



Title	ポプラハバチの耐凍性 III : 耐凍性と糖含量
Author(s)	丹野, 皓三; TANN0, Kouzou
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 55-64
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17695">https://hdl.handle.net/2115/17695</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p55-64.pdf



## ポプラハバチの耐凍性 III\*

### 耐凍性と糖含量

丹野 皓三

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和40年7月受理)

### I. 緒言

従来耐凍性の高い生物中には生物細胞を凍結のときの原形質からの脱水や細胞の内外における水溶液の濃縮から保護する作用のある物質が比較的少量に存在すると考えられており、そのような物質として植物では糖類が動物では多価アルコールが重要視されて来た。昆虫ではその体液に微量にしる糖類をもつものは極めて普通であるが<sup>1)</sup>、今までに発見された耐凍性の高い昆虫に比較的少量のグリセリンのあるものが多かったために、昆虫の耐凍性に糖が関与する可能性は全く論じられたことがなかった<sup>2,3)</sup>。

ところが昨年非常に高い耐凍性を示すポプラハバチの越冬前蛹が多価アルコールはほとんど持っていないがトレハロースを主とする極めて少量の糖類を体内に含んでいる事実が発見された<sup>4,5)</sup>。本文ではこの虫の終齢幼虫から成虫になるまでの変態にともなう耐凍性の変化とトレハロース含量の季節的変化との関係についてのべる。

### II. 材料と方法

**材料：**1964年8月中旬から9月初旬にかけて越冬場所を探しあっているポプラハバチ、*Trichiocampus populi* Okamoto, の終齢幼虫を札幌で採集した。この虫に枯れたオオハングソウの髓を10cmほどに切ったものを与えてやると、すぐその髓の中にもぐりこみ3日後繭を完成して前蛹に変態した。これをガラスのデシケーターに入れ室温を外気温と同じにさせた日光の当たらない飼育室に保存した。昨年の実験結果を検討したところ、雄の方が同時期の雌にくらべて約2割ほど高い生体重あたりの糖含量を持っていた(未発表)。それで耐凍性等の点では雌雄間に差はなかったので今回は雌だけを使った。

**全糖の定量：**虫体を1個ずつ磨碎して5~10mlの80%エタノールで抽出した。これを遠沈して得た上清液の0.05~0.5mlに5mlのアンスロン試薬<sup>6)</sup>を加え100°Cで10分間加熱した。これを急冷却させて620m $\mu$ の吸光度を分光光度計で測定した。

**トレハロースの化学的定量：**前報<sup>4)</sup>と同じ方法で行なった。全糖量を調べた場合と同様

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第734号

にして得た上清液の 0.05~0.5 ml を蒸発させ残渣を得た。この残渣を 0.3 ml の 1 N  $H_2SO_4$  で再溶解させ、100°C で 10 分間加熱後さらに 0.2 ml の 6 N NaOH を加え 100°C で 10 分間加熱した<sup>7)</sup>。冷却後アンスロン法で定量した。

**グリコーゲンの定量：** 糖類を抽出した残りのアルコール不溶の残渣に 0.5 ml の 30% KOH を加え 100°C で 20 分間加熱した<sup>8)</sup>。冷却後 4.5 ml の 80% エタノールと活性炭を加えて遠沈し、この上清液についてアンスロン法で定量した。

**含水率の測定：** 虫を 1 個体ずつ秤量してからそれぞれ小形のペトリ皿に入れ 105°C の温度で 8 時間風燥した。最初の生体重と風燥後の体重との差を含水量とし、百分率であらわした。

**耐凍性の観察：** 通常 10 個の虫体をペトリ皿にとり、低温室内の恒温箱において凍結させた。この虫は過冷却点が高いので -10°C 以低の気温では植氷しなくても約 10 分ほどで虫体は凍りだす。24 時間凍らせておいた後室温の空气中で融解し、体の外面から心臓のうごきを観察し、又運動の有無や変態の進行によって生死を判定した。耐凍度は凍結させた個体の 60% 以上が融解後 30 日以上生存できる最低の温度であらわした。耐凍度が -30°C 以低に及ぶ程高い場合は虫を液体窒素中で凍結生存させるための予備凍結温度を変えることにより調べた<sup>4,9,10)</sup>。予備凍結温度としてそれぞれ -15°, -20°, -25°, -30°C を用い、90 分間予備凍結した。

