

昆虫細胞の高温下における細胞分裂停止
(Arrest of cell cycle in insect cells under high temperature)

東京大学新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

資源生物制御学分野

学籍番号 36513

木内 隆史

指導教官 永田 昌男

目次

Summary		1
序論		2
第 1 章	カイコ培養細胞の温度反応性	
	緒言	4
	材料と方法	6
	結果	10
	考察	13
	Tables & Figures	18
第 2 章	カイコ細胞の高温下における細胞周期の停滞	
	緒言	25
	材料と方法	27
	結果	30
	考察	33
	Tables & Figures	38
第 3 章	カイコ培養細胞の高温における細胞周期停滞の機構	
	緒言	44
	材料と方法	46
	結果	50
	考察	52
	Tables & Figures	55
総合考察		62
要旨		66
謝辞		69
参考文献		70

Summary

Insects are poikilothermic animals and they sensitively respond to thermal environment. To investigate influences of temperature on insect cells, cultured BmN cells derived from the silkworm, *Bombyx mori* at different temperatures and investigated their proliferation. The proliferation of BmN cells was accelerated as temperature increase but stopped at 38°C. Cell viability test with trypan blue and BrdU incorporation assay revealed that BmN cells were viable and synthesized DNA at 38°C. These results suggested that BmN cells under the high temperature stopped their cell cycle at a particular point. The arrested point was defined G₂ by cell cycle analysis with a laser scanning cytometer. Cell cycle of the hemocytes and the midgut cells in the silkworm were also influenced by high temperature. To understand the molecular mechanism of G₂ arrest in the cell division at high temperature, mRNA level of cell-cycle regulating genes: *cyclin B*, *cdc2*, and *cyclin A* that was cloned in this research, heat shock protein *hsp90* and *actin A3* were examined using real-time PCR. The results, however, showed that all of them reduced their expression as the same and a particular interference point of gene expression was not determined.

序論

地球の気温は 19 世紀後半から約 100 年間で 0.6°C 上昇した。さらに 1990 年から 2100 年の間には、1.4~5.8°C 上昇するとも予測されている。地球温暖化問題では海面上昇や異常気象のような直接的影響が懸念されがちであるが、それらに伴う食糧生産量の低下や生物種の減少などの影響も大きい。昆虫は変温動物であることから、温度に敏感に反応し、温暖化の影響を受けやすい生物の代表といえる。温暖化は今後、昆虫の分布域や発生に影響を与え、貴重種の絶滅、生命分布域の変化や病虫害の大発生をもたらすことが考えられる。これらのことは現在においてもすでに身近なところで確認されている。例えば、南方由来のナガサキアゲハは年平均気温の上昇につれて分布域を北上させており（吉尾, 1997）、2000 年には関東地方においてもこの種が観測されている。高温化が世代数を増やし、冬季死亡率を低下させることで作物害虫の増加をもたらすことも実際の観察データから明らかになっている（山口, 2001）。このような現状から、昆虫と温度との関係について知見を深めることは近年になってさらに重要性を増している。

一般に、昆虫の発育日数と温度には次のような関係式が成り立つことが知られている。

$$(T - T_0) D = K$$

T は温度、 T_0 は発育零点で低温での発育限界温度、D は温度 (T) で発育に要した日数、K は有効積算温度定数であり、値は種により異なっている。すなわち、昆虫種により温度に対する反応性は異なり、また温度によって成長が調節されていることをこの式は表している。昆虫は外界の気温を敏感に感知し、成長速度を調節することで個体間における成長格差をなくし成虫になる時期を合わせる。すなわち、春の早い時期に孵化した個体はまだ気温が低いために成長がゆっくり進み、一方、春の遅い時期に孵化した個体はすでに外界の気温が上昇しているために成長がすみやかに進行する。結果として孵化時

期の異なる個体の羽化時期が種全体としてほぼ一致することになり、短い成虫の期間においても配偶者を見つけることができる。

Yamamura and Kiritani (1998) は、昆虫の発育零点と有効積算温度を利用し、温暖化による世代数の増加量を予測する計算方法を提案している。一方、山口ら (2001) は、野外での昆虫個体数の変動を調べ、気温変化の直接的、間接的影響を調べている。これら二通りの研究は、気温変動の影響を予測するのに大きく貢献すると考えられ、また種々の温度によって影響を受けた昆虫が示す発生や成長に関する研究は多くなされている。しかし、温度が昆虫の体内にどのような影響を与えているかについて、生理・生化学的に調べられた研究例は少なく、その分子メカニズムは全くわかっていない。適応範囲ではない温度にさらされた昆虫に起こる生体的異常を把握し、そのメカニズムを解明し、昆虫の温度に対する反応性を明らかにすることは重要な課題であると考えられる。これを著者は本研究の目的とした。

温度に関する研究を昆虫生体で行う場合、飼育環境を厳密に整えることが難しく、温度以外の要因が影響をもたらすことが多々ある。そこで本研究では、昆虫由来の培養細胞において温度に対する反応性を調べ、その機構を解明することとした。温度の影響を調べるにあたり昆虫培養細胞を用いることができれば、多くの実験的問題を解決できるだけでなく、分子生物学的メカニズムの解析も迅速に行うことが可能と予想される。

本研究では、カイコガを材料とし、昆虫生体と培養細胞の温度反応性を比較し、培養細胞を用いた実験系を確立することを最初の目的とした。さらに、培養細胞でみられた温度に対する反応性を細胞学的に調べることで細胞周期への影響を明らかにし、同様にその影響が生体でもみられることを確認した。そして、昆虫細胞が示した温度反応性のメカニズム解明のために遺伝子レベルでの解析を試みた。

第 1 章

カイコ培養細胞の温度反応性

緒言

昆虫は変温動物であり温度に敏感に反応する。とくに昆虫の成長における温度の影響は大きく、一般に温度上昇に伴い成長は早くなる (Ashburner and Thompson, 1978)。カイコにおいては給餌経済性を高める必要性から、飼料食下量および消化量に対する飼育温度の影響を調べる研究が盛んに行なわれた (松村ら, 1958; 竹内ら, 1964; 上田・鈴木, 1967)。また、高宮・中島 (1970) は人工飼料育における飼育温度と眠蚕 (幼虫脱皮期) 体重との関係について検討している。最近では、温度と成長の速度との基本的検討を須藤ら (1997) が行い、発育零点と有効積算温度が求められている。

カイコの他にも昆虫の温度反応性についての研究は多く、とくに低温に対する反応性として、昆虫に特徴的な生理現象である休眠の研究がさかんに行なわれてきた。しかし、数多くの研究の中に温度による影響を生理・生化学的に調べた研究は少ない。しかも、高温条件に対する反応性についての研究に限ればほとんどないに等しい。昆虫を研究する場合、第一に飼育法を確立することの難しさが問題となる。さらに温度に関する研究となると、飼育環境の湿度や餌の劣化など、温度以外の環境要因が複雑に絡むことでより問題は膨らむ。その問題を回避するため、本研究では昆虫培養細胞を用いることを考えた。

培養細胞は無菌的であり生体では難しい均一な条件での実験が可能である。分子生物学的な実験が迅速に行なえることも利点となる。昆虫ではショウジョウバエやヒトスジシマカをはじめ、多くの培養細胞株が樹立されている。カイコにおいても例外ではなく、

BmN 細胞をはじめとした培養細胞が継代されている (Maeda, 1989)。培養細胞は生体細胞のモデルとして扱うことができ、本質的には生体での反応は培養細胞にも反映しているはずであると考えた。

培養細胞を用いて昆虫の温度反応性を調べる足がかりとして、まず昆虫培養細胞に生体と同様に温度の影響が反映されることを確かめることにした。すなわち、カイコの成長と培養細胞の増殖を様々な温度条件下で比較することで温度による影響が培養細胞にも反映されることを確かめた。さらに高温条件下において確認された細胞増殖の停止に関して形態的観察・生存率の測定を行い、DNA 合成能を知る目的で 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の取り込みを調べた。

材料と方法

昆虫

カイコ: カイコガ (*Bombyx mori*) の品種は資源生物制御研究室で継代している鐘音を主に用いた。通常の飼育は、温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12 時間明-12 時間暗条件下であり、人工飼料 (日本農産工業製シルクメイト) で飼育した。

培養細胞

当研究室で継代している BmN4 (BmN) 細胞 (Maeda, 1989) を用いた。培地には 10% 牛胎児血清 (foetal bovine serum: FBS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を添加した TC-100 培地 (Sigma-Aldrich CO. Ltd., Irvine, UK) に Antibiotic antimycotic (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を 1% 加えたものを用い、 25°C のインキュベーターで維持した。

カイコの脱皮および羽化に及ぼす温度の影響

脱皮率および羽化率の検定には、上記した方法により飼育したカイコを用いた。3 齢幼虫 2 日齢 (III2) まで飼育し、脱皮のための絶食時期に入ったカイコ幼虫を雌雄 10 頭ずつ、 $22 - 38^\circ\text{C}$ に設定した BIO MULTI INCUBATOR LH-30-8CT (NH system) 内に放置し、脱皮行動を観察した。同じく、飼育し蛹になった直後のカイコ、雌雄 5 頭ずつをインキュベーター内に放置し、羽化行動を観察した。

各種温度におけるカイコ幼虫の成長比較

飼育温度 25°C で人工飼料により飼育し、4 齢幼虫になった直後のカイコ (鐘音) の体重を 1 頭ずつ秤量し、雌雄 10 頭ずつをプラスチック容器 ($20.5\text{cm} \times 15.0\text{cm} \times 5.2\text{cm}$)

に入れた。10 g - 20 g の人工飼料を、カイコの成長に応じて十分量与えながら 22、26、30、34、38℃の 5 段階の温度に設定した BIO MULTI INCUBATOR LH-30-8CT (NH system) 内で飼育した。飼育中の温度は最高・最低温度を記憶できるデジタル温度計を用い、±1℃以内の変動であることを確かめた。光周条件は 24 時間暗条件とした。餌の劣化を防ぐために毎日餌を交換し、その都度 1 頭ずつの体重を秤量し、記録した。インキュベーター内の湿度は、水を入れた容器を置くことで 60-70%に保った。

各種温度における培養細胞の増殖比較

カイコ培養細胞 BmN 株を 25 cm²のシャーレを用い 25℃で十分な細胞数が得られるまで培養した。細胞をセルスクレーパーで剥がしよくピペッティングした後、血球計算盤を用いて細胞濃度が 5×10⁴ cell/ml になるように TC-100 培地で希釈した。希釈した細胞を 96 穴のマルチウェルプレートに 200 μl ずつ分注し、培地の乾燥を防ぐために滅菌プレートシールで密封した。細胞が付着および安定するまで 25℃のインキュベーターで 2 日程度培養した。細胞の様子を顕微鏡下で確認したのち、1 列を直ちに 10 μl のホルマリン（最終濃度 0.5%）で固定し、22、26、30、34、38℃の 5 段階の温度に設定した BIO MULTI INCUBATOR LH-30-8CT (NH system) 内にプレートを移した。24 時間置きに 1 列ごとホルマリンで固定しながら各温度での培養を続けた。

Crystal Violet-SDS 法

細胞数の測定は本研究で考案した Crystal Violet-SDS 法で行った。各温度での培養を終え細胞を固定したプレートは 200×g で 20 分間遠心し、細胞をウェルの底にしっかりと附着させた。培地はタッピングにより取り除き、0.1% Crystal Violet 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を各ウェルに 50 μl 加え、10 分間細胞を染色した。タッピングにより Crystal Violet 溶液を取り除き、蒸留水 (Distilled Water: DW) で 2 分間×2 回洗浄した。洗浄後、各ウェルに 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液を

100 μ l加えMICRO MIXERで攪拌して細胞を破壊して、色素を溶出させた。最後に、ウェルの550 nmにおける吸光度をMicroplate Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Alfred Novel Drive, Hercules, CA, USA) により測定した。あらかじめ血球計算盤で細胞数を測定し、10倍希釈段階で作成した検量線をFig. 1-1に示す。実験における細胞数はこの検量線の式を用いて、吸光度から細胞数を逆算することで得た値である。

細胞の観察と生死判定

細胞の観察は倒立顕微鏡 IX70 (Olympus Co., Tokyo, Japan) を用い、写真は顕微鏡デジタルカメラ DP12 (Olympus Co., Tokyo, Japan) で撮影した。細胞死の判定には死細胞を特異的に染色するトリパンブルー染色法を用いた。0.4% Trypan Blue Stain (Gibco Co., Grand Island, NY, USA) を培地の 1/20 量加えて、倒立顕微鏡の一定の範囲内 ($3.03 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ もしくは $6.35 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$) で細胞をカウントし、染色細胞/全細胞で死細胞の割合を算出した。

5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 取り込み

Cell Proliferation Biotrak ELISA System, version 2 (Amersham Biosciences UK Ltd., Little Chalfont Buckinghamshire, England) のキットを用いた。 $5 \times 10^4 \text{ cell/ml}$ 細胞を 96 穴のマルチウェルプレートに 100 μ l ずつ分注し、培地の乾燥を防ぐために周囲のウェルには 300 μ l の DW を入れた。キットに含まれる BrdU Labeling Solution を TC-100 培地で 1/100 に希釈したものを各ウェル 10 μ l 添加し (BrdU 最終濃度 10 μ M)、22、26、30、34、38°C の 5 段階の温度で 24 時間培養を行った。培養後 300 \times g で 10 分間遠心してからタッピングにより培地を取り除いた。1 ウェルあたり 100 μ l の Fixative Solution を加え、室温で 30 分間インキュベートして固定した後、タッピング

により Fixative Solution を除いた。Blocking Buffer を各ウェル 100 μ l 加え、室温で 30 分間インキュベートした後、タッピングにより Blocking Buffer を取り除いた。Peroxidase-labelled anti-BrdU Working Solution を各ウェル 100 μ l 加え、室温で 60 分間インキュベートした。タッピングで抗体を取り除き、Washing Solution で 3 回ウェルを洗った。TMB Substrate 100 μ l を各ウェルに加え、室温で MICRO MIXER を用いて混合しながら 5 分間反応させた後、1M 硫酸 25 μ l で反応を停止した。反応停止後 5 分以内に Microplate Imaging System (Bio-rad Laboratories) を使用してウェルの 450 nm における吸光度を測定した。Assay blank として培地のみに対して同様に測定した値を用い、Non-specific binding control として BrdU Labeling Solution を添加しない細胞に対して同様に測定した値を用い、これらを各温度で培養した細胞の測定値からそれぞれ除いて測定値を補正した。

結果

カイコの脱皮および羽化に及ぼす温度影響

様々な温度条件下に3眠期に入った幼虫を放置し、脱皮行動を観察した結果を Table. 1-1 に示す。22°Cから34°Cにかけては温度の上昇に伴い脱皮は早く終了した。しかし、38°Cまで温度が上昇すると、新頭部形成 (head capsule slippage; HCS) もみられず、その後しだいに弱り最終的に致死した。一方、蛹化直後に各温度に置いて、羽化までの様子を観察した結果を Table. 1-2 に示す。22°Cから30°Cにかけて、温度が高くなるにつれ羽化は早くみられた。しかし、34°Cでは、雄の蛹に羽化行動が開始されるものの完全に羽化できないものがみられ、雌の蛹はすべて羽化直前で致死した。さらに、38°Cではすべての蛹が発育の途中で停止し、致死した。

カイコ幼虫の成長と温度との関係

22、26、30、34、38°Cの5段階の温度でカイコの4齢幼虫を飼育し、体重変化を記録した結果を Fig. 1-2 に示す。一般的なカイコの飼育温度である26°Cと比較し、30°C、34°Cと温度上昇に依存して体重増加が早まったが、38°Cでは26°Cよりも遅延した。一方、低温である22°Cでも体重増加は遅れた。なお、高温における3日齢以後の体重増加の停止あるいは低下は脱皮期に入ることによる。いずれの温度でも発育において外見的な異常はみられなかった。ほぼ直線的増加を示す1日齢から3日齢の体重増加速度を直線の傾きから求めた結果を Table. 1-3 に示す。30、34°Cの成長速度が高く、22°Cと38°Cでの体重増加速度は他の温度の半分程度まで低下していた。22°Cから30°Cで飼育したカイコは日数に差があるものの最終的には眠(脱皮期)に入り、5齢への脱皮が確認された。しかし、34°Cで飼育したカイコでは眠に入り、新頭部が出現する(HCS)までは進行したがその後の脱皮行動が正常に行なわれず、腹部の体色が橙色に変色し死んでしまった。

38°Cで飼育したカイコは眠に入らず、しだいに弱り致死した。

カイコ培養細胞の増殖と温度との関係

22、26、30、34、38°Cの5段階の温度で BmN 細胞を5日間培養し、Crystal Violet-SDS法を用いて細胞濃度を算出した結果を Fig. 1-3 に示す。また、グラフの直線的な傾きから増殖率を求めた値を Table. 1-3 に示す。22、26、30°Cと細胞の増殖率はそれぞれ 2.93×10^4 、 4.14×10^4 、 5.87×10^4 cells/ml/day と温度依存的に早くなったが、培養の後半では細胞数がプラトーに達するために増殖は停止した。34°Cでは初めの1日は増殖がさかんで 4.99×10^4 cells/ml/day と高い数値を示すが、1日目以降は増殖率が 2.12×10^4 cells/ml/day と著しく減少した。38°Cは初めから増殖が見られずに一定の細胞数を示した。34、38°Cでは4日目以降に細胞数の減少が見られた (Fig. 1-3 Day4-5)。

