

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31日現在

機関番号：92302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580057

 研究課題名（和文） リポホリンによるクチクラ中の炭化水素輸送機構；
 エノサイトから体表まで

研究課題名（英文） Hydrocarbon Transport from Oenocytes to Body Surface by Lipophorin

研究代表者

片桐 千仞（KATAGIRI CHIHIRO）

株式会社数理設計研究所・核物性研究室・研究員

研究者番号：90002245

研究成果の概要（和文）：昆虫の外骨格は外界との仕切りだけでなく、外界からの侵入や、体内からの水の蒸散を防ぐなど、からだをまもる最前線である。外骨格表面を覆っているワックス層の主成分は炭化水素である。炭化水素はクチクラにあるエノサイトで合成される。炭化水素は極めて疎水性が高いため、体液中のリポホリンに積み込まれない限り、体表のワックス層に運ばれない。しかしながら、炭化水素がクチクラ内をどのようにしてワックス層へ輸送されているかについてはこれまで不明であった。本研究ではクチクラ中にリポホリンが存在することを確認するとともに、クチクラからリポホリンを精製した。このことは、リポホリンがクチクラ内を経てワックス層へ炭化水素を輸送することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Insect cuticle performs various functions; a skin and a skeleton, a physical protective barrier between the internal body and the external environment, and a defense against microbes. Wax layer that hydrocarbons mainly comprise covers the cuticle. Hydrocarbons are synthesized at the oenocytes, and transported to the wax layer by an insect circulating lipoprotein, lipophorin. Little has been known about the mechanisms of the hydrocarbon transport through the cuticle from haemolymph to the wax layer. In the present study, intact lipophorin was found in the cuticle and purified from the cuticle extracts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・昆虫科学

キーワード：昆虫生理生化学、リポホリン、炭化水素

1. 研究開始当初の背景

昆虫は無脊椎動物の中で最も進化・繁栄している動物群の一つであり、生息域も広い。彼らの繁栄の要因の一つは、表皮（クチクラ）の特性にあると言えるだろう。クチクラは体内と外界を隔てる「死んだ組織」と以前は考えられていた。しかし、地球上のさまざまな環境に適応し、繁栄している昆虫の生体防御反応の最前線として、クチクラは重要な役割を果たしていることが明らかになってきていた。そのクチクラを覆うワックス層は主に炭化水素からできている。炭化水素は真皮細胞のひとつエノサイトで作られるが、疎水性のため一度体液中のリポホリンに取り込まれないとワックス層に現れない。しかし、炭化水素がクチクラのどこをどのように輸送されるのかについての知見は皆無に近かった。

エノサイトで合成された炭化水素が、そのままクチクラ中をワックス層に移行する最短ルートを取らないことは次の実験結果から得られていた。エノサイトを含む表皮を¹⁴Cでラベルした酢酸（炭化水素生合成の前駆体）の入った生理食塩水中にインキュベートしても、放射能を持つ炭化水素がエノサイトで合成されるだけであった。生理食塩水にリポホリンを加えてはじめて、ワックス層に放射能を持つ炭化水素が現れた。一度、体液中のリポホリンに積み込まれないと、炭化水素はワックス層に到達しない。しかし、この実験結果からは、リポホリンに積み込まれた炭化水素がどのようにしてワックス層に輸送されるのかについての情報はなにもない。リポホリンはクチクラ内を通過してワックス層に炭化水素を輸送するのだろうか、そのとき、リポホリンはどのようにしてクチクラ内に入り、どこをどのように通過して、どこで積み荷の炭化水素を降ろすのだろうか。クチクラ内にリポホリンが入らない、リポホリンがクチクラ内に存在しない可能性も考えられた。

