

作成者	所属（専攻）・氏名 連合農学研究科生物環境科学専攻 鈴木 幸一 連絡先（内線・メール）6147 koichi@iwate-u.ac.jp
研究課題名 （英語名）	昆虫生存戦略（休眠越冬）の分子機構 Molecular mechanism of diapause-hibernating insects
研究分野及び キーワード	研究サブグループ：熱に対する生物の生存戦略メカニズム 研究キーワード：（休眠・越冬）（分子機構）（昆虫）
研究協力者 （氏名・所属等）	
<p>研究成果報告</p> <p>目的</p> <p>寒冷圏における昆虫は、夏季の高温を回避する生存戦略と冬季の寒冷を克服する生存戦略を兼ね備えている。この相反的な生存戦略は、休眠を介することで高温耐性を発揮し、その後に耐寒性の越冬期を経て完結されている。昆虫の相反的な生存戦略の分子機構の解明は、温度（熱）環境に対する生命システム応答反応の多様性を理解しながら、そこから得られる情報をテクノロジーとして地球環境変動に対応する生存戦略法の提案へと発展するものである。そのために、高度な生殖行動が停止するコガタリハムシ成虫の休眠・越冬期の分子機構に着目し、特異的な遺伝子とタンパク質をネットワークシステムとして把握しながら、機能解析を進める。</p> <p>特に初年度については、休眠期に特異的に発現する遺伝子の操作の確立を目指した。</p> <p>研究結果</p> <p>1. 休眠特異的ペプチドの RNAi 解析</p> <p>これまでの昆虫の休眠・越冬研究においては、前休眠期、休眠期、後休眠期に特異的に発現する遺伝子の解析からペプチド・タンパク質の機能を推論するだけで、遺伝子操作を実現する系は確立されていなかった。しかし、コガタリハムシの成虫から単離した休眠特異的ペプチド (Diapause-specific peptide, DSP) の機能を解明するために、このペプチド遺伝子を RNAi 法で完全に発現抑制し、DSP の合成しない成虫の作出に成功することができた。この成果は休眠する昆虫では最初の報告であり、今後休眠・越冬機構を解析するための重要なモデル昆虫として提案することができた (図 1) (Tanaka & Suzuki, in press)。</p> <p>2. 休眠期特異的タンパク質 (21kD、23kD) のシャペロン機能と RNAi 解析</p> <p>SDS-PAGE により休眠期に主に出現する 21kD と 23kD のタンパク質のアミノ酸配列と cDNA の解析結果、非誘導型 αB-crystallin 様のスモール熱ショックタンパク質 (Small heat shock proteins, sHsps) であることを同定した。また、この二つの組み換え体 sHsp21、sHsp23 を利用し、in vitro 系でシャペロン活性があることを明らかにした。さらに、二つのタンパク質を等量混合することで、個別のタンパク質よりシャペロン活性が増加することを新しく提案することができた。一方、二つの遺伝子に関する RNAi 法を試みたところ完全に発現抑制することに成功した。そこで、in vivo 系においても個別の遺伝子発現抑制より二つの遺伝子の同時発現抑制が熱耐性を発揮するかどうかについて検討した。はじめに sHsp21 と sHsp23 の RNAi 法によってそれぞれの遺伝子発現を抑制した個体を作成し、その上で毎日 50°C・12 分間の熱ショックを与えた。その結果、sHsp21 および sHsp23 遺伝子が単独で発現抑制された個体よりも、二つの遺伝子が同時に発現抑制された個体で生存個体が著しく激減した。また、対照区の休眠中の個体では熱ショックにまったく影響を受けることなく、逆に前休眠期の個体は熱ショックで</p>	

完全に死亡した（図2）。

この結果は、*in vitro*系における二つの sHsps タンパク質の効果的なシャペロン機能が、休眠成虫の個体レベルにおいて *sHsp21* と *sHsp23* 遺伝子の同時発現で再現されていることを証明したことになる。すなわち高温に対する耐性機構として、コガタリハムシの夏季の休眠成虫は二つの *sHsps* の発現で環境適応のための生存戦略を展開していることを明らかにすることができた。この新しい生存戦略法のコネプトを「Double Chaperone Function」として提案中である（Atungulu et al., in submission）。

来年度以降に向けての反省点、改善すべき点、そして、対策方法

コガタリハムシにおける上記の研究成果の普遍性を他の生物種で検証するか、または他の昆虫種（例えば、休眠ステージが異なるヤマモユの前幼虫）で検証するかが残されている。

