

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07795

研究課題名(和文) 昆虫の膜脂質特性を与えたりポソームを用いた溶質輸送調節の解析

研究課題名(英文) Analysis of insect solute transporters in the liposome system with various phospholipids

研究代表者

東 政明 (AZUMA, Masaaki)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20175871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の越冬休眠では、凍結や低温障害を避けるためにグリセロールを増加蓄積するケースが多い。このしくみは、細胞内外の水やグリセロールの細胞膜を介した再配分である。その生体膜機能を調べるためにグリセロール輸送タンパクを特定し、それを組み込んだ人工膜(リポソーム)実験系の確立をめざした。昆虫細胞においても、アクアポリン(AQP)が水分子の選択的通過路であるだけでなく、グリセロールも輸送可能なAQPの分子種(アクアグリセロポリン: GLP)として分布する。幼虫のすがたで越冬休眠するニカメイガから休眠期で機能するAQPやGLPを特定し、その分子の輸送特性や越冬期の役割を追究した。

研究成果の概要(英文)：Insects are able to survive adverse climatic conditions. Glycerol and water redistributions in tissues and cells play a key factor under low temperature for cold and/or freeze tolerance. We have explored the membrane proteins of aquaporin (water channel) to clarify the molecular basis for glycerol accumulation in an overwintering insect (the rice stem borer, *Chilo suppressalis*). The results are as follows: (1) There have several AQP members in the *Chilo* larvae like the silkworm AQPs. (2) At the trachea, an insect respiratory tissue, we identified one water-specific AQP, which is predominantly expressed in the hindgut of silkworms. (3) The expression of this type increased significantly towards winter. (4) Another AQP, a glycerol transporter-type, was found in the midgut and Malpighian tubules. There appears to exist two different types of GLP subfamily in *Chilo* larvae. (5) An in vitro liposome system failed to construct with these characterized AQPs, that is still underway.

研究分野：昆虫科学

キーワード：アクアポリン グリセロール 昆虫休眠 低温耐性

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の水イオンバランス(浸透圧調節)には、管組織(絹糸腺・中腸・後腸・マルピーギ管・唾液腺 etc.)にある水分子の細胞膜通過路である水チャネル(アクアポリン: AQP)の関わることで、研究代表者のこれまでの研究(科研費 20380035, 23580071)から明らかにされた。2010年代に入り AQP の研究は、代表的な昆虫種のゲノム情報の整備によって加速し、液体摂取性昆虫(蚊、アブラムシなど)でも解析が進み、小型昆虫が僅かな血液量でもって、からだの水バランスを維持している AQP の役割も報告されている。しかし、AQP 遺伝子の同定とその遺伝子発現をみるところまでの研究が多く、(1) 組織特異性と膜タンパク質としての同定(研究代表者はカイコを材料に国際誌へ発表済)、(2) 原形質膜上の通過路としての開閉やスイッチオン・オフのしくみ、(3) 水以外のグリセロールや尿素などの溶質通過能(solute transporter)、への研究展開となると、国内外でも少ない。これらの課題解決が、それぞれの昆虫種での成長戦略における AQP の生理的役割を明確にし、浸透圧調節機構という昆虫生理学上の古くからの古典的重要課題の大きな前進が期待できると考えていた。

## 2. 研究の目的

分泌・消化・吸収・排泄・解毒などは、昆虫にとって必要不可欠な発育戦略である。一方、休眠のような非成長の静的な相ではこれらが見かけ上機能停止する。昆虫個体が示す環境情報への応答は、表現型や血液成分の変動からこれまで解明されてきた。発育時(オン)⇔休止時(オフ)で生理的変更を伴う組織=組織間、細胞内外のやりとり(輸送機構)の調節では、昆虫種固有のはたらきと特異性を司るチャネルやトランスポーターのオン・オフを調べる必要がある。膜脂質と膜タンパク質がセットになった *in vivo* の姿へより近づいた昆虫型プロテオリポソーム(膜小胞)を再構成し、「動」と「静」を橋渡しする切替スイッチの分子機能について解明するこ

