

1. 研究課題名：変温動物細胞におけるストレス応答機構に関する研究
2. 研究機関：長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設
3. 研究者：竹下哲史 (juniper@net2.nagasaki-u.ac.jp)
4. 研究協力者：松田尚樹 (長崎大学アイソトープ総合センター)  
横山兼久 (科学技術振興事業団長崎研究室)  
森田直子 (長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設)  
柳瀬 浩 (倉敷紡績・技術研究所)  
鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己 (長崎大学薬学部放射線生命科学)
5. 研究期間：平成7年～9年5月

#### 6. 要約

タイマイ由来細胞は線維芽様であり、DMEM/10%FBS で活発に増殖した。25 ~ 33 で増殖可能であり、培養至適温度は 33 であった。37 では可逆的に増殖が阻害された。ヒト胎児細胞の hsc73 を認識する抗体で検出可能な hsp を constitutive に発現し、その発現量は温度依存的に増大した。hsp90 の誘導に関しては活性酸素分子種が重要である可能性が示唆された。通常の培養条件下で細胞外にスーパーオキシドを産生し、その産生量は 37 で増大した。40 で細胞を処理すると、1 時間処理直後の細胞内酸化状態は明らかに亢進しており、熱処理後 33 で 1 時間放置すると、ほぼ定常状態を回復していた。これらのことから、細胞が熱の刺激を受容して、細胞内或いは細胞外に活性酸素を放出すると、細胞内が通常の還元状態から酸化状態へと変化し、その結果細胞内に一部或いは完全に変性した蛋白質が増加することに呼応して熱ショック蛋白質が動員される、即ち、熱に対する細胞のストレス応答のひとつには活性酸素が引き金となるものがあるのではないかと考えられた。

#### 7. 研究目的

生体は自身の生存環境の中で様々なストレスに晒されている。しかしながら、生物が種を維持、存続していくためにはそれらの負荷に適応していかなければならない。例えば「熱」ストレスに対して生体は Heat Shock Protein (hsp) と総称される数種類の蛋白質を合成することで対処している<sup>1)</sup>。これら hsp(s) に関するこれまでの研究の殆どは哺乳類細胞で行われてきたが、哺乳類以外の細胞、例えば変温動物の細胞ではその応答性は著しく異なることが予想される。すなわち、哺乳類以外の細胞も目的によっては極めて有用であり、場合によっては哺乳類の細胞では代用できないものもある。学術的、或いは実用的な重要性から、魚類の細胞が多く使用されているが、研究例の少ないものほど重要な知見をもたらす可能性は大きい。本研究ではウミガメ (タイマイ) の細胞を対象としたが、これは細胞レベルでの研究例が皆無に等しいこと及びウミガメの性決定が産卵後の孵卵温度に依存することに拠る。性決定に関する数十年前までの一般的な見解は、「全ての有羊膜類は類似の遺伝子型性決定機構を共有する。すなわち、個体の性は、受精の瞬間に遺伝子及びそれを担う性染色体によって決定され、雌雄の性比は原則として 1 : 1 である。」というものであった。ところが、1966 年、M. Charnier によってトカゲ (*Agama agama*) の孵化したばかりの幼体の性比は、孵卵温度で決定されるという報告がなされ<sup>2)</sup>、それ以来温度依存性決定機構は爬虫類の多く

の種で観察され、現在では周知の事実となっている<sup>3)</sup>。有性生殖を行う生物にとって、性決定は種の保存の根源に関わる大問題である。その因子が産卵場の環境（温度）であるということは、ウミガメが温度変化に対して特異な応答性を有していることを示すものであると考えられる。そこで本研究は、鳥類や哺乳類の進化上の子孫である爬虫類の中で、温度依存的な性決定機構を有すウミガメ（タイマイ）の細胞を用い、形態変化、生存率及び hsp の発現からその熱ストレスに対する応答特性を探り、動物細胞におけるストレス応答機構の解明に関する研究の一翼を担おうとするものである。

## 8. 材料と方法

### 【細胞】

タイマイ胎児筋肉由来細胞は、産卵後 42 日目の embryo 腹甲板を剥ぎ取り、露出した筋肉部分を 0.25%トリプシンを含む PBS 中で細切し、室温で 10~20min 放置後、遠心・洗浄し、細胞と組織の mixture をコラーゲンコートディッシュに播種したものを初代培養とした。

### 【細胞培養】

非必須アミノ酸、ビタミン類及びピルビン酸ナトリウムを添加した DMEM / 10%FBS を用い、5% CO<sub>2</sub> 存在下、33 で培養した。培養細胞がコンフルエントになった時点で 1:4 に継代した。実験には継代数 5~10 の細胞を用いた。

### 【細胞増殖性】

35mm ディッシュあたり  $2 \times 10^4$  個の細胞を播種し、培養温度 25、27、30、33 及び 37 における細胞数を血球計算盤を用いてカウントした。

### 【細胞増殖の可逆性】

35mm ディッシュあたり  $3 \times 10^4$  個の細胞を播種し、一旦 37 で 48 時間培養後、33 に戻して培養した細胞数の経時的変化を調べた。

### 【生存率曲線】

35mm ディッシュ或いは T-25 フラスコでコンフルエントまで培養した細胞を 40 或いは 43 で 1、2、4 時間処理した後、トリプシン/EDTA により回収、細胞を 60mm ディッシュあたり 100 個になるように播種後 33 で培養し、2 週間後にギムザ染色したコロニー数をカウントした。また、MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 法により細胞増殖活性を測定した。

### 【熱ショック蛋白質の誘導】

熱処理；細胞がコンフルエントまで増殖した 60mm ディッシュの周囲をシールし、プラスチックバッドに入れ、恒温水槽中 40 で処理した。

AZT 処理；アゼチジンカルボキシル酸 (L-azetidine-2-carboxylic acid, SIGMA) を PBS

に溶かして 100mM に調製し、コンフルエントな細胞を終濃度 2mM で 16 時間 (25、33 ) 処理した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理 ; 市販の過酸化水素水 (30%) をクレブス-リンガー溶液 (KRP) で希釈し、240nm の吸光度を測定し、過酸化水素のモル吸光係数 (43.6M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>) から濃度を算出した (用時調製)。35mm ディッシュでコンフルエントにある細胞の培養液を DMEM に交換し、終濃度 2.5、5、10mM になるように過酸化水素水を添加し、33 で 30 分間処理した。200 U / ml のカタラーゼを添加後、DMEM で洗浄、DMEM/10% FBS に培地交換し、1~5 時間培養した細胞を回収した。

O<sup>2·</sup> 処理 ; 25mM HEPES を含む KRP で 2mM のヒポキサンチン (Wako) を調製した。35mm ディッシュでコンフルエントにある細胞の培養液をヒポキサンチン溶液と交換し、これに 15、30、50mU / ml となるようにキサンチンオキシダーゼ (Buttermilk, Wako) を添加した。33 、1 時間放置後、DMEM で洗浄、DMEM/10% FBS に培地交換し、2 時間培養した細胞を回収した。

#### 【熱ショックタンパク質の免疫染色】

35mm ディッシュ中、カバーガラス上で増殖した細胞を 40 、4 時間処理の後、33 、4 時間及び 20 時間培養し、PBS で洗浄後、メタノール中 -20 で固定した。PBS 洗浄後、一次抗体として monoclonal (mouse) anti-heat shock protein 70 antibody (Affinity Bioreagents 社) と反応させ、続いて二次抗体として FITC 標識 anti-mouse IgG で蛍光染色したものを共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM410) で観察した。

#### 【熱ショックタンパク質の検出】

種々の条件で熱処理した細胞における hsp の検出はウエスタンブロット法により行った。60mm ディッシュでコンフルエントまで増殖した細胞を種々の条件で熱処理後、トリプシン / EDTA で回収し、RIPA buffer [50mM Tris-HCl (pH 7.2), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxycholate, 0.1% SDS] で lysis した。凍結融解後、遠心分離 (18,500 × g) し、上清のタンパク質量を測定後、最終質量 10~20 μ g を SDS-PAGE (hsp73 の分析には 7.5%ゲル、hsp90 の分析には 6%ゲルを使用) に供した。泳動終了後のゲルからタンパク質を PVDF 膜 (Millipore 社) にブロッティングし、hsp73 の分析には 10%スキムミルク / TBS-0.1%Tween 中で、また hsp90 の場合には 5%スキムミルク / PBS-0.1% Tween 中で一晩ブロッティングした。ブロッティング後の PVDF 膜を、一次抗体として、monoclonal (mouse) anti-heat shock protein 70 antibody (Affinity Bioreagents 社)、又は anti-90kD heat shock protein monoclonal antibody (Stress Gen 社)、二次抗体として、羊由来ビオチン化 anti-mouse Ig whole antibody (Amersham 社) と反応させ、続いて streptavidin-alkaline phosphatase (Amersham 社) との反応を行い、NBT / BCIP 法による発色で目的とするタンパク質のバンドを可視化した。

### 【細胞内酸化還元状態の観察】

細胞内の酸化還元状態は、次の二種類の蛍光試薬で細胞を染色することにより観察した。

#### 1) 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)染色<sup>4)</sup>

35mm ディッシュ中の無蛍光カバーグラス上で、サブコンフルエントよりも若干少なくなるように播種した細胞を熱処理した。培地を 5  $\mu$ M の DCFH-DA を含む Hank's 液で置換した。室温で 5 分間放置後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 2) dihydrorhodamine (DHR)染色

