

トレハロースのもつ冷凍耐性のゴキブリへの作用

佐野 可奈子 筑後 文香 筒井 優衣

1. 要旨

極寒の地に生息する昆虫の体内にはトレハロースが存在し、通常であれば死滅するような過酷な条件下でも、そのトレハロースが乾燥や凍結から細胞を守る役割を果たしている。我々はトレハロースの持つこの冷凍耐性に着目し、ゴキブリの体内にトレハロース水溶液を注射することで、ゴキブリが冷凍耐性を獲得するのではないかという仮説を立てた。ゴキブリは生命力が強く放射能や薬剤などへの耐性を持つことで知られている。また、その体を覆う固い外殻のため他の昆虫と比較して断熱性に優れているとの報告があったため、ゴキブリを使用することにした。実験の結果、我々の予測に反してこの方法では冷凍耐性を獲得できなかった。しかし、トレハロースを注射する際に用いたゴキブリの saline や、トレハロース水溶液を注射した場合に、何も処置していない個体よりも冷凍によるダメージが抑えられることが新たにわかった。すなわち、saline を注射することで冷凍耐性が獲得される可能性が示唆され、新たな研究へと発展させることができた。

2. 研究目的

数年前、現在岡山県岡山市に本社を置く株式会社林原によって大量生産技術が確立され話題となった「夢の糖」トレハロースは、現在でもその優れた性質を応用した研究が幅広く行われている(参考文献 1-3)。トレハロースとは二糖類の糖である。トレハロースを生来含有する一部の動植物は、一時的に乾燥しても水を与えれば元通りに戻ったり、極寒の地で生息できたりすることが知られている(参考文献 4-5)。通常、動植物を冷凍すると、体内でできた鋭い形状の氷の結晶が細胞を傷つけ再生不可能となる。しかし、トレハロース水溶液中では氷の結晶の成長が抑制され丸みを帯び、細胞を傷つにくくなるために冷凍耐性が生じ(Figure 1)、極寒に生息する動植物はこの性質を利用していると考えられている(参考文献 6)。

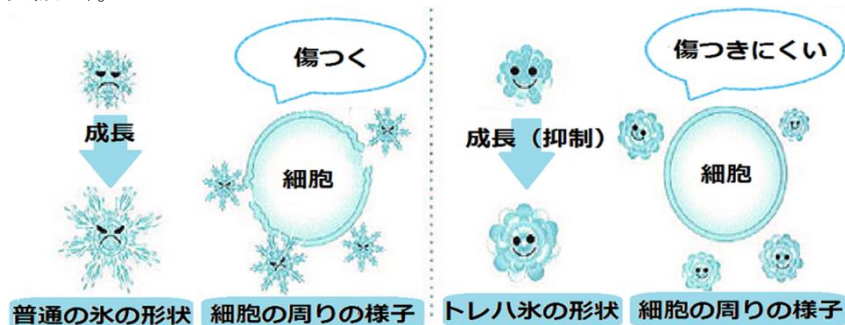


Figure 1: トレハロースの氷の結晶の成長の抑制

トレハロースは我々の身の周りの食品や化粧品にも含まれており、それを保持することによって、冷凍や乾燥への耐性を持ち、通常では考えられない環境下での生存を可能にできることは大変魅力的である。そこで、本来そのような耐性を持っていない生物にこの性質を導入したいと考え、またそれが実現できれば様々な形で人間の生活に役立てることができると期待した。

我々はトレハロースを温暖な気候である中南米に生息するドクロゴキブリ(Figure 2)に導入し、結果、冷凍耐性を獲得させることを目的として、本研究を遂行した。ゴキブリを用いた理由は、生命力が強く放射能や薬剤などへの耐性を持つことで知られているからである。(参考文献 7-8)



Figure 2: ドクロゴキブリ

3. 研究方法

ゴキブリの飼育方法

ドクロゴキブリは香川大学農学部から頂戴した。香川大学で飼育されているときは、虫かごにヤシ殻土を 3 分の 1 程度敷き詰め室温 25℃の空間で飼育されていた。本校にいただいてからは、飼育者の助言を参考に以下の方法で飼育した。

