

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380035

研究課題名（和文） 昆虫の排泄・水分調節の解明と応用展開

—アキアポリンファミリーの生理とその破綻—

研究課題名（英文） Molecular physiological studies on insect excretion and water regulation and its application – physiology of aquaporin and its disorder –

研究代表者

東 政明 (AZUMA MASAOKI)

鳥取大学・大学院連合農学研究科・教授

研究者番号：20175871

研究成果の概要（和文）：

昆虫は開放血管系の構造を持つ単純な体制でありながら、組織・細胞は乾き（渴き）に耐える潤った状態を維持し、排泄を調節している。特に、水分調節を司るカギ分子であるアキアポリン（水チャネル）は、チョウ目幼虫（イモムシのなかま）では腸管の上皮組織を単層で構成する細胞において方向性を持って表層分布し、水を体内へ回収し、堅い粒状の固形糞を排泄していることを示した。この機構によって幼虫は常に水分豊富な血液を維持し、液体摂取性昆虫（ヨコバイや蚊）と比べて、不測の絶食時や餌の不足下でも体内にはみずみずしさを維持することができることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Epithelial and cellular mechanisms in water transport has been explored over 50 years. Knowledge on the molecular aspects of water regulation in living organisms has greatly increased in recent years. Water transport across the plasma membrane depends on the presence of water channel – aquaporin (AQP). Studies on water transport itself in insect epithelia is so far lacking, although the movement of ions and water are inextricably linked. There are still few physiological studies on the multiple functions of AQP in insect epithelia. This project set out to investigate the present status on our understanding of insect aquaporins and the recent advances in the molecular and cellular roles of caterpillar's AQP.

Currently, all insect AQPs are water-specific except for the caterpillar's AQP, which possess the other isoform which enables to transport glycerol and urea (aquaglyceroporin: GLP). Water-specific AQPs in insects are classified into two closely related subfamilies, called **DRIP** (*Drosophila* Intrinsic Protein) and **PRIP** (*Pyrocoelia rufa* Intrinsic Protein) phylogenetically. Insect AQPs in very recent reports fall into DRIP or PRIP. In the silkworm, *Bombyx mori*, we have identified these three types, i.e., AQP-Bom1 as DRIP-type, Bom2 as GLP-type, Bom3 as PRIP-type. Caterpillars (solid/plant feeder) are normally endurable against drought and starvation compare to the liquid/plant feeders such as a leafhopper. Therefore, these three AQPs of *B. mori*, collaborate to maintain not only water balance, but also excretion in silkworm larvae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：昆虫生理学・分子生理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：浸透圧調節・原形質膜・乾燥耐性・害虫制御

1. 研究開始当初の背景

水という生命に直結する分子の細胞膜通過路（水チャネル）が発見され、アクアポリン（AQP）と命名され、水分子についてもプロトンや各種イオンのように原形質膜を介して輸送を行う分子が確定した（1992年）。昆虫のAQP研究は植物道管液を吸汁する半翅目昆虫（ヨコバイ）の中腸（Filter Chamber）からのcDNAクローニングで始まった（*Eur. J. Biochem.* **241**, 707-715, 1996年）。このヨコバイAQPの生理的役割は摂取した大過剰な水分の速やかな排出（セミのおしっこに相当）にあった。それ以降、吸血性の双翅目昆虫（蚊やハエ）から遺伝子がいくつか同定された。吸血行動は一過性であり、一度に大量の高濃度の動物血液が腸管内に流入してくるので、消化・排泄系の機能と浸透圧調節のしくみを解明すること、および病原媒介性昆虫の害虫制御を開拓することの二つの視点から進められていた。

代表者は、当時、カイコ絹糸腺や後腸より2種のAQPをクローン化していた（2007年時点で未発表）。これは鱗翅目（蛾・チョウのなかま）から最初の事例であった。鱗翅目幼虫（イモムシ）は植物葉を一過性でなく断続的に、長期にしかも大量に摂取する。このような飲水行動をとらない昆虫のAQPは食下物からの水吸収に役割があると考えられた。吸汁性昆虫ではいかにして過剰な水を捨て去るか（排水するか）に力点が置かれるのとは対照的で、いかにして水を再活用するのか、後腸における水リサイクル機能の解明とその応用展開へとアプローチする研究への準備段階が整っていた。

