

## 第 2 章 細胞増殖抑制メカニズムの解析

現在までに昆虫などの動物で、発育停止メカニズムについてはさまざまな研究がなされてきた。昆虫の休眠は大別して、外因性休眠と内因性休眠がある。外因性休眠は短日や気温低下など外部環境に反応して誘導され、内因性休眠は外部環境に関係なく遺伝的に決定誘導される。そして、このようにして休眠に入った個体では呼吸、代謝、活動低下、貯蔵タンパク質・脂質・糖質などの蓄積、ストレス耐性の向上といった特徴が認められる (Denlinger, 2008)。

休眠を誘導一覚醒する環境要因については古くから非常に多くの研究が積み重ねられてきた。そして、昆虫の発育や変態、そして生殖を制御するホルモンとしてよく知られているエクダイソンや幼若ホルモンが休眠制御に深くかかわっている例も多数報告されている。近年では、これらの環境要因やホルモンによる生体反応が、どのような分子機構で休眠の制御に関わるかについても報告されてきている。カイコでは休眠ホルモンが食道下神経節から分泌され、G タンパク質共役型受容体を介して卵巣に作用し、次世代の卵に休眠を誘導する (Homma *et al.*, 2006)。またカイコの休眠卵では、細胞内シグナル伝達経路のひ

とつである MAP キナーゼカスケードの構成要素である p38 と ERK が、休眠の前後で活性状態を変化させる (Fujiwara *et al.*, 2006a, b)。同じくチョウ目昆虫であるヤガ科の *Heliothis virescens* とタバコガ (*Helicoverpa assulta*) からは、カイコの休眠ホルモンと類似のペプチドが見つかっており、それらの遺伝子発現量は休眠蛹では非休眠蛹と比べて低く、休眠蛹にこのペプチドを投与すると休眠が覚醒する (Xu and Denlinger 2003; Zhao *et al.*, 2004)。さらにコガタルリハムシ (*Gastrophysa atrocyanea*) では、キチナーゼ活性を有する活動期特異的タンパク質 (APAP I and II) が休眠中では減少しているが、RNAi での発現抑制により休眠覚醒を阻害し、休眠期特有の地中に潜る行動を引き起こす (Fujita *et al.*, 2006)。またキイロショウジョウバエでは、野外集団の間で休眠性の変異をもたらす遺伝子座が解析され、ホスホイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 遺伝子が原因遺伝子として同定された (Williams *et al.*, 2006)。しかし、これらの報告は休眠現象を部分的に捉えた解析であり、休眠現象を総合的に説明するには至っていない。

第 1 章で明らかにした Yamamarin および C16-Yamamarin による細胞増殖抑制が、細胞レベルにおいて休眠化様現象を再現している可能性がある。そこで本章では、C16-Yamamarin を使用して細胞レベルでの休眠化様メカニズムの解析を

目的として、ショウジョウバエ胚子に由来する培養細胞（Schneider S2）を用いながら、C16-Yamamarin による up-regulation および down-regulation の網羅的遺伝子解析、ならびに細胞周期に及ぼす影響、そして細胞膜を透過化处理したミトコンドリア様細胞の呼吸に及ぼす影響を解析した。

## 材料と方法

### 1. ラット肝がん細胞増殖抑制活性の可逆性実験

C16-Yamamarin によるラット肝がん細胞 (dRLh84) 増殖抑制活性の可逆性実験として、第 1 章で述べた 96 穴マイクロプレートを用いた MTT 法により、それぞれ 24、48、72、96、120 h における C16-Yamamarin の増殖抑制活性を検討した。なお、48 h までの培養を 1st culture として 25  $\mu$ M の C16-Yamamarin とともに培養し、その後 48 – 72 h を 2nd culture として C16-Yamamarin を含む培地を除き、25  $\mu$ M のパルミチン酸を添加した新鮮な培地で培養した。次に 72 – 96 h を 3rd culture としてパルミチン酸を含む培地を除き、再び同濃度の C16-Yamamarin を添加した新鮮な培地で培養し、最後の 96 – 120 h の 4th culture では C16-Yamamarin を含む培地を除いて、同濃度のパルミチン酸を添加した新鮮な培地で培養する方法で検討した。なお同濃度のパルミチン酸を添加し、培地を新鮮なものに換えるタイミングを合わせたものをコントロールとして吸光度を比較した。また同様の操作を 35 mm dish (BD Falcon) で培養した細胞に対

してもおこない、それぞれの時間において C16-Yamamarin 区とパルミチン酸区を顕微鏡下で形態観察した。

## 2. 昆虫培養細胞増殖抑制活性の可逆性実験

C16-Yamamarin によるショウジョウバエ培養細胞 (Schneider S2) 増殖抑制活性の可逆性実験として、前述のラット肝がん細胞の場合とまったく同様の方法で WST-1 法を使用した。すなわち 24、48、72、96、120 h で C16-Yamamarin の増殖抑制活性を追いながら 48 h までの培養を 1st culture として 12.5  $\mu\text{M}$  の C16-Yamamarin とともに培養し、その後、48 – 72 h を 2nd culture として C16-Yamamarin を含む培地を除き、25  $\mu\text{M}$  のパルミチン酸を添加した新鮮な培地で培養した。また 72 – 96 h を 3rd culture としてパルミチン酸を含む培地を除き、再び同濃度の C16-Yamamarin を添加した新鮮な培地で培養し、最後の 96 – 120 h の 4th culture では、C16-Yamamarin を含む培地を除いて同濃度のパルミチン酸を添加した新鮮な培地で培養する方法で検討した。なお同濃度のパルミチン酸を添加し、培地を新鮮なものに換えるタイミングを合わせたものをコントロール

として吸光度を比較した。また同様の操作を 35 mm dish (BD Falcon) で培養した細胞に対してもおこない、それぞれの時間において C16-Yamamarin 区とパルミチン酸区を顕微鏡下で形態観察した。

### 3. DNA マイクロアレイによる解析

全ゲノム配列が解読 (Myers *et al.*, 2000) されているキイロショウジョウバエの胚子に由来する Schneider S2 細胞を用いて、可逆的細胞増殖抑制活性を遺伝子レベルで解析した。

#### 1) 細胞の培養

培養は第 1 章で述べた Schneider S2 細胞の条件と同様に 27 °C、全暗条件で FBS および抗生物質を含む Schneider Insect Medium でおこなった。フラスコ (175 cm<sup>2</sup>, BD Falcon) に  $5 \times 10^4$  cells/mL に調整した培地を 50 mL ずつ、計 8 個調整し 24 h 同条件で前培養した。

培養したフラスコは、可逆性実験と同様に 48 h までの培養を 1st culture として 12.5  $\mu$ M の C16-Yamamarin とともに培養し、その後、48 – 72 h を 2nd culture として C16-Yamamarin を含む培地を軽い遠心 (1,000g, 5 min) により取り除き、同濃度のパルミチン酸を含む培地で培養した。2nd culture 後のフラスコ 2 個から細胞を回収、洗浄した後に液体窒素で急速冷凍することで酵素などの働きを抑制し、T1-1、-2 として -80°C で保管した (Fig. 14)。なおコントロール区として C16-Yamamarin を添加せずに同濃度のパルミチン酸とともに 72 h 培養した細胞も回収し、同様の方法で凍結後、Control-1、-2 として保管した。

その他の細胞は遠心し洗浄後、新鮮な培地に再び同濃度の C16-Yamamarin を添加して培養 (72 – 96 h) し、3rd culture とした。3rd culture 後のフラスコ 2 個から細胞を回収および同様に冷凍し、T2-1、-2 として -80°C で保管した。他の細胞は C16-Yamamarin を含む培地を遠心により取り除き、パルミチン酸とともに 96 – 120 h の 4th culture をおこなった。その後、細胞を回収および同様に冷凍し、T3-1、-2 として -80°C で保管した。

## 2) RNA 抽出と Northern blotting による確認およびマイクロアレイ解析

それぞれの細胞からの RNA 抽出および精製には RNeasy® Mini Kit (50) (QIAGEN)を使用し、プロトコールに従い total-RNA の抽出をおこなった。

回収した total-RNA は微量分光光度計 Nano Drop(スクラム)により定量し、それぞれ 10 µg ずつを Northern blotting により確認した (Fig. 15)。確認した RNA それぞれ 10 µg ずつを RNase free MQ 水で 1 µg/mL に調整し、GeneChip Expression Array による解析を(株)タカラバイオに依頼した。得られたデータは(株)東北化学薬品の遺伝子発現データ解析サービス『MOGERA-GE』によりパスウェイデータとした。



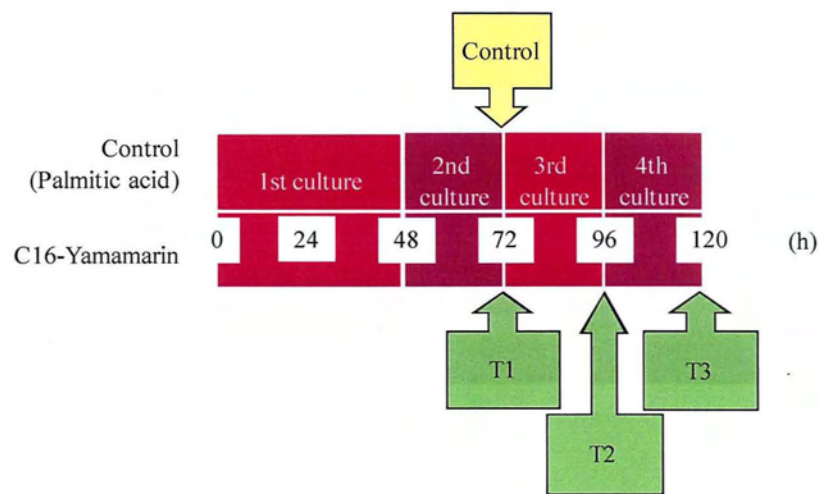


Fig. 14. Experimentally design of microarray analysis. S2 cells were exposed to the C16-Yamamarin in the 1st culture (0 - 48 h), and they were washed and cultured with palmitic acid (2nd culture: 48 - 72h). At 72h, T1 was recovered and a control sample from the control exposed to palmitic acid. In the 3rd culture, they were exposed to the C16-Yamamarin (72 - 96 h) and T2 were collected after this culture. In the 4th culture, cells were growth with palmitic acid (96 - 120 h) and T3 were recovered.

