

論文内容の要旨

論文題目 カイコ周気管腺の機能に関する研究

氏名 大和 知永

[序論]

20世紀初頭に器官として同定されたカイコ周気管腺は、囲心細胞や食道下体と同様に athrocyte (nephrocyte) として位置付けられる細胞から構成される。athrocyte は殆どの昆虫に存在し、体腔に注入した異物を取り込む特徴を持つ細胞の総称であり、その機能として異物の分解との関連が指摘されているが、詳細については未解明なままである。特に、カイコ周気管腺に関しては組織・形態学的な研究に留まり、1981年の電子顕微鏡による観察以後、本器官に関する研究は報告されていない。カイコ周気管腺は体腔内全体に分布し、単離・摘出が容易でないため、機能に関する研究が不十分なまま今日に至っている。

一方、同じ athrocyte である囲心細胞の方は昆虫に広く存在が知られ、機能探索が行われてきており、①異物の取り込みと分解、②血液タンパク質の合成と分泌、③物質の貯蔵、などの機能が推測されているが、実験的根拠が十分に与えられていないものが多い。囲心細胞は器官形態をとっておらず、背脈管の筋肉に直接細胞が付着しているため、生化学および分子遺伝学実験では複合体として扱わざるを得ない問題点がある。近年、ハエでは囲心細胞を心臓(背脈管)形成に働く付属器官と捉える報告も増え、この点からも athrocyte の機能の再検討が必要と考えられる。本研究は、器官が大きく単離が可能というカイコ周気管腺の利点を用いて、生化学的・分子遺伝学的な研究から、周気管腺、さらには athrocyte の生理機能を明らかにしたものである。

[結果と考察]

1. カイコ周気管腺の形態学的特徴と発育による変化

athrocyte については昆虫の種によって多様な存在様式が知られているが、特に周気管腺は、カイコ以外の昆虫ではこれまで報告例がなかった。そこで、他の数種の鱗翅目昆虫に関して、カイコとの比較で周気管腺の有無を調査した。鱗翅目昆虫の最終齢幼虫にトリパンプルーを投与すると、athrocyte はそれを取り込んで明瞭に観察される。カイコと同属のクワコでは囲心細胞、食道下体と共に周気管腺も存在していたが、エリサン、アワヨトウガ、モンシロチョウなどでは周気管腺に

相当する器官は認められなかった。器官の有無という大きな違いが鱗翅目昆虫の中にあることは注目すべき事実であるが、他昆虫の研究をみると昆虫種によって athrocyte には非常に多くのバリエーションが認められている。

次に、形態学的構造を詳細に観察した。その結果、周気管腺は、囲心細胞とは異なり明瞭な器官形態をとること、食道下体に比べて量が多いことなどから、機能探索に適した器官であると考えられた。

さらに、幼虫から成虫に至る発育時期ごとに周気管腺の形態を観察した結果、多くの幼虫組織が崩壊す

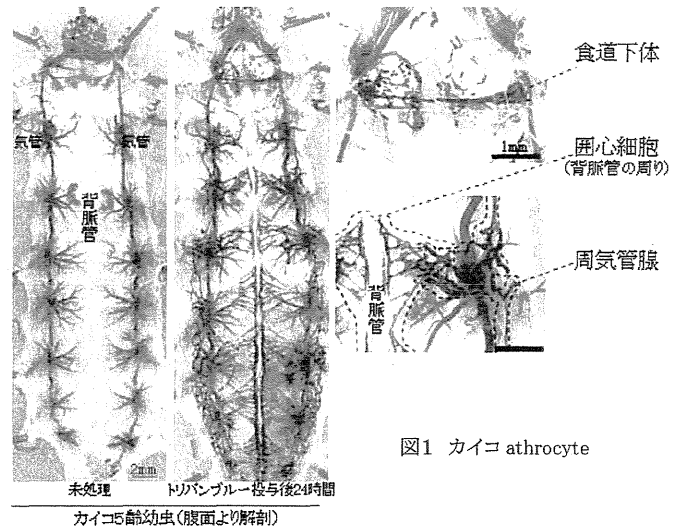


図1 カイコ athrocyte

る蛹初期でもしっかりとした組織構成が認められた。5 齢幼虫における周気管腺は、約 100µm 四方の扁平細胞が連なって靴紐のような形状で体腔全体に広く分布している(図1)。蛹初期になると各細胞内に顆粒が充満し、大きさも最大でおおよそ 500µm 四方の扁平細胞になる。蛹後期では、組織は小さく、壊れやすくなり、細胞内の顆粒も少なくなっていた。以上の点から、最も変化の大きい幼虫期から蛹初期を中心に研究を進めることにした。

