

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380036

研究課題名（和文） ハダニの紫外線適応に関する生理基盤の解明

研究課題名（英文） Physiological study of adaptation to ultraviolet radiation in spider mites

研究代表者

刑部 正博（OSAKABE MASAHIRO）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：50346037

研究成果の概要（和文）：ハダニの紫外線適応に関連して、UV 損傷の発生および光回復機構、UV 耐性におけるカロテノイドの効果、休眠誘起とカロテノイド代謝との関係について検討した。これにより、UV 損傷における相反則と光回復機構の存在を実証した。また、雌成虫における生殖休眠の誘起とカロテノイド代謝の変化（体色変化）が分離可能なことを証明した。一方、カロテノイド組成と UV 耐性の関係については不明な点が残った。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms of UV-damage and photoreactivation, effects of carotenoids on UV tolerance, and the relationship between diapause induction and change in metabolism of carotenoids were studied in spider mites. As a result, the reciprocity between intensity and irradiation time in UV damage and function of photoreactivation were verified. With regard to the change of pigmentation in diapausing adult females, we found that reproductive diapause and pigmentation were separable phenomena. On the other hand, the effects of carotenoid composition on UV tolerance remained unclear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2012 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫生理、光生物学

1. 研究開始当初の背景

太陽光は生物の生存に必要不可欠である反面、そこに含まれる紫外線（UV）は細胞における活性酸素の生成やそれに伴う DNA 損傷の発生を助長し、ヒトに対しても日焼け紅斑症状や皮膚ガンの発生などのネガティブな影響を及ぼす。近年のオゾン層の衰退は毒性が強い UVB（波長：280-315 nm）の地上への照射量増加を招くことから、その生態系へ

の影響や防御機構の解明は極めて重要である。多くの植物はフラボノイドなど UV フィルター機能を持つ二次代謝物質の表皮細胞層への蓄積に加え、クロロフィル近傍へのカロテノイドの配置により、三重項励起色素（3P*）や活性酸素による酸化反応を抑制して UV 損傷を防いでいる。動物はカロテノイドを生合成できないが、餌を通じて植物由来のカロテノイドを摂取し、そのままあるいは代謝して蓄積しており、UV 損傷からの保護

効果が推測される。しかし、カロテノイドの UV 損傷に対する生体内での保護効果は十分に検証されていない。

近年、 β -カロテンが生体膜内部に分布し、フリーラジカルと遭遇する頻度が少ないなどの理由から、従来考えられてきた抗酸化作用を通じた保護効果が疑問視されている (Young and Lowe 2001)。ヒトの皮膚繊維芽細胞による研究では、 β -カロテンは活性酸素種 (ROS) を減少させず、逆に UV-A 照射下でアポトーシスを促進することが指摘されている (Camera et al. 2008)。これに対して、アスタキサンチンでは ROS 除去効果と細胞膜損傷の抑制効果が確認され、カンザキサンチンでは解毒酵素の誘導による防御効果が示唆されている (Camera et al. 2008)。動物のアスタキサンチンやケトカロテノイド類は多くが β -カロテンから合成されるため、代謝によって保護機能が高いカロテノイドを得ているのかも知れない。

Tetranychus 属のハダニ類でも β -カロテンからアスタキサンチンを含むケトカロテノイド類が合成されることが示されている (Veerman 1974)。カンザワハダニ (*Tetranychus* 属) の体色が白色の変異系統 (野生型の雌成虫は赤色) を休眠させたところ、休眠雌は野生型のような鮮紅色ではなく黄色を呈した。これらのカロテノイドを調べた結果、野生型の休眠雌では β -カロテンおよびルテインが減ってアスタキサンチンが増えたのに対し、変異系統では逆に β -カロテンが増加し、アスタキサンチンは検出されなかった (未発表)。野生型では非休眠 (産卵) 時に卵へ移行していた β -カロテンが、生殖休眠によってアスタキサンチンおよび他のケトカロテノイドへの代謝にスイッチしたのに対して、変異系統ではこれらの代謝機能が失われていると考えられる。冬季の休眠は一般に厳しい寒さに対する適応と考えられる。その一方で、落葉した寄主植物上での太陽光 UV-B への暴露に対する適応との側面も考えられる。