とを研究のゴールと位置付けた。

昆虫の成長活動を妨げる要因として、暑さ(水分蒸発・乾燥)と寒さ(低温・凍結)は、昆虫のからだを直撃する。ところが、環境耐性を獲得した個体内では、水の体内再配分による生理的適応に成功している。この再配分を促進するための溶質搬送には、組織=組織間、あるいは細胞内外への輸送機構が必要となる。典型的事例の一つは、休眠昆虫におけるグリセロールに代表される多価アルコール増強とその血中への体内蓄積である。AQP が属する膜タンパク質ファミリーの中に、水チャネル機能に加え、グリセロール(一部ソルビトールやマニトール)や尿素をも通過させるサブファミリーが存在する(アクアグリセロポリン: GLP)。研究代表者はカイコ幼虫から、昆虫で最初となる GLP を同定し、中腸やマルピーギ管での存在を報告した。この GLP は、活動成長期(栄養成長期)の昆虫ではたらくトランスポーターである。

では休止期ではどうなるか? ニカメイガ休眠幼虫では血液中にグリセロールが蓄積する(約  $0.3 \text{ mol L}^{-1}$ )。既に研究分担者の泉は、休眠越冬期の幼虫で血液中のグリセロールが組織の細胞死回避に重要であることを示したが、虫体内でグリセロールと水分子の動きを司る GLP やグリセロールの移動と切り離せない水輸送に与る AQP 分子の特定までには至っていなかった。休眠昆虫や凍結耐性昆虫から AQP のクローニングは最近の国際誌にいくつか報告されてきてはいるが、季節変動や低温環境に応答するものを明瞭に証明特定した報告がない。そこで、カイコで得た GLP の遺伝子とニカメイガの特異なグリセロール輸送の系を合流させ、その輸送調節を調べることによって、前項の(2)(3)の課題を追究し、昆虫の溶質輸送の特徴とその調節機構の実体を示すことができると考えた。

## 3. 研究の方法

実験計画は、(1) 原形質膜の調製とその純度の生化学的検定[鳥取大・東]、(2) 膜脂

質組成の分析とそれに基づくリポソームのデザイン [ 島根大・泉 ], (3) AQP をモデルにして膜タンパク質の cDNA 発現と (2) でデザインしたリポソームへの再構成, そして輸送活性測定 [ 共同 ], の大きく3つに分かれる。計画当初は, 昆虫細胞の原形質膜を模倣したプロテオリポソームの輸送系を組み立て, 輸送スイッチの切換を調査することであった。当初は上記の3点を軸に進めようとしていた。

脂質組成をみる組織としても, 研究開始当初は脂肪体を分析すればよいと考えていた。ところが, 推定 AQP や GLP の探索を開始したところ, (i) AQP については幼虫の呼吸系 (気管) で顕著に存在することを見出し, (ii) GLP については脂肪体よりも中腸の方でその存在を支持する予備的データが得られたこと, これらの実験事実が得られたので, いくつかの課題を並行して進めることとなった。

休眠越冬準備へのグリセロール生産は脂肪体の役割である可能性が高いが, 幼虫休眠では消化管の機能停止をみる系という見方もできる。消化液分泌の停止も予想される。中腸の内容物 (食物残渣) を排出し, 水分制限するしくみ (中腸は半脱水状態あるいはグリセロール漬けになるか) など, 水輸送に関わると予想される点も多く, GLP や AQP の存否から中腸の凍結回避機能の発動にも注視し, 休眠幼虫の中腸では何が起きているか, についても検証しなければならなくなった。

