魚の細胞から何がわかるか

鳴 昭紘*

——増殖とDNA修復特性を中心にして

動物の培養細胞というと、ほとんどの人はマウスとかラットとか、近ごろはヒトの細胞の試験管内培養を思い浮かべるだろう。これらの哺乳類細胞の培養は、確かに現在最も広範囲に行なわれているが、ショウジョウバエ、キンギョやメダカのような非哺乳類の細胞培養系も癌化や老化の研究に使われ得る段階にまで達した。ここでは、数種類の魚類の細胞について、増殖特性と DNA 修復特性を中心に紹介したい。

「どんな実験材料を使って、放射線生物学や老化の研究をしているんですか？」と尋ねられ、「おもにサカナの培養細胞を使ってやっています」と答えると、「へえー、サカナの培養細胞なんてあるんですか!？」と多少なりとも驚かれる方は、なにもこの道の素人の方だけとは限らない。かつて医学部に奉職していたころ、“サカナヤ”と呼ばれていたのが自分であることに気付くのに、えらく時間がかかった憶えがある。マウスとラット以外は実験動物ではない、との考えをお持ちの方がおられることを知らされたのはこの時である。確かに、実験動物としての魚類は、マウスやラットをはじめアフリカツメガエル、カイコ、ショウジョウバエに比べて、あまり“有名”ではない。しかし、水産学や遺伝学の分野では、その主たる興味の視点は異なるにしても、魚類はすでに馴染みのある存在であるといえよう。かく申す筆者自身も、師匠の江上信雄先生（現公害研）から、老化研究の材料として“年寄りメダカ”をいただいた10余年前までは、専らマウスとラットを材料としていた。

数え方にもよるが、約42,000種の脊椎動物のうちで魚類は約20,000種、すなわち約48%を占めるといわれる。魚類に見られる多様性は、種の数だけにとどまらない。大きさでみると、性成熟時でも15 mmしかないピグミーゴビイ(*Eviota*)から21 mに達するサメ(*Rhincodon*)にわたるひろがりを持つ。この種のサメは、体重

が25トンにも達するという(これらの最大/最小体重や体長に関するデータについては、報告者によりかなりの幅がある)。一方、メダカは成魚で約300 mg程度の体重を持つのが普通である。生息場所も、上は海拔約5,000 mから、下は海面下約11,000 mの深海底に及ぶとされる。さらに生息温度も、氷結した極地の海中から40°Cを超える熱帯の水域にまでひろがっている。解剖学的には、骨格系、筋肉系、呼吸器系(エラ、ウキブクロ)、消化器系、循環器系、泌尿生殖器系、造血系、内分泌系および神経系を備え、脊椎動物の基本型としての特徴を具備している。しかし、詳しく見ると、魚類間でこれらの系に多様性がみられるとともに、哺乳類との異同も多々見受けられる。変温脊椎動物であること、主たる造血の場である頭腎や肺魚での肺の存在、卵性/卵胎性という生殖様式、末梢血中に見られる有核赤血球、淡水/海水中での浸透圧調整等々。もっとマイクロなレベルでは、たとえば細胞当りのDNA量、すなわちゲノムサイズについてみると、筆者らがDNA顕微蛍光測定法で実測した結果では、マウスのゲノムサイズの約30%(メダカ)から約3,000%(アフリカ肺魚)というように100倍の幅を示している。

魚類には進化のすべての試みの跡がみられるという。このことは、魚類に対する筆者の興味をいやが上にも高めてくれる。筆者らが現在実験に用いている魚類は、メダカ、キンギョ、アマゾンモリーとザイホホラスのわずか4種にすぎない。20,000種をこえる魚類のたった4種から得られ

* Akihiro SHIMA, 東京大学理学部動物学教室放射線生物学講座

た結果で魚類全体を論じることは、多くの危険を含んでいることを十分承知した上で、ここでは、魚類細胞のおもしろさ、特に魚類細胞の増殖特性と DNA 修復特性について、筆者らの研究成果を中心に述べたい。

