

# 昆虫細胞の高温下における細胞分裂停止

学生証番号 36513

資源生物制御学分野

木内 隆史

## 序論

近年、地球温暖化が問題となっており、この温暖化が変温動物である昆虫の分布域や発生にも影響を与えて、貴重種の全滅や害虫の大発生が起こることが懸念されている。このような現状からも、昆虫と温度との関係についての知見を深めることは重要性を増している。しかし、昆虫と温度との関係について現在まで行われてきた研究の多くは、発育や休眠に及ぼす影響や野外での昆虫個体数の変動を調べたものが主であり、温度による影響を生理・生化学的に調べた研究は少ない。本研究では、カイコ培養細胞を用い、昆虫細胞の温度に対する反応性について調べ、その分子レベルのメカニズムを解明することを目的とした。

## 結果と考察

### 1. カイコ幼虫の成長とカイコ培養細胞の増殖に及ぼす温度の影響

昆虫の成長速度が温度により影響を受けることは従来の研究から明らかにされている。そこで、カイコの成長と培養細胞の増殖を対比し、これらに及ぼす温度の影響についてまず確かめた。22 から 38 の範囲においてカイコ幼虫（鐘音）の体重増加と培養細胞（BmN 細胞株）の増殖について調べた結果、培養細胞にもカイコの成長への影響と同様の温度に対する反応性があることがわかった。培養細胞は 34 までは増殖がみられたが 38 では増殖が見られなくなった。細胞の生死をトリパンブルー判定試薬で調べると、46 では致死していたが、38 では増殖は停止しているものの、生存することが推測された。

### 2. 高温におけるカイコ培養細胞の DNA 合成

38 で細胞は生存しているものの増殖は停止していた。そこで、細胞分裂の過程を確かめるために、5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) の取り込みを温度間で比較した (Fig. 1)。22 から 34 で 24 時間培養した細胞では BrdU の取り込みに大きな変化はなかった。一方、38 でも、他の温度の 30% 程度と減少しているものの、取り込みが起こっていることが確認された。この結果から、38 でも DNA 合成はすぐに停止するわけではなく、用いた細胞の周期が同調していないためにある程度 S 期を通過する細胞があり、その後一定の時期で細胞増殖が停止することが示唆された。

### 3. カイコ培養細胞の高温における細胞周期の G<sub>2</sub> 期停滞

細胞周期における停止時期を特定するために、レーザースキャニングサイトメーターを用いて解析を行った。通常の培養温度である 26 と細胞増殖が停止する温度である 38 で培養した細胞の周期分布を比較すると、26 では G<sub>1</sub> 期の細胞が多くピークを示すのに対し 38 では G<sub>2</sub> 期にピークが移行していた (Fig. 2A,C)。また、培養温度を 38 から 26 に温度を戻すと、通常温度のパターンに回復した (Fig. 2B,D)。以上の結果、高温はカイコ培養細胞の細胞周期を G<sub>2</sub> 期で阻害すること、それは可逆的な反応であることが示された。

### 4. カイコ生体細胞の高温における細胞周期の変化

培養細胞の高温での G<sub>2</sub> 期阻害が生体細胞でも起こる現象であることを確かめた。カイコ 4 齢幼虫を 26 あるいは 38 で 24 時間処理し、体液を採取して血球の細胞周期の解析を行った。脱皮直後の幼虫に温度処理を施したときには、細胞周期に変化は見られなかった (Fig. 3 0- 1)。しかし、脱皮後 1 日齢、2 日齢の幼虫に温度処理を行うと、より核相の大きい細胞の割合が増加した (Fig. 3 1- 2, 2- 3)。これは、脱皮後 1 日齢から血球の分裂が高まり、その際に培養細胞と同様に高温下では G<sub>2</sub> 期阻害が生じた結果であると考えられた。また消化管の細胞についても同様の解析で、温度により細胞周期に変化がみられることを確認した。

## 5. カイコ *cyclin A* の配列決定と温度間における細胞周期制御遺伝子発現の変化

G<sub>2</sub> 期阻害が起きていることから、細胞周期に関与する遺伝子の発現に変化が生じていると考えられた。M 期の開始に関わる遺伝子である *cdc2* と *cyclin B* は、すでにカイコにおいて cDNA として配列が得られていたが、G<sub>2</sub> 期の通過に関与する *cyclin A* はまだ配列が決定されていなかった。そこで、カイコのゲノムデータベースからカイコと同じ鱗翅目昆虫である *Plodia interpunctella cyclin A* と相同性の高い領域を調べ、その配列からプライマーを設計し、カイコ培養細胞から抽出したトータル RNA から合成した cDNA を鋳型としてシーケンスを行った。実際に確認した配列から翻訳されるアミノ酸配列には、他の生物のサイクリン A との高い相同性が認められた。

