

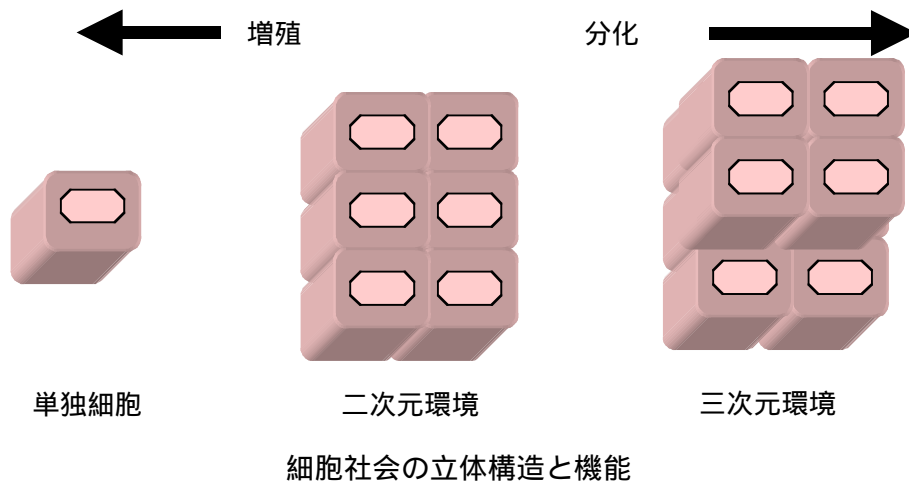
“ 動植物細胞におけるストレス応答機構 ” 研究成果概要

・ 共同研究の目的

生物は 20%の酸素、20℃ 前後の気温、760 ヘクトパスカル程度の圧力、多量の光など多くの物理化学的因子に囲まれ生存している。これら生物を囲む環境因子の値はある範囲内で変動する。その変動に伴うエネルギーの移動は大きなものであるが、生物はその変動に十分に対応するシステムを発達させ、表向きには全く影響を表すことなく生き続けていると考えられている。しかし、近年、生物解析技術の目覚ましい発展に伴い、生物は、これら周囲からの多様な刺激(ストレス)に反応していないのではなく、むしろ積極的に応答している証拠が数多く示されるようになってきている。全体としては、全く無応答であるように思われる自然環境因子のわずかな変化を認知し多彩な生命反応が展開しているのである。そして、その繰り返しが、“生きる”ことにほかならず、その機構を明らかにすることで生命の本質を動的に捉えられるのではないかという新しい研究領域 —ストレス科学— が注目されるようになってきている。

一方、多細胞生物は、多数の細胞からなる器官の集合体であり、それぞれの器官が分化した機能を分担し、互いに相補しあって 1 個の個体として存在する。すなわち、多細胞生物では、個々の細胞がそれぞれ異なった役割(分化した機能)を担って細胞社会が形付けられている。個々の細胞の細胞社会における役割は、基本的に遺伝子に記録されているが、その発現調節のメカニズムには不明な点が多い。最近では、遺伝情報の発現調節が遺伝的に支配されるばかりでなく、細胞社会を取り巻く種々の環境因子によって調節されている可能性が指摘されている。例えば、動物個体を構成する細胞をばらばらにして取り出し、既存の細胞培養技術を用いて体外で培養された細胞は、速やかに分化機能を失うという事実が好例となる。1 度ばらばらにされた細胞を何らかの方法で三次元的に集積させ組織を再構築させると、その細胞群は、生体外で培養されても分化した機能を再び発現できるようになる。従って、動物個体における分化機能の発現に係わる遺伝子発現は、細胞の立体構造の違いなど、細胞社会の環境因子によって調節されている可能性が示唆される。しかし、なぜ、動物細胞が生体外で三次元的に自立増殖できないか、あるいは、細胞の立体構造の変化で制御される遺伝子発現調節の本体は何か、植物と動物細胞に違いがあるか、などは解明されていない。

