HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニカメイガ越冬幼虫における凍結障害回避機構
Author(s)	泉, 洋平
Citation	低温科学, 81, 1-9
Issue Date	2023-03-20
DOI	10.14943/lowtemsci.81.1
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89125
Type	bulletin (article)
Note	第一章：変温動物
File Information	01_p001-009_LT81.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 1-9
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 1

ニカメイガ越冬幼虫における凍結障害回避機構

泉　洋平[1)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 10 日受理

ニカメイガは秋期の日長の短縮に反応して終齢幼虫で休眠に入り，その後の低温により凍結耐性を獲得する．これにより，－25℃の低温にさらされて体液が凍結しても生存することが可能となる．低温順化によりニカメイガ越冬幼虫は体液中にグリセロールを蓄積しており，凍結時にアクアポリンを介して細胞内の水と体液中のグリセロールの速やかな置換を行うことで，凍結耐性をもつ昆虫種であっても致死的となる細胞内凍結を回避している．この凍結障害回避機構は，休眠とその後の低温順化がなければ発現することはなく，グリセロール存在下であっても，非休眠幼虫や低温順化を受けていない休眠幼虫の組織では凍結障害を回避できない．

Freezing damage avoidance mechanism of overwintering larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker.

Yohei Izumi[1]

Overwintering larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* obtain freezing-tolerance to about −25℃ by the accumulation of glycerol in the hemolymph. However, non-diapausing larvae (in the summer season) cannot survive freezing. To prevent intercellular freezing, which causes death in overwintering larvae, water leaves and glycerol enters fat body cells through water channels ‘aquaporin’ during freezing. Fat body tissue isolated from non-acclimated diapausing and non-diapausing larvae cannot avoid freezing injury even when glycerol is present. Only fat body tissue isolated from cold-acclimated diapausing larvae can avoid freezing injury in the presence of glycerol. Moreover, in radiotracer experiments, water and glycerol displacement is observed only in cold-acclimated diapausing larvae. Therefore, in larvae of the rice stem borer, both diapause and cold-acclimation are essential to accumulate glycerol and activate aquaporin for the avoidance of freezing injury.

キーワード：ニカメイガ，耐凍性，休眠，低温順化，アクアポリン
Chilo suppressalis, freezing-tolerance, diapause, cold-acclimation, aquaporin

1．はじめに

昆虫の低温耐性は体液が凍結しても耐えることのできる凍結耐性と，凍結しないように過冷却点を下げる凍結回避性の２つに分けることができる（Storey and Storey, 1992; Bale, 2002; Danks, 2005）．温帯および寒帯に生息している昆虫の多くは凍結回避性であり，凍結耐性をもつ昆虫の多くはさらに寒さの厳しい地域に生息している．凍結耐性を持つ種が冬期の低温が厳しい地域に多く分布していることから，凍結耐性の獲得が厳しい低温での生存に有効であると考えられるが，同じ地域には非常に低い過冷却点をもつ凍結回避性の種も存在するため，冬期の低温にどちらの耐性がより適応的であるかといった結論は未だ出ていない．

連絡先
泉　洋平
島根大学生物資源科学部
〒690-8504　島根県松江市西川津町 1060
Tel. 0852-32-6527
e-mail：yohei@life.shimane-u.ac.jp
１）島根大学生物資源科学部
Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue, Japan

凍結回避性の昆虫にとって凍結は致命的であるため，これらの種は過冷却点を下げることにより，組織及び体液の液相を維持している（Salt, 1936）．過冷却能力は，トレハロースなどの糖や，グリセロールなどの糖アルコールの蓄積により増強され，多くの場合厳寒期に最も高い過冷却能力を示す（Sø mme, 1982）．また，不凍タンパク質も過冷却点の低下および過冷却状態の安定に関与していると考えられている（Zachariassen and Husby, 1982）．

凍結耐性の昆虫も凍結回避性の昆虫と同様に越冬時に糖や糖アルコール，不凍タンパク質（山内の稿参照）を体内に蓄積するが，その役割は異なると考えられている．凍結耐性を持つ昆虫は氷核物質を持っており，それらが氷点下の比較的高い温度での体液の凍結を誘導する（Zachariassen and Hammel, 1976; Duman, 2001; Bale, 2002）．昆虫の氷核物質は大きく内因性氷核と外因性氷核に分類される．内因性氷核には昆虫自身が生成する氷核タンパク質や氷核リポタンパク質が，外因性氷核には消化管内の食物残渣，氷核活性をもつ微生物などがある．これらの氷核物質を用いて，凍結耐性を持つ昆虫は体液の凍結を誘導するため，凍結耐性を持つ昆虫の不凍タンパク質は，凍結回避性の昆虫の不凍タンパク質のように過冷却点を下げることには寄与せず，融解時の再凍結による氷結晶成長を抑制することで機能していると考えられている．また，糖や糖アルコールは体液中や組織内に蓄積することで，凍結による傷害を軽減しているとされている（Lee, 1991）．

