

ウエタの低温耐性と脂質輸送タンパク質 lipophorin について

後藤由佳子（先端技術支援室）、
岩崎正純、落合正則、片桐千俣（昆虫生化）



図1 ウエタ
(*Hemideina femorata*)

1 はじめに

ニュージーランド固有の昆虫であるウエタ(*Hemideina femorata*、図1)は、2億年近くもその外部形態を変えずに生存してきた生きた化石であり、その生態や生理が注目されている。変温動物である昆虫は、普通氷の上では麻痺して動くことができないが、ウエタは氷の上で1時間以上冷やしても動き続けることができる。昆虫生化学グループの研究テーマの一つとして、昆虫の環境適応を脂質の機能から探っている。低温にも耐えられるウエタの体液中にある脂質輸送タンパク質 lipophorin の精製を試み、その脂質組成について、他の昆虫との比較を中心に実験を進めた。

2 実験方法

Lipophorin は昆虫の体液中にある主要なタンパク質の一つである。脂質を含むため、他のタンパク質よりも密度が低い。カイコからの高純度精製法については以前技術報告会で報告した(後藤、2006)。ウエタの lipophorin 精製は、カイコですでに確立した方法で行った(図2)。最初に緩衝液をウエタの体内へ注入した後、後肢を切断して体液を採取した。遠心分離により体液から血球を取り除いた後に、密度勾配遠心法(336,000×g、15時間)で上層から500 μL ずつ分取し、フラクションを得た。Lipophorin は含有するカロテノイドにより黄色を呈するため、450 nm の波長の吸収(A_{450})により検出できる。そこで、それぞれのフラクションの A_{450} を測定し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) の結果と合わせて、lipophorin を多く含むフラクションを集め、透析・濃縮した。その後、ゲル濾過クロマトグラフィ法により高純度の lipophorin に精製した。

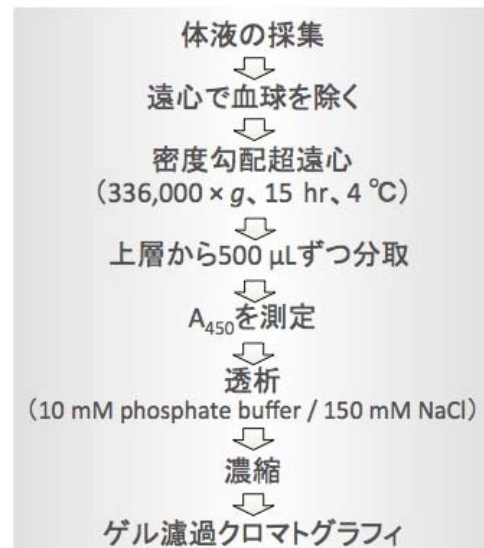


図2 lipophorin の精製手順

Lipophorin の脂質組成については、化合物が持っている特定の性質によって粗抽出物より分離できる TLC (Thin layer chromatography) と Iatroscan により分析を行った。精製した lipophorin から、クロロホルム : メタノール = 2 : 1 の混合溶媒によって脂質を抽出後、濃縮した。得られたサンプルを TLC と Iatroscan により、lipophorin を構成する炭化水素、中性脂質、リン脂質の組成について、昆

虫生化学グループの研究室で飼育しているカイコや亜熱帯性のクロコオロギ、ワモンゴキブリのデータと比較をした。

3 結果

ウエタはバッタ目に属する昆虫である。ウエタと同じバッタ目に属するトノサマバッタや鱗翅目のカイコでは、lipophorin の表面を補強して大量の脂質輸送を可能にする apolipoprotein-III (apoLp-III) と呼ばれるタンパク質を持つ。しかし、ウエタの体液には apoLp-III は含まれていなかった。また、密度勾配超遠心の結果から、ウエタの lipophorin は、カイコの lipophorin よりも低密度であることが分かった(図 3)。

TLC と Iatroscan の結果を見ると、ウエタの脂質組成は、コオロギやゴキブリに似ていた。中性脂質の中では炭化水素が最も多かった。炭化水素は、体表を覆って乾燥を防いでおり、分子中に二重結合を持たない飽和炭化水素と、二重結合を持つ不飽和炭化水素がある。低温耐性を持つ昆虫は、低温でも凝固しにくい不飽和炭化水素を持っていることが多い。しかし、ウエタは低温に強い昆虫であるのに、体液中に不飽和炭化水素を持っていないことが分かった(図 4)。



図 3 密度勾配超遠心後の lipophorin の黄色バンド(*)