35mm ディッシュ中の無蛍光カバーグラス上で、サブコンフルエントよりも若干少なくなるように播種した細胞を熱処理した。PBS(-)でカバーグラス上に接着した細胞を洗浄し、終濃度 2  $\mu$ M の DHR で 1 時間、通常の培養条件下でインキュベーションした。PBS(-)で細胞を十分に洗浄し、0.2% TritonX-100 / 10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 【スーパーオキシド 放出の測定】

O<sup>2-</sup> 放出は ferricytochrome c の還元を分光学的手法により測定した<sup>5)</sup>。50  $\mu$ M の cytochrome c を 35mm ディッシュで培養した細胞に加え、33 でインキュベーションした。cytochrome c の還元は、50U superoxide dismutase (SOD) ml<sup>-1</sup> 存在下或いは非存在下で 550-540nm における吸光度の上昇として測定した。cytochrome c の還元量は、0 時間のバックグラウンドで補正した後、モル吸光係数 (19.1mM<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>) から nmol に換算した<sup>6)</sup>。

### 【過酸化水素 の測定】

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は scopoletin 法により検出した<sup>7)</sup>。培養液に終濃度 6  $\mu$ M の scopoletin と 10U horseradish peroxidase ml<sup>-1</sup> を加えた 1ml の反応系で、励起波長 350nm、蛍光波長 460nm による蛍光強度の減少を蛍光分光光度計で測定した。市販の過酸化水素水 (30%) をクレブス-リンガー溶液で希釈 (用時調製) したのち、240nm の吸光度を測定し、過酸化水素のモル吸光係数 (43.6M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>) から濃度を算出した。この過酸化水素溶液を用いて、検量線を作成した。

## 9. 結果

### 【細胞の増殖性】

研究目的の項で述べたように、ウミガメの細胞生物学的な研究は皆無に等しく、培養温度や培地に関するデータは全く無い。参考にできるとすれば、多くの研究例がある魚類の細胞についてのデータである。水棲生物である魚類の細胞の培養温度は、例えばサケ科の冷水性魚類で 15~20、コイ、メダカ、ウナギなど温水性淡水魚では、多少の例外を除き 25~30 が適温である。そこでタイマイ細胞に関しては、培養温度 30、培地は哺乳類細胞で一般的に用いられている Dulbecco's Modified Eagle Medium に 10%FBS を加えたものを用い、その増殖性を顕微鏡下で観察した。その結果、速度は多少遅いものの確実に増殖することが

わかった。そこでさらに増殖性を高めるために、非必須アミノ酸、ビタミン類及びピルビン酸ナトリウムを培地に添加したところ、非常に良好な増殖を示したことからこれをタイマイ細胞の増殖培地とし、次に細胞増殖に及ぼす培養温度の影響を調べた(図1)。温度は、多くのウミガメの性決定に関する臨界温度である 25 から哺乳類細胞の培養温度である 37 までの間に設定し、各培養温度における細胞数の経時的変化を示したものである。培養温度が 25~33 の間では、温度依存的に増殖性が増し、培養至適温度は 33 であることがわかった。

一方、37 においては、本細胞の増殖は完全に阻害された。

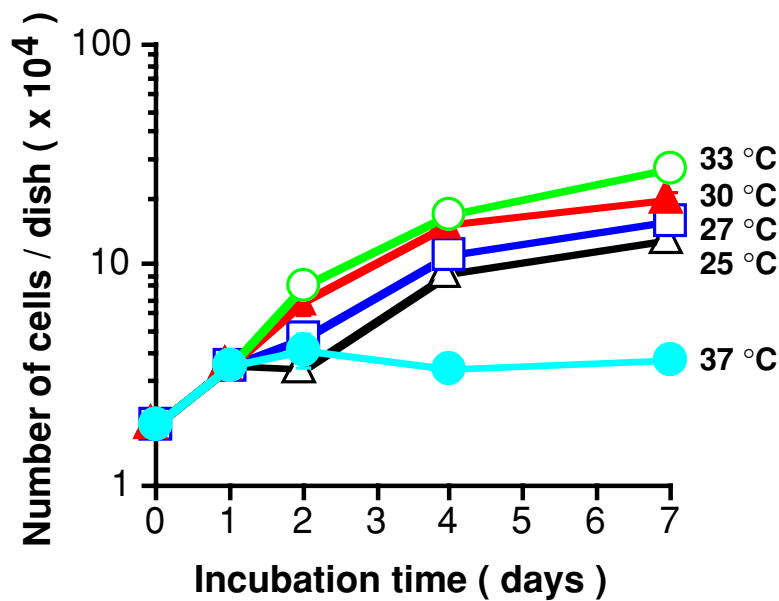


図1 タイマイ細胞の増殖曲線

【37 における細胞増殖阻害】

図1に示したように、本細胞を 37 で培養すると増殖が阻害された。この阻害が細胞数の

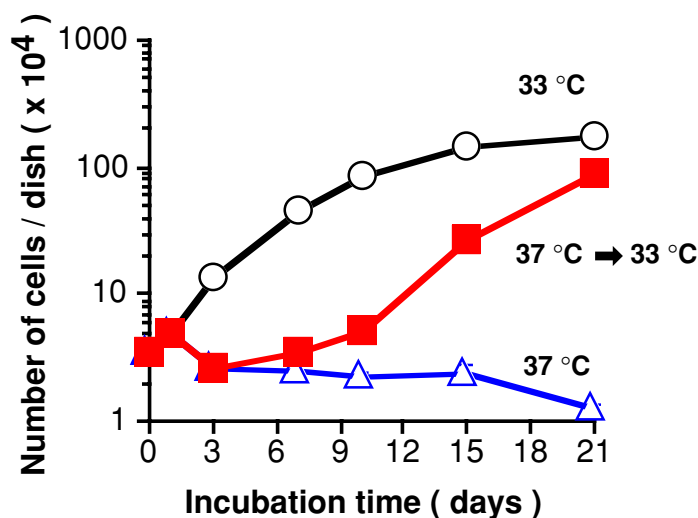


図2 増殖阻害の可逆性

多少に関わらず起こる現象であることを確認するために、 $1 \times 10^5$  個の細胞を播種し細胞数の経時的变化を調べたところ、全く同じ結果が得られた。次にこの増殖阻害が可逆的であるのかどうかを調べるために 33、37 及び 37、48 時間培養後 33 に戻して培養した細胞の増殖性を比較した (図 2)。37 で 48 時間培養することにより増殖が阻害された細胞を、33 に戻して培養を続けたところ、数日間の lag phase を経たあと増殖性は明らかに回復し、3 週間後には control の細胞数にほぼ匹敵するところまで増殖した。

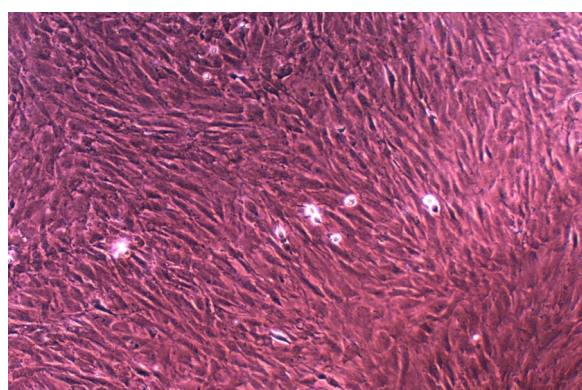
更に、増殖が阻害された細胞集団が細胞周期のどこに位置しているのかを調べるために、37 で 24、48 時間培養した細胞、及び 24 時間後に 33 で 24 時間 recovery した細胞を回収後エタノールで固定し、propidium iodide (PI) で DNA を蛍光染色後、フローサイトメータで測定したところ、37 では time-dependent に G<sub>2</sub>/M 期にある細胞集団の増加が観察され、33 に戻すと再び減少した (表 1)。

表 1 異なる培養条件下における細胞周期

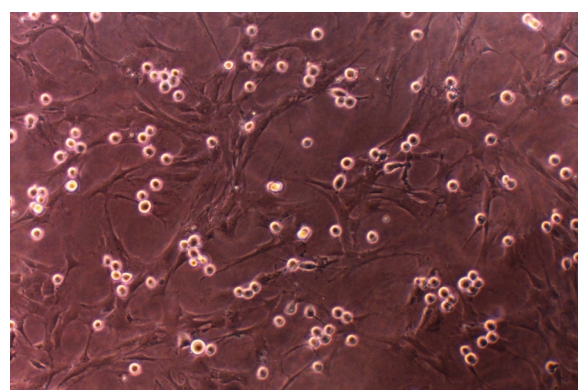
	33 °C	37 °C 24 hr	37 °C 48 hr	37 °C 24 hr 33 °C 24 hr
G <sub>0</sub> / G <sub>1</sub>	84.03%	70.43%	70.35%	84.40%
S	15.97%	16.76%	10.05%	7.21%
G <sub>2</sub> / M	0.00%	12.81%	19.60%	8.39%

培養温度を 37 にシフトした細胞の最も特徴的な変化は、24 時間後に monolayer の一部の細胞が球状となって浮遊してくる現象である (図 3)。

その要因の一つとして、培養液中に産生される液性因子の関与を考え、37 で conditioned medium を調製しその影響を調べたが、細胞増殖性の変化及び浮遊細胞の出現は全く観察されなかった。



