



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro; 朝比奈, 英三 他
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 159-163
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17631
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p159-163.pdf



越冬昆虫の体内にあるグリセリンについて*

竹原 一郎・朝比奈英三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和34年7月受理)

I.

数年前、朝比奈・青木・篠崎はイラガの越冬前蛹其他を材料として、耐凍性の高い昆虫ではその体が凍る場合に細胞外凍結を非常におこしやすいことを報告した。そしてこの様式の凍り方をするためにはこれらの昆虫の細胞を構成する原形質の性質ばかりでなく、細胞の浸されている血液の性質もまた重要であり、且高い耐凍性を保持するためにはその昆虫の細胞は細胞外凍結による高度の脱水と収縮にたえられる必要があることを指摘した¹⁾。このような考え方からすれば、何か非常に親水性に富む、高濃度でも生物細胞に無害な物質が細胞の内外に相当量存在していると甚だ好都合にちがいない。

一方生物材料の凍結保存法の研究が近年めざましく発展した結果、凍害防止剤としてのグリセリンの効果が最近とみに宣伝されてきた。たまたまグリセリンが昆虫の体内にも天然に存在することが発見された結果、昆虫の耐寒性の機構をグリセリン又はこれと似た性質の物質の存在によつて説明せんとする試みが行われるようになった。Salt は耐凍性のある昆虫の中にはグリセリンを体内にもつものがあることを明らかにしたが²⁾ 耐凍性の非常に高いコマユバチ *Bracon cephi* の幼虫にきわめて大量のグリセリンが含まれていることを発見するに及んで³⁾、最近ではこのような物質を充分に含んでいることが昆虫の耐凍性を高める必須の条件であると考えるに至つた⁴⁾。又茅野は蚕の卵では休眠中は卵内のグリコーゲンがその量に相当するグリセリンとソルビットに変換していることを明らかにし⁵⁾、これらの多価アルコールが蚕卵の耐寒性を休眠中に高めるのに役立つていると考えた⁶⁾。われわれが昆虫の耐凍性の研究の主材料としていままで使つて来たイラガにもグリセリンのあることが最近たしかめられた(青木・四益, 未発表)。

Salt はグリセリンの主要な凍害防止効果は凍結の際虫体内に生ずる濃縮塩溶液の濃度増加を小さくさせるためであると考えているが、われわれの得たデータにかぎり昆虫の凍害が果して温血動物の赤血球等でしられた塩害説に⁷⁾ よつて説明できるかどうかは未だきわめて疑問である。越冬イラガ前蛹の切り出された背脈管(心臓)を使つた実験では、少くとも媒液の

* 北海道大学低温科学研究所業績 第525号。

* 私信による

塩濃度の増加は凍結に際して直ちに凍害の増加をもたらすものではなかつた(未発表)。しかし前述のように虫体が凍るときに細胞外凍結をおこしやすくさせ、且この状態にある細胞を凍結による脱水や濃縮からまもる意味においてグリセリン等のような物質が虫体内にあると有利であることは当然予想され、又実際にわれわれも若干の昆虫にグリセリンの存在をたしかめている。現在までにわれわれの得た資料はまだきわめて不十分であるが、それぞれの昆虫の耐凍性の程度と対比してみると、耐凍性機構の研究の上に非常に興味深い手がかりをあたえるように思われるので、ここに予察的に報告することとした。

今回の実験に際して東京都立大学の茅野春雄氏からグリセリンの検出、定量についてのきわめて有益な御助言をいただいた。又東北大学の青木龍先生と四釜慶治氏からイラガ体内のグリセリン発見について御懇切なお知らせをいただいた。これらの方々にご厚くお礼を申し上げたい。

II.