### III. 結 果

#### 1. 生態観察

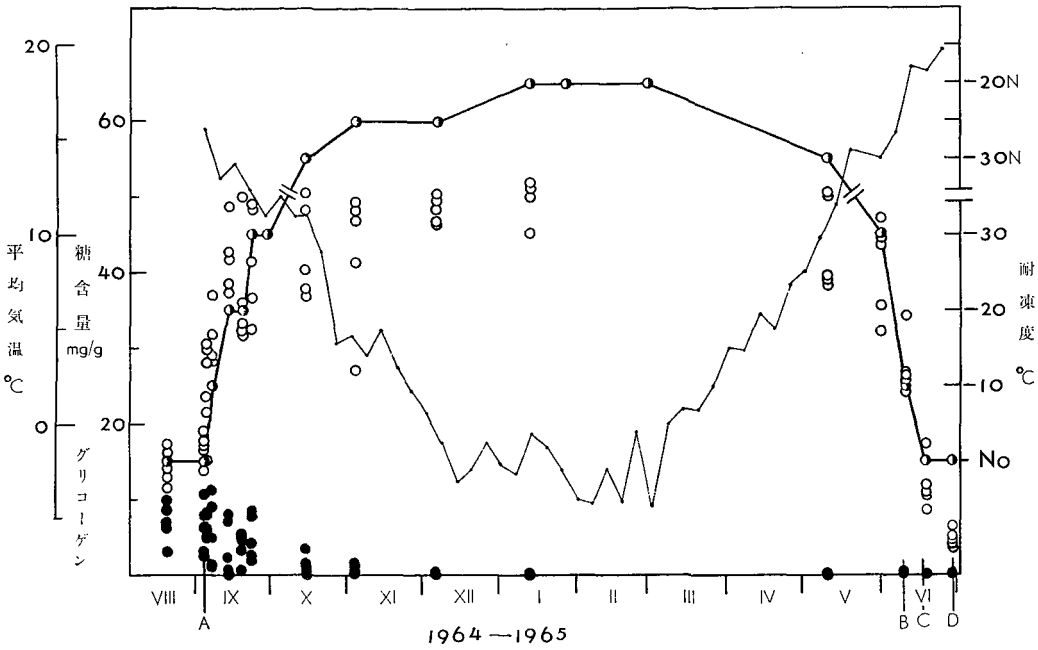
札幌の 8 月中旬から下旬にかけてポプラの葉裏にポプラハバチの 4 齢幼虫 (図版 I-1) と 5 齢幼虫 (図版 I-2) が見られる。1 枚の葉に 10 匹前後の虫が平行に並んで盛んに葉を食べている。葉柄をつたわって次の葉に集団で移動し、再び平行に並んで葉を食べはじめる。この場合に集団からはなれて別の葉に移動するものはほとんどいない。4 齢から 5 齢へ脱皮する時も集団は同一の葉の上でほとんど同時にする。この集団に人間の息を吹きかけたりして刺戟すると図版 I-1 に示したように葉の中央に集まりしばらく静止している。

8 月下旬から 9 月上旬になると 5 齢虫は集団からはなれてポプラの木をつたわり地面において来てそれぞれ越冬場所を探しはじめる (図版 I-3)。この時期の幼虫は摂食時の 5 齢幼虫が黄色であるのにくらべて橙色がかっている。地面におりた虫はポプラの樹下にはえている、ニワトコ、オオハンゴンソウ、タラノキ、アシ、等の枯れた茎や枝の髓の中に大顎で穴を掘って入りこみ (図版 I-4)、その中で繭を作りはじめる。きぬ糸でできたうすい繭は 3 日間で完成し前蛹となる (図版 I-5)。この状態で越冬するが、そのあいだニワトコの髓に入ったもののように雪上にさらされるものもすくなくなかった。