したがって, 予め計画調書へ記載した下記<sup>1)</sup>の代替課題も組み込みながら初年度から進めることとなった。

#### 初年度予定どおりに進まなかった場合

(1) ニカメイガアクアポリンの既知 cDNA の活用 ( この cDNA は上述の推定 GLP 遺伝子も含まれるが, 数種類の遺伝子情報が 2015 年以降公開 )。 (2) 上記遺伝子を探索し, それぞれに相当する既知のカイコ AQP の配列情報とも比較しながら, ニカメイガ幼虫で発現している遺伝子 ( mRNA ) またはタンパク質について, 季節変化 ( 秋 ~ 冬 ~ 翌春 ) を調査し, 低温順化プロセスでの動向を探る ( 発現組織の特定も必要 )。この計画は, 気管系での AQP の発見があったので, 越冬プロセスでの動き

を調査しなければならなくなり, 3 年間の計画の中に組み入れた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ニカメイガ幼虫の各組織抽出物を用いたウェスタンプロテイング法による AQP 検出

公共データベースから, ニカメイガでの推定 AQP の配列が, カイコ AQP と高い相同性 ( アミノ酸配列上的一致程度 ) を示したので, カイコのいくつかの AQP 抗体を用いて, ニカメイガ幼虫での AQP の組織分布を調べたところ, 排泄系 ( 後腸 ) に分布する水選択的なタイプが, ニカメイガでは気管で強く発現していることがわかった。これは, 研究計画調書を作成した段階では全く予想できなかった発見であった。また, 昆虫の呼吸系 ( ガス交換組織 ) での発見は, ネットアイシマカ成虫で報告があるが, その著者らは解釈に苦慮していた。この点, 我々の予想外の発見は, 幼虫休眠のメカニズムや昆虫 AQP の未知機能をさらに突き詰める上で, 重要な発見であると考えられる。

一方, カイコの消化系 ( 中腸やマルピーギ管 ) に多い GLP タイプは, ニカメイガ幼虫でも同様な結果であった。こちらの GLP についてはリポソームへ組み込む実験設計の方へ進めることにした。

##### (2) ニカメイガ AQP や GLP の昆虫細胞発現系での cDNA 発現とその収率向上

ニカメイガで GLP としてはたらいっていると予想される遺伝子が予想できたので, それを増幅させ, 昆虫培養細胞系で大量に発現させることを行った。昆虫型リポソームへ再構成するまでには至らなかったが, 先ずは単純な市販のリン脂質で調製したリポソームへ, タンパク質発現に成功した GLP タイプを組み込んで, GLP 分子としての輸送特性について, <sup>14</sup>C-グリセロールや <sup>14</sup>C-尿素を用いたトレーサー実験で輸送活性を調べた。リポソームの漏れがあるようで, 実験として未だ不完全で, 不成功に終わっている。とりわけ, (a) 成長期 ( 非休眠 ) 型リポソーム, (b) 休眠 ( 冬 ) 型リポソーム, での輸送活性の差が出てくるのか, 均質なリン

脂質（フォスファチジルコリンまたはフォスファチジルエタノールアミン）のリポソームへ再構成した場合と比較し、膜脂質の違いが輸送活性へ反映されるか、低温と昆虫特異的なリン脂質の利用については、計画どおりに進めることができていない。

### (3) ニカメイガ幼虫の季節変化に伴う AQP や GLP の動向

ウェスタンブロットティングによるタンパク質レベルでの変化について、気管で強く発現している AQP について調べたところ、厳冬期（日本の 12 月～1 月）にタンパク質として増加することを確認した。mRNA レベルでも同様であるかについては、現在検証中のところで研究期間を終えた（継続調査中）。

以上、昆虫の越冬休眠では、凍結や低温障害を避けるためにグリセロールを増加蓄積するケースが多い。このしくみは細胞内外の水やグリセロールの細胞膜を介した再配分である。その生体膜機能を調べるためにグリセロール輸送タンパクについては、早急に特定し、それを組み込んだ人工膜（リポソーム）実験系の確立をめざしている。幼虫のすがたで越冬休眠するニカメイガから休眠期で機能する AQP や GLP を特定し、その分子の輸送特性や生理的役割について引き続き実験を進めている。