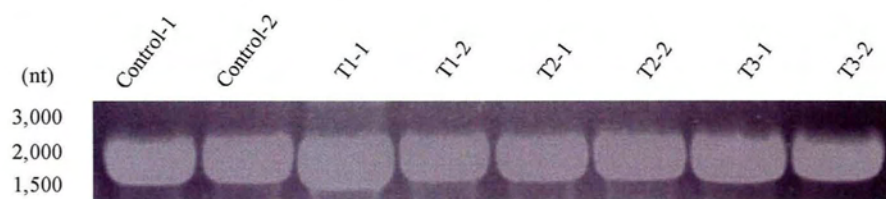


Fig. 15. Isolation of total-RNA from proliferation and arresting phase of S2 cells for microarray analysis. S2 cells were exposed to the C16-Yamamarin in the 1st culture (0 - 48 h), and they were washed and cultured with palmitic acid (2nd culture: 48 - 72h). At 72h, T1 were recovered and a control sample from the control exposed to palmitic acid. In the 3rd culture, they were exposed to the C16-Yamamarin (72 - 96 h) and T2 were collected after this culture. In the 4th culture, cells were growth with palmitic acid (96 - 120 h) and T3 were recovered. RNA were extracted from recovered cells and separated by electrophoresis on 1 % agarose-MOPS gels.

#### 4. フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

C16-Yamamarin による細胞増殖抑制において、細胞周期に関係する経路で遺伝子レベルにおける発現低下をマイクロアレイ解析により確認した。このため、C16-Yamamarin により停止している Schneider S2 細胞の細胞周期を特定することを目的として、フローサイトメトリーによる解析をおこなった。細胞培養条件は前述の Schneider S2 細胞の培養と同様に 27°C、全暗条件で FBS および抗生物質を含む Schneider Insect Medium により培養した。フラスコ (75 cm<sup>2</sup>, BD Falcon) に  $5 \times 10^4$  cells/mL に調整した培地を 10 mL ずつ、24 h 同条件で前培養した。培養したフラスコに 12.5  $\mu$ M と 25  $\mu$ M の C16-Yamamarin、およびコントロール区として同濃度のパルミチン酸を添加し、48 および 96 h 培養し、フラスコから細胞を遠心 (1,000g, 5 min) により回収、PBS (-) で洗浄し、計測した後に 70% 冷エタノールで一昼夜固定した。

固定した細胞を 100  $\mu$ g/mL RNase A を含む PBS (-) で懸濁し、37 °C で 1 h インキュベートした後に、100  $\mu$ g/mL の Propidium Iodide (PI) を添加して FACScan (Becton Dickinson) の 488 nm におけるアルゴンレーザーを用いて 10,000 個の

細胞含有 DNA 量のデータを測定し、CellFIT program で解析することで G0/G1 期、S 期、G2/M 期のそれぞれの細胞周期を特定した。

#### 5. ミトコンドリアおよび細胞膜透過処理細胞による解析

細胞小器官であるミトコンドリアは、真核生物で ATP 合成やプログラム細胞死 (PCD) の中核を担っている (Hand and Menze, 2008)。電子伝達系や付随する ATP 合成はミトコンドリア内膜で引き起こされる。複合体 II での反応によりコハク酸を消費してフマル酸を産生し、複合体 IV での反応により  $O_2$  を消費して  $H_2O$  を産生し、これらの結果により複合体 V で Pi および ADP から ATP を合成する (Fig. 16)。このため、コハク酸による酸素消費を指標としたミトコンドリア活性の測定が可能である (Piva and McEvoy-Bowe, 1998)。

##### 1) ミトコンドリアの回収

ミトコンドリアの回収は Piva and McEvoy-Bowe (1998) の方法を改変して

おこなった。フラスコ (175 cm<sup>2</sup>, BD Falcon) で培養した対数増殖期の Schneider S2 細胞 1×10<sup>9</sup> 個を遠心 (1,000g, 5 min) により回収および PBS (-) で洗浄し、4°C で冷蔵したダウンス型およびポッター型ホモジナイザーと 1 mM の EGTA を含む H-medium (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 0.5% BSA, 5 mM K-Hepes, pH7.2) を用い、細胞を氷冷中で摩砕した。トリパンブルー染色により全体の 60% 程度の細胞が染色されるまでホモジナイズを続け、核などを除去するために 800g、15 min の遠心をおこなった。遠心後、上清を回収し、再び沈殿を摩砕、遠心により上清を回収する工程を 4 回繰り返した。回収した上清は 1.5 mL 容のチューブに移して 10,000g、30 min の遠心をおこない、沈殿をミトコンドリア画分とした。回収したミトコンドリア画分のタンパク質は Bradford 法 (1976) を用い定量した。

## 2) 細胞膜透過化処理細胞の調整

細胞膜透過化処理細胞の調整は Hofhaus ら (1996) および Hakkaart ら (2006) の方法を改変しておこなった。フラスコ (175 cm<sup>2</sup>, BD Falcon) で培養した対

数増殖期の Schneider S2 細胞を遠心により回収および PBS (-) で洗浄し、PBS (-) に置換した後に細胞膜透過化処理剤のジギトニンを添加して約 5 分間常温で放置した後、トリパンブルー染色で全ての細胞が染色されることを確認し、PBS (-) で洗浄および調整したものを細胞膜透過化処理細胞とした。

### 3) 酸素消費量抑制実験

回収したミトコンドリアおよび細胞膜透過化処理細胞での酸素消費量活性の測定は Piva and McEvoy-Bowe (1998) の方法に準じた。酸素消費量はクラークタイプのキューベット電極 (Oxy1, Hansatech Instrument Inc) を用い、溶存酸素量を測定することで算出した。ミトコンドリアおよび細胞膜透過化処理細胞を検定用培地 (130 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM MOPS-NaOH, pH 7.2) に添加し、基質として 5 mM のコハク酸を使用した。時間ごとに溶存酸素量を測定して傾きを算出し、呼吸速度とした。また可逆性試験として試料を添加して呼吸速度を低下させた細胞膜透過化処理細胞を 1,000g、5 min の遠心により回収し、5 mM のコハク酸を基質として添加した後の酸素消費速度を測定した。

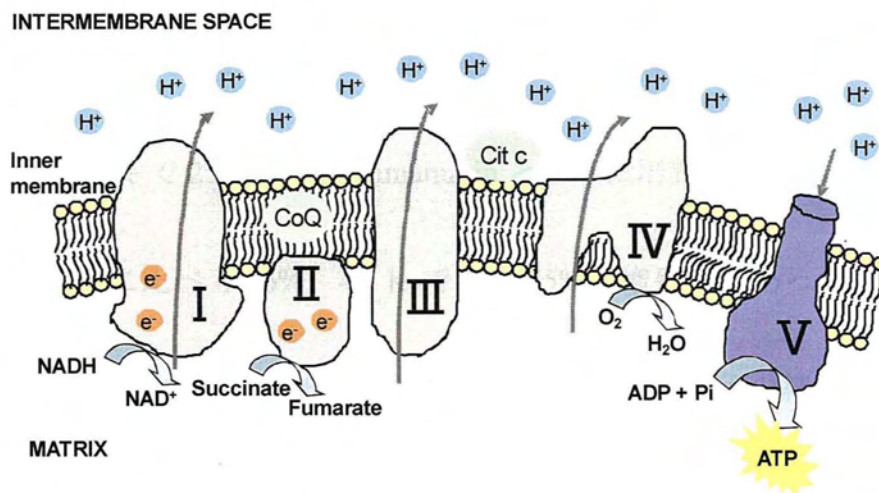


Fig. 16. The model of mitochondrial oxidative phosphorylation pathway. Oxygenation of the electron transport chain and ATP synthesis are achieved in the inner membrane of mitochondrion.