細胞の形態と生存

様々な温度で培養した細胞を倒立顕微鏡で観察した。22°Cから30°Cの範囲では細胞がコンフルエントに達して増殖阻害が生じない限り形状はほぼ丸型で、際立った変化も見られなかった (Fig. 1-4d, D)。34°Cでも形態的な違いはなかったが長時間培養することで一部凝集が見られた。38°Cでは培養後12時間で細胞が伸びる異常が観察された (Fig. 1-4a, A)。また、長時間培養を続けると激しい凝集が見られるようになった (Fig. 1-4c, C)。各温度で6日間の培養後、細胞の生存を確かめるためにトリパンブルー生死判定法を用いると、増殖が停止している38°Cの細胞でも30、34°Cと同程度の染色しかみられなかった (Table. 1-4)。42°C、46°Cでの培養は12時間で細胞膜に変性異常をもたらした (Fig. 1-4b, B)。異常を示した細胞は長時間培養してもその後変化することはなかった。トリパンブルー試薬では、42°Cで30%の細胞が、46°Cで70%の細胞が染色された (Table. 1-4)。

高温におけるカイコ培養細胞の BrdU の取り込み

38°Cで培養細胞は生存しているものの増殖は停止していると考えられた。そこで細胞分裂を確かめるために、BrdU の取り込みを 22、26、30、34、38°Cで比較した。BrdU を添加して 22、26、30、34°Cで 24 時間培養した細胞では、取り込みに大きな違いはみられなかった。一方、38°Cで培養した細胞でも他の温度の 30%程度と減少しているものの、BrdU の取り込みが起こっていることが確認された (Fig. 1-5A)。前もって各温度での培養を 100 時間行った細胞に対し BrdU を添加し、さらに 12 時間培養を行うと 38°Cでの取り込みは著しく減少した (Fig. 1-5B)。

考察

はじめに、カイコ生体に及ぼす温度影響を確認しておくために幼虫脱皮と羽化に及ぼす温度影響を調べてみた。一般的には、温度の上昇に伴い、脱皮や羽化は比較的早くみられるようになった (Table. 1-1, 1-2)。しかし、脱皮においては 38°C で、羽化においては 34°C でそれぞれの行動が阻害された。このようなことは、カイコの成長や発育が温度による影響を強く受けていることを示唆している。

昆虫における温度による影響を生理・生化学的に調べるために、本研究ではより実験条件のコントロールしやすい培養細胞を利用することを考えた。そのためには生体での温度反応性が培養細胞にも反映されていることを確かめることが第一に必要であった。昆虫に及ぼす温度影響が培養細胞にも反映されていることは、カイコ幼虫の体重増加と培養細胞の増殖を 22°C から 38°C の範囲で比較することで確かめた (Fig. 1-2, 1-3)。それぞれの成長率に対する温度依存性は類似しており、22°C から 30°C の範囲では温度の増加とともに成長率が上がり、そこで頭打ちとなり、34°C では 30°C と同程度になった。さらに 38°C では成長率は著しく減少した (Table. 1-3)。この結果、培養細胞もカイコ幼虫と同様に温度依存的に増殖が制御されていることが示唆された。しかし、培養細胞は 38°C で増殖が停止するのに対し、カイコ幼虫においてはこの温度では体重増加は遅延するものの、外見的には正常な成長がみられた。これは BmN 細胞が卵巣由来の単一の細胞であり、温度に対する反応性が一律であるのに対し、カイコ幼虫が様々な細胞の集合であり、組織の細胞ごとに温度に対する反応性が違うことに原因があると考えられる。また、カイコ幼虫では、例えばヒートショックプロテインのような高温に対する何らかの防御機構が個体として働くからであるとも考えられる (Landais et al., 2001)。しかし、38°C で飼育したカイコ幼虫では HCS (新頭部の出現) が起こらないことや 34°C で脱皮阻害が起こることを考えると、生体でも 38°C で細胞に異常が生じていることは容易に推

測される。さらに、カイコの細胞分裂は脱皮サイクル依存的に起こり、脱皮期の直前から盛んに細胞分裂が観察されることを考えれば、38°Cでも体重増加が観察されるのは、齢期前半は細胞の体積が増加する時期であり、細胞分裂への影響が及ばないと考えれば理にかなっている。このことに関しては、カイコ幼虫組織の細胞数の温度間での変化を比較すれば明らかにできるだろう。また、34°Cで脱皮阻害が起こり腹部に変色が見られたことから、高温は内分泌系の細胞を通じて、個体全体にも影響を与えている可能性が示唆される。

培養細胞は38°Cで増殖が停止した (Fig. 1-3)。このとき細胞に起きている変化を形態からも確認した (Fig. 1-4)。38°Cでは12時間で細胞の伸長がみられた (Fig. 1-4A, a)。この細胞の伸長は温度を26°Cに戻すことで、もとの状態に戻る可逆的な変化であり、このとき同時に細胞増殖も回復するので、この形態的变化は高温における細胞増殖の停止と関連性があると考えられる。細胞が伸長するという報告は酵母で細胞周期をG₂期で阻害したときにみられる現象と報告されている (Nurse and Thuriaux, 1980)。すなわち、高温での培養で増殖が停止した BmN 細胞では細胞周期の特定の時期で増殖が停止していることが示唆された。この点については2章で解析を行った。

38°Cで培養を続けていると細胞はしだいに凝集を始める (Fig. 1-4C, c)。凝集は常温でも細胞がコンフルエントな状態になることで観察される現象であり、細胞にかなりの負担がかかっている状態であると予想される。それを裏付けるように、凝集した細胞は温度を戻しても状態は回復しないし、細胞増殖も復帰しない。高温下とコンフルエントな状態の両者に共通していることは、細胞増殖が停止しているということである。細胞増殖停止状態が続くことが凝集を引き起こす要因となっているのかもしれない。このような38°Cでみられた影響は、比較的早い時間で現れることと、培地を変えないでも温度を戻すだけで形態および増殖が回復することから、温度による特異的な反応であると考えられる。

34°Cでは増殖は続くものの増殖率はしだいに減少する。4日目には細胞の増殖は停止し一部の細胞では凝集がみられた。これは、34°Cでも高温の影響は少なからずあり、長い時間をかけて影響が蓄積した結果であると考えられる。一般に、温度の生物への影響は、温度の値とともに、それにおかれた時間の影響があることが知られている (Schmidt-Nielsen, 1997)。

42°C以上の温度では培養してから数時間で細胞膜に異常がみられた (Fig. 1-4B, b)。これは高温により膜を構成するタンパク質が変性し構造が破壊された結果であると考えられる。一度、膜構造が壊れた細胞は温度条件を変えても、もとに戻ることはなかった。すなわち、42°Cでは不可逆的な変化が起こり死に誘導されたと考えられる。

トリパンブルー染色テストにより、38°Cの細胞は染色される細胞が少なく、増殖が停止しているが生存していることが推測された (Table. 2-1)。これは、38°Cで増殖が停止した細胞を26°Cに戻すことで増殖が回復する結果とも一致する。膜異常が観察される温度である42°Cの細胞もトリパンブルーでの染色率は高くなかったが、この細胞は温度を26°Cに戻しても膜異常は改善されず、増殖も起こらない。一方、同じく膜異常がみられた46°Cの細胞は、トリパンブルーでほとんどの細胞が染色された。トリパンブルー染色法は実験的な問題として死細胞が少なくカウントされてしまう問題があるが (Altman et al., 1993; Mascotti et al., 2000)、そのことを考慮しても、42°Cでは半分近くの細胞が生存しているという結果となる。この原因は42°Cの染色されない膜異常細胞は細胞内部ではまだ活性があること、それに対し46°Cではすべての細胞が完全に活性を失っていることとの差だと考える。

細胞周期の過程で新規に合成されるDNAにBrdUが取り込まれることを利用して、各温度培養下での細胞のDNA合成を比較した。昆虫では細胞分裂が停止してもDNA合成は停止せず、M期を通過してDNA複製が再び開始される現象 (Endoreplication) がしばしば観察されるため (Edgar and Orr-Weaver, 2001)、増殖が停止した細胞でも

DNA 合成は行なわれている可能があった。実験結果では、22°Cから 34°Cの範囲では BrdU の取り込み量に大きな違いはみられなかった (Fig. 1-5A)。24 時間の培養では細胞数に大きな変化はないため、この結果は BrdU の取り込みと温度には直接的な関係がないことを示唆する。一方、38°Cで培養した細胞でも他の温度の 30%程度と減少するものの、BrdU の取り込みはあった。昆虫の培養細胞では細胞周期の同調が実験的に困難なことから、本研究で用いた細胞では細胞周期は同調していない。従って、S 期に入らない細胞が増加したことにより、BrdU の取り込みは全体として減少し、一方、取り込みが引き続きみられるのは、増殖が停止するまでに S 期を通過する細胞が存在するためであると考えた。すなわち、細胞は細胞周期の一定の段階で止まったと推測される。この点は、あらかじめ 38°Cで細胞の世代時間 (約 72 時間) より長い培養を行った場合には、BrdU の取り込みが全く起こらないことで確認された (Fig. 1-5B)。34°Cでも 96 時間を過ぎたあたりから細胞増殖がみられなくなった (Fig. 1-3)。この点は 34°Cでも 100 時間の培養した後では、BrdU の取り込み量が減少することと一致する。(Fig. 1-5B)。34°Cの温度下で長時間を経て起こる細胞増殖の停止と、その後の細胞数の減少は、38°Cで早期にみられる増殖停止とは異なるメカニズムで起こると考えられる。それは、増殖を停止しながらも細胞数が一定に維持されてきた 38°Cでも、96 時間以後には細胞数の減少がみられることから示唆される。細胞死を誘導するようなゆっくりとした生体的変化が 34°C以上では進行していることが考えられる。哺乳類の培養細胞では、温度が変化するときの細胞内のグルコースやラクトース代謝などの変化が報告されている (Chuppa et al., 1997)。代謝の老廃物が培地中に蓄積することにより細胞死が起こったことも十分に考えられる (Glacken et al., 1986)。

本研究で、培養細胞はカイコ生体の温度反応性をよく反映していることがわかった。カイコは品種間により温度に対する反応性が異なることが知られている。とくに高温耐性に優れたカイコ系統の成長に対する温度の影響を調べ、今回の鐘音の結果と比較する

ことは非常に興味深いところである。また、体内でも組織による温度反応性の違いはあるであろう。BmN 細胞は卵巣由来であるとされているので温度反応性は卵巣のそれを反映していると考えられる。他の組織由来の細胞を用いれば異なる反応性がみられるかもしれない。当研究室で BmN とともに TC-100 培地を用いて継代している Sf 細胞の最適な培養条件は 28℃であるが 37℃でも増殖ができるように細胞が適応するという報告がある (Gerbal et al., 2000)。Sf 細胞の由来はヨトウガの一種 *Spodoptera frugiperda* で (Vaughn et al., 1977)、原産がアメリカからアルゼンチンにかけての西半球の熱帯域であるため、培養細胞は由来昆虫の性質を残していると考えられる。昆虫種間による温度反応性の違いを探るとき、異なる種由来の培養細胞を利用することも今後の研究の視野に入れておきたい。

Table. 1-1 カイコ幼虫の脱皮率に及ぼす温度の影響

Temperature(°C)	Total No.	No. of ecdysed larvae		
		Day 1	Day 2	Day 3
22	20	0	20	0
26	20	2	17	1
30	20	17	1	2
34	20	18	2	0
38	20	0	0	0

眠（脱皮期）に入ったカイコ3齢幼虫（Ⅲ2）を各温度条件下に放置して脱皮行動を観察した。

Table. 1-2 カイコ蛹の羽化率に及ぼす温度の影響

Temperature (°C)	Total No.	No. of eclosed adults			
		Day 8	Day 10	Day12	Day14
22	10	0	0	5	5
26	10	1	9	0	0
30	10	6	4	0	0
34	10	2	2	0	0
38	10	0	0	0	0

蛹になった直後のカイコ（P0）を各温度条件下に放置して、羽化を観察した。

Table. 1-3 カイコ幼虫と培養細胞の成長率

Temperature		22°C	26°C	30°C	34°C	38°C
Silkworm growth rate (g/day)	IV1-IV3	0.077	0.145	0.170	0.181	0.086
BmN cell growth rate ($\times 10^4$ cells/ml/day)	Day1-3	2.931	4.138	5.871	2.117	-0.362

Silkworm growth rate (g/day) : Fig. 1-2 の4齢1日齢から3日齢 (IV1 - IV3) の各温度間の体重増加の傾きをカイコ幼虫の成長率として求めた。

BmN cell growth rate (cells/ml/day) : Fig. 1-3 の培養後1日目から3日目まで (Day 1-3) の各温度間の細胞数増加の傾きを培養細胞の成長率として求めた。

Table. 1-4 トリパンプルーによる細胞生死判定

Temperature (°C)	30	34	38	42	46
Stained cell (%)	1.6	9.7	9.7	30.9	74.7

各温度で6日間培養した細胞 (BmN株) を0.4% Trypan Blueで染色した。

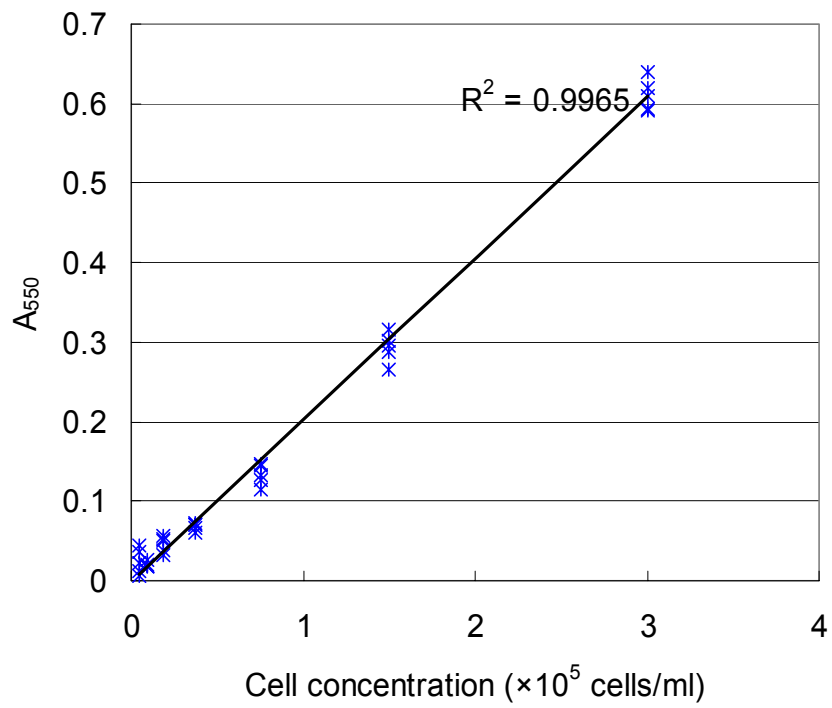


Fig. 1-1 Crystal Violet-SDS法の検量線
BmN細胞を10倍希釈段階で希釈してCrystal Violet-SDS法を行なった。直線：近似直線

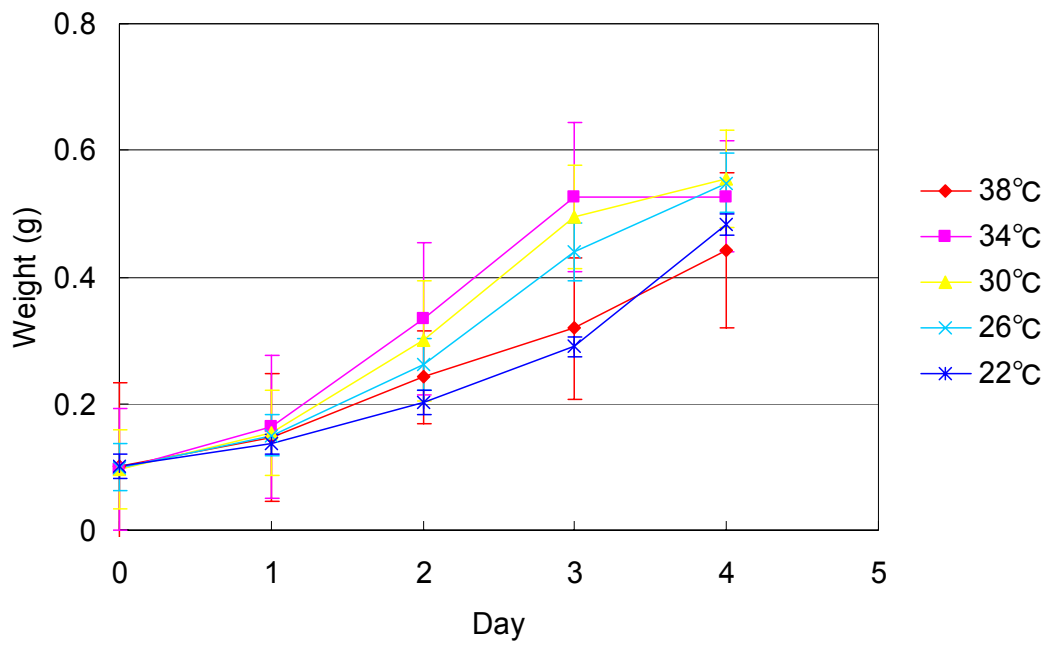


Fig. 1-2 カイコ4齢幼虫の体重増加と温度との関係
 カイコ（鐘音）4齢幼虫を各温度で4日間、人工飼料育し体重を測定した。測定値は平均値±SDで表した。

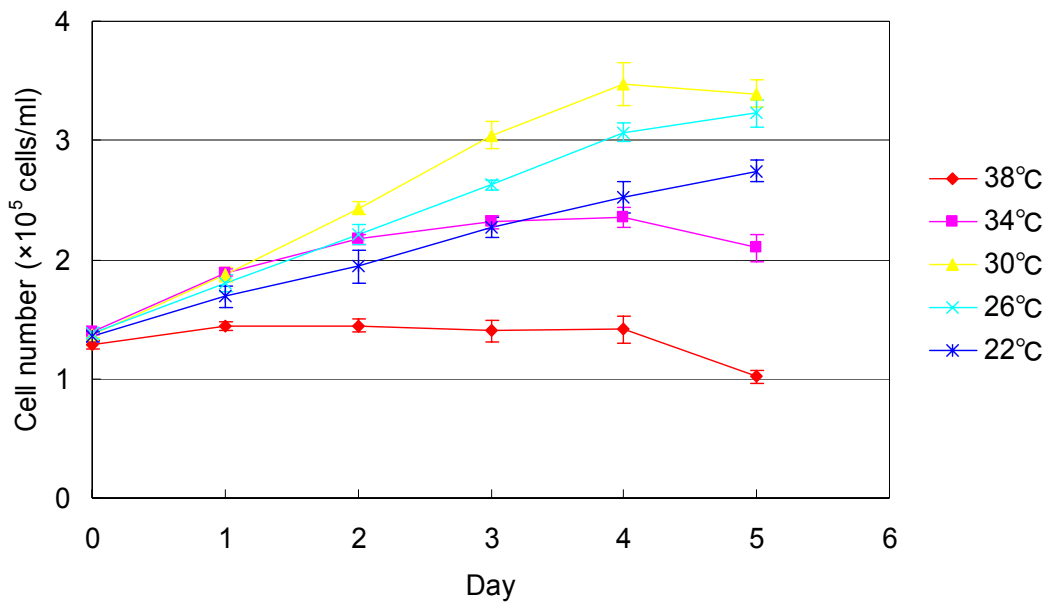


Fig. 1-3 カイコ培養細胞の増殖と温度との関係

カイコ培養細胞 (BmN株) を各温度で5日間培養し、24時間ごとにホルマリンで固定した。培養後Crystal Violet-SDS法を用いて細胞濃度を求めた。細胞数はFig. 1の検量線から算出した。測定値は平均値±SDで表した。

