

昆虫の水分管理機構に関する細胞生理学的研究
—昆虫アクアポリンファミリーの多機能性の解明—
New insights into aquaporin physiology in insect cells

丸 山 麻 理 弥

Mariya Maruyama

2015

学 位 論 文

昆虫の水管理機構に関する細胞生理学的研究 —昆虫アクアポリンファミリーの多機能性の解明—

New insights into aquaporin physiology in insect cells

平成 27 年度

鳥取大学大学院連合農学研究科

生物資源科学専攻

生物機能科学連合講座

丸 山 麻 理 弥

2015 年 (平成 27 年) 9 月

目 次

第 1 章 カイコの 2 種の水選択的アクアポリンの生理的役割	01
第 2 章 カイコ卵形成期におけるアクアポリンの生理的役割	40
第 3 章 昆虫アクアグリセロポリン (Group 3 subfamily) の特質と カイコでの存在 (幼虫中腸と卵形成期の動態)	59
第 4 章 総合考察	79
引用文献	95
和文摘要	102
英文摘要	104
学位論文の基礎となる学術論文	107

第 1 章

カイコの 2 種の水選択的アクアポリンの生理的役割

節足動物の祖先は先カンブリア代の海に棲んでいた (Chapman, 2013)。今日まで多様な生物種が脈々と命を繋いできた。多くの生き物はその過程で姿や形を変え、現在その種数は分類されているだけで約 170 万種にのぼり (林, 2010)、未分類・未同定の種は計算上、約 1,000 万種に達するとされている (Mora et al., 2011)。その中で特に地上において繁栄を誇っているのが昆虫綱 (Insecta) である。その祖先は今からおよそ 4 億 8 千万年前に出現したとされ (Misof et al., 2014)、陸上生活を始めた動物界のパイオニア的存在である。昆虫は種の数、個体の数が他の動物と比べて桁外れに多く、生活型 (ライフスタイル) は多様性に富んでいる。現在約 95 万種の昆虫が知られ、これは分類された全生物種のおよそ半数を占める (森本, 2003a)。このような昆虫の繁栄は、自らの体サイズを小型化・軽量化したことによるところが大きい。また環境の変化に適応するため、休眠機構や変態機構などを発達させ生活史を多様化させたことも“陸上の王者”とよばれるに至った一因であろう。その一方で、体サイズの小型化により相対的な表面積が増し、外気からの乾燥に曝されることになった。生体は外部環境の変動に対し、さまざまな機構を備えて内部環境をほぼ一定に保つ。陸上に棲む動植物の生存にとって大きな障害となる乾燥への耐性は言うまでもない。昆虫では水分ロスを抑えた皮膚構造と気門によるガス交換、そして食性に合わせた窒素態排泄など様々な節水機構を獲得するに至った (田付, 2007; 寺山, 2009; 山元, 2009)。

体液組成や浸透圧を適切に調整することも恒常性の維持に重要である。水はその過程、それ以外でも生物にとって重要かつ不可欠な物質である。細胞内外における生化学反応の場所となり、細胞内高分子や原形質膜の構造を維持する、そして各種物質の運搬を行うなど、役割は多岐に渡る (武村, 2014)。さらに比熱の高い水は急激な温度変化の緩衝剤としても働く。このように水は細胞内外を問わず生体で普遍的に存在、機能している。しかし、原形質膜はリン脂質を主成分とする脂質二重膜であり、一般的に水の透過性は低い。だが、赤血球膜などは水分子本来の極性から予測されるよりも高い水透過性を有しておりこれは長年の謎であった。水分子が膜を速やかに通過する答えはアクアポリン (水チャネル: Aquaporin : AQP) とよばれる水分子専用の経路にあった。AQP が多くの原形質膜に存在することが分かり、この発見によって体内の水バランス調節とその破綻に関する生理学的な基盤を分子レ

ベルで調査・研究する方法が提示された (Agre, 2006)。さらに水バランスを議論する上で水分子がどちらに流れるかは重要である。AQP を介した水分子の流れの方向性は原形質膜を隔てた内側と外側の浸透圧的な濃度勾配によって受動的に決定される。この濃度勾配は主に Na^+ の電気化学的電位差 (electron-chemical potential difference: $\Delta\phi$) を駆動力とするトランスポーターやチャネルから生じる (谷口, 2000)。

多くの生物で Na^+ による能動輸送機構が広く機能しているが、カイコガ (カイコ) のような植物葉を摂食するチョウ目昆虫は一生を通じてナトリウムの乏しい環境で棲息するため、体内中の Na^+ 濃度はわずかである。ゆえにカイコなどでは分布も神経組織に限られている (Petschenka et al., 2012)。ではナトリウムポンプがほとんど機能していない生物で細胞・組織はどのように物質輸送の駆動力を獲得しているのか。

その答えは1990年代以降、 H^+ の駆動力 (proton-motive force) に関する研究より明らかとなった。 H^+ を能動輸送するプロトンポンプ (Proton-translocating vacuolar-type ATPase, H^+ V-ATPase あるいは V-ATPase) が細胞内外でのエネルギー勾配を形成し、イオン輸送や溶質輸送 (solute transport) に必要な電気化学的エネルギー “proton-motive force” を創出しているのである。現在、生物界に広く存在する普遍的なポンプとして個々の細胞生理における重要性が認識され、定着している (森山, 2000; 孫ら, 2002; Beyenbach and Wiczorek, 2006)。原形質膜に存在する H^+ V-ATPase は細胞外に H^+ を放出し、原形質膜を介して pH 勾配を形成する。 H^+ V-ATPase は酵母細胞の液胞で最初に発見され (Ohsumi and Anraku, 1981), 細胞内膜系のプロトンポンプ (endomembrane V-ATPase) と考えられていた。しかし様々な動物細胞・組織でナトリウムポンプ (Na^+ , K^+ -ATPase) と協調してイオンのホメオスタシスに機能していることが報告された (Harvey et al, 2010)。

AQP はこの電気化学的電位差によって構成される浸透圧勾配を受け、原形質膜を介した水輸送を行う。ここで少し詳しく AQP 発見までの過程を示す。動物の赤血球膜は高い水透過能をもつがそのメカニズムは不明であった。その後、赤血球膜には分子量 28 kDa の未知タンパク質が大量に存在することが分かり、CHIP28 (Channel-like Integral Protein of 28 kDa) と名付けられた (Agre, 2006)。1992年に米国のジョンスホプキンス大学の Peter Agre 教授が、CHIP28 の完全長 cDNA をクローニングしたところ、推定アミノ酸配列から

6つの膜貫通領域を有することが予想された (Jung et al., 1994)。そして、アフリカツメガエル卵を用いた外来遺伝子発現系での水輸送検定により水輸送機能が証明され、水専用チャネルタンパク質であることが明らかとなった。今日ではこの水チャネルはAQPとよばれ、最初に報告されたこのAQPはAQP1と命名されている (Agre et al., 1998; Borgnia et al., 1999; Fig. 1)。その後、ほとんどの生物で存在が報告され、現在では動植物共通の水チャネルとして広く認められている。哺乳類では13種類のAQPs (AQP0~12)が確認され (石橋, 2005)、AQP1は腎臓 (近位尿細管)・眼・脳などで水輸送に機能している。続いて見つかったAQP2は腎臓の集合管に存在し、尿濃縮に決定的な役割を果たしており、この遺伝子が変異を起こすと腎性尿崩症という多飲多尿を示す先天性の病気となる (佐々木, 2005)。水は糖などの高分子や電荷を持つイオンなどに比べると脂質二重膜を透過しやすい。ゆえにAQPを介さなくてもゆっくりとした透過 (または浸透) は起こるが、AQPが原形質膜に存在することによって通過速度は10~100倍以上に促進される (光岡, 2008)。多くのAQPが体内に存在し、水輸送が豊富な臓器では高密度かつ複数種が存在することも認識されている。AQPは輸送能により大きく2つのタイプに分けられる。水のみを選択的に通過させるもの (水選択的アクアポリン, orthodox aquaporin) と、水だけでなくグリセロールや尿素といった低分子かつ非電荷の物質も通過させるアクアグリセロポリン (aquaglyceroporin, GLP) であり、それぞれが互いに協調しながら働いていると考えられている (佐々木・石橋, 2008)。AQPの発見は生命科学における大きな功績であり、Agre博士は2003年度のノーベル化学賞に輝いた (Agre, 2006)。

