

氏 名 泉 洋 平

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博乙第4273号

学位授与の日付 平成20年 9月30日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者

(学位規則第5条第2項該当)

学位論文の題目 ニカメイガ幼虫における凍結障害誘導および回避機構に関する研究

論文審査委員 教授 積木 久明 准教授 園田 昌司 教授 宮竹 貴久 (環境学研究科)

学位論文内容の要旨

昆虫の低温耐性は凍結耐性と凍結回避性の二つに分けられる。ニカメイガ *Chilo suppressalis* 越冬幼虫は凍結耐性を有しており、最も凍結耐性の高まる1月中旬から2月にかけては凍結温度が約-15℃にもかかわらず、半数の幼虫が-25℃の低温に耐えることができる。この時期の越冬幼虫は体内にグリセロールを蓄積し、筋肉および表皮に氷核物質を生成することが知られている。本研究では、この凍結耐性を持つニカメイガ越冬幼虫と、凍結耐性を持たない非休眠幼虫を比較することにより、凍結障害誘導および回避機構を明らかにした。

越冬幼虫および非休眠幼虫の凍結による組織への障害を調べた。凍結死した越冬幼虫では消化管が、非休眠幼虫では脂肪体の障害が他の組織に比べて大きかったことから、これらの組織への障害が個体死を誘導すると考えられる。さらに、越冬幼虫と非休眠幼虫との間で、凍結による障害の違いが最も顕著であった脂肪体を用いて、凍結障害回避におけるグリセロールの役割について検討した。グリセロールを添加したグレース昆虫細胞培養培地中で脂肪体を凍結させると、越冬幼虫から抽出したものはまったく障害を受けなかったが、非休眠幼虫から抽出したものは強い障害を受けた。冷却から凍結に至る過程で、越冬幼虫の脂肪体において、グリセロールは細胞外から細胞内へ流入し、細胞内の水は細胞外に流出することが明らかとなった。この水とグリセロールの置換機構は塩化水銀により阻害されたことから、この機構にはアクアポリンが関与していると考えられる。以上の結果から、非休眠幼虫の脂肪体はこの置換機構を有していないために、たとえグリセロールが存在していても凍結に耐えられないことが明らかとなった。また、越冬幼虫がこの機構を獲得するには、休眠と低温順化の両方が不可欠であることも明らかとなった。

さらに、非休眠幼虫および越冬幼虫の脂質二重膜を構成するリン脂質、特に Phosphatidylcholine (PC) と Phosphatidylethanolamines (PE)の脂肪酸組成と凍結耐性の関係について検討した。越冬幼虫では、冬期不飽和脂肪酸の割合が増加しないPCの量を減少させ、不飽和脂肪酸の割合が80%を超えるPEの量を増加させることで、リン脂質全体の不飽和度を上げ、それにより低温における細胞膜の流動性を維持していると考えられる。越冬幼虫の脂肪体細胞中には大量のトリアシルグリセロールが油滴として存在する。このトリアシルグリセロールの示差走査熱量測定(DSC)から、その相転移温度は-25℃付近にあることが明らかとなった。この温度は越冬幼虫において個体死が起きる温度と一致していたことから、細胞内の多くの容積を占めるトリアシルグリセロールの固化が細胞内小器官に影響を与える、もしくは細胞内凍結の引き金となることで細胞死ひいては個体死を誘導していると考えられた。

サブトラクション法を用いて、低温順化した休眠幼虫で特異的に発現している遺伝子の単離を試みた。単離した遺伝子の塩基配列より推定されるアミノ酸配列は、昆虫の貯蔵タンパク質と高い相同性を示した。この貯蔵タンパク質は、グリセロールとトレハロースの蓄積、アクアポリンの生成、リン脂質の脂肪酸組成の変化に関係する合成経路の活性を維持するためのアミノ酸供給源となっている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

これまでに、稲作害虫であるニカメイガの季節適応の研究において、越冬幼虫は冬季多量のグリセロールを蓄積し-25℃の凍結に耐えて生存できるが、-30℃以下の凍結には耐えられなかった、一方、非休眠幼虫は凍結に耐えられない、凍結感受性である、こと等が報告されている。しかし、凍結障害誘導機構と回避機構の詳細については不明であった。本論文では、ニカメイガ越冬幼虫と非休眠幼虫の凍結障害誘導機構と回避機構に注目して研究を行ったものである。

-30℃以下で凍結死した越冬幼虫では消化管の障害が、-10℃で凍結死した非休眠幼虫では脂肪体の障害が他の組織に比べて大きかったことから、これらの組織への障害が個体死を誘導すると考えられた。さらに、脂肪体を用いて凍結障害回避におけるグリセロールの役割を検討した。グリセロール添加培地中で凍結させると、越冬幼虫の脂肪体は障害を受けなかったが非休眠幼虫の脂肪体は障害を受けた。また、グリセロールを添加していない培地で凍結させるとどちらの脂肪体も凍結障害がみられた。冷却から凍結に至る過程で、越冬幼虫の脂肪体では、グリセロールは細胞外から細胞内に流入し、細胞内の水は細胞外に流出した。細胞膜を介した水とグリセロールの置換にアクアポリンが関与していた。一方、非休眠幼虫の脂肪体ではこの置換機構が存在しないために、グリセロールが存在しても凍結に耐えられなかった。次に、非休眠幼虫と越冬幼虫の細胞膜を形成する磷脂質、特に **phosphatidylcholine** と **phosphatidylethanolamine(PE)** の脂肪酸組成と凍結耐性の関係について調べた。越冬幼虫では、冬季不飽和脂肪酸の割合が80%を超えるPEの量を増加させることで、リン脂質全体の不飽和度を上げ、低温での細胞膜の流動性を維持している。冬季、脂肪体細胞の中に油滴として多量に蓄積されるトリアシルグリセロールの相転移温度は-25℃付近であり、これが固化することで細胞内の小器官障害を与える、あるいは細胞内凍結の引き金となることで細胞死ひいては個体死を誘導すると考えられた。遺伝子解析から、低温順化した休眠幼虫で特異的に合成される貯蔵蛋白質は、越冬中の特異的代謝系に関与する酵素やアクアポリンのアミノ酸供給源になっていると考えられる。

本論文は、ニカメイガ幼虫を用いて、昆虫の凍結障害誘導機構と回避機構を明らかにしたものであり、海外の研究者からも高い評価を得ており、博士（農学）の学位論文に値すると判断した。