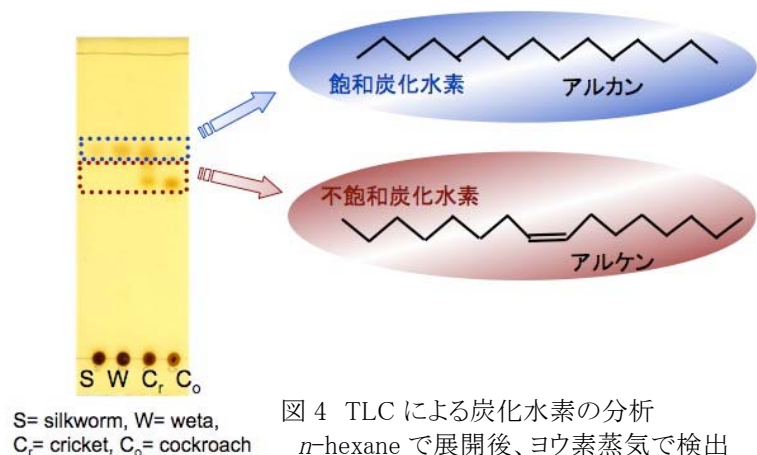


図 4 TLC による炭化水素の分析
n-hexane で展開後、ヨウ素蒸気で検出

この研究は、低温研の研究助成で 2006 年度と 2007 年度に行った研究の一部である。また、この報告の一部は 2007 年 7 月に ISEPEP 2 (International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants 2nd, Otago Univ., New Zealand) でポスター発表した(次ページ)。

参考文献

後藤由佳子, カイコ幼虫体液からの lipophorin 高純度精製法の確立, 北海道大学低温科学研究所技術部技術報告, 11, 30-31, 2006

Tree Weta Lipophorin -Biochemical Analysis-

Y. Gotoh, M. Iwasaki, M. Ochiai & C. Katagiri
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, JAPAN

Introduction

Tree weta, *Hemideina femorata*, an endemic orthopteran in New Zealand, overwinters in every life stage; egg, larva, and adult. The end of last year, we started the biochemistry of weta. To understand the relationship of lipids and tolerance to low temperature, we purified lipophorin, a major lipoprotein, from weta haemolymph.



Tree weta (adult male)

Insects

We used three kind of insects other than weta; silkworm because we have some data about its lipophorin, and cricket, which is orthopteran insect as weta is. The other is cockroach, which is close related to orthopteran. The used insects were reared in our laboratory.

The insects used in the experiments

name	order	born in	food	temp	stage	
weta	<i>Hemideina femorata</i>	Orthoptera	New Zealand	carrot, artificial diet	14 °C	adult
silkworm	<i>Bombyx mori</i>	Lepidoptera	lab	artificial diet	25 °C	larva
cricket	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Orthoptera	lab	carrot, artificial diet	25 °C	adult
cockroach	<i>Periplaneta americana</i>	Blattaria	lab	carrot, artificial diet	25 °C	adult

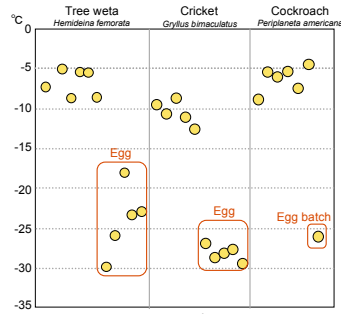
Tolerance to low temperature

Around subzero temperature, there was remarkable difference among three insects in pinching test. In the test, we pinched a hindleg by tweezers. When insects have activities, they try to escape from the pinching stimulation. We confirmed that only weta has an ability to move at -1°C more than one hour although subtropical insects (crickets and cockroaches) stopped to move within few minutes.

Response to hindleg pinching at -1°C

Insect	stage	sex	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
Tree weta	Adult	Male	+	+	+	+	+
<i>Hemideina femorata</i>	Adult	Female	+	+	+	+	+
	Adult	Male	+	+	+	+	+
	Adult	Female	+	+	+	+	+
Cricket	Adult	Male	+	-	-	-	-
	Adult	Female	+	-	-	-	-
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Adult	Male	-	-	-	-	-
	Adult	Female	-	-	-	-	-
	Larva	-	-	-	-	-	-
Cockroach	Adult	Male	+	-	-	-	-
	Adult	Female	+	-	-	-	-
<i>Periplaneta americana</i>	Adult	Male	+	-	-	-	-
	Adult	Female	+	-	-	-	-
	Adult	Female	+	-	-	-	-

+ : Avoidance of pinching stimulation
- : No response

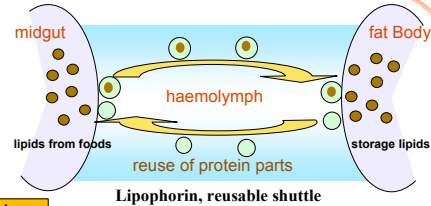


Comparison of freezing temperature

On the other hand, we checked temperature at which tree wetas, crickets, and cockroaches started freezing. There was no big difference among them. Tree wetas started freezing a little earlier than crickets. Eggs of tree wetas started freezing at various temperature, and didn't have remarkable tolerance to freezing too.

Insect lipophorin

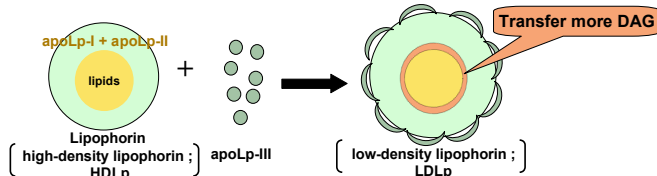
Lipophorin is known as a reusable shuttle to transport a variety of lipids. It transfer the lipids (loads) and its protein parts (vehicle) go back to transport other lipids.