AQP研究は哺乳類を中心に精力的に進められてきたが、近年、他の生物種でも分子的な特徴付けやその生理学的意義が蓄積されつつある (Campbell et al, 2008)。昆虫のAQPの最初の報告はオオヨコバイ (*Cicadella viridis*) であり、中腸の一部 (Filter chamber : FC, ろ過室) で存在することが示された。そしてcDNAクローニングにより全塩基配列の決定も行われた (Le Cahérec et al., 1996)。それ以来、昆虫でも大いに研究が進み、AQPは昆虫でも他の生物と同様に排泄や吸収といった生理的機能の重要な役割を担っていると示唆されている。

昆虫AQPはアミノ酸配列の系統解析により4つのグループに分かれる (Kambara et al., 2009; Goto et al., 2011)。まずグループ1は水選択的AQP、グループ2にはショウジョウ

バエで報告された Bib (Big brain) 類似の AQP が、グループ 3 は昆虫 GLP およびアミノ酸配列の相同性からグループ 3 に分類されるが、現時点では水のみを通過させると報告された AQP が分類され、さらなる調査が待たれる。グループ 4 には他の 3 グループとは相同性が低く、NPA モチーフが一部変化した unorthodox AQP が含まれ、機能解析はほとんど進んでいない。また 4 つのグループの内、水選択的 AQP (グループ 1) のみがさらに 2 つのサブファミリー、キイロショウジョウバエで報告された *Drosophila* integral protein (DRIP) サブファミリー (Kaufmann et al., 2005) と、アキマドボタル (*Pyrocoelia rufa*) から報告された *Pyrocoelia rufa* integral protein (PRIP) サブファミリー (Lee et al., 2001; Campbell, 2008) に分けられることも明らかとなった。後述するカイコの AQP は AQP-Bom1 が DRIP, AQP-Bom3 が PRIP に属する。カイコでは現在 3 種類の AQP がクローニングされており、この DRIP (AQP-Bom1) タイプと PRIP (AQP-Bom3) タイプは後腸での知見から特性の違いが示唆された。またもう 1 つの AQP, AQP-Bom2 は GLP タイプであり、昆虫で報告された初の GLP である。当初、オオヨコバイから報告された最初の昆虫 AQP が水選択的 AQP だったこともあり、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) のゲノム情報から存在が推測されていたが、昆虫での存在に関しては否定的であった。しかし、片岡ら (Kataoka et al., 2009a; b) がカイコとナシヒメシンクイ (*Grapholita molesta*) から GLP を発見・単離し、実験的に尿素とグリセロールを運ぶことを証明した。この 2 種の推定アミノ酸配列は哺乳類などで報告された一般的な GLP と異なっており、2012 年には昆虫で 3 例目となる GLP がエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) で報告された (Wallace et al., 2012)。この GLP はグリセロール・尿素に加えマンニトール・キシリトールやソルビトールなどの糖をも通過させる。また、ベネズエラサシガメ (*Rhodnius prolixus*) で同定された Rp-MIP (Major Intrinsic Protein; Echevarría et al., 2001) は配列上グループ 3 に属するものの、水のみを輸送させると考えられてきた。だが近年、バリエントの Rp-MIP-A が過酸化水素 (H₂O₂) を通過させることが報告され (Staniscuaski et al., 2013), 新たな輸送能が確認された。哺乳類などでは GLP に関する豊富な知見があるにもかかわらず、昆虫 GLP に関する研究は少数である。昆虫 GLP と他の生物の GLP との相違点を検証するためにも更なる報告が期待される。機能未同定の昆虫 AQP, あるいは同定された AQP のバリエントにも水以外の通過能を持つも

のが存在している可能性もある。今後、昆虫 AQP の報告が増えるに従って、哺乳類などで報告されている多様な輸送能 (Gomes et al., 2009; Verkman 2011) , そして細胞接着への関与 (Neely et al., 1999; Engel et al., 2008) などが昆虫でも明らかとなるかもしれない。

カイコのAQPs (AQP-Bom1, AQP-Bom2 および AQP-Bom3) は主に消化管での発現が確認され、ノーザンブロット解析により AQP-Bom1 は後腸 (結腸と直腸) で強く発現し、AQP-Bom2 は主に中腸後部とマルピーギ管で発現していた (Kataoka et al., 2009a; 第 3 章参照)。おそらく水特異的な AQP (AQP-Bom1) は後腸内腔から水を回収するための主たる分子であり、GLP (AQP-Bom2) は窒素態の吸収と排泄に関与しているであろう。この AQPアイソフォームは後腸と中腸、そしてマルピーギ管の間における水バランスの維持、そして幼虫の排泄がどのように行われているかを示唆する可能性もある。

カイコにおける AQP の分布は今のところ絹糸腺や中腸、後腸において調査されている (Miyake and Azuma 2008; Kataoka et al., 2009a) に留まり、その他器官での知見はまだまだ乏しい。また、消化管において遺伝子の発現は確認されたが、実働分子としてのタンパク質の組織・細胞での局在部位など不明な点も残っている。そこで本研究では消化管における *Bombyx* AQPs タンパク質の発現とカイコの卵形成における AQP の生理的役割とその機能調節に焦点を合わせて調査した。

ほとんどのチョウ目昆虫の幼虫は植食性であり、摂食する葉から水を得ている。タバコスズメガ (*Manduca sexta*) の幼虫を用いた水バランスの生理学的研究では後腸において水が再吸収され、血リンパを介して中腸内容物として再利用されると推定された (Reynolds et al., 1985)。この水分吸収には後腸部位に存在するマルピーギ管の末端である cryptonephric Malpighian tubules (cMT) が直腸上皮と密着し、並行に存在する perinephric membrane に包まれた直腸-cMT複合組織 (cryptonephric rectal complex) が大きな役目を担っていると示唆されていた (Ramsay, 1976; Bradley, 1985; Liao et al., 2000)。現在、この組織の構造は K^+ や Cl^- のようなイオンの移動に伴って起こる後腸管腔側から近接する cMT への急速かつ効率的な水の輸送を行うために機能していると考えられる (O' Donnell, 2008) , 後腸管腔内で脱水された内容物は堅い固形粒状の糞として排泄される。

この際、水はどのようなルートを辿り後腸管腔内から血リンパへと回収されるのか。上皮細胞を介した水の移動には、細胞を経る (transcellular) , 細胞間を通る

(paracellular) , そして細胞内から細胞間隙へと向かう (transcellular and paracellular) ルートが考えられる。だが昆虫は開放血管系であり, わずかな体液の漏れが命取りとなる。ゆえに上皮細胞間を強固に結ぶ septate junction とよばれる接着を持ち, paracellular な移動は制限される。このことから, おそらく水は transcellular な経路を通ると考えられる。ではどのように後腸の上皮細胞を経て体腔内へと移動しているのか。

まず, 第 1 章においてカイコの後腸部位における transcellular な水の移動を裏付ける AQP-Bom1, そしてカイコ幼虫の直腸からクローニングされた 3 番目の AQP (AQP-Bom3) の発現と分布について調査, 検証した。

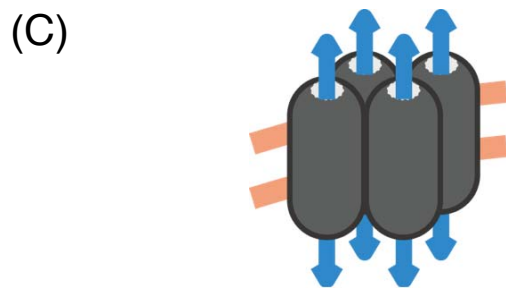
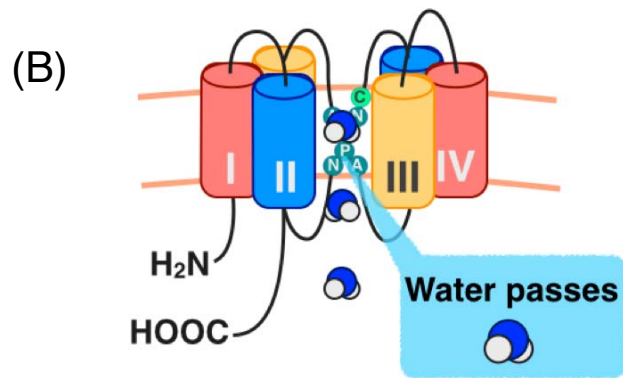
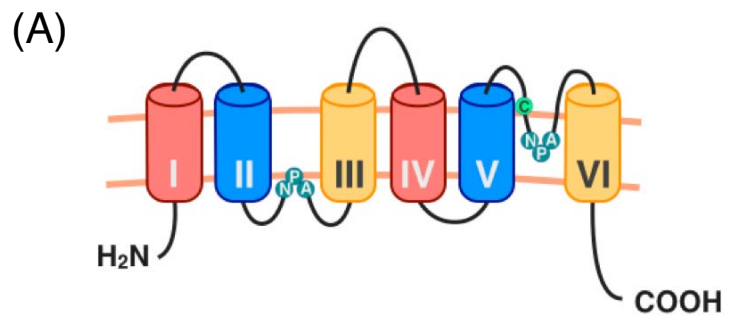


Fig. 1.

