

ウエタ lipophorin の脂質組成

加藤由佳子¹、岩崎正純²、落合正則²、片桐千俣²

1. 先端技術支援室
2. 生物分子機構

はじめに

ニュージーランド固有の昆虫であるウエタ（図 1）は、2 億年近くもその外部形態を変えていない生きて化石であり、その生態や生理が注目されている。生物分子機構（旧昆虫生化学）グループの研究テーマの一つとして、昆虫の環境適応における脂質の役割



Tree weta
(*Hemideina femorata*)
体長 4~5 cm



Alpine weta
(*Hemideina maori*)
体長 5~6 cm

図 1 ウエタ

について探っている。昨年度の技術報告では、ウエタの血液中タンパク質 lipophorin の精製法と他の昆虫との血液の比較について述べた（後藤ら、2008）。今回はその続報として、ウエタ lipophorin の脂質組成について報告する。

実験方法

Lipophorin は昆虫の血液中にある主要なタンパク質の一つで、脂質輸送の役割を担っている。タンパク質と脂質が複合体を形成する（図 2）ことで、血液 (=水) に

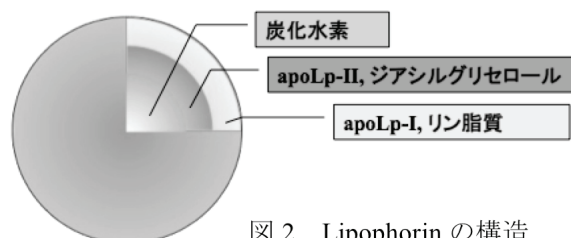


図 2 Lipophorin の構造

は溶けない脂質 (=油) を運ぶことができる。体内の組織へと脂質を輸送する lipophorin の脂質組成は、ウエタの体を構成する脂質組成を反映すると考えられる。

実験には、2006 年と 2007 年にニュージーランドで採集した 2 種類のウエタ（平野部に棲む tree weta : *Hemideina femorata* と山岳地帯に棲む alpine weta : *Hemideina maori*）の成虫を用いた。前回の技術報告（後藤ら、2008）の通り、それぞれの血液から lipophorin を精製し、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した後、変性したタンパク質部分を濾過によって除去した。ウエタの lipophorin には、他の昆虫と同様に、炭化水素（体表を覆い乾燥を防ぐ働き）、中性脂質（エネルギー源）、リン脂質（細胞膜の構成成分）が含まれていた。ウエタ lipophorin の脂質組成について、生物分子機構グループの研究室で飼育しているカイコ（幼虫）や亜熱帯性のクロコオロギ（成虫）の lipophorin 脂質組成と比較をした。

脂質の比較には、薄層クロマトグラフィ (Thin layer chromatography ; 以下 TLC) と Iatroscan を用いた。TLC ではガラスプレートに、Iatroscan では細長い石英棒に、シリカゲルがコーティングされている。有機溶媒で展開すると、混合物中のそれぞれの化合物が持つ固定相 (シリカゲル) と移動相 (展開溶媒) への親和性の違いにより、化合物を分離させることができる。分離後、TLC は検出用試薬、Iatroscan は水素炎イオン化検出器 (Flame ionization detector ; 以下 FID) によって化合物を検出した。Iatroscan では、FID のピーク面積から目的の脂質を定量することができる。TLC でおおまかに脂質組成と分離を観察し、Iatroscan で定量するようにした。

今回の実験では、TLC と Iatroscan の展開溶媒として、炭化水素を展開する場合には *n*-ヘキサンを、リン脂質を展開する場合にはクロロホルム : メタノール : 水 = 65 : 25 : 4 の混合溶媒を用いた。これらの溶媒は脂質の展開に汎用されているものであり、問題なく展開できた。一方、中性脂質の展開には通常 *n*-ヘキサン-ジエチルエーテル系混合溶媒が多く用いられるが、この溶媒系ではジアシルグリセロールとコレステロールを分けることが出来ず、溶媒系の検討が必要となった。

結果

○ 炭化水素

炭化水素には、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、ウエタは氷の中で1時間以上冷やされても活動できる比較的低温に強い昆虫であるが、飽和炭化水素のみを持っていることが分かった (図 3)。

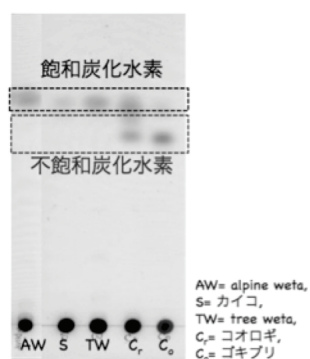
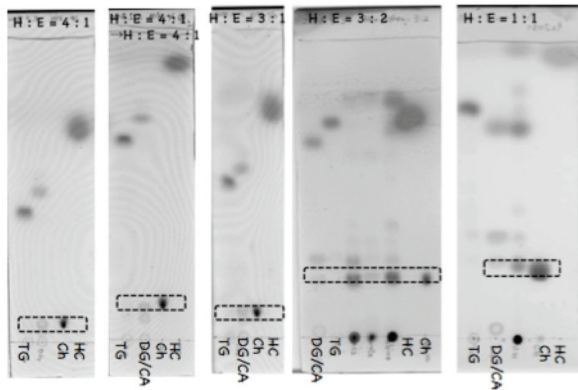


