

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21597

研究課題名(和文) シロアリの食害行動に関与する水代謝システムの解明と制御技術の開発

研究課題名(英文) Studies on water utilization system of termites and application to termite control

研究代表者

神原 広平 (Kambara, Kohei)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：60727577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の水の通り道を形成するタンパク質アクアポリンに着目し、シロアリの水代謝システムの解明を試みた。2種のシロアリから新たにアクアポリン遺伝子を獲得し、そのうちイエシロアリでは唾液腺に2タイプのアクアポリンが共発現することを明らかにした。唾液腺を低張液や高張液に浸漬すると速やかに膨潤収縮したことから、これらのアクアポリンは水透過の役割を担うと考えられた。また、銅や亜鉛の存在下では膨潤収縮が認められず、水透過能が金属イオンで阻害される可能性が示唆された。RNA干渉法でアクアポリンの機能を阻害したところ職蟻の排泄に変調が生じたことから、シロリアクアポリンは消化排泄系に寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロアリは木造建築物の多い日本では深刻な経済的被害をもたらす木材害虫である。日本で注意すべき代表的なシロアリ種にイエシロアリがいるが、本種の生活は水に依存し生活環境中の水を効率よく代謝・利用していると考えられている。本研究では細胞の水の通り道を形成するタンパク質であるアクアポリンを獲得し、イエシロアリの唾液腺では異なる2タイプのアクアポリンが共発現することを明らかにした。また、機能阻害による水代謝異常の誘引を示唆する結果を得たことから、アクアポリンを新たな標的分子にした個体の致死や社会生活の破綻を狙った防蟻薬剤の開発に資する成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the water metabolism in termite body by focusing on the aquaporins. We cloned cDNAs encoding aquaporin from *Coptotermes formosanus* and *Incisitermes minor*. Immunocytochemistry analysis for the *Coptotermes* aquaporins reveals that the two types of aquaporins are colocalized at the parietal cells of salivary glands of workers. The acinar salivary glands swelled or shrank rapidly when placed in hypotonic or hypertonic solutions. And these phenomena were not observed in the presence of copper or zinc. It was suggested that the *Coptotermes* aquaporins transport water and they can be inhibited by some metal ions. RNAi-mediated knockdown of a *Coptotermes* aquaporin causes a modulation of excretion in workers. It might be suggested that the aquaporin contributes to water metabolism in the digestive systems.

研究分野：木材保存学

キーワード：シロアリ アクアポリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シロアリは木質資源を餌として生活できるため、森林では枯死木等の分解者であるが、木造建築物の多い日本では深刻な経済的被害をもたらす害虫である。被害の大きさや難防除性から、現状注意すべきシロアリ種には、イエシロアリとアメリカカンザイシロアリがある。これら2種の加害様式は異なり、行動学的にみて、それぞれが独自のシステムで生活環境中の水を効率よく代謝・利用していると考えられている。イエシロアリは地下から侵入し、液状の水が確保できる箇所から木材への食害を始める。その際、唾液腺に隣接する唾液(貯水)嚢に由来する水を吐出することで周囲にある乾いた木材を好適な湿度環境に整備しながら食害範囲を拡大する。一方、アメリカカンザイシロアリは梁や柱といった気乾状態の木材中に生息し、木材から水分を獲得することで食害を行う。アメリカカンザイシロアリの糞は特徴的な顆粒状の形をしており、消化管で徹底的に水が吸収されていることが窺える。