## 結 果

### 1. C16-Yamamarin によるラット肝がん細胞の可逆的増殖抑制効果

C16-Yamamarin によるラット肝がん細胞 (dRLh84) での可逆的な増殖抑制活性の検証を MTT 法 (Fig. 17A) と顕微鏡観察 (Fig. 17B) によりおこなった。その結果、1st culture で 25  $\mu$ M C16-Yamamarin とともに培養した 24 h 培養の結果、コントロール区に比べ 9.56%、48 h では 4.45%の増殖率であったのに対し、C16-Yamamarin を除去して 24 h 培養した 72 h の 2nd culture 後の細胞では 19.93% まで回復し、その後、再び C16-Yamamarin を添加して培養した 3rd culture 後の細胞では 5.12%、そこから再び C16-Yamamarin を除去した 4th culture 後の細胞では 53.76%まで回復し、C16-Yamamarin は dRLh84 の細胞増殖に対し可逆的な細胞増殖抑制活性を示すことを確認した。



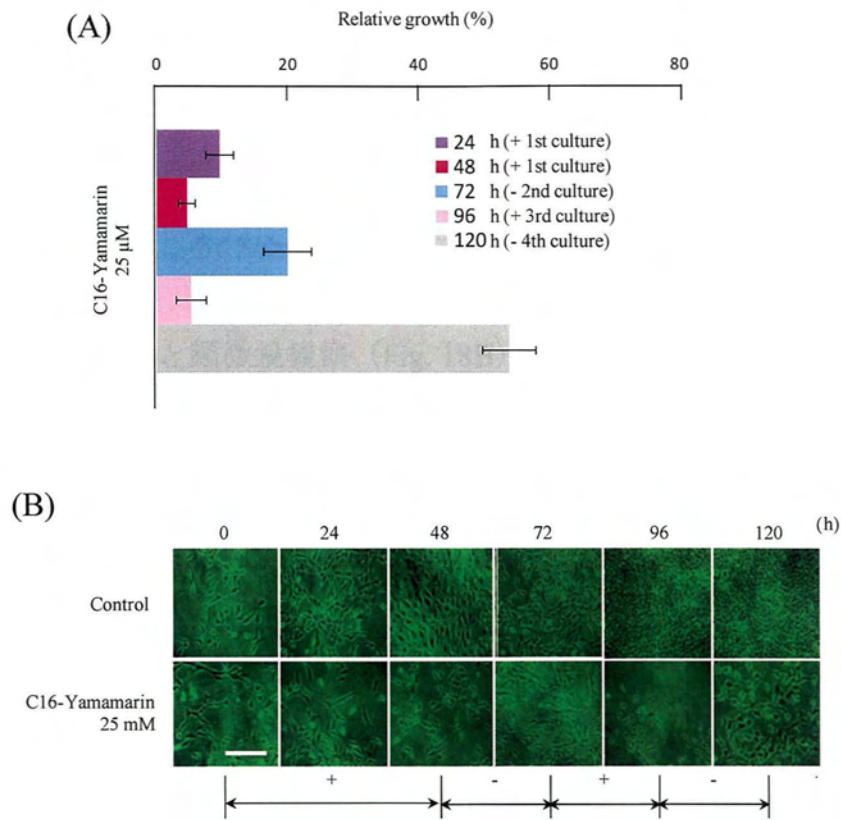


Fig. 17. Reversible arrest of cell proliferation and phase-contrast micrographs of dRLh84 cells treated with C16-Yamamarin. (A) Cell proliferation was assessed with the MTT assay and the growth of culture treated with 25  $\mu$ M C16-Yamamarin was experimented in % of the cell counts in the control culture that was treated with the solvent (0.5% DMSO) alone (abscissa). The assay culture (each bar) was exposed to C16-Yamamarin for 24 (violet bar) to 48 h (red bar) (marked as +1st culture in inset) and then for 24 h (light blue bar) to the control medium (marked as -2nd culture, total consecutive incubation of 72 h). In 24 h (pink bar) of the 3rd-consecutive culture (marked as +3rd culture, total consecutive incubation of 96 h) the cells were treated again with C16-Yamamarin and afterwards they were grown in control medium for alone 24 h (gray bar) (marked as -4th culture, total consecutive incubation of 120 h). Result were expressed as means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. (B) Phase-contrast micrographics of dRLh84 cells grown alternatively in either 0.5%DMSO (control, upper row) or C16-Yamamarin (C16-Yamamarin 25  $\mu$ M, bottom row) applied in the solvent. Incubation time (h) is shown upon each panel and the presence (+) and absence (-) of C16-Yamamarin below each panel. Initial cell density was  $5 \times 10^4$  /mL. Scale bar = 200  $\mu$ m.

## 2. C16-Yamamarin による昆虫培養細胞の可逆的増殖抑制効果

C16-Yamamarin による Schneider S2 での可逆的な増殖抑制活性の検証を WST-1 法 (Fig. 18A) と顕微鏡観察 (Fig. 18B) によりおこなった。

その結果、1st culture で 12.5  $\mu$ M C16-Yamamarin とともに培養し 24 h 後、コントロール区に比べ 59.89%、48 h では 51.72%の増殖率であったのに対し、C16-Yamamarin を除去して 24 h 培養した 72 h の 2nd culture 後の細胞では 73.76%まで回復し、その後、再び C16-Yamamarin を添加して培養した 3rd culture 後の細胞では 55.70%、そこから再び C16-Yamamarin を除去した 4th culture 後の細胞では 84.52%まで回復し、C16-Yamamarin は dRLh84 の細胞増殖に対し可逆的な細胞増殖抑制活性を示すことを確認した。

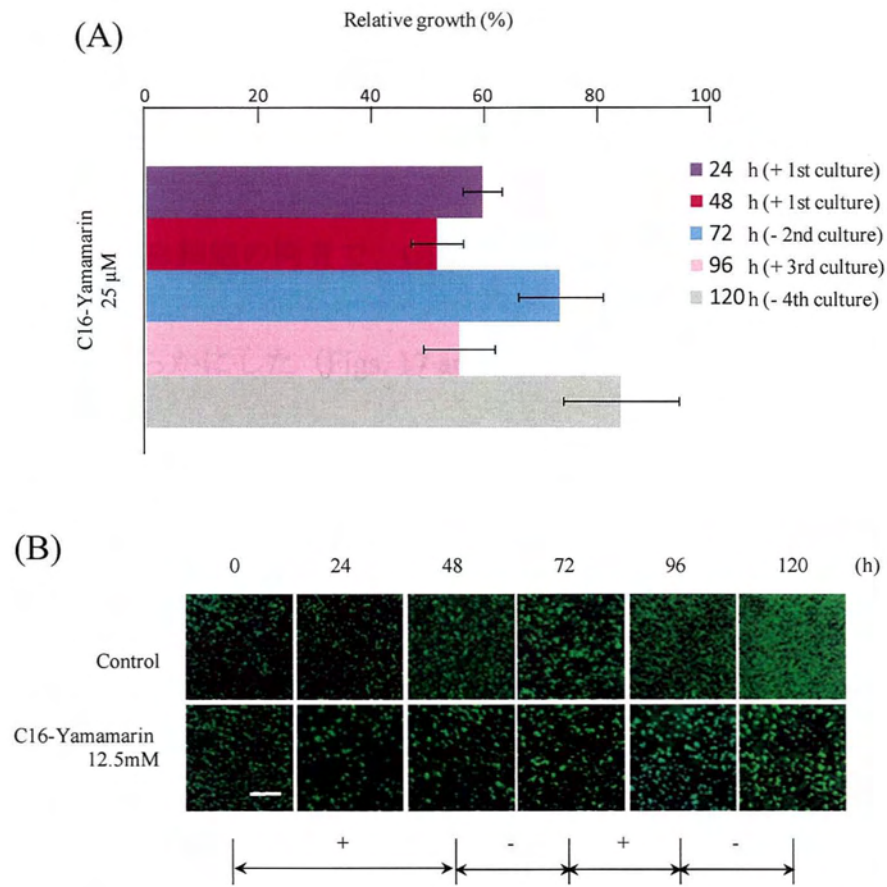


Fig. 18. Reversible arrest of cell proliferation and phase-contrast micrographs of Schneider S2 cells treated with C16-Yamamarin. (A) Cell proliferation was assessed with the WST-1 assay and the growth of culture treated with 12.5  $\mu$ M C16-Yamamarin was experimented in % of the cell counts in the control culture that was treated with the same concentration of palmitic acid (C16) (abscissa). The assay culture (each bar) was exposed to C16-Yamamarin for 24 (violet bar) to 48 h (red bar) (marked as +1st culture in inset) and then for 24 h (light blue bar) to the control medium (marked as -2nd culture, total consecutive incubation of 72 h). In 24 h (pink bar) of the 3rd-consecutive culture (marked as +3rd culture, total consecutive incubation of 96 h) the cells were treated again with C16-Yamamarin and afterwards they were grown in control medium for alone 24 h (gray bar) (marked as -4th culture, total consecutive incubation of 120 h). Result were expressed as means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. (B) Phase-contrast micrographics of S2 cells grown alternatively in either same concentration of palmitic acid (control, upper row) or C16-Yamamarin (C16-Yamamarin 25  $\mu$ M, bottom row) applied in the solvent. Incubation time (h) is shown upon each panel and the presence (+) and absence (-) of C16-Yamamarin below each panel. Initial cell density was  $5 \times 10^4$  /mL. Scale bar = 200  $\mu$ m.

### 3. C16-Yamamarin による RNA 発現レベルでの変動

ほ乳類細胞と昆虫細胞の両者で、C16-Yamamarin による細胞増殖抑制が可逆的であることを明らかにした (Figs. 17 and 18)。この増殖抑制活性がどのようなメカニズムによるか解析する手段として、*Drosophila* Schneider S2 細胞によるマイクロアレイ解析をおこなった。前述の可逆性試験と同様に C16-Yamamarin との共培養と C16-Yamamarin の代わりにパルミチン酸 (C16) との共培養を交互におこない (Fig. 14)、Control、T1、T2、T3 のそれぞれの細胞から total-RNA を回収した (Fig. 15)。

回収した total-RNA は GeneChip Expression Array による解析を㈱タカラバイオに依頼した。得られたデータは㈱東北化学の遺伝子発現データ解析サービス『MOGERA-GE』によりパスウェイデータとし (Fig. 19; Table 1; Supp. Tables 1-6)、T1 から T3 における主要な各経路についてはヒートマップで示した (Figs. 20 and 21)。