翌年の 6 月中旬になるとこの前蛹は外観が棒状になり、蛹に似て来る (図版 I-6)。そしてまもなく蛹化し (図版 I-7)、約 2 週間後成虫になる (図版 I-8)。

#### 2. 耐凍性と糖

終齢幼虫から成虫になるまでの耐凍性の変化を季節的においかけた。第 1 図に示したように幼虫はいずれも凍結しさえすればただちに死亡した。ところがわずか 3 日後の繭を完成した



第1図 耐凍性, 糖, グリコーゲン, 及び気温の季節的变化

- : 耐凍度 (60% 以上の個体が1日生存出来る最低の凍結温度)
- No: 非耐凍性
- 20 N: -20°C で予備凍結した後液体窒素中に投入
- : 糖含量
- : グリコーゲン
- : 気温
- A: 摂食終了終齢幼虫 B; 外観が蛹の形態に近くなった前蛹
- C: 蛹 D; 成虫

前蛹では -10°C で 24 時間の凍結に耐えられるようになった。そして 20 日後にはすでに -30°C で 24 時間の凍結に十分耐えられるようになり、又液体窒素の温度に耐えられる個体もあった。

この比較的短期間での耐凍性の顕著な増大は外的な条件、例えば気温の降下等によって直接支配されているとは思われない。というのは、8 月中旬に幼虫から前蛹になったものでも 9 月中旬になったものでもまったく同じ耐凍性の増大過程を示すから、耐凍性の増大する主要因は虫自身の変態に内在していると思われる。

耐凍性の高い昆虫はその耐凍度が -30°C 程度に向上したところには更にこれを超低温まで冷却しても生存出来ることがわかっている<sup>9,10)</sup>。そこで予備凍結法<sup>10)</sup>によって -30°C 以下の温度での耐凍性を調べた。10 月中旬になると -30°C で予備凍結してやると液体窒素の温度まで耐えられるようになる。1 月になると前蛹は -20°C の予備凍結でも生存出来るようになり、最高度の耐凍性をしめた。しかし液体窒素の温度まで冷却されたものでは正常に蛹化は出来るが成虫になる段階で例外なく脱皮に失敗した。-15°C の予備凍結では液体窒素に投入後融解するとすぐ体壁から体液が流出してすべて死亡した。6 月の初旬までこの前蛹は -30°C で 24

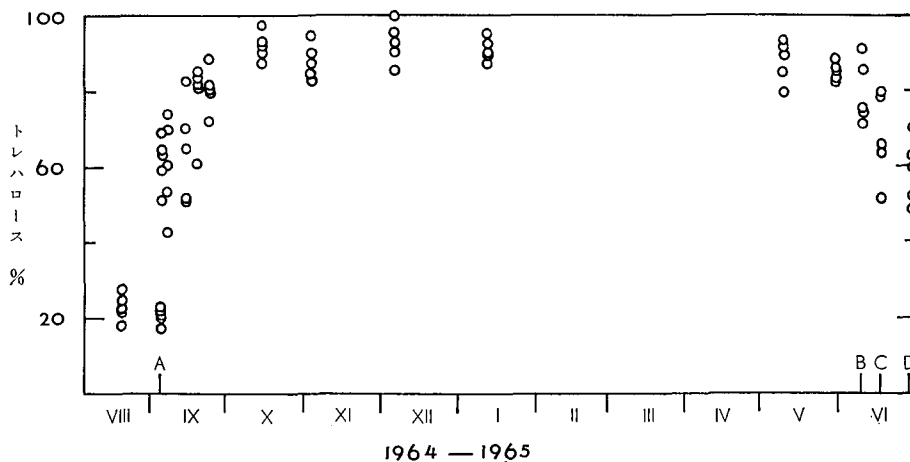
時間の凍結に耐えられるが、中旬に外観が棒状になり蛹の形態に近くなると(図版 I-6)、急に耐凍度は小さくなり  $-10^{\circ}\text{C}$  になった。蛹及び成虫では凍結しさえすればただちに死亡した。