昆虫体内で起きる水吸収・分泌の流れ(=水代謝システム)は、水チャネル「アクアポリン」が重要な役割を担っている(東, 2008; 2010)。シロアリでは、イエシロアリから DRIP タイプのアクアポリンがクローニングされ、職蟻の唾液腺で高発現する一方で、兵蟻の唾液腺には存在しないことが明らかになっている(Kambara *et al.*, 2014)。シロアリが木材を餌資源にできる背景には、共生生物とシロアリ自身の唾液腺に由来するセルラーゼによるセルロースの分解・利用がある。セルラーゼ等の分泌型酵素は、溶媒として水が存在しなければ機能できない。従って、唾液腺で発現するアクアポリンは水の供給路として唾液の生産・分泌に寄与していると考えられた。一方、シロアリ社会の扶養個体である兵蟻は、防衛に特化した大顎により自ら餌を探ることができないため、活発な唾液分泌の必要性がなくなったと推察されている。アクアポリンの機能阻害によりシロアリ職蟻の水代謝に異常を引き起こすことができれば、個体の致死だけでなくシロアリの社会生活の破綻が想定されることから、アクアポリンは防蟻薬剤の新たな標的分子となることが期待できると考えた。

2. 研究の目的

細胞の水の通り道を形成するタンパク質アクアポリンに焦点を当て、シロアリの食害行動に関与する水代謝システムの分子基盤の解明と制御技術の開発を目的とする。まず、シロリアクアポリン遺伝子のクローニングと組織別の発現分布解析を行う。つぎに、シロリアクアポリンの機能阻害がシロアリ個体に及ぼす影響を検討するとともに、アクアポリンの機能を阻害する候補薬剤の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) シロリアクアポリンのクローニングと RT-PCR による組織別発現分布解析

イエシロアリから DRIP タイプと異なるタイプのアクアポリン遺伝子をクローニングするため、公共の DNA データベースに登録されるイエシロアリの遺伝子情報を用い *in silico* クローニングを行った。イエシロアリ職蟻の消化管から QuickPrep Micro mRNA Purification Kit を用い mRNA を抽出し RT-PCR に供した。プライマーは、*in silico* クローニングで得た配列情報から設計した遺伝子特異的プライマーを用いた。RT-PCR は OneStep RT-PCR Kit を用いて行い、電気泳動による予測断片長の確認後、配列解析を行った。また、消化に関わる組織での遺伝子発現を解析するために前腸、中腸、後腸、直腸、マルピーギ管、唾液腺の各組織から mRNA を抽出し RT-PCR に供した。つぎに、アメリカカンザイシロアリから新たにアクアポリン遺伝子をクローニングするため、アメリカカンザイシロアリ擬職蟻の消化管から mRNA を抽出し RT-PCR に供した。プライマーは、数種の既知 DRIP タイプアクアポリンのアミノ酸配列間できわめて相溶性の高い 2 領域(各 9 アミノ酸)から設計した degenerate プライマーを用いた。上記同様に PCR 産物の配列解析を行った。

(2) 免疫組織化学染色法を用いたイエシロリアクアポリンの発現分布解析

イエシロアリ職蟻より摘出した組織をブアン固定液に浸し、室温下で減圧浸透させた後、氷上で 4~6 時間固定した。固定試料はエタノール系列で段階的に脱水処理しキシレン浸漬後、パラフィンへ浸透・包埋した。包埋組織は小型回転式マイクロトームで切片にし、常法に従い蛍光染色による免疫組織化学を行った。免疫組織化学に用いた抗体は、(1) でイエシロアリからクローニングしたアクアポリン遺伝子から翻訳されるアミノ酸配列のうち、C 末端側の 15 残基を抗原認識部位とし作製したものをを用いた。

(3) シロリアクアポリンの水透過能の検討と阻害物質の探索

防蟻性能を有する木材保存剤の中には、銅系や第四級アンモニウム系の化合物があるが、シロアリに対する作用機序は詳しく調べられていない。銅イオンや第四級アンモニウム塩にはヒトのアクアポリンの水透過性を阻害する知見が報告されている(Zelinina *et al.*, 2004; Detmers *et al.*, 2006)。そこで、イエシロリアクアポリンの発現が確認されている唾液腺を用いて水透過能の検討を行うとともに、銅、亜鉛、第四級アンモニウム塩による水透過能の阻害効果を検討した。水透過能の検討は、異なる濃度の緩衝液に浸漬した唾液腺の膨潤収縮を、生物顕微鏡で観察した後、顕微鏡用デジタルカメラで撮像した。