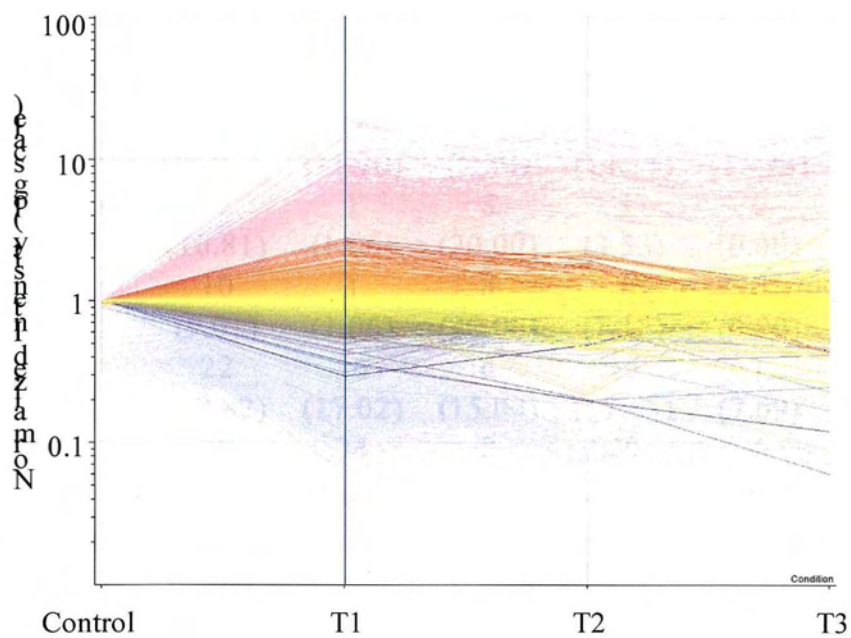


Fig. 19. Parallel coordinates display of gene expression profiles across time points. Graph of expression for all genes showing normalized values. Each gene is represented as a line with discontinuities resulting from missing data. The lines are colored according to the quantitative change in expression in T1. X-axes correspond to a successive time point. Y-axes denote the normalized values at each time point for each gene.

Table 1. Functional categories of differentially expressed genes

Category	T1/Control 1.5 fold QC sig		T2/Control 1.5 fold QC sig		T3/Control 1.5 fold QC sig	
	up	down	up	down	up	down
cell cycle	2 (1.80)	5 (5.32)	0 (0.00)	2 (2.35)	0 (0.00)	3 (2.59)
DNA replication	1 (0.90)	1 (1.06)	0 (0.00)	1 (1.18)	0 (0.00)	1 (0.86)
cell death	6 (5.41)	3 (3.19)	2 (5.00)	5 (5.88)	0 (0.00)	7 (6.03)
signal transduction	11 (9.91)	11 (11.70)	3 (7.50)	12 (14.12)	2 (15.38)	6 (5.17)
response to stress	12 (10.81)	1 (1.06)	8 (20.00)	3 (3.53)	0 (0.00)	7 (6.03)
immune response	10 (9.01)	1 (1.06)	8 (20.00)	1 (1.18)	0 (0.00)	1 (0.86)
development	22 (19.82)	16 (17.02)	6 (15.00)	15 (17.65)	1 (7.69)	18 (15.52)
metabolism	30 (27.03)	34 (36.17)	8 (20.00)	29 (34.12)	6 (46.15)	47 (40.52)
mitochondrion	2 (1.80)	6 (6.38)	0 (0.00)	1 (1.18)	0 (0.00)	8 (6.90)
transcription	9 (8.11)	6 (6.38)	3 (7.50)	5 (5.88)	1 (7.69)	7 (6.03)
translation	1 (0.90)	1 (1.06)	1 (2.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	3 (2.59)
transport	5 (4.50)	9 (9.57)	1 (2.50)	11 (12.94)	3 (23.08)	8 (6.90)
Total	111	94	40	85	13	116

The number of genes assigned to a functional category and their prevalence (%) with respect to the total number of differentially expressed genes in T1, T2 and T3 were shown.

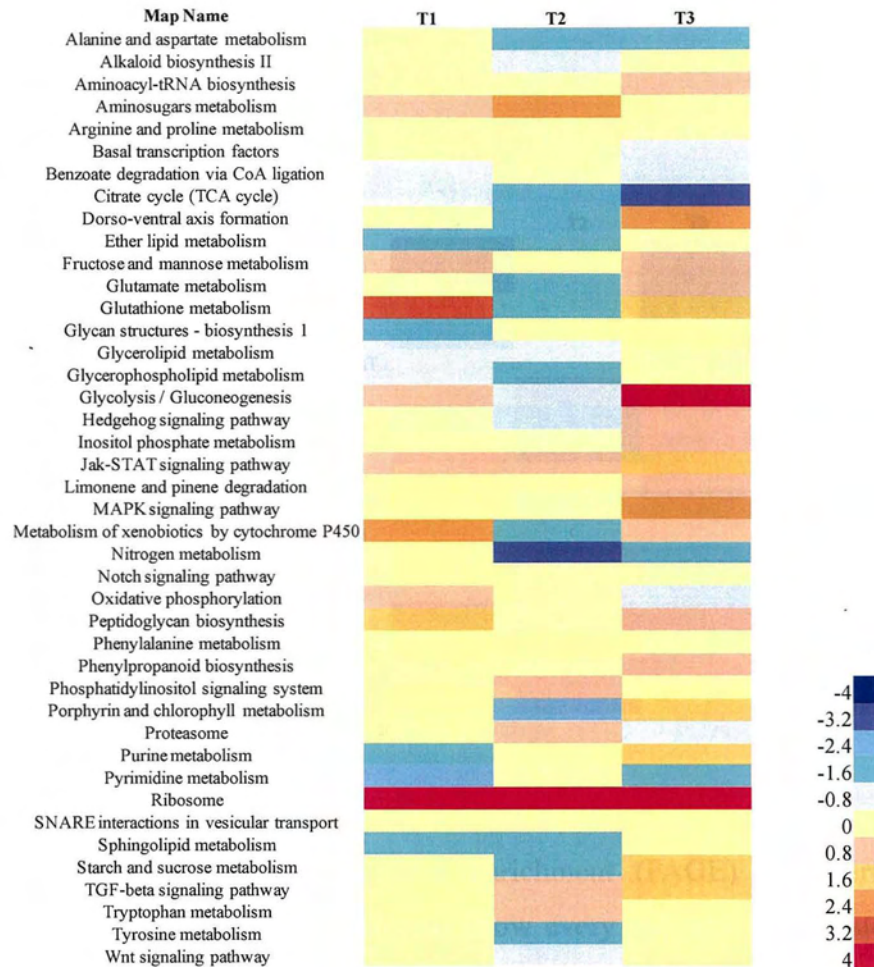


Fig. 20. Parametric analysis of gene-set enrichment (PAGE) was performed on microarray data from T1, T2 and T3. Columns show every pathway upregulated (red) or downregulated (blue).

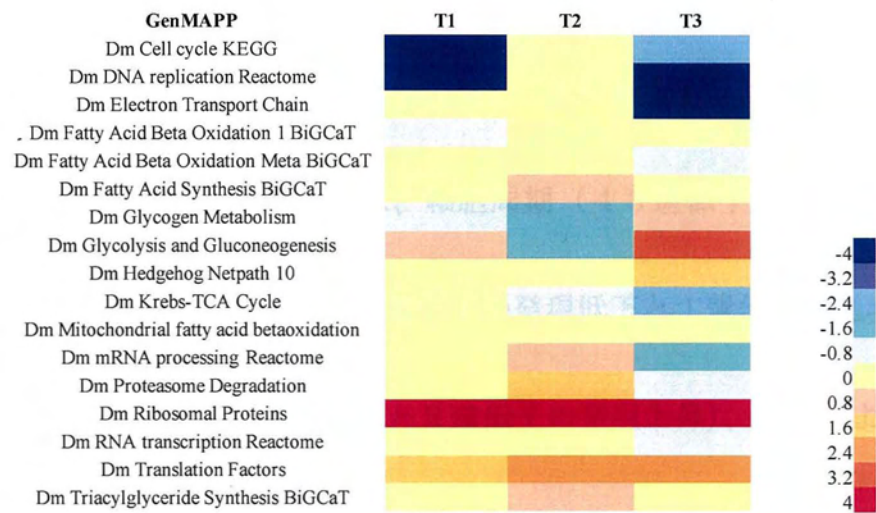


Fig. 21. Parametric analysis of gene-set enrichment (PAGE) was performed on microarray data from T1 and T3. Columns show every pathway upregulated (red) or downregulated (blue).



これらの結果から、C16-Yamamarin の添加により発現の低下した遺伝子が最も多かった T3 phase に着目した (Table 1)。T3 phase は C16-Yamamarin による増殖停止と除去による増殖再開を2度ずつ経た細胞より抽出した total-RNA のマイクロアレイによる解析結果である。Fig. 21 のヒートマップ中 T3 phase において変動した遺伝子群で、コントロールに対して 1.6 以上もしくは -1.6 以下の変動を示した遺伝子が関連する経路は、細胞周期 (43 遺伝子の発現低下と 3 遺伝子の発現上昇)、DNA 複製 (34 遺伝子の発現低下と 1 遺伝子の発現上昇)、電子伝達系 (44 遺伝子の発現低下と 2 遺伝子の発現上昇)、解糖および糖新生系 (12 遺伝子の発現低下と 12 遺伝子の発現上昇)、TCA 回路(27 遺伝子の発現低下)、mRNA プロセッシング (76 遺伝子の発現低下と 14 遺伝子の発現上昇)、リボゾームタンパク質 (57 遺伝子の発現上昇と 12 遺伝子の発現低下)、翻訳因子 (20 遺伝子の発現低下と 16 遺伝子の発現上昇) の8個であり (Table 2)、特に変動が大きかった遺伝子は 1) minichromosome maintenance 7 (*Mcm7*)、2) *latheo (lat)*、3) DNA replication primer (*DNAprim*)、4) ecdysone-inducible gene L3 (*ImpL3*)、5) pyruvate dehydrogenase kinase (*Pdk*)、6) bruno-2; (*bru-2*)、7) B52 (*B52*)、8) ribosomal protein L28 (*RpL28*)、9) human PERK kinase homolog (*PEK*)、10)

suppressor of variegation 3-9 (*Su(var)3-9*)であった (Table 3)。このようにミトコンドリアやリボソーム関連の代謝や細胞周期に関連する遺伝子などで顕著な変動傾向が認められた。

