では細胞内のグリセロールを細胞外へ排出するために開いた状態であることを示している。このようなゲーティング機構に関して、Fps1は極端に長いN末端およびC末端領域をもつことから、これらの領域がグリセロールの細胞内外への輸送を制御する鍵であることが以前から推定されていた。TamásらはN末端領域のデリション解析により、高度に保存された特定の領域を欠損させると恒常的なオープン型となり、グリセロールの蓄積ができず高浸透圧感受性になることを見いだした⁽⁶⁾。また、ThorsenらはFps1を欠損させるとヒ素の取り込みができなくなることから、アクアグリセロポリンがグリセロールだけではなくヒ素輸送体としても機能することを示した⁽⁷⁾。Hog1を欠損するとヒ素感受性となり、Hog1の活性型変異株では逆に野生株よりも耐性になった。Fps1のN末端領域にはMAPKリン酸化部位(Thr²³¹)が存在し、実際に *in vitro* の実験ではFps1がHog1によりリン酸化されることがわかった。これらの結果から、Hog1はFps1のリン酸化を介したゲート開閉を制御することによってグリセロールの蓄積に関与することが示された。

最後に、酵母のアクアポリンの構造解析で明らかになった新規なゲーティング機構について紹介する。Fischerらはメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* 由来のアクアポリン Aqy1の結晶構造を膜タンパク質研究上で最高の解像度(1.15Å)で解析することに成功した⁽⁸⁾。構造解析によると、Aqy1は閉じた状態の構造であり、これにはN末端領域の特定のアミノ酸残基(Tyr³¹およびSer¹⁰⁷)が影響していると考えられた。これらのアミ

ノ酸残基を置換した推定オープン型変異株(Tyr³¹→AlaおよびSer¹⁰⁷→Asp)は水輸送活性が上昇し、急速冷凍の繰り返し実験において生存率の低下が見られたことから、オープン型アクアポリンは過度な水の流入と流出をひき起こし生育に悪影響を与えることがわかった。さらに、分子動態のシミュレーション解析により、Aqy1のゲーティングはリン酸化と機械的感受性の組み合わせによって制御されていることが明らかにされた。

以上、酵母アクア(グリセロ)ポリンの生理機能と制御機構について述べた。一般的な実験条件(培地組成や培養温度など)は酵母が実際に存在する果実表面などの環境とは大きく異なり、さらには変異体も得られやすい条件であることから、酵母アクアポリンの本来の役割を見誤っている可能性が考えられ、今後の詳細な解析が必要であろう。また、ヒトアクア(グリセロ)ポリンは様々な疾病に関連していることが報告されており、酵母の変異株を宿主として用いた機能解析や阻害剤のスクリーニングなどが病態解明に向けた有効な手段として期待される。

- 1) S. Hohmann: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 300 (2002).
- 2) N. Pettersson *et al.*: *Biol. Cell*, **97**, 487 (2005).
- 3) V. Laizé *et al.*: *Yeast*, **16**, 897 (2000).
- 4) F. Sidoux-Walter *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17422 (2004).
- 5) K. Furukawa *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **74**, 1272 (2009).
- 6) M. J. Tamás *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **278**, 6337 (2003).
- 7) M. Thorsen *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4400 (2006).
- 8) G. Fischer *et al.*: *PLoS Biol.*, **7**, e1000130 (2009).

(古川健太郎, スウェーデン・ヨーテボリ大学)

クワガタムシにおける空中窒素利用の可能性 里山の人気者は物質循環の立役者

空中窒素固定は一般には植物でよく知られている。古くからダイズなどのマメ科植物が有名であり、近年になって畑作物ではサツマイモなども仲間入りしている。これらは地力の低い土地でも比較的生育が良い植物でもある。

この空中窒素固定とは、空気成分の8割ほどを占める窒素ガスを、生物が硝酸態窒素やアンモニアなどの窒素化合物に変換する現象である。ダイズでは根に根粒菌が寄生し、根粒菌は宿主から光合成産物である炭水化物を

供給してもらい、そのかわりに空中窒素固定で得た窒素化合物を宿主に与えて生育を助け、ひいては種子の増産にも貢献する。

一方、動物界に目を向けると、主に昆虫において、空中窒素固定細菌と共生している種がいくつか見つかった。たとえば、シロアリでは腸に共生している細菌が空中窒素固定をしていることが比較的古くから知られており^(1,2)、細菌のゲノム解析などから近年はさらに詳しいメカニズムが判明してきている。また、甲虫ではクワ

