

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成17年度博士課程進学

粥川 琢巳

指導教員 田付 貞洋 教授

論文題目 Molecular biological studies on cold hardiness in the onion maggot, *Delia antiqua*
(タマネギバエの耐寒性に関する分子生物学的研究)

タマネギバエ (*Delia antiqua*) は北半球の冷涼な地域に生息し、タマネギ、ネギ、ニラ、などのネギ属植物の害虫として知られている。本種は高温の夏季、および低温の冬季を耐えるために休眠蛹として過ごす。夏休眠、冬休眠、非休眠の蛹にそれぞれ低温処理 (-20°C , 非凍結温度) を施し耐寒性を調査したところ、冬休眠蛹だけではなく夏休眠蛹でも高い生存率を示し、ほとんどの休眠前、休眠後、非休眠蛹で生存が観察されなかった。また非休眠蛹に低温順化 (5°C) 処理を施すと、囲蛹殻形成後の一定期間に限り、順化日数の増加に伴う生存率の増加が観察された。

非凍結条件における低温障害の1つとして、タンパク質の変性が考えられる。Heat shock proteins (HSPs) はシャペロン機能を有し、さまざまなストレス条件下で誘導され変性したタンパクの refolding を担う。低温ストレスにおいても HSPs の誘導は多くの生物種で報告されている。2つ目として、生体膜の液晶相 (liquid phase) からゲル相 (gel phase) への相転移 (phase transition) による膜の流動性損失が挙げられる。ゲル相では、脂質分子の炭化水素鎖が秩序正しく配列し、流動性が乏しく物質の透過性はきわめて低い。多くの生物種において、温度変化に伴い生体膜の組成を変化させ、膜の流動性を保つ現象 (homeoviscous

adaptation, HVA)が報告されている。

本研究はこれらの耐寒性メカニズムに関与する遺伝子をクローニングすると共に、differential display 法による新たな耐寒性遺伝子のスクリーニングを行った。

1. 耐寒性における HSPs の関与

昆虫における HSPs は分子量によって small HSP, HSP60, HSP70, HSP90 の 4 つに分類される。そこで、タマネギバエの *HSP70* と *HSP90* をクローニングし、mRNA の発現量と耐寒性の関係性を調査した。その結果、耐寒性の低い個体では *HSP70* と *HSP90* の mRNA 発現量が非常に低いが、耐寒性の高い夏休眠、冬休眠、非休眠において非常に高い mRNA の誘導が見られた。またこれらの蛹に低温ストレスもしくは高温ストレス処理を施し、mRNA の発現量を調査した。その結果、発現量が高い休眠蛹では、*HSPs* のさらなる誘導がみられ、また非休眠蛹においても誘導が観察された。

これらの結果から、タマネギバエの耐寒性には HSPs が関与していることが示唆された。また HSPs の誘導には、休眠による誘導と温度ストレスによる直接的な誘導の2つが見出された。温度ストレスによる直接的な誘導は heat shock transcription factors (HSFs)による制御が考えられるが、休眠による HSPs の誘導機構は不明であり興味もたれる。

2. 低温に対する HVA

タマネギバエの Δ 9-acyl-CoA desaturase (*Dadesat*) をクローニングした結果、2 つのホモログ (*Dadesat1*, *Dadesat2*) が得られた。real-time PCR により耐寒性と 2 種類の *Dadesat* mRNA の発現量の推移を測定した結果、*Dadesat1* では発現量の差はみられなかったが、*Dadesat2* では耐寒性の増加に伴い多くの組織において mRNA 発現量の増加が観察された。*Dadesat2* と最も高い相同性を示すイエバエ *Musca domestica* の Δ 9-acyl-CoA desaturase は palmitoyl-CoA と stearoyl-CoA を基質とすることが報告されている。これらの結果からタマネギバエにおいても *Dadesat2* は両基質を不飽和化し、生体膜を構成するリン脂質炭化水素鎖の不飽和度を高めることによって耐寒性を増強していることが示唆された。