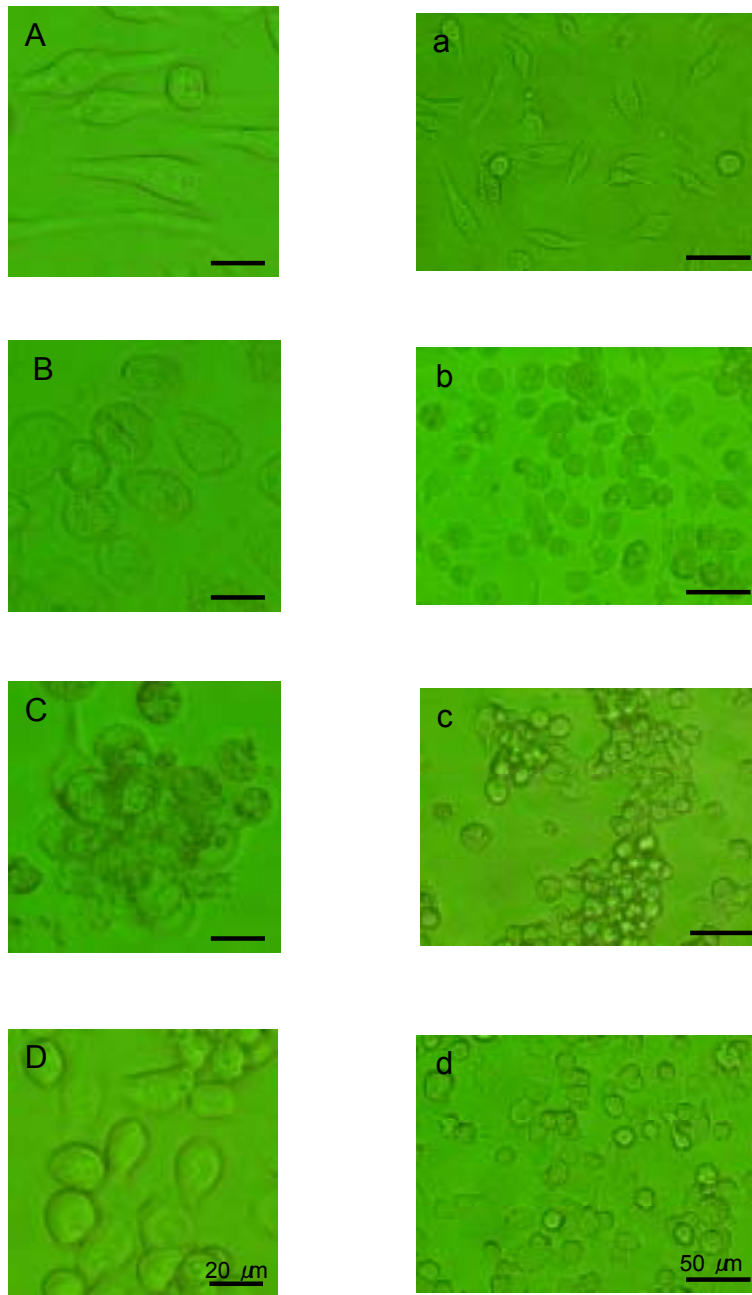


Fig. 1-4 様々な温度条件における細胞の形態

22°Cから46°Cでカイコ培養細胞（BmN株）を培養したときの細胞形態を顕微鏡で観察した。A,a : 38°Cで12時間培養したときにみられた細胞の伸展 B,b : 42°Cおよび46°Cで12時間培養したときにみられた細胞膜の変性 C,c : 38°Cで長時間培養したときにみられた細胞の凝集 D,d : 正常な細胞 scale bars=A-D 20 μm , a-d 50 μm 。

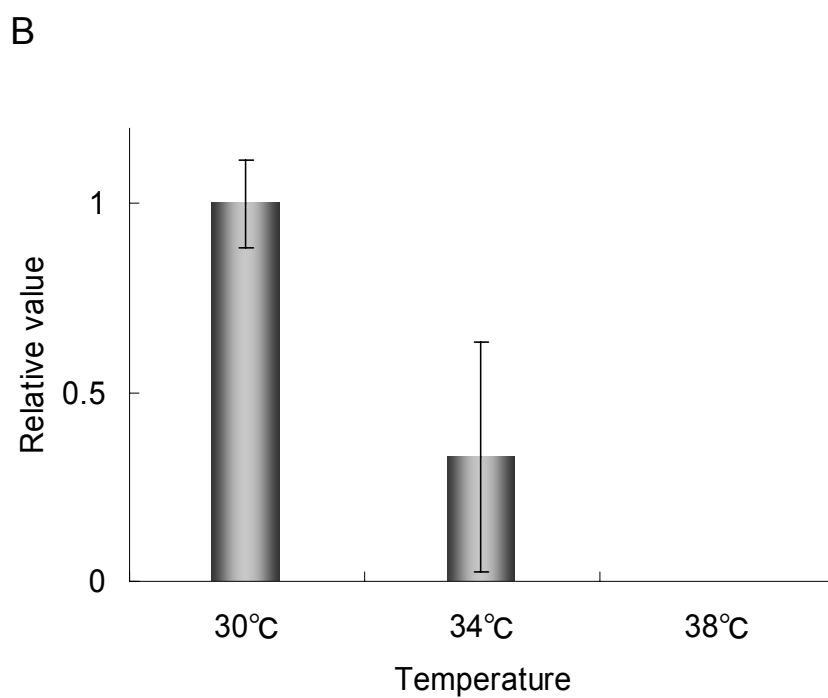
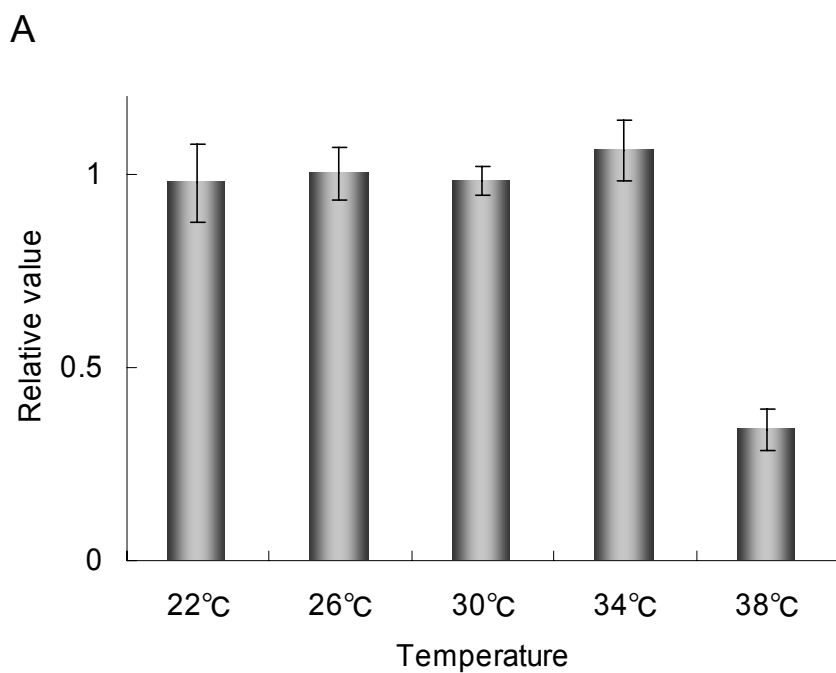


Fig. 1-5 BrdUの取り込みに対する温度の影響

A : BrdUを添加して各温度で12時間培養した細胞へのBrdUの取り込み
26°Cの値を1としたときの比率を示した。

B : 各温度で100時間培養した細胞にBrdUを添加し、さらに12時間培養
した細胞へのBrdUの取り込み

30°Cの値を1としたときの比率を示した。

測定値は平均値±SDで表した。

第 2 章

カイコ細胞の高温下における細胞周期の停滞

緒言

変温動物である昆虫は温度により大きな影響を受ける。その性質は昆虫由来の培養細胞にも反映されており、昆虫の成長日数が温度により左右されるのと同様に、温度依存的な細胞増殖率の変動がみられた (第 1 章)。第 1 章においては、高温下において、生存しているにもかかわらず細胞の増殖が停止する現象を発見した。すなわち、トリパンブルー細胞生死判定法により増殖が停止した細胞も生存していることが明らかになり、細胞分裂機構に異常が生じていることが示唆された。そこで、高温下で増殖が停止した細胞の細胞周期をみることで、高温における細胞増殖停止メカニズムの解明を行った。

昆虫における細胞周期関連の研究はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) が中心で他の昆虫ではあまり調べられていないのが現状である。ショウジョウバエでは細胞周期制御遺伝子が決定され、その機能が詳細に調べられている (Jorgensen and Tyers, 2004; Stern et al., 1993)。しかし、同じ昆虫ではあるが、双翅目であるショウジョウバエと鱗翅目であるカイコは同一のものでも、同じ機能や機構を示さないことが多いの研究で報告されている。

カイコの培養細胞は高温にさらされて増殖を停止するが BrdU の取り込みがみられるという結果から、細胞周期が一定の時期で停止している可能性が推測された (Fig. 1-5)。従って、G₂ 期と M 期の分離も可能なレーザースキャニングサイトメーター (LSC) で解析を試みた。すなわち、高温条件における細胞分裂停止時期を特定するために様々な温度で培養したカイコ培養細胞の細胞周期を、LSC を用いて核の DNA 量と形態から

解析した。さらに、培養細胞でみられた現象がカイコ生体でも確認されるかを確かめるために、温度処理したカイコの細胞を用いて同様の解析を行なった。

材料と方法

昆虫、培養細胞

カイコの品種、培養細胞株ならびに培養液などは第 1 章と同じである。

培養細胞における細胞周期の解析

カイコ培養細胞 BmN 株を 25 cm²のシャーレを用い 25°Cで十分な細胞数が得られるまで培養した。細胞をセルスクレーパーで剥がしよくピペッティングした後、細胞濃度が 5×10⁴ cell/ml になるように TC-100 培地で希釈した。希釈した細胞を 6 ウェルのプレートに 1 ml ずつ分注し、ウェルとウェルの隙間には DW を入れて湿度を保った。細胞が付着および安定するまで 25°Cのインキュベーターで 2 日程度培養した。細胞の様子を顕微鏡下で確認したのち、26、30、34、38°Cの温度で培養を行った。各温度で 24 時間、48 時間、72 時間培養後、細胞をセルスクレーパーで剥がしてよくピペッティングし、100 µl (細胞数が少ないときは調節) をスライドガラス POLY-PREPT™ SLIDES (Sigma-Aldrich CO. Ltd., Irvine, UK) 上の LIQUID BLOCKER (SUPER PAP PEN) で囲んだ領域にのせた。すぐに 50 µl のカルノア液 (ethanol: chloroform: acetic acid, 2:1:1) を加え、室温で 10 分間細胞を固定した。次に、ピペットを用いて培地を静かに吸出し、カルノア液を再度 50 µl 加えて再固定し、室温放置してカルノア液を揮発させた。揮発後直ちに 100 µl の Phosphate-buffered saline (PBS; 130 mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄, pH 7.4) を加え、2 分間×3 回の洗浄を行なった。洗浄後 PI-RNase 溶液 (Propidium iodide; 5 µg/ml, Sigma, DNase-free RNase 50 µg/ml, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) を 100 µl 加え、遮光して 37°Cで 1 時間 RNA の分解と DNA の PI 染色を行った。処理後、ピペットにより PI-RNase 溶液を注意深く吸出し、封入剤として 10 µl の Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA,

USA) をのせ、空気が入らないようにカバーガラスを被せて濾紙の上から軽く押し、封入した。

LSC 解析

細胞標本の蛍光は Laser Scanning Cytometer 2 (LSC2; Olympus Co., Tokyo, Japan) により測定した (Darzynkiewicz et al., 1999)。蛍光は LSC2 備え付けのアルゴンレーザー (488 nm) で励起し、PI による赤い蛍光 (610-620 nm) を検出した。検出感度は Offset: 2025, PMT: 10% に設定した。測定範囲は細胞密度により調節し、20×対物レンズを用いて約 5000 個の細胞を走査した。形態解析をする場合は LSC2 備え付けの CCD カメラを用いて、測定データからスライドガラス上の細胞像を呼び出して行った。フローサイトメーター (FCM) での解析と比較したときの特徴として、1. 染色過程や測定による細胞損失率が 5% 以下と小さいため比較的少ない細胞数で解析可能。2. スライドガラス上に固定した細胞を計測するため、DNA 量の測定データその細胞の形態観察との双方向からの解析が可能。3. スライドガラス上の走査エリアと個々の細胞位置を記憶しており透過光明視野での形態観察や二重染色標本の解析が繰り返し可能。4. 単細胞標本にしなくても細胞が単層でかつ細胞間にある程度の空間があれば解析可能な点が上げられている。とくに細胞周期解析についての利点は、細胞核を PI で単独染色するだけで、PI ピーク値 (核の単位面積当たりの PI 蛍光のピーク値で核の凝集と正の相関を示す) と PI 総蛍光量 (核の DNA 量) とのサイトグラムを作成し、細胞周期と細胞形態との相関をみることができる点で、これにより G₂ 期と M 期の細胞も分別することが可能である (Luther and Kamentsky, 1996)。

カイコ幼虫細胞における細胞周期の解析

血球

カイコ（鐘音）は人工飼料育により 25°C で飼育し、4 齢 0 日齢 (IV0)、1 日齢 (IV1)、2 日齢 (IV2) にインキュベーターに移し、26°C あるいは 38°C で餌を与えずに 24 時間放置した (湿度 50-60%)。温度処理後、幼虫の腹肢に針で穴を開け体液を 100 μ l 採取した。採取した体液を等量の PBS で希釈し、その 100 μ l を用いて上述した培養細胞の場合と同様に細胞標本作製した。

中腸細胞

幼虫の中腸細胞は、次のようにし得た。5 齢 1 日齢 (V0) のカイコ幼虫をインキュベーターに移し、26°C あるいは 38°C で餌を与えずに 24 時間放置した (湿度 50-60%)。温度処理したカイコ幼虫を解剖し、消化管を取り出して、PBS で 2 回洗浄した。次に、洗浄した消化管の中腸部分を解剖バサミで切り刻み、10 \times Trypsin-EDTA (0.5% Trypsin, 0.2% EDTA-4Na, 0.85% NaCl; GIBCO™, Invitrogen Co., Auckland, N.Z.) を 1 ml 入れたエッペンドルフチューブの中に移した。37°C で 30 分間振盪しながら酵素処理を行い、最後にピペッティングによって細胞を遊離させた。酵素処理産物は滅菌ガーゼで濾し、大きな組織断片を除いた。得られた細胞は濃度に応じて PBS で適宜希釈し、その 100 μ l を用いて上述した培養細胞の場合と同様に細胞標本作製した。

LSC 解析

血球 LSC 解析は細胞が小さく蛍光が弱いため、検出感度を PMT: 10% で解析を行ない、約 5000 個の血球を走査した。中腸細胞は大きさが不揃いで蛍光量の範囲が広いため随時検出感度を調節して解析を行なった。約 5000 個の細胞を走査した。

結果

培養細胞における細胞周期の解析

25°Cで培養していたカイコ培養細胞をPIで染色し、LSCで解析を行なった。Orange Integral (総蛍光量) と Orange Max Pixel (蛍光強度) により細胞集団の分布をヒストグラムに示した結果を Fig. 2-1 に示す。解析した細胞の核形態を呼び出し CCD カメラで観察すると核の大きさと凝集度から大きく分けて 5 つのグループに分類された (Fig. 2-1)。この核の形態ならびに蛍光量・蛍光強度から、ヒストグラム上の細胞集団を G₁、S、G₂、M-G₁ の各期に分類した (Fig. 2-1 赤線四角)。なお蛍光量と蛍光強度のヒストグラムを底面にし、細胞数を高さに積算した 3 次元ヒストグラムを Fig. 2-2 に示す。

培養細胞の高温における細胞周期の変化

様々な温度で培養した細胞の細胞周期の変化をみるために、LSCで解析をした。26°Cで培養を続ける限り細胞周期分布には大きな変化は起こらなかった (Fig. 2-3A, B, C)。すなわち、G₁ 期の細胞が最も多く、24-72 時間で一定のパターンを示した。培養温度を 30°C、34°Cとしても 26°Cと同様な細胞周期分布を示した (date not shown)。それに対し、38°Cで 24 時間処理すると、BmN 細胞の周期は G₂ 期に偏ってきた (Fig. 2-3D)。この G₂ 期の偏りは 48 時間、72 時間と処理時間が経過するにつれて、さらに大きくなった (Fig. 2-3E, F)。