本研究プロジェクトでは、動植物細胞を材料に、“細胞が周囲から受ける様々なストレスに対応する仕組み”を明らかにすることによって、生命活動の基本的仕組みを理解するとともに、生体のストレス応答機能発現のメカニズムを理解するために計画した。さらに、ストレス応答機能を利用して様々な生体物質を分離・同定し利用する技術を開発し実用化することを目的とした。



II. 共同研究成果の概要

本共同研究は、地域における科学技術力の拡充とそれを支える研究推進基盤の整備を主たる目的として実施された。そのため、“ストレス応答”というキーワードのもとに、幅広い分野にまたがった研究者がチームを作り共同研究を実施した。その結果、各研究グループが利用した研究材料や解析技術は多様であったが各研究グループに共通した目的として、(1) 分化機能を保持した生体等価培養法の開発、(2) 動植物細胞におけるストレス応答機構解明、(3) ストレス応答現象の利用法の検討、(4) 特殊環境下で育成する生物の有用生物機能の探索などを目指して研究を展開した。

1. 分化機能を保持した生体等価培養法の開発とその応用研究

まず、この共同研究では、複数の動植物細胞を三次元的に培養する技術を開発し、細胞を生体外で培養することによって失われる生体環境を保持することによって、種々の分化形質を発現し得る生体等価の実験系を完成した。この事実は、多細胞生物の体細胞の分化機能の発現が、細胞の立体構造や細胞間情報交換能など“細胞社会”によって制御されていることを意味している。こうした技術によって実現した生体等価培養細胞を用いて、細胞社会による分化機能発現制御のメカニズムの解析をおこなうとともに、従来の培養法では実現し得なかった、分化機能への影響を指標にした 1) 臨床前制癌剤感受性の評価法、2) 化学物質の急性毒性の評価法、また、3) 機能性生理活性物質の分離・応用技術の開発に発展している。

本共同研究では、分化機能を保持したまま生体と等価な生理状態を維持できる培養法を複数開発した。その結果、細胞を分化機能を発現したまま培養維持するための基本的条件は、細胞を三次元的に配置することと増殖を抑制することであった。現在、こうした条件を取るによって、なぜ細胞が分化機能を保ったまま維持されるかを詳細に検討中である。

JST 長崎研究室の横山のグループは、三次元的に培養された肝臓細胞では、活性酸素生成量が二次元的に培養されている細胞に比べ 2 倍以上多いことを見つけた。また、活性酸素生成量と p450 酵素活性やアルブミン合成活性に密接な相関性があることを明らかにした。分化機能の発現には、多量の活性酸素が必要とされるということであろう。勿論、活性酸素が多いと細胞損傷性も大きいと予想されるが、三次元的に培養された細胞では、還元型グルタ

チオン量が 3 倍程度高まり活性酸素防御能が増強する。さらに、三次元培養細胞では、細胞間情報伝達に關与するコネキシン 26 タンパクの発現量が増加している。

このように、これまでに報告されている三次元培養法は正常細胞の分化機能の発現を誘発するが、細胞の増殖を維持することはできなかった。しかし、本研究では、JST 長崎研究室の森田らによってアルギン酸ビーズに封じ込めることによって、ヒト正常初代培養細胞を増殖状態で維持可能であることが発見された。これは、世界に先駆けた発見であるとともに、細胞の増殖と分化制御のメカニズムを明らかにするために重要な情報を与えてくれるものと期待できる。

開発した機能発現培養技術の応用という面でさらに実用化に向けて複数の研究を展開した。癌の最大の特徴は、その悪性度の進行度合いによって、性質を刻々と変化させることにある。このことは、例え同じ臓器に発生した癌であっても、その進行の度合いによって、また、個人毎に適する治療法は異なることを意味する。そのため、最も効果的な治療を行うために、治療に先だって癌組織の一部を採取し、体外で培養し制癌剤感受性を調べ最も適する治療法を選択する技術が熱望されている。しかし、新鮮癌組織由来細胞は、体外で培養しにくく判定に時間がかかる、また、正常細胞が混在すると制癌剤感受性が修飾されるなど解決すべき課題が多い。聖マリアンナ大学の研究グループは、早稲田大学の研究グループとともに開発した温度感受性ポリマーを使ったスフェロイド培養法に改良を加え、ゼラチンを含有させることによって、50%以上の新鮮癌組織由来細胞を簡単に培養し、正常細胞の増殖を抑えることが出来ることを発見した。この技術は、治療前制癌剤感受性判定法として有用であり実用化を目指している。