なお、実験動物としての魚類に関して筆者の手元にある成書として、魚学一般については文献 1), 実験動物としての魚類については文献 3), 放射線生物学の研究に如何に魚類が使われたかについては文献 2), 日本で開発された数少ない実験動物としてのメダカの生物学については文献 4) を挙げておく。

In vivo での魚類細胞

1. クローンサカナとその利用

生殖に関しては、メダカやキンギョは卵性であり、アマゾンモーリーとザイホホラスは卵胎性である。なかでも面白いのは、アマゾンモーリー (*Poecilia formosa*) である。これはテキサスや中米原産の熱帯魚で、ニューヨークにある Brookhaven 国立研究所の R.B. Setlow と A. D. Woodhead により系統的に実験動物化され、現在は 2 つのクローン系統が維持されている。このサカナにはメスしかいない。では、どうして子孫がとれるのか?—雌核発生 (gynogenesis) により繁殖するからである。とはいえ、卵の発生開始には近縁のブラックモーリーのオスの gonopodium (授精器官) による物理的刺激が必要である。オスの精子 (正しくは精子の DNA) は胚の発生に関与せず、卵核の 2 倍体化により子孫を作る。したがって、得られる子孫は (自然突然変異を考えなければ) すべて同一の遺伝子型を持つことになり、自然にクローン動物が得られる。

この系をうまく使って、*in vitro* で DNA に 254 nm の紫外線 (UV) で傷をつけた甲状腺細胞を、同じクローンのサカナの腹腔に注射し、一定期間後に腫瘍ができることを証明した仕事⁽⁵⁾は、DNA の傷 (ピリミジンダイマー)⁽⁶⁾ が細胞の癌化をひき起こすことを示す直接証拠として注目された。この実験系では、魚類細胞が持つ DNA 修復特性が見事に活かされた。DNA 修復について

図 1 クローンメダカの作り方 (Naruse *et al.*⁽¹¹⁾)

は、適当な成書⁽⁷⁻⁹⁾を参照願うことにして、ここでは光回復 (UV によって DNA に生じたピリミジンダイマーを、光回復酵素と可視光線のエネルギー共存下で 2 分子のモノマーに開裂し、DNA の遺伝情報を元どおりに修復する“内科的な”DNA 修復機構をいう。photoreactivation, PR) 処理されなかった UV 照射細胞を注射されたサカナにはほぼ 100% の個体に腫瘍ができたのに対して、PR 処理した照射細胞注射群では腫瘍発生頻度が 0% であったという結果が、際だった対照を示した。しかし、この実験系には再現性に関して難しい点があり、筆者は 1982 年以來の Setlow との共同研究により、解決策の一つとしてこのクローンサカナの培養細胞系を作ったので⁽¹⁰⁾、今後の *in vitro* と *in vivo* を直接結びつける研究に利用する予定である。

一方、成瀬らは、人工的にクローンメダカを作出することに成功した⁽¹¹⁾。要領は図 1 に示した 6 つのステップに分けられる。すなわち、超高線量 UV を照射して遺伝的に不活化した精子で単為発生を開始させた半数体胚 (ステップ 1, 2) を、高水圧か高温で処理し、第一卵割を阻害して 2 倍体化し、メスのホモ接合体を作る (ステップ 3)。これらを、輸精管結紮したオスと偽交尾させて未受

精卵を採卵し（ステップ4）、ステップ1、2と同様にUV不活化精子で半数体胚の発生を開始させ、高温処理で第二減数分裂を阻害してホモ接合2倍体メスを得る（ステップ5）。このままでは、いつまでたってもメスしか得られないから、これらのメスを2群に分け、1群はそのままメスとして飼育し、他の群にメチルテストステロンを投与してオスに性転換させる。かくして得られたメスとオスは、同一の遺伝子型を持っており、これらの交配によってクローンメダカが恒常的に得られる（ステップ6）。メダカには種々の変異体があり、これらをクローン化することが可能になったことは、実験動物としてのメダカの利用価値を高めた。