ニカメイガ *Chilo suppressalis* はチョウ目ツトガ科に属し，東南アジアから西南アジアにかけて広く分布しており，日本では沖縄から北海道まで広く分布している（積木　1998）．幼虫はイネなどの茎内に潜入して食害する．1960 年ごろまでは日本において稲作に甚大な被害をもたらす，最も重要なイネ害虫であった．しかし，1970 年代以降は急激に密度が低下し，現在では一部の地域を除いて，水田内での本種の捕獲は困難になっている．ニカメイガは基本的には年に 2 回発生する年二化の生活史を持つが，東北地方北部や北海道では年一化の生活史を持っている．日長が短くなる秋期に休眠に入り終齢幼虫で越冬する．休眠誘導後の外気温の低下にともなって体内にグリセロールを多量に蓄積し，筋肉および表皮に氷核物質を生成することで 1 月中旬から 2 月にかけて −25℃ もの低温に耐えることができるようになる（Tsumuki & Kanehisa, 1978; Tsumuki, 1990; Tsumuki & Konno, 1991; Hirai & Tsumuki, 1995）．越冬幼虫の過冷却点が −15℃ 前後であることから，ニカメイガ越冬幼虫は温帯域に生息する昆虫では珍しく凍結耐性をもっているといえる．しかし，夏期に生育する第 1 世代幼虫は，短日による休眠誘導を受けないために非休眠であり，本幼虫を低温にさらしても，グリセロールを蓄積することはできず凍結には耐えることはできない（積木　1998）．

2．凍結障害回避におよぼす細胞膜の水とグリセロール輸送の役割

Polge ら（1949）によるグリセロールの凍結障害防御効果の発見以来，細胞の凍結障害の発生機構と凍結保護物質の作用が多くの研究者によって研究されてきたが，まだ充分に解明されていない．それは，凍結による溶液の物理的変化には一定の法則性があるが，細胞の性質は組織によって異なり，凍結に対する感受性が大きく異なるため，凍結障害の発生機構と凍結保護物質の作用に一定の法則性を見いだすのが難しいためと考えられている（Lovelock, 1953; Doebbler, 1966; Takahashi & Hirsh, 1985）．冷却速度を速くすると細胞は細胞内凍結を起こしやすくなる（Mazur, 1984）．これは，冷却速度が早いと細胞内の水の多くが細胞内に残って過冷却され，その後の細胞外からの植氷により細胞内凍結を起こすためである（植氷については宇高の稿参照）．組織細胞により異なるものの生存率が最も高くなる最適冷却速度が存在し，最適冷却速度より早い冷却速度での生存率の低下は細胞内の氷晶形成に起因すると考えられている．細胞内の氷晶形成は，細胞内微細構造の破壊，細胞内の形態変化，呼吸や各種酵素活性の低下，細胞分裂能や細胞運動能の損失等を引き起こし，凍結障害を誘導する（Mazur, 1984）．

Lovelock（1953）は凍結保護物質として具備すべき条件として，低分子であること，低温においても水溶性が高く高濃度に濃縮可能であること，毒性が少ないこと，細胞内に容易に透過しうることを提案している．このような物質は，その束一性（凝固点降下のようにその物質の化学的組成には関係なく，溶質の濃度だけによって決定される性質）により溶液の凍結温度を効果的に下げ，氷晶形成量を減らし細胞内外の塩濃度の濃縮を抑える効果が高い．このことは，塩害説（赤血球では一定以上に塩濃度が高まると，細胞膜脂質の一部に分解がおこり，それにより膜透過性が増大し，融解時に溶血がおこるという説）の凍結障害を引き起こす要因である細胞内外の塩濃度が細胞膜を変成するほど高まらず，最小容積説（細胞には収縮可能な容積に限界があり，それを超えて収縮すると細胞膜にストレスがかかり半透性を失うという

説）における凍結障害の要因である脱水収縮が細胞が障害を受けるほどおこらないことを意味する．このように細胞膜を通過して拡散しうる凍結保護物質は“細胞膜透過型凍結保護物質”と呼ばれ，グリセロールやジメチルスルホキシド（DMSO）がその代表的なものである（Shlafer, 1981）．これらはその束一性により氷晶形成量を抑制するとともに，凍結下での溶液の物理化学的状態を大きく変える．グリセロール溶液ではグリセロールの濃度が高くなるに従い凍結温度が降下する．氷晶核を持たない溶液も－38℃に冷却されると水分子の集合による均質的氷晶核（homogeneous ice nuclei）が形成されて凍結を開始するが，グリセロールの濃度が高くなるに従って均質的氷晶核が形成される温度も下降し，グリセロール濃度 40％では－50℃以下になる（Rasmussen & Luyet, 1970）．このことは，細胞にとっては過冷却能力が増大することを意味し細胞内凍結が起こりにくくなることを示している．しかし，実際には高濃度のグリセロールは細胞にとって有害である．DMSO に比べて膜透過性が低いことから，融解時に急速な水の細胞内侵入に見合うだけのグリセロールの細胞外への排出がともなわず，細胞が膨潤して障害を受けてしまう．これらの理由から，凍結保存におけるグリセロールの最適濃度は 10～15％程度であるとされている．