2. 異物の処理

囲心細胞による異物の取り込みは過去に数多く報告されており、athrocyte を定義付ける現象とみなされている。しかし、取り込み後の物質の行方に関しては、これまで殆ど調べられていない。そこで本研究では、色素取り込み後の変化を調査した。そして、異物取り込みと関連する生理学的な現象を新たに見出した。

2-1. 色素

トリパンブルーの周気管腺への取り込みは、注射後1時間で観察され始め、1日後で最大となるが、3日、6日後と、日数の経過と共に色素は少なくなった。これにより、周気管腺は血液中の色素を急速に取り込み、その後徐々にマルピーギ管などの排泄器官へ放出しているのではないかと考えられた。

2-2. メラニン

昆虫では病原体が侵入すると体腔内でメラニンが形成される生体防御反応が知られている。そこで、大腸菌の死菌を注射したところ、血液中にメラニンが生じると共に、それが周気管腺に取り込まれる現象が観察された。これは、過剰のメラニンによる障害が多くの組織に及ばないように周気管腺が吸収したものと推測した。

2-3. 絹糸腺

充分の吐糸ができずに営繭できないものを不吐糸蚕(不結繭蚕)というが、これには、蛹初期で黒化して死亡する場合と成虫になることが可能な場合がある。それぞれの個体を解剖したところ、羽化できなかった個体では周気管腺は全て肥大していた。一方、羽化できた成虫の周気管腺では、正常(営繭)に比べて大きさは変わらなかったが、若干茶色に見えた。この現象は、繭として吐糸できずに体内に残存した絹タンパク質及び変態時に崩壊する絹糸腺組織を周気管腺が処理しきれなかったために起きたものと考えられた。そこで、周気管腺は蛹初期における幼虫組織の分解過程に重要な役割を果たしていると考察し、分解機構に焦点を当てて以下の機能研究を進めた。

3. リソソームの分布

ハエ囲心細胞においてリソソームやサイトリソームが発達していることは、電子顕微鏡観察に基づき報告がなされている。しかし、発育時期による変化、また周気管腺におけるリソソームの報告は極めて少ない。そこで蛍光プローブを用いて、カイコ周気管腺におけるリソソームの存在と変化を調べた。まず、5 齢幼虫において、周気管腺には囲心細胞ならびに食道下体と同様に発達したリソソームがあることを確認した。一方、筋肉など他組織では、蛍光顆粒は観察されなかった。次に、発育時期ごとに、摂食期(5 齢 3 日、6 日)、吐糸期(1 日)、蛹期(2 日)の周気管腺を調べた。その結果、5 齢 3 日幼虫の周気

管腺の細胞質全体に蛍光を発する顆粒を検出した。5 齢 6 日、吐糸 1 日へと時間経過が進むと、周気管腺内の蛍光顆粒は徐々に増加した。そして蛹 2 日では、強い蛍光を発する膨張した顆粒が細胞質全体に充ちていた。このことから、カイコ周気管腺では常時リソソーム系が機能しており、特に変態初期においてその機能が活発になると考えられた。一方、脂肪体では、幼虫期における蛍光は弱い、蛹初期において組織崩壊に伴う強い蛍光顆粒が観察された。

4. 周気管腺における遺伝子発現解析

5 齢 3 日幼虫の周気管腺は組織単離が可能であることから、athrocyte における遺伝子発現解析に適していると考えた。そこで、過去に囲心細胞での合成が報告されているものを含め、血液タンパク質の遺伝子発現レベルを調べた。その結果、血液タンパク質の主成分であるアリルフォリンと 30K タンパク質、またリゾチームの発現レベルは比較的低いことが示された(図2)。

次に、異物分解との関連から、線虫・ハエ・哺乳類等で報告されているエンドサイトーシス関連遺伝子と、オートファジー関連遺伝子である ATG の数種遺伝子の発現解析を行った(図3)。まず、ゲノムデータベース上でカイコホモログを探索し、その配列からプライマー

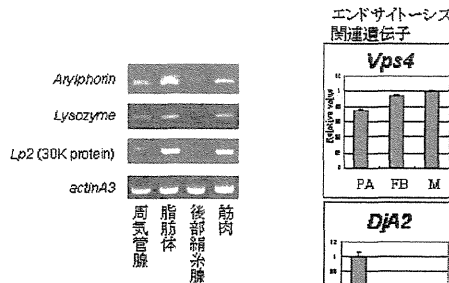


図2 半定量 RT-PCR 法による血液タンパク質の遺伝子発現レベル

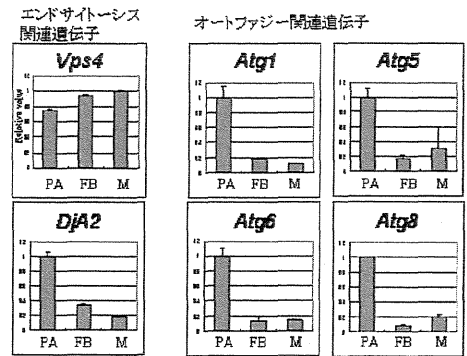


図3 リアルタイム PCR 法における分解系遺伝子発現パターン (PA, 周気管腺; FB, 脂肪体; M, 筋肉)