Aquaporin molecular structures.

(A) Aquaporin (AQP) has six transmembrane regions and NPA (N: asparagine, P: proline, A: alanine) motifs exist roop B, roop E respectively. C-terminal and N-terminal domains reside in cytoplasm.

(B) AQP is folded on plasma membrane, then NPA motifs located roop B, roop E form single aqueous pathway. Many AQP is mercury sensitive (mercury ion inhibits water transport by AQP), and in AQP1, C: cysteine 189 amino-acid residue is mercury sensitive site.

(C) AQPs form homo-tetramer, each AQP transports water separately.

(A) and (B) figures drawing based on (Jung, et al.,1994), (C), figure drawing based on (Verkman, 2005)

材 料 と 方 法

実験昆虫

カイコ品種として交雑種（春嶺×鐘月または錦秋×鐘和）に人工飼料（KIT-2515M15, 無菌養蚕システム研究所, 京都）を与えて24~26°Cで飼育した。5齢（終齢）期は約7日間摂食し、その後吐糸期に入る。5齢幼虫の3~4日齢から解剖摘出した後腸組織（結腸: colon, 直腸: rectum）、マルピーギ管（Malpighian tubule: MT）、気管系（trachea）を使用した。なお、解剖に使用したピンセット・眼科用ハサミなどの器具類は特に滅菌処理をしていない。

PRIP タイプ AQP アライメントと相同性の比較

AQP-Bom3（Genbank accession no. NP_001153661.1）と他の昆虫から報告されているPRIPタイプAQPのアミノ酸配列をclustalWにてアライメントし、相同性を比較した。使用したAQP配列は以下の通りである。PRIP（*Pylocoelia rufa* integral protein : AF420308.1）、*Aedes aegypti*（AaAQP2 : XP_001656932.1）、*Anopheles gambiae*（alternate isoform of AgAQP1 : AB523397.1）、*Belgica antarctica*（BgAQP1 variant B : AB602340.1）、*Eurosta solidaginis*（EsAQP1 : FJ489680.1）、*Polypedilum vanderplanki*（PvAQP1 : AB281619.1）。

カイコ幼虫の各種組織からの mRNA 調製

解剖には diethylpyrocarbonate（DEPC）処理を行った生理食塩水（Phosphate buffered saline : PBS-DEPC*）を使用した。摘出した組織を PBS-DEPC* を満たした滅菌済みプラスチック製シャーレ（60 × 15 mm, FALCON® 3002, CORNING, NY, USA）中に移し、よくすすぐとともに付着した他組織を中腸組織自体になるべく傷つけないように注意して素早く取り除いた。最後に新品の葉包紙上に組織片をのせ、余分な水分を取り除いて乾熱滅菌したアルミ箔にのせて0.1 gを目安に秤量した。ヌクレアーゼの汚染に気をつけてオートクレーブ処理（121°C, 30~40 min）した新品のエッペンドルフチューブ（1.5 または 2.0 ml 容）に移し、mRNAの精製に取りかかるまでそのまま水中に置いた。直ちに使用しない場合は、液体窒素中に投入し瞬間凍結させた後、-80°Cフリーザーで保存した。

摘出した組織から Acid-Guanidium-Phenol-Chloroform 法（AGPC 法）を用いて全 RNA を精製後、あるいは組織から直接、poly(A) RNA のみを単離するようにデザインされた QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit（Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK）を用いて mRNA を調製した。それぞれの精製方法を以下に示した。

*PBS-DEPC（1 × PBS, RNase-free）

50 mlの10 × PBS-DEPC**に 450 mlの DEPC-H₂O を加えた。

全 RNA の抽出

全 RNA および mRNA 精製にあたって、使用するガラス器具類は乾熱滅菌処理した（190°C, 2 hr）。プラスチック製の器具類は、滅菌済みの未開封のものをそのまま使用した。エッペンドルフチューブ、イエローチップ、ブルーチップは、新品のものに長めのオートクレーブ処理（121°C, 30~40 min）をしてから使用した。なお、実験台や種々の機器類には RNase の汚染があることを前提にし、RNA 精製に関わるすべてのガラス器具やキット関係の試薬ボトルを直接置かないようにするために、実験台上に乾熱滅菌したガラスシャーレ（直径 9 cm）を数枚用意した。

(1) 準備

- (a) 全 RNA を抽出後直ちに mRNA を精製するため QuickPrep™ Micro mRNA Purification Kit をあらかじめ室温に戻しておいた。
- (b) 解剖直後の組織、または -80°C で凍結保存してあった組織を氷冷下に置いた。
- (c) 37°C にセットしたインキュベータ（Multi-Shaker Oven HB, TAITEC, 埼玉）内で Extraction Buffer を完全に溶解させた。

(2) 乾熱滅菌したアルミフォイルの小片に組織を載せて、組織の湿重 (0.1 g 前後) を測り、乾熱滅菌したガラス製マイクロホモジナイザー (0.1~1 ml 用, Radnoti LLC, CA, USA) へ移した。

(3) 組織湿重の 10 倍量 (0.1 g の組織に 1 ml) の変性溶液†を加え均一なホモジェネートを作成した。

†4 M GTC 溶液 (変性溶液)		最終濃度
Guanidium thiocyanate (GTC)	236.3 g	4 M
2 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)	6.25 ml	
Sarcosyl (Sodium N-lauroyl sarcosine)	2.5 g	0.5 %
Total	500 ml	

- 1 L 容のマイエルに Guanidium thiocyanate (GTC: 結晶状) 236.3 g を量り取り、280 ml の蒸留水を加えた。

- 12.5 ml の 2 M クエン酸ナトリウム†† (pH 7.0) を加えた。

- 2.5 g の Sarcosyl を加え、インキュベータ (Multi-Shaker Oven HB, TAITEC) (65°C) で GTC を溶解させた。

- 蒸留水を加え、500 ml にメスアップした。

- 使用時に 5 ml の変性溶液に対し 35 µl の 2-mercaptoethanol を加えた。

††2 M クエン酸ナトリウム

- 29.4 g のクエン酸ナトリウムを DEPC-H₂O に溶解させ、100 ml にメスアップした。

(1 M クエン酸ナトリウムストック溶液)

- 19.2 g のクエン酸 (無水) を DEPC-H₂O に溶解させ、100 ml にメスアップした。

(1 M クエン酸ストック溶液)

- 適当量の 1 M クエン酸ナトリウムストック溶液に、数十 µl ずつ 1 M クエン酸ナトリウムストック溶液を滴下してゆき、pH を 7.0 に合わせた。

(4) ホモジェネートを、乾熱滅菌したパスツールピペットで、泡立てないように丁寧に 2 本のエッペンドルフチューブ (Safe-Lock 2.0 ml, Eppendorf AG) に半分ずつ移した。(目分量で分けた。0.05 g の組織に 0.5 ml の変性溶液を加えたと仮定して、以降の操作を進めた。)

(5) 変性溶液の 1/10 量の 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0) ¶を各チューブに加え、よく転倒混和した。(変性溶液が 0.5 ml なので 50 µl)

¶2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0)

