

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏 名: 三 宅 誠 司

題目: Molecular physiological studies on cellular and tissue osmoregulation in the silkworm, *Bombyx mori*

Physiology of V-ATPase and aquaporin –water channel- in insects

(昆虫の水分調節におけるアクアポリン水チャネルの細胞生理機能に関する研究)

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1匹の全血液に相当する場合もあり、その微量な水分の維持が生死を分ける。脱皮・変態および休眠をも伴うドラマティックな一生のなかで、昆虫個体は摂食（吸汁）と排糞（排尿）の動的なバランスを維持している。昆虫はからだの成り立ちが開放性血管系であるので、血液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 pH・イオンに関わる細胞膜機能の変調や破綻が、全身の浸透圧維持に及ぼす影響は大きい。体内水分の適正な調節は、昆虫において正に水際作戦で行っているといえる。水という生命に直結する分子の通過路（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（H⁺）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。昆虫個体の生命維持の根幹に関わる細胞機能を解明するために、このAQPを中心にカイコ幼虫の浸透圧調節に関わる水分調節機構を検証し、水コントロールにおける鱗翅目幼虫（チョウ・蛾のなかま）の生理学的特徴をカイコ幼虫を用いて追究した。

(1) カイコ幼虫の成長の実体は絹タンパク質の生産を担う組織である絹糸腺にある。吐糸開始時に成長のクライマックスを迎え、幼虫体重（約5 g）の4割近くを占める絹糸腺では莫大量のシルク（液状絹）を貯留している。液状絹は30%にも達する高濃度タンパク溶液（ゲル状）であるので、そのpH調節が絹タンパク質の物性に必須であると考え、絹糸腺の肥大成長過程における液状絹の実際のpHを調査した。盛食期（絹タンパク質生産期）には弱酸性（pH 5～6）であったが、変態期（吐糸・繭形成期）には中性（pH 7～8）に変化し、ゲル状態がゾル化（流動化）することが推定された。また、このpH調整機能に関わる能動輸送機構として、絹糸腺細胞にはH⁺の能動輸送機構（H⁺ポンプ、V-ATPase）が存在関与していることを示した。カイコ幼虫が安定かつスムーズに吐糸営繭するために、pH環境と血液からの水分供給（水輸送機能）の双方が、絹タンパク質の溶液状態を規定する物理化学的要因として必須であると推論した。

(2) 水輸送を担うAQP遺伝子を、カイコ幼虫の絹糸腺および消化管系の組織(中腸・後腸)からクローニングした。二種類のアイソフォームを絹糸腺および中腸組織からクローニングし、AQPをコードする遺伝子の配列から推定されるカイコAQPは、いずれもAQPの基本構造を包含しており、吸汁性昆虫(ヨコバイ)や吸血性昆虫(蚊・ハエ)で報告されているAQPとの相同類似性を示した。この二種類のカイコAQPは幼虫体内で組織特異的な分布を示し、一つは絹糸腺や排泄に与る後腸で強い発現を示すタイプで、もう一つは消化吸収機能を担う中腸で発現するタイプであることがわかった。前者のAQPの主たる遺伝子発現組織が後腸であった事実は、カイコのようなイモムシの仲間(鱗翅目幼虫)が堅い固形粒状の糞を排泄することを説明し、後腸AQPの生理的役割は食下物からの水吸収(水リユーズ)機能にあると考えられる。鱗翅目幼虫は水飲み行動をとらないが、それはこの消化管末端、排泄前の腸管領域の細胞生理機能が、AQP分子を介した水リサイクルであることを示している。

(3) 絹糸腺におけるAQPの存在意義を調査した。絹糸腺の大部分は絹タンパク質を生産する領域(後部絹糸腺)とそれを腺内腔で貯える領域(中部絹糸腺)が質・量共に圧倒的の大部分を占め、口器で開口する吐糸口に連絡する導管部分(前部絹糸腺)は細管(長さ約3cm)になっており、その領域で絹タンパク質分子の方向性が決定され、繊維としての物性を構築すると考えられている。その細管領域で後腸と同じタイプのAQPの遺伝子発現は、絹糸腺全体の肥大成長と共に増大し、吐糸開始時(絹糸腺成長のピーク時)に極大となり、繭形成する過程で急減した。この絹糸腺AQPは、AQPに対する特異的抗体を用いた免疫組織化学による細胞観察から、腺内腔に面した原形質膜に局在することがわかった。また、後部絹糸腺で大量生産された絹タンパク質が中部絹糸腺の腺内腔へ大量流入してくる領域でもAQPが原形質膜に分布することも示された。絹糸腺の肥大に伴って、絹タンパク質濃度が高まるので、それが腺内腔で非可逆的に固化することはカイコにとって吐糸不能に陥るので避けねばならない。絹糸腺ではAQPが働いて血液より水供給することによって、液状絹の適正な水分維持管理がなされていると考えられた。つまり、先の(1)で示したpH調節と水調節が絹糸腺にとって必要不可欠であると結論された。

哺乳類のAQPには13種類のアイソフォームがあり、臓器特異的な発現や水輸送だけにとどまらない多様な細胞生理機能が解明されつつある。カイコは比較的大型の昆虫であるのでAQPの組織特異的解析が可能であった。昆虫のAQP研究は植物汁液を吸汁する半翅目昆虫(ヨコバイ)の中腸からのcDNAクローニングで始まった(1996年)。それ以降、吸血性昆虫から遺伝子としていくつか同定されている。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研究が進められている。カイコのような鱗翅目昆虫は、幼虫時代には植物葉(時には農業作物)を一過性ではなく断続的に、長期にしかも大量に摂取している(solid/plant feeder)。そのような飲水行動をとらない昆虫の水代謝研究は、AQP研究の害虫制御への応用展開の可能性も秘めている。