市販の虫かごにハムスター用のマットの木くずを同様に敷き詰め、そこにゴキブリを入れた。ゴキブリは夜行性であるため、虫かご全体をダンボールで覆うことで暗い空間で飼育するようにした。本校には 25℃に保てる培養器がなかったので、ドクロゴキブリが生息するのに適した最低温度である 20℃の培養器の中で飼育した。水とエサは常に虫かごの中にあり、3日に一度補充することでゴキブリがいつでも摂食、飲水ができる状態にした。エサはオリエンタル酵母工業株式会社の NMF(繁殖用)を与えた。

予備実験 ゴキブリへのトレハロースの注射

ゴキブリにトレハロースを取り込ませる方法は、エサや水に混ぜて食べさせることも考えたが、注射で導入することにした。理由は、確実にゴキブリの体内に一定量のトレハロースを取り込ませることができ、また、昆虫は開放血管系であり注射をすることで全身に行き渡ると考えたからだ。

実験では、体長 45 mm ~ 55 mm、重さ約 5 g の成虫を使用することにより、一定の体液量辺りに同じ量のトレハロースが含まれるようにした。またゴキブリの雌雄の判断は難しいので区別しなかった。

注射した後トレハロースが代謝されていないかを確認するため、トレハロース水溶液を注射後一日間放置したゴキブリの体液に対して、赤外吸収スペクトル測定を行った。東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター櫻井研究室の櫻井実教授に問い合わせたところ、多くの糖の赤外吸収スペクトルのピークが 1000 cm^{-1} 付近にピークがあるのに対し、トレハロースは約 992 cm^{-1} に特有のピークがあるとわかった。測定の結果約 995 cm^{-1} 付近にピークが見られ、トレハロースが体内に残っていることを確認した(Figure 3)。トレハロース水溶液を注射していないゴキブリの体内にはトレハロースが含まれていないことは確認出来ている。また、冷凍実験以降、注射したゴキブリと注射をしていないゴキブリの排出物の量に観察期間内は違いが見られなかったことから、この間ほぼ同量のトレハロースが体内に含まれていると考えられた。トレハロース水溶液を注射していないゴキブリの体内にはトレハロースが含まれていることは確認出来ているが、グラフが残っていなかったためここには掲載していない。