2. 成長と寿命

魚類には遺伝的に決まった成長限界がないとする極論⁽¹²⁾もあるが、筆者は種に特異的な上限があると考えている。マウスなどでも、産仔数が多いと仔の成長が抑制されることはよく知られているが、魚類ではその傾向は一層顕著である。筆者らの観察によれば、一定容量の水槽で種々の数のメダカを飼うと、たとえエサを十分に与えても“人口密度”の高い水槽のメダカは明らかに成長が悪い。しかし、成長が抑えられたメダカを一匹飼いにすると、成長抑制は解除される。このような現象はアマゾンモーリーでも観察されている。メダカの属する *Oryzias* 属には現在10種が数えられているが、この中でも *O. minutillus* は体長が最も小さいとされている。しかし“小さい”成魚を一匹飼いにすると、「これが *minutillus* か？」と誰もが驚くほど大きくなる。

メダカの体長が大きくなる時には、構成細胞数が増えていると考えるのが自然であろうが、そうでない極端な場合としては、細胞間物質の蓄積や細胞自体の肥大の可能性も考え得るから、成長抑制解除後の再成長時の細胞増数の様子を、組織学的および個体当りのDNA量の定量といった比較的簡単な方法で、一度は確かめておく必要を感じている。それにしても、メダカやアマゾンモーリーが持つ細胞増殖に関する高予備力の機構は、分

子／細胞のレベルで解明したい課題の一つである。なお、培養細胞レベルでの現象論的特徴については後述する。

成長と密接に関係するのは、個体の寿命である。魚類の寿命に関する文献上の数字は、あまりにもまちまちである。たとえば、Brookhaven 国立研究所でのアマゾンモーリーの寿命は約3年といわれていたが、Setlow から筆者らに分与された同じクローンのサカナは飼育してから7年たった今もまだ生存している個体がある。したがって、魚類で種に特異的に遺伝的に規定された寿命については、現在でも正確な数値はほとんど不明といっていいように思うが、屋外で飼育されたメダカに関しては、最長生存日数として1,838日（記録保持者はメス）という数字が江上と江藤により報告されている⁽¹³⁾。

3. 特定座位メダカ

実験動物としての魚類の中で、遺伝学的に最も詳しく研究されているのがメダカである⁽⁴⁾。突然変異体も多数知られ、名古屋大学理学部附属淡水魚類系統保存実験施設で維持されている。また筆者らは、日本の100余の地点から集めた野生集団の系統保存に当たっている。このような長所を活かして、物理的および化学的環境変異原の継世代的影響の研究に供するために、複数の劣性遺伝子に関するホモ接合体すなわち“特定座位メダカ”を作出中である。

メダカの卵は透明なので、受精直後から胚発生の全過程を実体顕微鏡下で連続して観察することができる。特定座位メダカの胚発生過程における個々の胚の劣性可視表現形質を観察し、自然突然変異率と誘発突然変異率を調べるために、筆者らは96穴のマイクロタイプレートを用い、1枚のプレート当たり96個の胚を識別しながら早期死を含む表現形質を調べる方法を確立した。Russell⁽¹⁴⁾によってマウスを用いて開発されたこの劣性特定座位突然変異検出法は、哺乳類での突然変異研究の根幹を成すもので、この系を用いてマウスについて得られた膨大なデータが、ヒトにおけるリスクアセスメントの基礎になっている。

いまさら特定座位メダカを作っても無意味であるという批判もあったが、あえてメダカを使う長所は何かといえば、マウスでは優性致死突然変異として一括して扱われている子宮内の胎仔死亡にあたる現象を、胚発生の最初から連続して観察することができることである。マウスでの F_1 スコアに相当するものは、ふ化した稚魚での表現形質のスコアであり、ふ化以前の時期では“マウス子宮内での非侵襲的スコア”に相当する観察が可能である。この研究はスタートしたばかりで、データの蓄積はこれからの課題である。