耐凍性の観察と平行して体内にある糖量の季節的変動を調べた。その結果耐凍性の変化と糖の変動との間に密接な平行関係がみられた(第1図)。摂食をやめて越冬場所をさがしている幼虫では生体重  $1\text{g}$  あたりの糖含量は  $16.8 \pm 1.7\text{mg}$  であつたが、前蛹になると急速に増加し20日後には  $39.6 \pm 5.3\text{mg/g}$  になった。この間耐凍性の増大が密接に平行しておきていた。一方、グリコーゲンは最初  $6.0 \pm 3.4\text{mg/g}$  あつたのがこの間に減少して40日後にはほとんどなくなった。この結果からグリコーゲンから糖が生成される可能性は十分に考えられる。しかしこの急激な糖の増加をグリコーゲンだけで量的に説明出来ないように見える。これは糖量を表わすのに生体重あたりで表現していることに原因がある。第3図に示したようにこの時期に急激な生体体重の減少があり、その結果生体重の小さくなった前蛹ではこの表現での糖含量が大きくなる。第1図と第3図を組合わせてみるとグリコーゲンと糖量の和はその絶対量はほとんど変化していないことがわかる。10月中旬になると前蛹の糖含量は最大に達し、その後越冬期間中翌年の6月初旬までこのレベルを維持していた。

6月の中旬に外観が棒状になり蛹の形態に近くなると耐凍度の低下と平行して糖含量は急速におちをはじめ、非耐凍性の蛹では  $11.7 \pm 2.9\text{mg/g}$  となり、同じく非耐凍性の成虫では  $4.6 \pm 1.0\text{mg/g}$  に減少した。しかしこの時期にグリコーゲンはほとんど含まれていなかった。

### 3. トレハロース

前蛹の時期の糖類がトレハロースを主体としている事実を前報<sup>4)</sup>で述べた。今回は終齢幼虫から成虫まで調べた。第2図に示したように摂食を終了した幼虫において、その糖の  $20.6 \pm$



第2図 虫体が含む糖類の中で占めるトレハロースの割合の季節的变化

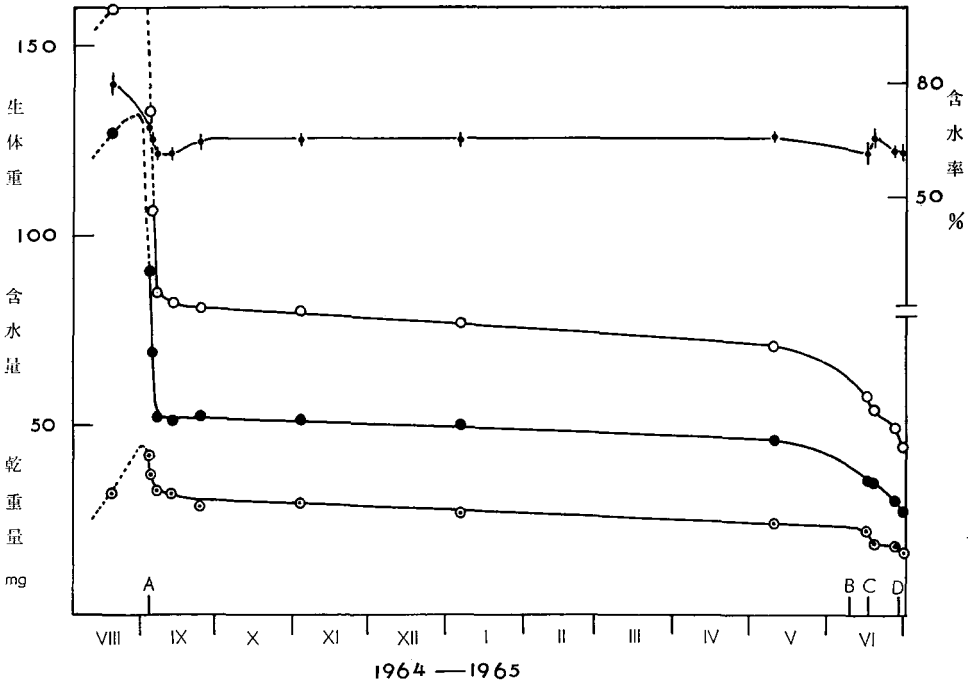
- A: 摂食終了終齢幼虫
- B: 外観が蛹の形態に近くなった前蛹
- C: 蛹
- D: 成虫