Lipophorin, reusable shuttle

Lipophorin is composed of two apolipoproteins; apolipoproteins (apoLp) -I and -II. Lipophorin has lower density than other proteins because it contains a lot of lipids, and is detected as yellowish protein because it contains carotenoid. Some insects have another apolipoprotein; apoLp-III, which attaches to the surface of lipophorin to transfer more diacylglycerol as fuel during long distance flight.

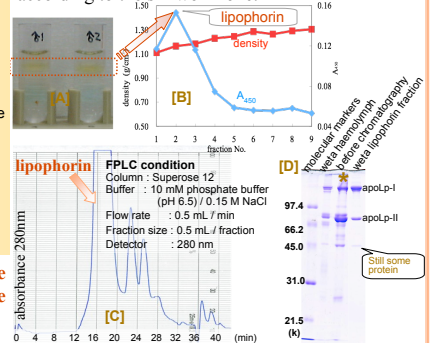
Three-layer model of the structural organization for lipophorin.



Lipophorin purification from the weta

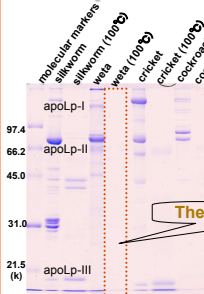
Steps
Haemolymph collection from adult weta
Haemocyte removal with centrifugation
KBr density gradient ultracentrifugation at 72,000 rpm for 2 hr at 4 °C [A]
Fractionation into 100 µL each from top to bottom
Measurement of weight and absorbance 450 nm (A₄₅₀) of each fraction [B]
Dialysis against 10 mM phosphate buffer / 0.15 M NaCl
Concentration [D-]
Gel permeation chromatography [C]

We have already established the purification procedures of lipophorin from the silkworm. Firstly we tried to purify lipophorin from the weta according to the silkworm one.



Weta lipophorin could be partially purified by the same steps for silkworm lipophorin.

Comparison of weta haemolymph with other insects



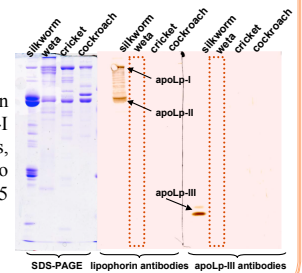
We compared the composition of proteins in haemolymph to examine whether weta has apoLp-III or not. Silkworm apoLp-III is a heat stable protein at 100°C for 30 min. Therefore the samples were subjected to the same heat condition and applied to SDS-PAGE. SDS-PAGE showed there was no protein band from the heated weta haemolymph.

There was no protein band

ApoLp-III was not detected in weta haemolymph.

Western blot analysis

Weta haemolymph was also subjected to western blot analysis with silkworm lipophorin (apoLp-I and II) and apoLp-III polyclonal antibodies, separately. We used rabbit serum diluted to 1/2000 with buffer (pH 7.4 10 mM Tris-HCl, 0.05 % Tween 20, 0.5 % skim milk).



Western blot analysis of weta showed no-cross reaction with silkworm antibodies.

Lipid composition of weta lipophorin

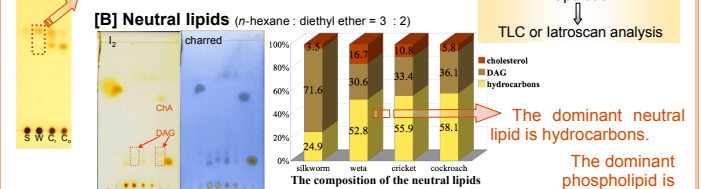
Lipids extracted by CHCl₃ : MeOH = 2 : 1 were applied to TLC (Thin layer chromatography) and Iatroscan analysis. On TLC plates, the lipids were detected by iodine (I₂), Dittmer reagent and charred.

Sample preparation

Lipid extraction
CHCl₃:MeOH = 2:1
2.5 mL
Lp fraction (ultracentrifugation)
0.01 mL
Filtration
Evaporation
TLC or Iatroscan analysis

[A] Hydrocarbons (developed with n-hexane)

Weta has only saturated hydrocarbons.



S: silkworm, W: weta, C: cricket, C₂: cockroach,
1: hydrocarbons,
2: triacylglycerol,
3: diacylglycerol (DAG) and cholesterol acetate (ChA),
4: free cholesterol,
5: phosphatidylinositol,
6: sphingomyelin (SM),
7: phosphatidylcholine (PC),
8: phosphatidylethanolamine (PE)

Summary Tree weta could move on ice more than one hour, although they started freezing from -3 to -5°C as well as other insects. We started biochemistry of the weta lipophorin. Weta lipophorin could be partially purified by the same methods for silkworm lipophorin. ApoLp-III was not detected in weta haemolymph. In weta lipophorin, hydrocarbons are dominant among neutral lipids, and phosphatidylcholine among phospholipids.