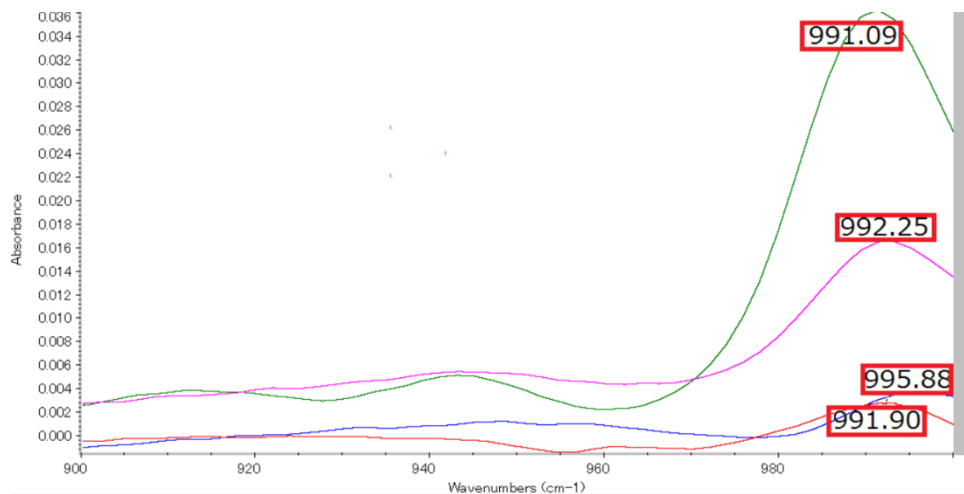


Figure3：赤外吸収スペクトルの結果（波長 900~1000 付近を拡大）

ゴキブリに注射をする際は、ゴキブリへのダメージを最小限に抑えるために腹の節と節の間のやわらかい部分に針を射した。また、事前に解剖を行い臓器等の器官の位置を把握したうえで、一部の器官に入らないよう器官を避けた体液のみ存在する箇所注射を行うようにした。また、注射直後に弱ったゴキブリは冷凍実験に使用していない。そのため個体数にはばらつきがでた。

冷凍耐性の実験は市販の冷蔵庫の冷凍庫(-20℃)で行った。ゴキブリを冷凍する時間は通常元気なゴキブリを用いて冷凍時間を段階的に変え、死んでしまう直前の弱りきった状態になる冷凍時間を調査して決めた。実験を行った結果、冷蔵庫での冷凍では 30 分、氷水を用いた緩慢な冷凍では 68 分が最適な時間であることがわかった。

本研究ではゴキブリの実験後の状態を数値化しグラフ化するにあたり、我々が独自に考案した元気度という指標を用いて結果を表した。元気度については、虫かごで飼育しているときと同じように元気に動き回る状態を「2」、弱っていて揺るとかろうじて動く状態を「1」、死んでいる状態を「0」と定めた。以下に示す棒グラフでは各条件での個体の元気度を表し、折れ線グラフでは各条件での元気度の平均値を示している。

実験 I 冷凍実験 急速冷凍

実験方法

ドクロゴキブリを以下の条件ごとにはけ注射等を行った。その際の麻酔は冷凍庫に 10 分間入れることで行った。そして注射後 20℃で 24 時間放置し、トレハロース水溶液等が全身に行きわたった後、冷凍庫で 30 分間冷凍し、その後 20℃でエサも水も与えずに 7 日間様子を観察した。

比較条件

- 1.何も注射しない
- 2.saline 0.5 ml を腹部に注射
- 3.トレハロース 0.21 g を saline 0.5 ml に溶かした溶液（すなわち 42%溶液であり、飽和状態となった溶液）を腹部に注射

本実験で扱う saline とはゴキブリの等張液のことである。

saline の成分…NaCl: 12.5 g, 0.1M KCl: 31 ml, 0.1 M CaCl₂: 18 ml,
0.1 M NaH₂PO₄: 6 ml, 0.1 M Na₂HPO₄: 18 ml,
DW (蒸留水): 930 ml

実験Ⅱ 冷凍実験 緩慢冷凍

実験Ⅰから冷凍方法を以下に変更して実験した。

冷凍方法

ゴキブリ3匹ずつをビーカーに入れパラフィルムで封をし、室温(約25℃)の食塩水を入れた発砲スチロールにそのビーカーを半分浸けた。ビーカーの内部の空気の温度を測定するためにパラフィルムに小さい穴を開け、上から温度センサーを差し込んだ。発砲スチロール容器内の溶液に徐々に氷を足していき、ビーカー内の空気の温度を温度センサーで計測しながら40分間かけて、約25℃から1℃まで徐々に下げた。水と氷と塩は20:20:7の質量比にした。温度が1℃に達した時点で、あらかじめ冷凍庫で内部の空気を1℃にしておいたシャーレにゴキブリを1匹ずつ移し替え、その後、冷凍庫で28分間冷凍した。

実験Ⅲ トレハロースとスクロースの比較実験

冷凍耐性がトレハロース特異の効果であるのかを調査するため、トレハロースと同じ二糖類であるスクロースを用いて実験を行った。また実験Ⅱまでの結果を踏まえて、注射する溶液の濃度が高すぎてゴキブリにダメージを与えている可能性を考え、濃度を落として5%水溶液でも再実験を行った。

実験方法

ドクロゴキブリを麻酔した後、以下の条件で注射を行った。注射後20℃で24時間放置し、その後冷凍庫で30分間冷凍した後、20℃でエサも水も与えず7日間様子を観察した。