近年，多くの研究により細胞の凍結保存を成功させるには細胞膜を介した水と凍結保護物質の置換が重要であることが明らかにされている．水と凍結保護物質の細胞膜を介した置換には，浸透圧によるものと水チャネルよるものがある．アクアポリンと呼ばれる水チャネルタンパク質は多くの高等動物や植物で報告されている（Maurel, 1997; Benos et al., 2001; Chumont et al., 2001）．また，いくつかの昆虫種においても報告されている（Beuron et al., 1995; Le Caherec et al., 1996a, b; Pietrantonio et al., 2000; Azuma et al., 2012）．アクアポリンは，選択的に水のみを通すものと，水と同時にグリセロールのような物質を通すものが知られている（Tyerman et al. 2002）．アクアポリンによる水の輸送は塩化水銀（$HgCl_2$）により阻害される（Preston et al., 1992）．それは，砂時計型をしているアクアポリンの最も細くなっている部分に水銀分子が結合することにより水の輸送を阻害すると報告されている（Murata et al., 2000）．アクアポリンと凍結耐性との関連は以下に述べるいくつかの生物種ですでに報告されている．酵母菌の研究では，凍結耐性を持つ系統でのみアクアポリンが発現していたと報告されている（Tanghe et al., 2002）．また，凍結耐性を持たない系統でアクアポリンを過剰発現させると凍結耐性を持つことも確認されている（Tanghe et al., 2002）．哺乳類の卵細胞ではグリセロールに対する透過性が低いためにグリセロールベースの保存液での凍結保存の成功例は報告されていなかった．しかし，Edashige et al（2003）は，マウス卵細胞にアクアポリン-3（AQP3）を人工的に発現させることでグリセロールベースの溶液での凍結保存を成功させている．AQP3 は哺乳類において，水だけではなくグリセロールや尿素なども通すことのできるアクアグリセロポリンというグループに属しており，卵細胞ではほとんど発現しておらず，凍結耐性の高い桑実胚（受精卵が細胞分裂を繰り返し 16 個から 32 個まで分裂した状態）になると強く発現するようになりグリセロールの膜透過性が高くなることが知られている．

ニカメイガ越冬幼虫においても，アクアポリンを介した水とグリセロールの速やかな置換が凍結障害の回避に重要であることが明らかとなった．死細胞を染色するトリパンブルー染色法を用いて各器官と個体死との関係を評価したところ，凍結耐性を持たない非休眠幼虫では，－10℃に 4 時間暴露すると脂肪体に大きな障害を受けた個体が死亡することが明らかとなった．一方で凍結耐性をもつニカメイガ越冬幼虫を半数致死温度である－25℃に 24 時間暴露すると，中腸に障害を受けた個体は死亡し，受けなかった個体は生存することができる（Izumi et al., 2005）．しかしながら，死亡個体，生存個体ともに脂肪体には大きな障害は見られなかった．越冬幼虫，非休眠幼虫それぞれの脂肪体を摘出して，グレース昆虫培養培地内で凍結させると両者とも大きな障害受ける．そこにグリセロールを加えると越冬幼虫の脂肪体は障害を受けないが，非休眠幼虫の脂肪体は障害を受ける（Izumi et al., 2006）．このことは，非休眠幼虫が凍結に耐えることができないのは体内にグリセロールを蓄積することができないためだけではなく，それを効果的に利用する機構を持っていないためであることを示している．また，グリセロールを添加したグレース培地に $HgCl_2$ を加えて凍結させると，越冬幼虫の脂肪体も傷害を受ける（図 1）．水銀はアクアポリンの活性を阻害することが知られていることから，この結果は越冬幼虫脂肪体の凍結障害の回避にアクアポリンが大きな役割を担っていることを示唆している．

［^{14}C］グリセロールと［^{3}H］H_2O を用いた，トレーサー実験により，冷却から凍結に至る過程における脂肪体組織内の水とグリセロールの動態を調査したところ，5℃で処理すると，越冬幼虫の脂肪体はグリセロールを取り込み，30 分で最大値（約 160 ng/mg）に達した．しかし，

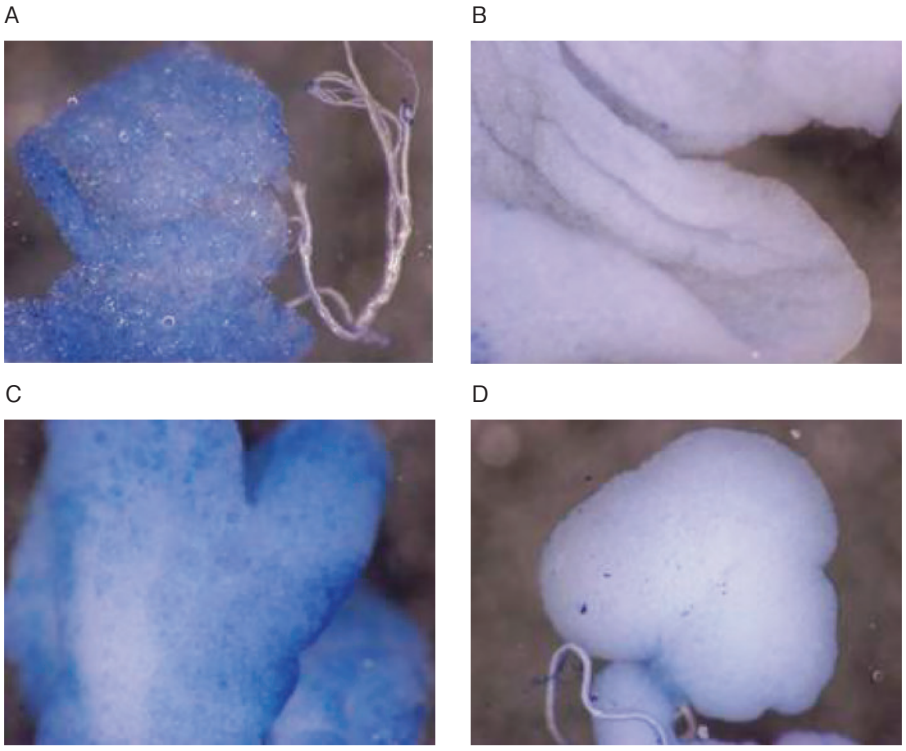

図 1：－20℃，2 時間処理におけるニカメイガ越冬幼虫脂肪体の傷害．
A グレース昆虫培養培地，B グレース昆虫培養培地＋グリセロール，C グレース昆虫培養培地＋グリセロール＋ $HgCl_2$，D グレース昆虫培養培地＋グリセロール＋ $HgCl_2$　5℃処理．（Izumi et al., 2006 より引用）