高温における G₂ 期停滞からの回復

38°Cで培養した細胞の G₂ 期での細胞周期停滞が可逆的な影響であるか否かを確認した。38°Cで 24 時間培養した BmN 細胞は G₂ 期に停滞していた (Fig. 2-3D)。しかし、38°Cで 24 時間培養したのち 26°Cに温度を下げ再度 24 時間培養を行うと G₂ 期の停滞

は解除され、細胞周期の分布は 26°C で 48 時間培養したときと同様な形状を示した (Fig. 2-4A)。38°C で 48 時間培養した細胞に対しても細胞周期停滞からの回復は認められたが、24 時間のときと比較すると G₂ 期の細胞も多く存在した (Fig. 2-4B)。

血球細胞への温度の影響

高温における G₂ 期停滞が培養細胞で確認されたが、同じ現象が生体細胞でもみられるかを調べた。24 時間温度処理したカイコ 4 齢幼虫から採取した体液を用いて、血球細胞の DNA 量の分布を LSC で解析した結果を Fig. 2-5 に示す。4 齢 0 日齢 (IV0) の幼虫を温度処理しても 26°C と 38°C で血球の DNA 量の分布の違いは見られなかった (Fig. 2-5A, D)。血球の DNA 量は 4 齢 1 日齢、2 日齢と発育が進むと、多い細胞が増えてきた。すなわち、核相の大きな細胞が増加した (Fig. 2-5B, C)。4 齢 1 日齢、2 日齢でカイコを 38°C に 24 時間置くと、この核相の大きな細胞の割合が高くなった (Fig. 2-5E, F)。各ピークにおける細胞の核形態を観察したが、G₂ 期と M 期の細胞を見分けることはできなかった。

中腸細胞への温度の影響

血球以外の細胞においても温度による影響がみられるか確認するために、細胞分裂がさかんに行なわれていると予想される中腸の細胞を用いて、細胞周期の解析を行なった。中腸細胞は血球と異なり細胞が強固に結合しているため、組織のままでは細胞どうしの重なりが多く LSC での解析が困難であった。そこで解剖して取り出した中腸をトリプシンで処理することで細胞間の結合を解き、ばらばらにして解析を行なうことにした。5 齢 1 日齢の幼虫を 26°C あるいは 38°C で 24 時間温度処理してから消化管を取り出し、トリプシンで処理し、細胞を解析したところ、それぞれ Fig. 2-6 のような DNA 量の分布を示した。血球と同様に 38°C で処理した中腸細胞は 26°C と比べ、より DNA 量の多い細

胞が増えていた。また総蛍光量のピークは4つ以上確認され、多倍体の核の存在を示唆した。

考察

カイコ培養細胞には温度上昇に伴う増殖の昂進がみられたが、しだいに頭打ちとなり高温条件では増殖がみられなくなった (Fig. 1-2)。しかし、38°Cで増殖が停止した細胞でも細胞生死判定法では生存が推測された (Table. 1-4)。この結果から高温において細胞増殖が停止する原因は、細胞分裂の過程に異常が起こることで細胞周期が停止してしまうことにあると考えられた。また BrdU の取り込みが高温においてもしばらく観察されることは、特定の細胞周期で分裂が停滞していることを示唆した (Fig. 1-5)。そこで、本章では高温にさらされた培養細胞における増殖停止メカニズムを解明する足がかりとして、細胞周期の停止時期を明らかにすることを考えた。さらにカイコの生体細胞についても高温における細胞周期への影響を調べることにした。

細胞周期の解析には、S 期以降の細胞周期を正確に特定するために PI の単独染色のみで G₂ 期と M 期も明瞭に分離できる機能を備えた LSC を用いた (Luther and Kamentsky, 1996)。実際に BmN 細胞の核 DNA を PI で染色し LSC で解析を行うと、総蛍光量と蛍光強度のヒストグラム上に各細胞周期にあたる細胞の集団が形成された (Fig. 2-1)。G₁ 期から S 期を介して G₂ 期に至るまで核内 DNA 量はしだいに増加しほぼ 2 倍になった。このとき同時に核の面積も広がるが 2 倍になるようなことはなく、代わりに単位面積あたりの DNA 量が増加する。核形態で核内の非染色部分が少なくなるのはこのためである (Fig. 2-1G₁, G₂)。G₂ 期から M 期にかけては総蛍光量の変化はなく、蛍光強度が大きく上がる。これは分裂前のクロマチンの凝集による効果であり、形態観察からも核が明るい蛍光を発していることが確認できる (Fig. 2-1M)。さらに、分裂後の核形態観察によって、面積および核 DNA 量が半分になり、しだいに凝集が緩み G₁ 期に戻るところまで追跡できた (Fig. 2-1M-G₁)。

Fig. 2-1 のヒストグラムを底面に置き、単位測定領域内の細胞数を高さにとることで

各細胞周期の分布を視覚的に明瞭に捉えることが可能である (Fig. 2-2)。この 3 次元ヒストグラムを利用することで、BmN 細胞の各温度における細胞周期分布を比較したところ、38°Cで培養を続けると G₂ 期の細胞の山がしだいに高くなっていくことが明らかになった (Fig. 2-3D, E, F)。一方、26°Cをはじめ 30°Cや 34°Cでの培養では G₁ 期の細胞が多く存在し、分布のパターンは一定であり、このような G₂ 期ピークの上昇は確認されなかった (Fig. 2-3A, B, C)。すなわち、38°Cでは細胞分裂が G₂ 期で停滞していることが示唆される。

細胞周期の G₂/M 期阻害はカイコと同じ鱗翅目昆虫では *Plodia interpunctella* の成虫翅原基由来の培養細胞・IAL-PID2 で 20-hydroxyecdysone により誘導されるという報告がある (Mottier et al., 2004)。また、*Spodoptera frugiperda* 由来の培養細胞 (Sf9 株) を無血清状態で培養することでも誘導された (Doverskog et al., 2000)。さらに、Sf9 細胞を 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) の添加により G₁ 期および S 期の前半で同調させたのち新しい培地に移すと、細胞周期はすぐに G₂ 期まで進行してしばらく停滞し、細胞増殖の開始とともに G₁ 期に移行するが、同じことを哺乳類の培養細胞で行うと逆の現象が得られ、G₁ 期での停滞後に増殖が開始された (Fertig et al., 1990)。すなわち、哺乳類細胞の静止期 (G₀ 期) が 2c の DNA 量で特徴付けられるのに対し、昆虫細胞では 4c で特徴付けられるということになる。高温による細胞周期の G₂ 期での停滞は、昆虫細胞周期における停滞の特徴といえるのかもしれない。哺乳類の細胞では温度環境により G₁ 期で遅延するという報告がいくつかあるが (Bloemholk and Gray, 1992; Jenkins and Hovey, 1993)、昆虫細胞において温度による影響で細胞周期が特定の時期に停滞する現象の報告は今研究が初めてである。

38°Cで細胞増殖が停止した細胞には、伸長するといった形態変化がみられたが、26°Cに戻すことで形態異常は回復し、再び増殖を開始した (1 章)。そこから、G₂ 期での細胞周期の停滞も可逆的な現象であると予想された。実際、38°Cで培養し細胞周期を G₂ 期

で停滞させた細胞を再び 26°C で培養すると、細胞周期の分布パターンはもとの状態に回復した (Fig. 2-4)。しかし、38°C での処理時間が 24 時間のときと比較し、48 時間で戻したときには G₂ 期の細胞も多く完全な回復がみられなかった。これは細胞周期の停滞が長時間続くと細胞に悪影響が蓄積されることを示唆し、38°C での培養においてしだいに凝集する細胞が目立つようになることや浮遊細胞が増えることと関係があると考えられる。

昆虫生体細胞における細胞周期に関する研究はショウジョウバエを除くと非常に少ない。血球に関しては、成長に伴いより核相の大きな細胞のピークが確認されるようになった (Fig. 2-5)。カイコの血球や真皮細胞では 4 齢幼虫と終齢幼虫で核相が変化すると報告されたが (志村, 2004; 中原, 2004)、本研究の実験によってもその現象が認められた。細胞周期の停止時期を特定するため血球においても蛍光強度の分析と核形態の観察をしたが、核が小さく周期を区別することができなかった。より倍率の高い対物レンズを用いて核の凝集の程度をみる必要がある。

鱗翅目昆虫である *Pseudoplusia includens* や *Spodoptera frugiperda* の血球では発育時期によって細胞分裂頻度に変動がありとくに脱皮期には分裂が低下している (Gardiner and Strand, 2000)。4 齢 0 日齢の処理で温度間に細胞周期の違いがみられなかったのは細胞分裂が少ないためであると考えられる。すなわち、脱皮直後は血球の分裂がもともと減衰しており、38°C での細胞分裂停滞の影響が解析結果に現れなかったといえる。それに対し、1 日齢からは血球の分裂は盛んになるが、38°C ではその分裂の細胞周期が異常になり DNA 量の多い細胞が蓄積したと考えられる。すなわち、26°C に比べ 38°C では核相の高い血球数が増加している。Nakahara ら (2003) はカイコの培養造血器官の培養によって、血球の細胞分裂は脱皮直後のカイコから取り出した器官を用いたときに活発であることを示している。このとき、造血器官を取り出してからの培養時間を考慮すれば、血球数が増加する時期は、高温によって核相の増加が見られた時期

と一致する。

カイコをはじめ鱗翅目昆虫の血球には原白血球、プラズマ細胞、顆粒細胞、小球細胞、エノシトイドの 5 種類が存在する。このうち分裂することが確認されているのは原白血球、プラズマ細胞と顆粒細胞の一部であり、小球細胞やエノシトイドは分裂しないと考えられている (Gardiner and Strand, 2000; Yamashita and Iwabuchi, 2001)。体液中を循環する血球の多くは顆粒細胞ではあるが (Gardiner and Strand, 2000)、脱皮サイクルにおいて血球の種類には変動があるため、高温が血球の分化に影響を与え、異なる血球種が蓄積した可能性もある。血球の種類により DNA 量に 2 倍以上の差がある場合には、高温が血球の種類に影響し、今回解析されたような結果が得られるかもしれない。しかし、血球の種類による核相の違いについては不明である。血球の種類を形態観察から確認することが必要だが、血球の形態からの分類は難しく、現在でも色素や各血球を特異的に認識する抗体を用いた分離方法などが考えられている状態で確立されていない (Ling et al., 2003)。今後、LSC により詳細な解析を行い、血球の核の凝集度合いや核相を確かめるとともに、解析データから血球の種類を特定することができないか検討していきたい。

次に、カイコ幼虫の中腸細胞に対しても解析を行ったが、核相の多様さに驚かされた。とくに中腸細胞においては蛍光のピークが 5 つ以上検出され、一番小さなピークを単純に $2n$ とすると $32n$ まで存在することになる (Fig. 2-6 legend)。昆虫においては、多倍体の細胞が存在することは珍しくなく、カイコの絹糸腺や真皮細胞、蛾の仲間である *Ephestia* の翅上皮細胞、ユスリカやショウジョウバエの唾液腺など、様々な昆虫種および器官で確認されている (Edgar and Orr-Weaver, 2001)。カイコの真皮細胞においては $2n$ から $32n$ までの核相が確認されており (志村, 2004)、今回解析した中腸細胞の核相と一致する。しかしながら、この多倍体の細胞の存在が周期解析を困難にした。それは $2n$ の細胞の G_2 期と $4n$ の細胞の G_1 期の総蛍光量 (DNA 量) が同じであるため、細

胞周期が特定できないからである。この点については LSC の利点である核の蛍光強度の違いと形態を観察することで解析可能であると考えているが、明瞭な形態観察ができず詳細なデータはまだ得られていない。

血球に関しても、中腸の細胞に関しても相対的な DNA 量は測定できたが核相が特定できなかった。BmN 細胞は卵巣由来であるが卵細胞ではなく、被膜細胞由来と考えられている。従って、体細胞であることから一番小さなピークを $2n$ と考えるのが普通である。実際 BmN 細胞の核相は $2n$ から $6n$ と観察されている (舟越, 1991)。しかし、Endoreplication が頻繁に起こり、多倍体が多く存在する昆虫細胞では、組織ごとに核相が異なる細胞の割合が異なる可能性は十分考えられた。これらの状況をふまえ、核相を決定するためには確実に n であるといえる精子と比較することが最善と考え、カイコ成虫から取り出した精子を PI で染色し、血球などと同じように解析を行った。しかし、精子特有の膜構造のためかカルノア液では固定が不十分であり、PI の蛍光が弱く検出できなかった。現在、固定時間や固定剤などを検討して、精子でも十分な蛍光が得られるよう工夫を試みている。

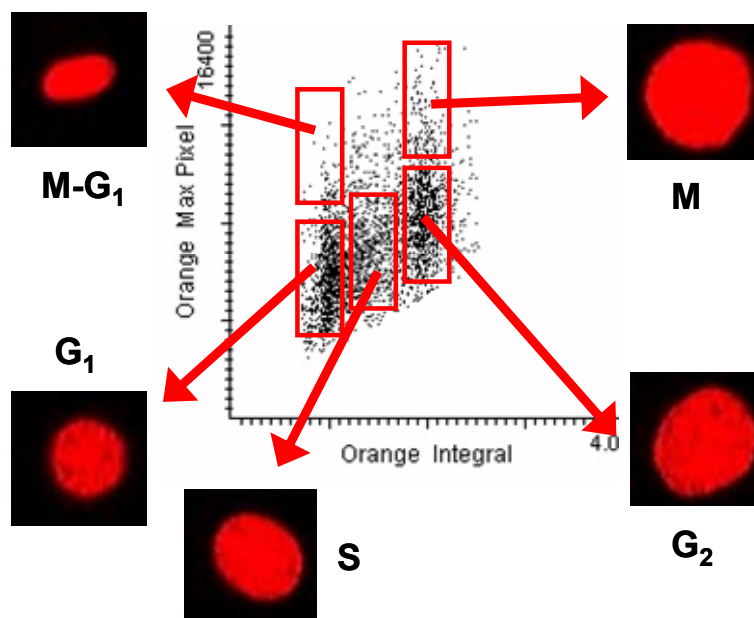


Fig. 2-1 LSCによるBmN細胞の細胞周期解析と各細胞周期の核形態

25°Cで培養したBmN細胞をLSCで解析した (PMT: 10%)。横軸にPIの総蛍光量を、縦軸にPIの蛍光強度をとったヒストグラム上のドットにより細胞の分布を示した。解析データから各細胞の核形態像を呼び出し、CCDカメラで観察すると核形態は大きく分けて5つに分類され、総蛍光量と蛍光強度の関係と対比させることでそれぞれの細胞周期が決定された。各細胞周期の細胞集団を赤線で囲み、代表的な核形態をヒストグラムの周囲に示した。G₁: G₁期, S: S期, G₂: G₂期, M: M期, M-G₁: 分裂直後
 総蛍光量 (Orange Integral) は相対値で、G₁期にあたる集団が1.0となるように設定した。なお、蛍光強度の高いM期とM-G₁期の間にある細胞は、細胞周期として特定できないので、解析から除いた。

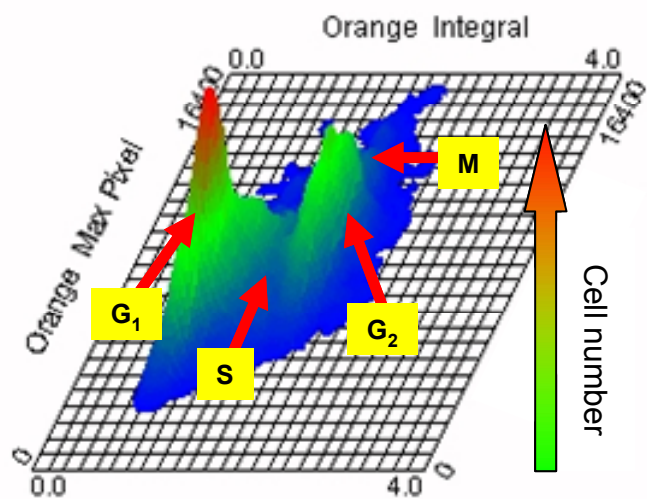


Fig. 2-2 細胞周期分布の3次元ヒストグラム

G₁: G₁期, S: S期, G₂: G₂期, M: M期, M-G₁: 分裂直後

Fig. 1のヒストグラムを底面として、高さに関与する細胞数をとり3次元で表したヒストグラム。細胞密度が大きい領域ほどピークの山が高くなる。それぞれの山が示す細胞周期を図の中に示した。