2.0% がトレハロースであった。この幼虫が3日後繭を完成して前蛹になると、糖類の中で占めるトレハロースの割合は急に増し  $61.8 \pm 7.9\%$  となり、40日後の10月中旬には  $92.0 \pm 3.4\%$  となった。この高いトレハロースのレベルは翌年の6月初旬まで続き。中旬になって前蛹が蛹の形態に近くなるとさがりはじめ、蛹では  $67.7 \pm 10.5\%$  になり、成虫では  $56.5 \pm 10.1\%$  となった。この顕著なトレハロースの季節的増減は、全糖量の場合と同様に耐凍性と密接な平行関係を持っていることがわかる。

4. 生体重と含水率の季節的変動

終齢幼虫から成虫になるまでの生体重と含水率の変化を実測し、この結果から含水量と乾重量を計算した。結果を第3図に示した。まず含水率についてみるとポプラの葉を食べている終齢幼虫では  $79.2 \pm 2.1\%$  であったが、摂食終了幼虫では  $68.1 \pm 1.1\%$  になった。繭を作りはじめるといくぶん減少して3日後には  $61.2 \pm 1.4\%$  であった。20日後  $64.8 \pm 1.7\%$  となり、以後翌年の6月初旬まではほとんどこの値を示した。蛹化直前になると  $61.3 \pm 2.5\%$  といくぶん減少するが、蛹化すると前蛹とほとんど同じ  $65.6 \pm 2.4\%$  になった。羽化直前に含水率はふたたび低下し成虫では  $61.8 \pm 2.0\%$  であった。

次に生体重についてみると幼虫から前蛹になるわずか3日間に急激な減少がおきているこ



第3図 生体重、含水率、含水量及び乾重量の季節的変化

- ↓ : 含水率      A : 摂食終了終令幼虫
- : 生体重      B : 外観が蛹の形態に近くなった前蛹
- : 含水量      C : 蛹
- ◎ : 乾重量      D : 成虫

とがわかる。この減少は含水量の減少が主な要因である。又この時期に乾重量も減少するが、40匹のはき出した繭の重量をはかったところ1匹あたり7.6mgであったから、この時の燥重量の減少をこの繭で説明することが出来る。

越冬期間中生体重はゆっくりと直線的に減少するが、これは含水量と乾重量がほぼ同率に減少するためである。5月の中旬ごろから生体重は急に減少しはじめ蛹化し、さらに羽化する過程ですます減少する。この場合も含水量と乾重量はほぼ同率で失なわれて行くが失なわれる絶対量を比較すると、乾重量はあまり減少しないことがわかる。

このように繭化、蛹化、羽化のそれぞれの時期に、激しい体重の減少がおきており、これらの時期は又耐凍性の著しい変化がおきるときでもある。

#### IV. 考 察

従来種々の越冬昆虫の体内にグリセリンが検出されており、特に耐凍性の高いものではほとんど例外なく検出されていた<sup>2,3)</sup>。そのため昆虫では耐凍性と関連づけてグリセリンが重要視されて来た。ところで昆虫の体液に微量にしる糖類が含まれている場合は極めて普通であるが昆虫の耐凍性に糖が関与する可能性は全く論じられなかった。前報でこの耐凍性の高いポプラハバチの前蛹がグリセリン及び他の多価アルコールを含んでおらず、そのかわりトレハロースを主体とする多量の糖類を含んでいる事実について述べた<sup>4)</sup>。今回の実験では耐凍性の変化と糖含量の変動とのあいだに密接な平行関係がある事実を明らかにした。これらの実験はすべて糖と耐凍性との間の因果関係を直接に解明しているものではないが、あまりにも密接な平行関係がある事実を考えると、糖の存在が昆虫の耐凍性を高めるひとつの要因となっているにちがいないと思われる。

もちろん糖類の存在だけが耐凍性を高める要因でないことは、今まで発見された昆虫のなかで最大量の糖類を含んでいるツヤハナバチの一種 *Ceratina* が非耐凍性である<sup>11)</sup> ことから考えて明らかである。