(4) RNA 干渉法によるシロアリアクアポリンの機能阻害効果の検討

RNA 干渉法は、タンパク質合成の設計図である mRNA の相補的配列を導入することでタンパク質合成を阻害し、遺伝子の機能を調べる技術である。アクアポリンの機能阻害がシロアリ個体に及ぼす影響について調べるため、体腔への微量注入によるイエシロアリアクアポリンに対する RNA 干渉を行った。相補的配列となる 2 本鎖 RNA (dsRNA) は、MEGAscript™ RNAi Kit を用いて合成した。鋳型となる mRNA はイエシロアリ唾液腺より Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit を用いて抽出した。合成した dsRNA は容量可変式オートインジェクターピペットキット NANOJECT II を用いて、イエシロアリ職蟻体腔へ微量注入した (図 1)。処理及び無処理個体をろ紙上に静置し、24 時間後までの排泄量を測定した。ろ紙上の糞は画像処理ソフトウェアである ImageJ を用いて 2 値化し面積に換算することで排泄量とした。



図 1 シロアリ職蟻への微量注入の様子

4. 研究成果

(1) シロアリアクアポリンのクローニングと RT-PCR による発現分布解析

イエシロアリの遺伝子情報を用いた *in silico* クローニングより 1,242 bp の塩基配列を獲得した。ここから翻訳されるアミノ酸配列 (261 残基) はアクアポリンで高度に保存される 2 つの NPA モチーフを有していた (図 2)。

```
nuc CGGCCGGGGAGTCGAGAGGTGATCAGTGAACCATTAGCATCAAGCTGTGACTGTGGCCAGTTTCGTTCAAACCACCTTTTTGAGTTCTCCATCTAAAAGAAATAATGGCTGGCTCTGGCATC
aa
nuc AAGGAGAAGCTGGCGTGGAGGAGATTACTCGGGGATTTGGAAAGCGCTACTCGCAGAATTCTCGGCAACCTGCTGCTAAATTTCTACGGGTGCGCAAGCTGCGTCGGCACCGGACAGGGAAAG
aa K E K L G V E E I T R G I W K A L L A E F L G N L L L N F Y G C A S C V G T G Q G K
nuc AGTCAGTGCTAATTCGCCCTCAGTTTCGGTCTGTTATGATGCGCATTTGTCAGTCTGTGGTCATGTGAGTGGCGCACATGTGAACCCAGCAGTTACGTTGGCATGCTAGCTACTGGAAACATC
aa S A V L L I A L T F G L V I M A I V Q S V G H V S G A H V N P A V T C G M L A T G N I
nuc TGCATCTCAAAGCACTACTCTACATCGCTGTACAATGCGTAGGTGCAAGTTGCTGGGACTGGAGTCTTAAGGCCCTAACTCCACTACATGCACAAAAGCAATGGGTATTACTCTACTCTCAGAA
aa C I L K A L L Y I A V Q C L G A V A G T G V L K A L T P L H A Q K Q L G I T L L S E
nuc GGTGTGACACCTGTCCAAAGTTTCGGTATTGAGTTCTCCTTGGATTGCTGCTGACTAGTGGTATTGGAGTATGTGACGTGAACCGCTCTGAAGTGAAGGGCTGGCTCCTGTTGCCATTGGA
aa G V T P V Q G F G I E F F L G F V L V L V F V G V C D V N R S E V K G L A P V A I G
nuc CITACATTGCTATGGGACACCTGGCTGCTGGATTATACAGGTTCCAGCATGAATCGCTGACAGCACTTTGGTTCTGCTAATACACAGAAATGGGAAGACCACTGGGTGCTACTGGTTGGT
aa L T I A M G H L A V L D Y T G S S M N P A R T L G S A I I T G I W E D H W V Y W L G
nuc CCCACTTTGGAGAAATCTCAGCTGCTTGTATCTACAGCAAGCAGCTTTCTCAGCAGTTCTGTTGAGATGACGACAGACTACACTCCAGTGCAGCTGAAGCGACTCGACAAACAAGAAATGAGGAT
aa P I L G G I S A L I Y K H A F S A V P V E M T T D Y T A P V Q L K R L D N K D E D
nuc GGAATGGCTTGAAGCTGTGCAAGAAATGACTTCAACTAATCTGTTTTGAAAGTCTACAGGAAATGCTCACAATAATGATCACTGAACACATCATGTGAAGATCCATGTAATTTCCGAGTTAC
aa G M A *
nuc CTAAGTTGTGAATAATTAACATATCGAGACCTTTCTGAACACAGAACATCGAGCAATTTTACGTGATGTTTGTGTAAGTTGGCTCCAGAAGCTAAGCGTAACAACACAGCATATGTGACAATCTGGA
nuc GTTGATGAAGCTGAATTAATCTCTAAGCAATCATATATACACCACCCATCTCTTAAAGTAAAAACATTCAGTGCCTGTGTAATAAAAAAAAAAAAAA
```