- 54.4 g の酢酸ナトリウム・3H₂O を 20 ml の DEPC-H₂O に溶解させた。

- 酢酸をゆっくりと加えて (約 150 ml) pH を 4.0 に合わせた。

- DEPC-H₂O で 200 ml にメスアップした。

- オートクレーブ (121°C, 30~40 min) 後、室温で保存した。

(6) 変性溶液と等量の水飽和フェノール¶¶ (変性溶液が 0.5 ml なので 0.5 ml) を加えてボルテックスでよく混和させた。

- 30 g の結晶フェノールを 50 ml チューブに直接量りとした。

¶¶水飽和フェノール

フェノール (核酸抽出用) 30 g

8-ヒドロキシキノリン (8-HQ) 0.03 g

- 0.03 g の 8-HQ をチューブのキャップに量りとした。

- チューブがいっぱいになるまで DEPC-H₂O (約 20 ml) を加え、

8-HQ をこぼさないようにふたをした。

-65°C にセットしたインキュベータ (Multi-Shaker Oven HB, TAITEC) に静置し、フェノールを溶解させた。

-ふたが閉まっていることを確認し、激しくシェイクした。二層に分離したら余分な上層 (水層) をアスピレータで除いた。

ただし、フェノールの酸化を防止するため、1 cm ほど水層を残した。

※水層の量が変化なくなった時点で水飽和とした。

水層がなくなる場合は DEPC-H₂O をあふれない程度に加え、二層に分離するまで繰り返し行った。

-アルミフویلで遮光し、4°C で保存した。

8-HQ が黄色から赤褐色に変わったものは酸化しているので、精製に使用してはいけない。

(7) 変性溶液の1/5 量 CIA† (変性溶液が 0.5 ml なので 100 μl) を各チューブに加え、ボルテックスした。

†CIA (クロロフォルム：イソアミルアルコール=49:1)

クロロフォルム	49 ml
イソアミルアルコール	1 ml

-DEPC 処理したガラス製のビン (100 ml 容) に上記を加えた。

-アルミフویلで遮光し、暗所 (室温) で保存した。

(8) 氷上で 15 min 静置させ (この段階でフェノール層と水層が分離してくる)、その後 20 min 遠心した (4°C, 15,000 rpm)。

(9) 中間層を吸わないように注意しながら上清 (400~450 μl) を新しい 2 ml 容のエッペンドルフチューブに移した。(この操作で、(4)で2つに分けたサンプルをひとつのチューブにまとめた。)

(10) 最初の変性溶液と等量のイソプロピルアルコール (2-プロパノール) (変性溶液が 1 ml なので 1 ml) を加え転倒混和させた後、室温で 15 min 静置した。

(11) 全 RNA の回収率を上げるために、最低でも 30 min 遠心 (4°C, 15,000 rpm) した後、上清をアスピレータで除去した。もし、全 RNA のままで実験に用いる場合は、1 ml の80% エタノールでリンス (4°C, 15,000 rpm, 5min) を2回行い、最後に数秒間遠心 (4°C, 15,000 rpm) し、アスピレータで余分な水分を完全に除去した。mRNA の精製を行う場合は80% エタノールで1回リンスした後、数秒間遠心 (4°C, 15,000 rpm) し、アスピレータで余分な水分を完全に除去した。

(12) 沈殿に0.1 ml の DEPC-H₂O を加え 65°C で 10 min インキュベーションし、完全に溶解させた。

なお、得られた全 RNA 画分を直ちに使用しない場合は、ステップ (11) の後、1 ml の80% エタノールを加え、沈殿させたまま -80°C で保管した。

実験再開時はチューブ底面の同じ位置に沈殿させるようにチューブをセットして (12) のステップを行った。

mRNA の精製

(1) Oligo(dT)-Cellulose (Oligo(dT)-cellulose (25 mg/ml) containing 0.15% Kathon™ CG/ICP Biocide) の瓶をよくかき混ぜて懸濁し、均一化させてあることを確認した上で、その懸濁液 1 ml をエッペンドルフチューブ (Safe-Lock 2.0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) に分取した。これを精製するサンプル数だけ用意した。

(2) 全 RNA の精製のステップ(12)で沈殿を溶解させたチューブに直接 Extraction Buffer (キットのプロトコールでは、組織 0.1 g に対して 0.6 ml の Extraction buffer を加えると記載されている) を常に 0.6 ml 加え、泡立てないように穏やかに転倒混和させた。

(3) 転倒混和後、Extraction Buffer の 2 倍量 (0.6 ml ずつ 2 回に分けて合計 1.2 ml) の Elution Buffer (10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1 mM EDTA) を穏やかに加え、Extraction Buffer に含まれている N-lauroylsarcosine による泡立ちを最小限にするように注意してゆっくりと転倒混和させ、RNA 溶液を完全に均一化させた。この操作を終了後、Elution Buffer の小瓶 (ガラス製) を、68°C (キットのプロトコールには 65°C と記載されているが高めに設定) に設定変更したインキュベータ内で保温した。

(4) 先の (2) で用意した Oligo(dT)-Cellulose 入りのチューブと RNA 溶液入りのチューブを遠心した。遠心時間は Oligo(dT)-Cellulose 懸濁液のチューブは 1 min、ホモジェネートチューブについてはキットのプロトコールには 1 min 遠心とあるが、変性させた組織タンパク質など核酸以外のものを完全に遠心除去させるために、15 min 遠心した。遠心処理には微量高速冷却遠心機 (MR-150, 株式会社トミー精工, 東京) を用い、特に断らない限り、温度設定は室温 (20~25°C) で、15,000 rpm で行った。

(5) 遠心開始 1 min 経過したら、遠心を一旦停止させ、直ちに Oligo(dT)-Cellulose 懸濁液チューブの上清を、RNase free のイエローチップを先端に取り付けた簡易式アスピレータにて吸引除去した。なお、RNA 溶液の入ったチューブは引き続き 15 min の遠心を行った。

(6) RNA 溶液の遠心終了後、RNase free のブルーチップを取り付けたピペットマンで、透きとおった上清 (約 1.5ml) を、Oligo(dT)-Cellulose ペレットの入ったチューブに移した (AGPC 法により大部分のタンパク質が除去されており沈殿物を確認することはできないが、沈殿物があると考え 1.5 ml のみ移した。)

(7) Oligo(dT)-Cellulose と RNA 溶液を緩やかに充分に反転攪拌させた。ここで、キットのプロトコールには 3 min 反転攪拌とあるが、Oligo(dT)-Cellulose と mRNA を確実に結合させるために、10 min の振とう攪拌を行った。この時、Oligo(dT)-Cellulose が小さい塊を形成することもあるが、これは精製に影響を及ぼさないとプロトコールに記載されているので無視した。振とう攪拌が完了したら、遠心を 10 sec 行った。遠心完了後直ちに上清を取り除いた。以後、特に断らない限り、上清の除去には、RNase free のイエローチップを取り付けたアスピレータによって吸引除去した。

(8) まず、High-Salt Buffer (10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl) を 1 ml 加え、懸濁する程度に反転攪拌を行い、攪拌後、10 sec 遠心し直ちに上清を取り除いた。この操作を計 5 回行った。

(9) 次に、Low-Salt Buffer (10 mM Tris-HCl; pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl) を 1 ml 加え、先の (10) と同様に懸濁する程度に反転攪拌を行い、攪拌後、10 sec 遠心し、直ちに上清を取り除いた。この操作を計 2 回行った。

(10) この Oligo(dT)-Cellulose 入りチューブに Low-Salt Buffer を 0.3 ml 加え懸濁させた。

(11) 新しい RNase free のエッペンドルフチューブ (2 ml 容) に MicroSpin™ Column (キット同封) をセットし、先の (12) で Low-Salt Buffer で懸濁させた Oligo(dT)-Cellulose を添加し、5 sec 遠心した。遠心後、チューブに出た排出液を除去した。

(12) 先の (12) で Oligo(dT)-Cellulose の入っていたエッペンドルフチューブへ再び Low-Salt Buffer を 0.5 ml 加え、チューブに多少残っている Oligo(dT)-Cellulose のスラリー (slurry) と共に MicroSpin™ Column に移した。この際、既に MicroSpin™ Column 内の Oligo(dT)-Cellulose のカラムベッドを乱さないように穏やかに移した。5 sec 遠心し、チューブに出た排出液を除去した。この操作をあと 2 回繰り返し、計 3 回行った。