$HgCl_2$ を添加した培地では 5℃で 120 分処理してもほとんど取り込まなかった．非休眠幼虫の脂肪体では $HgCl_2$ の添加に関わりなく，グリセロールは脂肪体内にほぼ取り込まれなかった．また，5℃でグリセロールを取り込ませた後に－20℃まで冷却し培地を凍結させると，越冬幼虫の脂肪体では細胞内の水が細胞外に流出する一方，グリセロールは細胞外から細胞内に流入した．しかし，$HgCl_2$ を添加した培地中では，脂肪体内の水とグリセロールの量はほとんど変化しなかった（図 2）．これらの結果から，ニカメイガ越冬幼虫は体液中にグリセロールを蓄積させ，凍結時にアクアポリンを介して細胞内の水と体液中のグリセロールを速やかに置換することで，細胞内凍結が引き起こす凍結障害を回避していると考えられた（Izumi et al., 2006）．－50℃と非常に低い温度での凍結耐性を持つホシマダラバエの一種 *Eurosta solidaginis* においても，凍結耐性とアクアポリンとの関係が報告されている（Philip et al., 2008）．アクアポリンのなかでも，水のほかにグリセロールなどの低分子の物質を通すことのできるアクアグリセロポリンであるヒト AQP3 の抗体を用いて，低温時にヒト AQP3 様タンパク質の発現量が増加することを明らかにするとともに，水銀処理により凍結時に細胞死が引き起こされることが明らかになっている（Philip et al., 2008）．また，AQP3 様タンパク質の季節変化では，厳寒期にむけて膜画分における AQP3 様タンパク質の量が増加することも明らかにされている（Philip and Lee, 2010）．以上の結果より，凍結保護物質としてグリセロールを蓄積させる昆虫種の凍結耐性にはアクアポリンが深く関わっていることが示唆される．

3．凍結障害回避における休眠と低温順化の役割

いくつかの昆虫種の例外を除いて，多くの昆虫種では厳しい冬の寒さに耐えるためには，休眠と低温順化が不可欠である（Denlinger, 1991; Hodkova and Hodek, 2004; Danks 2005, 2006）．昆虫の主な凍結保護物質であるグリセロールなどの糖アルコールの合成と休眠との相互関係は三つのタイプにわけられる（Sø mme, 1982）．一つ目は糖アルコールの合成が休眠に関係なく低温のみによって誘導されるタイプ，二つめは外気温に関係なく休眠に入るだけで糖アルコールが合成されるタイプ，三つめは糖アルコールの合成に休眠と低温順化の両方を必要とするタイプである．ニカメイガでは，短日条件で誘導された休眠幼虫を低温順化したときにグリセロールは蓄積されるが，長日条件で飼育した非休眠幼虫ではたとえ低温順化してもグリセロールは蓄積されない（Tsumuki