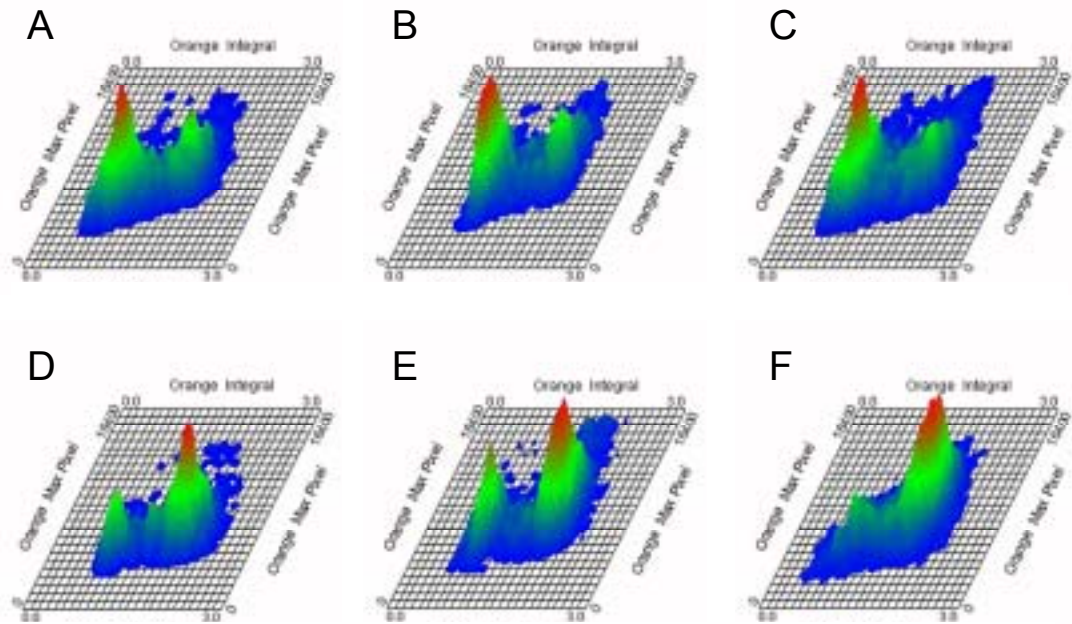


Fig. 2-3 BmN細胞の高温における細胞周期分布

A: 26°Cで24時間培養 B: 26°Cで48時間培養 C: 26°Cで72時間培養 D: 38°Cで24時間培養 E: 38°Cで48時間培養 F: 38°Cで72時間培養

BmN細胞を26°Cあるいは38°Cで培養し、LSCにより細胞周期解析を行った。

総蛍光量 (Orange Integral) は相対値で、G₁期にあたるピークを1.0に設定した。

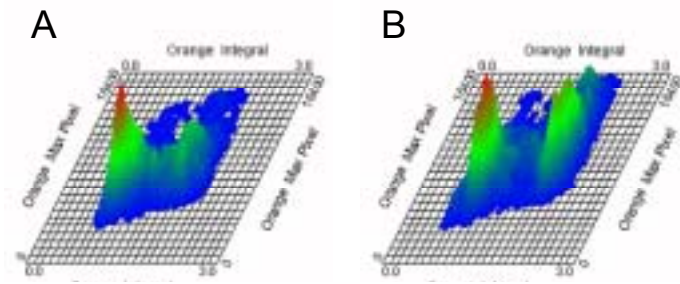


Fig. 2-4 高温における細胞周期停滞からの復帰

A: 38°C-24時間の後、26°C-24時間培養 B: 38°C-48時間の後、26°C-24時間培養

BmN細胞を38°Cで24時間もしくは48時間培養し細胞周期をG₂期で停滞させた。

その後、温度を26°Cに戻して再び24時間培養し、LSCにより細胞周期解析を行った。

総蛍光量（Orange Integral）はG₁期にあたるピークを1.0に設定した相対値で示した。

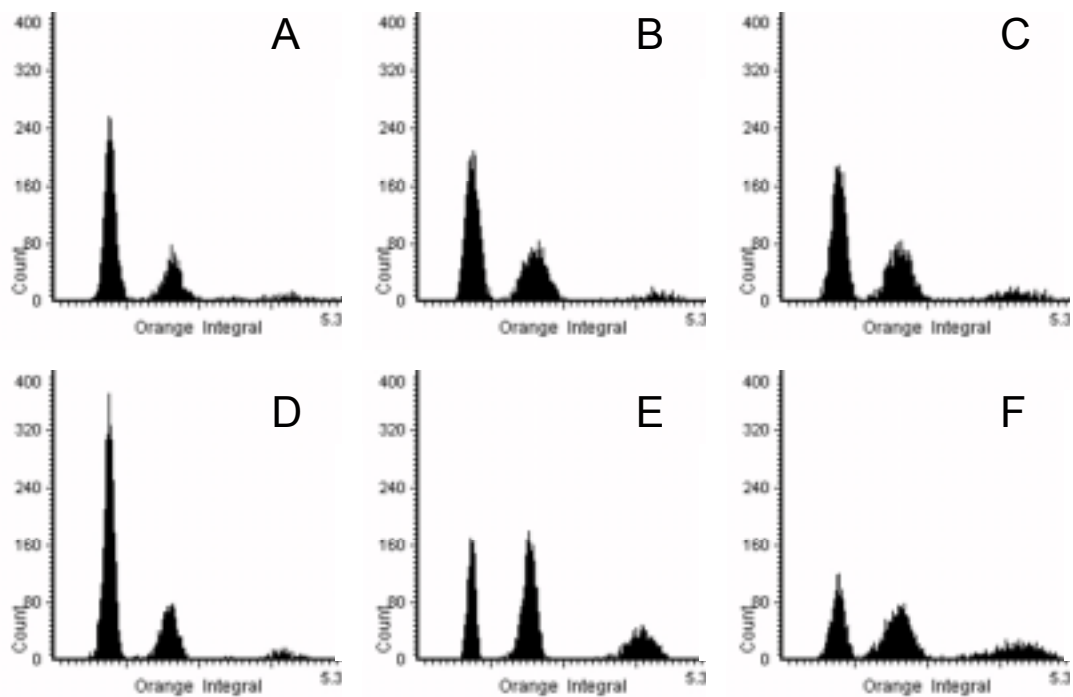


Fig. 2-5 高温で処理したカイコにおける血球の細胞周期の比較

A-C: 26°Cで24時間温度処理、D-F: 38°Cで24時間温度処理

A, D: IV0-IV1、B,E: IV1-IV2、C, F: IV2-IV3

温度処理を24時間行ったカイコ4齢幼虫から体液を採取し、血球の細胞周期をLSCで解析した (PMT: 10%)。

総蛍光量 (Orange Integral) は最も小さいピークを1.0に設定した相対値で、すべてのピークがヒストグラム中に納まるように調節した。

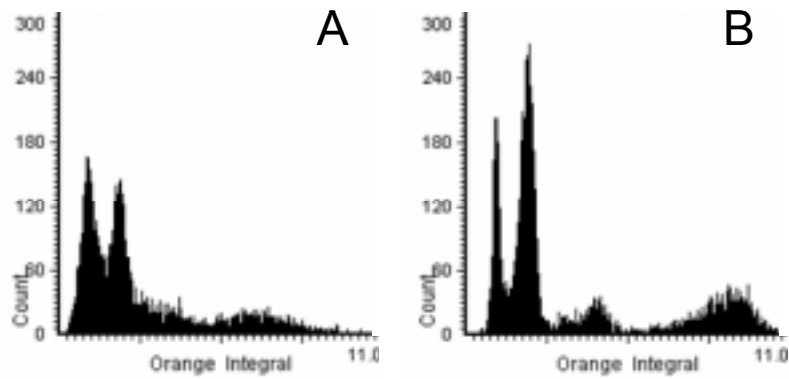


Fig. 2-6 高温で処理したカイコにおける消化管の細胞周期の比較

A: 26°Cで24時間温度処理 B: 38°Cで24時間温度処理

カイコ5齢幼虫1日齢で24時間温度処理してから消化管を取り出し、トリプシンで組織を分解した。分解産物を細胞標本にし、LSCで解析した (PMT: 4%)。

総蛍光量 (Orange Integral) は、最も小さいピークを1.0に設定した相対値である。ヒストグラム内に表示できない、さらに総蛍光量の大きいピークもみられた。

第3章

カイコ培養細胞の高温における細胞周期停滞の機構

緒言

細胞周期はサイクリンや CDK (cyclin-dependent kinase)、CKI (CDK inhibitor) などの様々な遺伝子が関与して制御されている (Nabel, 2002)。G₂ 期の通過に関しては Cyclin A が、M 期の開始に関しては Cyclin B が Cdk1 (Cdc2) と複合体を形成し、それぞれ別の機構で Cdk1 (Cdc2) が活性化されて細胞周期が進行する。細胞周期制御機構は古くから酵母を用いた研究で調べられてきた。また高等生物でもショウジョウバエの突然変異体の作製、ノックアウトマウスの作製により詳しく解明されてきている (Jorgensen and Tyers, 2004)。

カイコ培養細胞は高温下において細胞周期が G₂ 期で停滞した (Fig. 2-3)。また、カイコ幼虫の血球や中腸細胞でも細胞周期に同様の異常が確認された (第2章 Fig. 2-4, 2-5)。ショウジョウバエでは G₂/M 期における細胞周期の停滞についての報告は多く、Cdc2 をリン酸化する遺伝子の変異が原因の多くとなっている。カイコと同じ鱗翅目由来の培養細胞では 20-hydroxyecdysone の添加や無血清培地での培養により、*cyclin A* や *cyclin B* の発現が減少し G₂/M 期阻害が起こるという報告があり (Doverskog et al., 2000; Mottier et al., 2004)、またカイコの絹糸腺の発達に、G₁ 期サイクリンである *cyclin E* と *cyclin B* の発現が関与しているとする報告がある (Dhawan and Gopinathan, 2003; Sudhakar and Gopinathan, 2000)。高温で増殖を停止した細胞は G₂ 期特異的に停滞しており、上述した報告のように G₂/M 期に関わる遺伝子の発現に異常が起きている可能性は高い。そこで、これら遺伝子の発現レベルをみることでメカニズムの解明につながる

ると考えた。

ゲノム解析が進んでいるとはいえ、突然変異体の作製法が確立されているショウジョウバエとは異なり、カイコでは細胞周期に関連する遺伝子として配列が決定され、機能が特定されているものは少ない。Takahashi ら (1996) はサイクリンに共通する保存領域の配列からプライマーを作製し、他の生物の Cyclin B とアミノ酸配列の相同性が高い配列をクローニングした。この遺伝子は絹糸腺の発達において発現が下がり、M 期への進行を妨げることで絹糸腺細胞の多倍体化に関わっている (Dhawan and Gopinathan, 2003)。また、休眠卵の G₂ 期阻害との関係で、*cdc2* がクローニングされて mRNA の発現が調べられている (Iwasaki et al., 1997; Takahashi et al., 1998)。以上の報告を除いて、細胞周期を制御する遺伝子の発現レベルについては、カイコおよび鱗翅目昆虫では、クローニングされていない遺伝子がほとんどである。

そこで、本研究では、まず細胞周期遺伝子で重要な役割を担い G₂/M 期通過に関与している *cyclin A* のクローニングを試みた。そして、高温状態におかれた培養細胞の遺伝子発現の変化をみるために、配列決定したカイコ *cyclin A* とゲノムデータベースに登録されているカイコ *cyclin B*、*cdc2* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で調べた。

材料と方法

培養細胞

カイコ培養細胞 BmN 株を用いた。培養方法等は第 1 章を参照。

RNA 抽出

25 cm² のシャーレで 1×10^5 cell/ml まで増殖した細胞を各温度に設定した BIO MULTI INCUBATOR LH-30-8CT (NH system) に移し 24 時間培養した。セルスクレーパーで剥がし、2 ml \times 2 本のエッペンチューブに移した。200 \times g で 10 分間遠心し、細胞を沈殿させ上清培地を除いた。それぞれのチューブに ISOGEN (Nippon Gene Co., Toyama, Japan) を 250 μ l 加え、ピペッティングにより細胞を分散し、ボルテックスミキサーで攪拌、破壊した。攪拌後、2 本のチューブを 1 つに合わせ室温で 5 分間放置し、 -80 度に一時保存した。室温に戻し、攪拌した細胞分解物に 250 μ l のクロロホルムを加えて激しく混合した。室温で 15 分間放置したのち、12,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し RNA の含まれる水層 (上層) の 250 μ l を新しいチューブに移した。イソプロパノール 200 μ l と共沈剤として Glycogen (Invitrogen Co., Faraday Avenue Carlsbad, CA, USA) 2 μ l を加えチューブを上下逆さにして混合した後、室温で 30 分間放置した。15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心し、RNA の沈殿を得た。沈殿に 70%のエタノールを 500 μ l 加え沈殿を洗い、再び 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した。エタノールを除去し、吸引式乾燥機で 10 分間乾燥した後、DEPC 水 20 μ l を加えピペッティングにより溶解させた。RNA の濃度は Gene Quant *pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用い、吸光度から算出した。

RT-PCR

トータル RNA 1 μg に 1 μl の Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen) と DEPC 水を加えて全量 10 μl とした。この混合液を 70°C で 10 分間インキュベートして RNA の高次構造を破壊した。氷上に 1 分間以上置き、10×Reaction Buffer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 2 μl 、250 mM MgCl₂ (Takara Biotechnology Co., Ltd. Seta, Otsu, Shiga, Japan) 0.2 μl 、10 mM dNTP Mixture (Takara) 1 μl 、0.1 M DTT Solution (Wako) 2 μl 、DEPC 水 1.8 μl を順に加え、ボルテックスミキサーで軽く混合した。42°C で 5 分間プレインキュベーションを行い、ReverseScript II (Wako) を 1 μl 加え、マイクロチップの先でよく混合した。42°C で 50 分間、70°C で 15 分間反応させたのち温度を 4°C に下げ、軽く遠心して反応液をチューブの底に集めた。RNaseH (Takara) を 1 μl (60 units) 加え、37°C で 20 分間インキュベートして DNA と 2 本鎖をなす未反応の RNA を除去した。なお、温度反応は iCycler (Bio-Rad Laboratories, Alfred Novel Drive, Hercules, CA, USA) を用いて行った。

cDNA の精製

RT-PCR 産物に、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、共沈剤として Glycogen (Invitrogen) を 1 μl 添加し、その 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、チューブを上下逆さにして混合した。15,000 rpm で 20 分間遠心し cDNA の沈殿を得た。100%エタノールを除去し、70%エタノール 500 μl を加えてチューブを洗い、再度 15,000 rpm で 2 分間遠心した。遠心後 70%エタノールを除き、10 分間真空乾燥した。乾燥後、滅菌蒸留水 20 μl に沈殿を溶かした。

シーケンス用 PCR

シーケンスのための PCR には正確性が求められるためエラーの少ない *Pfu* DNA Polymerase (Promega, Co., Woods Hollow Road, Madison, USA) を用いて PCR 反応を行った。*Pfu* 10×Reaction Buffer (Promega) 5 µl、10mM dNTP Mixture (Takara) 0.5 µl、cDNA (0.1 µg/µl) 0.5 µl、10 µM の各プライマー2.5 µl ずつ、*Pfu* DNA Polymerase (Promega) 2 µl、DDW 37 µl を加え全量 50 µl の PCR 反応液を調製し、25 µl ずつ 2 本の PCR チューブに分けて、iCycler (Bio-Rad) を使用して PCR 反応を行った。PCR に用いたプライマー配列並びに PCR 条件は Table. 3-1 に示す。

ゲルからの切り出しと PCR 産物の精製

増幅した PCR 産物を 0.7%アガロースゲルで電気泳動を行い、紫外線下で迅速にバンドの切り出しを行った。切り出したゲルを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて溶解、PCR 産物を精製した。

トランスフォーメーション

シーケンスを行うために PCR 産物をプラスミドベクター (pCR-XL-TOPO) に組み込んだ。PCR 産物のベクターへの挿入および大腸菌への形質転換には TOPO XL PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて添付の実験操作書に従って行った。

挿入断片の確認とプラスミド精製

形質転換により選択培地上で得られた白色のシングルコロニーを 1 つとり、コロニー PCR により目的サイズの PCR 産物が挿入されていることを確かめた。コロニー PCR は Template を除いた通常の PCR 組成の反応液に、コロニーを軽く突付いた滅菌済み爪楊枝を浸けることで行った。PCR 産物を電気泳動することで、目的サイズの断片が

得られることを確認できたコロニーを再びとり、抗生物質 (kanamycin 50 µg/ml) を含む LB 液体培地で一晩振盪培養した。プラスミドの精製は、Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いて添付の実験書に従い行った。

シーケンス

プラスミドベクター (pCR-XL-TOPO) に挿入した断片の配列を 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) でシーケンスした。Big Dye™ Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems) を用い、実験書に従って一連の作業をした。

リアルタイム PCR

合成した cDNA を鋳型として Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, USA. and Takara) を用いたリアルタイム PCR 法により定量した。cDNA に 2 本鎖 DNA 染色剤である 3×SYBR Green I (Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland, USA) 2.5 µl、10×R-PCR buffer (Mg²⁺free) (Takara) 2.5 µl、250 mM MgCl₂ (Takara) 0.3 µl、10 µM 各プライマー1.25 µl ずつ、10 mM dNTP Mixture (Takara) 0.75 µl、*Ex Taq*™ R-PCR Version (Takara) 0.25 µl (1.25 units) を混合し、全量が 25 µl になるように DDW を加え PCR 反応液を調製した。リアルタイム PCR に用いたプライマー配列並びに PCR 条件は Table. 3-2 に示す。

結果

カイコガ *cyclin A* 遺伝子の塩基配列決定

カイコでは G₂ 期の通過に関わるとされる *cyclin A* の配列がまだ決定されていなかったが、同じ鱗翅目の昆虫であるノシメマダラメイガ (*Plodia interpunctella*) では他の生物の Cyclin A との保存性が高い *cyclin A* 遺伝子の部分配列が決定されていた (Mottier et al., 2004)。カイコのゲノムデータベース (KAIKOBLAST <http://sgp.dna.affrc.go.jp/>) を利用し、*Plodia interpunctella cyclin A* 塩基配列と相同性が高い配列を全ゲノムショットガン (Whole-Genome Shotgun: WGS) 方式から得られた計 21 万 3 千個のシーケンスコンティグから探し出した。その結果、相同性が高い配列を含むシーケンスコンティグ、ramen-contigs contig468547 (Accession No. BAAB01102568) と ramen-contigs contig446124 (Accession No. BAAB01092085) が見つかったが両断片は一続きの配列ではなかった (Fig. 3-1)。それぞれのコンティグに対し Open Reading Frame: ORF の解析を行うと、contig468547 にはプロモーター配列と開始コドンが、contig446124 には終始コドンと Poly (A) signal 配列が含まれており、イントロンを挟んでいくつかのエクソンが存在することが予想できた。またエクソンから翻訳されるアミノ酸配列はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の Cyclin A と相同性が高く、この 2 つのコンティグはそれぞれカイコ *cyclin A* 遺伝子の 5' 末端領域と 3' 末端領域にあたりと考えられた。そこで、カイコ培養細胞 (BmN 株) からトータル RNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を合成、それを鋳型として 3 組のプライマーセットを用いてカイコ *cyclin A* mRNA の配列を決定した (Table. 3-1; Fig. 3-1)。今回のシーケンスにより、2 つのコンティグの間にある WGS 方式でも解析されていない未知領域を決定することができた (Fig. 3-1 contig468547–contig446124)。