比較条件

- 1.トレハロース42%水溶液 (トレハロース0.21g+saline 0.5ml)
- 2.トレハロース5%水溶液 (トレハロース0.025g+saline 0.5ml)
- 3.スクロース42%水溶液 (スクロース0.21g+saline 0.5ml)
- 4.スクロース5%水溶液 (スクロース0.025g+saline 0.5ml)

4. 結果

実験Ⅰ 冷凍実験 急速冷凍

なにも注射を行わなかったグループの元気度が最も低い結果となった(Figures 4-7)。トレハロース水溶液やsalineを注射したグループは翌日に差がみられ、トレハロース水溶液を注射したグループの元気度のほうが低かったが、3日後以降は差が見られなかった(Figures 4-7)。トレハロースの冷凍耐性の効果が表れていないことが分かったため、氷の結晶がより大きく成長し効果が表れやすくなると考えられるより緩慢な冷凍方法に変えて実験Ⅱを行った。

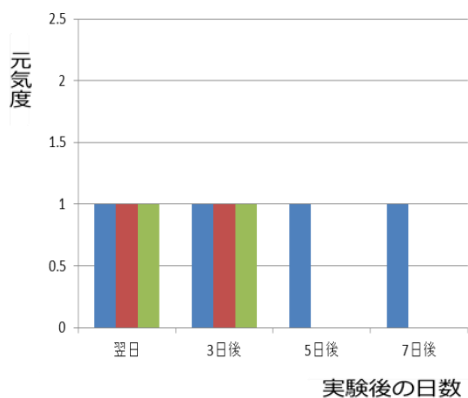


Figure 4: 実験Ⅰ なにもなしの結果

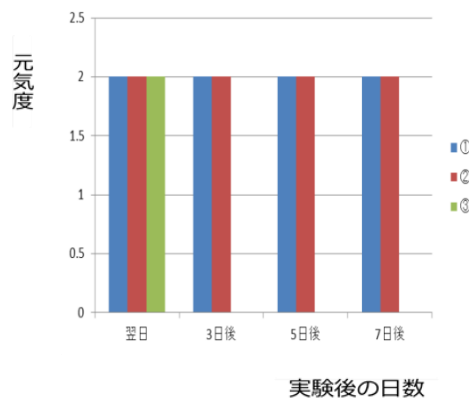


Figure 5: 実験Ⅰ saline の結果

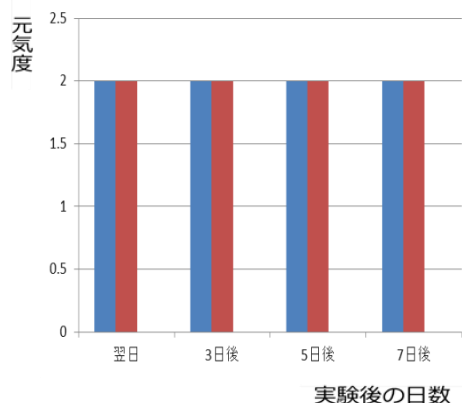


Figure 6: 実験Ⅰ トレハロース水溶液の結果

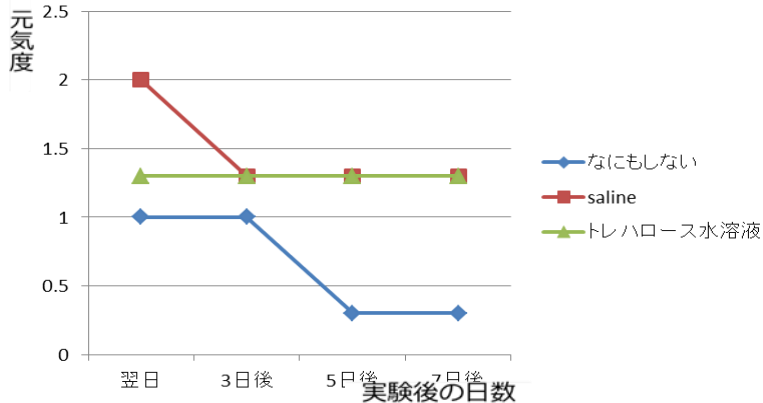


Figure 7: 実験Ⅰ の元気度数値化グラフ

実験Ⅱ 冷凍実験 緩慢冷凍

実験Ⅰよりもゆっくりと冷凍したことで、トレハロースの冷凍耐性が見られるとの予想に反して、トレハロースを注射したグループは saline のみを注射したグループよりも元気度が下がった(Figures 8-11)。したがって、以降の実験では冷凍方法を実験Ⅰ(急速冷凍)に戻して行うことにした。