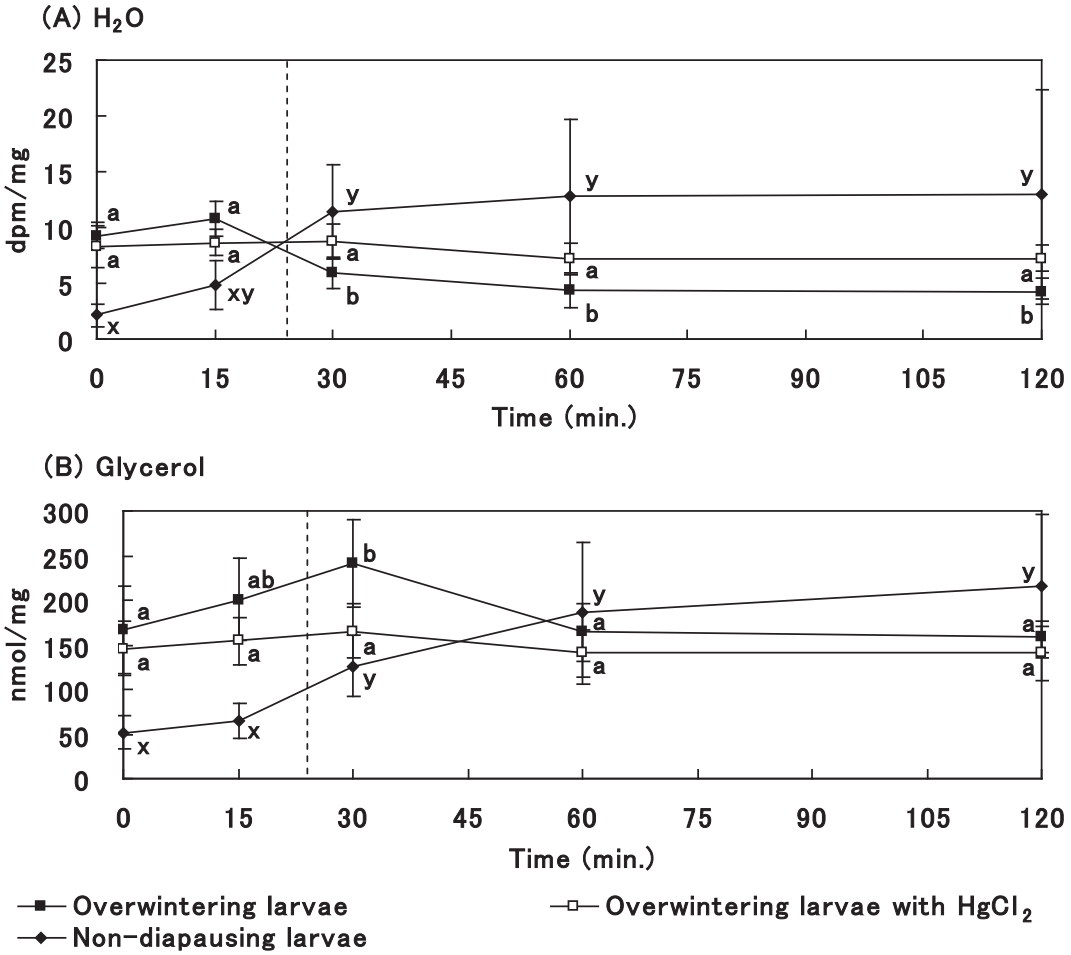

図 2：凍結時の水およびグリセロールの動態
(A) 水　(B) グリセロール　グラフ内の垂直の破線は平均の凍結時間を示す（Izumi et al., 2006 より引用）

& Kanehisa, 1980）．これらのことから，ニカメイガ幼虫は三つめのタイプであるといえる．しかしながら，ニカメイガ幼虫の凍結耐性はグリセロールが存在することだけでは獲得されない．

前述したように，越冬幼虫から取り出した脂肪体は，グリセロールを添加したグレース昆虫培養培地では－20℃で凍結させてもほとんど障害を受けないが，非休眠幼虫の脂肪体は非常に強い障害を受ける．また，越冬幼虫の脂肪体では，アクアポリンの関与により凍結過程で細胞外に水が流出し，細胞内にグリセロールが流入する．一方で，非休眠幼虫の脂肪体ではこのような機構はみられない．しかし，越冬幼虫は休眠と低温順化の両方を受けているため，この凍結障害回避機構には休眠と低温順化のどちらが重要なのか，もしくは両方が必要であるのかどうかは前述の実験ではわからない．そこで，凍結障害回避機構と休眠および低温順化との関係を明らかにするために，低温順化した，または順化していない休眠幼虫と非休眠幼虫の，脂肪体の凍結障害，および水とグリセロールの輸送について調査した．

各グループの幼虫より摘出した脂肪体の－20℃における凍結障害の程度を Table 1 に示した．グリセロールを添加していない培地で凍結させると，すべてのグループの幼虫の脂肪体は 60％以上の領域がトリパンブルーにより青く染色され細胞傷害を受けていた．グリセロールを添加した培地の中で凍結させても，低温順化した非休眠幼虫の脂肪体は $HgCl_2$ の添加，無添加に関わらず 60％以上の領域が染色された．グリセロールを添加した培地の中で，低温順化していない休眠幼虫の脂肪体を凍結すると，約 50％の領域が染色されたが，この染色領域は非休眠幼虫と比べると有意に小さかった．一方，低温順化した休眠幼虫の脂肪体はグリセロールを添加した培地の中で凍結させると，ほとんど染色されなかった．しかし，培地に $HgCl_2$ を添加して凍結させると，低温順化しなかった休眠幼虫と同じ程度（約 50％）染色された．

［^{14}C］グリセロールと［^{3}H］H_2O を用いた，トレーサー実験において，低温順化した休眠幼虫の脂肪体だけが，越冬幼虫の脂肪体と同様の動態を示した．低温順化した，および低温順化しなかった非休眠幼虫の脂肪体では

表 1：様々な培地における脂肪体の凍結傷害

Temperature	Medium	Blue colored area in fat body tissues (%)			
		Non-diapausing larvae		Diapausing larvae	
		Non-acclimated	Cold-acclimated	Non-acclimated	Cold-acclimated
5℃	Grace's medium	4.2±1.0a	4.0±0.5a	3.9±0.7a	3.8±0.5a
	Grace's medium with 0.25M glycerol	4.0±0.8a	4.1±0.7a	3.7±0.5a	4.0±0.6a
	Grace's medium with 0.25M glycerol and 0.2mM $HgCl_2$	3.5±0.8a	3.9±0.6a	4.2±0.9a	3.8±0.6a
−20℃	Grace's medium	68.5±8.4c	66.7±6.4c	64.3±7.9c	65.3±9.4c
	Grace's medium with 0.25M glycerol	65.3±7.5c	65.9±8.2c	48.4±9.8b	4.1±0.5a
	Grace's medium with 0.25M glycerol and 0.2mM $HgCl_2$	67.4±9.8c	66.1±5.3c	50.2±7.7b	49.9±9.3b