なお Supporting table 6 に示したように、経路として抑制傾向を示したものは細胞周期、DNA 複製、電子伝達系、クレブス回路、mRNA プロセッシングに関連する遺伝子群であり、細胞周期関連での抑制は *Mcm7* や *lat* などの 4 3 遺伝子におよんだのに対し、発現量の上昇傾向を示した遺伝子は 3 個のみであった。同様に DNA 複製関連では発現抑制傾向を示した遺伝子群は *DNAprim* などの 3 4 遺伝子ある一方、上昇傾向を示した遺伝子は 1 個のみであり、また電子伝達系では抑制は 4 4 遺伝子に対し 2 遺伝子でのみ発現量の増加、さらにクレブス回路では 2 7 遺伝子全てが抑制傾向を示し、mRNA プロセッシング関連では抑制は *B52* など 7 6 遺伝子でおきたのに対し上昇は *bru-2* など 1 4 遺伝子であった。その一方で、経路としての発現の上昇傾向を示したものは解糖および糖新生系、ヘッジホッグシグナル、リボソームタンパク質、翻訳因子に関連する遺伝子群であった。また解糖および糖新生系の関連遺伝子群で発現上昇した遺伝子は *Impl3* をはじめ 1 2 遺伝子あり、抑制は 1 2 遺伝子であった。ヘッジホッグシグ

ナル関連での上昇は6に対し、抑制も6遺伝子、リボソームタンパク質経路では *RpL28* など57個の上昇遺伝子に対し、抑制12遺伝子、翻訳因子関連では *PKE* などの上昇が16遺伝子あり、抑制は *Su(var)3-9* など20遺伝子であった。

Table 2. Functional categories of differentially expressed on T3 phase

GenMAPP	T3/Control			Z score
	number of genes	p-value	fold change average	
cell cycle KEGG	46	0.003	-0.250	-3.003
DNA replication reactome	35	<0.001	-0.328	-4.554
electron transport chain	46	<0.001	-0.286	-4.022
glycolysis and gluconeogenesis	24	0.001	0.021	3.379
Hedgehog Netpath 10	12	0.07	-0.02	1.84
Krebs-TCA cycle	27	0.005	-0.274	-2.827
mRNA processing reactome	90	0.104	-0.185	-1.628
ribosomal proteins	69	<0.001	0.050	6.748
translation factors	36	0.009	-0.040	2.602

The number of genes assigned to a functional category and their prevalence (%) with respect to the total number of genes differentially expressed in T3 phase are shown.

Table 3. Functional categories of selected genes differentially expressed in T3 phase

GenMAPP	gene symbol	fold change (T3/Control)
Cell cycle KEGG	<i>Mcm7</i> (Minichromosome maintenance 7)	0.652
	<i>lat</i> (latheo)	0.618
DNA replication reactome	<i>Mcm7</i> (Minichromosome maintenance 7)	0.652
	<i>lat</i> (latheo)	0.618
	<i>DNAprim</i> (DNA replication primer)	0.614
glycolysis and gluconeogenesis	<i>ImpL3</i> (Ecdysone-inducible gene L3)	3.322
Krebs-TCA cycle	<i>Pdk</i> (Pyruvate dehydrogenase kinase)	0.54
mRNA processing reactome	<i>bru-2</i> (bruno-2; translational regulator in <i>Drosophila melanogaster</i> )	1.617
	<i>B52</i> (human <i>SRp55</i> homolog)	0.593
	<i>B52</i> (human <i>SRp55</i> homolog)	0.571
ribosomal proteins	<i>RpL28</i> (Ribosomal protein L28)	1.624
translation factors	<i>PEK</i> (human <i>PERK</i> kinase homolog)	1.321
	<i>Su(var)3-9</i> (Suppressor of variegation 3-9)	0.662

A list of differentially expressed genes discussed in 1.5 fold changes is shown.

#### 4. C16-Yamamarin による細胞周期の変動

マイクロアレイ解析の結果、ショウジョウバエの細胞周期に関連する複製前複合体 (pre-RC) 構成タンパク質 MCM7 をコードする遺伝子 (*Mcm7*) や複製開始点認識複合体 (ORC) の6種のサブユニットのひとつ *Orc3* をコードする遺伝子 (*latheo*) などで、RNA レベルでの発現の低下を確認した (Fig. 21; Table 3; Supp. Table 6)。そこで C16-Yamamarin による Schneider S2 細胞増殖停止時の細胞周期を特定することで、Yamamarin によるラット肝がん細胞 (dRLh84) 増殖停止時の細胞周期 (Yang *et al.*, 2004) やマイクロアレイでの結果と比較することができる。

S2 細胞を各濃度の C16-Yamamarin やパルミチン酸とともに培養し、各培養細胞の細胞周期を測定し、G0/G1 期 (Fig. 22B)、S 期 (Fig. 22C)、G2/M 期 (Fig. 22D) の割合を算出した。その結果、C16-Yamamarin により細胞増殖が抑制されるのに対し (Fig. 22A)、特定の細胞周期での停止は確認できなかったため、どの細胞周期でも停止していることが示唆された (Fig. 22B、C、D)。

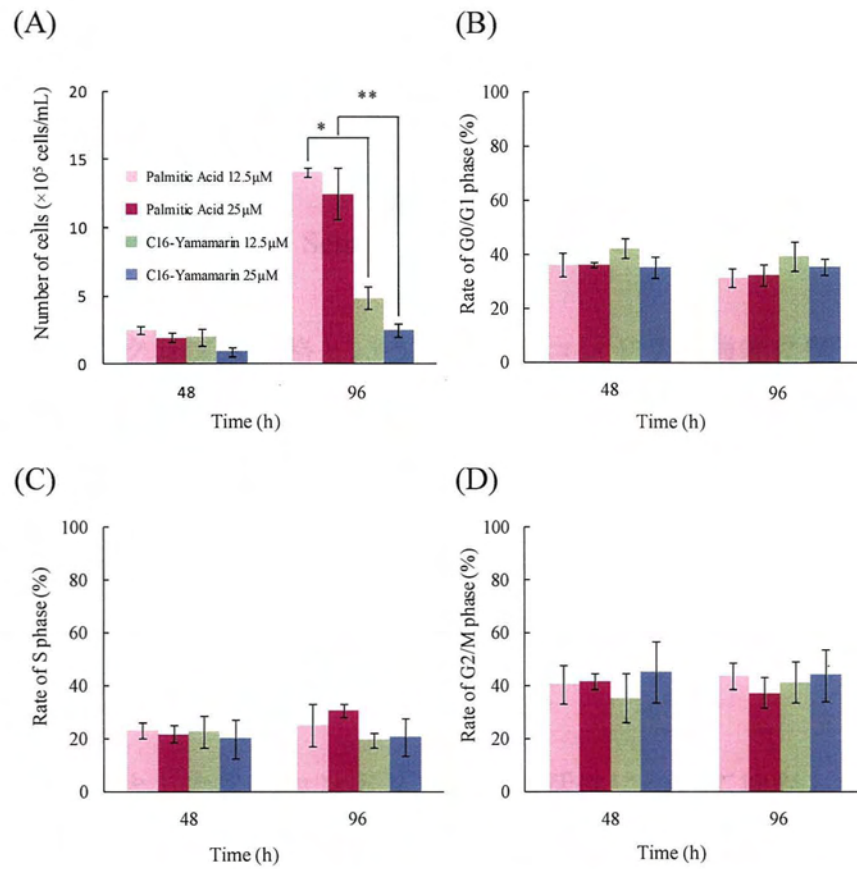


Fig. 22. Cell cycle analysis of Schneider S2 cells treated with C16-Yamamarin. (A) S2 cell were treated with 25 and 12.5 μM of C16-Yamamarin and palmitic acid (control) for 48 and 96 h. These cells were collected, counted and fixed with ice-cold 70% ethanol overnight. The cells were then suspended in PBS containing and 100 μg/mL RNase A. After 1 h incubation at 37°C, added 100 μg/mL propidium iodide and analysed with a FACScan flow cytometer equipped with a single 488nm argon laser. Data on 10,000 cells were analyzed using Modifit LT software. The percentage (%) of cells in G0/G1 (B) S (C) and G2/M (D) phases were calculated from 3 experiments.