高温条件における細胞周期制御遺伝子の発現

高温下で培養したカイコ培養細胞は増殖を停止した (Fig. 1-3)。そして、増殖が停止した細胞は G₂ 期で細胞周期が停滞していることが明らかになった (Fig. 2-4)。細胞分裂が G₂ 期で停滞するメカニズムを明らかにするため、カイコ培養細胞における数種の細胞周期制御遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量した。今回、シーケンスにより配列を決定した G₂ 期の通過に関わる *cyclin A*、G₂ 期から M 期への移行に関わる *cyclin B*、Cyclin A または Cyclin B と複合体を形成しリン酸化状態により活性を制御する CDK *cdc2*、高温により発現が高まると予想されるヒートショックプロテイン *hsp90*、発現に大きな変化はないと考えられる *actin A3* の発現を調べた。通常の培養温度である 26°C と比較して、38°C の培養では *actin A3* も含めすべての遺伝子に関して発現が低下していた (Fig. 3-4)。しかし、他の遺伝子の発現量が 40% 程度まで低下しているのに対し、*cyclin B* の発現量だけは 60% 程度と、そこまでの低下はみられなかった (Fig. 3-4 *cyclin B*)。

考察

高温における細胞周期停滞のメカニズムを解明するために、著者らは G₂ 期制御に関わる遺伝子の発現状況を常温下と高温下で比較することを考えた。カイコと同じ鱗翅目の昆虫 *Plodia interpunctella* の培養細胞では 20-hydroxyecdysone の添加により G₂/M 期阻害が起こり、このとき *cyclin A* と *cyclin B* の発現が低下する (Mottier et al., 2004)。また、カイコの休眠卵では *cyclin B* と *cdc2* および *Bombyx mori* Cdc2-related kinase (*Bcdrk*) の mRNA レベルでの発現の調節により、細胞分裂の G₂ 期での停止を制御している (Iwasaki et al., 1997; Takahashi et al., 1998)。そこで、カイコ培養細胞の高温下における細胞周期の G₂ 期停滞においても、同じように細胞周期制御遺伝子の発現に変化がみられる可能性は高かった。しかし、カイコにおいて細胞周期制御遺伝子として報告があるのは上述した *cyclin B*、*cdc2*、*Bcdrk* と絹糸腺の Endoreplication 機構に発現が関与する *cyclin E* と少ない (Sudhakar and Gopinathan, 2000)。そこで第一に、G₂ 期の通過に関与し発現に変化が生じている可能性が高い、*cyclin A* 遺伝子の配列を決定することにした。

配列の決定にはカイコゲノムデータベース (KAIKOBLAST <http://sgp.dna.affrc.go.jp/>) を利用した。このデータベースには全ゲノムショットガン方式により解析された計 21 万 3 千個のシーケンスコンティグが登録されており、カイコ遺伝子の 80% を網羅すると言われている。これらコンティグの中から鱗翅目昆虫 *Plodia interpunctella* *cyclin A* と相同性が高い配列を探したところ 2 つの断片が見つかったが、2 つの配列はつながっていなかった。そこで、両コンティグを跨いだプライマーを作製し (Table. 3-1, Fig. 3-1)、2 つの断片の間を埋め合わせるように配列を決定した。シーケンスの結果、2 つのコンティグを連結することができ、未知領域の配列が決定された (Fig. 3-1)。ORF 解析から予想していた配列と実際に確認した cDNA 配列は一致しており、6 つのエクソ

ンが 5 つのイントロンを挟んで存在した。さらにイントロンの両端には投げ縄構造を作るために必要な塩基、GT と AG がそれぞれ確認された。3'末端配列がまだ未決定ではあるが、ゲノム配列のターミネーションコドンと Poly (A) signal 配列 (AATAAA) の存在から、おそらくエクソン配列から翻訳されるアミノ酸は 468 aa である。このアミノ酸配列を *Plodia interpunctella* の Cyclin A と比較すると相同性は 70% とかなり高いことがわかった。また、他の生物の Cyclin A と比較するアライメントを作製してみると Fig. 3-2 のようになった。カイコの Cyclin A にはサイクリンに保存されるアミノ酸配列が存在した。アミノ酸配列 MRXXILXDWL はサイクリンタンパク質に特異的な β - シート構造をとり、今まで未知だった領域に存在した。アミノ酸配列 LQLVG も同じくサイクリン特異的な β - シート構造をとる (Nugent et al., 1991)。配列 AXKYEEEXXP は α - ヘリックス構造をとり他のタンパク質と相互作用するか、チロシン残基が保存されリン酸化が可能な領域だと予想され、やはりサイクリンタンパク質によくみられる (Nugent et al., 1991)。そして配列 XYXXDI は Cyclin A が Cdc2 と複合体を形成する際に結合する部位とされる (Yang and Farin, 1994)。これらサイクリンに特徴的な配列は Cyclin A と Cyclin B の両方にみられる。また、脊椎動物の Cyclin A は A1 と A2 の 2 種類が存在し、おもに体細胞の細胞周期に関わるのは後者である。そこで、この研究により決定したカイコ Cyclin A のアミノ酸配列を無脊椎動物の Cyclin A、Cyclin B、脊椎動物の Cyclin A1 および A2 のアミノ酸配列と比較する系統樹を作製した (Fig. 3-3)。系統樹によれば、カイコ Cyclin A は無脊椎動物 Cyclin B とは早い段階で分岐していることがわかった。また、脊椎動物のような 2 種類の Cyclin A に分岐する前に分かれており、系統関係からは A1、A2 として区別できなかった。*Drosophila melanogaster cyclin A* は脊椎動物 *cyclin A2* と同じ細胞周期制御機能をもつとされるので (Ueda et al., 1992)、おそらくカイコ *cyclin A* でも同じ機能をもつと推測される。

カイコ *cyclin A* の配列が確認されたため *cyclin B*、*cdc2* と合わせて、高温におけるこ

れら細胞周期制御遺伝子の発現を通常温度の場合と比較してみることにした。対照として、一般に発現の変化が大きくないと推測されるカイコ *actin A3* (Mounier and Prudhomme, 1986) と高温により発現が変化すると考えられるヒートショックプロテイン *hsp90* (Landais et al., 2001) も同時に調べることにした。リアルタイム PCR の結果では *cyclin B* が他の遺伝子と比較して少し発現が高いものの、高温状態で培養した培養細胞ではこれら遺伝子の相対的発現量はすべて減少しており、有意に発現レベルが変わっているものはなかった (Fig. 3-4)。RT-PCR ではトータル RNA 量を揃えて cDNA を合成しており、ある遺伝子の発現が高まることで相対的に他の遺伝子の割合が減少した可能性は考えられる。その遺伝子の特定が現在の課題であり、候補としては Cdc2 のリン酸化状態を調節し、G₂ 期から M 期への移行を制御する *cdc25* や *wee1*、*p53* といった遺伝子やさらに上流の遺伝子が考えられる (Dai et al., 2004; Singh et al., 2004)。カイコにおいては *cyclin A* と同様これら遺伝子はまだクローニングされていない。しかし、カイコのゲノム配列が決定されたので、本研究で *cyclin A* の配列を決定したようにこれら遺伝子の配列決定を行うことは比較的容易と予想される。

遺伝子の発現変化を調べることは G₂ 期停滞のメカニズム解明には有効な手段だと思われるが、タンパク質レベルで発現が変化している可能性も十分考慮しておく必要がある。とくに有糸分裂の終了には Cyclin A や Cyclin B タンパク質のユビキチン依存的な制御が関わっており、温度変化によりユビキチン化状態が変化するようなこともあるかもしれない。また、Cdc2 のリン酸化および脱リン酸化を制御する遺伝子の発現を調べると同時に Cdc2 のリン酸化状態も調べるべきである。ヒト Cdc2 の生物間でよく保存されている PSTAIR 領域付近のペプチドに対する抗体を用いた Western Blotting 法では温度条件による発現の差はなかった (date not shown)。今後、リン酸化した Cdc2 を特異的に認識する抗体を用いて高温における Cdc2 のリン酸化状態を確認することを考えている。

Table. 3-1 カイコ *cyclin A* 遺伝子の配列決定に使用したプライマー

Primer	Sequense
B.mori cyclinA F	GGCAATGGCTTTTAGAATTCA
B.mori cyclinA R	ACATTTTCAGCAGCATTCA
B.mori cyclinA GSP1	GAGAACAGGACGGTACGTCA
B.mori cyclinA R3	AGGCATGGGAATGTGTACGA
B.mori cyclinA F2	TGCACAGACCGACAGAGA
B.mori cyclinA R4	CACTCATGTATGACAGG

反応条件：熱変性95°C×45秒→熱変性95°C×45秒、アニーリング60°C×45秒、伸張反応72°C×45秒 30 cycle→伸張反応72°C×10分→4°C×∞

Table. 3-2 リアルタイムPCRに使用したプライマー

Gene	PCR primer		Melting point (°C)	Reference
	Forward	Reverse		
<i>actin A3</i>	ATGTGCGACGAAGTTGC	CTCACCTGTTGGCCTTGG	91	Mounier and Prudhomme (1986)
<i>hsp90</i>	GAAGAAATGGAGACACAGCC	AGATTCCCACACGTATTGCT	87	Igor et al. (2001)
<i>cdc2</i>	ACCATCCACGGCAATAAAG	TGGTGACAGTACAAGATGGC	83	Iwasaki et al. (1997)
<i>cyclin B</i>	GCCGGAGACAACAACAGC	GGGTCTCGCAAGACAGAA	85	Takahashi et al. (1996)
<i>cyclin A</i>	TGCACAGACCGACAGAGA	CTGTTCCGACAAGTTGAAGC	85	This study

反応条件：熱変性95°C×20秒→熱変性95°C×15秒、アニーリング62°C×20秒、伸張反応72°C×20秒、蛍光感知 Melting point -3°C×6秒 40 cycle

ramen-contigs contig468547 #BAAB01102568

promoter

TTGCGTAGCCTAGAAATAAATAAAAGTTATTTTTAGGCTCTATTCTTTCTCTTTAATTACTTTTTGGGCAGAATTTTTC AATTTAAAGAAATAGTTAATA
4001
TCATTCGACCTCAGTTTTTGTCTCCATTTTGATGTGGACTATAATAATATGCACGTTGATTGTTATGTATAAAATTTGAAAACCTGAGATTTAAACA
AAACATAGACAACCTCCGCTTTTACTGTACGGAGACGCAACCTGATTGGTTGAATTC A AATCAACATAGACAATTGATTAACGTAAACTGCAACAGCTGA
AAATTTATCAAAATGTCTGTGTCCGTTGACGCTTTGCTAGCGTTTGTGGTGGTCTTATTTAAAACCGTAACATTTTCAATCTACTCACATTTTCT
TTTAAAAATGTACATTTAATTC A AATATAGTTAATTTCCGGTTCCGGTTGCAAACTGCACACGTTGACTCCTTGA A ATATCTGATCAGGTGCAATTTG
F initiation codon
TTTACAAAAGAAGCGGGGCAATGGCTTTTAGAATTCATGAAGATCAAGAAAACACAGCATTAGGCC TAAGAAAAGATGGATCCGACCTATTTCTACCA
ACCAAGGCGTGCCTCGGAGACCTCAGTCAATTTGCATGCAACCATAATCGGAACACCAAACTAGTAAGTAACGCTTTGGTCAGTAAAGACACCGATAA
GSP1
TTTATTTCTTAAATGTATCAAAATTTTTTAGACTGGTCTGACAAACGGAACCTGTGAAGTTCAAGATGAGAACAGGACGGTACGTC A AATCAAGAACGA
GAAAAACATCGTTCTTCCCCTATCCCAGTTTTCGTGCCTTTAGCGTATATGAAGACAAACCCACCGAGGTGGAGGTGAAAAAGCGGGAGACCCTTACAAA
R
CCATTTGCAACCAAGGAGACTAAAAAGAAAGCAATTTCTTTGTGAATGCTGCTGAAAATGTGAGAGCTCTGTGTGCACAAGTTGAAAAAAATCGCTTG
AGGAAACCAACAGATCGATCGAGAGAAGACCCCATACGTTAAATGGTTTTTAAATTTCTTAGTTATTCAATGACAGATAGTTCTAATAGAAAAATA
5001
TTATTAATATAAAAAATGTTTCAACTTAGGTTATATTTATAGAGAATTACCAACATATTTCAAAACCAATATTCACAATGGTGCATTTGTTCACA
CTCGCACCCCTGTACTTAGATTAATATAATAATAAACTGTTTTAGTTATTTAGCAAATACAGAAGGTTGTAATGTGAAAAAGTGTAAATGTAATTTA
AAACTAAATAACCCAGGAAAGCATTACAAGAAAAGAAAGATGCTGTGAATCACCCTGCTGTGGTGGATGCCAGTATTTCTGTCGATGTCTATTTCA
F2
AAGAATGAGAGTCAAATTTATGAAGATGTTGACGATGAAGAAATCACCACTGCACAGACCGACAGAGAAATGTTTTCTATGTTGAGGAATATAGGCAGG
ATATCTATGAATACATGAGGAAATGAGGTAAAACATTTAGTTTTTATTACTTCCTTTAGGCTTTAGTCTTTCTTTCTCTAACTGAATACATGTCA
592
AAATATTAAGACAAATTTCCCTAAATGGTCTTTGTAAAAACAGGTGAAAAACAGGGCCACCCCGCTACATGCGTAAGCAACCAGACATCA