In vitro での魚類細胞

魚類の細胞培養は、哺乳類細胞の培養にはるかに遅れ、1960 年頃から始められた。しかも、当初は主としてウイルス学や染色体学（核学）の分野に利用された⁽¹⁵⁾に過ぎなかった。魚類細胞の培養方法は、基本的には哺乳類細胞培養法と同じであるが、詳しくは文献 16) を参照願いたい。

1. 培養細胞の増殖特性

ところで、ヒトの正常 2 倍体線維芽細胞は、“正常”である限り有限の分裂（増殖）寿命を持つことは“Hayflick の限界”としてあまりにも有名である。さらに、何種類かの脊椎動物由来細胞の増殖寿命は、それぞれの動物の個体としての最長

寿命とよく相関しているという報告もある。そこで、先に述べた魚類の個体レベルでの成長特性を念頭において、培養系での増殖特性をキンギョ⁽¹⁷⁾、アマゾンモリー⁽¹⁰⁾、メダカ⁽¹⁸⁾で調べてみた（図 2）。その結果、3 種の魚類由来線維芽細胞は、いずれも 1 年以上にわたって増殖し続けることがわかった。培養方法が不適當（下手）で、細胞が早期に増殖を停止した結果を“短い増殖寿命”と誤って結論する可能性はあっても、図 2 に示した結果はその逆で、哺乳類細胞での用語を借りて“無限増殖能の獲得”と表現するより他に方法がない。マウス細胞はいわゆる自然形質転換傾向が顕著で、無限増殖能を簡単に獲得するが、その場合には試験管内癌化の指標が満足されている。ところが、図 2 に示したサカナ由来細胞の場合には、筆者らが現在までに調べた限りでは、それらの指標は満足されない。つまり、マウス細胞のような自然形質転換による無限増殖能の獲得ではない、と言わざるを得ない。表現を変えれば、魚類培養細胞は癌化することなく細胞が不死化（immortalize）する、と言える。このような癌化なしの不死化は、魚類培養細胞の増殖特性であると筆者は考えている。

不死化といえば、癌遺伝子との関係がすぐに思い浮かぶ。個体レベルでの成長特性と、培養系での増殖特性の関係には大変興味がある。このこと

図 2 3 種の魚類由来培養線維芽細胞の累積増殖曲線

(A) キンギョ⁽¹⁷⁾, (B) アマゾンモリー⁽¹⁰⁾, (C) メダカ⁽¹⁸⁾. 横軸は培養日数, 縦軸は集団倍加数で表わした累積増殖能力

図3 キンギョ由来 RBCF-1 細胞の種々の温度での増殖曲線⁽¹⁷⁾

25 cm² の培養皿に 2.5 × 10⁵ 個の細胞を植え込み、種々の温度で培養し、経時的に培養皿当りの全細胞数を数えた(縦軸)。

と関連して、半数体メダカ胚(図1でのステップ1と2だけから発生させた胚で、発生段階27に達して発生が止まり死ぬ)を発生途中で細胞をバラして培養系へ移してやると、なぜか自然に2倍体化し“半数体死(haploid death)”を免れることを最近見つけた⁽¹⁹⁾が、機構はまだわからない。

ところで、変温動物である魚類由来の培養細胞は、培養系でも依然として“変温細胞”であろうか? 図3に、キンギョ由来 RBCF-1 細胞での結果を示す⁽¹⁷⁾。一定数の細胞を培養皿に播き込み、種々の温度で培養しながら経時的に皿当りの全細胞数を数え、増殖の指標とした。増殖曲線の直線部分の勾配から、細胞倍加時間(T_d)を求めたところ、 T_d は明らかに温度に依存して変化している。しかし、培養温度にかかわらず、換言すれば T_d の長短に関係なく、この細胞は単位面積当たり一定の細胞数に達すると、増殖を停止する。つまり、増殖の接触阻止がよく働く系と言える。これは、アマゾンモリー⁽¹⁰⁾やメダカ⁽¹⁸⁾由来細胞でも見られる現象である。面白いことには、RBCF-1 と同じくキンギョのヒレ由来の CAF 細胞(放医研の須山と江藤により樹立された)は、33°C 以上の培養温度ではもはや増殖できず、一種の“ t_s ”変異体のように思える。RBCF-1 と CAF の違いは、細胞継代温度が前者は 37°C で、後者は 27°C である点だけである。キンギョ(ワキン)という同じ遺伝子構成からスタートした両者の違いは、変温動物細胞での“変温性”を