秋田住友ベークライトの研究グループは、ラット肝臓細胞をコラーゲンゲル上で三次元培養し、培養液成分等の詳細な検討を行ない、肝臓の持つ分化機能を数週間維持発現できる培養系を実現した。この培養系を用いることにより、肝臓細胞に特徴的なルブミン合成能、アンモニア代謝、P450 酵素活性、中性脂肪合成、グリコーゲン合成等の機能を生体と等価で実現することに成功し、毒性評価、薬効評価系としての実用化の段階に差し掛かっている。

倉敷紡績の研究グループは、血管平滑筋細胞の分化機能の発現も増殖制御（増殖抑制）と密接に連動した現象であることを発見した。このようにこのこの共同研究で得られた結果は、細胞の由来組織に関係なく、多くの組織について、細胞の分化機能発現制御が細胞増殖制御と密接に関連した現象であることを支持している。

2. 動植物細胞におけるストレス応答機構解明

一方、生体のストレス応答機構に関する基礎研究においても、いくつかの興味深い知見が得られている。特に、ストレスの受容と情報伝達のメカニズムに関する研究が進むとともに、ストレス応答のメカニズムは、植物でも動物でも基本的に差がないことが改めて確認された。ストレス応答機構は、生物に普遍的な最も基本的な現象である。

ストレスの受容に関して、共同研究で得られた結果から、ストレスの種類に限らず、ストレス応答反応の重要な役割を活性酸素が果たしていることが推測される。植物細胞では、農業生物資源研究所のグループがシロイヌナズナ培養細胞、長崎大学のグループがハマボウフ

ウの培養細胞を材料にして活性酸素がストレス応答反応の引き金になっていることを見つけた。活性酸素の刺激が種々の情報伝達機構を経由して、エチレン、アントシアニン、フラノクマリンといったストレス応答産物の産生につながるが、いずれも、細胞の増殖と分化に密接に関連することは興味深い。同様の反応が、 H_2O_2 や酵母抽出液などでも起きるので、かなり幅広いストレスに共通した現象である。

動物細胞では、長崎大学および JST 長崎研究室のグループが、ヒト細胞を使って、ガンマ線、紫外線、メカニカルストレス、熱、酸素ストレスなどで、植物細胞と同様に多くの活性酸素種がストレス応答反応の引き金になっている可能性を指摘した。動物細胞でも植物細胞と同様、ストレス応答反応の多くが細胞の増殖制御と密接に関係した現象であることが支持される。長崎大学の鈴木らは、X線照射されたヒト胎児細胞のストレス応答反応を詳細に調べ、数 cGy 以下の線量域で見られるストレス応答反応とそれ以上の線量域で起こるそれが全く異なり、同じストレスでもストレスの量によって応答様式が全く異なると報告した。このように、ストレス応答機能の発現程度は、生体に備わっているストレス処理能力とのバランスで決定されることに注目せねばならない。生物は、その活動のエネルギーを活性酸素ラジカルを介して産生し生物反応を進行させているので、生物が生きること自体が、多くのラジカルを発生し、それに曝されることを意味している。従って、ラジカルの攻撃を避けるために、進化の過程で、多彩なラジカル消去機能を獲得せねばならなかったと思われる。言い換えれば、巧妙な機能(群)を備えた生物ほどストレスに強く、生存に有利であるに違いない。ストレスの質や量によってそれらを組み合わせ発現させるものと思われる。