UV 感受性とカロテノイド組成が異なり、さらにカロテノイド代謝に関する変異系統が利用可能なハダニ類は生体保護効果の実証研究および代謝機構の解明に最適なモデルと考えられる。また、これらのハダニは葉内分布や休眠性などの生態特性が異なることから、カロテノイド代謝の適応的意義、休眠による UV 耐性の獲得、環境適応物質の供給を通じた植物と動物の関係および植物による UV 環境の制御がマイクロゾウム形成へ及ぼす効果など、生態系の成立に関わる新たな視点の提供が期待される。

2. 研究の目的

UV 耐性の獲得は動物界の環境適応進化の根幹に関わる重要な課題であるが、その実態及び生理機構については不明な点が多い。さらに、陸上の動物については従来から UV 耐性の獲得が進化上の前提になっているためか、水生生物に比べて UV 耐性に関する関心が低かった。

そこで本研究では、陸上の植食性節足動物であるハダニ類における UV ストレスの実態と適応機構を明らかにし、その生理機構と生態的意義の解明を目的とした。

具体的には、太陽光 UV に対する感受性とカロテノイド組成が異なるハダニ類とその変異系統を用い、(1) ハダニにおける UV 損傷機構の基盤の解明、(2) UV に対するカロテノイドの生体保護効果の解明および (3) 休眠誘起とカロテノイド代謝との関係の解析などを行った。

3. 研究の方法

(1) UV 損傷と光回復

一般的に光による化学反応では相反則が成立し、反応の強さは光の強度と照射時間の積による積算照射量に比例する。また、微生物や植物、甲殻類などにおいて、UV による DNA 損傷 (ピリミジンダイマー) が UVA や可視光などのエネルギーを利用した光回復酵素の働きによって修復されることが知られている。

そこで、ナミハダニの生存に影響する UV 損傷において相反則が成立するかを検証した。さらに、その UV 損傷が可視光の照射によって回復するかについて検証した。

(2) カロテノイド組成と UV 耐性

ハダニ類のカロテノイド組成に関する知見は薄層クロマトグラフィーと分光光度計による吸収波長スペクトル解析があるのみで、正確な定量には至っていない。

そこで、まずミカンハダニおよびカンザワハダニを用いてカロテノイドの構成を HPLC により解析し、保持時間および吸収波長スペクトルを標品と直接比較することにより、同定した。また、アルビノ系統についても同様の解析を行い野生型と比較した。

さらに、ミカンハダニの野生型とアルビノ型を正逆交配し、得られた卵のカロテノイド組成と UVB 耐性を比較し、カロテノイドの効果を検討した。

(3) 休眠誘起とカロテノイド代謝

Tetranychus 属のハダニ類では一般的に雌成虫が生殖休眠する。休眠誘起に伴って、摂食が停止し、カロテノイドの蓄積による体色変化が生じると考えられてきた。このため、体色の変化を指標として休眠誘起を判定し

ている文献も少なくない。しかし、産卵停止と摂食停止、体色変化との関係および体色変化に関与するカロテノイド組成の変化についての詳細な知見は得られていない。

そこで、ナミハダニの休眠時のカロテノイド組成の変化を調べた。この際、コレステロールエステラーゼにより、多くがエステル体で維持されていると考えられるアスタキサンチンを遊離させた後に分析に用いた。