研究し、ひいては恒温動物細胞の“恒温性”を調べる上で有効な材料だと筆者は考えている。

2. 変異原に対する感受性

上に述べたような経過で魚類培養細胞系が確立したので、これらを用いて種々の変異原に対する感受性を、コロニー形成能(致死感受性)と DNA 修復能を指標として調べている。哺乳類細胞との比較において、すでにわかったことは次の5点である。i) 254 nm の UV に対してより高感受性である、ii) 低 LET 電離放射線に対してはより低感受性である、iii) 254 nm の UV によって誘発されるピリミジンダイマーの除去能力は欠損しているか、あるいはあっても大変低い、iv) 254 nm の UV で誘発される修復 DNA 合成能は非常に低い、v) 化学発癌剤処理に対する修復 DNA 合成能も低い。

DNA 修復に関して哺乳類細胞と最も対照的なのが、UV 誘発 DNA 損傷に対する非常に高い光回復能の存在である^(10,20)。キンギョ由来の RBCF-1⁽¹⁷⁾ やアマゾンモリー由来の Pf⁽¹⁰⁾ では、光回復セクター(光回復率の最大値)は約1に達する。光回復能を欠損する魚類細胞は、現在までのところ、まだ報告がない。RBCF-1 細胞は、魚類培養細胞の中では種々の作用原に対して最も高い致死感受性を示す。しかし、UV 損傷の PR(光回復)能だけはちゃんと備えている。つまり、UV 照射後に暗黒条件下に置くと、除去修復能がないので UV 過敏症を呈して死んでしまうが、可視光線を当ててやるとほぼ100%の細胞が生き返る。

光回復能がそんなによく発達している魚類細胞が太陽光(現在の地表に達している太陽光の強度スペクトルは 300 nm より長波長側に広がり、286~320 nm の UVB や 320~390 nm の UVA を含む)に当たる時には、UVB などによる DNA の損傷生成と、もっと長波長の可視光線による光回復とが同時に起こっていると考えられるが、本当にそうだろうか? RBCF-1 細胞をサンランプ(313 nm に強度ピークを持ち、290 nm から 355 nm の範囲の波長を持つ。太陽光の部分的なシミ

ュレーターとして使われる)と昼光色タイプの蛍光灯の2つで同時に照射して、ピリミジンダイマー数の変動と細胞の生存率を調べた結果、まさにそのとおりであることが証明できた⁽²¹⁾。これに関連して、ヒトの皮膚癌の発生頻度と太陽光の中のUVBの強度とは因果関係にあることはよく知られた事実である。自然界にいる魚類ではどうだろうか? 現在、Setlowと共同研究を行なっている。

3. ヒト細胞との融合の試み

ところで、現在まで知られている限りでは、PR酵素の基質はピリミジンダイマーただ1つである。ピリミジンダイマーの開裂以外に、PR酵素の機能は本当に皆無なのだろうか? この問題に対する一つのアプローチとして、魚類細胞のPR遺伝子(*phr*)に関する研究を開始した。

まず、*phr*の染色体マッピングをめざして、RBCF-1細胞とヒト修復欠損細胞との細胞融合を試みることにした。RBCF-1は除去修復能欠損体なので、融合する相手の細胞としては同じく除去修復欠損かつ光回復能も欠くものがよい。ヒトの常染色体性男性遺伝病の一つで、太陽光による高発癌性疾患である色素性乾皮症(XP)患者由来細胞は、DNA修復に関してデータの蓄積が豊富であり、細胞も京大の武部教授から分与していただけたので、このXP細胞(XP2OS-SV40; 相補性A群)を使うことにした。ヒトの細胞とサカナの細胞の融合をやろうとするとは、なんとも無謀なことをするもんだ、とのコメントが多かった。特にサカナの細胞は25~27°Cで培養すべきもの、との考えが多いのも一因で、37°Cでヒト細胞と一緒に培養できるはずがない、というわけである。ところが、筆者らのRBCF-1細胞は37°Cですでに10年近く継代してきた細胞だから、少なくともこの点に関する問題はない。XP細胞には選択マーカーが入った細胞(XP2OS-SV-neo)が、武部教授のところですでに作られているので、RBCF-1細胞側に別の選択マーカーを入れることにし、pSV2-*gpt*を使うことにした。そして、哺乳類細胞で使われている実験条件を種々改

