

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 6 月 17 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658020

研究課題名（和文） 絹糸腺の解毒、排泄および生体防御における機能の解明

研究課題名（英文） Searching new functions of silk gland for detoxication, excretion, and immunity

研究代表者

神村 学 (MANABU KAMIMURA)

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫成長制御研究ユニット 主任研究員

研究者番号：60370649

研究成果の概要（和文）：

色素の取り込み実験から、カイコの絹糸腺は口から取り込んだ異物を繭中に排泄する能力を持つことが確認できた。マイクロアレイ解析と RT-PCR 解析の結果、カイコでは、様々なトランスポーター類の遺伝子が終齢幼虫期の前半まではマルピーギ管で強く発現するが、後半になると前部絹糸腺で強く発現するようになることがわかった。一方、7種類のガの繭の抗微生物活性を調べたが確認できなかった。以上の結果より、絹糸腺が“蛹化期特異的な排泄器官”として機能する可能性が示唆されたが、生体防御における機能は確認できなかった。

研究成果の概要（英文）：

The silkworm larvae that ate an artificial diet containing a dye span colorful cocoons, indicating that the silk gland can excrete unnecessary materials into cocoons. Microarray and RT-PCR analysis showed that multiple transporter genes are strongly expressed in the Malpighian tubes until the mid-last instar and thereafter expressed strongly in the anterior silk gland. Taken together, these results suggest that the silk gland functions as "pupation stage-specific excretory organ." In contrast, we could not obtain an evidence that show immune functions of the silk gland.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	0	1,000,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	630,000	3,730,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫生理

1. 研究開始当初の背景

今までになされてきた膨大な数の研究から、ガ類の絹糸腺は繭の材料となる絹タンパク質の合成に特化した器官であり、それ以外の生理機能は持たないというのが通説になっている。しかし、様々なガの蛹が暑く湿潤な日本の夏を繭の中で過ごす、その間に繭上で細菌やカビが繁殖することはないことから、繭は抗微生物活性を持っていることが予想される。もし、そうだとすると絹糸腺から繭中に抗菌物質が分泌され蛹を微生物の感染から守っているのではないだろうか？

また、繭がカイコにおいてはガット・パージにより腸内を空にしてから繭を作りはじめて3日ほどで蛹になるが、その間は肛門からは一切排泄しない。しかし、幼虫から蛹へと体の構造を作り替える際には多量の老廃物が発生すると考えられ、それらを適切に処理することは蛹への変態を正常にすすめるにあたって必要不可欠のことだと考えられる。この間、通常の排泄経路は働かないが、絹糸腺が“蛹化期特異的な第二の排泄器官”として、老廃物や有毒物質などを、多量の水分と一緒に繭中に排泄する役割を担っているのではないだろうか？

このように絹糸腺が絹タンパク質生産以外の様々な機能を持つ可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ガ類の絹糸腺が、絹タンパク質の合成以外に、解毒、排泄や生体防御などの多様な機能を持つ可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 色素のカイコへの摂食実験

ブリリアント・ブルーFCF、ローダミンB、ニュートラル・レッド、マラカイト・グリーン、メチレン・ブルー、ブリリアント・ブルーFCFの5種類の色素を500 ppmの濃度で人工飼料に混ぜてカイコの5齢幼虫に食べさせた後、皮膚の色彩の変化を観察するとともに、解剖して絹糸腺の染色具合を観察し、また繭の色彩を観察した。

(2) カイコの絹糸腺で発現する遺伝子のマイクロアレイによる網羅的解析

5齢4日の摂食期および5齢8～10日の繭を作っている最中のカイコ幼虫の前部絹糸腺から総RNAを抽出し、マイクロアレイ解析に供試した。

(3) 絹糸腺で発現する遺伝子のRT-PCR解析

マイクロアレイ解析により、繭を作ってい

る最中の幼虫の前部絹糸腺で強く発現することがわかった遺伝子について、RT-PCR解析を行い、時期別・器官別発現プロフィールを詳しく調べた。

(4) カイコ繭のメタボローム解析

桑を食べさせて飼育したカイコの繭を50%温エタノールで抽出し、抽出物をLC-TOF-MS解析に供試した。同時に、4齢幼虫が5齢幼虫に脱皮する際に吐く足場糸を50%温エタノールで抽出し、抽出物をLC-TOF-MS解析に供試した。

(3) 繭の抗微生物活性の検定

様々な微生物の培養プレートに、カイコ、ヤママユガ、ミノウスバ等の7種類の繭を置く、もしくはそれぞれの繭の50%温エタノール抽出物を蒸留水に溶解し直した溶液をスポットすることを行い、数日培養した後に培養阻止円ができるかどうかを観察することにより、各繭および繭抽出物の抗微生物活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 色素のカイコへの摂食実験