### 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 3 件）

- (1) Endo, H., Azuma, M., Adegawa, S., Kikuta, S. and Sato, R.: Water influx via aquaporin directly determines necrotic cell death induced by the *Bacillus thuringiensis* Cry toxin. *FEBS Lett.* (査読有) **591**, 2017年, 56-64. DOI: 10.1002/1873-3468.12506
- (2) Maruyama, M. and Azuma, M.: Aquaporins are expressed in the

columnar cells of the midgut epithelium of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.* (査読有) **84**, 2015年, 55-61. DOI: [https://doi.org/10.11416/jibs.84.3\\_055](https://doi.org/10.11416/jibs.84.3_055)

- (3) Maruyama, M., Kambara, K., Naka, H. and Azuma, M.: Insect water-specific aquaporins in developing ovarian follicles of the silk moth *Bombyx mori*: role in hydration during egg maturation. *The Biol. Bull.* (査読有) **229**, 2015年, 58-69. DOI: <https://www.journals.uchicago.edu/loi/bbl>

〔学会発表〕（計 10 件）\*発表者

- (1) 藤原希\*・泉洋平・東政明：幼虫休眠する昆虫におけるアクアポリンの役割 .生物系三学会中国四国支部大会（山口市）2018 年 [ 口頭発表 ]
- (2) 藤原希\*・泉洋平・丸山麻理弥・東政明：ニカメイガ *Chilo suppressalis* の凍結耐性機構に関わるアクアポリンの探索 . 第 61 回日本応用動物昆虫学会大会( 小金井市 ) 2017 年 [ ポスター発表 ]
- (3) 向井紳・丸山麻理弥・東政明：カイコ中腸幹細胞の初代培養維持と Flow Cytometry 解析 .平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会～日本蚕糸学会第 87 回大会( つくば市 ) 2017 年 [ 口頭発表 ]
- (4) 神原広平\*・大村和香子・丸山麻理弥・東政明：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 . 第 67 回日本木材学会大会（福岡市）2017 年 [ 口頭発表 ]
- (5) Azuma, M.: Epithelial and cellular mechanisms of aquaporins (AQPs) in lepidopteran caterpillar. 25<sup>th</sup> International Congress of

- Entomology (Orlando, Florida, USA) (2016) [ シンポジウム講演 ]
- (6) Kambara, K. \*, Ohmura, W., Maruyama, M. and Azuma, M.: Localized expression of water-specific aquaporins in the salivary glands of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. 25<sup>th</sup> International Congress of Entomology (Orlando, Florida, USA) (2016) [ ポスター発表 ]
- (7) 神原広平\*・大村和香子・丸山麻理弥・東政明: イエシロアリの水輸送に関わる新たなアクアポリンの同定と特徴づけ. 第66回日本木材学会大会(名古屋市)2016年 [ 口頭発表 ]
- (8) Azuma, M.: Physiology of aquaporins in lepidopteran caterpillars. Entomology 2015(アメリカ昆虫学会年会) 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Entomological Society of America (Minneapolis, Minnesota, USA) (2015) [ シンポジウム講演 ]
- (9) 丸山麻理弥\*・東政明: カイコ卵形成過程におけるアクアグリセロポリンの役割. 平成27年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会～日本蚕糸学会第85回大会(札幌市)2015年 [ 口頭発表 ]
- (10) 神原広平\*・大村和香子・東政明: シロアリの水分利用の分子メカニズムの解明とその制御の検討. 日本木材保存協会第31回年次大会(東京都)2015年 [ ポスター発表 ]

[ 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 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[ その他 ]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
東 政明 (AZUMA, Masaaki)  
鳥取大学・農学部・教授  
研究者番号 : 2 0 1 7 5 8 7 1

(2) 研究分担者  
泉 洋平 (IZUMI, Yohei)  
島根大学・学術研究院 環境システム科学系・  
准教授  
研究者番号 : 1 0 4 5 7 2 1 0

(3) 連携研究者 : な し

(4) 研究協力者 : な し