さらに、休眠誘起と体色変化の関係を調査するため、休眠誘起後の摂食量の変化と体色変化をモニターし、同時に摂食制御などの操作を行った。

4. 研究成果

(1) UV 損傷と光回復

野外実験の結果から、太陽光 UV の照射がナミハダニ卵のふ化に及ぼす影響は春が最も強く、秋に向かうに従って弱くなることが明らかになった。季節によって気温と UV 強度のバランスが変化するため、UV 強度や気温、湿度および UV 積算照射量などについて死亡率との相関を検討したところ、UV 積算照射量の効果が検出された。そこで、室内実験により、UV 損傷における相反則を検証したところ、卵、幼虫、雌成虫の死亡率が UV 強度に関わらず、積算照射量に比例することが明らかになり、野外の実験結果が支持された。しかし、野外実験における卵の LD₅₀ 値は室内実験のものに比べて 86 倍大きかった。この理由として、光回復の働きが関与していることが予想された。

そこで、室内実験において UVB を照射した卵に対して可視光 (UVA を含む) を照射した結果、可視光を照射しなかった場合に比べてほぼ 50% のふ化率の増加が認められた。さらに、成虫までに 100% の個体が死亡した幼虫への UVB 照射の例では、UVB 処理後の可視光照射によりほぼすべての個体が正常に成虫まで発育するほどに回復した。これらの結果から、野外と室内における LD₅₀ 値の相違の主要因の一つは光回復効果によるものであり、また光回復機構がナミハダニの野外での生存に大きく寄与していることが示唆された。

(2) カロテノイド組成と UV 耐性

ミカンハダニ卵のカロテノイド組成について、アスタキサンチン、カンタキサンチン、フェニコキサンチン、3'-ヒドロキシエキネノン、β-カロテンなどを同定した。野生型とアルビノの正逆交配により得られた卵の分析では、野生型を母親とした場合にのみこれらのカロテノイドが検出されたことから、卵のカロテノイド組成は母性効果によることが示された。野生型とアルビノの卵およびそれ

らの正逆交配による卵について、太陽光紫外線 (UV) に対する耐性を比較した結果、6 月にはカロテノイドを有する卵の耐性が高い傾向が認められた。しかし、その後の調査ではこれらの差は検出されていない。また、室内実験においても野生型とアルビノの間で顕著な UV 耐性の差異は検出されていない。

一方で、アスタキサンチンや 3-ヒドロキシエキネノンなど、ケトカロテノイドの含有量が高いミカンハダニの卵は、β-カロテンやルテインなどを多く持つナミハダニ卵に比べて、UVB 耐性が高いことが明らかになった。したがって、ミカンハダニの UV 耐性におけるカロテノイドの役割については不明な点が多く残った。今後さらに総合的な環境ストレスに対する防御機構としての役割を検討すると同時にカロテノイド以外の UV 耐性機構についても検討していく予定である。

カンザワハダニ雌成虫では、休眠誘起による UV 耐性の上昇が確認され、休眠雌のカロテノイド分析ではアスタキサンチンのエステル体と考えられる多くのピークが検出された。一方で、カンザワハダニのアルビノ系統では休眠雌は野生型のような鮮紅色は呈さずに、黄色の体色に変化した。また、体内にアスタキサンチンの蓄積は認められず、代わりに植物由来と考えられる β-カロテンが蓄積する傾向が認められた。このことから、アルビノ系統では β-カロテンを取り込む能力は有するものの、アスタキサンチンへの代謝のごく初期の段階に関与する遺伝子に変異があることが予想された。休眠誘起にはビタミン A が必要とされるため、β-カロテンからビタミン A への代謝経路については正常に機能しているものと予想される。

また、休眠雌の UV 耐性の上昇が知られるナミハダニについて、エステル体の解離処理を行った。その結果、体内の全アスタキサンチン量のほぼ九割がエステル体として存在し、休眠雌では非休眠雌に比べて数十倍のアスタキサンチンが生体内に蓄積していることが分かった。しかし、カンザワハダニのアルビノ系統の休眠雌も野生型と同様に、非休眠雌に比べて高い UV 耐性を示したことから、ミカンハダニの場合と同様にカロテノイド組成、特にアスタキサンチンの蓄積量と UV 耐性との関係については、さらに検討が必要である。

