

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580071

研究課題名(和文)トランスポーター搭載の人工膜(プロテオリポソーム)による昆虫の排泄機能の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of insect excretion through aquaporin water channel in insects

研究代表者

東 政明 (AZUMA, Masaaki)

鳥取大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20175871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内外の水輸送を司る分子が、細胞膜にあるアクアポリン(水チャンネル)である。生物の水やイオンのバランス維持は、細胞が有する必要不可欠な機能で、昆虫は小さな体でありながら、そのごく少量の体内水分をアクアポリンを介して効率よく循環させ、からだの乾き(渴き)を防いでいる。水を唯一の輸送溶質とするアクアポリンの基本的な性質に加え、細胞膜に対して透過性が高いとされる非電荷溶質(グリセロール・尿素等)をも通過可能な多機能タイプ(アクアグリセロポリン)の同定と特徴付けを、カイコおよび他昆虫を用いて実施した。さらなる分子機能を調査するべく、単純な小胞系やリポソーム系の確立をめざした。

研究成果の概要(英文)：The regulation of body fluid composition and cellular and tissue osmolality through solute and water transport is fundamental for all terrestrial insects. Water transport across the plasma membrane is mediated through a water channel, called aquaporin (AQP), which regulates rapid water fluxes between cellular and tissue compartments. Advances in the functional characterization of AQPs in the vectorial fluid transport of liquid-feeding insects have led to the identification of three distinct AQPs in the digestive and excretory tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. Evidence that several isoforms of AQP occur in one insect species is accumulating steadily. We have explored the physiological roles of the respective type of *Bombyx* AQP in other insect species such as the blowfly, the chafer larva and a termite. The molecular functional characterization of each AQP protein were explored to understand the physiological substrate (water only or further non-electrolyte solute) in each insect.

研究分野：昆虫生理学・分子生理学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：浸透圧調節 原形質膜 水代謝 排泄 カイコ シロアリ

1. 研究開始当初の背景

昆虫は開放血管系の単純な組み立ての下、上皮細胞の単層で内外を隔て、原形質膜を介した輸送機構(ポンプ・キャリアー・チャネル)を駆動させる。ポンプやチャネルはイオンをダイナミックに移動させるが、その背後には細胞内外で常に水分子が動いている。いわゆる浸透圧調節である。水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司る分子が証明された。昆虫が食下物(植物汁液、動物血液、植物葉 etc.)からどのように水を獲得し、乾きや絶食あるいはイオン種の過多に耐えているか、限られた水分を維持するしくみの実態解明をカイコ幼虫をモデルにここ数年来、進めてきた。

水やイオンのバランスについてアクアポリン分子が昆虫細胞でも扱われるようになってきたのはここ10年くらいで、昆虫アクアポリンの実像が次第に明らかになってきた。吸水性昆虫(ヨコバイ・蚊など)での研究を皮切りに、カイコで我々によって先鞭を付けた複数のAQPの組織特異的発現や機能的役割分担については、国際誌上では吸血性昆虫(蚊・ハエ)や植物吸汁性昆虫(アブラムシ・ウンカ)で同様な研究が発表されるようになり、それと共に単純な膜小胞系でチャネル機能を生化学的に測定することによる機能解明が、より本質的な課題へのアプローチとなってきていた。

2. 研究の目的

生物の水やイオンのバランス維持は、細胞が有する必要不可欠な機能である。昆虫は変温動物であり、外界環境の影響をまともに受ける宿命にありながら、暑さ(水分蒸発)や寒さ(細胞凍結)など体の正常なしくみを混乱されることが多い陸上生活に適応している。それは水分調節維持を中心とした原形質膜に存在する運び手(トランスポーターやチャネル)の機能によることがわかってきた。本研究では人工膜(リポソーム)をトランスポーター搭載型(プロテオリポソーム)へ再構成し、水輸送を手始めにトランスポーターのバランス維持のはたらきをシンプルな系で設計し輸送特性を解析する。さらに昆虫個体へ投入(注入)させて、機能変調や発育不振を誘発させる試みが有効かどうか、モデル昆虫:カイコでの試験からチョウ目害虫への応用も指向する。