ポプラハバチの糖類の中でもトレハロースの変動が特に耐凍性と密接に関連している事実は、同じトレハロース型\*に属するサツカロースが植物の耐凍性と関連している事実<sup>12)</sup> と比較して非常に興味がある。

ところで繭化、蛹化、羽化のそれぞれの時期に激しい体重の減少がおきており、この時期に耐凍性の著しい変動が平行しておきている。もちろんこの体重の減少が耐凍性に直接関係を持っているとは考えられないが、繭化のさいにみられたように、含水量の減少によって糖濃度を相対的に高め、間接的に耐凍性に関係している可能性も十分考えられる。

ポプラハバチの他にもおそらく耐凍性の高い越冬昆虫の中には、トレハロース式のものがかなりいるのではなからうか。例えば Sømme (1964) がみつけたタマバエの一種 *Eura nodus* の越冬幼虫のように高い耐凍性を示しながらグリセリン或は他の多価アルコールを持ってい

\* トレハロースのように六炭糖がおたがいに還元基で結合して出来ている二糖類。

ないものでは<sup>13)</sup>、ポプラハバチのようにあるいは多量のトレハロースを含んでいるかもしれない。

終りに実験の指導並びに御校閲くださった朝比奈教授に感謝する。

## V. 摘 要

ポプラハバチ, *Trichiocampus populi* Okamoto, を材料として終齢幼虫から成虫になるまでの耐凍性の変化と糖量の変動との関係を季節的に調べた。その結果、耐凍性と糖、特にトレハロースとの間に密接な平行関係がみられた。

1. ポプラハバチの変態時期は下記のとおりである。8月中旬—摂食中の5齢幼虫, 9月上旬—摂食終了5齢幼虫, 同3日後に繭を完成して前蛹となり, 以後翌年6月初旬までこの状態である。6月中旬にこの前蛹は, 外観が棒状になり蛹に似てくる。数日後—蛹化。6月下旬—羽化。

2. 幼虫はいずれも非耐凍性であるが, 繭を作り前蛹になると耐凍性は急速に高まり, 40日後には液体窒素の温度まで耐えられるようになる。これと密接に平行して糖量の増大がおきている。1月になると前蛹は  $-20^{\circ}\text{C}$  の予備凍結でも液体窒素に十分たえられるようになり最大の耐凍性を示す。この高い耐凍性は翌年の6月初旬まで続くが, 中旬に前蛹の形態が蛹に近くなると急に  $-10^{\circ}\text{C}$  以上の凍結温度にしか耐えられなくなる。蛹と成虫は非耐凍性である。この耐凍性の低下と平行してやはり糖量が減少する。

3. 液体窒素の温度で生存したものは正常に蛹化出来るが, 成虫になる段階で例外なく脱皮出来ない。

4. 前蛹期に虫体に含まれる糖類の主体はトレハロースである。糖類のうちでトレハロースが占める割合は耐凍性と密接な平行関係を持っている。耐凍性の高い前蛹の時期ではその割合は90%前後であるのに対して, 非耐凍性である幼虫, 蛹, 成虫では20~68%である。