## 5. C16-Yamamarin によるミトコンドリアレベルの酸素消費活性の可逆的抑制効果

マイクロアレイ解析の結果、Schneider S2 細胞において C16-Yamamarin 添加により電子伝達系やクレブス回路といった、ミトコンドリア機能に関連する経路で RNA レベルでの発現低下を確認した (Fig. 21; Supp. Table 6)。そのために、C16-Yamamarin はミトコンドリアにまで影響を及ぼしていると考えられ、ミトコンドリアでの解析をおこなった。

コハク酸を基質としたミトコンドリア呼吸の活性について検討した結果、パルミチン酸と比べて C16-Yamamarin の濃度依存な呼吸抑制活性を確認した (Fig. 23)。またコハク酸と膜溶解剤ジギトニンによる細胞膜透過化処理 S2 細胞での呼吸も C16-Yamamarin により濃度依存的に抑制され、抽出ミトコンドリアレベルでの作用と同様の活性を示した (Fig. 24)。

さらに、100  $\mu$ M C16-Yamamarin により有意に呼吸抑制した細胞膜透過化処理 S2 細胞 (Fig. 25A) を遠心し PBS (-) で洗浄後、コハク酸を基質とした呼吸活性を測定したところ、コントロール区との比較において有意差がなくなり、



C16-Yamamarin により抑制された呼吸がコントロール区と同等のレベルにまで回復しており、このことは C16-Yamamarin によるミトコンドリアレベルでの呼吸抑制作用が可逆的であることを示している (Fig. 25B)。

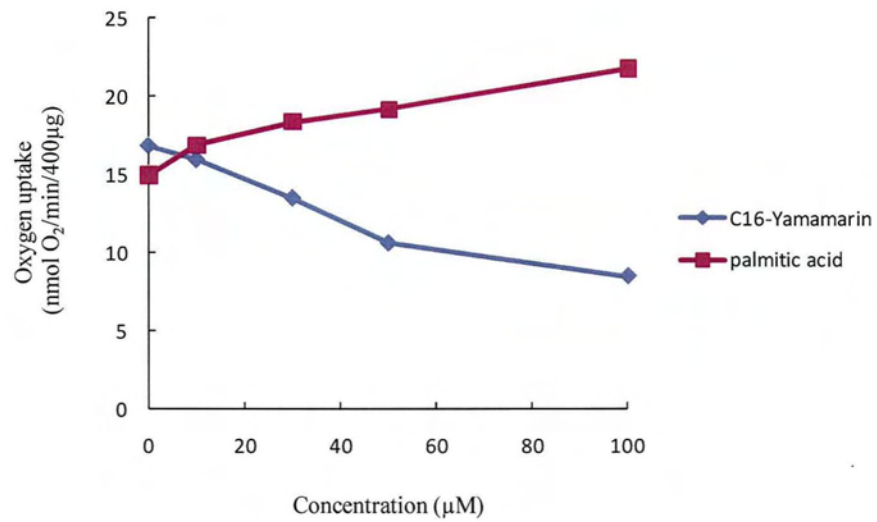


Fig. 23. Inhibitory effect of C16-Yamamarin on oxygen consumption in mitochondria isolated from S2 cells. Relationship between mitochondrial oxygen consumption and concentrations of C16-Yamamarin or palmitic acid was investigated.

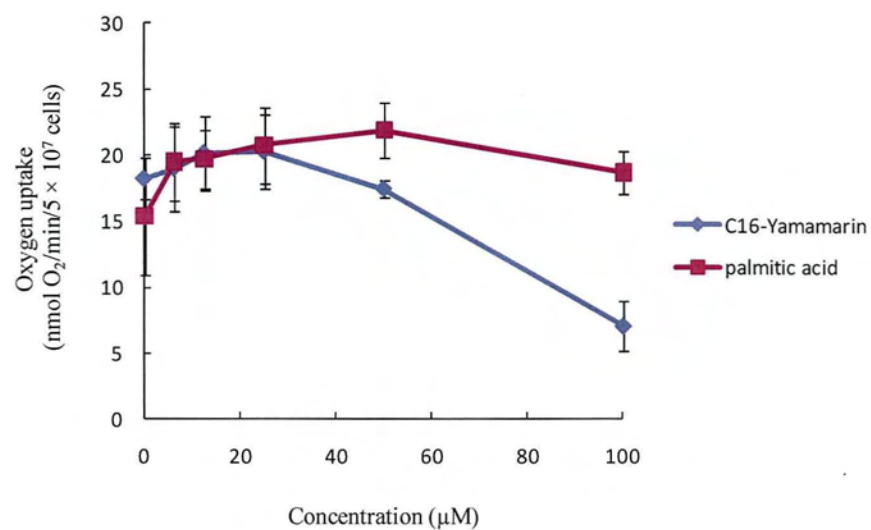


Fig. 24. Inhibitory effect of C16-Yamamarin on oxygen consumption in digitonin-permeabilized cells. Relationship between mitochondrial oxygen consumption and concentrations of C16-Yamamarin or palmitic acid was investigated.

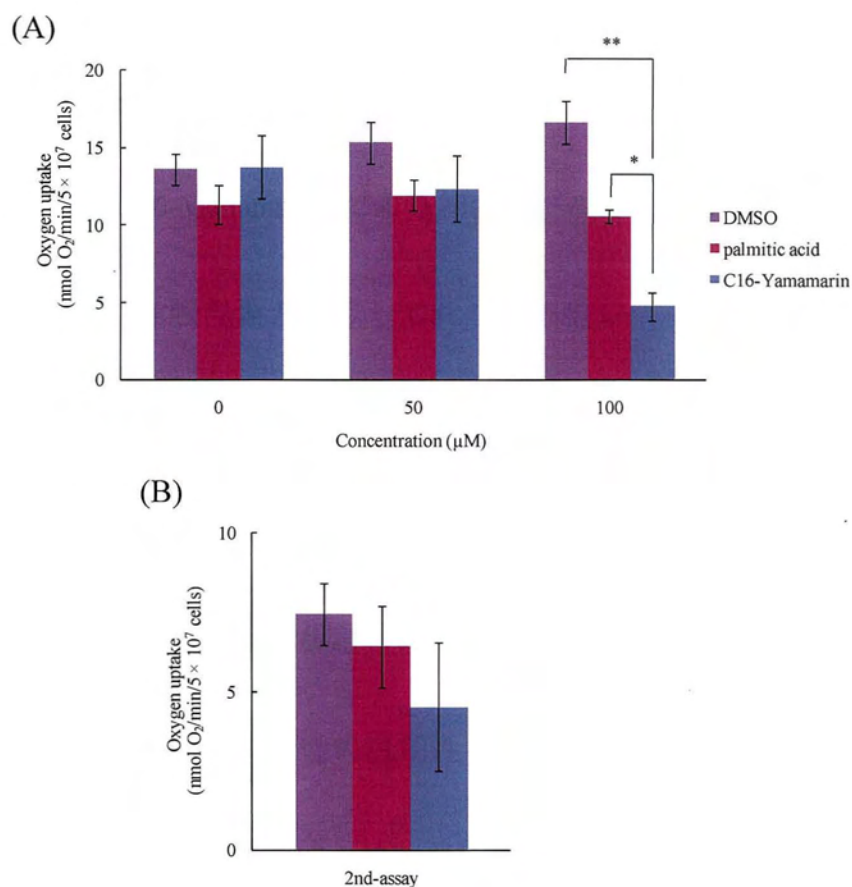


Fig. 25. Oxygen uptake during titration of samples in permeabilized S2 cells with digitonin. (A) When 100  $\mu\text{M}$  C16-Yammarin reduced oxygen consumption to half of the control value, (B) the cells were collected and suspended in a fresh medium. All data are means  $\pm$  SE of 3 independent samples. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.001$ ; Student's t-test.

## 考 察

本章ではラット肝がん細胞 (dRLh84) およびショウジョウバエ胚子由来の S2 細胞の両者で C16-Yamamarin による可逆的な細胞増殖制御作用を確認することができた。この C16-Yamamarin による細胞レベルでの増殖停止と再開という反応が個体レベルの休眠現象と酷似しており、細胞レベルでの休眠化の再現であるといえる (Yang *et al.*, 2007)。しかも動物界において、ほ乳類 (脊椎動物門) と昆虫 (節足動物門) という、分類学上の距離が大きく離れる生物に由来する 2 種類の細胞系統で、同様の休眠類似現象を確認できた。この C16-Yamamarin による可逆的細胞増殖制御活性の汎用性を理解するために植物培養細胞や微生物など、さらに広範な生物種での検証が期待される。

マウスなどほ乳類は受精後、細胞分裂をおこないながら胞胚を形成し、子宮内膜上皮に到達して着床する。しかし、一部のほ乳類では環境要因 (気候や栄養状態) が不適切であると着床が遅延することがある。その際、胚は着床せずに発生が停止し (Dormancy)、環境要因が回復すると胚発生が再開し、着床する。

この Dormancy では細胞の分化発生能に影響することなく細胞分裂を休止して

いる（浜谷ら, 2006）。マウスにおける胞胚休眠（Dormancy）と活動期の遺伝子発現を比較した研究（Hamatani *et al.*, 2004）および本研究結果を比較してみると、マウスの休眠中の胞胚では細胞周期に関連する *Mcm5*、本研究で使用したショウジョウバエの培養細胞では *Mcm7*、炭水化物代謝に関連する遺伝子でマウスでは *Eno1*、本研究では *Eno* がそれぞれ発現の低下を示した（Supp. Table 6）。このように、マウスの休眠と C16-Yamamarin によるショウジョウバエ培養細胞の可逆的細胞増殖抑制による細胞周期や代謝に関する遺伝子発現の挙動は類似している。C16-Yamamarin による可逆的な細胞増殖抑制は、マウスの休眠と同様に DNA 複製や転写といった細胞周期や、エネルギー代謝のような多細胞生物に共通する機構が RNA レベルで抑制されていると考えられる。すなわち、C16-Yamamarin による細胞増殖抑制時とマウスの休眠時に down-regulation している遺伝子でも同様な傾向があることを示唆している。

カイコの場合には休眠中の胚子は G2/M 期（Nakagaki *et al.*, 1991）で、ニクバエの一種である *Sarcophaga crassipalpis* の休眠時の脳（Tammariello and Denlinger, 1998）や、マウスやラットなどでは休眠中に G0/G1 期で休止する（Renfree and Shaw, 2000）ことが知られている。またラット肝がん細胞（dRLh84）での