2. 研究の目的

まず第一に、クチクラ内にリポホリンが存在することの確認をしなければならない。存在するならば、それが

- (1) 体液にあるときと同じ機能を持つインタクトなリポホリン（体液中のインタクトなリポホリンは脂質をその合成や貯蔵器官から目的の組織や器官に何度でも輸送可能である。従って、クチクラにあってもインタクトならば炭化水素の再輸送は可能である）
- (2) 積み荷の炭化水素をおろしたけれど、新たな積み荷を取りに戻れなくなってしまったリポホリ

ン（再輸送不可能）

- (3) 積み荷の炭化水素をおろす際に、荷車部分（タンパクとリン脂質）も同時に壊されたリポホリンのアポタンパクの断片（再輸送不可能）の3つのうちのどの状態なのかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) クチクラのワックス層に炭化水素が蓄積することの確認

家蚕幼虫の終令脱皮後、体表の炭化水素をヘキサンで抽出し、定量した。

- (2) クチクラに体液リポホリンのアポタンパク質の抗体と反応する物質があるかの確認

家蚕終令幼虫のクチクラタンパク質中に体液リポホリンの抗体と反応するものがあるかどうかをウエスタンブロット法により、調べた。

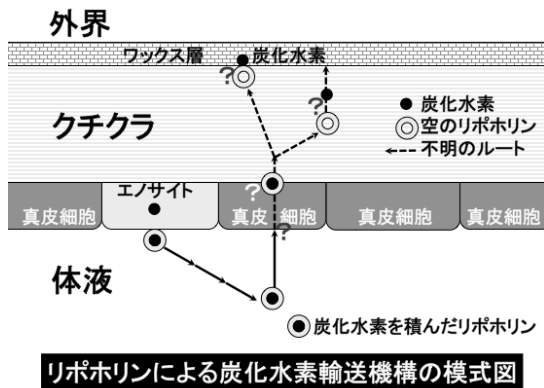
- (3) クチクラからリポホリンを精製

家蚕終令幼虫のクチクラから酢酸緩衝液により抽出後、CM32 カラムクロマトグラフィー、硫酸分画などを行い、KBrによる密度勾配遠心法を行った。

4. 研究成果

本研究ではまず、家蚕幼虫の体表炭化水素量が、成長とともに増加することを確認した。これは、幼虫の各ステージでリポホリンが炭化水素を体表に輸送していることを示している。次にリポホリンのアポタンパク質（アポリポホリンIとII）がクチクラ中に存在することを、その抗体をもちいて確認した。そこで、リポホリンが脂質—タンパク質複合体をいまだ形成しているのか、それともその構造は壊れて、バラバラのアポタンパク質として存在するのを確かめるために、クチクラからリポホリンを精製することを試みた。その結果、KBr密度勾配遠心法により、精製することに成功した。リポホリンはインタクトな脂質—タンパク質複合体としてクチクラ内に存在していることを示す初めてのデータである。リポホリンの抗体をもちいた免疫組織電子顕微鏡像は、リポホリンがクチクラ中にランダムに存在していることを示していた。リポホリンがクチクラのたとえば蠟管などの特定の構造に存在することは認められなかった。これまでの結果をもとに、リポホリンによる炭化水素輸送機構の模式図を描いてみた。エノサイトで合成された炭化水素は体液中のリポホリンに積み込まれること、リポホリンに積み込まれないと体表に炭化水素は届けられないことに加え本研究で新たに、クチクラ中にリポホリンが存在することが明らかになった。しかしながら、リポホリンは真皮細胞のどこをどのように通過してクチクラ

に移行するのだろうか、さらに、炭化水素はリポホリンによってどこまで輸送された後にワックス層に出現するのだろうかなど、未解明の点が残されている。



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 13 件)