長崎大学のグループが報告した例は、複数のストレス応答機構がストレスの量によって協同的に働くことを示した好例である。彼らの研究では、植物色素のフラボノイド色素は、代表的なラジカルスクベンジャーであるが、通常、多量のフラボノイドを産生しているハマボウフウ細胞は、X線や酵母抽出液や H_2O_2 処理によって生ずる活性酸素をアントシアニン(フラボノイドの一種)で消去し、特別のストレス応答機能を発現しなくても生存できる。しかし、フラボノイドを産生できない細胞は、ストレスによって生ずる活性酸素を消去できないので、PAL 活性を上昇させフラノクマリンを産生することによってストレスの影響を巧く回避しているようである。AAPH のように有機ラジカルを生ずるが活性酸素を生じないストレス処理では、こうしたことは起こらない。これらのことは、同一生体でストレスの量と質を判断して選択的応答をしている好例である。

一方、長崎大学のグループは、発がんや突然変異を起こす原因が、ストレス応答現象の引き金になる活性酸素などの反応活性の高いラジカルではなく、活性の低い有機ラジカルであることを指摘した。この有機ラジカルは、一次的に誘導された活性ラジカルが生体内の有機物と反応して生じ、常温において半減期が 20 時間を超える活性が低いラジカルである。このラジカルは、細胞の生死に関することはないが、異常生化学反応の原因となり、突然変異や発がんの原因となるとと思われる。しかし、こうしたラジカルもビタミンCで効率よく消去されるので、如何に活性酸素ラジカルをコントロールできるかが健やかな生涯を送れるかにかかっているといえる。

この意味において、生体に対する酸素の影響評価は、生命科学の分野においてかなり重要

な問題である。しかし、これまでの生命科学の研究は、生体内における酸素圧から大きくはずれた 20%大気圧下で行われている。そのため、酸素が大過剰の外的ストレスとなって 0.5%程度の酸素圧にある生体内と細胞の置かれた環境は全く異なるものと考えられる。言い換えれば、通常の細胞培養条件は、細胞にとって酸素ラジカルとの戦いに終始する異常な状況であると思われる。こうした状況下で、生体と等価のストレス応答反応が再現されている可能性は少ないのではないだろうか？

そこで、本共同研究では、生体と等価の 0.5%酸素圧における細胞培養と解析が可能なように研究器材の開発と改良を行うとともに、生体と等価の酸素圧条件下における生体反応を評価することを計画し、池本理工工業とともに酸素圧調節型細胞培養装置を完成させた。

これまでに、通常の細胞培養時の酸素濃度(20%)のおよそ 1/4 の酸素濃度(5%)で正常ヒト細胞を培養すると、*c-fos* や *c-jun* の活性化が起きると共に細胞増殖能が亢進されることがわかった。結果として、細胞寿命の延長が観察された。しかし、癌細胞(HeLa)では、こうした現象は見られなかった。低酸素状態で培養することによって細胞内酸化度は低下するが、癌細胞では全く変化しない。今後は、酸素ストレスに対する生体応答反応に特別の注目を払いたい。

ラジカルを起源とした情報は、情報伝達機構を介して、核内へ伝えられ、種々のストレス応答反応を起こす。共同研究の結果を総合すると、その経路は、MAP カイネースファミリーを介した経路、PKC など膜介在性タンパク質酸化酵素を介した経路、p53 タンパク質を介した経路、NF- κ B を介した経路など多彩であることが判った。それらの経路は、独立して存在するのではなく、互いにネットワークを形成してクロストークしながら機能していると思われる。どの経路が働くかは、ストレスの質と量の違いによって決定されるようである。ストレス応答反応のメカニズムを理解するうえで、情報伝達機構を詳細に解析する必要性が増すものと考えられる。