33 で培養



37 に移して 24 時間後

図 3 熱で誘導されるタイマイ由来細胞の形態変化

### 【熱ショックに対する応答性】

本細胞は 37 に曝されると増殖が阻害されることが明らかとなったが、次にそれ以上の温度における細胞の熱ショックに対する応答性を調べた。

細胞を 40 、4 時間処理した場合、形態的には 37 の場合と同様に monolayer の一部の細胞が球状となって浮遊する以外には大きな変化は認められなかった。この条件での細胞の生存率を調べたところ、熱処理直後の MTT 法では変化は無く、温熱処理後、33 で 24 時間培養した細胞では 81%、コロニー形成法では約 70%であった (図 4 A)。

一方、43 処理の場合、形態的にもそのダメージは大きく、2 時間後には細胞が剥がれはじめ、4 時間後には鱗片状に剥離した。細胞の生存率は、熱処理直後では変化は無かったものの、処理 24 時間後には 56%となりコロニー法では約 10%にまで低下した (図 4 B)。

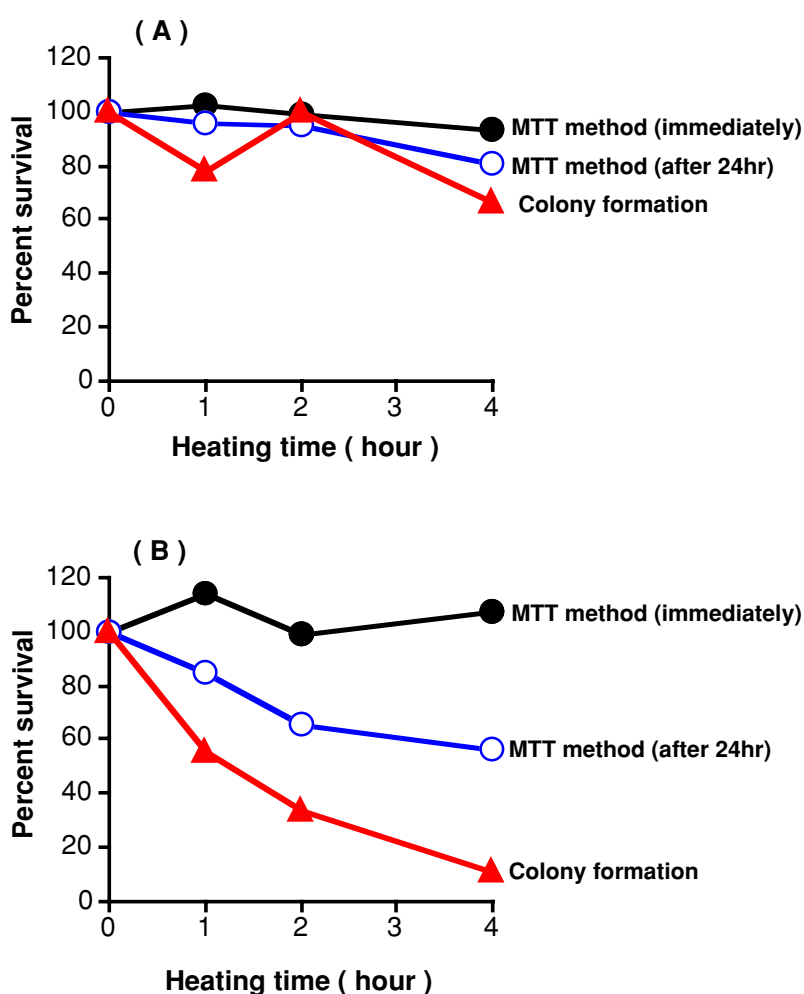
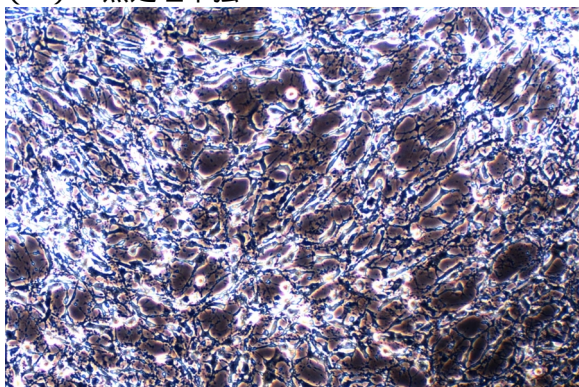


図 4 熱処理した細胞の生存率 : (A) 40 、 (B) 43

しかしながら、細胞を一旦低レベルストレス (37 、24 時間) で前処理し、続いて 43 、4 時間処理の step-up 加温した細胞は鱗片状に剥離することも無く (図 5)、コロニー形成法による生存率も 65%を示した (図 6)。

(A) 熱処理単独



(B) step-up 加温

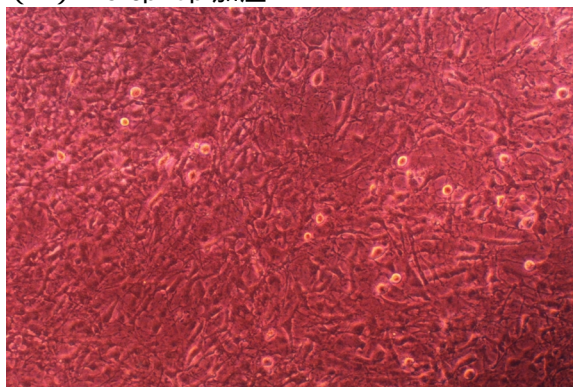


図5 細胞の形態変化に及ぼす step-up 加温の影響

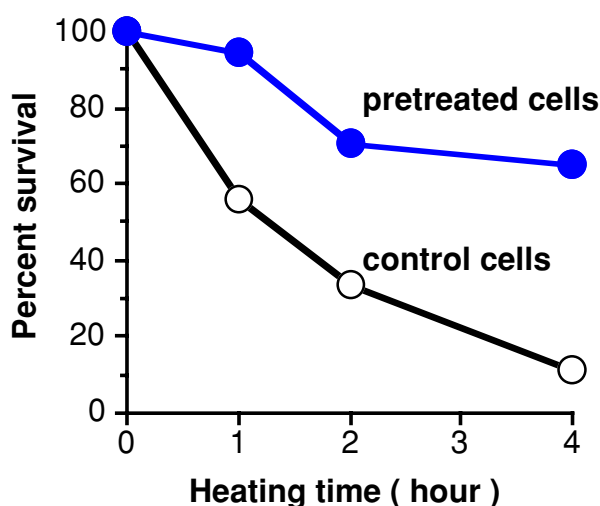


図6 細胞の生存率に及ぼす step-up 加温の影響

#### 【タイマイ細胞の熱ショックタンパク質】

細胞がストレスに应答する現象の一つに熱ショックタンパク質 (hsp) の発現が知られている。これまで述べたように、タイマイ細胞は熱に対し様々な应答を示すが、細胞内では hsp が発現していることも充分考えられる。そこでまず、本細胞の hsp と交叉性のある抗 hsp 抗体があるのかどうかを調べた。ヒト hsp 70 を認識する 4 種類の抗体 (抗 hsp 72; Oncogene Science 社、抗 hsp 72 / hsc 73 ; Stressgen Biotechnologies 社、Affinity Bioreagents 社、抗 hsc 73 ; Stressgen Biotechnologies 社) を用い、33、37 で 3 日間培養した細胞内全タンパク質を試料とし、ウエスタンブロット法により調べた。ポジティブコントロールにはヒト胎児細胞を用いた。タイマイ細胞は抗 hsp 72 抗体には交叉せず、hsc 73 を認識できる抗体にのみ交叉性を示した。また、検出されたバンドの位置はヒト胎児細胞のそれと完全に一致していた。更にこの constitutive な hsp (hsc73) は 33 から 37 に温度が上昇することにより発現量が増加していた (図7)。



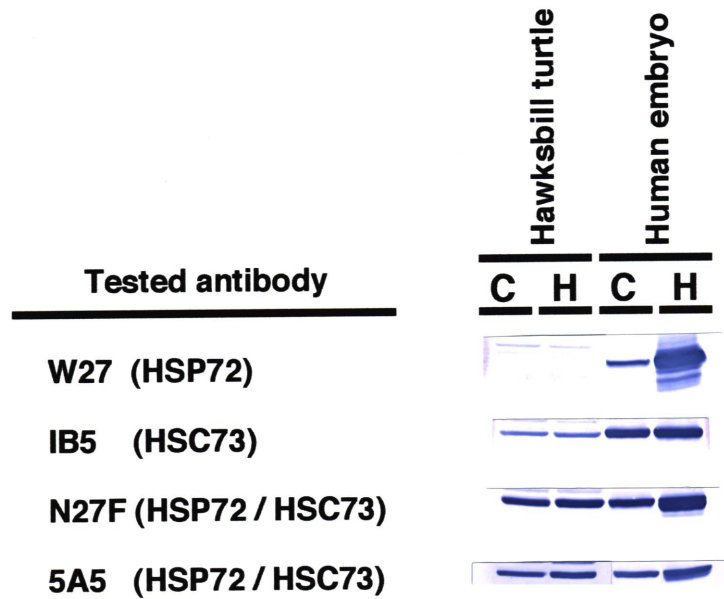


図7 熱ショックタンパク質の検出

次に、免疫染色による hsc73 の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。33 では hsc73 は細胞質全体に分布しているが(図8左上)、40、4時間熱ショックのあと4時間 recovery したものは、核を中心とした部分に集中(図8右上)し、同熱ショック後20時間 recovery したものは、再び、細胞質全体に分布していた(図8左下)。

