており、カイコの血球にも2C、4C、8Cと3つのDNA量のピークがあることが明らかになった。また、この3つのDNA量をもつ各血球の割合は、4齢期に間にダイナミックに変動していることがわかった。すなわち、4齢0日では2Cと4Cのピークがメインであるが、成長を始めるとピークが高DNA量側へ推移し、脱皮期に入ると再び2Cと4Cに戻るといった動態を示した。この動きは、DNA合成は行うものの、分裂は少ないという血球の性質に起因し、脱皮期での高DNA量のピークの消失は血球の分解がこの時期に生じるためと考えられた。常温下でのこのような変化に対し、高温下では血球のDNA量は増加の一途をたどり、3日齢には8Cの血球の大量な蓄積がみられた。この結果は、高温ストレスを受けた血球がDNA合成能を保持するものの、分裂が停止していることを示唆し、生体内の細胞にも高温ストレスによるG2期停止機構が働く可能性が示された。

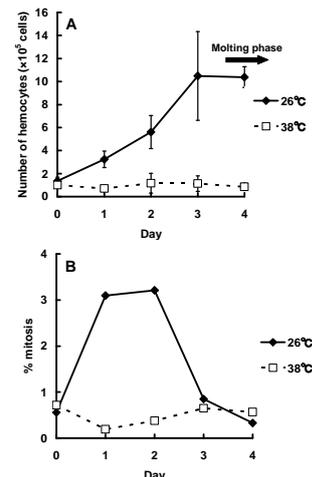


図6. カイコ血球における高温ストレスの影響

(A) カイコにおける体液中の血球数の変化。脱皮したカイコ4齢幼虫を0日として、24時間毎に体液中心血球濃度を測定した。体重の30%を体液量として血球数を計算した。矢印: 脱皮期。(B) 有糸分裂中の血球の割合。M期マーカーである抗リン酸化ヒストンH3抗体により免疫染色を行い、有糸分裂中の血球をカウントした。

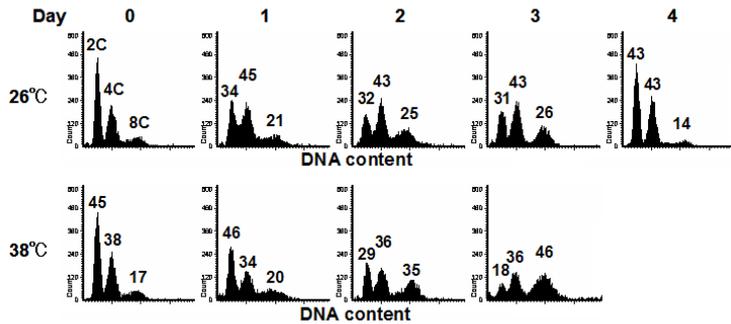


図 7. カイコ血球の細胞周期の解析

各温度で飼育した4齢幼虫から体液を採取し、血球をスライドガラスに固定後PIで核染色し、LSCで解析した。精原細胞を1Cとしたときの各ピークのDNA量、その割合(%)を図中に示した。

そこで、カイコ体液を集め血球タンパク質を抽出し Cdc2 のリン酸化状態を培養細胞のときと同様に調べた (図 8)。まず、血球あたりの Cdc2 のタンパク質量自体がカイコの成長に依存して変化を示していた。摂食前のカイコの血球では Cdc2 のタンパク質量は低いレベルにあったが、発現レベルは 1 日齢で高い水準を示し、成長が盛んな 2 日にそのピークがみられた。その後、脱皮準備に入り始める 3 日以降に再び減少を始めた。このときのリン酸化レベルの推移は Cdc2 の発現量の推移と類似しており、Cdc2 タンパク質量あたりのリン酸化レベルは 4 齢期を通じて大きな変化はなかった。血球の分裂が盛んな時期と Cdc2 の発現量が高い時期に相関性が認められたことは、転写もしくは翻訳レベルの細胞分裂制御機構の存在を推測させた。一方、高温ストレス下における血球 Cdc2 の発現量は、常温下と比較するとそれ自体は少ない値を示すがリン酸化レベルは高い水準を保っていた。以上のことから、高温ストレスによる不活性化リン酸化状態の Cdc2 の蓄積が確認され、生体内の細胞でも G2 期停止機構を備えていると考えた。

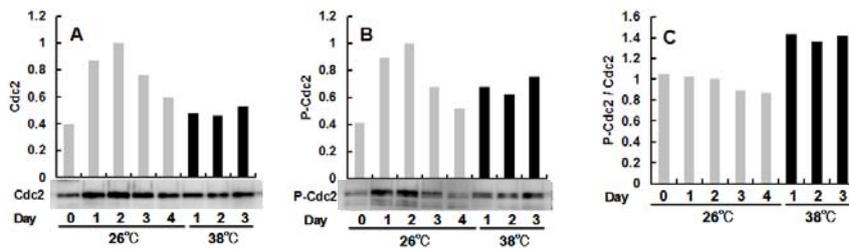


図 8. カイコ血球におけるCdc2の発現量とリン酸化レベル

(A) 4 齢幼虫における Cdc2 の発現量。各温度で飼育したカイコから回収した血球よりタンパク質を抽出し、抗 Cdc2 抗体で検出した。イメージソフトでバンドを定量化した。(B) 4 齢幼虫における Cdc2 のリン酸化状態。同じく、抗リン酸化 Cdc2 抗体で検出した。(C) 4 齢幼虫における Cdc2 タンパク質量あたりのリン酸化レベル。

【結論】

カイコ培養細胞を利用することで、昆虫細胞は温度ストレスを感知すると細胞周期を G2 期に停止する機構を備えていることが判明した。また、高温ストレスについてはシグナル経路に p38MAPK が介在し、高温により活性化された p38 は Cdc25 の脱リン酸化作用を抑制することで Cdc2 を不活性化リン酸化状態に保ち、細胞周期を G2 期に停止していると推測された。そして、高温により酸化ストレスが発生することが、一連の G2/M 期チェックポイント機構が働く要因の一つであることが示された (図 9)。さらに、血球における解析から、カイコ生体内の細胞でも同様な高温ストレスによる細胞周期停止機構が機能していると考察した。

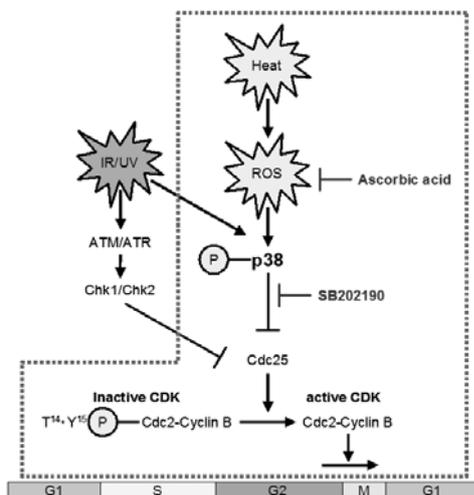


図 9. 高温ストレス下における昆虫の細胞周期チェックポイント機構

高温は細胞内に H_2O_2 を始めとする活性酸素種 (ROS) を蓄積する。活性酸素種は DNA 等を損傷し、そのストレスが p38 をリン酸化、活性化する。活性化された p38 は Cdc25 の脱リン酸化作用を阻害し、CDK 複合体を形成する Cdc2 は不活性化高リン酸化状態が維持される。その結果、細胞は G2 期から M 期に移行することができず細胞周期は G2 期で停止する。(点線枠内)