(13) MicroSpin™ Column を RNase free のスクリーキャップ付きチューブ (Cat. No. 72.692 S, 滅菌済, 株式会社アシスト, 東京) に移動させた。暖めておいた Elution Buffer (68°C) 0.2 ml を MicroSpin™ Column 内へ、Oligo(dT)-Cellulose のカラムベッドを乱さないように穏やかに添加し、68°C 下に 5 min 静置した。68°C で 5 min、静置する操作はキットのプロトコールには記されていないが、mRNA の溶出をより確実にするために行った。その後、遠心を 5 sec 行い、mRNA 画分を溶出させた。この操作をもう 1 度繰り返し、合計 0.4 ml の mRNA 溶液を得た。

(14) 回収した 0.4 ml の mRNA 溶液を、直ちにそのまま、分光光度計 (Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech Ltd, Cambridge, UK) によって純度と濃度の測定に供した。測定終了後、mRNA 溶液を全量回収した。なお、測定時の Reference にはキットに添付されている Elution Buffer を用いた。また、分光光度計での測定にあたり、ウルトラマイクロボリュームシュガーキューブセル (50 μ l 用) を mRNA 精製に先立ってキットのプロトコールに従い、濃塩酸：メタノール (1:1) に 1 hr 浸漬後、DEPC-H₂O で数回充分に洗浄して RNase free のキューベットとして用いた。

(15) この mRNA 溶液 (約 400 μ l) は希釈されており、そのまま使用するには濃度が低いので、測定終了後、エタノール沈殿処理によって濃縮した。すなわち、それぞれの mRNA 溶液 (約 400 μ l) へ以下の (a)~(c) の溶液を順次加えた。

- (a) 10 μ l の Glycogen Solution (glycogen at 5~10 mg/ml in DEPC-H₂O)
- (b) 40 μ l の K Acetate Solution (2.5 M potassium acetate; pH 5.0)
- (c) 1ml の 95% エタノール (RNase free, あらかじめ -20°C に置いたもの)

プロトコールでは、この後 -20°C 下に最低 30 min 静置とあるが、確実にエタノール沈殿を行うため、-20~-30°C 下の冷凍庫にて一晩静置した。

(16) 一晩静置後、プロトコールには 4°C, 5 min 遠心となっているが、mRNA の回収率をできる限り高めるために、遠心機の温度設定を 0~2°C にして、2 hr 遠心した。

(17) アスピレータで上清を吸引除去した後、さらに数秒間遠心し、底に溜まったエタノールをアスピレータで完全に除去した。

(18) 先の分光光度計による mRNA 量の見積もりに基づいて、濃度が 0.5 μ g/ μ l となるように RNase-free の水 (DEPC-H₂O) に溶解させた。なお、得られた mRNA 画分を直ちに使用しない場合には、ステップ (18) での遠心後、95% エタノール中での沈殿物のまま、-80°C で保管した。

実験再開時はチューブ底面の同じ位置に沈殿させるようにチューブをセットしステップ (16)~(18) を行った。

グリセロールストックの作製

決定した塩基配列から、カイコのアクアポリンホモログと判定されたクローンを持つ大腸菌を長期保存しておくために、グリセロールストックを作製した。方法は以下に示した。

トランスフォーメーションの時に作製したレプリカプレートをクリーンベンチ内で室温に戻した。

LB/ampicillin (LB/Amp) 液体培地の作製

液体培養を行う前日、もしくは 1 ヶ月以内に作製した培地を使用した。

(1) 寒天を加えていない 250 ml の LB 培地をトランスフォーメーションの項に従って作製し、pH を合わせたあと 200 ml の Duran ビンに 125 ml ずつ分注し、121°C で 20 min オートクレーブ滅菌した。この時、Duran ビンのキャップには 4 重に折りたたんだアルミニウムフォイルをビンの肩に掛かるくらいまでかぶせた。

(2) オートクレーブ後、内部気圧が下がり、液体培地が室温程度にまでもどったことを確認してから Duran ビンを取り出し、クリーンベンチ内で 125 μ l の ampicillin (100 mg/ml) を加え、ビンの蓋を閉め 37°C 恒温器 (暗所) で一晩静置し、翌日雑菌などのコンタミネーションがないことを確認した。この後、培養に使用する場合はそのまま 37°C に静置し、ただちに使用しない場合は 4°C (暗所) で保管した。

	Anti-sense probe 用	Sense probe 用
Plasmid DNA (10 µg 程度)	X µl	X µl
Autoclaved H ₂ O (up to 50 µl)	Y µl	Y µl
TaKaRa 10 × M buffer	5 µl	5 µl
0.1% BSA	5 µl	0 µl
Restriction enzyme	NcoI 2 µl	SpeI 3 µl
Total	50 µl	50 µl

(3) 恒温振とう培養器 (Bio Shaker BR-13M, TAITEC) を 37°C にセットした。

(4) 冷蔵庫保存していたマスタープレートをクリックベンチ内へ移した。

(5) ポリプロピレンチューブ (Falcon® 2059 または同等品, CORNING) を 1 クローンにつき 2 本ずつ用意し, LB/Amp 液体培地を 5 ml ずつ分注した。

(6) 爪楊枝で目的のコロニーを突き刺し, 傾けたポリプロピレンチューブに爪楊枝の先端部分をいれて, 培地でしっかりすすいだ。

	Anti-sense probe	Sense probe
(a) linearized vector DNA (1 µg)	X µl	X µl
(b) NTP labeling mixture	2 µl	2 µl
(c) Transcription buffer	2 µl	2 µl
(d) RNase inhibitor	2 µl	2 µl
(e) RNase-Free H ₂ O (18 µl に調整)	Y µl	Y µl
(f) SP6 or T7 RNA polymerase	X µl	X µl
Total	20 µl	20 µl

(7) 37°C, 280 rpm に設定した恒温振とう器で培養し, 大腸菌の 600 nm の吸光度が 0.7~1.0 くらいになるまで培養 (6 hr 程度) した。

(8) γ線滅菌済みの 1.5 ml アシストチューブ (No.72.692S, アシスト) を 1 クローンにつき 5 本用意し, それぞれに菌体培養液を 425 µl ずつ分注した。

(9) 菌体培養液の入ったチューブにオートクレーブ済みの 100% グリセロールを 75 µl ずつ入れ, 無菌的にキャップを元に戻しボルテックスで菌体培養液とグリセロールを充分に混和した。チューブに日付とクローンの名前を書いた後, 液体窒素に投入して急速凍結し, 1 本を -30°C で, 残りの 4 本を -80°C で保存した。

RNAプローブの作製

カイコの推定上のアクアポリンのタンパク質コード領域 (Open Reading Frame : ORF) をサブクローニングしたプラスミドを鋳型にして DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche Ltd, Basel, Switzerland) を用いて, Digoxigenin (DIG) -UTP で標識された DIG-labeled RNA を作製した。本来, mRNA の検出には anti-sense probe のみでよいが, 本章では anti-sense probe の特異性を確認できるだけではなく, anti-sense 鎖による遺伝子の発現調節の存否についても情報を得ることができる sense probe も同時に作製した。方法を以下に示した。

(1) 培養チューブ (Falcon 2059) に 5 ml の LB/Amp を分注し, そこにグリセロールストックを一掻きした白金耳をすすぎ, 37°C に設定した振とう培養器 (BioShaker Br-13FM, TAITEC) で一晩培養 (250 rpm, 12 ~ 14hr) した。

(2) 冷却遠心機 CD-100R (トミー精工) で集菌 (2,000 rpm, 15 min) した菌体から QIAprep Miniprep (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いてプラスミド DNA を抽出した。

(3) *in vitro* transcription には直鎖化したプラスミド DNA が必要となる。そこで、以下のことに注意し、プラスミド DNA を処理した。

- ・直鎖化するために用いる制限酵素の認識部位がインサート (ORF) にない。
- ・末端は5'突出もしくは平滑末端にする必要がある (3'突出末端では *in vitro* transcription を終了した RNA polymerase が鋳型 DNA から離れず、得られるプローブ量が極端に低下)。
- ・マルチクローニングサイト (MCS) をなるべく含まない位置、つまり MCS に挿入されている ORF に近い位置で切断する必要がある。

pGEM®-T Easy Vector の MCS 中には先の条件をみたす Nco I 部位と Spe I 部位が組み込まれており、SP6 RNA polymerase を使用する場合は Nco I, T7 polymerase を使用する場合は Spe I を使って直鎖化した。Bombyx AQP の ORF は、T7 側に 5' 末端 (メチオニン), SP6 側に 3' 末端 (終止コドン) の方向で挿入されている。Anti-sense プローブを作るにはプロモーター領域に近い方に遺伝子の 3' 末端が位置していればよいので、SP6 RNA polymerase を使用した。下記の反応液を 1.5 ml 容チューブに調製し、37°C に設定した気相インキュベータ (Multi-Shaker Oven HB, TAITEC) 内で一晩静置させた。