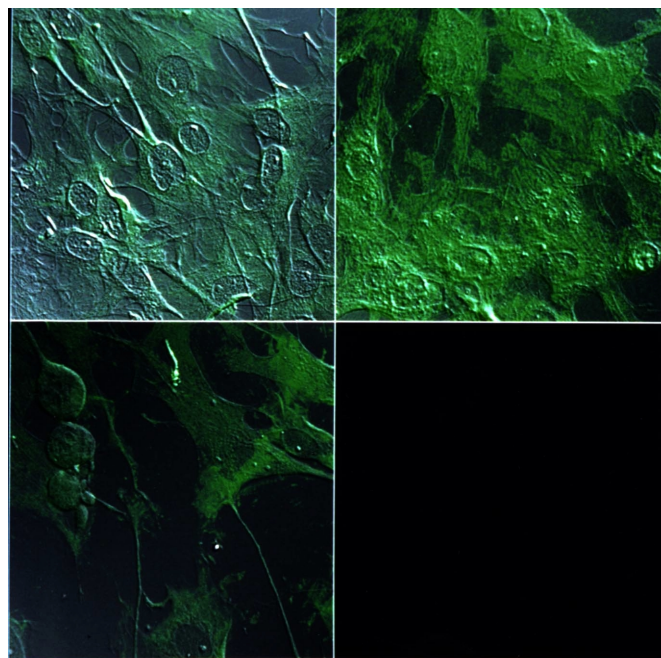


図8 熱ショックタンパク質の免疫染色

本細胞は 25~33 の間で温度依存的に増殖性が増すことから、細胞の増殖性と hsc73 の発現量との相関を調べるために、各温度で培養した7日目の細胞の hsc73 をウエスタンブロ

ットで分析したバンドの強度を数値化したものの相対値と、図 1 の増殖曲線から求めた growth rate をそれぞれ絶対温度の逆数に対してプロットした(図 9)。hsc73 の発現量と  $1/T$  との関係は直線であり、40、7 時間の熱処理( )での発現量も同一直線上にあった。

一方、growth rate と  $1/T$  との関係は 33 を境として二つの直線で示され、細胞が増殖できる 25 から 33 の範囲における直線は、hsc73 の発現量から得られた直線と平行であることがわかった。

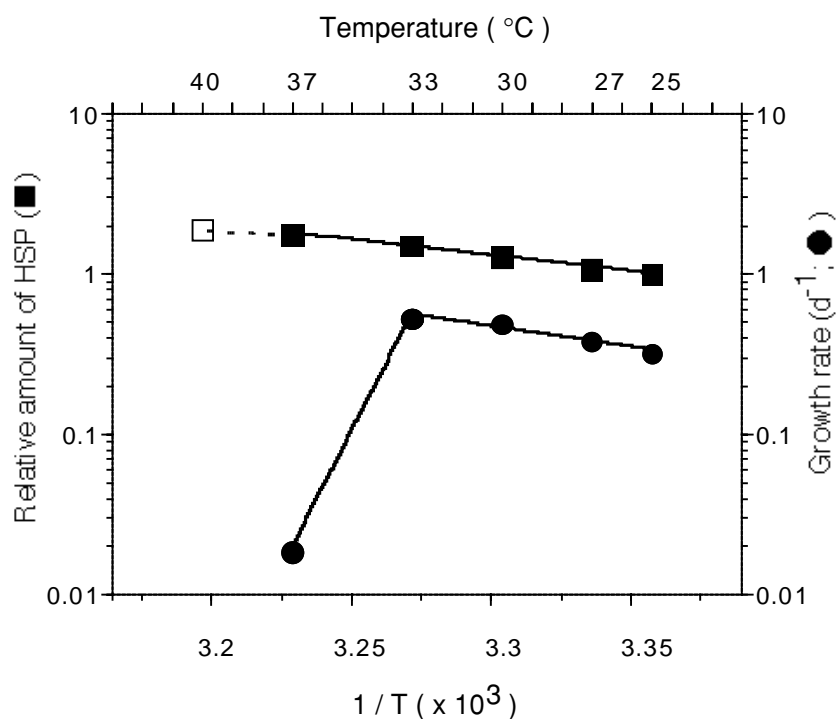


図 9 培養温度に対する hsc73 発現量と増殖速度との関係

#### 【熱処理による hsc73 の発現】

hsc73 の発現に関してさらに検討した。まず、熱処理後の回復時間を 2 時間に固定し、熱処理による hsc73 発現の経時的变化を最大 7 時間まで調べたところ、その発現量は 7 時間の熱処理で最大となった(図 10 左)。そこで熱処理を 7 時間、回復時間を 2 時間として処理温度 28~40 での hsc73 の発現を調べたところ、その発現量は 40 で最大であった(図 10 右)。

次に処理時間を更に延長した場合の hsc73 発現の消長を検討した結果、7~12 時間まではほぼ同程度の発現であった(図 11)。



図 10 hsc73 発現に及ぼす熱ショックの時間と温度の影響

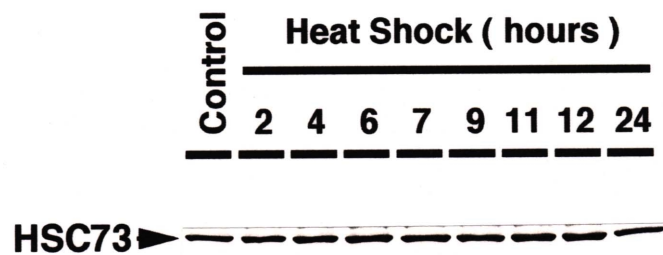


図 11 hsc73 発現量の経時的変化

また、hsc73 の発現に及ぼす回復時間の影響を調べるために、40、12 時間の熱処理後、33 に戻した直後から 24 時間後までの変化を経時的に調べた。その結果、この条件における hsc73 の発現量は熱処理直後ですでに最大となっており、そのレベルは 24 時間後までほぼ維持されていることがわかった (図 12)。

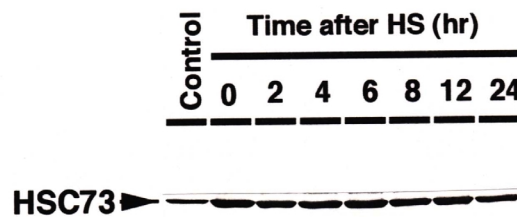


図 12 hsc73 発現に及ぼす熱処理後の経過時間の影響

#### 【アミノ酸類似体による hsp72 の誘導】

これまでの実験結果から、タイムイ培養細胞内では hsc73 が熱に応答してその発現量を増減させることがほぼ明らかとなったが、所謂誘導型の hsp72 の熱による誘導は認められなかった。そこで hsp72 を誘導する因子の一つとして知られる、プロリンの構造類似体である L-アゼチジン-2-カルボキシル酸 (AZT) で細胞を処理することにより、本細胞内に hsp72

が誘導されるのか否かを調べた。細胞は 25 に順応させたものと通常の培養温度である 33 で培養したものをを用いた。その結果、何れの温度で培養した細胞においても AZT 処理による hsp72 の誘導は認められず、またこれによる hsc73 の発現量の増加も認められなかった (図 13)。

【活性酸素分子種による hsc73 の発現】

活性酸素分子種で hsp72 或いは hsc73 が誘導されるかどうかを検討した。ヒポキサンチンを基質として、これにキサンチンオキシダーゼを作用させることにより酵素反応的に培養液中で直接  $O_2^-$  を産生させ、或いは培養液中に  $H_2O_2$  を添加することにより細胞を各々処理し、hsp の発現レベルを対照と比較したが両者間に相違はみられなかった。次に、 $O_2^-$  を不均化する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (Cu,Zn-SOD) 又は  $H_2O_2$  を分解する酵素であるカタラーゼを通常の培養条件下で培地に添加し、hsp の発現レベルを対照と比較したがいずれの処理の場合でも両者間に相違はみられなかった。また同様の実験を熱処理条件下でも行ったが、熱処理で誘導されるレベルに変化は認められなかった。結果を表 2 にまとめた。

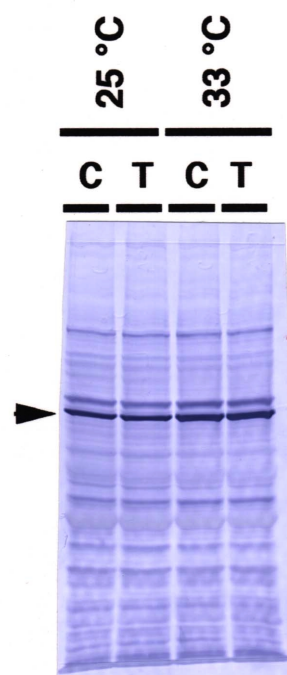


図 13 アゼチジン処理による hsp72 の誘導

表 2 種々の処理による熱ショックタンパク質の発現

Treatment	HSP72	HSC73	HSP90
HX-XOD	—	→	→
$H_2O_2$	—	→	↑
SOD	—	→	ND
HS+SOD	—	→*	ND
Catalase	—	→	ND
HS+Catalase	—	→*	ND

Symbols: —, no expression; →, no change; \* , no change except increase by heat-shock; ↑, increase expression; ND, not done.