配列決定した *cyclin A* を含め、細胞周期制御遺伝子 *cyclin B*、*cdc2*、ヒートショックプロテイン *hsp90* および対照として *actin A3* の高温下における発現をリアルタイム PCR で確認したが、全体的に発現は低下し、とくに大きく変化する遺伝子はなかった (Fig. 4)。さらに細胞周期を制御する遺伝子について調べていく必要がある。

## 結論

昆虫細胞の温度に対する反応性を培養細胞を用いて解析した結果、38℃ で増殖は停止し、これは細胞周期が G<sub>2</sub> 期で停滞していることによることを明らかにした。高温による G<sub>2</sub> 期阻害はカイコ生体細胞でも認められた。

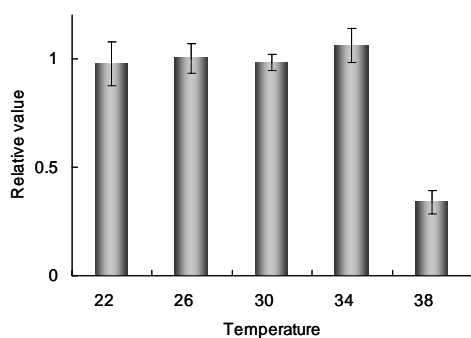


Fig.1 各温度で培養した細胞へのBrdUの取り込み

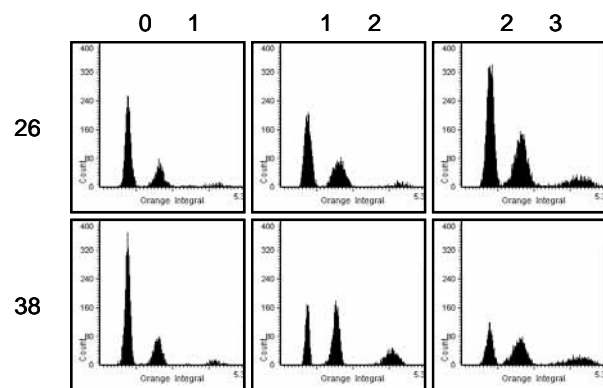


Fig.3 高温で処理したカイコにおける血球の細胞周期の比較

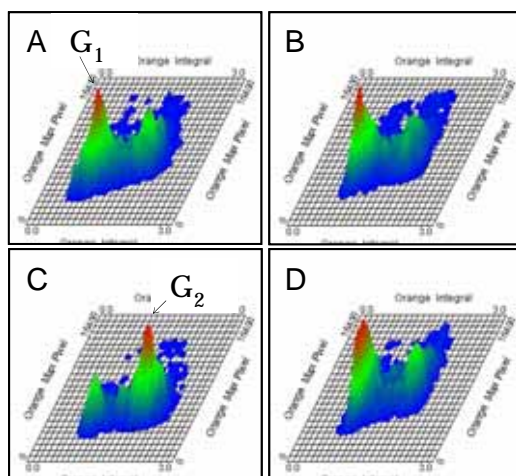


Fig.2 カイコ培養細胞の高温下における細胞周期の変化  
A:26 24h B:26 48h  
C:38 24h D:38 26h 24h

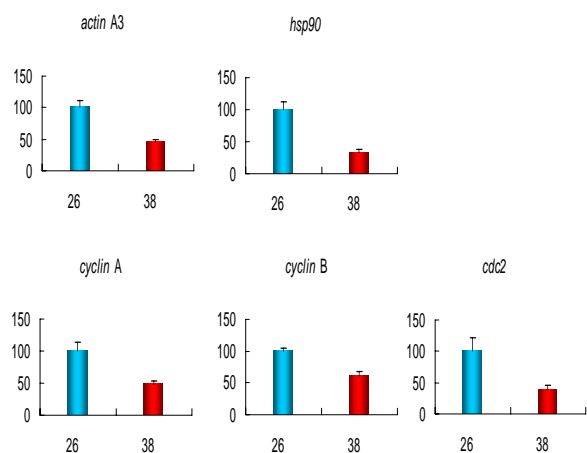


Fig. 4 カイコ培養細胞の高温における遺伝子発現の変化