使つた昆虫は主として越冬期又は越冬直後の状態の鱗翅類でその種名及びステータスは次の通りである。

イラガ	<i>Cnidocampa flavescens</i>	前蛹及び蛹
オオフタオビキョトウ	<i>Mythimna grandis</i>	幼虫
カブラヤガ	<i>Agrotis fucosa</i>	幼虫
シロヒトリ	<i>Spilosoma niveus</i>	幼虫
シンジュサン	<i>Philosamia cynthia pryeri</i>	蛹
キアゲハ	<i>Papilio machaon pippocrates</i>	蛹

このうちイラガ前蛹は越冬中のものを種々の温度で保存してその耐凍性をいろいろ変えさせて使つた。オオフタオビキョトウ・カブラヤガ・シロヒトリは何れも4月上旬に積雪の消えて間もない野外の土壌中より採集し、5°C内外の温度で1ヶ月程保存したものである。シンジュサン及びキアゲハは前年飼育して得た蛹を0°C内外に保存しておいた。*

これらの昆虫の耐凍性はキアゲハを除いていずれも今までテストずみのものばかりであるが、今回の虫体内のグリセリン検出にあつてあらためて数頭ずつをちようど耐えられる程度の低温で凍らせてみた。即ちそれぞれの昆虫をベトリ皿に入れて-5°C乃至-20°Cの恒温箱内におき、過冷却しやすいものはぬらした紙片を虫体の表面にはりつけて植氷した。こうして凍らせた虫体を適当な時間の後に融かして其後の回復の状態をしらべたのである。

虫体からのグリセリンの検出は次のようにして行つた。数ケの虫体を80%エチルアルコールと共に磨碎し、遠心して得た抽出液を蒸発乾固した。これをエーテルで洗つてから少量のピリジンを加えて遠心し上清を得た。この上清をペーパークロマトグラフィーの試料として、

* シンジュサン蛹は北大農学部養蚕学教室滝沢義郎助教授より、又キアゲハ蛹は帯広畜産大学小野映氏よりいただいた。貴重な材料を分けて下さつた両氏の御好意に厚くお礼を申し上げる。

ワットマン No.1 濾紙上に、n-ブタノール、醋酸、水 (4:1:2) を用いて展開した。発色はアルカリ性硝酸銀法¹⁰⁾ によつた。又、上記の方法で分離したグリセリンを過沃素酸で酸化し、クロモトローブ酸試薬で発色、比色定量⁴⁾ した。

III.

使つた昆虫の耐凍性のテストの結果をまとめて第1表に示したが、今回は種類によつては材料の頭数が甚だ少ないものがあつたので結果は生死の概略をしるすにとどめた。ただし生存としてあるのはその虫が単に融解後にうごくことができたというだけでなく、その大部分のものが全く平常に変態を行つて羽化できた場合をさしている。又同じ凍結温度で生存できた場合、凍結時間に長短があつても必ずしも耐凍性の高低をあらわしてはいない。