(4) 制限酵素処理後の反応液を 1.5% のアガロースゲル電気泳動で分離した。マーカー (200 bp DNA Step Ladder, Promega Corporation, Wisconsin, USA) を同時に泳動し、目的の大きさである約 3.8 kbp (3015 bp のベクターと 766 bp のインサート) の位置に断片を得たことを確認した。目的産物をゲルと共に切り出し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲルから抽出した。抽出した全量 9 µl の DNA 溶液から 1 µl を 59 µl の D.W. で希釈し、260 nm の吸収を分光光度計 (Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech) で測定し、その値から濃度を算出した。

(5) 引き続きラベリング反応を行うために、1.5 ml 容チューブに以下の (a) から (f) を順次加えた。

(6) 37°C 設定の気相インキュベータ (Multi-Shaker Oven HB, TAITEC) 内で 2 hr 反応させた。

(7) RNA が合成されているかを確認するために、0.5 ml 用のチューブに下記の通りにサンプルを調製し、全量を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離させた。マーカーには 200 bp DNA Step Ladder (G696A, タカラバイオ株式会社, 滋賀) を使用した。泳動中、残りの反応液を 4°C で保管した。

反応液	1 µl
滅菌水	9 µl
6 × Dye	2 µl
<hr/>	
Total	12 µl

(8) 合成されていれば DIG-UTP が配列中に取り込まれるので、ORF と MCS を足したサイズよりも大きい位置に産物を確認することができる。不必要となった鋳型 DNA を除去するために反応液に 2 µl の DNaseI (Roche) を加え、37°C (Multi-Shaker Oven HB, TAITEC) で 15 min 反応させた。最後に 2 µl の 0.2 M EDTA (pH 8.0, RNase-Free) を加え、ピペッティングすることで反応を停止させた。

(9) 反応液中に存在する逆転写酵素および鋳型 DNA 断片を除去するために、RNeasy Kit (QIAGEN GmbH) を使用して精製した後、得られたプローブの濃度を DIG Application manual for Filter Hybridization (Roche) の Estimation of Probe Yield by the Direct Detection Procedure に従って測定した。

Northern Hybridization

Northern hybridization には、特異性・検出感度が高く、シグナルに対するノイズが少ないとされている DIG 標識の 1 本鎖 RNA プローブを用いた。操作手順は以下のとおりである。なお、特に断らない限り試薬は RNA 実験専用を準備し、調製した溶液は、必要に応じて RNase free にするために DEPC 処理[¶]を行った。

[¶]DEPC を最終濃度 0.1% となるよう加え、約 37°C に 2 hr 以上置いた。時々シェイクすることでキャップ部分にまで DEPC をよく行き渡らせ、最後に、長めのオートクレーブ (121°C, 40~50 min) で DEPC を不活化させた。

(a) アガロースゲル電気泳動

Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA) を用いて電気泳動を行った。

(1) トレイ (7×10 cm) で 0.5 cm の厚さの 1.2% ゲルを使用するため、乾熱滅菌済みの Erlenmeyer flask (100 ml) にアガロース (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad) 0.36 g を測り取り、乾熱滅菌済みメスシリンダーを使い 21.6 ml の DEPC-H₂O を加えた。

(2) 電子レンジで 1 回につき約 15~30 sec のパルス数を数回行って、突沸に注意して完全にアガロースを溶解させた。室温下、60~65°C まで冷えた後、3 ml の 10×MOPS[†] と 5.4 ml の 37% ホルムアルデヒド (最終濃度 6.66% = 2.2 M) を加え、よく混合させた。

[†] 10×MOPS : 0.2 M MOPS, 50 mM sodium acetate, 10 mM EDTA (pH 7.0)

(DEPC 処理済みの褐色ビンに保存するのであらかじめ DEPC-H₂O をそのビンで作成しておくこと)

MOPS	20.927 g
sodium acetate · 3H ₂ O	3.402 g
500 mM EDTA (pH 8, DEPC)	10 ml
DEPC-H ₂ O	450 ml
- pH は 2 M NaOH で 7.0 に合わせた	
- DEPC-H ₂ O で 500 ml にメスアップ	
- autoclave (the solution will turn yellow-green)	

(3) 両端にシールを貼っておいたトレイに流し込み、サンプルコームをセットし、サランラップで覆ってゲルを水平な場所で固化させた (最低でも 30 min 以上静置した)。

(4) 使用する mRNA もしくは全 RNA 試料と、あらかじめ RNA sample buffer^{¶¶} を 15.5 µl 加えてある RNA Markers (0.28~6.58 kb, G3191, Promega) を -80°C フリーザーから取り出し、氷中で溶解させた。

RNA Marker の調製	
RNA Markers	3.0 µl (= 3 µg)
RNA sample buffer ^{¶¶}	15.5 µl
RNA loading buffer ^{¶¶¶}	2.0 µl

直ちにスピンドウンして -80°C に保管 (初回調製時に小分けしておく)。

(5) RNase-free のエッペンドルフチューブ (0.5 ml 容) をサンプル数だけ用意し、それぞれへ RNA sample buffer^{¶¶} を 15.5 µl 加えた。

^{¶¶} RNA sample buffer	
deionized formamide* (RNA 用)	10.0 ml
37% formaldehyde (12.3 M, RNA 用)	3.5 ml
10×MOPS	2.0 ml

*Formamide (Fluka 47671) をそのまま使用

-dispense into single use aliquots in tightly sealed screw-cap tubes and store at -30°C (3~6months, do not freeze-thaw)

(6) ゲルトレイを泳動装置へセットし、水面がゲルの上面から 1-2 mm となるように 1×MOPS† を注ぎ入れた（入れ過ぎないように注意）。30 min 以上泳動槽中で放置した後、ゲルが崩れやすいので注意深くサンプルコムを引き抜いた。少なくとも泳動開始 30 min 前までには 1×MOPS†† でゲルを平衡化させた。

†1× MOPS containing 0.74 % formaldehyde	
10 × MOPS†	25 ml
37% formaldehyde	5 ml
DEPC-H ₂ O	220 ml

(7) mRNA 試料 1 µg または全 RNA 試料 10 µg となるよう、先の (5) で用意したチューブへ添加した。
mRNA 試料 1 容に対して少なくとも 2 倍量の RNA sample buffer を加え、その全量（約 20 µl）を電気泳動に供する、と実験書には書かれている

(8) 試料と RNA Markers を 65°C で 15 min 処理し、RNA を変性させた。その加熱処理中にセットしたゲルを 30V で約 10 min, pre-run させた。

(9) 加熱処理後、試料は直ちに水中に戻し、各試料に 2 µl の RNA loading buffer¶¶ を加え、それぞれのチューブの全量を各レーンに添加した。すべての準備が整い次第、30V で電気泳動し、7~8 割程度（BPB がゲルの 2/3 程度）流れた時点で泳動を終了させた。

† Prehybridization solution (Corning® tube 50 ml を使用)	
50% formamide Fluka 47671	25.0 ml
5 × SSC	12.5 ml
0.1% N-lauroyl sarcosine 10% (w/v)*	0.5 ml
0.02% SDS 10% (w/v)**	0.1 ml
2% Blocking Reagent	10.0 ml
Blocking Reagent stock solution¶	
DEPC-H ₂ O	19.0 ml
total	50.0 ml
¶¶ RNA loading buffer	
50% glycerol (glycerol autoclaved)	5 ml
1 mM EDTA 500 mM EDTA (pH 8, DEPC)	20 µl
0.4% bromophenol blue ≈ 300 bp	0.04 g
0.4% xylene cyanol FF ≈ 4k bp	0.04 g
DEPC-H ₂ O	5 ml
- make up to 10 ml using a very high grade glycerol	
- dispense into single use aliquots and stored at -30°C	