AQPを例にとると、水の通過路としての

働きは同じでも、複数種AQPの組織特異的発現が、昆虫ゲノム情報の蓄積から指摘されていたが、我々はカイコで3種類のAQPの特徴付けを、本研究着手当時に済ませていた。そのうち水選択的であった2種類のAQP(AQP-Bom1, Bom3)は、排泄に関わる後腸において、後腸上皮細胞の原形質膜の腸管腔側(apical:オモテ)および血液側(basal:ウラ)の表裏一体で偏在し、水輸送はtranscellularなプロセス(経上皮水輸送)であること、さらに後腸に密着縦走するマルピーギ管(Cryptonephric MT)でも、この2種AQPは、後腸と同じく偏在していた(雑誌論文)。これらの機能解明や昆虫個体での機能攪乱へのアプローチを進めるには、単純な膜小胞系での解析が必要になる。そこで、カイコおよび他昆虫での生理的に重要なAQPの同定と特徴付けを進めながら、並行して膜小胞を使った輸送機能を検定する系のセットアップを進めることとした。

3. 研究の方法

(1)カイコではグリセロールや尿素も輸送するアクアグリセロポリン(DBJ:AB245966)がある(中腸やマルピーギ管で発現)。条件が確立したら、同様にAQPリポソームの作製を試みる。このプロテオリポソームの検定には¹⁴C-Glycerolまたは¹⁴C-Ureaを用いて、リポソーム内へ取り込まれた輸送活性が測れる。2つのAQPリポソームが予定どおり進まなかった場合、アクアグリセロポリンへ方針変更する。AQPリポソームについて、まずは一つでも成功させることを目指す。

(2)他のチャネルタンパク質(Cl⁻やNa⁺チャネル etc.)をカイコゲノムの情報から選別し、同様な実験の流れに沿って実施する。

(3)このようにして調製されたプロテオリポソームはシンプルで小さな閉鎖系である。高品質のプロテオリポソームを使って、内外のpH勾配や電位差を人為的に設定して、輸送特性を調査する。また、プロテオリポソームを使ってトランスポーターの特異的ブロッカーの探索への応用も調査検討する。

4. 研究成果

昆虫の感覚器官(感覚子)における重要なトランスポーターについては、連携研究者の石田と議論しながら進めた。石田との研究でアオバエの感覚毛においてAQPを1種類

(水選択的)を同定することができた(雑誌論文)。さらに、ドウガネブイブイ幼虫(雑誌論文)およびイエシロアリ(雑誌論文)について、特徴付けや生理的役割についてのレポートを発表することができた。

輸送機能の検定について、(1)小胞(vesicle)を用いた輸送活性の測定、(2)さらに単純化させたプロテオリポソーム系での実験設計、これらについては研究途上で最終年度を終えた。標記研究課題のコアである、人工膜リポソームヘカイコのAQPを組み込ませた人工膜(プロテオリポソーム)を作製し、それを用いた輸送活性の機能解析について、研究開始初年度より少しずつ準備してきたが、特にこの点を最終年度では、少しでも実験系として軌道に載せることができた。

水輸送そのものを測定することは困難であったので、われわれがこれまでにクローン化したアクアグリセロポリン(GLP)型のAQP-Bom2(DDBJ: AB245966)について、14C-glycerolや14C-ureaを用いて測定できるように、今後は実験を進めることにしている。

昆虫のAQPそのものを特定する研究は、今後、グリセロール・尿素・アンモニア・CO₂・H₂O₂等を輸送する多機能性AQPの解明へと進める必要があり、昆虫の特異代謝と関係した研究が重要になると考えている。昆虫の呼吸は酸素直達方式で(肺がない)、気管系を介してガス交換が、体の組織とダイレクトに起こるので、昆虫の呼吸機能とAQPの関与も、将来、重要課題になると予見している。小型で総細胞数にしても哺乳類より格段に少ないシンプルな個体の中で、見事な組織を組み立てている虫たちの生きざまの中で、チャネルの分子機能をリポソームの単純系で進めることが今後必要になってくると考えられる。

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4件)*責任著者

Kambara, K., Nagae, T., Ohmura, W. and Azuma, M. (2014) Aquaporin water channel in the salivary glands of the Formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus* is predominant in workers and absent in soldiers. *Physiol. Entomol.* **39**, 94-102. [査読有]

Nagae, T., Miyake, S., Kosaki, S. and

Azuma, M. (2013) Identification and characterisation of a functional aquaporin water channel (*Anomala cuprea* DRIP) in a coleopteran insect. *J. Exp. Biol.* **216**, 2564-2572. [査読有]