第1表 数種の昆虫の耐凍性

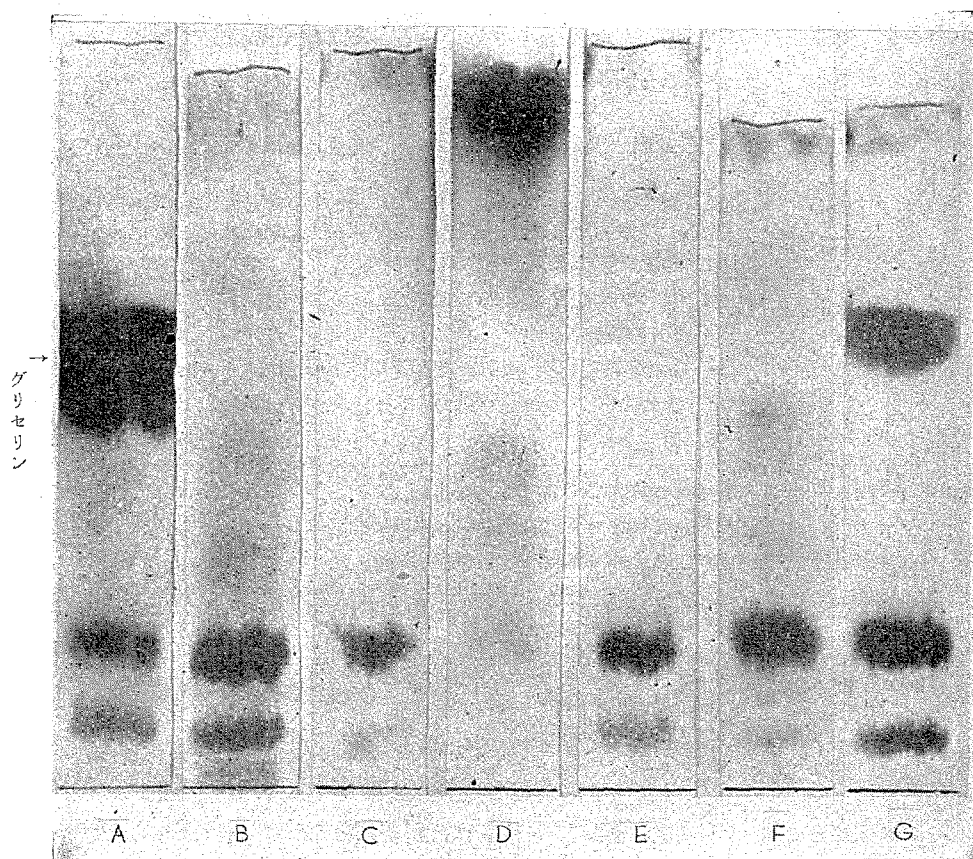
種名	時期	凍結温度	凍結時間	結果
イラガ	1. 越冬期前蛹 (5月まで -5°C 保存)*	-20°C	2日	生存
	2. 同上の前蛹 (7日間 20°C 保存)	-10°C	1時間	生存
	3. 5月の前蛹	-10°C	5時間	生存
	4. 蛹化直前の前蛹 (頭部突出型)	-5°C	10分	死
	5. 永久前蛹	-10°C	5時間	生存
	6. 蛹	-5°C	2分	死
オオフタオビキョトウ	越冬後の幼虫 (5°C で1カ月保存)	-5°C	6日	生存
カブラヤガ	越冬後の幼虫 (5°C で1カ月保存)	-10°C	15時間	生存
シロヒトリ	越冬後の幼虫 (5°C で1カ月保存)	-10°C	1日	生存
シンジュサン	越冬蛹	-5°C	10時間	死
キアゲハ	越冬蛹	-20°C	2日	生存

* 休眠は完全に終つている。

第1表のうちイラガ前蛹のみは材料のステージが複雑なので簡単に説明しておく、本種の越冬前蛹は札幌産のものでは1月初旬にはほとんど休眠からさめて 20°C の恒温におかれると30日以内に蛹化するが²⁾、 0°C 乃至 -5°C で保存された場合には変態の進行はみられず少なくとも数ヶ月間はほとんどその耐凍性は低下しない。自然状態では5月末頃までは外見上の変態の進行がみとめにくい、以後は次第に外形も変わり外部より刺戟すると筋肉が鋭敏に収縮するようになり、越冬中は体腔内に引こまれていた頭部が突出してくる。休眠中の前蛹を 20°C の恒温におくと遂に休眠からさめることなく、1年乃至3年もそのままの形態で生存している。このような状態のものをわれわれは永久前蛹と称しているが、この型の前蛹は休眠がやぶれて変態が少しでも進んだ前蛹に比べると同じ 20°C の温度に保存されていても耐凍性が高いのが常である²⁾。又イラガの蛹はきわめて凍結に弱く、一旦虫体の過冷却がやぶれて凍りだした際

はその直後に急速に温めて体内の氷をすぐ消失させない限りごく短時間のうちに凍死してしまう。

次にこれらの昆虫の体内にあるグリセリンを前記の方法で定性的にしらべたクロマトグラムを第1図に示した。これでわかるようにグリセリンを持つているのは供試した昆虫の中で最も耐凍性の高い越冬期のイラガ前蛹とキアゲハ蛹の二つのみであつた。又グリセリン以外にもクロマトグラムの上に少なくとも二つのスポットとして認められる糖類が見出されたが、これはシロヒトリを除いたすべての虫体に存在していた。