平均±標準誤差，異なるアルファベットは処理間で有意差があることを示す（$p<0.05$）（Izumi et al., 2007 より引用）

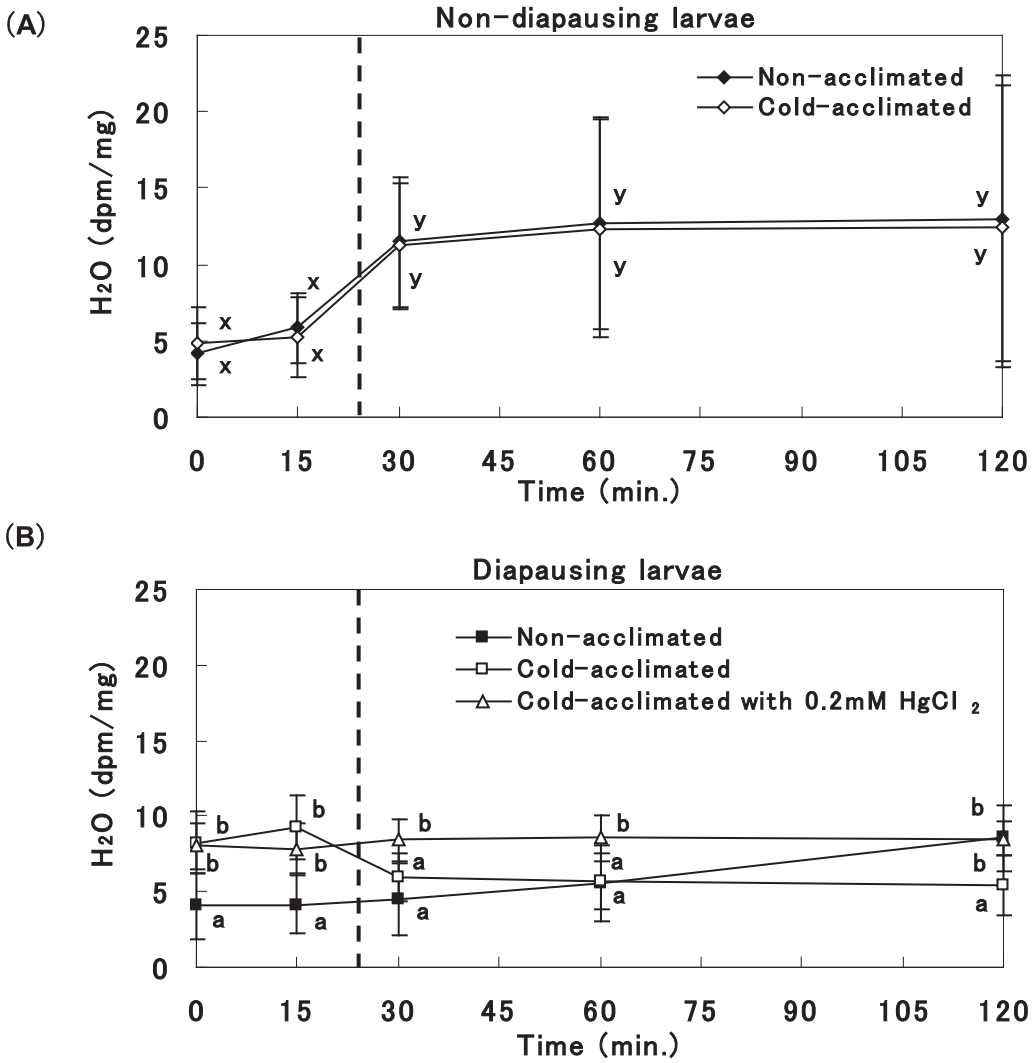

図 3：凍結時の水の動態
（A）非休眠幼虫　（B）休眠幼虫　グラフ内の垂直の破線は平均の凍結時間を示す（Izumi et al., 2007 より引用）

温度が下がるにつれて細胞内に水およびグリセロールの両方が急速に流入した．低温順化していない休眠幼虫の脂肪体においても水およびグリセロールの細胞内への流入が見られたが，非休眠幼虫よりも緩やかであった（図 3, 4）．これらの結果は，ニカメイガ幼虫における凍結障害の回避機構は休眠とその後の低温順化によりもたらさ