Ishida, Y., Nagae, T. and Azuma, M. (2012) A water-specific aquaporin is expressed in the olfactory organs of the blowfly, *Phormia regina*. *J. Chem. Ecol.* **38**, 1057-1061. [査読有]

Azuma, M., Nagae, T., Maruyama, M., Kataoka, N. and Miyake, S. (2012) Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes of insect epithelia: Molecular basis for water recycling through the cryptonephric rectal complex of lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.* **58**, 523-533. [査読有]

[学会発表](計12件)*発表者

神原広平*・東 政明・大村和香子：イエシロアリ唾液腺におけるアクアポリンのカーブ特異的発現。日本応用動物昆虫学会第58回大会(高知市), 2014年3月27~29日。[口頭発表]

大村和香子*・伊藤優子・東 政明・神原公平：木材加害シロアリ種のみネラル摂取と体内吸収特性。第64回日本木材学会大会(松山市), 2014年3月13~15日。[口頭発表]

丸山麻理弥*・神原広平・東 政明：カイコの卵形成期に出現する2つの水選択的アクアポリンの動態。蚕糸・昆虫機能利用学術講演会~日本蚕糸学会第84回大会(藤沢市), 2014年3月10~11日。[口頭発表]

東 政明*・丸山麻理弥：ドウガネブイブイ幼虫のアクアポリンのクローニングと昆虫アクアポリンファミリーの中での特徴付け。蚕糸・昆虫機能利用学術講演会~日本蚕糸学会第84回大会(藤沢市), 2014年3月10~11日。[口頭発表]

丸山麻理弥*・東 政明：昆虫の排泄・浸透圧調節に関わるアクアポリン-水チャネルの生理的役割。日本応用動物昆虫学会第57回大会・小集会(藤沢市), 2013年3月27~29日。[口頭発表]

神原公平*・永江知音・東 政明：イエシロアリの水分調節に関わるアクアポリンの組織特異的発現。第63回日本木材学会大会(盛岡市), 2013年3月27~29日。[口頭発表]

Nagae,T., Kambara,K. and Azuma,M. * :
Water transport physiology in insect
gut epithelia. The 2nd International
Symposium on Insect Midgut Biology,
South China Normal Univ. Guangzhou,
CHINA, Sep. 24-28, 2012. [口頭発表]

Maruyama,M. * , Nagae,T. and Azuma,M. :
Water physiology of vitellogenic
follicles in *Bombyx mori*. 24th
International Congress of Entomology,
Daegu, KOREA, Aug. 19-25, 2012. [ポス
ター発表]

Azuma,M. , Nagae,T. and Maruyama,M. * :
Molecular physiology of epithelial
water transport in the lepidopteran
hindgut. 24th International Congress of
Entomology, Daegu, KOREA, Aug. 19-25,
2012. [ポスター発表]

丸山麻理弥・永江知音・東 政明* :カイ
コ幼虫直腸から血液への水の通過路 -直
腸細胞の Apical 側と Basal 側にある 2
種類のアクアポリン水チャネル- 蚕
糸・昆虫機能利用学術講演会～日本蚕糸学
会第 82 回大会 (福岡市), 2012 年 3 月 18
～19 日 .[口頭発表]

丸山麻理弥*・永江知音・東 政明 :カイ
コ卵包の水の取り込みに関与するアクア
ポリンの同定 . 日本蚕糸学会第 77 回関西
支部・第 67 回九州支部合同研究発表会(盛
岡市),2011 年 11 月 4～6 日 . [口頭発表]

Azuma,M. : Aquaporins for water balance
in Lepidopteran larvae. Molecular
physiology of epithelial transport in
insects: a tribute to William R. Harvey.
Society for Experimental Biology Annual
Main Meeting, Glasgow, UK, July 1-4,
2011. [招待講演]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

東 政明 (AZUMA, Masaaki)
鳥取大学・大学院連合農学研究科・教授
研究者番号 : 2 0 1 7 5 8 7 1

(2)研究分担者

小林 淳 (KOBAYASHI, Jun)
山口大学・農学部・教授
研究者番号 : 7 0 2 4 2 9 3 0

(3)連携研究者

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 : 9 0 5 0 9 8 6 1
(H23~24 年度)