(3) 休眠誘起とカロテノイド代謝

従来は体色の変化と休眠はほぼ同一の現象としてとらえられてきた。本研究においても生殖休眠は日長と気温の変化によって誘導された。休眠個体の特徴として、一般的に摂食が停止すると考えられている。しかし、本研究で休眠誘起された雌成虫の摂食状況を調査した結果、脱皮後 7 日間は半数以上の

個体で摂食が確認された。その後 14 日後に掛けてほぼすべての個体の摂食が停止した。脱皮直後の雌成虫の体色は非休眠個体とほぼ同様であり、摂食の間に徐々に鮮紅色に変化していった。また、摂食が確認された期間には、消化管に葉の成分と考えられる内容物が確認され、それらは摂食の停止と共に見られなくなった。

また、脱皮後にパラフィルム上に移して餌の摂取ができない状態で維持した雌成虫では、産卵が停止している（生殖休眠）状況にもかかわらず、体色の変化が見られなかった。また、脱皮後に摂食した休眠雌ではアスタキサンチンの顕著な蓄積が認められたのに対して、絶食させた個体では体内のアスタキサンチン含量は微量であった。

これらの結果から、休眠時の体色の変化には成虫化後の摂食が不可欠であることが判明した。成虫休眠の誘起にはビタミン A 前駆体でもある β -カロテンが必要である。しかし、先行研究により、それらは雌親から卵へ導入されたものでも十分であると考えられている。これに対して、体色の変化に必要なアスタキサンチン合成にはより多くの β -カロテンが必要であり、そのために成虫化後の補充が不可欠と考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. Sudo, M. and M. Osakabe (in press) Stellate hairs on leaves of a deciduous shrub *Viburnum erosum* var. *punctatum* (Adoxaceae) effectively protect *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae) eggs from the predator *Phytoseius nipponicus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology*. DOI: 10.1007/s10493-012-9648-4. 査読有
2. Murata, Y. and M. Osakabe (2013) The Bunsen-Roscoe reciprocity law in ultraviolet-B-induced mortality of the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Physiology* **59**, 241–247. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2012.11.008. 査読有. <http://hdl.handle.net/2433/171233>
3. Fukaya, M., R. Uesugi, H. Ohashi, Y. Sakai, M. Sudo, A. Kasai, H. Kishimoto and M. Osakabe (2013) Tolerance to solar ultraviolet-B radiation in the citrus red mite, an upper surface user of host plant leaves. *Photochemistry and Photobiology* **89**, 424–431. DOI: 10.1111/php.12001. 査読有
4. Tachi, F. and M. Osakabe (2012) Vulnerability and behavioral response to

ultraviolet radiation in the components of a foliar mite prey-predator system. *Naturwissenschaften* **99**, 1031–1038. DOI: 10.1007/s00114-012-0984-3. 査読有.

<http://hdl.handle.net/2433/168511>

5. Sakai, Y., M. Sudo and M. Osakabe (2012) Seasonal changes in the deleterious effects of solar ultraviolet-B radiation on eggs of the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology* **47**, 67–73. DOI: 10.1007/s13355-011-0090-6. 査読有. <http://hdl.handle.net/2433/153294>
6. Hiragaki, S., T. Kobayashi, N. Ochiai, K. Toshima, M. A. Dekeyser, K. Matsuda and M. Takeda (2012) Novel action of highly specific miticide, bifentazate as a synergist for a GABA-gated chloride channel of *Tetranychus urticae* [Acari: Tetranychidae]. *Neurotoxicology* **33**, 307–313. DOI: 10.1016/j.neuro.2012.01.016. 査読有
7. Sudo, M. and M. Osakabe (2011) Do plant mites commonly prefer the underside of leaves? *Experimental and Applied Acarology* **55**, 25–38. DOI: 10.1007/s10493-011-9454-4. 査読有. <http://hdl.handle.net/2433/147162>
8. Suzuki T., M. Shah, N.A. Ghazy, M. Takeda, H. Amano and K. Ohyama (2011) An improved space-saving system for testing photoperiodic responses of insects and mites: Its use for diapause experiments in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Applied Entomology and Zoology* **46**, 449–454. DOI: 10.1007/s13355-011-0059-5. 査読有