Abbreviations: HX, hypoxanthine; XOD, xanthine oxidase;  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide; SOD, superoxide dismutase; HS, heat shock.

### 【hsp90 の発現】

タイマイの雌雄は卵発生段階のある特定時期に晒される温度によって決定されるが、最近の研究で性ホルモンに関係する酵素が孵卵温度によって制御されていることが明らかとなってきた<sup>8)</sup>。現段階では性決定のメカニズムと熱ショック蛋白質との相関は不明であるが、熱ショック蛋白質のうちステロイドホルモン受容体と結合し、その機能を調節していることで知られる hsp90 が何らかの関わりを有しているとも考えられる。そこで先ず、タイマイ細胞に hsp90 が存在するのか否かを調べた。誘導の条件は hsc73 の場合と同様に 40℃、7 時間の熱処理後、2 時間の回復時間で細胞の全蛋白質を抽出した。その結果、分子量 90,000 付近に heat-inducible な hsp90 が検出された (図 14)。

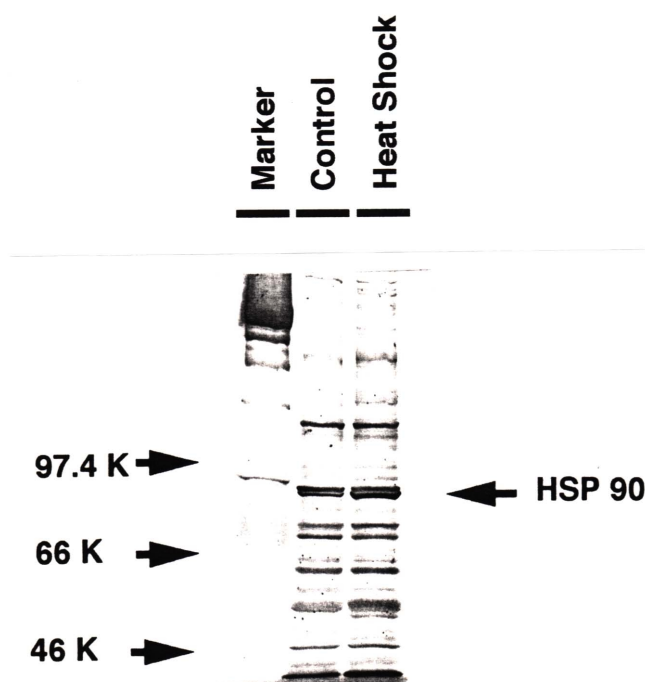


図 14 hsp 90 の検出

### 【hsp90 の誘導条件の検討】

先ず、熱処理時間が hsp90 の発現にどのような影響を及ぼすのかを調べた。細胞を 40℃ で種々の時間熱処理し、2 時間の回復時間の後、全蛋白質を抽出した。図 15 に示すように、hsp90 は 2 時間の熱処理から誘導され、その後は熱処理時間依存的に発現量が増大し、9~12 時間の熱処理によりほぼ最大の発現となった。

また、hsp90 の発現に及ぼす回復時間の影響を調べるために、40℃、12 時間の熱処理後、33℃ に戻した直後から 24 時間後までの変化を経時的に調べた。その結果、この条件における hsp90 の発現量は hsc73 の場合と同様に、熱処理直後ですでに最大となっていたものの、その後の発現レベルはわずかずつではあるが減少する傾向にあった (図 16)。

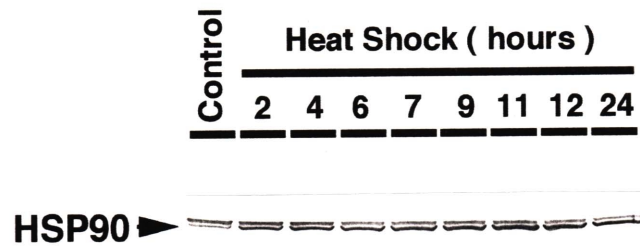


図 15 hsp 90 発現量の経時的変化

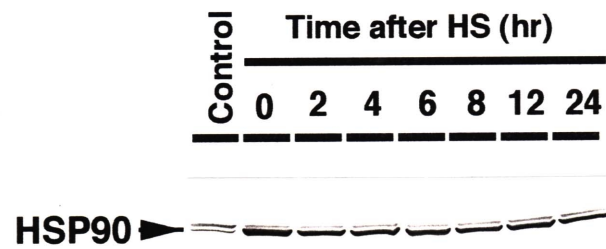


図 16 hsp 90 発現に及ぼす熱処理後の経過時間の影響

更に、hsp90 の誘導が熱処理の程度に依存していることを確認するために、あらかじめ 25 の培養温度に順応させた細胞の熱処理を 7 時間、回復時間を 2 時間として処理温度 25 ~ 40 での hsp90 の発現を調べたところ、通常の培養温度である 33 から誘導が始まり、その発現量は 40 で最大となった (図 17)。

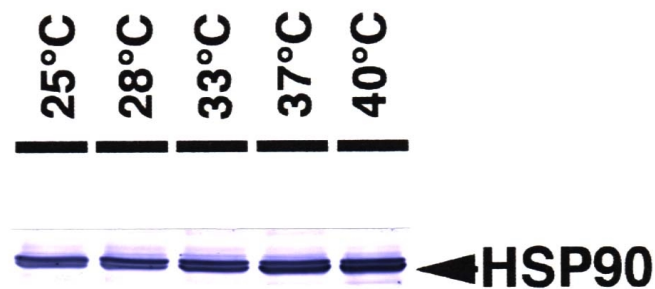


図 17 hsp 90 発現に及ぼす処理温度の影響

#### 【活性酸素分子種による HSP90 の発現】

先ず、ヒポキサンチン - キサンチンオキシダーゼ系により培養液中で直接  $O_2^{\cdot -}$  を産生させることで hsp90 の誘導を試みたが、今回の条件ではその誘導は認められなかった。次に  $H_2O_2$  処理によって hsp90 が誘導されるのかどうかを調べるために、終濃度 2.5, 5, 10mM の  $H_2O_2$  で 33、30 分間処理し、処理直後から 1, 3, 5 時間後の hsp90 の誘導を調べた。図 18

に、細胞を 10mM で処理した場合の結果を示す。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理により hsp90 は 1 時間後から明らかに誘導され、時間の経過に伴ってそのレベルは増大した。

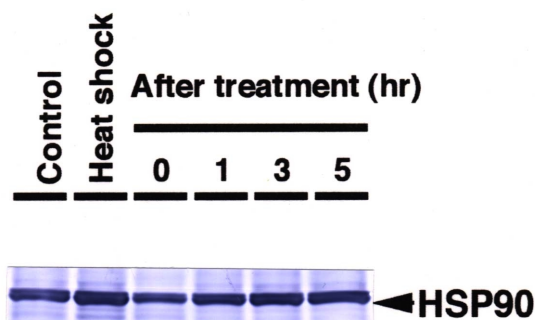


図 18 hsp 90 発現に及ぼす H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の影響

### 【33 と 37 での細胞内の酸化還元状態】

タイマイ筋肉由来線維芽様細胞は 37 で増殖を一時的に停止するが、このときの細胞内の酸化還元状態を、通常の培養条件下での状態と比較した。蛍光染色試薬として用いた DCFH-DA は非極性物質であり、細胞内に取り込まれるとエステラーゼの作用により、無蛍光極性誘導体の DCFH に変換される。この物質は膜透過性が無く、細胞内の過酸化水素やペルオキシダーゼによって、強い蛍光物質の 2',7'-dichlorofluorescein へ速やかに酸化される。従って、細胞内で観察される蛍光強度の上昇は、細胞内が酸化状態となっていることを意味する。図 19 に示すように、通常の培養条件下における 2',7'-dichlorofluorescein の蛍光の発光状態 (A) と比較すると、37 で 32 時間培養した細胞内の酸化状態 (B) ははるかに高いことがわかった。

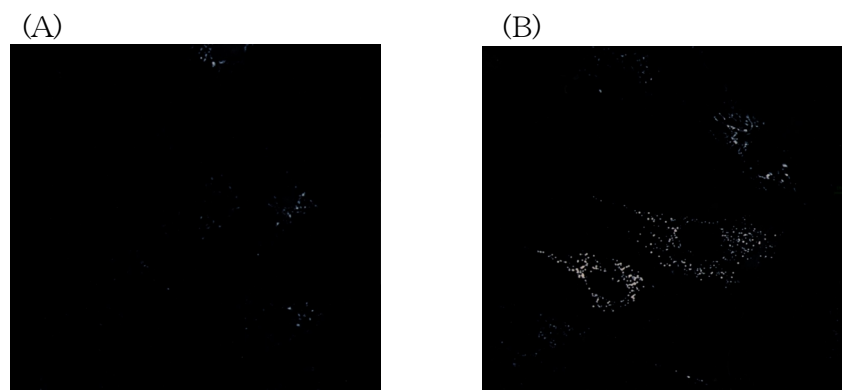


図 19 細胞内酸化状態に及ぼす培養温度の影響

### 【33 と 37 での細胞外への活性酸素の放出】

本細胞を 37 で培養すると細胞内の酸化状態の亢進が認められたので、次に細胞外への活性酸素の放出を調べた。培養液中での cytochrome c の還元を経時的に調べたところ、通常の培養条件下で cytochrome c は還元され、その還元は SOD の添加で阻害された。更にそ