5種類の色素を含む人工飼料をカイコの5齢初期の幼虫に食べさせて、その後の皮膚の色の変化や繭の色、また解剖して絹糸腺の色の変化を調べた(図1)。

絹糸腺



繭



図1 色素入りの人工飼料を食べたカイコの絹糸腺と繭

それぞれ左からローダミンB、ニュートラル・レッド、ブリリアント・ブルーFCF、メチレン・ブルーを食べさせたカイコのもの。

マラカイト・グリーンを食べた虫は食下後数日以内に死亡した。ブリリアント・ブルーFCFを含む飼料を食べた虫では皮膚が染まる

ことはなく、また、絹糸腺や繭も染色されなかった。メチレン・ブルーを含む飼料を食べた虫では皮膚が薄い青に染まり、絹糸腺と繭も薄い青に染色された。ニュートラル・レッドを含む飼料を食べた虫では、皮膚が濃い赤紫に染まり、絹糸腺も濃い赤紫に染まったが、繭は薄く紫色を帯びるにとどまった。ローダミンBを含む飼料を食べた虫では皮膚が濃いピンクに染まり、絹糸腺と繭も濃いピンクに染色された。このように、絹糸腺は食べ物と一緒に体内に取り込んだ物質を取り込み、さらに繭中に排泄する能力を持つことが確認できたが、その輸送程度は色素により大きく異なることもわかった。

(2) カイコの絹糸腺で発現する遺伝子のマイクロアレイによる網羅的解析

摂食期と繭を作っている最中のカイコ終齢幼虫の絹糸腺で発現する遺伝子のマイクロアレイ解析から、多数の遺伝子が繭を作っている時に強く発現誘導されることがわかった。特に物質の輸送に関わるトランスポーター類に注目すると、摂食期に比べて吐糸期に5倍以上強く発現した遺伝子には、SLC(solute carrier)トランスポーターのうち、脊椎動物の有機カチオン/アニオン・トランスポーターが属すSLC22ファミリーのメンバーが7種類、プロトン共役アミノ酸トランスポーターが属すSLC36ファミリーのメンバーが4種類、カチオン性アミノ酸トランスポーターが属すSLC7ファミリーのメンバーが1種類、グルコース・トランスポーターが属すSLC7ファミリーのメンバーが5種類含まれていた。また、解毒に関わる可能性のあるP450遺伝子もいくつか発現誘導されていた。

(3) 絹糸腺で発現する遺伝子のRT-PCR解析

マイクロアレイ解析において前部絹糸腺で発現していたトランスポーター類をコードする遺伝子について、RT-PCRにより時期別・器官別のmRNA発現プロファイルを調べた。

まず、マイクロアレイ解析において、吐糸期における発現誘導率が特に高かった6種の遺伝子に注目して前部絹糸腺における発現を4、5齢期を通して調べた。4齢期中はどの遺伝子についてもほとんど発現を確認することができなかった。糖トランスポーター遺伝子ファミリーの*SCL2-2*については5齢期のはじめから発現し始め吐糸開始期の7.5日ごろに発現ピークを迎えた。同じく糖トランスポーター遺伝子ファミリーの*SCL2-1*は*SCL2-2*よりやや遅れて発現を開始し、やはり吐糸開始期に発現が最大になった。一方、有機イオン・トランスポーター遺伝子ファミリーの*SCL22-1*、*SCL22-2*、アミノ酸トランスポ

ーター遺伝子ファミリーの*SCL36-1*、*SCL36-2*は全て5齢6日から発現しはじめ、吐糸期の5齢7.5~10日にかけて強い発現が観察された。

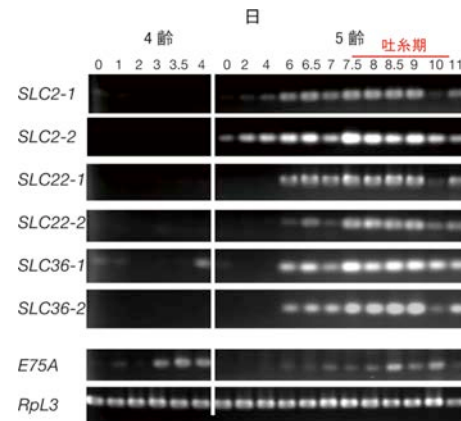


図2 4、5 齢期中のカイコ前部絹糸腺における SCL 遺伝子ファミリーの発現

次に、アミノ酸トランスポーター遺伝子ファミリーの*SCL36-1*、*SCL36-2*、*SCL36-3*、*SCL36-4*について5 齢期の器官ごとの発現を比較した。前部絹糸腺では*SCL36-1*、*SCL36-2*に加えて*SCL36-3*が摂食期に比べて吐糸期に強く発現していたが、*SCL36-4*については摂食期に比べて吐糸期でやや強く発現するにとどまっていた。前部絹糸腺以外の器官では、*SCL36-2*、*SCL36-3*、*SCL36-4*は昆虫の排泄器官であるマルピーギ管で特に強い発現が観察された。興味深いことに、これらの遺伝子の遺伝子は前部絹糸腺では摂食期に比べて吐糸期に強く発現していたのに対し、マルピーギ管では逆に摂食期で強く発現し吐糸期に入ると弱い発現しか観察できなくなった。