contig468547—contig446124

CACATGTTATGCGCTCAACTTGTGGACTGGCTAGTTGAAGTATGTGA

Fig. 3-1 カイコ cyclin A 遺伝子の配列

青文字：シークエンスで確認した配列 赤文字：イントロンの両端

1st Run F : B.mori cyclinA F R : B.mori cyclinA R

2nd Run GSP1 : B.mori cyclinA GSP1 R3 : B.mori cyclinA R3

3rd Run F2 : B.mori cyclinA F2 R4 : B.mori cyclinA R4

ramen-contigs contig446124 #BAAB01092085

1
TGAATATCAACAGCAGAGTGAAACTTTACATCTAGCTGTGCTTACGTAGATAGGTTCTGTGCATACATGAGTGTGTGTCAGAACTAAGCTTCAACTTGT
GGAACAGCTGCCACCTATATTGCCGCGTAAAGTATTCTAAACAAAATATGTGTGAACTTCTCAAATTTATTTTGTCTGTAGATATGCAGGCTACCTA
TGGTGCCAGAGCCATAGGTAGCCTGCAGAAGCATAGATGCAGATACATATATGCAGCTAGCATCTAGATGCAGATACATAGATGCAGATACGTCTGATG
AGACCGAGTTTCAACTGTATTTAGTAGTACTCTTTTCAATCTGAAAAAGAGACTCCCCTGATAGAAATAGATCATAGAAATGTGGCATTATCACTAT
CAAATGTCAAGTTTGAATTTAATCAGGCTACAAAGCTGTTAAGACCCAGAACTTCTATGTATTATAAAAATATTTAATAAAAATAAACTAAGCAATG
CATTTTAATAAATCTTATTTAATTAGGTAGTGTGTTTGTAGCTATACCTAAATCTGTTAAGATGGTCTATCAGATTAATCATTATAATAGTAATTTAATCA
GAATGCAATAAAAAATCAATAGAAGGTGTAACCTGGATGTCCTTTGTACATGATTTTCTATTACTCTGTACTTTGTCTTCTTTTTTGTGTGACATA
AATAAATAAAAAAAATACTGGACATCCAAAATATATATGTAATTCATGTGAAATATGCATTTAATTAATACATATGTACAAACTGAGTGATGCATACA
TAAATAGATGGGTAATTTTTTAAATCTCGAGAATATGATGATGTAGGTAATTTCACTAAACAAAAGTAACAAGATAATAGTAACAATACATTGT
CAAATATCATTAGACAATGTTTATGTCTAAATTTATTTATCATTATATTTAGCTATGTCATTTTAGATTTAATTTTCGATATGGTTTTGAGTAAATATA
1001
GGAAATTGACAAAATGAAGTAAAGTACAGTTGATTGATGATGTCAATCAGCTGTACTGTGACCAATAAATGGTCTATGACGGTTTTCTATATAAGT
TACTTTTAAGTTAGTTCTGAGCTGTACAAAATAATGTCAGGAAATGTAAGTGTATTATTATAAATTAATACATAGAAAATTTTTTATACTTTACTATAT
ATGAGTCGACTATTATCAAAGCCGGCAATCTGACTTTTGGACAATGATGGTAAATCAGAAAAACGAATATTGACTTTGTATTCCATTGGCAGTCACAA
AACTCTTCGGAACGACATCTTAGATAAATAACAGGTTAACTATTAACCTTTATTTAATGCAGGTTTGAACCGTATTTCTTGAAGGAGACGATTATATTC
AAATCAATCTGTATTGACATATCAATAATTTTTTTTTGTCCAAATGCACAGATTGCCACCTTTGATAATAGACGACTCATATATACAAAAATAAGTTG
TAAATTGTAATAAAATCTATATAAAGTATAAGAATATTACCTAATTTGAAACCATCAATGTCTACTAATATTATTTTGGTGTGAATTTTATTAATGTT
CCATCTTGCTGTATGGTTAAATTACATTTGGTACCAGGTTGGGAAACCTCATCATGAAGTAGTAAATATTAGCAAACCTGACAGACCTTTTGTCTATAC
ACACATCTTATATCTAAAAAATCCAAAGGTTTTTGAATAAGTTATAACAATCTGGACGGTTTTGAGTAATAAAAAAAGTTATTACAATACCAAATATGA
ATCTAAGCCATTGTCAAATCTCTGGAACACACAAAAAATTTCACTAAAATGTTCCAGTCACTTAGGATGAGTTCACTAACATACACATGGACAGAA
GAATTAATAATAAAGATTGTTAAACATTTTTGTTTTACAGTAAATATGAAGAATATATCCACCAGAAGTCTCAGAATTTGTGTACATCACTGACGACA
2001
CATAACAAAACGTGAAGTACTGAGAATGGAGCATTTAATTTTAAAGGTGTTATCATTTGATCTCTCAACCCACCTCACTAGCTTTCTGTGCACATTA
CTGTATTTCTAATGGTCTCTCAAGAAGACATTCATTTGGCATCTGTGAGTATAAATCTATTCAAACAAAATAACAATAAATGAAATCTCTTAATGCTG
AAATAATAAAGCATCAATTTTTTTTAAATATATTATTATCATTTTTTTATGTCCTAGATGTGTGGACGAGCTCACAGCCCACCTGGTGTAAAGTGGTTA
CTGGAACCCATAGACATAAATGCGCCACACACCTTGAGATATAAGTTCTAAGGTCAGTATAGTTACAACGGCTGCCCCACCTTCAAACCGAAACGCA
TTACTGCTTCACAGCAGAAATAGGATTTAATATTAGAAATCATATCAAATGTACAGTATATTGTTTTATCAAAATGTAATAAATTTAATTTCACTATATG
CGGAGCTGTGCCTACTTGAAGCAGACCCATATCTCAATTCAAACCCCTCAGTAATAGCAGCGTCGGCGCTGGCAACGGCTCGGCATTGCTTACTATGCGA
GCAGTGCCTGTGATCCTCAGGACGTATACGAAACTAGAGACGCTCCGGGCAAGGTCAACCCGCAATGTGCAATGGTCCGCTGGCCGTCTACGTTGTCC
R3
ACGTGTTCCGGATACACTTTACTTGAATGGAAACATGCCTTAAAGAAATGCTCGTACACATTCCTCATGCCTCTGTTCAACCTTATCAAGCCATACCAG
termination codon
ACAAAATAAAGAGCAACAAGTGTAGTAGTAATCGTTTCAGAACATATTTTCGAAAGTAAGTTTTTTTATGACGAATGAACGAAATCATAGCCCTTATA
GACATCACGACGTCATGCTGTTGACACATTGAGATATGAGTTTGTGAGTATCATTCAAATGGAAGGCATCACTGCTCTATGGCTGATATTACTAAGAT
3001
GGTGGTACCACCATTTGTGAGTACGATACCCCTTCCACCATAAATCAGTTACGCTAATGATTATTTTAAATCTGTGATTTAGACATAGATATAAAT
poly (A) signal
TAGATTGATTTGTAATAAATGGTCAATAGGGATGTTGAGACAAATTAATAAGCCAAACAGCTATATCTAATATTACATATAATACTATATAATATATACA
TCCATATATGCAAAAGGAAAGTCGATTGTGAATCGATTCCGAAGTGACTATTTAAAAGCATTCTATAACAGCCTTACGCCCTTAAATTTGATGTTGTAA

```

X.laevis-cyclinA2 -----MSDHLRDEHQENVQPRKL---
H.sapiens-cyclinA2 -----MLGNSAPGPATREAGSALLALQQTALQEDQENINPEKA---
D.rerio-cyclinA2 -----MSTQGSAYHDSDIHNQENMLSRLRGAANKRVENRE---
D.melanogaster-cyclinA -MASFQIHQDMSNKENPGIKIPAGVKNKQPLAVIGGKAENALAPRANFA
B.mori-cyclinA -MAFRIHQENTALGLRKGSDLFSTN-ORRALGDLSQFACNHNRTKL
P.interpunctella-cyclinA -MAFRIHQENATLGLKKNADYFAANQRRALGNISHFACNQNRNIQL
:

X.laevis-cyclinA2 -----LVPYGGRTYLGVLQENHRGPKALKYSKPALQQTQ
H.sapiens-cyclinA2 -----APYQQRTRAALAVLKSGNPRGLAQQQ-RPKTRR
D.rerio-cyclinA2 -----NYPNPKAANNRTYLGELNSQRRQLGLRGAQGG
D.melanogaster-cyclinA Y-----LNGNNVPRPAGKQVQVFRDVRNLNVDENVEYGAKKSNVVP
B.mori-cyclinA TGLTNGTCKVQDENRTYRQIKNEKNIVLPLSQFRAFVSVEYDKPTEVEYKK
P.interpunctella-cyclinA PGLSNGPCKVQDENRTYRQIKNEKNIVPPYDQFRAFVSVEYDKPNEVEYRR
.

X.laevis-cyclinA2 YLSYNHLGVNDENYGIIPARKAASKQPAFTIHYDEPDCATNKRKAYHKKT
H.sapiens-cyclinA2 YAPLKDLPVN-DEHYTVPPWKANSKQPAFTIHYDEAEKEAQKKAESQK-
D.rerio-cyclinA2 -SGPQIIACKPEENARSGERPSNRQPAAFQIHYDEPDGACSKKAPLQRST
D.melanogaster-cyclinA YVEQFKTFSVYEDNNDQVAPSGKSLASLVYDKENHDVYKFGAGQKELVDYD
B.mori-cyclinA RETTYKPFATKETKK-ESNFFVNAENYRALCAQVEKKSLEETKPDRSRE
P.interpunctella-cyclinA REPTFKPFYAKDSNRKENIFYNAAGNSRKQALAEKQPERPKAEPYKR--
:

X.laevis-cyclinA2 YQDENLQQLNSYLGSIQTRKPLHPIQ---IAMETSFQSP--MDVSIYDEE
H.sapiens-cyclinA2 IEREDALAFNSAISLPGPRKPLVPLD---YPMDGSEFSPHTMDMSIVLED
D.rerio-cyclinA2 MDCSPLTLN---PTYTRLRQPLATID---LPLEASFDSP--MDMSVIDCE
D.melanogaster-cyclinA LDSTPMSYTDVQSPMSVDRSILGVIQSSDISVGTETGASPTGRVKELPPR
B.mori-cyclinA DPHYALQEKKDAVESPMSSVYDASILSMSISKNESQIIEDVD-DEEITTAQ
P.interpunctella-cyclinA ---LPLQEKKDYVESPMSSVYDASILSMSISRNDSHILNDSLEDEDTITAK
:.

X.laevis-cyclinA2 QKYVGCNNVADYAKEIHTYLREMEYKCKPKAGYMQKQPDITGSMRAILVD
H.sapiens-cyclinA2 EKPYSYNEVPDYHEDIHTYLREMEYKCKPKVGYMKKQPDITNSMRAILVD
D.rerio-cyclinA2 ERPTNYNEVSDYAAEIHHLREMEYKCKPKAGYMRKQPDITNSMRAILVD
D.melanogaster-cyclinA NDRQRFLEVVYQYQMDILEYFRESEKKHRPKPLYMRQKDISHMRSILID
B.mori-cyclinA TDREMFYVVEYRQDIYEYMRREIEG---HPRYMRKQPDITHVMRSILVD
P.interpunctella-cyclinA TDREMFHYVEYRDDIYQYMRREIEYKNRANPRYMRKQPDITHVMRSILID
*:*:* :*: * : *::*:* *

```

Fig. 3-2 カイコCyclin Aの相同性

シーケンスで決定した塩基配列から推測されるカイコCyclin Aのアミノ酸配列と他の生物のCyclin Aとの相同性を示した。

アライメントはClustalW (<http://clustalw.genome.jp/>) を用いて作成した。

* すべての生物間において、同じアミノ酸

赤い四角: Cdc2ファミリーの結合部位

青い四角: サイクリンに特異的なβ-シート構造

黄色い四角: 保存されたチロシン残基を含むリン酸化部位

X.laevis-cyclinA2	WLVEYGEEYKLNQNETLYLAVNYIDRFLSSMSVLRGNLQLVGTAAMLLASK
H.sapiens-cyclinA2	WLVEYGEEYKLNQNETLHLAVNYIDRFLSSMSVLRGNLQLVGTAAMLLASK
D.rerio-cyclinA2	WLVEYGEEYKLNQNETLYLAVNYIDRFLSSMSVLRGNLQLVGTAAMLLASK
D.melanogaster-cyclinA	WLVEYSEYKLDLTETLYLVFYLDLDRFLSQMAYVRSKQLVGTAAAMYIAAK
B.mori-cyclinA	WLVEYCDEYQQQSETLHLAVSYVDRFLSYMSVYRTHLQLVGTAAATYIAAK
P.interpunctella-cyclinA	WLVEYCDEYSQQNETLHLAVSYVDRFLSYMSVYRTHLQLVGTAAATYIAAK
	***** :** . :****:* * :***** * :** * ***** :** :
X.laevis-cyclinA2	FEEIYPPEVAEFYITDDTYTKKQVLRMEHLVLYKVLVSLDAAPTILQYLN
H.sapiens-cyclinA2	FEEIYPPEVAEFYITDDTYTKKQVLRMEHLVLYKVLVSLDAAPTVNOFLT
D.rerio-cyclinA2	FEEIYPPEVAEFYITDDTYTKKQVLRMEHLVLYKVLVSLDAAPTINOFLT
D.melanogaster-cyclinA	YEEIYPPEVGEFVFLTDDSYTKAQVLRMEQVILKILSFDLCTPTAYVFIN
B.mori-cyclinA	YEEVYPPVEVSEFYITDDTYTKREVLRMEHLILKVLVSLDSTPTSLAFLS
P.interpunctella-cyclinA	YEEIYP-----
	:**:**
X.laevis-cyclinA2	QYFQIHP-VSPKVESLSMFLGELSLVDADPFLRYLPSVYAAAAFVIANCT
H.sapiens-cyclinA2	QYFLHQPPANCKVESLAMFLGELSLIDADPYLKYLPVIAAGAAFHLLALYT
D.rerio-cyclinA2	QYFLHQPP-VSSKVESLSMFLGELSLIDCDPFLKYLPVIAAGAAAFILANHT
D.melanogaster-cyclinA	TYAVLCD-MPEKLYMTLYISELSLMEGETYLQYLPVIAAGAAAFILANHT
B.mori-cyclinA	HYCISNG-LSKTFHLASYIAELCLLEADPYLQFKPSVIAAASALATARHC
P.interpunctella-cyclinA	-----
X.laevis-cyclinA2	IN-----ERTWSDPLVEYTSYTTLETLLKPC
H.sapiens-cyclinA2	VT-----GQSWPESLIRKGTGTTLESLLKPC
D.rerio-cyclinA2	LA-----SGSWSKSLVDLTGYSLEDLLPC
D.melanogaster-cyclinA	LG-----MEMWTPRLEEITTYKLEDLKTIV
B.mori-cyclinA	LLCEQCACDPQDYVETRDAPGKYNPQCAMVAVPSTLSTCSGYTLLEETC
P.interpunctella-cyclinA	-----
X.laevis-cyclinA2	ILDLYQTYLSAASHQQQAVREKYKAPKNHAYSLIIPPESMSTFL-----
H.sapiens-cyclinA2	LMDLHQTYLKAQQAQQSIREKYKNSKYHGVSLLNPPETLNL-----
D.rerio-cyclinA2	YQDLHQTYLAASQAQQAVREKYKNSKYHEVSLIEPPELMLN-----
D.melanogaster-cyclinA	YLHLCHTHKTAKELNQAAMREKYNRDQYKVMAMESVEMSKDDFDQLCEA
B.mori-cyclinA	LKEIARTSHSHASVQPYQAIPDKYKSNK-----
P.interpunctella-cyclinA	-----

X.Laevis : *Xenopus laevis* アフリカツメガエル
H.sapiens : *Homo.sapiens* ヒト
D.rerio : *Danio rerio* ゼブラフィッシュ
D.melanogaster : *Drosophila melanogaster* キイロショウジョウバエ
B.mori : *Bombyx mori* カイコガ
P.Interpunctella : *Plodia interpunctella* ノシメマダラメイガ

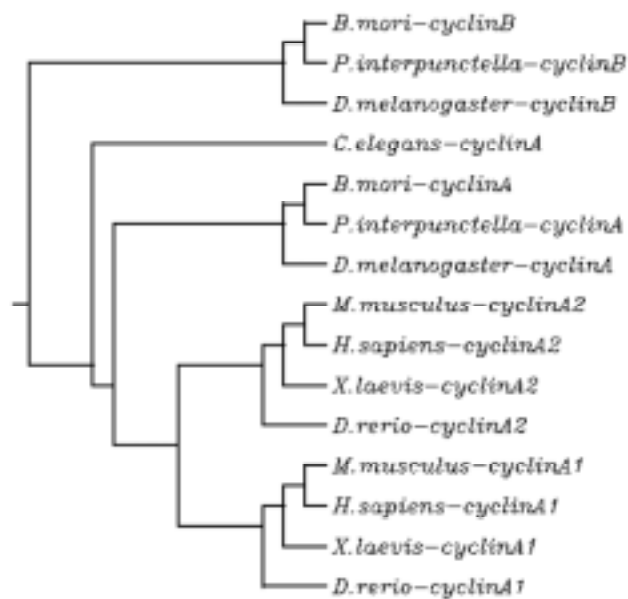


Fig. 3-3 サイクリンの系統樹

各生物のCyclin AおよびCyclin Bのアミノ酸配列から系統樹を作製した。作製にはClustalW (<http://clustalw.genome.jp/>) を用いた。

X.Laevis : *Xenopus laevis* アフリカツメガエル

H.sapiens : *Homo.sapiens* ヒト

D.rerio : *Danio rerio* ゼブラフィッシュ

D.melanogaster : *Drosophila melanogaster* キイロショウジョウバエ

B.mori : *Bombyx mori* カイコガ

P.Interpunctella : *Plodia interpunctella* ノシメマダラメイガ

C.elegans : *Caenorhabditis elegans* 線虫

M.musculus : *Mus musculus* マウス

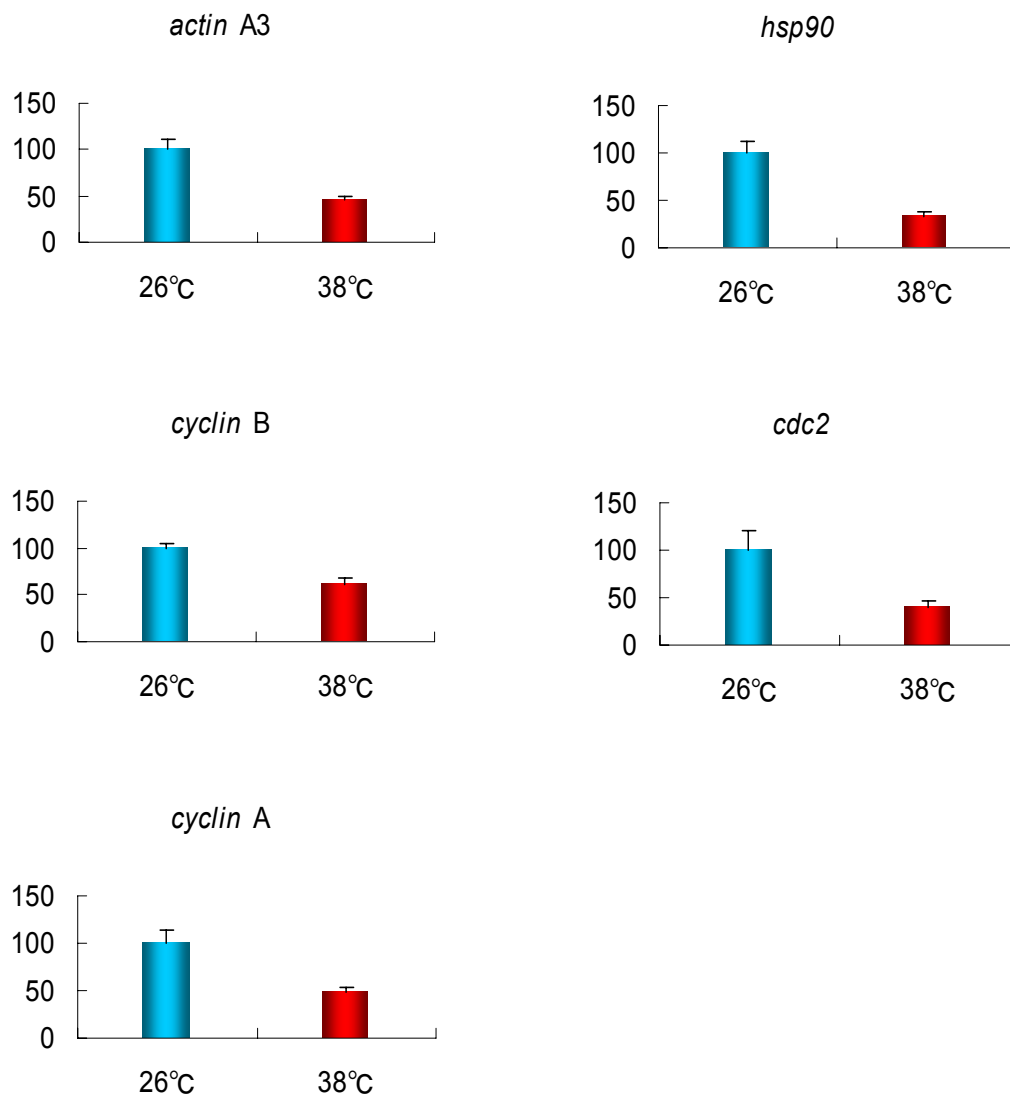


Fig. 3-4 カイコ培養細胞の高温における遺伝子発現の変化

26°Cあるいは38°Cで24時間培養した細胞からトータルRNAを抽出し、RT-PCRにより合成したcDNAを鋳型として各遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により定量した。各遺伝子の26°Cにおける発現量を100として38°Cの発現量を相対値 (%) で示した (平均値±SD)。