来年度研究計画の概略

夏季の高温に対する新しい分子機構を提案することができたので、次に秋季の休眠期から冬季の越冬期に渡る分子機構について、特にこの二つの期間中に蓄積されている休眠特異的ペプチド（DSP）の機能解析を目指す。これまで昆虫を含めて提案されてきた耐寒性・耐凍性分子は、糖・アミノ酸関連物質ならびに耐凍性タンパク質が多く、ペプチドの機能性と耐寒性についてはほとんど解明されていない。従って、コガタリハムシの成虫休眠の特性を活用しながら、耐寒性の分子機構に関して新しい提案を試みる。

本研究拠点形成に関連して受けた研究助成

特になし。

その他特記すべき事項

わが国における昆虫学分野では農水省を中心としながら昆虫機能を利用した産業創出が進められており、この流れに対して出版界においては、昆虫産業のための技術に関する最新の研究をまとめることに積極的となっている。そのひとつとして、まもなく『昆虫テクノロジー研究と産業利用』（シーエムシー出版）が発刊されるが、本書は医薬品・化学・バイオ関連メーカーに読者層を絞って企画されたものである。大学・研究所の昆虫研究関連者40人が執筆しており、その中で総論編—昆虫テクノロジーの総論・研究開発動向—を担当執筆した。ここでは、本研究成果である休眠昆虫から単離同定された物質や遺伝子の産業利用を提案しており、学術研究成果の社会貢献を目指したものである。

研究成果

原著論文

- Tanaka, H. and Suzuki, K. 2005. Expression profiling of a diapause-specific peptide (DSP) of the leaf beetle *Gastrophysa atrocyanea* and silencing of DSP by double-strand RNA. *J. Insect Physiol.* (in press).
- Atungulu, E., Tanaka, H., Fujita, K., Sakata, M., Sato, E., Hara, M., Yamasita, T., and Suzuki, K. A double function of the sHsp genes against heat-environmental adversity. (in submission)

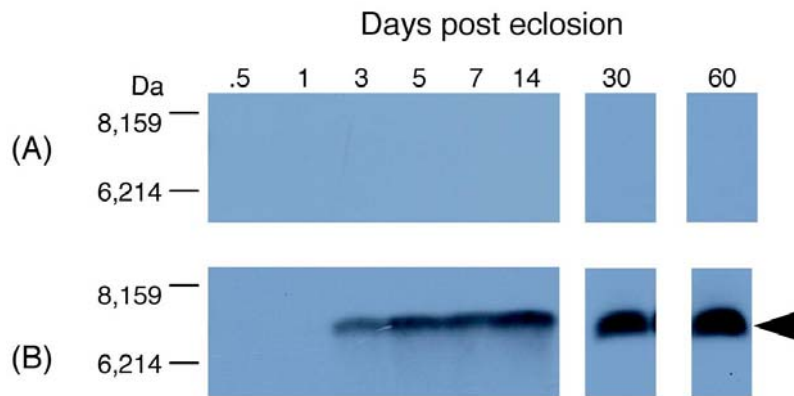


図1. コガタルリハムシ成虫の休眠特異的ペプチド（DSP）遺伝子の発現抑制による個体作出
 (A) ウェスタンブロット法で確認した羽化後60日でもDSPを合成しないRNAi注射成虫。
 (B) 対照として羽化後3日から60日までDSPを合成している蒸留水注射成虫。

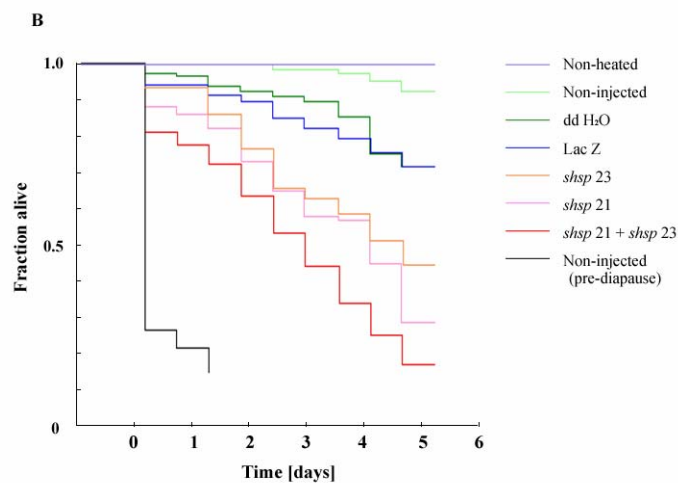


図2. *sHsps* 遺伝子発現抑制のためのRNAi注射と熱ショック処理で生存しているコガタルリハムシ成虫の生存曲線（Kaplan-Meier法）