の阻害は SOD 濃度に依存することがわかった。37℃ で培養した細胞の培養液中での cytochrome c の還元は、通常の培養条件下におけるレベルをはるかに越えるものであった (図 20-A)。cytochrome c 還元法では、SOD-inhibitable な還元は  $O_2^-$  によるものであると考えることができるので、図 20-A から 33℃ と 37℃ それぞれの温度での SOD-inhibitable な還元量を再プロットすると、タイマイ筋肉由来線維芽様細胞は細胞外に  $O_2^-$  を産生し、その量は培養温度を高くすると (33℃ → 37℃) 増大することがわかった (図 20-B)。

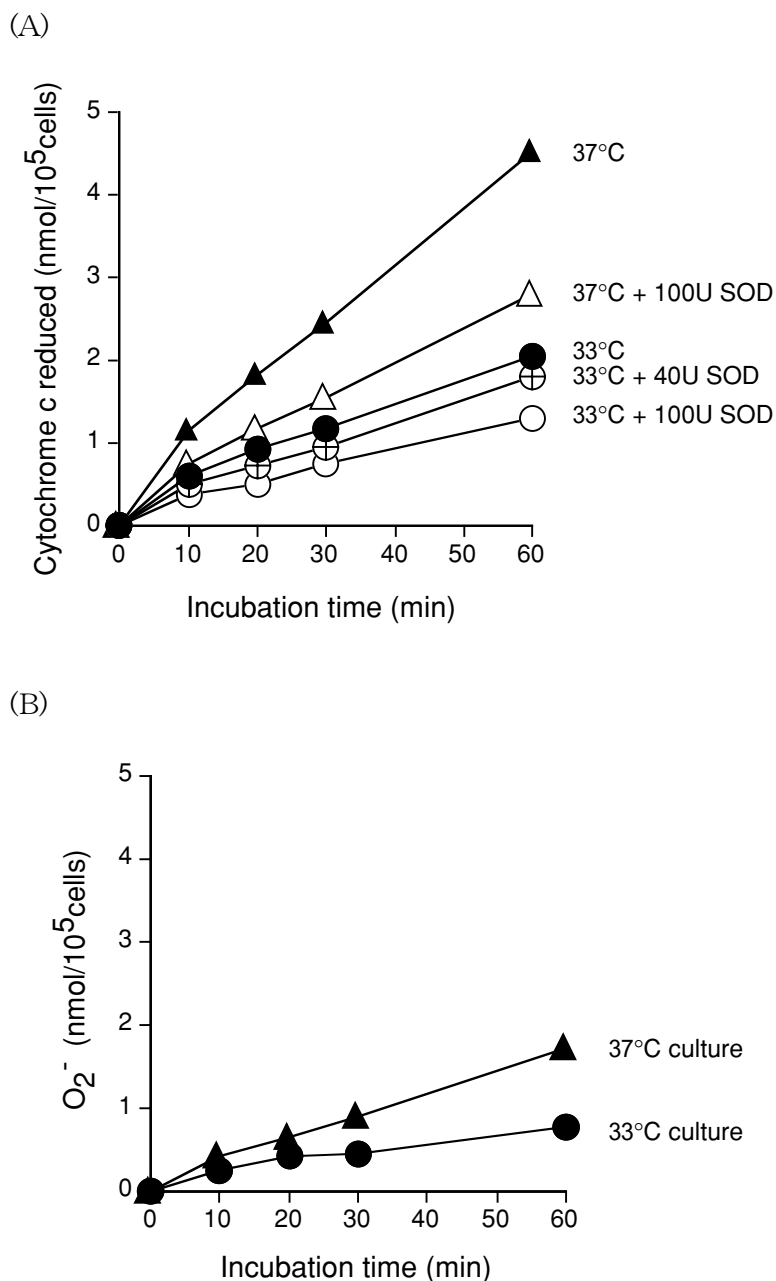


図 20 cytochrome c の還元 (A)と  $O_2^-$  の産生 (B)



更に、 $O_2^-$  は SOD によって不均化され、その反応産物として  $H_2O_2$  が生成する。そこで通常の培養条件下での  $H_2O_2$  の産生と、SOD を加えた場合の  $H_2O_2$  の生成を調べた。図 21 に  $H_2O_2$  量を算出するための検量線とそれによって求めた  $H_2O_2$  量を示した。

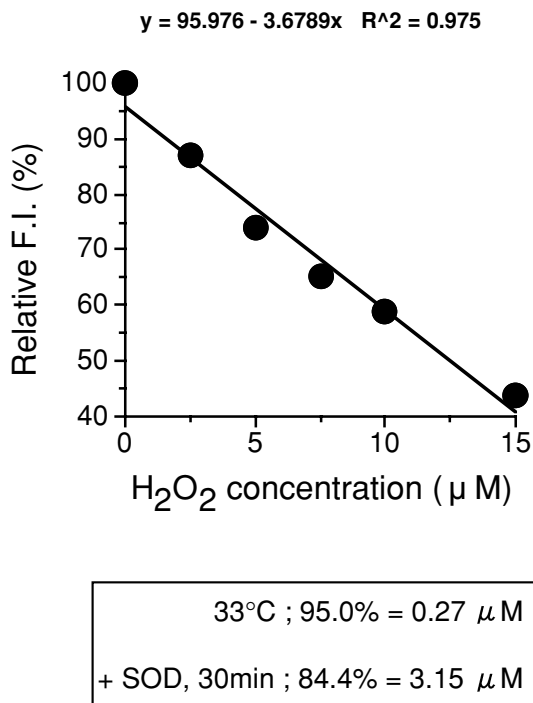


図 21  $H_2O_2$  の産生

わずかな量ではあるけれども、培養液中に  $H_2O_2$  が産生されていることがわかった。また、SOD を加えてから 30 分後にはその量がおよそ 11 倍になったことから、培養液中に  $O_2^-$  が産生され、添加した SOD の不均化反応により  $H_2O_2$  が生成していることを確認することができた。

【スーパーオキシド 産生量の細胞数依存性】

35mm ディッシュに播種する細胞数を  $10^3 \sim 10^5$  個に調製し、 $O_2^-$  産生の細胞数依存性を調べた(図 22)。 $10^3$  個と  $10^4$  個では細胞数に依存して、というよりはむしろ  $10^4$  個の場合で劇的に  $O_2^-$  産生量が上昇した。一方、細胞数が  $10^5$  個になると産生量に若干の減少が認められた。

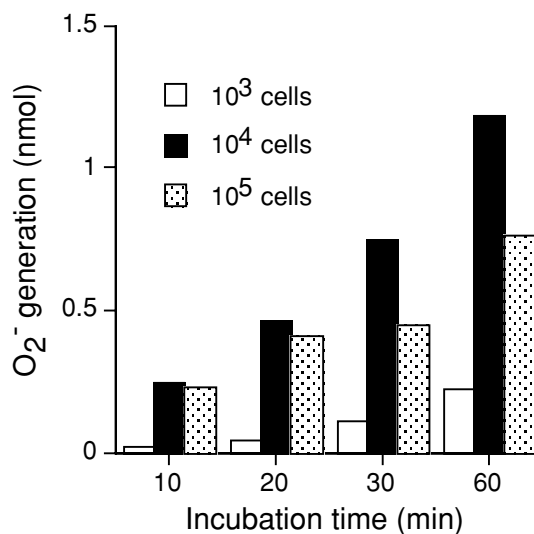


図 22  $O_2^-$  産生の細胞数依存性

### 【スーパーオキシド産生に及ぼす温熱の影響】

本細胞は 35mm ディッシュで細胞数が  $10^4$  個にある時に、 $O_2^-$  の産生量が最大となることがわかったので、この状態にある細胞の温熱に対する応答反応を調べた (図 23)。

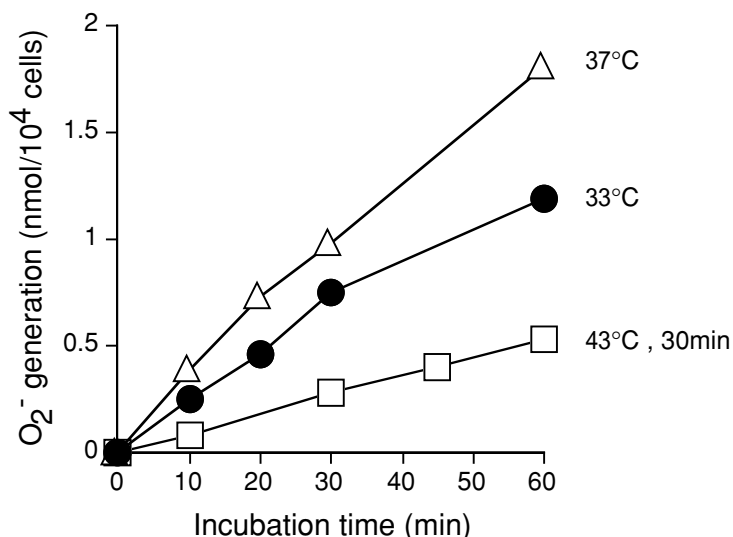


図 23  $O_2^-$  産生に及ぼす温熱処理の影響

33 で培養した細胞と比較して、37 で培養した細胞の産生量が上昇したのは図 20-B (細胞数  $10^5$  個あたりの産生量) で示した結果と同様であるが、本細胞に致命的なダメージを与える温度である 43 で 30 分間細胞を処理すると産生量が激減した。