〔学会発表〕（計 15 件）

1. 舘英夕貴・刑部正博, 眼の無いカブリダニの紫外線忌避行動と餌ハダニの cue. 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会, 2013 年 03 月 27–29 日, 藤沢市 (日本大学)
2. 村田康允・刑部正博, ナミハダニにおける光回復効果の検証. 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会, 2013 年 03 月 27–29 日, 藤沢市 (日本大学)
3. 舘英夕貴・刑部正博, 紫外線照射に対するカブリダニの耐性と忌避行動について. 第 21 回日本ダニ学会大会, 2012 年 09 月 28–30 日, 松江市 (島根県民会館)
4. 村田康允・刑部正博, ナミハダニの UVB 損傷における相反則と光回復効果. 第 21 回日本ダニ学会大会, 2012 年 09 月 28–30 日, 松江市 (島根県民会館)
5. Osakabe M., S. Kawaguchi and Y. Murata, Is solar ultraviolet-B radiation an ultimate factor causing diapause in *Tetranychus*

urticae under temperate climatic conditions? XXIV International Congress of Entomology, 19–24 August 2012, Daegu, Korea.

6. Osakabe M. and M. Fukaya, Tolerance to UV radiation in the citrus red mite, *Panonychus citri*: the upper leaf surface user of host plants. 7th Symposium of the European Association of Acarologists, 9–13 July 2012, Vienna, Austria.
7. Murata Y. and M. Osakabe, Bunsen-Roscoe's Law in UVB damage and photoreactivation in the twospotted spider mite. 7th Symposium of the European Association of Acarologists, 9–13 July 2012, Vienna, Austria.
8. 須藤正彬・酒居勇太・刑部正博, なぜ一部の植食性ダニだけが葉表に産卵するのか. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会, 2012 年 3 月 29 日, 奈良市 (近畿大学)
9. 川口尚子・刑部正博, ナミハダニの休眠後摂食と体色変化. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会, 2012 年 3 月 28 日, 奈良市 (近畿大学)
10. 村田康允・刑部正博, ナミハダニに対する UVB の影響. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会, 2012 年 3 月 28 日, 奈良市 (近畿大学)
11. 刑部正博, ミカンハダニの紫外線耐性. 第 20 回日本ダニ学会大会, 2011 年 9 月 30 日, 高知市 (城西館)
12. 川口尚子・刑部正博, 休眠時および非休眠時におけるナミハダニのカロテノイド組成. 第 20 回日本ダニ学会大会, 2011 年 9 月 30 日, 高知市 (城西館)
13. 村田康允・刑部正博, ナミハダニに対する UVB の影響: 効果を決めるのは照射強度か積算照射量か? 第 20 回日本ダニ学会大会, 2011 年 9 月 30 日, 高知市 (城西館)
14. 酒居勇太・刑部正博, 反射シートを利用した太陽光紫外線によるナミハダニの防除の可能性. 第 55 回日本応用動物昆虫学会大会, 2011 年 3 月 27 日, 福岡市 (九州大学)
15. 關戸智恵・真鍋祐樹・菅原達也・刑部正博, おなじ赤色でも大違い? 見掛け倒しのカンザワハダニと質実剛健なミカンハダニにおける UV 耐性・UV 忌避性とカロテノイド組成の関係. 第 55 回日本応用動物昆虫学会大会, 2011 年 3 月 29 日, 福岡市 (九州大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刑部 正博 (OSAKABE MASAHIRO)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 50346037

(2) 研究分担者

竹田 真木生 (TAKEDA MAKIO)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 20171647

菅原 達也 (SUGAWARA TATSUYA)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 70378818

(3) 連携研究者

中川 好秋 (NAKAGAWA YOSHIAKI)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 80155689