- ① Harada T., Takenaka S., Iyota K., Shiraki T., Moku M., Katagiri C., Košťál V. (2013). Supercooling points and heat coma temperatures in four species of oceanic sea skaters of the genus *Halobates* (Heteroptera: Gerridae: Halobatinae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 16: 219-222. (査読有)
- ② Harada T., Takenaka S., Sekimoto T., Osumi Y., Iyota K., Furutani T., Shiraki T., Nakajo M., Katagiri C., Moku M., Košťál V. (2012). Correlation analysis of heat hardiness and super-cooling point in the oceanic sea skaters, *Halobates*. *Trends in Entomology* 8: 115-124. (査読有)
- ③ 林正和、片桐千仞、Wharton D. A.、網野比佐子、北潔、村勢則郎 (2012) 南極線虫 *Panagrolaimus davidi* の低温耐性と脂質. *低温生物工学会誌* 58:185-190. (査読有)
- ④ 片桐千仞 (2012) 昆虫の脂質輸送タンパク質 (リポホリン). *生物資料分析* 35:105-112.
- ⑤ Horikawa D. D., Yamaguchi A., Sakashita T., Tanaka D., Hamada N., Yukuhiro F., Kuwahara H., Kunieda T., Watanabe M., Nakahara Y., Wada S., Funayama T., Katagiri C., Higashi S., Yokobori S., Kuwabara M., Rothschild L. J., Okuda T., Hashimoto H., Kobayashi Y. (2012) Tolerance of Anhydrobiotic Eggs of the *Tardigrade Ramazzottius varieornatus* to Extreme Environments. *Astrobiology* 12:283-289. (査読有)
- ⑥ Goto S.G., Katagiri C. (2011) Effects of acclimation temperature on membrane phospholipids in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Entomological Science* 14:224-229. (査読有)
- ⑦ Ikeno T., Katagiri C., Numata H., Goto S. G. (2011) Causal involvement of mammalian-type cryptochrome in the circadian cuticle deposition rhythm in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Insect Molecular Biology* 20:409-415. (査読有)
- ⑧ Yao I., Katagiri C. (2011) Comparing wing loading, flight muscle and lipid content in ant-attended and non-attended *Tuberculatus* aphid species. *Physiological Entomology* 36:327-334. (査読有)
- ⑨ Harada T., Takenaka S., Sekimoto T., Nakajyo M., Inoue T., Ishibashi T., Katagiri C. (2011) Heat coma as an indicator of resistance to environmental stress and its relationship to ocean dynamics in the sea skaters, *Halobates* (Heteroptera: Gerridae). *Insect Science* 18:703-711. (査読有)
- ⑩ Harada T., Takenaka S., Sekimoto T., Ohsumi Y., Nakajyo M., Katagiri C. (2011) Heat coma and its relationship to ocean dynamics in the oceanic sea skaters of *Halobates* (Heteroptera: Gerridae) inhabiting Indian and Pacific Oceans. *Journal of Thermal Biology* 36:299-305. (査読有)
- ⑪ Goto S.G., Udaka H., Ueda C., Katagiri C. (2010) Fatty acids of membrane phospholipids in *Drosophila melanogaster* lines showing rapid and slow recovery from chill coma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391:1251-1254 (査読有)
- ⑫ Tsuchida K., Yokoyama T., Sakudoh T., Katagiri C., Tsurumaru S., Tkada N., Fujimoto H., Ziegler R., Iwano H., Hamano K., Yaginuma T. (2010) Apolipoprotein-III expression and low density lipoprotein formation during embryonic development of

the silkworm, *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology, part B 155:363-370 (査読有)