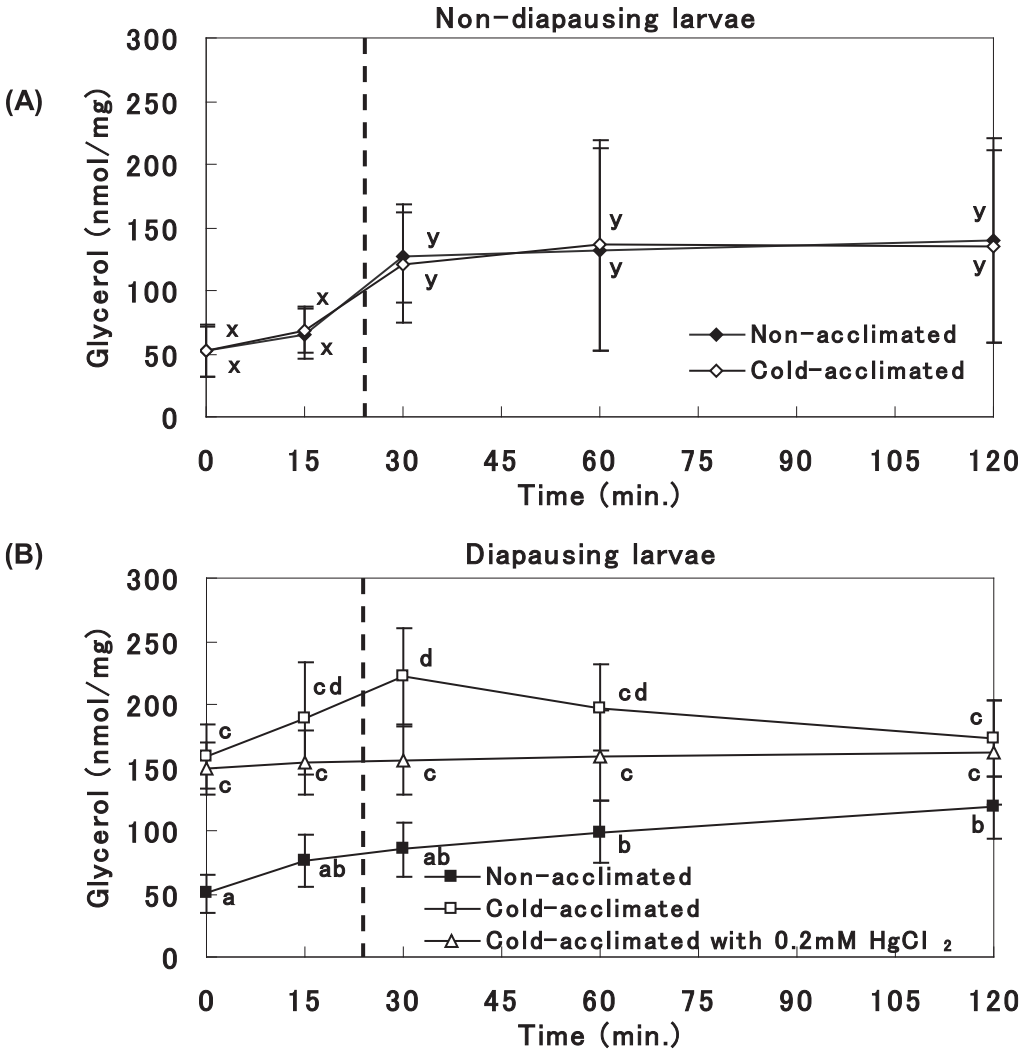

図4：凍結時のグリセロールの動態
（A）非休眠幼虫　（B）休眠幼虫　グラフ内の垂直の破線は平均の凍結時間を示す（Izumi et al., 2007より引用）

れることを示唆している（Izumi et al., 2007）.

休眠に入るだけでは，脂肪体は凍結障害回避機構を獲得することができないことが明らかとなった．野外では，ニカメイガ幼虫の休眠は初秋に誘導され，グリセロールはその後の低温により蓄積され，幼虫の凍結耐性は体内のグリセロール濃度の上昇とともに高くなり，1月中旬に最も高くなる（Tsumuki and Kanehisa, 1978; Tsumuki, 1990）．グリセロールは脂肪体で合成され体液中に放出され蓄積されるが，細胞膜を介した単純拡散によるグリセロールの透過性は非常に低いため，大量のグリセロールを体液中に放出するためには輸送する機構が存在すると考えられる．これまでの結果から，この機構にアクアポリン（アクアグリセロポリン）が関与しており，凍結時にはそれが速やかな水とグリセロールの置換を促していると推定される．中国の研究グループによりニカメイガの全ゲノム情報は公開されており，アクアポリンおよびアクアグリセロポリンと推定される遺伝子が存在することは明らかとなっているが，残念ながら今のところ脂肪体における水とグリセロールの輸送に関与するアクアポリン（アクアグリセロポリン）は特定できていない．

4. おわりに

ここまで，ニカメイガ越冬幼虫における凍結障害の回避機構について，主に細胞内凍結を回避するためのアクアポリン（アクアグリセロポリン）を介した水とグリセロールの置換について述べてきた．しかし，凍結耐性を持つ昆虫における凍結障害の回避はこれだけで達成されるものではなく，低温下での細胞膜流動性の維持に寄与するリン脂質の脂肪酸組成の変化（Izumi et al., 2009）や，不凍タンパク質等による体液における氷結晶成長の抑制

など様々な機構が組み合わさって達成されている．それぞれの機構の個々の詳細な役割と発現条件，および機構同士の相互作用を明らかにすることができれば，昆虫の凍結障害回避機構に関する研究の新たな展開が期待できると考えられる．

参考文献

Azuma, M., T. Nagae, M. Maruyama, N. Kataoka, and S. Miyake. (2012) Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes of insect epithelia: molecular basis for water recycling through the cryptonephric rectal complex of lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology* **58**: 523–533

Bale, J. S. (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transactions of the Royal Society* B, **357**, 849–862.

Benos D. S., Simon, S. Hohmann, P. Agre, and S. Nielsen (Eds.) (2001) *Aquaporins. Current Topics in Membranes*, vol. 51. Academic Press, New York

Beuron, F., F. Le Caherec, M. T. Guillam, A. Cavalier, A. Garret, J. P. Tassan, C. Delamarche, P. Schultz, V. Mallouh, J. P. Rolland, J. F. Hubert, J. Gouranton, and D. Thomas (1995) Structural analysis of a MIP family protein from the digestive tract of *Cicadella viridis*. *Journal of Biological Chemistery* **270**: 17414–17422.

Chaumont, F. B., E. Wojcik, M. J. Chrispeels, and R. Jung (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*. **125**, 1206–1215.

Danks, H. V. (2005) Key themes in the study of seasonal adaptations in insects I. Patterns of cold hardiness. *Applied Entomology and Zoology* **40**, 199–211.

Danks, H. V. (2006) Key themes in the study of seasonal adaptations in insects II. Life-cycle patterns. *Applied Entomology and Zoology* **41**, 1–13.