***Maleic acid buffer : 0.1 M maleic acid, 150 mM NaCl; pH 7.5 (DEPC)

maleic acid	11.607 g
NaCl	8.766 g

(b) Northern blotting

(1) 泳動終了後、ホルムアルデヒドを除くためにゲル（30 ml 容積）を DEPC-H₂O（150 ml）に 5~10 min 浸漬し、これを 3 回繰り返した。以下、特に断らない限り、洗浄液量はゲル容積に対して、だいたい 5 倍量の溶液で、乾熱滅菌したシャーレ（直径 15 cm）で洗浄した。ゲルは非常にもろいので穏やかに振盪させた。

(2) 50 mM NaOH に 20~30 min 浸し、その後 5 min 程度 DEPC-H₂O で洗った。

(3) 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) に 10 min 浸し、その後 5 min 程度 DEPC-H₂O で洗った。

(4) 20 × SSC† (pH 7.0) に 15 min 浸し、これを 3 回繰り返した。

†20 × SSC (pH 7.0) (RNase-free)
 3 M NaCl 87.66 g
 0.3 M sodium citrate 44.115 g
 (= trisodium citrate dihydrate)
 - well mix, make up to 500 ml with D.W.
 - add 1 M citric acid (pH 7.0-7.1)
 - add 500 µl of DEPC
 - mix overnight, then autoclave at 121°C for 30~40 min

(5) 上記 (4) の操作中に、ゲルと同じサイズの 3MM フィルターペーパー (Whatman®, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) 5 枚とハイブリダイゼーション用メンブレン (Nylon membranes, positively charged, Boehringer Mannheim, Germany) 1 枚を用意した。また、ゲルとほぼ同じサイズになるようにキムタオルを裁断し、厚さ約 5 cm 分の量を準備した。

(6) 次に、上記 (4) の操作中に、3MM フィルターペーパーは 20 × SSC に浸漬しておいた。ハイブリダイゼーション用メンブレンは、まず 2 × SSC に浸し、続いて 20 × SSC に浸漬しておいた。

(7) ブロットング装置 (Gキャピラリーブリッターミニ, TAITEC) を組み立て、転写を室温で一晩行った。

(c) Hybridization

(1) 注意深くブロッキング装置を取り外し、ハイブリダイゼーション用メンブレンとゲルが密着している状態で、試料添加した well のレーン位置をメンブレン上にボールペン (細書用) でマークした (マーク側に RNA が転写されている)。

(2) 5 × SSC で 5 min 洗い、3MM フィルターペーパーで軽く水分をきり、乾熱滅菌したアルミニウムフォイル上に RNA 面を上にして置き、GS Gene Linker UV チャンバー (Bio-Rad, C-3 damp membrane の条件, 150 mJoules, ~60 sec) で UV-crosslinking を行った。

(3) RNA Markers (0.28~6.58 kb, G3191, Promega) を泳動させたレーンを新品の鋭利なカッターで切り取り、そのメンブレンストリップ小片を先のアルミフォイルに挟んで、ひとまず保管した。以降の実験操作の合間に、RNA 染色を行った (後述 (e) の項目を参照)。

(4) ハイブリダイゼーション用バッグに残りのメンブレンを入れ、20~25 ml の Prehybridization solution† を加えて、68~70°C で 3 hr 振盪させた (20 ml / メンブレン 100 cm²)。気相インキュベータ (Multi-Shaker Oven HB, TAITEC) を使用した。

* 10% (w/v) N-lauroyl sarcosine sodium salt (Fluka 61743)

- filtrate through Millex-GV 0.22 µm

**10% (w/v) SDS : strong inhibitor of RNase and DNase, not necessary to sterilize

- filtrate through Millex-GV 0.22 µm

¶ **Blocking Reagent stock solution** (10% solution; 50 ml × 2 bottles) :

-dissolve 10 g Blocking Reagent (Boehringer 1096 176, vial 11)

in 100 ml Maleic acid buffer*** with several 30 sec heat pulses in the microwave

-50 ml aliquots, then add 50 µl DEPC, mix well at 37°C (2~3 hr)

-autoclave at 121°C for 30~40 min

Note; Blocking Reagent must be completely in solution before autoclaving.

Store at 4°C until you need (check before each use for contamination)

- add D.W. 950 ml

- add solid NaOH >40 grains until pH ≈ 6.5

- adjust pH to 7.4~7.5 carefully with 2 M NaOH (ほぼ 1 L)

- add 1ml of DEPC, mix well overnight (or at 37 °C for 2~3 hr)
- autoclaving 121°C, 30~40 min

(5) -20°C に保存してある RNA プローブを沸騰水浴中で、10 min 熱変性させた。

(6) Prehybridization solution をハイブリダイゼーション用バッグから回収し（再利用可）、直ちに RNA プローブを加え、泡をなるべく取り除いて密封し、68~70°C で一晩振盪させた。

(7) バッグを開封して、RNA プローブを回収する（冷えてから -20°C に保存）。メンブレンは直ちに 2× Wash solution（2× SSC, 0.1% SDS）を入れた乾熱滅菌したシャーレ（直径 15 cm）へ移し、室温で 15 min 振盪洗浄した（洗浄液量は、最低 50 ml / メンブレン 100 cm²）。

(8) 2× Wash solution* での 15 min 洗浄（室温）をさらに 2 回繰り返した。

(9) 0.5× Wash solution** (0.5× SSC, 0.1% SDS) での 15 min 洗浄 (68 - 70°C) を 3 回行った。

(10) 0.1× Wash solution*** (0.1× SSC, 0.1% SDS) での 15 min 洗浄 (68~70°C) を 3 回行った。

2× Wash solution*		0.5× Wash solution**		0.1× Wash solution***	
20× SSC	20 ml	20× SSC	5 ml	20× SSC	1 ml
10% SDS	2 ml	10% SDS	2 ml	10% SDS	2 ml
DEPC-H ₂ O	78 ml	DEPC-H ₂ O	193 ml	DEPC-H ₂ O	197 ml

(d) 発色反応によるシグナルの検出

（以下の操作は特に断らない限り室温で実施）

(1) メンブレンを Washing buffer† で 3 min 平衡化させた。

† Washing buffer : Maleic acid buffer	200 ml
0.3% (w/v) Tween 20	3 ml of 20% Tween 20

(2) 新しいバッグの中にメンブレンを入れ、Blocking solution†† を 30 ml 入れて封じ、2~3 hr ゆっくりと振盪させた（100 ml Blocking solution / メンブレン 100 cm² の割合が望ましい）。

†† Blocking solution : 1% (w/v) Blocking reagent/Maleic acid buffer	
Blocking Reagent stock solution*	5 ml
Maleic acid buffer*	45 ml

(3) 上記 (2) の操作中に、4 μl の Anti-DIG-ALP¶ を 20 ml の Blocking solution†† に加えて、穏やかに混合させ、1 / 5000 希釈の Working solution を作製した。

¶ Anti-DIG-ALP : 750 units/ml Anti-Digoxigenin Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase, polyclonal sheep (Boehringer mannheim 1093 274 or Vial 8)

(4) 開封して Blocking solution†† を回収し、その同じバッグへ、1 / 5000 希釈の Working solution（Anti-DIG-ALP, 150 mU/ml）を加え、30 min 穏やかに振盪させた。（20 ml Working solution / メンブレン 100 cm² の割合）

(5) 開封して Working solution を回収し（1~2 週間は冷蔵庫で保存可能）、抗原抗体反応の終わったメンブレンは、約 100 ml の Washing buffer の入ったシャーレ（直径 15 cm）へ移して振盪させて、15 min 洗浄した。同様の洗浄をさらに 2 回行った（3× 15 min）。

(6) 新しいバッグへ洗浄の終わったメンブレンを移し、30 ml の Detection buffer††† で 3 min 平衡化させた（端は溶液が漏れないようにハンドクリップで止めた）。

†††Detection buffer : 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 9.5)

1 M Tris-HCl (pH 9.5)*	5 ml
5 M NaCl**	1 ml
DEPC-H ₂ O (古くてもよい)	44 ml

*1 M Tris-HCl (pH 9.5) : アルカリ性緩衝液なので一度に大量に作らない!!