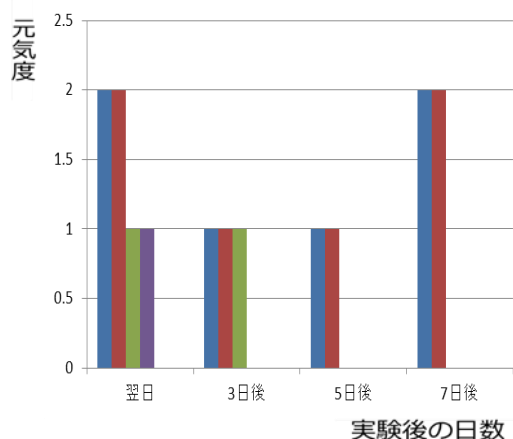


Figure 8: 実験Ⅱ なにもなしの結果

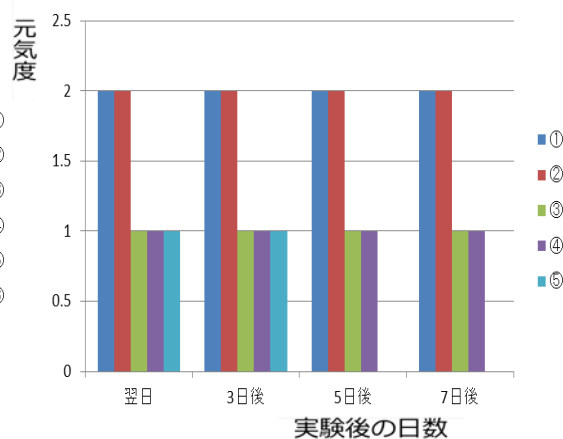


Figure 9: 実験Ⅱ saline の結果

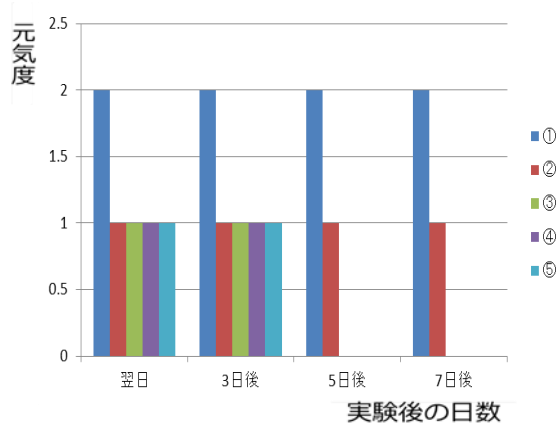


Figure 10: 実験Ⅱ トレハロース水溶液の結果

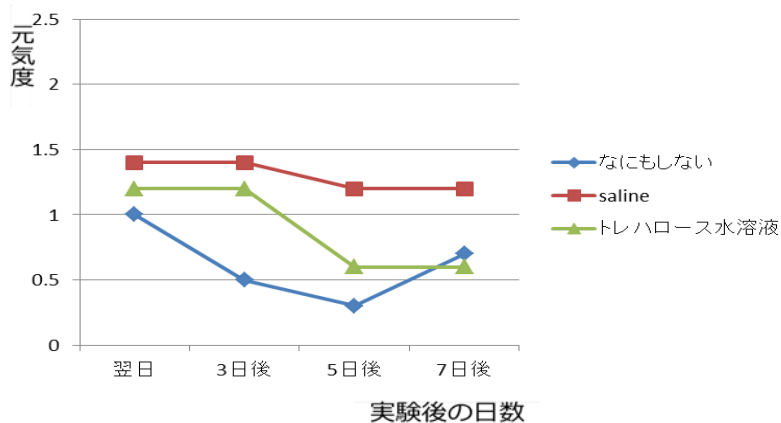


Figure 11: 実験Ⅱ の元気度数値化グラフ

実験Ⅲ トレハロースとスクロースの比較実験

42%濃度のトレハロース水溶液は観察期間内に元気度の変化はみられず、42%濃度のスクロース水溶液も多少の変化はあったものの大きな変化はみられなかった(Figures 12-14)。5%濃度のトレハロース水溶液は5日後に元気度の上昇がみられ、5%濃度のスクロース水溶液は観察期間内に元気度の変化はみられなかった(Figures 15-16)。比較すると、5%濃度と42%濃度共にトレハロースとスクロースの結果に違いはないことがわかった (Figures 12-17)。