5. 幼虫はグリコーゲンを持っているが, 前蛹になる過程で糖量が増加するときグリコーゲンは減少し, 40日以後の前蛹, 蛹及び成虫ではほとんどみられない。

6. 繭化, 蛹, 羽化のそれぞれの時期には激しい体重の減少がおきている。この時期は又耐凍性が著しく変化する時でもある。

## 文 献

- 1) Wyatt, G. R. 1961 The biochemistry of insect hemolymph. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 75-102.
- 2) Salt, R. W. 1961 Principles of cold-hardiness. *Ann. Rev. Entomology*, **6**, 55-74.
- 3) Asahina, E. 1964 Freezing and frost-resistance in insect. In *Cryobiology* (H. T. Meryman, ed.) Academic Press, London,
- 4) 丹野皓三・朝比奈英三 1964 ポプラハバチの耐凍性 I. 低温科学, 生物篇, **22**, 59-70.
- 5) Asahina, E. and Tanno, K. 1964 A large amount of trehalose in a frost-resistant insect. *Nature*, **204**, 1222.
- 6) Mokrasch, L. C. 1954 Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **208**, 55-59.
- 7) Wyatt, G. R. and Kalf, G. F. 1957 The chemistry of insect hemolymph II Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.*, **40**, 6, 833-847.
- 8) Balmain, J. H., Bigger, J. D. and Claringbold, P. J. 1956 Micromethod for the estimation of glycogen in the genital organs of the mouse. *Australian J. Biol. Sc.*, **9**, 139-158.
- 9) 酒井 昭 1956 超低温における植物組織の生存. 低温科学, 生物篇, **14**, 17-23.
- 10) 朝比奈英三・青木 藤 1958 耐凍性昆虫を超低温で凍結生在させる一つの方法. 低温科学, 生物篇, **16**, 55-63.
- 11) 丹野皓三 1964 越冬期のツヤハナバチに含まれる多量の糖類. 低温科学, 生物篇, **22**, 51-58.
- 12) 酒井 昭 1960 木本類の耐凍性増大の過程 VII. 糖類の季節的変動 (2). 低温科学, 生物篇, **18**, 1-14.
- 13) Sømme, L. 1964 Effects of glycerol on cold-hardiness in insects. *Can. J. Zool.*, **42**, 87-101.

## Summary

The poplar sawfly, *Trichiocampus populi* Okamoto, was examined in the developmental stages from full grown larva to adult with regard to its frost-resistance and related properties.

1) All larvae are killed by freezing even at a temperature of  $-10^{\circ}\text{C}$ . Their sugar content is  $1.68 \pm 0.17$  per cent, based on their fresh body weight. After spinning cocoons they transform into prepupae, during such transformation, their frost-resistance is rapidly enhanced in accordance with the increase of sugar content.

Prepupae can withstand liquid nitrogen temperature at the 40th day after spinning the cocoon, provided they have been previously frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$ . Their sugar content is  $4.27 \pm 0.56$  per cent. In January, prepupae can survive liquid nitrogen temperature after previous freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . After thawing from the super-low temperature, some of them are able to resume development up to the formation of imago, but cannot shed their pupal skins. Such high levels of frost-resistance and of sugar content persist throughout the five months cold season.

When the environmental temperature become warm and the transformation to pupa begins to occur in prepupa at the middle of June in the following year, the frost-resistance decreases to a temperature of  $-10^{\circ}\text{C}$  in accordance with the decrease of sugar content.

A few pupae can survive freezing at  $-10^{\circ}\text{C}$  for one day, and their sugar content is  $1.17 \pm 0.29$  per cent. All adults are invariably killed by freezing even at a temperature of  $-10^{\circ}\text{C}$ , and their sugar content is  $0.46 \pm 0.10$  per cent (Fig. 1).

2) About 90 per cent of the total sugar content in the frostresistant prepupa is trehalose. This persists throughout the five months cold season. On the other hand, trehalose levels in nonfrost-resistant larvae, pupae and adults are,  $20.6 \pm 2.0$ ,  $67.7 \pm 10.5$  and  $56.5 \pm 10.1$  per cent respectively (Fig. 2).

3) Larvae contain glycogen of about 0.6 per cent, based on their fresh body weight. Contrary to the increase of sugar content, glycogen decreases as larvae transform into prepupae. There is little glycogen in prepupae at the 40th day after spinning cocoon, and this persists up to the adult stage (Fig. 1).

4) In the stages of pupation, emergence, and especially cocooning, rapid decrease of fresh body weight in the insect occurs parallel with the remarkable change in frost-resistance. This mainly depends on the loss of water content in the insect body (Fig. 3).

## 図 版 説 明

## 図版 I

1. ポプラハバチ 4 齢幼虫 ×1
2. ポプラの葉を摂食中の終齢幼虫 ×1
3. 摂食終了した終齢幼虫 ×1
4. 枯枝に穴をあけてもぐりこもっている終令幼虫。この中で3日後繭を完成して前蛹になる。×1
5. 越冬前蛹 ×4
6. 蛹化が近づいた前蛹 ×4
7. 蛹 ×4
8. 成虫 ×4