3. 海洋微生物ライブラリー構築および海洋微生物の有用生物機能の探索

海洋環境は、高塩濃度、低酸素圧など地上生物が経験しない特異なストレス環境である。また、海洋は、生命誕生の場である。そして、水に守られ比較的環境の変動が少なく生命を守りやすい環境であり地上に比べ圧倒的に多様な生物が生存している。しかし、人類は、これまで、比較的大型の海洋生物を捕獲して食料とする以外に海洋生物資源に目を向けることは少なかった。生物は、環境と相互作用をしつつ、環境に適応しつつ生存するとすれば、地上とは全く異なる環境に住む海洋生物には、地上生物が持たない機能を備えるものが多数存在すると予想される。そこで、共同研究で得られた基礎的な研究成果を実用面研究として反映させる一つの試みとして、長崎県が海洋県であるという特徴を生かし、共同研究参加者の全面的な技術支援のもと、海洋微生物ライブラリー構築および海洋微生物の有用生物機能の探索事業を長崎県産業振興財団とともに開始した(長崎県産業振興財団、JST 長崎研究室、長崎大学、長工醤油味噌共同組合、三菱長崎機工株式会社)。

まず、海洋微生物から有用な医薬品及び食品素材を獲得する目的で海洋微生物シード(種)ライブラリー構築事業を開始した。そして、これまでに、およそ 13,000 株のシードライブラリ

ーを構築した。

長工醤油味噌および長崎大学のグループは、このシードライブラリーから地上生物が分解できない高分子アルギン酸を分解する能力を持つ海洋微生物の分離を試み、30 数種のアルギン酸分解細菌の分離に成功した。、調理味噌や醤油製造の過程で大量に生ずるだし昆布残渣は、その重量の 90%以上が高分子アルギン酸であるが、ヒトを始め地上生物では分解できず、地上で分解しにくい産業廃棄物として大きな問題を生じている。この研究グループは、廃棄物問題を解決するとともに、高分子アルギン酸の分解生成物の食品及び薬品素材化を試みているが、アルギン酸の分解生成物(4-7 量体)のなかにヒト癌細胞の増殖を抑制する能力の持つものが存在することを発見し、さらに詳細を調査中である。

さらに、グループでは、赤潮原因藻類を分解する細菌（長工醤油味噌、長崎大学）、環境汚染化学物質の分解菌（長崎三菱機工株式会社）、病因タンパクの分解菌（長崎大学）などをこのシードライブラリーから探索中である。

同時に、JST 長崎研究室では、アルギン酸が地上動物の体内では、生物学的に非常に安定で毒性を示さない性質に注目して、寒天や合成化学ポリマーに替わる細胞培養の培養支持体としての応用をはかった（JST 長崎研究室、長崎大学）。そして、ヒト正常初代培養細胞をアルギン酸ビーズに封じ込めることによって、継続的に増殖を続けさせることが可能であることを発見した。ヒト正常培養細胞を、三次元的に継続して増殖させることに成功した例は世界で始めてであり、生命科学の培養細胞としての利用が期待される場所である。

まとめ

成果を整理すると、細胞の分化と癌化は、細胞の増殖制御機構と密接に関係する現象であることを改めて支持する。三次元構造を持たせた正常細胞は、完全に増殖を抑制されるが、多彩な分化機能を発現する。一方、放射線や熱、生体を取り巻くバラエティーに富んだストレスは、一過的な細胞増殖抑制を引き起こし、レベルは低いものの一過的な分化機能の発現に繋がるのではないか。その分化機能発現は、増殖促進系が十分に生き残っている二次元培養細胞では弱く可逆的であるが、増殖促進系が厳密に抑制されるか、脱落する三次元培養細胞では強く非可逆的になるのではないだろうか。

研究を通じて特記すべきもう一つの観察は、多くの研究で細胞の増殖度を著しく変化させる時期に対応して、著しい細胞形態の変化が観察されることである。現時点では、細胞形態変化の生物学的意義は不明であるが、スフェロイド構造をとることによって、分化機能を発現できることと合わせ考えると、“細胞の分化や増殖が、細胞形態で制御されている”とする本共同研究が掲げる仮説の信憑性は高く今後この分野における研究の発展が期待される。

平成 12 年 1 月 19 日
共同研究推進委員長
長崎大学薬学部
教授 渡邊正己