Yamamarin の細胞増殖抑制活性では、細胞周期の G0/G1 期で停止することが報告されている (Yang *et al.*, 2004)。本研究ではマイクロアレイの結果より、細胞周期に関連する遺伝子群で発現の低下を確認した (Supp. Table 6)。そこでフローサイトメトリーを用いた細胞周期の検証をおこなったところ、細胞の増殖が抑制されているにもかかわらず特定の細胞周期での停止は確認できなかったことから、どの細胞周期でも停止していることが示唆された。すなわち RNA レベルでの細胞周期関連遺伝子群の発現の低下を、細胞周期全体の停止として理解した。本研究で使用した S2 細胞の細胞周期が特定の周期で停止していなかった理由として、カイコ (G2/M 期) とニクバエやラットなど (G0/G1 期) のように、休眠中に停止する細胞周期が生物種により異なる事が報告されており (Lopes *et al.*, 2004)、また一方で、Yamamarin と C16-Yamamarin による分子構造の違いによる可能性もある。これらの検証のためにも、今後の更なる解析が期待される。

休眠現象とは対照的な老化現象では、細胞内エネルギー代謝の顕著な変換が起こることが知られている (Roberts and Rosenberg, 2006)。また細胞レベルでの生存には、核小体で合成されるリボソーム合成やそこで生産されるタンパク質の合成で消費されるエネルギーと、ミトコンドリアのエネルギー生産小器官と

しての ATP レベルでのバランス制御が重要となっている (Murayama *et al.*, 2008)。

その一方で、休眠中の個体は外部からのエネルギーが供給されないことによる一種の栄養欠乏状態であり、アルテミア (*Artemia franciscana*) ではミトコンドリアレベルで細胞死を防ぐ手段が構築されている (Hand and Menze, 2008)。本研究では C16-Yamamarin によるミトコンドリアレベルでの呼吸抑制活性とその可逆性を明らかにした。ミトコンドリアはエネルギー生産だけでなく、チトクローム *c* 放出などにより細胞死も制御する細胞小器官 (Hand and Menze, 2008) であり、また進化的に高度に保存され、センチュウ (*Caenorhabditis elegans*) では個体レベルで寿命を制御するプロヒビチン (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009) を保持している。このようなミトコンドリアに対して C16-Yamamarin は呼吸レベルで可逆的に抑制することから、ミトコンドリアのような細胞小器官での休眠の再現、つまり個体としての休眠の本質につながる可能性がある。以上のことから、個体レベルでの休眠によるエネルギー供給停止時の代謝低下と呼吸量の減少、および長期間の生存が、C16-Yamamarin によるミトコンドリア小器官への直接的な抑制作用の結果として理解できるかもしれない。



## 摘 要

1. C16-Yamamarin をラット肝がん細胞 (dRLh84) とショウジョウバエ胚子由来 S2 細胞に添加し、あるいは培養細胞から除去しながら、細胞増殖に与える影響を検討した。その結果、両細胞と共培養することで細胞増殖を抑制し、培養細胞から除去することで再び増殖は進行した。すなわち細胞の増殖→抑制→増殖の可逆的な反応が確認された。

2. C16-Yamamarin によるショウジョウバエ胚子由来 S2 細胞の増殖抑制に関連する down-regulation および up-regulation 遺伝子についてショウジョウバエ GeneChip Expression Array による解析をおこなった。その結果、down-regulation されたものは細胞周期、DNA 複製、電子伝達系、クレブス回路、mRNA プロセシングに関連する遺伝子群であり、up-regulation されたものは解糖および糖新生系、ヘッジホッグシグナル、リボソームタンパク質、翻訳因子に関連する遺伝子群であった。すなわち、C16-Yamamarin による細胞増殖抑制の遺伝子発現は、個体レベルの休眠化による遺伝子発現を反映していると考えられる。

3. C16-Yamamarin によるショウジョウバエ胚子由来 S2 細胞の増殖抑制と細胞周期の関連性について、フローサイトメトリーによって解析した。その結果、G0/G1 期、S 期、G2/M 期のどのステージでも停止することを明らかにした。

4. ショウジョウバエ胚子由来の S2 細胞からミトコンドリアまたはジギトニン処理による細胞膜透過化処理細胞を回収して、C16-Yamamarin による酸素消費量活性に及ぼす影響を解析した。その結果、酸素消費量活性が可逆的に抑制されることを明らかにした。

## 総合考察

動物の休眠 (Dormancy, Diapause) は、昆虫綱などの節足動物門を含めた主要な34、5門で報告されている (Hand and Menze, 2008)。このように休眠現象は動物界での普遍的な現象ではあるが、いまだに不明な点が多い。特に細胞レベルでの長期生存に関連する分子機構はほとんど知られていない。そこで本研究ではヤママユ (*Antheraea yamamai*) の休眠維持候補物質 Yamamarin のひとつの誘導体である C16-Yamamarin を使用して、細胞レベルにおける休眠様現象に類似する可逆的な細胞増殖制御活性およびそのメカニズムの解析を試みた。その結果、C16-Yamamarin による細胞レベルでの休眠化様の再現は昆虫とほ乳類による生物種の違いを超えて共通であり、これがミトコンドリアレベルでの可逆的な呼吸抑制による可能性を提案することができた。すなわち動物の休眠に伴う呼吸量の低下は、ミトコンドリアレベルにおける C16-Yamamarin のような分子実体の存在を示唆するものである。

Yamamarin は休眠中のヤママユ前幼虫体から同定され、C16-Yamamarin は細胞レベルで休眠化様状態に誘導できる分子実体である。そこで、C16-Yamamarin

のこの機能性の応用開発を、医薬品候補物質の視点から検討することにした。

臓器移植、特に肝臓などでは移植する臓器の viability がその後を左右する必要条件となっている。この viability は、肝ミトコンドリアの正常な膜電位の保持できる期間とよく一致している。また、肝臓の viability を保護するために臓器の再かん流時の障害防止が求められていたが、プロスタグランジンなどでは臨床効果は十分とはいえない状況である (山本, 2004)。このため、C16-Yamamarin の特異的な機能であるミトコンドリアレベルでの呼吸阻害の可逆的活性が、viability の高い状態でより長時間の臓器保存を可能にすると考えられる。

また Yamamarin と C16-Yamamarin の CD スペクトルや NMR など分光解析の結果より、-RG-NH<sub>2</sub> に起因する共通のランダムコイルの構造が確認されている (Kamiya *et al.*, 2010)。したがって、ヤママユ以外の昆虫を含めた他の生物種の休眠においても、Yamamarin 様の -RG-NH<sub>2</sub> 構造を有するヒトやマウスなどの脳ペプチドホルモン Vasopressin およびタンパク質が細胞増殖と呼吸の抑制制御に関与している可能性がある。ヒトやマウスなどの Vasopressin は -RG-NH<sub>2</sub> 構造をとる Arginine Vasopressin (CYFQNCPRG-NH<sub>2</sub>) であり、マウスのがん細胞を使用した実験では cyclin D1 の抑制と G0/G1 期での細胞周期の停止、また増殖の阻

害が報告されている (Schwindt *et al.*, 2003)。すなわち、Arginine Vasopressin と Yamamarin および C16-Yamamarin は、機能面でも極めて類似している。

さて、1910年代ではわが国の昆虫産業の代表的生産物である生糸の輸出額は約 50%であり、文字通り経済や産業を支えていた。しかし化学繊維の出現以降、凋落の一途をたどってきた。一方、カイコや桑を中心とする20世紀型の養蚕学や養蚕業は大きく変貌しながら、21世紀型の昆虫バイオテクノロジーの創出とその産業が生み出されようとしている。カイコは有用タンパク質遺伝子の組換え体によるトランスジェニック昆虫として、 $\alpha$ -インターフェロンをはじめとして有望な医薬品候補物質の生産のために技術革新が進んでいる。カイコの食餌植物の桑はヒトの健康を支える QOL (Quality of Life) 向上のための作物として期待されている (鈴木ら, 2006)。

カイコ同様に絹糸昆虫であるヤママユにおいても、20世紀までは絹のダイヤモンドとして高級絹織物の素材としてだけ活用されてきたが、わが国原産のこの昆虫種においても新しい学術と産業の創出が求められている。それに対応するようにヤママユのフィブロインタンパク質のパウダー化に成功した。このフィブロインタンパク質を利用して高級化粧品の開発に結びついた (鈴木ら,

2006)。またヤママユセリシタンパク質のパウダー化にも成功し、ショウジョウバエ胚子由来 S2 細胞の増殖能とマウスリンパ球細胞の増殖能がカイコセリシタンパク質よりも優れているという知見もでてきた (Cui *et al.*, 2009)。さらに、本研究で明らかになったヤママユ休眠前幼虫由来の Yamamarin 誘導体の C16-Yamamarin による細胞増殖抑制活性の普遍性と細胞小器官ミトコンドリアレベルの呼吸阻害活性の可逆性は、昆虫の休眠研究の分子実体を提案するのみならず、細胞増殖制御剤の開発 (鈴木・楊, 2007) や新しい昆虫成長制御剤 (IGR) の開発にも道を拓いていくと考えられる。本研究成果はその第 1 歩を踏み出すものと信じている。

## 引用文献

Artal-Sanz M. and Tavernarakis N. (2009) Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* **461**, 793-797.

Atay-Kadiri Z. and Benhsain N. (2005) The diapause of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1040**, 219-223.

Basu J. (2004) Protein palmitoylation and dynamic modulation of protein function. *Current Science* **87**, 212-217.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Cui X, Urita S, Imanishi S, Nagasawa T. and Suzuki K. (2009) Isolation and

characterization of a 41kDa sericin from the wild silkworm *Antheraea yamamai*. *J.*

*Insect Biotechnol. Sericol.* **78**, 11-16.

Denlinger D. L. (2008) Why study diapause? *Entomol. Res.* **38**, 1-9.

