

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 粥川 琢巳

タマネギバエ (*Delia antiqua*) は北半球の冷涼な地域に生息するネギ属植物の害虫である。本種は高温の夏季、および低温の冬季を蛹で休眠して過ごす。休眠、非休眠の蛹を -20°C に曝すと、冬休眠と夏休眠の蛹は高い生存率を示したが、非休眠蛹ではほとんど生存できなかった。しかし非休眠蛹を低温順化 (5°C) すると、順化日数の増加に伴い生存率が増加した。

非凍結条件における低温障害の原因にはタンパク質の変性と生体膜の液晶相からゲル相への相転移がある。Heat shock proteins (HSPs) は分子シャペロン機能を有し、高温、低温などストレス条件下で誘導されて変性したタンパクの refolding を担う。生体膜の相転移に対しては生体膜の脂質組成を変化させ、膜の流動性を保つ働き (homeoviscous adaptation, HVA) がある。本研究で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 法により新たな耐寒性遺伝子を探索した。

1. 耐寒性における HSPs の関与

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を調査した。耐寒性の低い蛹では両遺伝子の mRNA 発現量が非常に低いが、耐寒性の高い休眠蛹では非常に高い mRNA の誘導が見られた。これらに低温ストレスを施したところ、mRNA の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。これらから、本種の耐寒性には HSPs が関与していることが示唆され、HSPs の誘導には休眠によるものと温度ストレスによるものの2つが見出された。温度ストレスによる誘導は heat shock transcription factors (HSFs) による制御が考えられるが、休眠による誘導の機構は不明である。

2. 低温に対する HVA

$\Delta 9\text{-Acyl-CoA desaturase}$ (*Dadesat*) をクローニングした結果、RT-PCR において耐寒性の高い休眠蛹で強く発現するホモログが得られた。Real-time PCR によると多くの組織において耐寒性の増加に伴う *Dadesat* mRNA 発現量の増加がみられた。これらから、*Dadesat* は基質と考えられる palmitoyl-CoA と stearoyl-CoA 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 発現量の変化をもとに、耐寒性の高い低温順化蛹と冬休眠蛹、および耐寒性の低い非休眠蛹、冬休眼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ところ、耐寒性と *Dadesat2* の mRNA 発現量が共に増加していた。

脳では、PE では C16:1 が、PC では C18:1 が増加しており、*Dadesat* が不飽和度を高めることによる HVA が示唆された。さらに、各組織における低温に対する HVA を調査したところ、 $|t_m - t_h|$ 値 (t_m : gel/ liquid transition temperature, t_h : liquid/ hexagonal transition temperature) が増加する傾向の脂質変化が観察され、休眠蛹が耐寒性と耐熱性の両方を持ち備えている事実とよく符合した。

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し、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)* を見出した。TCP-1 は真核生物のシャペロンである CCT (chaperonin containing the TCP-1) を構成単位 (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 つである。 α サブユニット以外の 7 つのサブユニット ($\beta \sim \theta$) もクローニングし、real-time PCR によって耐寒性に伴う発現量の変化を測定した。その結果、すべての組織で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おり、CCT の耐寒性獲得への寄与が示唆された。CCT は細胞骨格を構成するアクチンを基質とし、低温により Ca^{2+} ATPase の活性が低下し細胞内 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、アクチンが脱重合される。そこで低温処理したタマネギバエでマルピーギ管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脱重合が見られたが、耐寒性の高い個体では観察されなかった。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脱重合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。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、もしくは低温による脱重合が生じても迅速にアクチンの再重合を促し、その結果として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であろう。

以上、本研究ではタマネギバエの耐寒性に、heat shock proteins によるタンパク質の refolding、 $\Delta 9$ -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、アクチンの脱重合が低温ストレスによって誘導されることをはじめて示し、CCT がアクチンの脱重合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。審査委員一同はこれらの成果が学術的にも応用的にも大いに貢献するものであり、博士 (農学) の学位を授与するに十分な価値を有することを認めた。