実験は、独立に2回行った。2回の実験の結果に大きな違いはなかった。

リアルタイムPCRに使用したプライマーおよび反応条件はTable. 1に示した。

総合考察

昆虫は変温動物であり温度に敏感に反応する。それらは昆虫の成長速度に反映されている。成長については発育日数と発育温度の積が種により一定の値を示すように調節されていることが古くから知られている。しかし、この調節機構は不明であり、昆虫の温度に対する反応メカニズムはよくわかっていない。このメカニズムを分子レベルで解明することを目的とし、本研究では生体のモデルとして昆虫培養細胞を用いた。従って、まず昆虫生体における温度反応性が培養細胞にも反映されていることを確かめることにした。

成長速度が温度により影響を受けるなら、昆虫培養細胞の成長速度、いわゆる増殖も同じように影響されると考えた。カイコ幼虫の体重増加とカイコ培養細胞の増殖を 22°C から 38°C の範囲で比較すると、両者の成長率は同様な挙動を示した。すなわち、成長率は温度依存的な増加をみせるが、限界があり、それ以上の温度では成長が阻害される。このようなパターンは他の昆虫でも認められており、成長率が低下する温度は種によって異なっている。おそらく、昆虫はそれぞれ生息する環境に適応しており、その種の成長に適した温度範囲は分布域の気候を反映していると考えられる。そして、その反応は基本的には細胞にもあると考えられる。由来昆虫種によって培養細胞のタンパク質発現が阻害される温度が異なるのもこのためであると推測される (Gerbal et al., 2000)。

培養細胞では増殖が低下するような温度でも、カイコ幼虫では体重増加がみられた点は興味深い。カイコ生体には高温に対する防御機構が備わっているか、または、今回用いた細胞が高温に対して感受性が高かったことなどの可能性があると思われる。後者においては BmN 細胞が卵巣由来であることから、34°C で飼育したカイコを解剖し、卵巣の発育状況を見ることで確かめられると考えられるが検討していない。いずれにしても、

34°Cでの飼育では脱皮阻害がみられたことを考えると、卵巣以外の組織でも障害が発生すると考えられ、この温度が成長における限界温度に近いことは間違いない。

高温において培養細胞の増殖が停止するという現象は温度に対する反応性として代表的であった。高温による発育遅延は一般的にみとめられる現象ではあるがその原因については明らかにされていない。そこで、培養細胞の高温における増殖停止メカニズムを解明することにより温度限界を決定する機構を調べようと考えた。38°Cで培養した細胞は増殖が停止しているものの、生存していた。しかも、BrdUの取り込みからDNA合成はすぐに停止するわけではなく、ある程度S期を通過する細胞が存在することが明らかになった。これらの結果、細胞の増殖停止は、細胞死が起こるからではなく、細胞周期の一定の段階で止まることによると推測した。

高温で培養した細胞の細胞周期を、レーザースキャニングサイトメーター (LSC) を用いて解析すると、高温における細胞増殖の停止は、細胞周期がG₂期で停滞するためであることがわかった。高温にさらされることによってG₂期という細胞周期の特定の段階で細胞分裂が停止してしまうことには、何か積極的な機構があると予感させられる。鱗翅目昆虫の培養細胞であるSf9細胞を無血清培養した場合にも、G₂/M期阻害が確認されている (Doverskog et al., 2000)。この結果は、細胞増殖因子の関係を疑わせるが、培地を換えずとも温度を38°Cから26°Cに下げただけで細胞周期の停滞はなくなり、再び増殖が始まるので、高温での増殖阻害についてはその可能性は低い。Fertigら (1990) は、哺乳類細胞の細胞分裂静止期のDNA量が2cであるのに対し、昆虫培養細胞における静止期はDNA量が4cであることを報告している。この点から、昆虫細胞では細胞分裂をG₂期で積極的に停止する機構が備わっている可能性が示唆される。

高温の細胞周期への影響はカイコ幼虫の生体細胞にも反映されていた。この結果は、昆虫が高温にさらされた時に成長が遅延することの生理学的な基礎の一部を示したといえる。生体細胞としては血球と中腸細胞について解析を行ったが、核が小さく形態観察

がしにくかったことやこれらの細胞が多倍体性であり、停滞期を厳密には特定できなかったことなどの問題があった。この点については、今後精子との比較によって核相を同定し、核の形態観察を高倍率で行うことにより特定しようと考えている。さらに、血球の分裂時期や核相が日齢とともに変化することについても今後の興味ある課題だと思う。また、間接的な方法ではあるが、細胞周期を阻害する薬品をカイコ幼虫に注射したときの成長を、高温飼育したときの成長と比較することで、高温と細胞周期の停滞との関係を解明していくことも考えている。

G₂期停滞のメカニズムを解明するにあたり細胞周期制御遺伝子のうち G₂/M 期に関わる遺伝子の発現を調べたが、特異的な挙動を示す遺伝子は発見できなかった。とくに Cyclin A と Cdc2 の複合体は G₂期の進行に、Cyclin B と Cdc2 の複合体は G₂期から M 期への移行に関与し、複合体の活性は Cdc2 のリン酸化状態により左右される (Nabel, 2002)。このリン酸化のステップに G₂期停滞の原因があることも考えられ、今後、Cdc2 のリン酸化状態を明らかにしたうえで、その状態を調節する遺伝子の発現を調べることを考えている。その際に、カイコにおいてまだ配列決定がなされていない遺伝子については、シーケンスを行い、配列の確認をする必要がある。本研究ではカイコ *cyclin A* の配列を確認した。アミノ酸配列の相同性から推測する限り *cyclin A* 遺伝子だと考えられるが、今回の研究では機能までは確認できていない。今後、新たに配列決定する遺伝子を含め、RNAi などの方法を用いた機能の解析も要求される (Imamura et al., 2003; Tabunoki et al., 2004)。その際、LSC による解析法は培養細胞のみならず生体細胞においても遺伝子の発現を止めたことによる細胞周期への影響を確認するのに役立つと考えている。

本研究ではカイコ培養細胞 BmN 株のみで実験を行った。今後、昆虫における一般性や温度反応性の違いを調べるためには異なる昆虫種由来や組織由来の培養細胞を用いても同様な解析を行っていく必要がある。また、Imanishi ら (1999) のように BmN 細胞

を高温に適応させることができれば **Differential Display** 法などで網羅的に遺伝子発現を比較し、高温適応に重要な役割を担う遺伝子を特定する方法も有効であろう。高温により発現が変化する遺伝子が特定できれば、高温に耐性をもつ品種とそうでない品種の間にある遺伝子配列や発現の比較が可能となる。さらには、温暖な地方に分布する昆虫と寒冷な地方に分布する昆虫とを比較することで、温度反応性に関する昆虫種の分子レベルでの違いが明らかになるだろう。本研究の成果が、温暖化による昆虫分布への影響予測や種の保存に役立つことができればよいと思う。

要旨

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。

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°Cから38°C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°Cまでは増殖がみられたが38°C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°Cでは致死していたが、38°C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°C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。22°C から 34°C 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°C 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°C 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 G₂ 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°C と細胞増殖が停止する温度である 38°C で培養した細胞の周期分布を比較すると、26°C では G₁ 期の細胞に高いピークを示すのに対し 38°C では G₂ 期にピークが移行していた。また、培養温度を 38°C から 26°C に温度を戻すと、通常温度のパターンに回復した。以上の結果、高温はカイコ培養細胞の細胞周期を G₂ 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 G₂ 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°C あるいは 38°C 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。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 DNA 量の多い細胞の割合が増加した。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 G₂ 期阻害が生じた結果であると考えられた。また中腸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. カイコガ *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

G₂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、G₂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。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。

謝辞

本研究を遂行するにあたりましては、東京大学新領域創成科学研究科資源生物制御学研究室、永田昌男教授および青木不学助教授から丁寧なご教授と細やかなお心遣いをいただきました。心よりお礼申し上げます。

永田先生には貴重な時間を割き、一対一でとても長い時間ディスカッションをしていただきました。また、実験手法の基礎を優しく教えていただきました。今ある知識はそのような時間から生まれたものばかりです。

青木先生には度重なる場面で貴重な助言をしていただき、本論文についても先生なくしてはここまでの成果をあげることはできなかったと思います。

また、資源生物制御学研究室の諸先輩方には様々な場面でお世話になりました。自分の研究も忙しいはずであるのに、隣について実験補助をしていただいたり、声をかけてアドバイスをしていただいたりと、感謝の気持ちでいっぱいです。

最後になりましたが、本論文の作成にあたり影で支えていただきました方々に深く感謝いたします。

参考文献

Altman, S. A., Randers, L., and Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* *9*, 671-674.

Ashburner, M., and Thompson, J. N. (1978). *The Genetics and Biology of Drosophila* (New York, Academic Press).

Bloemholk, J., and Gray, M. (1992). Effect of temperature on hybridoma cell cycle and MAb production. *Biotechnol Bioeng* *40*, 427-431.

Chuppa, S., Tsai, Y., Yoon, S., Shackleford, S., Rozales, C., Bhat, R., Tsay, G., Matanguihan, C., Konstantinov, K., and Naveh, D. (1997). Fermentor temperature as a tool for control of high-density perfusion cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* *55*, 328-338.

Dai, X., Yamasaki, K., Yang, L., Sayama, K., Shirakata, Y., Tokumara, S., Yahata, Y., Tohyama, M., and Hashimoto, K. (2004). Keratinocyte G2/M growth arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation. *J Invest Dermatol* *122*, 1356-1364.

Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., and Melamed, M. R. (1999).

Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Exp Cell Res* *249*, 1-12.

Dhawan, S., and Gopinathan, K. P. (2003). Cell cycle events during the development of the silk glands in the mulberry silkworm *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol* *213*, 435-444. Epub 2003 Jul 2017.

Doverskog, M., Bertram, E., Ljunggren, J., Ohman, L., Sennerstam, R., and Haggstrom, L. (2000). Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf9 insect cells: modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. *Biotechnol Prog* *16*, 837-846.

Edgar, B. A., and Orr-Weaver, T. L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* *105*, 297-306.

Fertig, G., Kloppinger, M., and Miltenburger, H. G. (1990). Cell cycle kinetics of insect cell cultures compared to mammalian cell cultures. *Exp Cell Res* *189*, 208-212.

舟越正子 (1991) : 哺乳類以外の有用細胞 (II) 昆虫細胞, 蛋白質 核酸 酵素, *36*, 2544-2555.

Gardiner, E. M., and Strand, M. R. (2000). Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochem Physiol* *43*, 147-164.

Gerbal, M., Fournier, P., Barry, P., Mariller, M., Odier, F., Devauchelle, G., and Duonor-Cerutti, M. (2000). Adaptation of an insect cell line of *Spodoptera frugiperda* to grow at 37 degrees C: characterization of an endodiploid clone. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36, 117-124.

Glacken, M. W., Fleischaker, R. J., and Sinskey, A. J. (1986). Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximizing product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* 28, 1376-1389.

Imamura, M., Nakai, J., Inoue, S., Quan, G. X., Kanda, T., and Tamura, T. (2003). Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* 165, 1329-1340.

Imanishi, S., Cho, E.-S., and Tomita, S. (1999). Novel *Bombyx mori* cell lines cultivable at 37 degrees C. *Appl Entomol Zool* 34, 259-266.

Iwasaki, H., Takahashi, M., Niimi, T., Yamashita, O., and Yaginuma, T. (1997). Cloning of cDNAs encoding *Bombyx* homologues of Cdc2 and Cdc2-related kinase from eggs. *Insect Mol Biol* 6, 131-141.

Jenkins, N., and Hovey, A. (1993). Temperature control of growth and productivity in mutant Chinese hamster ovary cells synthesizing a recombinant protein. *Biotechnol Bioeng* 42, 1029-1036.

Jorgensen, P., and Tyers, M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* *14*, R1014-1027.

Landais, I., Pommet, J., Mita, K., Nohata, J., Gimenez, S., Fournier, P., Devauchelle, G., Duonor-Cerutti, M., and Ogliastro, M. (2001). Characterization of the cDNA encoding the 90 kDa heat-shock protein in the Lepidoptera *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Gene* *271*, 223-231.

Ling, E., Shirai, K., Kanekatsu, R., and Kiguchi, K. (2003). Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining. *Histochem Cell Biol* *120*, 505-511. Epub 2003 Nov 2011.

Luther, E., and Kametsky, L. A. (1996). Resolution of mitotic cells using laser scanning cytometry. *Cytometry* *23*, 272-278.

Maeda, S. (1989). Gene transfer vectors of a baculovirus, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, and their use for expression foreign genes in insect cells. *Invertebrate Cell System Application* *1*, 167-181.

Mascotti, K., McCullough, J., and Burger, S. R. (2000). HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion* *40*, 693-696.

松村季美・田中茂明・高坂孝義・鈴木シズエ (1958) : 蚕の飼育条件と桑葉の食下および消化の関係. 蚕試彙報, *73*, 1-40.

Mottier, V., Siaussat, D., Bozzolan, F., Auzoux-Bordenave, S., Porcheron, P., and Debernard, S. (2004). The 20-hydroxyecdysone-induced cellular arrest in G2 phase is preceded by an inhibition of cyclin expression. *Insect Biochem Mol Biol* *34*, 51-60.

Mounier, N., and Prudhomme, J. C. (1986). Isolation of actin genes in *Bombyx mori*: the coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in an unusual position. *Biochimie* *68*, 1053-1061.

Nabel, E. G. (2002). CDKs and CKIs: molecular targets for tissue remodelling. *Nat Rev Drug Discov* *1*, 587-598.

Nakahara, Y., Kanamori, Y., Kiuchi, M. & Kamimura, M. (2003). In vitro studies of hematopoiesis in the silkworm: cell proliferation in and hemocyte discharge from the hematopoietic organ. *J Insect Physiol* *49*, 907-16.

中原雄一・志村幸子・神村学 (2004) : カイコ血球のフローサイトメトリー解析. 日本蚕糸学会, 第74回学術講演会, 口頭発表.

Nugent, J. H., Alfa, C. E., Young, T., and Hyams, J. S. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* *99*, 669-674.

Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* *96*, 627-637.

Schmidt-Nielsen, K. 1915- (1997). *Animal physiology: adaptation and environment / KuntSchmidt-Nielsen. -5th ed (Gambridge University Press), 218-239*

志村幸子 (2004) : カイコ真皮細胞の変化と成長の関係について. 日本蚕糸学会関東支部, 第 55 回学術講演会, 口頭発表.

志村幸子・中原雄一・神村学 (2004) : カイコ真皮細胞のフローサイトメトリーによる解析. 日本蚕糸学会, 第 74 回学術講演会, 口頭発表.

Singh, S. V., Herman-Antosiewicz, A., Singh, A. V., Lew, K. L., Srivastava, S. K., Kamath, R., Brown, K. D., Zhang, L., and Baskaran, R. (2004). Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J Biol Chem* 279, 25813-25822. Epub 22004 Apr 25808.

Stern, B., Ried, G., Clegg, N. J., Grigliatti, T. A., and Lehner, C. F. (1993). Genetic analysis of the *Drosophila cdc2* homolog. *Development* 117, 219-232.

Sudhakar, B., and Gopinathan, K. P. (2000). Expression of cyclin E in endomitotic silk-gland cells from mulberry silkworm. *Gene* 257, 77-85.

須藤光正・藤原裕紀・堀江保宏 (1997) : 5 齢のカイコの成長速度と飼育温度との関係の数式化並びに発育零点について. *日蚕雑* 68, 461-468.

Tabunoki, H., Higurashi, S., Ninagi, O., Fujii, H., Banno, Y., Nozaki, M., Kitajima, M., Miura, N., Atsumi, S., Tsuchida, K., *et al.* (2004). A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *FEBS Lett* *567*, 175-178.

Takahashi, M. *et al.* (1996). Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in non-diapause and diapause eggs. *Dev Genes Evol* *206*, 288-291

Takahashi, M., Iwasaki, H., Niimi, T., Yamashita, O., and Yaginuma, T. (1998). Changing profiles of mRNA levels of Cdc2 and a novel Cdc2-related kinase (Bcdrk) in relation to ovarian development and embryonic diapause of *Bombyx mori*. *Appl Entomol Zool* *33*, 551-559.

高宮邦夫・中島正雄 (1970) : 飼育温度が人工飼料育蚕の成長成育に及ぼす影響. 蚕試彙報, *94*, 37-58.

竹内好武・高坂孝義・上田悟 (1964) : 4・5 齡期の飼育温度と食下量および消化量の関係. 蚕試彙報, *84*, 1-12.

上田悟・鈴木清 (1967) : 家蚕の成長に関する研究. 1. 食下量, 消化量, 体重および体水分重量の相互関係. 蚕試報, *22*, 33-74.

Ueda, R., Togashi, S., Takahisa, M., Tsurumura, S., Mikuni, M., Kondo, K., and Miyake, T. (1992). Sensory mother cell division is specifically affected in a Cyclin-A mutant of *Drosophila melanogaster*. *Embo J* *11*, 2935-2939.

Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* *13*, 213-217.

山口卓宏・桐谷圭治・松比良邦彦・福田健（2001）：異常高温が作物害虫の発生に及ぼす影響. 応動昆会誌, *45*, 1-7.

Yamamura, K. and Kiritani, K. (1998). A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperate zones. *Appl Entomol Zool* *33*, 289-298.

Yamashita, M., and Iwabuchi, K. (2001). *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J Insect Physiol* *47*, 325-331.

Yang, L., and Farin, C. E. (1994). Identification of cDNAs encoding bovine cyclin B and Cdk1/Cdc2. *Gene* *141*, 283-286.

吉尾正信（1997）：ナガサキアゲハの北上と休眠性. インセクタリウム, *34*, 382-387.