を作成してリアルタイム PCR で cDNA 中のターゲット遺伝子の発現レベルを調べた。その結果、エンドサイトーシス系ではタンパク質品質管理に関与すると報告されている *Dja2* の発現が、またオートファジー系では調べた4つの遺伝子全ての発現が、脂肪体や筋肉に比べて周気管腺において高かった。一方、一般的なエンドサイトーシスとしての multivesicular body pathway への関与が報告されている *Vps4* 遺伝子の発現は、周気管腺でも脂肪体や筋肉と同程度であった。以上より、カイコ周気管腺では、リソソームに関連したタンパク質分解システムが発達していると判断された。

5. 異物タンパク質の取り込みと分解

これまでに athrocyte への外来性タンパク質の取り込みの報告は数多くなされている。しかし、取り込まれたタンパク質のその後の変化については全く報告がなく、また、発育時期による取り込み活性の差異も検討されていない。そこで、これらの点に関して、カイコ周気管腺を対象として調べた。

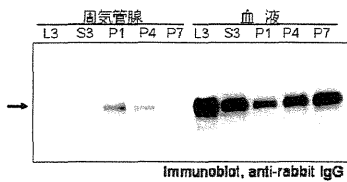


図4 発生時期による周気管腺における外来性タンパク質 IgG (矢印) の取り込み活性
IgG を注射したカイコを 24 時間後に解剖した。血液を採取し周気管腺を取り出して western blotting で調べた。
(L3, 5 齢 3 日幼虫; S3, 吐糸 3 日幼虫; P1, 蛹 1 日; P4, 蛹 4 日; P7, 蛹 7 日)

異物タンパク質として rabbit IgG を体腔内に注射し、周気管腺への取り込みを western blotting で調べたところ、蛹 1 日の周気管腺において、取り込み能が最大であり、同時に血液からの IgG の消費量が大いことが分かった(図4)。また、組織化学的な検討として、注射 1 日後の FITC 標識 IgG の取り込みとリソソームとの共局在を共焦点レーザスキャン顕微鏡で観察した結果、5 齢 3 日幼虫、蛹 2 日共に IgG の取り込み顆粒が多いが、蛹 2 日の方が取り込んだ顆粒が大きかった。

次に、周気管腺に IgG を取り込ませた後、体外に取り出して分解を調べた *ex vivo* の実験結果を図5に示す。各発育時期において、取り込まれた IgG (H 鎖約 50kDa) は時間経過と共に濃度が減少した。一方、30kDa 周辺に IgG 由来の分解過程と思われるバンドが増えていた。すなわち、取り込まれた IgG は、低分子に分解されていくと推定された。さらに、牛血清アルブミンを投与した実験でも同様の結果が得られた。

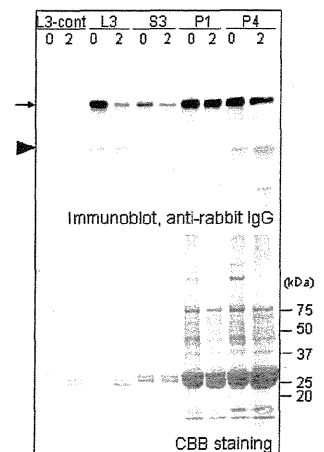


図5 周気管腺における IgG の分解
IgG を各時期カイコに投与。24 時間後に解剖して採取し(培養開始日)、Grace 培地で 2 日間振盪培養。(L3-cont, IgG 非投与; L3, 5 齢 3 日幼虫; S3, 吐糸 3 日幼虫; P1, 蛹 1 日; P4, 蛹 4 日; P7, 蛹 7 日; 0, 培養開始日; 2, 培養 2 日; 矢印, IgG H 鎖; 矢頭, 分解物)

6. 血液タンパク質との関連

これまで athrocyte のタンパク質分解機能と内在性タンパク質との関係は明らかにされていなかったので、周気管腺と血液タンパク質であるアルルフォリンとの関連を調べた。カイコ幼虫の主血液タンパク質であるアルルフォリンは、吐糸期に脂肪体に吸収され貯蔵顆粒を形成し、その後成虫組織形成のアミノ酸源になると報告されている。