- ⑬ Harada T., Sekimoto T., Iyota K., Shiraki K., Takenaka S., Nakajyo M., Osumi Y., Katagiri C. (2010) Comparison of the Population Density of Oceanic Sea Skater of *Halobates* (Heteroptera: Gerridae) among Several Areas in the Tropical Pacific Ocean and the Tropical Indian Ocean. *Formosan Entomologist* 30:307-316 (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 八尾泉、片桐千仞: アリ共生型・非共生型アブラムシの脂質分析と飛翔筋について. 第72回日本昆虫学会 (東京) 2012年9月15日-17日
- ② Harada T., Takenaka S., Sekimoto T., Osumi Y., Inoue T., Nakajyo M., Katagiri C.: Temperature tolerance of oceanic sea skaters, *Halobates* (Heteroptera; Gerridae), and ocean dynamics. 24th International Congress of Entomology (韓国, 大邱) 2012年8月19日-25日
- ③ 林正和、片桐千仞、Wharton D. A.、網野比佐子、北潔、村勢則郎: 南極線虫 *Panagrolaimus davidi* の低温耐性と脂質. 第57回低温生物工学会年会 (筑波) 2012年5月31日-6月1日
- ④ 平林哲也、横山浩平、堀山正雄、島村透、片桐千仞、村上誠: 脂肪滴形成における脂質代謝酵素 PNPLA5 の機能解析. 第84回日本生化学会大会 (京都) 2011年9月21日-24日
- ⑤ 山田大邦、片桐千仞、宮下洋子、秋元信一: ユキムシ (トドノネオオワタムシ) の綿毛発生過程についてイボタロウムシやワモンゴキブリとの比較. 日本昆虫学会第71回大会 (松本) 2011年9月16日-19日
- ⑥ Katagiri C.: Waxy strand of woolly ash aphid, *Procipilus oriens*. 4th International Symposium of Environmental Physiology of Ectotherms and Plants (ISEPEP4) (Rennes, France) 2011年7月18日-22日
- ⑦ 八尾泉、片桐千仞: 低移動性を示すアリ共生型アブラムシの脂質分析と飛翔筋について. 第55回日本応用動物昆虫学会 (福岡) 2011年3月27日-29日
- ⑧ 八尾泉、片桐千仞: 飛ばないアリ共生型アブラムシの飛翔器官に選択はかかっているか? 2010年度日本応用動物昆虫学会・日本昆虫学会共催北海道支部大会 (札幌) 2011年1月19日
- ⑨ 平林哲也、横山浩平、島村透、上野紀子、池田和貴、山本圭、片桐千仞、田口良、村上誠: 皮脂腺に特異的に発現する新規脂質代謝酵素の機能解析. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010年12月7日-10日
- ⑩ 後藤慎介、片桐千仞: ナミクバエの低温順化と膜脂質. 日本動物学会第81回大会 (東京) 2010年9月23日-25日
- ⑪ 山田大邦、片桐千仞、宮下洋子、秋元信一: トドノネオオワタムシ (ユキムシ) の綿毛微細繊維の形状と発生の仕方. 日本昆虫学会第70回大会 (鶴岡) 2010年9月17日-20日
- ⑫ 金子文俊、片桐千仞、伴野豊、白井孝治: 蚕の繭の透湿性の品種による違い. 日本昆虫学会第70回大会 (鶴岡) 2010年9月17日-20日
- ⑬ 平林哲也、横山浩平、上野紀子、池田和貴、片桐千仞、田口良、村上誠: 皮膚に発現する新規脂質代謝酵素の機能解析. 第52回日本脂質生化学会 (渋川) 2010年6月14日-15日
- ⑭ 金子文俊、片桐千仞、伴野豊、白井孝治: 熱重量分析法を用いた繭の透湿性測定. 日本蚕糸学会第80回大会 (上田) 2010年4月3日-4日
- ⑮ 白井孝治、福島壽斗、片桐千仞、深本花菜: エビガラスズメ緑色幼虫の体色発現機構; 色素顆粒中の INS 凝集性分 X について. 日本蚕糸学会第80回大会 (上田) 2010年4月3日-4日

[図書] (計 2 件)

- ① 片桐千仞 (2010) 昆虫の低温耐性 - その仕組みと調べ方- (編 積木久明・田中一裕・後藤三千代) 岡山大学出版会 pp. 343 第3部1. 第5章 脂質の定量 (pp. 84-89)、第6部第1章 細胞膜の低温障害 (pp. 158-163)、第2章 細胞膜の流動性 (pp. 169-174)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 片桐 千仞 (KATAGIRI CHIHIRO)
株式会社数理設計研究所・核物性研究室・研究員
研究者番号: 90002245