2. 研究の目的

一般に昆虫の体は小さい。ヒトからみれば僅か一滴の水が昆虫にとっては生死を分ける場合もある。脱皮・変態および休眠を伴うドラマティックな一生のなかで摂食（吸汁）と排泄の微妙なバランス維持が要求される。昆虫はからだの成り立ちが開放血管系で

あるので、体液（Hemolymph）を介して組織間の相互作用だけでなく、細胞間の溶質交換つまり原形質膜を介したやりとりも、より直接的で単純である。したがって、僅かな水分の漏出やイオン・溶質（fluids）に関わる細胞膜機能の異常や破綻が、個体の浸透圧維持に及ぼす影響は大きいだけに、体内水分の適正な維持管理は昆虫において正に水際作戦で行っているといえる。

哺乳類のAQPには臓器特異性があり、多数のアイソフォーム（ヒトで13種）が遺伝子ファミリーを形成している。機能も水だけでなくグリセロールや尿素・アンモニアなどを通過させるタイプが発見され、【AQP＝水チャネル】に留まらないアクアポリン分子の機能多面性の実体や病態解明が進み、研究が大きく展開していた。

既に代表者がカイコ幼虫から遺伝子同定を完了していた2種類のAQP遺伝子について、カイコ後腸の排泄機構や幼虫個体の水分維持に積極的に関わることが予想されていたので、本研究では、AQPは水を通過輸送させる役割—狭義のAQPの働き—にとどまらず、昆虫個体の排泄や浸透圧調節・水リサイクルによる生体維持基盤全体に関わってくる複数のアクアポリンの生理的役割とその破綻・不調（disorder）を解明する研究グループを組織することとした。研究分担者と協力することによって、生理的状态および非生理的状态にある昆虫個体のみずみずしさを制御するための排泄・水分調節を解明し、さらに害虫制御への応用を模索するまでの展開を目指した。

3. 研究の方法

本研究では鱗翅目幼虫（カイコ・ニカメイガ・コナガ・ナシヒメシンクイ）を用いた。それぞれの食性・寄主植物が異なるので、消化・排泄系の形態にも異同があるが、排泄・水分調節に関わるのは主に消化管（中腸・後腸・マルピーギ管）であり、代表者が既に明らかにしていたカイコAQPの知見を元に

して、昆虫個体の浸透圧調節におけるアクアポリンファミリーの生理的役割を検証した。アクアポリンファミリーは水特異的な群とグリセロールチャネル群（水に加えて、グリセロール・尿素を通過する性質を有する）に大別されるので、機能的なはたらき **「何を輸送するのか」** を中心課題に据えた。研究課題分担は以下のとおりであった。

- (1) 後腸の扁平単層上皮細胞の生理 **「堅い排泄糞の意義」**（代表者・東）
- (2) ニカメイガ休眠幼虫のグリセロール輸送の分子的検証（積木・泉）
- (3) 尿素輸送の実体解明 **「アクアグリセロポリンが関与するのか」**（平山）
- (4) アクアポリン機能の破壊試験 **「原形質膜を用いたアッセイ系の確立」**（堀・東）
- (5) 昆虫感覚器官におけるアクアポリンの存在証明とその生理的役割（塩見・石田・東）

4. 研究成果

上記課題のうち、(1)(3)(4)について論文発表し、(5)については実験を終えることができた。とりわけ、グリセロール・尿素も輸送するタイプ（アクアグリセロポリン）が昆虫においても存在することを初めてカイコ幼虫で証明した（雑誌論文③ *Insect Mol. Biol.* 誌, 2009年）。さらに、ナシヒメシンクイ幼虫からも昆虫のアクアグリセロポリンとしての2例目を発表した（雑誌論文④）。カイコ・ナシヒメシンクイの双方について、もう一方の水専用のAQPと併せてそれぞれの昆虫で2種類のAQPを対比させながらまとめて1ヶの論文として発表したため注目された（雑誌論文③と④）。

