

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月16日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15398

研究課題名(和文) 昆虫内分泌器官における糖供給経路

研究課題名(英文) Sugar traffic in invertebrate endocrine organ

研究代表者

菊田 真吾 (Kikuta, Shingo)

茨城大学・農学部・助教

研究者番号：90718686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫のアラタ体への糖供給が停止すると昆虫は致死に至る。しかし、その糖供給経路は不明である。この経路の解明には、アラタ体の細胞膜を隔てた内外の糖分子を明らかにする必要があった。主要な血糖であるトレハロースは、分解酵素TREH2によりグルコースに分解され、細胞内に輸送されと考えられてきたが、TREH2の膜内外の方向は明らかにされていない。抗TREH2抗体を用いた免疫組織化学的手法により、TREH2のトポロジーは細胞膜内側であることが示された。本組織において、トレハロース輸送を担う新規トランスポーターTRET2遺伝子を同定した。これは体液中のトレハロースを直接取り込んでいる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖は生物の代謝で重要である。昆虫もヒトと同様に、糖を利用して生きている。生存に不可欠な器官に糖の供給が停止すれば、昆虫は死に至る。本研究では、チョウ目昆虫における糖の輸送を明らかにした。この輸送を阻害する働きを示す薬剤が見つかれば、新規の農薬の作用点となる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)： Interruption of sugar port from hemolymph to corpora allata leads to death in insects. However, the sugar transport remains unknown. Trehalose is a disaccharide sugar as an energy source, which is contained in the hemolymph. The hydrolysis of trehalose is underwent by trehalase, TREH2 in peripheral tissues. This study revealed that the topology of membrane-bound TREH2 in *Bombyx mori* by using Immunohistochemistry. The study also showed that a novel trehalose transporter TRET2 using the *Xenopus* oocyte expression system.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：トレハロース トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

開放血管系である昆虫において、糖は体液から組織へ供給される。昆虫の主要な血糖のトレハロースはグルコース二分子で構成される二糖類である。トレハラーゼ阻害剤を施与されたカイコは、致死もしくは蛹化異常を引き起こすことが知られており、トレハロース関連酵素やトランスポーターを標的とする新規薬剤作用点となる可能性がある。昆虫のアラタ体は、内分泌器官のひとつとして生体の恒常性維持や成長に関わる生体内分子を分泌する。これまでカイコを用いた研究で、体液中に存在するトレハロースは、脳とアラタ体に発現するトレハラーゼ II (TREH2) により分解され、グルコースの形態でトランスポーターを介して細胞内に輸送されると考えられてきた。しかしながら、カイコ血糖はトレハロースであり、グルコースは検出限界以下であることや TREH2 のトポロジーが明らかにされていないことなどからアラタ体への糖分子の輸送経路は不明なままである。この経路の解明には、アラタ体の細胞膜を隔てた内外の糖分子を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

様々な昆虫において、主要な血糖であるトレハロースは、分解酵素 TREH2 により、グルコースに分解され、細胞内に輸送されると考えられてきたが、TREH2 の膜内外の方向は明らかにされていない (図 1)。鱗翅目昆虫の脳とアラタ体にのみ発現し、トレハロース輸送を担う新規トランスポーター TRET2 が推定された。これは、体液中のトレハロースを直接取り込んでいる可能性を示唆する。本課題では、脳とアラタ体への糖供給経路を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗 TREH2 抗体を用いた免疫組織染色

これまで十分に検証されなかったトレハロース分解酵素 TREH2 の脳及びアラタ体細胞膜内外の方向を、免疫組織化学的手法を用いて明らかにした。研究実施者は、ペプチド抗体を用いて細胞膜近傍の局在を観察した。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた TRET2 の機能解析

これまで推定していたトレハローストランスポーター候補遺伝子 TRET2 の ORF をアフリカツメガエル卵母細胞発現用ベクターに組換えた。In vitro 合成した cap 付加 RNA を細胞に微量注射し、細胞膜上に TRET2 を発現させた。TRET2 を発現させた卵母細胞をトレハロース溶液に浸した。水を注射した卵母細胞は、対照区として用いた。陽性実験区は PvTRET1 を発現させた卵母細胞を用いた。MBS バッファで洗浄後、細胞内トレハロースは糖分析カラムを備えた HPLC で定量した。

(3) CRISPR/Cas9 法によるトランスポーター TRET2 ノックアウトカイコの作出

カイコ非休眠 N4 系統の卵に、精製 Cas9 タンパク及び guide RNA を微量注射した。guide RNA は、次の工程で作製した。TRET2 の標的配列を予測プログラムで入手し、カイコゲノム上でオフターゲット領域の有無を探索した。得られた標的配列に PAM 配列及び T7 プロモーター、sgRNA 相補配列を付加した一本鎖 DNA を用いて、逆転写反応により guide RNA を作製した。注射済みカイコを飼育し、野生型との交配で得られた G1 世代の変異導入を確認した。シークエンスで欠損配列が明らかになったカイコ個体群を系統化し、交配維持した。G2 世代以降で、ノックアウトホモ系統、野生系統 (N4) を獲得し、それら系統間における違いを評価した。