図 2. イエシロアリ PRIP タイプアクアポリンの塩基配列と推定アミノ酸配列

また、BlastX を用いて相同性検索を行った結果、ネバダオシロアリ (*Zootermopsis nevadensis*) のゲノムから推定されたアクアポリンと 86%、次いでチャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) の PRIP タイプアクアポリンと 67% の相同性を有していた。遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR して得られた PCR 産物の配列解析の結果も *in silico* クローニングの配列とほぼ完全に一致したことから、イエシロアリに PRIP タイプのアクアポリンが存在することが明らかとなった。RT-PCR による組織特異的発現分布の結果、全ての組織で増幅が認められたことから、イエシロアリの PRIP タイプアクアポリンの消化排泄系器官における発現が示された (図 3)。

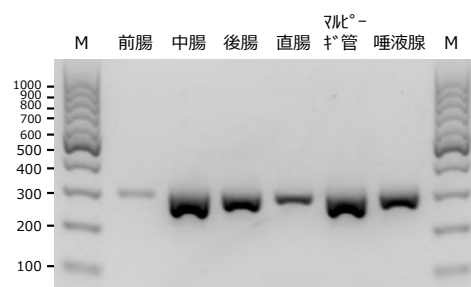


図 3. イエシロアリ PRIP タイプアクアポリンの発現分布

アメリカカンザイシロアリからは RT-PCR の結果、252 bp の cDNA 断片 が得られた。この cDNA クローンの塩基配列を用い、BlastX による相同性検索を行ったところ、イエシロアリの DRIP タイプアクアポリンと 91%、ネバダオシロアリのゲノムから推定されたアクアポリンとも 77% の相同性を有していた。このことから、アメリカカンザイシロアリは少なくとも DRIP タイプのアクアポリンを有することが明らかとなった。

(2) 免疫組織化学染色法を用いたイエシロアリアクアポリンの発現分布解析

免疫組織化学染色法を用いアクアポリンの組織特異的な発現分布を調べた結果、イエシロアリの PRIP タイプアクアポリンは、唾液腺及びマルピーギ管の基底部側の表層領域で特異的に検出された。唾液腺では、イエシロアリ DRIP タイプアクアポリンが唾液腺の傍細胞 (parietal cell) に局在することが知られている (kambara *et al.*, 2014)。そこで、DRIP タイプと PRIP タイプアクアポリンの二重染色を行なったところ、どちらのアクアポリンのシグナルも同じ唾液腺細胞で検出された。このことから、唾液腺の傍細胞には両方のタイプが共局在することが明らかとなった。唾液の産生には体液側からの水や電解質の輸送が必要不可欠であり、特にシロアリの唾液腺はセルラーゼを分泌するので、唾液腺で共発現するアクアポリンが唾液腺での活発な消化