研究の3年目に入り、カイコで上記の2種類AQPとは別の第3のアイソフォームを遺伝子クローニングすることができた（DDBJ:AB458833, 配列は既公開）。このタイプは最初にクローン化した水専用のAQP（DDBJ:AB178640）と同様に後腸に分布し、既に発表した2種のAQPが、中腸や後腸の上皮細胞の apical 側（腸管腔側）の原形質膜に局在するのに対して、この第3のタイプ

は basal 側（基底部側）に局在するという対照的な結果を得た（下図参照）。

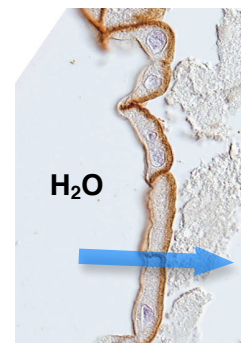
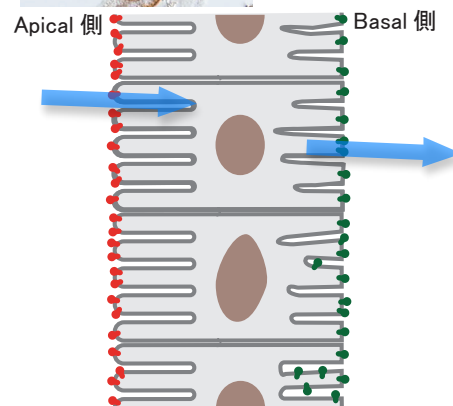


図. 実際の後腸上皮細胞のBasal側にあるアクアポリンを免疫組織化学で示している。後腸では原形質膜の両側に異なるアクアポリンが存在する（下の模式図）。水輸送の方向は排泄糞を堅くするため体腔（Basal）側へ向かう。



このことによって、消化・吸収・排泄のプロセスでの上皮細胞層を介した水分子の流れ（trans-epithelial water flow）を正確に追跡できることを示し、イモムシが排泄過程で水分を回収し、堅い固形糞として排出する中でのAQPの役割を示した（*J. Exp. Biol.* 誌, 投稿中）。

我々がカイコから2番目に見出した、中腸とマルピーギ管で分布するAQP（アクアグリセロポリン型, DDBJ:AB245966）の実際の昆虫個体での生理的役割の詳細については今後の課題としての残されたが、現時点で、我々の研究のように一種の昆虫個体内での複数のAQP種の分子生理学的な研究を行っている事例は海外でも見当たらない。しかし、我々が論文発表した頃を前後して、様々な昆虫でAQPの報告が国際雑誌へ掲載されるようになり、研究者間の競争が激化してきた。現在、昆虫アクアポリンの研究は、それぞれの昆虫でアクアポリンをコードする遺伝子の発現を人為的に操作して、その機能

を特定するべく、よりハイレベルな段階へ移行しつつある。われわれも研究終了翌年の2011年を未発表データの投稿に集中している。

なお、本研究課題の研究期間中に2回、研究分担者の所属機関に於いて（岡山大学・新潟大学）公開講演会を開催した。

■日本学術振興会・基盤研究B「昆虫の排泄・水分調節の解明と応用展開—アクアポリンファミリーの生理とその破綻—」公開セミナー主催，岡山大学資源生物科学研究所（倉敷市）2009年1月6日。

■日本学術振興会・基盤研究B「昆虫の排泄・水分調節の解明と応用展開—アクアポリンファミリーの生理とその破綻—」公開セミナー主催，新潟大学大学院・生命環境棟（新潟市）2012年12月27日。

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 Haginoya, K., Thangavel, V., Pandian, G.N., Tomimoto, K., Shitomi, Y., Azuma, M., Angsuthanasombat, C. and Hori, H (2010) Investigation of physicochemical condition to stabilize phosphatidylcholine-liposome enclosing fluorescent calcein and its exploitation for analysis of pore formation with CryIA toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Entomol. Zool* **45**, 477-488. [査読有]
- ② Kambara, K., Takematsu, Y., Azuma, M. and Kobayashi, J. (2009) cDNA cloning of aquaporin gene expressed in the digestive tract of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera; Rhinotermitidae). *Appl. Entomol. Zool.* **44**, 315-321. [査読有]
- ③ Kataoka, N., Miyake, S. and Azuma, M. (2009a) Aquaporin and aquaglyceroporin in silkworms, differently expressed in

the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* **18**, 303-314. [査読有]