Denlinger, D. L. (1991) Relationship between Cold Hardiness and Diapause. Lee, R. E. and Denlinger, D. L. (ed.), *Insect at Low Temperature*, Chapman and Hall, New York and London, pp. 174–198.

Doebbler, G. F. (1966) Cryoprotective compounds. Review and discussion of structure and function. *Cryobiology* **3**, 2–11.

Duman, J. G. (2001) Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*. **63**, 327–357.

Edashige, K., Y. Yamajia, F. W. Kleinhans, and M. Kasai (2003) Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction* **68**, 87–94.

Hirai, M. and H. Tsumuki (1995) Characterization and localization of the ice-nucleating active agents in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Cryobiology* **32**, 209–214.

Hodkova, M. and I. Hodek (2004) Photoperiod, diapause and cold-hardiness. *European Journal of Entomology* **101**, 445–458.

Izumi, Y., S. Sonoda, H. Yoshida, and H. Tsumuki (2005) Identification of tissues showing the lowest tolerance to freezing in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Physiological Entomology* **30**, 324–331.

Izumi, Y., S. Sonoda, H. Yoshida, H. V. Danks and H. Tsumuki (2006) Role of membrane transport of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology* **52**, 215–220.

Izumi Y, S, Sonoda and H. Tsumuki (2007) Effects of diapause and cold-acclimation on the avoidance of freezing injury in fat body tissue of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Journal of Insect Physiology* **53**, 685–690.

Izumi, Y., C. Katagiri, S. Sonoda and H. Tsumuki (2009) Seasonal changes of phospholipids in last instar larvae of rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Entomological Science* **12**, 376–381.

Le Caherec, F., P. Bron, J. M. Verbavatz, A. Garret, G. Morel, A. Cavalier, G. Bonnec, D. Thomas, J. Gouranton, and J. F. Hubert (1996a) Incorporation of proteins into (Xenopus) oocytes by proteoliposome microinjection: functional characterization of a novel aquaporin. *Journal of Cell Science* **109**, 1285–1295.

Le Caherec F. S., Deschamps, C. Delamarche, I. Pellerin, G. Bonnec, M. T. Guillam, D. Thomas, J. Gouranton, and J. F. Hubert (1996b) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin: functional comparison with aquaporin 1. *European Journal of Biochemistry* **241**, 707–715.

Lovelock, J. E. (1953) The mechanism of protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta* **11**, 28–36.

Maurel, C. (1997) Aquaporins and water permeability of plant membranes. Annual *Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 399–429.

Mazur, P (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology*. Cell physiology **16**, 125–142.

Philip, B. N., S.-X. Yi, M. A. Elnitsky, and R. E. Lee (2008) Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Experimental Biology* **211**, 1114–1119.

Philip, B. N. and R. E. Lee (2010) Changes in abundance of aquaporin-like proteins occurs concomitantly with seasonal acquisition of freeze tolerance in the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Journal of Insect Physiology* **56**, 679–685.

Pietrantonio P. V., C. Jagge, L. L. Keeley, and L. S. Ross (2000) Cloning of an aquaporin-like cDNA and in situ hybridiza-

tion in adults of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Insect Molecular Biology* **9**, 407–418.

Polge, C., A. U. Smith, and A. S. Parkes (1949) Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature* **164**, 666–666.

Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre (1992) Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385–387.

Rasmussen, D. and B. Luyet (1970) Contribution to the establishment of temperature-concentration curves of homogeneous nucleation in solutions of some cryoprotective agents. *Biodynamica* **11**, 33–44.

Shlafer, M. (1981) Pharmacological considerations in cryopreservation. In Karow, A. M. & Pegg, D. E. (Ed) *Organ Preservation for Transplantation* Maecell Dekker, New York. pp. 177–212.

Sø mme, L. (1982) Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology* **73A**, 519–543.

Storey, K. B. and J. M. Storey (1992) Biochemical adaptations for winter survival in insects. In: Steponkus, P. L. (Ed.), *Advances in Low-temperature Biology 1*. JAI Press Ltd, London, pp. 101–140.

Takahashi, T. and A. Hirsh (1985) Calorimetric studies of the state of water in deeply frozen human monocytes. *Biophysical Journal* **47**, 373–380.

Tanghe, A. P. V. Dijck, F. Dumortier, A. Teunissen, S. Hohmann, and M. J. Thevelein (2002) Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Applied Environmental. Microbiology*. **68**, 5981–5989.

Tsumuki, H. and K. Kanehisa (1978) Carbohydrate content and oxygen uptake in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Berichte des Ohara Instituts für landwirtschaftliche Biologie*, Okayama Universität **17**, 95–110.

Tsumuki, H. and K. Kanehisa (1980) Effect of low temperature on glycerol and trehalose concentration in haemolymph of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology* **24**, 189–193.

Tsumuki, H. (1990) Environmental adaptations of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* and the blue alfalfa aphid, *Acyrthosiphon kondoi* to seasonal fluctuations. In: Hoshi M, Yamashita O (eds) *Advances in Invertebrate Reproduction*, vol. 5. pp. 273–278 Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Tyerman, S. D., C. M. Niemietz, and H. Bramley (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* **25**, 173–194.

Zachariassen, K. E. and J. A. Husby (1982) Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature* **298**, 865–867.

Zachariassen, K. E. & H. T. Hammel (1976) Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing. *Nature* **262**, 285–287 .