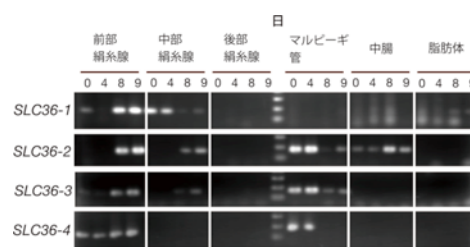


図3 6 種の器官におけるアミノ酸トランスポーター遺伝子の5 齢期の発現

以上の結果から、前部絹糸腺において繭を作る時期になると様々なトランスポーター類の遺伝子の発現が誘導されること、およびアミノ酸トランスポーター遺伝子については、5 齢期の摂食期まではマルピーギ管で強く発現し、吐糸がはじまるとマルピーギ管での発現が弱まり前部絹糸腺で強く発現するようになることがわかった。これらの結果から、

マルピーギ管からの排泄が止まる蛹への変態過程において、絹糸腺が“蛹化期特異的な第二の排泄器官”として機能する可能性が強く示唆された。

(4) 繭のメタボローム解析

カイコの繭を HPLC-TOF-MS 解析に供試したところ、多数の有機化合物が4齢期の足場糸に比べて繭中から検出され、絹糸腺が高い排泄能力を持つという仮説が裏付けられた。特に繭中から多量に検出された化合物の中にはロイシン/イソロイシンやグルタミン酸などのアミノ酸が含まれており、吐糸期の絹糸腺でアミノ酸トランスポーター遺伝子が強く発現していたこととよく一致していた。

(3) 繭の抗微生物活性の検定

大腸菌と黄色ブドウ球菌の2種の細菌、*Rizopus oryzae* とクワ暗斑病菌 (*Myrothecium roridum*) の2種の植物病原性糸状菌、緑きょう病菌 (*Nomuraea rileyi*)、白きょう病菌 (*Beauveria bassiana*)、*Metarhizium anisopliae* の3種の昆虫病原性糸状菌に対して、7種類のガの繭とそれぞれの繭の50%メタノール抽出物を処理してそれぞれの発育に対する影響を調べたが、はっきりした成長阻害効果は観察できず、ここで調べたガの繭には微生物に対する強力な成長阻害活性物質は含まれていないと判断した。

以上の結果から、絹糸腺が“蛹化期特異的な第二の排泄器官”として機能する可能性が強く示唆されたが、生体防御に役立つという仮説を裏付ける結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. Kamimura M, Saito H, Niwa R, Niimi T, Toyoda K, Ueno C, Kanamori Y, Shimura S, Kiuchi M. (2012) Fungal ecdysteroid-22-oxidase: a new tool for manipulating ecdysteroid signaling and insect development. *J Biol Chem.* 287: 16488-16498.
2. Kanamori Y, Hayakawa Y, Matsumoto H, Yasukochi Y, Shimura S, Nakahara Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. *J Biol Chem* 285: 36933-36944.
3. Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) Two hemocyte lineages exist in silkworm larval

hematopoietic organ. *PLoS One* 5, e11816.

[学会発表] (計16件)

1. 神村学 (2013) *in vivo* リポフェクション: 昆虫への簡便で汎用的な遺伝子導入法としての可能性. 日本応用動物昆虫学会、2013年3月29日、日本大学藤沢キャンパス
2. 神村学 (2013) 緑きょう病菌の脱皮ホルモン不活性化酵素: 新たな生理学、発生学研究ツールとしての展開. 日本応用動物昆虫学会、2013年3月29日、日本大学藤沢キャンパス
3. 神村学 (2013) *in vivo* トランスフェクション (*in vivo* リポフェクション) は昆虫への汎用的な遺伝子導入法になりうるか? 日本蚕糸学会、2013年3月19日、農林水産技術会議筑波事務所
4. 神村学 (2013) *in vivo* リポフェクションによるカイコほかのチョウ目昆虫への簡単な遺伝子発現技術の開発. 日本蚕糸学会、2013年3月19日、農林水産技術会議筑波事務所

[図書] (計1件)

1. Kamimura M (2011) ENF peptides in insects. Hemolymph proteins and functional peptides: Recent advances in insects and other arthropods (Bentham Science Publishers), pp. 172-182.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神村学 (KAMIMURA MANABU)
(独) 農業生物資源研究所・
昆虫成長制御研究ユニット・主任研究員
研究者番号: 60370649

(2) 研究分担者

平山 力 (HIRAYAMA CHIKARA)
(独) 農業生物資源研究所・
昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号: 90370676

(3) 連携研究者

石橋 純 (ISHIBASHI JUN)
(独) 農業生物資源研究所・
昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号: 20391576