- ④ Kataoka, N., Miyake, S. and Azuma, M. (2009b) Molecular characterization of aquaporin and aquaglyceroporin in the alimentary canal of *Grapholita molesta* (the oriental fruit moth) - comparison with *Bombyx mori* aquaporins. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **78**, 81-90. [査読有]
- ⑤ Miyake, S. and Azuma, M. (2008) Developmental expression and the physiological role of aquaporin in the silk gland of *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **77**, 87-93. [査読有]

〔学会発表〕（計10件）

- ①丸山麻理弥・永江知音・東 政明：カイコ卵巣の発育過程におけるアクアポリン（水チャンネル）の役割。蚕糸・昆虫機能利用学術講演会～日本蚕糸学会第81回大会，東京都，2011年3月20～21日。
- ② 東 政明・丸山麻理弥：後腸とそれに並走するマルピーギ管におけるアクアポリンの局所的分布とその機能。蚕糸・昆虫機能利用学術講演会～日本蚕糸学会第80回記念大会，上田市，2010年4月3～4日。
- ③丸山麻理弥・東 政明：カイコ幼虫の水バランスにはたらく後腸アクアポリンの抗ペプチド抗体を用いた分析。日本蚕糸学会第75回関西支部・第65回九州支部合同大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会，山口市，2009年11月12～13日。
- ④ Masaaki Azuma: Physiology of aquaporins in lepidopteran caterpillars. 3rd International Symposium on the Environmental Physiology of Ectotherms and Plants (ISEPEP3) Tsukuba, Japan (August 24-28, 2009) (一般講演)
- ⑤ 片岡直也・三宅誠司・東 政明：鱗翅目幼虫のアクアポリンとアクアグリセロポリンの構造的特徴と機能的解析。蚕糸・昆虫機能学術講演会～日本蚕糸学会第79回大会，東京都，2009年3月21～22日。
- ⑥ Miyake, S. and Azuma, M.: Molecular cloning, tissue and cellular characterization of two isoforms of

aquaporin in silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. International Symposium on Insect Midgut Biology, South China Normal Univ. Guangzhou, China (April 7-11, 2008) (ポスター発表)

[図書] (計5件)

- ① 東 政明 (2010) 水チャネル (アクアポリン) のはたらき. 昆虫の低温耐性 -その仕組みと調べ方- (積木久明編). pp. 138-146, ISBN978-4-904228-14-2, 岡山大学出版会, 岡山. [査読有]
- ② 三宅誠司・東 政明 (2009) 絹糸腺でpHと水分を調節するしくみ. 『虫たちが語る生物学の未来』, pp. 166-169. (財)衣笠会編. 為国印刷(株), 京都. [査読無]
- ③ 東 政明 (2008) 昆虫の水代謝. からだと水の事典 (佐々木成・石橋賢一編). pp. 94-100, ISBN978-4-254-30094-9, 朝倉書店, 東京. [査読有]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 政明 (AZUMA MASA AKI)
鳥取大学・大学院連合農学研究科・教授
研究者番号：20175871

(2) 研究分担者

積木 久明 (TSUMUKI HISAAKI)
岡山大学・資源生物科学研究所・教授
研究者番号：60033255
(H20年度のみ)

泉 洋平 (IZUMI YOHEI)
岡山大学・資源生物科学研究所・技術専門職員
研究者番号：10457210
(H21~22年度)

平山 力 (HIRAYAMA CHIKARA)
独立行政法人 農業生物資源研究所・昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット・主任研究員
研究者番号：90370676
(H20~21→H22：連携研究者)

堀 秀隆 (HORI HIDETAKA)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号：00293241

塩見 邦博 (SHIOMI KUNIHIRO)
信州大学・繊維学部・准教授
研究者番号：70324241
(H20年度のみ)

石田 裕幸 (ISHIDA YUKO)
神戸大学・大学院理学研究科・GCOE リサーチアソシエイト
研究者番号：90509861
(H22年度のみ)