### 【細胞内酸化状態と熱ショック蛋白質の発現】

本細胞は 40 の熱処理で熱ショック蛋白質の発現が最大になる。そこで、この温度での細胞内酸化状態を DHR 染色によって調べた。図 24-A に示すように、40、1 時間の熱処理により細胞内の酸化状態は著しく亢進し、それを 33 に戻して 1 時間後には、熱処理前のレベルまで戻っていることがわかった。図 24-B は hsc73 の発現誘導から消長までを二次抗体に FITC 標識抗マウス抗体を用いて観察したもので、hsc73 は 40、4 時間の熱処理により細胞質全体に誘導され、熱処理後の細胞を 33 に戻して 4 時間後には、核を中心に集中しており、17 時間後には熱処理前のレベルまで戻っていることがわかった。

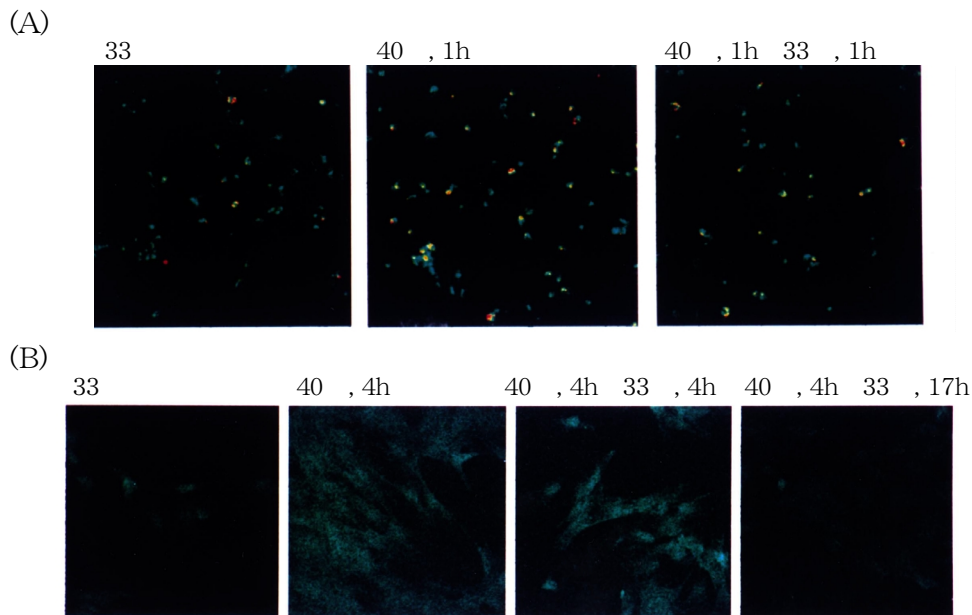


図 24 細胞内の酸化状態 (A) と hsp の消長 (B)

## 10. 考察

タイマイ由来細胞は、DMEM/10%FBS に非必須アミノ酸、ビタミン類及びピルビン酸ナトリウムを添加した培地で活発に増殖した。研究例の多い魚類の細胞の殆どがイーグルの MEM やライボビッツの L-15 に 10%程度の FBS を添加した培養液で培養することができることから考えると、特殊な場合を除いて生物の種に関わらず一般的な培地を用いることができるものと考えられる。変温動物の細胞を取り扱う際に最も重要なことは培養温度である。魚類の細胞の培養温度は概ね 20 前後であり、高温にすると死滅するものも多い。本研究で用いたタイマイ由来細胞は、25~33 の範囲で増殖可能であり、増殖速度が最も速い温度は 33 であった。爬虫類は一般に環境温度と等しい体温を持つ変温動物とされるが、例えばアカウミガメの実際に得られた記録によると彼等の体温は水温よりも高く、その温度差は平均して 0.7~1.7 である<sup>9)</sup>。タイマイに限らずウミガメの生活域は彼等が「生きた海流ビン」と言われる程に広範囲であり、且つ独特の潜水行動をとることなどから、実際の棲息温度を特定することは困難であるが、産卵場の分布を一つの手掛かりとすることができる。タイマイの世界的に重要な産卵場は全て熱帯圏にあり、その北限は薩南諸島の北緯 28 度付近ではないかと考えられている<sup>10)</sup>。これらの事柄を考え合わせると、本細胞の培養至適温度はそれほど不自然な温度ではなく、今回は検討していないが 20 前後の低温域のほうがむしろ影響するとも考えられる。また、37 では増殖が阻害されることから、哺乳類細胞とは明らかに異なる温度感受性を有しており、生体に近い機能を維持していることが予想される。

本細胞の熱ストレスに対する応答性の特徴の一つは、哺乳類細胞の培養温度である 37 では、24 時間後に monolayer の一部の細胞が球状浮遊細胞となり、その後の増殖が阻害されることである。培養液中に産生される液性因子の関与は無く、37 で培養を続けた場合、接着した細胞の全てが順次浮遊することはないことから、この現象は低レベルストレスに対する初期反応であると考えられる。更にこの温度では G2/M 期にある細胞集団の増加、

constitutive な hsp (hsc73) 発現量の増加、43 heat challenge による抵抗性の獲得等が誘導されるが、これらの因果関係は今のところ不明である。

一般に、細胞は温度ストレスに対し誘導型の hsp を発現することで対処していると考えられているが、本細胞においては、用いた抗 hsp 抗体では所謂誘導型の hsp は検出されず、哺乳類細胞の hsc73 に相当するストレスタンパク質が検出された。しかもこのタンパク質は 25 ~ 40 の範囲で温度依存的に発現量を増すが、培養至適温度が 33 であることから、in vitro においては、僅少なストレスが増殖には好ましいとも考えられる。本来 constitutive な hsp がストレスにより明らかに誘導されるという事実は、これまであまり知られていないことである。周囲の環境変化に迅速に対応するためには、新たなタンパク質を合成するよりは、生体内で常に合成されているタンパク質の量を増減させることにより対処したほうがより効率的であると考えられる。すなわち、このような応答機構こそが変温動物たる由縁であるのかも知れず、今後解明すべき興味ある点ではある。

哺乳類細胞における hsp72 は、一般的に培養温度から 5、6 高い温度で 30 分程度の熱ショックで誘導されるが、タイマイ細胞の hsc73 は同様な温度差では 7~12 時間という長時間で誘導が最大となる。生体レベルで考えてみると、アカウミガメの場合、回遊時の鉛直移動（潜水及び浮上）によって、水温は一時的に 2 以上変動するが、そのような時間スケールの短い 90 分以内の水温変動に対しては体温は影響されずに一定に保たれ、また、時間スケールが長い数時間以上にわたる水温変動に対しては、変動の幅は小さくなるものの体温は 2~3 時間遅れて同様な追従を示すことが報告されている<sup>11)</sup>。すなわち、多少の温度変化と持続時間は彼等にとっては極めて日常的な状態であり、タイマイ細胞が温度変化をストレスとして認識し、hsc73 を動員するためには哺乳類細胞のそれと比べて時間を要すものと考えられる。しかも、40、12 時間のような長時間のストレスに晒された場合には、ストレスの最中に hsc73 の誘導が開始される、つまり recovery time を必要としないことが明らかとなった。このようなストレス応答時間の差はまさしく、恒温動物と変温動物の違いを示す一つの大きな特徴と考えることができるかもしれない。

また、本研究に用いた抗 hsp70 抗体は inducible な hsp72 と constitutive な hsc73 の両者を認識する抗体であるにも関わらず、熱ショック、アミノ酸類似体及び活性酸素等の各刺激によってもタイマイ細胞において hsp72 は誘導されなかった。爬虫類の熱ショック蛋白質に関する研究例は皆無に等しく、これまで in vivo における研究が二例報告されているのみであるが<sup>12, 13)</sup>、その中でも熱に応答する蛋白質は constitutive な hsp70 であることが示されている。これらの事例から判断して、変温動物であるタイマイ細胞には hsp72 は存在せず、hsc73 がそれらの機能を兼ね備えているのではないかと考えている。

更に、熱ショックで明らかに誘導される hsp90 蛋白質をタイマイ培養細胞内に見出し、しかもこの蛋白質は細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で刺激しても誘導され、そのレベルは熱ショックで誘導されるそれに匹敵するものであることを確認した。活性酸素は主として食細胞が刺激されると産生し、非特異的の防御機構に関与すると考えられているが、それ以外の細胞でも内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞なども刺激により低レベルの活性酸素を産生する<sup>14)</sup>。我々は、タイマイ培養細胞は通常の培養条件下で、わずかではあるが O<sup>2</sup>· を細胞外に放出し、培養温度を

37 にシフトするとその産生量が増大し、細胞内では酸化状態が上昇していることを見出した。これらのことから、熱の刺激に応答する初期反応として、細胞内に活性酸素が生じ、これが引き金となって hsp90 を誘導するのではないかと考えている。