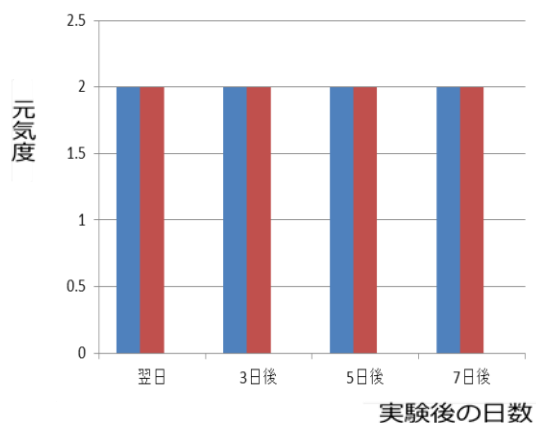


Figure 12: 実験Ⅲ トレハロース水溶液 42%濃度の結果

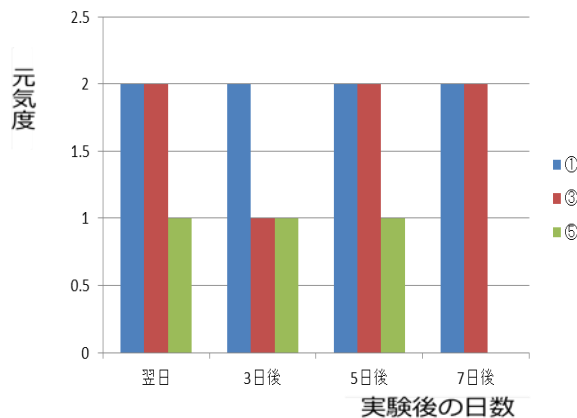


Figure 13: 実験Ⅲ スクロース水溶液 42%濃度の結果

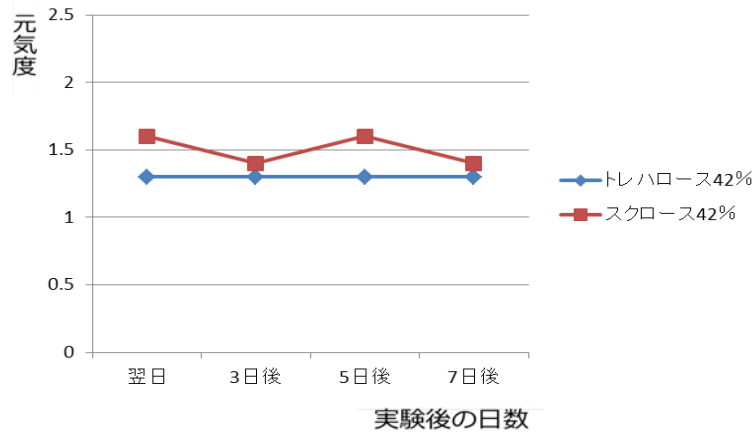


Figure 14: 実験iii 42%濃度の元気度数値化グラフ

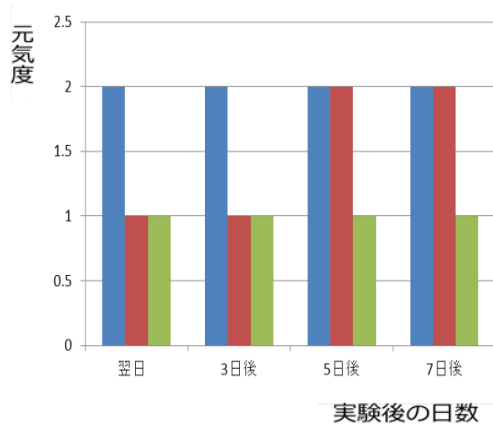


Figure 15: 実験iii トレハロース水溶液 5%濃度の結果

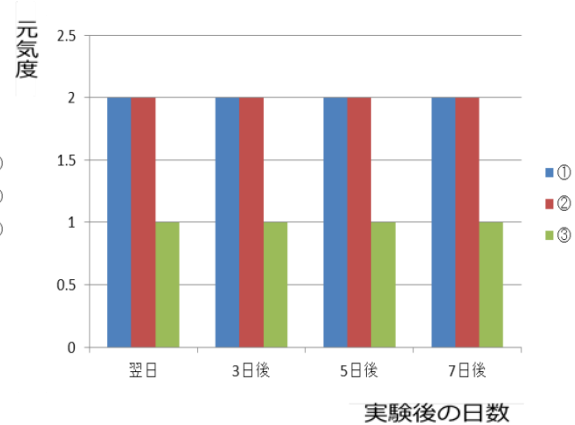


Figure 16: 実験iii スクロース水溶液 5%濃度の結果

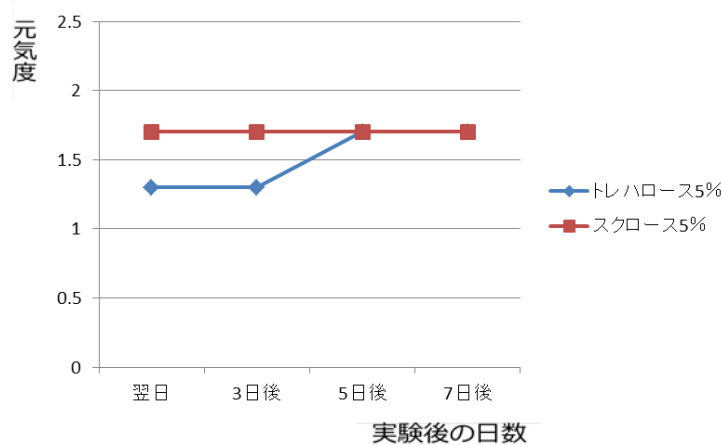


Figure 17: 実験iii 5%濃度の元気度数値化グラフ

5. 考察

実験 I、II から、トレハロース水溶液を注射したグループは、なにもしていないグループより冷凍に多少の耐性があったものの、saline を注射したグループと比較すると元気度が同じかあるいは低かった。したがって、トレハロースによる作用では冷凍に強くなったとは結論づけられなかった。また実験IIIから、トレハロースとスクロースの作用に違いがみられなかったことから、トレハロースの性質によって冷凍耐性に影響があるとは考えられなかった。

しかし、実験を通じて、我々の予測に反して以下の可能性が示唆された。

1. saline を注射したグループは冷凍耐性が多少なりとも生じる
2. トレハロース水溶液を注射したグループは冷凍後、翌日まで弱っている

1 については、saline に含まれる何らかの成分の作用、あるいは個体の容積の増加による影響が考えられる。よって、saline に含まれる成分の作用であるかどうかを明らかにするために、saline の各成分割合を変えて実験を行う必要がある。しかし、saline の成分は通常の塩類ならびにリン酸であるため、冷凍耐性に影響するとは考えにくい。

