

論文審査の結果の要旨

氏名 木内 隆史

本論文は、変温動物である昆虫の温度に対する反応、とくに高温ストレスが細胞分裂に与える影響について研究したものであり、3章から構成される。

第1章では、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。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、ほぼすべての細胞が生存していることから、細胞周期の途中で停止している可能性が示唆された。そこで、各温度下で培養した細胞の細胞周期の割合を解析した。その結果、増殖が抑制される温度ではG2期の割合が増加していた。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。

第2章では高温ストレスによる細胞のG2期停止機構を解析した。細胞周期のG2期からM期への進行にはCDK複合体が関与するが、それを構成するCdc2が不活性化リン酸化状態にあることがG2期停止に関して働くと考え、Cdc2のリン酸化状態を調べた。その結果、高温下で培養した細胞のCdc2は、常温下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り、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が示された。次に、このCdc2を不活化する機構について調べた。高温ストレス下においてMAPKファミリーに属するp38のリン酸化を調べた結果、p38の活性化が確かめられ、これがCdc2の不活化をもたらすと推測された。次に、p38の特異的阻害剤を用いて、G2期停止の抑制を試みると、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。これらのことより、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。さらに、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蛍光試薬を用いて観察すると、38°Cで培養した細胞では活性酸素種の蓄積をみた。抗酸化剤のアスコルビン酸を培地に添加した状態で高温処理すると、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が確認された。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に働く可能性が示唆された。

第3章では、カイコ生体内の細胞、すなわち血球を用いて高温ストレスの細胞に与える影響を確認した。4齢幼虫の総血球数は、26°Cでは幼虫経過とともに飛躍的に増加するが、次の脱皮期に入ると増殖は停止した。一方、38°Cの飼育では血球数に大きな変化はみられなかった。また、4齢期の途中で高温に変えると、血球増殖は抑制され、常温飼育

に戻すことで再び増殖した。次に、有糸分裂血球を調べ、血球数の増加する時期に血球分裂も比較的盛んに起こっていることを確認した。血球の細胞周期を解析すると、昆虫の細胞には染色体の高倍数化が起こっており、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。これらの DNA 量をもつ各血球の割合は、4 齢期の間に変化し、脱皮直後の 2C と 4C のピークが、成長を始めると高 DNA 量側へ推移し、次の脱皮期に入ると再び 2C と 4C に戻るという動態を示した。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 の血球の大量の蓄積がみられた。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、分裂を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。次に、Cdc2 のリン酸化状態を調べた結果、高温ストレス下において血球のリン酸化レベルは高い水準であることが明らかになり、生体内の細胞でも G2 期停止機構を備えていると考えられた。

以上から、昆虫細胞においては、高温ストレスがかかると、酸化ストレスがもたらされ、p38MAPK が活性化して、Cdc25 を不活性化し、G2/M 期で細胞周期を停止させると推測された。

なお、本論文は、青木不学、永田昌男との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。