Dadesat mRNA 発現量の推移変化をもとに、耐寒性の高い蛹(低温順化蛹, 冬休眠蛹)と耐寒性の低

い蛹(非休眠蛹, 冬休眠前期蛹)の脳を用いて, リン脂質を構成する phosphatidylethanolamine (PE)と phosphatidylcholine (PC)における脂肪酸の側鎖をGC解析により調査した. 耐寒性の上昇と共に *Dadesat2*の mRNA 発現量が増加していた脳において, PE で C16:1 (C16 は炭素の長さを, コロンの後の数字は二重結合数を示す)が増加し, PC では C18:1 が増加していた. これらの結果から *Dadesat2* が monoenes を増加させ, 低温に対する HVA に関与していることが示唆された.

また, それぞれの組織における低温に対する HVA を調査するため, リン脂質側鎖の炭素鎖長・不飽和度を解析した. その結果, $|t_m - t_h|$ 値 (t_m : gel/ liquid transition temperatures, t_h : liquid/ hexagonal transition temperatures)が増加する傾向の脂質変化が観察された. 休眠蛹は耐寒性と耐熱性の両方を持ち備えているため, このような脂質変化をおこなっていることが示唆された.

3. 低温ストレスにおけるCCTの働き

Differential display 法により耐寒性に関与する遺伝子のスクリーニングを行った結果, 耐寒性の増加に伴い発現量が増加する遺伝子として, *T-complex polypeptide-1 (TCP-1)* 遺伝子が見出された. TCP-1 は真核生物のシャペロニンである CCT(chaperonin containing the TCP-1)を構成する α サブユニットである. CCT は 8 つのサブユニットから構成され, 新生タンパク質の folding や assembly に関与する分子シャペロンの1つとして知られている. そこで, CCTを構成する α サブユニット以外の7つのサブユニット($\beta \sim \theta$)をクローニングし, real-time PCR によって耐寒性に伴う発現量の推移を測定した. その結果, 調査したすべての組織において, 耐寒性の増加に伴い全サブユニットの mRNA 発現量が同調して増加していた. これらのことから, CCT が耐寒性獲得に寄与していることが示唆された.

CCT は基質特異性が高く, 細胞骨格を構成するアクチンとチューブリンが主な基質と考えられている. アクチンの低温条件下における特性は, 動物細胞ではラットの肝臓シヌソイド内皮細胞で唯一報告がなされている. 低温により Ca^{2+} ATPase の活性が低下し細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇すると, Ca^{2+} 依存性細胞内プロテアーゼであるカルパインが活性化されアクチンの depolymerization を引き起こす. そこで, タマネギバエのマルピーギ管における低温処理後のアクチンの構造を共焦点レーザー顕微鏡で観察した. その結果, 耐寒性の低い個体ではアクチンの depolymerization が観察されたが, 耐寒性の高い個体では観察されなかった. また同時にトリパンブルー染色により細胞膜の構造を観察した結果, 低温により生じ

たアクチンの depolymerization の後に細胞膜が損傷を受けることが観察された。マルピーギ管のアクチンは細胞膜付近に局在することと、アクチンの depolymerization の後に細胞膜の崩壊が起こることから、低温条件下でアクチンが細胞膜を保護することが示唆された。そこで幼虫期にアクチンの重合阻害剤である Latrunculin B (LatB) を摂食させた蛹を用いて耐寒性試験を行った。その結果 LatB を摂食した蛹において有意に耐寒性の低下が観察された。

これらの結果から、耐寒性の高い蛹では CCT が細胞内に多く存在するためアクチンの増強、もしくは低温によって depolymerization が生じても迅速にアクチンの再重合を誘発し、その結果アクチンが細胞膜を保護することで耐寒性を獲得していることが示唆された。

以上、本研究ではタマネギバエの耐寒性に、heat shock proteins におけるタンパク質の refoldin, Δ 9-acyl-CoA desaturase による homeoviscous adaptation が関与していることを明らかにした。また昆虫において、actin の depolymerization が低温ストレスによって誘導されることをはじめて証明し、CCT が actin の depolymerization を抑制することで細胞膜を保護するという新たな耐寒性獲得のメカニズムを解明した。