図1 ■1頭のヒラタクワガタ幼虫の飼育前・後におけるマットと生体の窒素量および空中窒素由来量（推定値）の例

単位：mg. マット：朽ち木の破砕物であり、幼虫の飼育に用いる。空中窒素由来量は見かけの値。文献5より作成

イムシにおける空中窒素固定についての報告がなされている⁽³⁾。

さて、本題のクワガタムシであるが、里山の代表的な昆虫であり、十数年ほど前からはペットとして飼育するのがブームにもなった。彼らには、幼虫時代を朽ち木の中で過ごし、朽ち木や菌糸を摂食して発育する種がいくつもある。この朽ち木は栄養面でみればきわめて偏った食餌である。それらのC/N比（炭素量と窒素量の比率で、食餌の質を示す指標に使われる）は100～200であり、炭素分が圧倒的に多く、逆に窒素分が少ないものがほとんどである。一般に、昆虫の体は約10%が窒素から構成されているので、幼虫の発育には相当量の窒素が必要である。したがって、幼虫が発育する課程で、いかに多くの窒素分を生育環境中から取り込むかが重要となってくる。その適応戦略の一つとして、クワガタムシの少なくとも一部の種では、空中窒素固定を利用していることが明らかになりつつある。

空中窒素固定の有無を検証する手法の一つとしてアセチレン還元能が用いられている。これは、空中窒素固定能のある生物が、そのニトロゲナーゼ酵素の働きによりアセチレンガスをエチレンガスに還元できることを利用し、固定能を間接的に検知できるものである。その手法により、コクワガタの幼虫に還元能が確認され⁽⁴⁾、おそらく幼虫と共生関係にある細菌が空中窒素固定を行なっているものと推察されている。

また、空中窒素固定が行なわれると飼育環境中の窒素量が増えることが予想される。実際に、コクワガタより

大型で窒素量変化の検出が容易と考えられるヒラタクワガタについて調べた結果、幼虫の発育に伴って飼育環境中の総窒素量が増加していることが判明している⁽⁵⁾。

これらのことから、クワガタムシ幼虫は空中窒素固定を生育のために利用している可能性が高いと考えられる。報告をもとにしたヒラタクワガタ幼虫の飼育環境中の窒素量の変化を図1に示す。この例では、成虫に含まれる窒素量の少なくとも4割程度に匹敵する量が空中窒素から取り込まれていることになる。なお、脱窒（窒素固定の逆反応、窒素化合物を還元し分子状窒素として大気中へ放出する）の可能性が否定できないため、空中窒素由来量は見かけ上の値である。今後は、空中窒素固定をより確実に検証するため、窒素固定に関与する *nifH* 遺伝子の存在や動きを確認することなどが重要となろう。

また、クワガタムシ幼虫の共生菌に関する研究が近年進んでおり、酵母の仲間などが重要な役割を果たしていることがわかってきている。このような有用微生物を、クワガタムシ幼虫はどのように獲得しているのだろうか。これに関しては、22種のクワガタムシでマイカンギア（菌嚢）という微生物を受け渡す器官がメス成虫に形成されていることがわかり、有用微生物が後代に受け渡されていると考えられている⁽⁶⁾。空中窒素固定細菌もこの中に含まれている可能性が考えられ興味深い。

里山の代表的な昆虫であり近年はペットとしても馴染み深いクワガタムシが、空中窒素固定を利用して窒素の獲得を積極的に行なっていること、ひいては里山の窒素循環のパイプを太くするのに貢献していることが明らかになってきたといえるだろう。つまり、クワガタムシが穿孔した朽ち木やクワガタムシ自身の窒素分は、キノコなど他の生物に利用され、やがて森林土壌へと移って地力を豊かにし、森林の維持・発達に貢献していると考えられる。さらには、この機能を積極的に農林業面などに活用していくことも検討されるべきであろう。

- 1) J. R. Benemann: *Science*, **181**, 164 (1973).
- 2) J. A. Breznak, W. J. Brill, J. W. Mertins & H. C. Coppel: *Nature*, **244**, 577 (1973).
- 3) J. R. Bridges: *Microb. Ecol.*, **7**, 131 (1981).
- 4) T. Kuranouchi, T. Nakamura, S. Shimamura, H. Kojima, K. Goka, K. Okabe & A. Mochizuki: *J. Appl. Entomol.*, **130**, 471 (2006).
- 5) 藏之内利和, 望月 淳, 鈴木一隆, 小島啓史, 五箇公一: 昆虫 (ニューシリーズ), **14**(4), 276 (2011).
- 6) M. Tanahashi, K. Kubota, N. Matsushita & K. Togashi: *Naturwissenschaften*, **97**, 311 (2010).

(藏之内利和, 元@Nifty昆虫フォーラム)