江頭伸昭、三島健一、岩崎克典、中西 博、大石了三、藤原道弘 (2009) 精神機能におけるバソプレシン受容体の役割. *日薬理誌* **134**, 3-7.

Eira M. T. S. and Caldas L. S. (2000) Seed dormancy and germination as concurrent processes. *Rev. Bras. Fisiol. Vegetal* **12**, 85-104.

Flannagan R. D, Tammariello S. P, Joplin K. H, Cakra-Ireland R. A, Yocum G. D. and

Denlinger D. L. (1998) Diapause-specific gene expression in pupae of the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 5616-5620.

Fujita K, Shimomura K, Yamamoto K, Yamashita T. and Suzuki K. (2006) A chitinase



structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 502-507.

Fujiwara Y, Shindome C, Takeda M and Shiomi K. (2006a) The roles of ERK and P38 MAPK signaling cascades on embryonic diapause initiation and termination of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 47-53.

Fujiwara Y, Tanaka Y, Iwata K, Rubio RO, Yaginuma T, Yamashita O. and Shiomi K (2006b) ERK/MAPK regulates ecdysteroid and sorbitol metabolism for embryonic diapause termination in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **52**, 569-575.

Gerish B. and Antebi A. (2004) Hormonal signals produced by DAF-9/cytochrome P450 regulate *C. elegans* dauer diapause in response to environmental cues. *Development* **131**, 1765-1776.

Goto M, Li Y. and Honma T. (2001) Changes of diapause and cold hardiness in the Shonai ecotype larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) during overwintering. *Appl. Entomol. Zool.* **36**, 323-328.

Gupta S, Krasnoff S. B, Underwood N. L, Renwick J. A. and Roberts D. W. (1991) Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* **115**, 185-189.

Hakkaart G. A. J, Dassa E. P, Jacobsm H. T. and Rustin P. (2006) Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Rep.* **7**, 341-345.

Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter M. G, Ko M. S. H. and Dey S. K. (2004) Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 10326-10331.

浜谷敏生、洪 実、久慈直昭、浅田弘法、丸山哲夫、吉村泰典 (2006) 着床前期

胚の遺伝子発現プロファイリング. 慶応医学 **83**, 69-80.

Hand S. C. and Menze M. A. (2008) Mitochondria in energy-limited states: mechanisms

that blunt the signaling of cell death, *J. Exp. Biol.* **211**, 1829-1840.

Hofhaus G, Shakeley R. M. and Attardi G. (1996) Use of polarography to detect

respiration defects in cell cultures. *Meth. Enzymol.* **264**, 476-483.

Homma T, Watanabe K, Tsurumaru S, Kataoka H, Imai K, Kamba M, Niimi T,

Yamashita O. and Yaginuma T. (2006) G protein-coupled receptor for diapause hormone,

an inducer of *Bombyx* embryonic diapause. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**,

386-393.

Imanishi S, Inoue H, Kawarabata T, Hara K, Funakoshi M, Yasunaga-Aoki C. and Mitsuda K.

(2003) Establishment and characterization of a continuous cell line from pupal ovaries of Japanese oak silkworm *Antheraea yamamai* Guerin—Meneville. *In Vitro Cell Dev. Biol. Animal* **39**, 1-3.

Ishiyama M, Shiga M, Sasamoto K, Mizoguchi M. and He P. (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem.Pharm. Bull.* **41**, 1118-1122

Kamiya M, Oyauchi K, Sato Y, Yokoyama T, Wang M, Aizawa T, Kumaki Y, Mizuguchi M, Imai K, Demura M, Suzuki K. and Kawano K. (in press) Structure-activity relationship of a novel pentapeptide with cancer cell growth-inhibitory activity. *J. Pept. Sci.*

Kondo N, Sekijima T, Kondo J, Takamatsu N, Tohya K. and Ohtsu T. (2006) Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell* **125**, 161-172.

近藤宣昭 (2007) 年周リズムに支配され脳で冬眠を制御するホルモン. 生化学  
79, 415-424.

Lopes F. L, Desmarais J. A. and Murphy B. D. (2004) Embryonic diapause and its  
regulation. *Reproduction* 128, 669-678.

Mitsuhashi J. (1984) Isolation of a continuous cell line from larval fat bodies of an  
arctiid moth, *Spilarctia seriatopunctata* (Insecta, Lepidoptera, Arctiidae) (Cell  
Biology). *Zool. Sci.* 1, 415-419.

Murayama A, Omori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S,  
Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T. and Yanagisawa  
J. (2008) Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*  
133, 627-639.

Myers E. W, Sutton G. G, Delcher A. L, Dew I. M, Fasulo D. P, Flanigan M. J, Kravitz S. A, Mobarry C. M, Reinert K. H, Remington K. A, Anson E. L, Bolanos R. A, Chou H. H, Jordan C. M, Halpern A. L, Lonardi S, Beasley E. M, Brandon R. C, Chen L, Dunn P. J, Lai Z, Liang Y, Nusskern D. R, Zhan M, Zhang Q, Zheng X, Rubin G. M, Adams M. D. and Venter J. C. (2000) A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* **287**, 2196-2204.

Nakagaki M. Takei R. Nagashima E. and Yaginuma T. (1991) Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G2-arrest at diapause stage. *Dev. Biol.* **200**, 223-229.

Narbonne P. and Roy R. (2009) *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* **457**, 210-215.

Oka M, Maeda S, Koga N, Kato K. and Saito T. (1992) A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1472-1473.

Piva J. T. and McEvoy-Bowe E. (1998) Oxidation of Glutamine in HeLa Cells: Role and Control of Truncated TCA Cycles in Tumour Mitochondria. *J. Cell. Biochem.* **68**, 213-225.

Renfree M. B. and Shaw G. (2000) Diapause. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 353-375.

Rinehart J. P, Li A, Yocum G. D, Robich R. M, Hayward S. A, Denlinger D. L. (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 11130-11137.

Roberts S. B. and Rosenberg I. (2006) Nutrition and aging: changes in the regulation of energy metabolism with aging. *Physiol. Rev.* **86**, 651-667.

Schneider I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* **27**, 363-365.

Schwindt T. T, Forti F. L, Juliano M. A, Juliano L. and Armelin H. A. (2003) Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry* **42**, 2116-2121.

Shimizu T, Shiotsuki T, Seino A, An Y, Kuwano E. and Suzuki K. (2002) Identification of an imidazole compound-binding protein from diapausing pharate first instar larvae of the wild silkmoth *Antheraea yamamai*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **71**, 35-42.

鈴木幸一、藤沢 巧 (1989) 天蚕の人工孵化への道. *インセクタリウム* **26**, 269-301

Suzuki K, Minagawa T, Kumagai T, Naya S, Endo Y, Osanai M. and Kuwano E. (1990) Control mechanism of diapause of the pharate first-instar larvae of the silkmoth *Antheraea yamamai*. *J. Insect Physiol.* **36**, 855-860.



Suzuki K, Tanaka H. and An Y. (2001) Significance of specific factors produced throughout diapause in pharate first instar larvae and adults. In: Denlinger D. L, Giebultowicz J. M. and Saunders D. S. (Editors) *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*, Elsevier, Amsterdam pp. 185-198.

鈴木幸一、山本圭一郎、満月眞寿、大内順子 (2006) 地域と QOL 向上のための昆虫バイオテクノロジー. 蚕糸・昆虫バイオテック **75**, 96-102.

鈴木幸一、楊 平 (2007) 休眠昆虫由来のペプチドによる細胞増殖と寿命の制御. バイオサイエンスとインダストリー **65**, 21-25.

Szymanowska-Dziubasik K, Marciniak P, Rosinski G. and Konopinski D. (2008) Synthesis, cardiostimulatory, and cardioinhibitory effects of selected insect peptides on *Tenebrio molitor*. *J. Pept. Sci.* **14**, 708-713.

Tammariello S. P. and Denlinger D. L. (1998) G0/G1 cell cycle arrest in the brain of *Sarcophaga crassipalpis* during pupal diapause and the expression pattern of the cell cycle regulator, proliferating cell nuclear antigen. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **28**, 83-89.

Williams K. D, Busto M, Suster M. L, So A. K, Ben-Shahar Y, Leever S. J. and

Sokolowski M. B. (2006) Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapause due to the insulin-regulated PI3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15911-15915.

Xu W. H and Denlinger D. L. (2003) Molecular characterization of prothoracicotropic hormone and diapause hormone in *Heliothis virescens* during diapause and a new role for diapause hormone. *Insect. Mol. Biol.* **12**, 509-516.

山本雄造 (2004) ミトコンドリアから出発して. *Akita J. Med.* **31**, 173-184.

Yamanaka A, Imai H, Adachi M, Komatsu M, Islam AT, Kodama I, Kitazawa C. and

Endo K. (2004) Hormonal control of the orange coloration of diapause pupae in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L.(Lepidoptera: papilionidae) (Endocrinology). *Zool. Sci.* **21**, 1049-1055.

楊 平 (2004) 天蚕前幼虫における休眠制御因子の同定と機能利用. 岩手大学大学院連合農学研究科博士論文 pp. 100.

Yang P, Abe S, Sato Y, Yamashita T, Matsuda F, Hamayasu T, Imai K. and Suzuki K. (2007) A palmitoyl conjugate of an insect pentapeptide causes growth arrest in mammalian cells and mimics the action of diapause hormone. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **76**, 63-69.

Yang P, Abe S, Zhao Y, An Y. and Suzuki K. (2004) Growth suppression of rat hepatoma cells by a pentapeptide from *Antheraea yamamai*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **73**, 7-13.

Zhao J. Y, Xu W. H. and Kang L. (2004) Functional analysis of the SGNP I in the pupal diapause of the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Regul. Pept.* **118**, 25-31.