4. 研究成果

(1) 抗 TREH2 抗体を用いた免疫組織染色

TREH2 は、細胞膜結合型酵素であり、膜貫通ドメインを C 末端付近に有する。また、膜貫通ドメイン N 末端側は、TREH1 との相同性が非常に高かった。TREH2 の抗原は、膜貫通領域外 C 末端の 15 ペプチドとした。本残基の交差性は、Silkbase で確認した。カイコ 5 齢幼虫から脳とアラタ体を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。パラフィン切片サンプルを用いて、免疫組織化学染色を行なった。熱処理及び proteinase K 処理で抗体賦活化した。組織染色の結果、TREH2 の局在は、酵素処理条件区で、組織内で検出された (図 2)。このことから、血糖トレハロースが組織に取り込まれ、細胞内トレハラーゼにより分解代謝される可能性が考えられた。抗体染色が不十分であった場合に、TREH2-C_GFP を一過的に強制発現させたカイコの GFP を局在マーカーとして、抗 GFP 抗体を用いて、局在を解析することが研究開始当初の予定であったが、TREH2 抗体を用いた組織染色で、その局在が明らかになったため、計画を変更した。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた TRET2 の機能解析

TRET2 発現卵母細胞では、トレハロースの取り込みがみられた。既に同定されている糖促進性トレハローストランスポーターの輸送活性に比べ、低かった (図 3)。これは、脂肪体内で産生されたトレハロースを体液中へと排出する活性よりも、体液中の血糖として存在するトレハロースを器官へ取り込むために機能することが考えられた。TRET2 は、トレハロース輸送を担うことが示された。

(3) CRISPR/Cas9 法によるトランスポーターTRET2 ノックアウトカイコの作出

変異体成虫を交配し、シーケンスにより変異を確認できた G2 世代の TRET2 ノックアウトカイコを継代・維持した。TRET2 ノックアウトホモ系統の作出はできなかった。TRET2 ノックアウトヘテロ系統は、野生系統に比べ、著しく成長が遅延した。現在も引き続き、TRET2 ノックアウトホモ系統の作出を試みている。これら一連の成果をまとめた論文を執筆中である。

**細胞膜結合型トレハラーゼTREH2は
幼若ホルモン (JH) 産生を制御する**

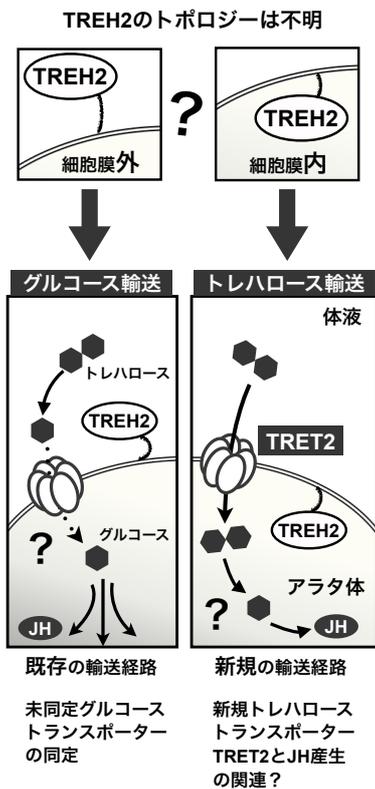


図1 内分泌器官における糖輸送経路

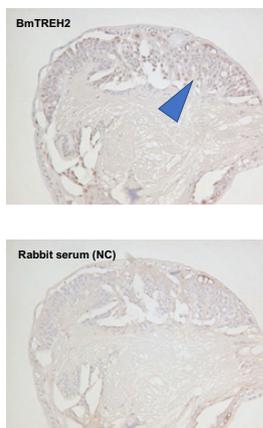


図2 細胞膜結合型トレハラーゼ酵素IIの局在

上) 抗BmTREH2抗体を用いた組織染色。

下) 対照区。

矢じりは、検出部位を示す。組織は、カイコ5齢幼虫の脳。

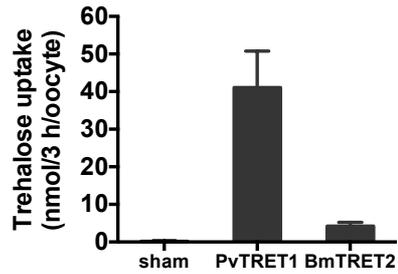


図3 TRET2によるトレハロース取り込み

sham, アフリカツメガエル卵母細胞に水を注射した対照区.

PvTRET1, ネムリユスリカ由来トレハローストランスポーターTRET1. Kikawada et al., 2007.

実験陽性区として用いた.

BmTRET2, 本研究で注目する新規トランスポーター候補遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。