## 11. 今後の展開

タイマイ由来細胞は熱の刺激によって、細胞外に  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  といった活性酸素分子種を産生し、また細胞内はかなりの酸化状態に転化していることが明らかとなった。つまり、細胞が熱の刺激を受けて細胞内あるいは細胞外に活性酸素を放出すると、細胞内が通常の還元状態から酸化状態へと変化するという予測を実験的にある程度証明することができた。しかしながら、細胞内で、一部あるいは完全に変性した蛋白質が蓄積し、それに呼応して熱ショック蛋白質が動員される、すなわち、熱に対する細胞のストレス応答の一つには活性酸素が引き金となるものがあるのではないかという仮説は、未だ解明するには至らなかった。その考え方が正しいと仮定するならば熱刺激後の細胞内の酸化状態への変化は、少なくとも熱ショック蛋白質が誘導されるよりはかなり早い時期である必要がある。この点に関しては図 24 で示したように、実際、細胞内の著しい酸化状態は 40、1 時間で観察され、一方 hsc73 の発現誘導は 4 時間以後であることから両者の「時間差」という点では前述の考え方と符合する。このような考え方を支持する他の研究結果としては、熱は reactive oxygen intermediates の産生を増加し、細胞内の酸化イベントを促進することを、培養 HeLa 細胞におけるスーパーオキシドの産生に及ぼす熱の影響を分析した結果から示唆している報告<sup>15)</sup>があり、また、チオール還元試薬である dithiothreitol が本来熱によって誘導される hsp の合成や HSF の DNA binding activity を阻害するのは、熱で誘導された細胞質蛋白質の酸化を抑制するためであり、すなわち、酸化還元のメカニズムは熱ショックのシグナル伝達の初期の重要な段階であることを示唆する報告<sup>16)</sup>等がある。

以上のようなことから、熱のストレスもラジカルが起源なのではないかということをはっきりとしたいと考えている。

## 12. 参考文献

- 1) Lindquist S., *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1151-1191, 1986.
- 2) Charnier M., *C. R. Seances Soc. Biol.*, **160**, 620-622, 1966.
- 3) Bull J. J., *Q. Rev. Biol.*, **55**, 3-21, 1980.
- 4) Ohba M., Shibamura M., Kuroki T., Nose K., *J. Cell Biol.*, **126**, 1079-1088, 1994.
- 5) Johnston R. B., Godzik C. A. Jr., Cohn Z. A., *J. Exp. Med.*, **148**, 115-127, 1978.
- 6) Kakinuma K., Minakami S., *Biochim. Biophys. Acta*, **538**, 50-59, 1978.
- 7) Nathan C. F., Root R. K., *J. Exp. Med.*, **146**, 1648-1662, 1977.
- 8) Wibbels T., Bull J.J., Crews D., *J. Exp. Zool.*, **270**, 71-78, 1994.
- 9) Sakamoto W., Uchida I., Naito Y., Kureha K., Tujimura M., Sato K., *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1435-1443, 1990.
- 10) 内田 至, *海洋と生物*, **23**, 402-410, 1982.

- 11) Sato K., Sakamoto W., Matsuzawa Y., Tanaka H., Naito Y., *Mar. Biol.*, **118**, 343-351, 1994.
- 12) Yu Z., Magee W. E., *J. Therm. Biol.*, **19**, 41-53, 1994.
- 13) Ulmasov K. A., Shammakov S., Karaev K., Evgen'ev M. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1666-1670, 1992.
- 14) 野瀬 清, 化学と生物, **33**, 74-75, 1995.
- 15) Burdon R. H., Gill G., Evans C. R., in *Stress Proteins: Induction and Function*, pp. 19-25, Springer-Verlag Berlin, 1990.
- 16) Huang L. E., Zhang H., Bae S. W., Liu A. Y.-C., *J. Biol. Chem.*, **269**, 30718-30725, 1994.

### 13. 研究業績

13-1. 原著論文 なし

13-2. 総説など なし

13-3. 国際学会発表 なし

#### 13-4. 国内学会発表

- 1) 竹下哲史、松田尚樹、横山兼久、晦日房和、渡邊正己：培養タイマイ細胞の熱ストレスに対する応答性、日本農芸化学会1996年度大会、平成8年3月30日-4月2日、京都。
- 2) 竹下哲史、松田尚樹、横山兼久、晦日房和、鈴木啓司、渡邊正己：培養タイマイ細胞の対熱ストレス応答特性、日本組織培養学会第69回大会、平成8年5月15日-5月17日、広島。
- 3) 竹下哲史、松田尚樹、横山兼久、晦日房和、鈴木啓司、渡邊正己：タイマイ由来細胞の培養系確立とその温度感受性、第7回日本ウミガメ会議、平成8年12月14日-12月15日、沖縄。
- 4) 岡市協生、王立紅、竹下哲史、井原誠、奥村寛：正常 p53 遺伝子導入細胞の放射線感受性とアポトーシス、第39回原子爆弾後障害研究会、平成10年6月7日、長崎。
- 5) 岡市協生、王立紅、竹下哲史、井原誠、奥村寛：変異 p53 遺伝子導入細胞の放射線感受性とアポトーシス、第35回放射線影響懇話会、平成10年7月18日、福岡。
- 6) 岡市協生、井原誠、竹下哲史、奥村寛：放射線照射でアポトーシスは誘導されるが Waf-1 は誘導されない p53 の変異、日本放射線影響学会第41回大会、平成10年12月2日-12月4日、長崎。
- 7) 岡市協生、池田恵、竹下哲史、井原誠、奥村寛：低濃度の wortmannin による放射線感受性の修飾、第40回原子爆弾後障害研究会、平成11年6月6日、広島。

- 8) 竹下哲史、奥村 寛、松田尚樹、渡邊正己：タイマイ（ウミガメ）細胞の温熱特性、第 12 回九州・山口地区ハイパーサーミア研究会、平成 11 年 7 月 17 日、福岡。
- 9) 岡市協生、竹下哲史、森田直子、池田 恵、井原 誠、奥村 寛：低濃度 wortmannin で阻害される PI3 キナーゼの放射線感受性への関与、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-9 月 3 日、広島。
- 10) 奥村 寛、井原 誠、岡市協生、竹下哲史、島崎達也、古澤佳也：高 LET 放射線に対する scid 細胞の RBE、日本放射線影響学会第 42 回大会、平成 11 年 9 月 1 日-9 月 3 日、広島。
- 11) 奥村 寛、竹下哲史、井原 誠、岡市協生：変温動物細胞の熱ショック蛋白質と熱耐性誘発の解析、日本ハイパーサーミア学会第 16 回大会、平成 11 年 9 月 9 日-9 月 11 日、大阪。

13-5 . 新聞など なし

13-6 . 特許 なし

14 .

- (1) Studies on stress response mechanisms of poikilotherm cells.
- (2) Department of Radiation Biophysics, Radiation Effect Research Unit, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University School of Medicine
- (3) Satoshi Takeshita
- (4) Naoki Matsuda (Nagasaki University Radioisotope Center)  
Kanehisa Yokoyama (Laboratory of Cell and Stress Biology, Japan Science and Technology Corporation at Nagasaki)  
Naoko Morita (Nagasaki University School of Medicine)  
Hiroshi Yanase (Department of Biochemistry, Technical Research Laboratory, Kurabo Industries, Ltd.)  
Keiji Suzuki, Seiji Kodama, Masami Watanabe (Laboratory of Radiation and Life Science, Department of Health Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University)

(5) 1995~1997

(6) Abstract

Responses to heat-stress in vertebrates have been widely investigated for recent years. One of the unique characteristics of the reptiles is that their sex determination is dependent on the temperature of the environment where the embryo undergoes cell proliferation, differentiation and development. They are also able to live in poikilothermic conditions. These characteristics of reptiles lead us to speculate that their cellular responses to heat-stress might differ from that of mammals. The purpose of this study

was to establish culture conditions of hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) cells and to examine their responses to heat stress, in terms of morphological change, proliferation and expression of heat-responsive proteins. The cells isolated from the embryo of a hawksbill turtle exhibited fibroblastic morphology and extensively proliferated in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with nonessential amino acids, vitamin solution, sodium pyruvate, and 10% fetal bovin serum. Optimal growth was achieved at 33 °C although replication occurred between 25 and 33 °C. When cells were incubated at 37 °C for 24hr, the cell growth was totally inhibited. This growth inhibition was evidently recovered by changing the incubation temperature back to 33 °C. Detection of heat shock proteins (hsp) by western blotting demonstrated that expression of constitutive hsp (correspondent to hsc 73 in mammalian cells) was increased depending on elevating temperature between 25 and 33 °C. On the other hand, hsp90 was evidently induced by heat shock treatment above 33 °C. In addition, treatment with a 10 mM hydrogen peroxide also induced hsp90 and the induction level was comparable to that by heat shock treatment. The generation of reactive oxygen species may play an important role in hsp90 induction because established hawksbill turtle cells normally generated superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) during cell growth under the culture conditions. The level of  $O_2^{\cdot-}$  generation increased after culture temperature was shifted to 37 °C. The intracellular oxidation state level also increased by changing incubation temperature to 37 °C. When cells were exposed to 40 °C, heat-shock protein inducing temperature, for 1 hr, the intracellular oxidation state level obviously increased, and then the level decreased within 1 hr by changing incubation temperature back to 33 °C.

These results suggest that reactive oxygen species may be intra- and/or extracellularly generated by heat-stimulation and result in alteration of cellular redox state, and then heat shock proteins are induced in order to rescue some proteins lost their native conformations. In other words, one of heat stress response may be mediated reactive oxygen species generation in cells.