容積の増加による影響であるかどうかにおいては、注射による個体の体液量の変化と冷凍耐性との関係を追究する必要がある。今回使用したゴキブリの体長から計算したゴキブリの容積は約 9 cm³ ほどである。これに対して 0.5 ml

の注射を行ったので、約 5%の容積増加となっている。容積増加による冷凍耐性への影響の理由としては「ベルクマンの法則」が考えられる(参考文献 9)。ベルクマンの法則とは、体を大きくすると表面積の増加分より体積の増加分の方が大きくなる。つまり、体が大きいほど単位体積あたりの表面積が小さくなり体の大きさの割に外気に接している皮膚の面積が小さくなるので、熱が逃げにくいということを示すものである。このことが変温動物であるゴキブリでも証明されれば、ベルクマンの法則が恒温動物のみならず変温動物にも適応されることになる。

また、今回は個体数が少なかったため統計処理を行えなかったが、今後は個体数を増やし、ランキングのデータを扱いかつ独立多群を扱う検定(たとえば Kruskal-Wallis 検定)などを行いたい。

一方、上述の可能性 2 については、浸透圧の影響ではないかと考えた。そこで本来であれば浸透圧を測定すべきであるが学校に装置がなかったので計算により求めた。その結果、saline の浸透圧は 0.45 Osm、トレハロース 42%濃度の水溶液では 1.7 Osm、5%濃度では 0.59 Osm となり、よって 42%濃度は saline のみの 3.76 倍、5%濃度は 1.33 倍の浸透圧がかかっていることが分かった。したがって、トレハロース水溶液を注射したグループは浸透圧の影響によって翌日には弱ると考えた。

6. 結論

我々の実験方法では、トレハロースによってドクロゴキブリに冷凍耐性を獲得させることはできなかった。

しかし、実験を通じて saline を注射したグループは冷凍耐性が多少は上がることがわかった。その理由としては saline に含まれる何らかの成分の作用、あるいは個体の容積の増加による影響が考えられる。

7. 参考文献

1. 浸透圧物質としてのトレハロース(trehalose)にかける期待—第 51 回ワークショップより— 佐中 孜 : 透析会誌 40(7), 568-570, 2007
2. トレハロースに脂肪細胞の肥大化抑制効果を確認 株式会社林原 : 2010 9.29
3. トレハロースを用いたトレニア培養植物の長期長期維持方法 農研機構 : 2010
4. ネムリユスリカの乾燥耐性メカニズムに関する物理化学的研究 櫻井 実 : 低温動物工学雑誌, p 77-80, 2004
5. 生命を知るための基礎化学 分子の目線でヒトをみる 川井 正雄 : p 65 コラム 8B, 2012 年 3 月出版
6. <http://www.food.hayashibara.co.jp/product/treha/fushigi.html#fushigi01> : 株式会社 林原 トレハと氷
7. <http://dsc.discovery.com/tv-shows/mythbusters/mythbusters-database/cockroaches-survive-nuclear-explosion.htm> : Discovery Communications
8. <http://www.j-cast.com/2010/08/07072604.html?p=all> 殺虫剤効かない「スーパーゴキブリ」世代交代で次第に「耐性」強化 : J-CAST ニュース, 2010.8.7
9. 生物分布の法則～ベルクマンの法則とアレンの法則にみる適応～ : gg 佐藤 マナペディア
10. <http://www.fre.kyushu-u.ac.jp/technology/new-technology/> : 睦化学工業株式会社 Frek

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたりまして、終始御指導及び御教示を賜りました高松第一高等学校の本田一恵先生、徳島文理大学香川薬学部の伊藤悦朗教授、香川大学農学部の関根吉孝氏、ならびに高松第一高等学校の先生方に心より感謝申し上げます。