第1図 数種の昆虫の抽出液のクロマトグラム

- A イラガ越冬前蛹, B 蛹化直前のイラガ前蛹, C オオフタオビキョトウ幼虫
D シロヒトリ幼虫, E カブラヤガ幼虫, F シンジュサン蛹, G キアゲハ蛹

次に耐凍性の異なる各ステージのイラガと、キアゲハ蛹を使ってグリセリンを定量した結果をのべる。イラガでは休眠期を終った越冬中のもの又はこれを -5°C で5月まで保存したものは生体重当り1~2%内外、これと同状態の前蛹を7日間 20°C の恒温においてやや筋肉の収縮が敏感になつたものは1%以下のグリセリンを含んでいた。しかし同じイラガでも第1表の

3, 4, 5, 6に当るもの、即ち4月乃至5月まで外気温においた前蛹、蛹化が近づき頭部が突出した前蛹、永久前蛹型となつた休眠前蛹、蛹等には全くグリセリンが検出されなかつた。又キアゲハの越冬蛹には0.5%程度のグリセリンが見出された。

これらの結果によると少なくともイラガでは耐凍性の高い時期には虫体内にグリセリンが存在しているらしい。イラガの越冬前蛹中にあるグリセリンの量は *Bracon cephi* で Salt が発見した20%内外という値⁹⁾よりはけたちがい少ない。又彼によれば2%内外という程度のグリセリン含量は耐凍性のないといわれるビートのめいが *Loxostege sticticalis* の幼虫にも見出されている⁸⁾。一方耐凍性の高さからみればイラガ前蛹及びキアゲハ蛹は現在までしられた越冬昆虫の中で最高級のもので、双方共 -30°C で予備凍結させると -183°C に及ぶ超低温での冷却にも耐えられることが知られている³⁾。又ここで明らかにされたように全くグリセリンを含まない昆虫にも -5°C 乃至 -10°C で相当長時間の凍結に耐えられるものがあることはまことに興味深い事実である。昆虫の耐凍性についてこのような「保護物質」の役割を重視するとすれば、必然的にグリセリン以外の有効物質や、これらの物質が関与する機構について検討されねばならないが、それらのことがらについては更に充分な資料をととのえてからふれたいと思う。

文 献

- 1) Asahina, E., K. Aoki, and J. Shinozaki 1954 The freezing process of frost-hardy caterpillars. Bull. Ent. Res., **45**, 329.
- 2) Asahina, E. 1959 Diapause and frost-resistance in a slug caterpillar. Kontyû, **27**, 47.
- 3) Asahina, E. 1959 Nature, 印刷中.
- 4) Burton, R. M. 1957 The determination of glycerol and dihydroxyacetone. Methods in Enzymology, (edited by S. P. Colowick & N. O. Kaplan) Academic Press, N. Y. Vol. III, 246.
- 5) Chino, H. 1958 Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*. II. Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. J. ins. Physiol., **2**, 1.
- 6) 茅野春雄 1959 カイコの休眠卵で見出されたソルビットおよびグリセリンの凍結防止剤としての可能性. 日本動物学会関東支部第11回大会講演.
- 7) Lovelock, J. E. 1953 The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. Biochim. Biophys. Acta, **11**, 28.
- 8) Salt, R. W. 1957 Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. Can. Entomologist, **89**, 491.
- 9) Salt, R. W. 1959 Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). Can. J. Zool., **37**, 59.
- 10) Trevelyan, W. E., D. P. Procter, and J. S. Harrison 1950 Determination of sugar on paper chromatograms. Nature, **166**, 444.
- 11) Wyatt, G. R. and G. F. Kalf 1956 Organic components of insect haemolymph. 10th Int. Congr. Ent. (Abs.).