液生産に関係していると推察された。一方、マルピーギ管で二重染色を行ったところ、DRIP タイプは管腔側で、PRIP タイプは基底側側に局在することが確認され、これはカイコ後腸で報告されたアクアポリンの発現分布と同様であった。

(3) シロアリアクアポリンの水透過能の検討と阻害物質の探索

イエシロアリアクアポリンの水透過能について、アクアポリンの発現が確認されている唾液腺を用いて検討した。イエシロアリ職蟻から摘出した唾液腺を高張液または低張液に浸漬すると、高張液では浸漬後直ちに収縮し細胞が凝集した状態になるのに対し、低張液では膨潤することが観察された。また、薬剤による水透過の阻害効果を調べるため、シロアリの防蟻薬剤の有効成分に用いられる、銅、第四級アンモニウム塩に加え亜鉛に対する水透過能の阻害効果を検討した。その結果、イエシロアリ職蟻の唾液腺は、銅や亜鉛の存在下では低張液に浸漬しても膨潤しなかった。一方、第四級アンモニウム塩では膨潤した。これらの結果から、金属イオンや第四級アンモニウム塩はヒトアクアポリンで阻害効果が認められているが、シロアリアクアポリンでは金属イオンが水透過能への阻害効果を有する可能性が示唆された。

(4) RNA 干渉法を用いたイエシロアリアクアポリンの機能阻害

個体レベルでのアクアポリン機能阻害が及ぼす影響について RNA 干渉法を用い調べた。RNA 干渉は DRIP タイプアクアポリン遺伝子から合成した dsRNA を職蟻体内へ微量注入することで行った。RNA 干渉を行ったイエシロアリ職蟻では、接種 24 時間後までの排泄量が無処理の場合の半分程度であった (図 4)。このことから、イエシロアリ DRIP タイプアクアポリンが消化排泄系に寄与している可能性が示唆された。

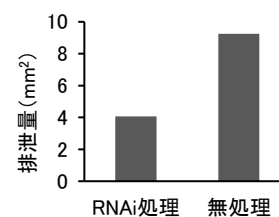


図 4. イエシロアリ職蟻の排泄量の比較

本研究から、経済的に深刻な木材害虫であるシロアリの体内で起きる水吸収・分泌の流れにおけるアクアポリンの役割や、その機能阻害がシロアリ個体に及ぼす影響が示された。今後は、機能阻害に関する更なる検討を進めていくことで、アクアポリンを標的分子にした新たな防蟻薬剤の開発といった応用展開へと繋げていきたい。

<引用文献>

- 東 政明、昆虫の水代謝、からだの水の事典 (佐々木成・石橋賢一編)、2008、94-100
東 政明、アクアポリン—水チャネル—のはたらき、昆虫の低温耐性—その仕組みと調べ方— (積木久明・田中一裕・後藤三千代編)、2010、138-146
Kambara, K. *et al.*、Aquaporin water channel in the salivary glands of the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus* is predominant in workers and absent in soldiers, *Physiological Entomology*, 39, 2014、94-102
Zelenina *et al.*、Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2004、51939-51943
Detmers *et al.*、Quaternary ammonium compounds as water channel blockers: specificity, potency and site of action, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 2006、14207-14214

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神原広平、大村和香子、東政明
2. 発表標題 アメリカカンザイシロアリのアクアポリンcDNAのクローニング
3. 学会等名 第68回日本木材学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kambara, K., Ohmura, W., Maruyama, M., Azuma, M
2. 発表標題 Localized expression of water-specific aquaporins in the salivary glands of the Formosan subterranean termite, <i>Coptotermes formosanus</i> .
3. 学会等名 XXV Internatinoal Congress of Entomology (ICE 2016)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 神原広平、大村和香子、丸山麻理弥、東政明
2. 発表標題 イエシロアリPRIPタイプアクアポリンの組織特異的発現分布
3. 学会等名 第67回日本木材学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----