まず、精製したアルルフォリンを FITC で標識し、5 齢 3 日幼虫・吐糸 1 日・蛹 2 日の組織への取り込みの様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、従来の報告のようにアルルフォリンは吐糸期にのみ脂肪体に著しく取り込まれ、顆粒状になることが確認でき、幼虫や蛹 2 日では取り込みは認められなかった。一方、周気管腺では、アルルフォリンの取り込みは常時認められ、特に蛹においてサイズの大きい顆粒が細胞周縁部に局在していた。次に、図6では、蛹 1 日のカイコを使って、アルルフォリンの取り込み後の分解について検討した。FITC 標識アルルフォリンを注射した個体の周気管腺を摘出し、時間経過を追ったところ、培養日数と共に取り込まれた FITC 標識アルルフォリンが減少し、その下に分解物と推定されるラダーバンドが増加した(図6上)。次に、同メンブレンをストリッピングバッファーで処理した後、抗アルルフォリン抗体を用いて western blotting を行ったところ(図6下)、脂肪体では吐糸期に取り込まれていた内在性アルルフォリンが多量に存在し、培養日数と共にこのアルルフォリンが大きく 5~6 箇所分解されていることが観察された。この分解は、脂肪体の組織崩壊に伴う分解と考えられた。蛹期に生じるアルルフォリンの分解を担う組織やその過程については分かっていないが、本結果から、アルルフォリンは脂肪体内で自己分解と共に低分子化されること、さらに周気管腺もアルルフォリン分解に関わっていることが示唆された。最後に FITC 標識による影響を除くため native アルルフォリンの存在量を調べた。蛹期の周気管腺を体外に取り出して培養し、抗アルルフォリン抗体を用いて western blotting を行ったところ、アルルフォリンは周気管腺内に存在し、そのバンド濃度は培養日数と共に減少し、蛹初期において分解物と推定されるバンドが増加していることを確認した(図7)。

以上より、周気管腺は内在性タンパク質についても取り込み、分解する機能を持ち、幼虫組織が崩壊する時期に当たる蛹初期において、その活性が高いことが推察された。

[結語]

カイコ周気管腺においては、タンパク質分解系の遺伝子発現が高く、常時リソソーム系が機能し、特にそれが蛹初期で活発になっていた。また、異物タンパク質、さらに内在性タンパク質についても取り込んで分解することが示された。

以上、本研究は、athrocyte が異物タンパク質の分解を行うことに関し周気管腺を用いて実験的根拠を与え、さらに周気管腺が変態初期の幼虫組織の崩壊やタンパク質の分解処理にも関わる重要な器官であることを明らかにしたものである。

[原著論文]

Chie Owa, Fugaku Aoki, and Masao Nagata, Distinctive presence of peritracheal athrocyte in *Bombyx mori* L. and *Bombyx mandarina* M. as compared to their absence in several other lepidopteran species, *Arthropod Struct. Dev.*, 35, 93-98. (2006)

Chie Owa, Fugaku Aoki, and Masao Nagata, Gene expression and lysosomal content of silkworm peritracheal athrocyte, *J. Insect Physiol.*, 54, 1286-1292. (2008)

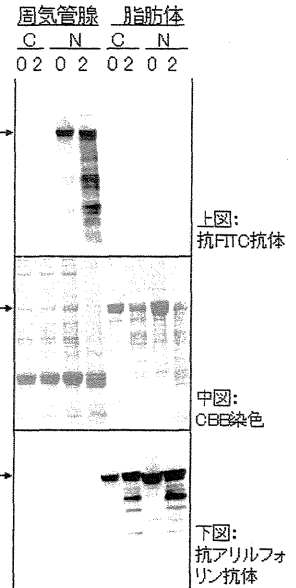


図6 血液タンパク質アルルフォリンの分解
アルルフォリン-FITC 投与 24 時間後(蛹1日)に組織を採取し、Grace 培地で2日間振盪培養。(N, アルルフォリン-FITC 投与群; C, アルルフォリン-FITC 非投与群; 0, 培養開始日; 2, 培養2日; 矢印, アルルフォリン)

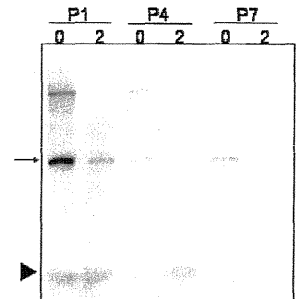


図7 抗アルルフォリン抗体を用いた western blotting
カイコ周気管腺を採取し、Grace 培地で2日間振盪培養。(P1, 蛹1日; P4, 蛹4日; P7, 蛹7日; 0, 培養開始日; 2, 培養2日; 矢印, アルルフォリン; 矢頭, 分解物)