図 3 Lipophorin の炭化水素

○ 中性脂質

n-ヘキサンとジエチルエーテルの溶媒比を変えて、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、酢酸コレステロール、コレステロール、炭化水素の標品を TLC で展開した。どの溶媒比でもジアシルグリセロールとコレステロールが重なってしまった (図 4A) ため、他の溶媒系を検討することにした。クロロホルム-アセトンの溶媒系で溶媒比を検討したところ、クロロホルム : アセトン = 19 : 1 の比で最も良く分かれた (図 4B)。しかし、クロロホルム-アセトン系ではトリアシルグリセロールと酢酸コレステロール (脂質量を計算するために内部標準として使用) の Iatroscan 上での分離が不十分であった。現在より良い条件を検討中である。

(A) *n*-ヘキサン-ジエチルエーテル系溶媒



(B) クロロホルム-アセトン系溶媒

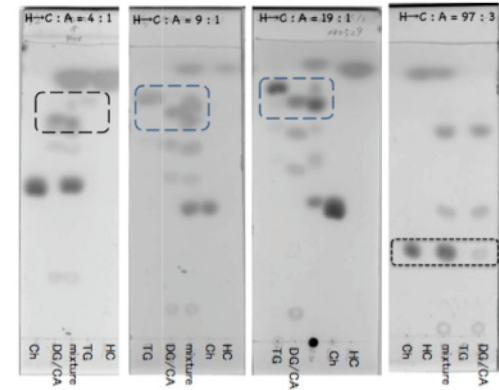


図4 TLC上での中性脂質の挙動

点線部分はジアシルグリセロールとコレステロールが分離されていないことを示す。

破線部分はトリアシルグリセロールと酢酸コレステロールの分離が不十分であることを示す。

(A) 左から *n*-ヘキサン : ジエチルエーテル = 4 : 1, 4 : 1 (2回展開), 3 : 1, 3 : 2, 1 : 1 で展開。

(B) *n*-ヘキサンで展開後、左からクロロホルム : アセトン = 4 : 1, 9 : 1, 19 : 1, 97 : 3 で展開。

H = *n*-ヘキサン, E = ジエチルエーテル, C = クロロホルム, A = アセトン

Ch = コレステロール, DG / CA = ジアシルグリセロールと酢酸コレステロールの混合物、

TG = トリアシルグリセロール, HC = 炭化水素, mixture = Ch, DG / CA, TG, HC の混合物

TLC の展開結果を基に、Iatroscan で分析を行なった。それぞれの昆虫の lipophorin 脂質を *n*-ヘキサン → クロロホルム : アセトン = 19 : 1 → クロロホルム : メタノール : 水 = 65 : 25 : 4 の溶媒系で順に展開し、組成比を調べた。

図5に示したように、alpine weta は他3種に比べて、リン脂質の割合が多かった。全体的な組成比では、ウェタはカイコよりも亜熱帯性のクロコオロギに近く、特に tree weta ではその傾向が強かった。

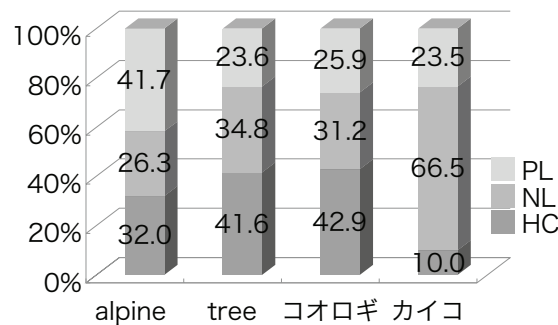


図5 Lipophorin の脂質組成比

左から、alpine weta、tree weta、クロコオロギ、カイコの lipophorin 脂質組成。

PL=phospholipids (リン脂質)、NL=neutral lipids (中性脂質)、HC = hydrocarbons (炭化水素)

この研究は、平成 18 年度と平成 19 年度に低温科学研究所地球惑星雪氷圏研究創出事業費（カテゴリー2）によりニュージーランドで採集したウエタを用いて行った研究の一部である。また、この研究結果の一部は ISEPEP 2（International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants 2nd, Otago Univ., New Zealand, 2007 年 7 月）と日本比較生理生化学会第 30 回大会（札幌、2008 年 7 月）、日本動物学会第 79 回大会（福岡、2008 年 9 月）でポスター発表した。

最後になりましたが、ウエタの採集・飼育ケースは、市販のケースを技術部共通機器管理室の池田正幸氏に加工して頂きました。心より謝意を表します。

参考文献

後藤由佳子、岩崎正純、落合正則、片桐千帆：ウエタの低温耐性と脂質輸送タンパク質 lipophorin について，北海道大学低温科学研究所技術部技術報告，**13**，3-5，2008