変した結果、大腸菌のXGPRT(キサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ)活性を安定して発現する魚類培養細胞クローンを得ることに成功した⁽²²⁾。

本格的な融合実験はこれからであるが、XP細胞とRBCF-1細胞を融合処理して得られたヘテロカロイドで、254nmのUVで誘導される修復DNA合成(XP, RBCF-1細胞それぞれ単独では修復DNA合成はほとんどゼロである)が有意に増加することがわかった。他の相補性群の細胞との融合結果を待たないと最終的な結論は下せないが、この結果の一つの解釈は、共に除去修復能を欠損する2種の細胞が互いの(どこだかわからないが)欠損箇所を補い合った結果、見掛け上、除去修復が見られたという考えである。現にXP細胞には、AからHまでの少なくとも8つの相補性群の存在が知られている。魚類とヒトとの間でDNA修復の相補性が証明できればDNA修復機構の系統学として大変面白いので、共同研究者とともに頑張っ取り組んでゆきたいと思っている。

文 献

- 1) 末広恭雄: “改訂 魚類学”, 岩波書店, 1974.
- 2) 江上信雄(編): “放射能と魚類”, 恒星社厚生閣, 1973.
- 3) 江上信雄(編): “実験動物としての魚類——基礎実験法と毒性試験” ソフトサイエンス社, 1981.
- 4) T. Yamamoto: “Medaka (Killifish), Biology and Strains”, Keigaku Pub. Co., 1975.
- 5) R. W. Hart, R. B. Setlow & A. D. Woodhead: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5574 (1977).
- 6) R. B. Setlow & W. L. Carrier: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 226 (1964).
- 7) 近藤宗平: “分子放射線生物学”, 学会出版センター, 1972.
- 8) 武部 啓: “DNA 修復”, 東京大学出版会, 1983.
- 9) E. C. Friedberg: “DNA Repair”, W. H. Freeman and Company, 1985.
- 10) A. Shima & R. B. Setlow: *Zool. Sci.*, **2**, 477 (1985).
- 11) K. Naruse, K. Ijiri, A. Shima & N. Egami: *J. Exp. Zool.*, **236**, 335 (1985).
- 12) R. J. Goss: *Perspect. Biol. Med.*, **17**, 485 (1974).
- 13) N. Egami & H. Etoh: *Exp. Gerontol.*, **4**, 127 (1969).
- 14) W. L. Russell, L. B. Russell & E. M. Kelly: *Science*, **128**, 1546 (1958).
- 15) K. Wolff & W. Ahne: *Adv. Cell Culture*, **2**, 305 (1982).
- 16) 伊佐かおる, 小村潤一郎, 嶋 昭紘: 組織培養, **12**, 19 (1986).
- 17) A. Shima, O. Nikaido, S. Shinohara & N. Egami: *Exp. Gerontol.*, **15**, 305 (1980).
- 18) J. Komura & A. Shima: in preparation.
- 19) K. Naruse, J. Komura & A. Shima: *Zool. Sci.*, **2**, 895 (1985).
- 20) A. Shima, M. Ikenaga, O. Nikaido, H. Takebe & N. Egami: *Photochem. Photobiol.*, **33**, 313 (1981).
- 21) A. Shima & R. B. Setlow: *Photochem. Photobiol.*, **39**, 49 (1984).
- 22) K. Isa & A. Shima: in preparation.