Tris	12.11 g
DEPC-H ₂ O	90 ml

-add ca. 1 ml of 6 M HCl make up to 100 ml

-store at 4°C with 25 ml aliquots (4 tubes)

**5 M NaCl (500 ml, DEPC 処理不要)

$58.44 \times 5 \times 0.5 = 146.1$ g, make up to 500 ml

- autoclaving at 121°C for 20~30 min

(7) 上記, (5)(6) の間に, Color substrate solution†を調製した。

†Color substrate solution :

NBT/BCIP stock solution (Roche 1681 451)	200 μ l
Detection buffer	10 ml

(8) Detection buffer を捨て, Color substrate solution (全量 10 ml) を加えてバッグを封じ, 暗黒下 (室温) にバッグを静置し, 12~16 hr 反応させた。

(9) バッグを開封し, Color substrate solution を捨て, 通常の蒸留水で充分 (100 ml, 5 min, 4 回) に洗浄した後, 濾紙上で風乾し, 遮光して保管した。

(e) RNA Markers の染色

(1) シャーレ (直径 15 cm) で市販の 100% 酢酸 (=水酢酸) を 1/10 希釈して, 5% 酢酸を 50 ml 作製した。メンブレンストリップ小片を浸し, 室温で 15 min, 緩やかに振盪させた。

(2) 5% 酢酸を捨て, 0.04% メチレンブルー / 0.5 M 酢酸ナトリウム††を加えて, 室温で 10 min, 緩やかに振盪させた。

(3) 蒸留水でマーカースのバンドを確認できるまで注意して脱色した。濾紙上で風乾後, RNA マーカーのバンドの位置にボールペンで印をつけ保管した。

†† 0.5 M sodium acetate (pH 5.2) including 0.04% methylene blue

3 M sodium acetate (pH 5.2, RNA 用)	10	ml
DEPC-H ₂ O	50	ml
methylene blue	0.024	g

カイコAQPに対する特異抗体の作製

クローニングされた 3 種類のカイコAQPs (*Bombyx* AQPs : AQP-Bom1, AQP-Bom2, AQP-Bom3) より推定されたアミノ酸配列中の 20 アミノ残基に対する抗ペプチド抗体で, ウサギ及びマウスを免疫し作製した。AQP-Bom1, AQP-Bom2 は AQP のループDドメイン, AQP-Bom3 はウサギとマウス, それぞれで, C 末端近傍 (ウサギ) と N 末端から 40 アミノ酸残基程度 (マウス) の部位で作製した (Fig. 2)。

抗血清からの IgG 分画の精製

Western blotting 法, 免疫組織化学などの検出に用いられる抗体は抗血清, または抗 IgG 抗体である。抗原と反応するのは IgG であり, それ以外の血清成分は非特異的結合の原因となりうる。そこで使用抗体は特に明記のない場合, 精製 IgG を用いた。抗体精製には IgG の定常部と特異的に結合する Protein A, または Protein G (IgG Purification Kit Protein A または Protein G, GE Healthcare) を用い, 以下の操作はキットの説明書によった。

- (1) 1つのサンプルにつき、30 μ l の neutralizing buffer を加えた 2 ml チューブを 2 本用意した。
- (2) Kit のカラム内のメディウムを転倒混和で懸濁したあと、カラムのキャップとボトムキャップを外して新しい 2 ml チューブにセットし、100 g で 30 sec 遠心して保存液を排除した。
- (3) 600 μ l の binding buffer をカラムに加え、100 g で 30 sec 遠心した。
- (4) IgG サンプル溶液 100 μ l に binding buffer 100 μ l を加え 2~3 回ピペッティングして混合した。
- (5) 操作後のサンプル溶液を Protein A カラムまたは Protein G カラムに全量加えた。
- (6) 両方キャップを閉め、シーソーで約 10 min、穏やかに混和し溶液とゲルをよく混合させ、キャップを閉め、100 g で 30 sec 遠心した。
- (7) 600 μ l の binding buffer を加え 100 g で 30 sec 遠心した。その後、600 μ l の binding buffer を加え 100 g で 30 sec 遠心した。
- (8) Elution buffer を 400 μ l カラムに加え、キャップをして転倒混和しメディウムと混合させた。
- (9) キャップを外した後、(1) で用意した 2 ml のチューブにカラムを移し、70 g で 30 sec 遠心し、ろ液を回収した。
- (10) カラムに elution buffer を 400 μ l 加え、キャップをして転倒混和し、キャップを外した後、(1) で用意したもう 1 本の 2 ml チューブにカラムを移し、70 g で 30 sec 遠心し、ろ液を回収した。
- (11) 回収ろ液（精製 IgG 溶液）に最終濃度が 0.1% となるよう NaN_3 を加え、0~5°C で保存した。

Western blotting

(a) ショ糖密度勾配遠心によるオルガネラ調製

幼虫を氷冷麻酔した後、0.3 M Mannitol, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES : pH 7.5 緩衝液[†]で解剖し、結腸 (Colon : Cln) , 直腸 (Rectum : Rec) , マルピーギ管 (Malpighian tubules : MT) を摘出した。また使用したピンセット・眼科用ハサミなどの器具は特に滅菌処理をしていない。

なお、手順を概略示した (Fig. 3) 。

[†]0.3 M Mannitol, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES : pH 7.5 緩衝液

1 \times EH buffer...100 ml の 10 \times EH buffer^{††}に 900 ml の D.W. を加えた。

*この際、54.65 g の Mannitol を加えた。

^{††}10 \times EH buffer

EDTA-Na₂ 18.612 g

HEPES 23.831 g

-上記の試薬を 900 ml の D.W. に加え、一晚攪拌した。

pH メーターで pH を計測し、

NaOH 溶液を用いて pH 7.5 に調整した。

- D.W. を加え、1000 ml とした。

- (1) 解剖の際に使用した緩衝液 10 ml に対して protease inhibitor cComplete Tablets, Mini EDTA-free, *EASYPack* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を 1 錠加えたものを、摘出した組織の 10 倍量 (w/v) となるように加えた。

(2) ホモジナイザーにペッスルを取り付け、対応する外套を用いて、1,500 rpm の回転速度により組織を磨砕し、10 倍量ホモジェネートを作製した。その後あらかじめ緩衝液で湿らせた 4 重のガーゼでろ過し、10 ml のメスシリンダーに受けた。続いて 4 本のチューブにおおよそ均等となるように分取し、CA-4HS ローター（トミー精工）で 1,000 g, 10 min, 4°C で遠心を行い、回収した上清をさらに RP65T ローター（日立工機株式会社、東京）で 100,000 g, 90 min, 4°C で遠心し、pellet を得た。

(3) 上で得た pellet をホモジェネート作製に使用した緩衝液を適量（1 つの pellet につき 500 μ l 程度を目安とした）用いて懸濁し、ショ糖密度勾配遠心法に供した。

(4) 懸濁に使用した緩衝液にショ糖を 50, 40, 30, 20% の濃度となるように溶解し、各種濃度のショ糖溶液を作製した。続いて 12PA チューブにそれぞれの界面を乱さないように留意しながらパスツールピペットを用いて 50% は 2.5 ml, 40, 30, 20% は 2.7 ml ずつ重ね、20% のショ糖溶液を重ねた後に懸濁した sample（約 1 ml）を重ねた。

(5) RPS40-T スイングローター（日立工機）を用いて 27,500 rpm（93,900 g），18 hr, 4°C で遠心を行った。

(6) それぞれバンド状に現れた各分画を上から順に Band 2, Band 3 ... とし、パスツールピペットを用いて分画が混ざらないように留意しながら分取した。

(7) 分取した分画はマイクロピペットを用いてよく懸濁し、200 μ l ずつ 0.5 ml PCR チューブに分注した。

(8) 上記で得たそれぞれのショ糖溶液分画を -30°C に凍結保存、もしくは直ちに以下の実験に供した。

(b) 総タンパク量の定量

(1) ショ糖溶液分画を 1 \times EH Buffer で 1/5~1/10 倍に希釈し、以下の実験に使用した。あらかじめ Dye Reagent を冷蔵庫から出し、室温に戻しておいた。

(2) 対照区として pellet の懸濁とショ糖溶液の希釈に使用した 1 \times EH Buffer を用い、20 μ l に対して 1 ml の Dye Reagent（Quick Start Protein assay, Bio-Rad）を加えて 2~3 検体作製した。ボルテックスした後、5 min 程度室温でインキュベートし、測定波長 595 nm で測定した中からもっとも低い値を示す 1 検体で 0 補正を行い、以後の測定に用いた。

(3) アッセイに付属していた 0.125~2 mg/ml までの IgG スタンダード 20 μ l にそれぞれ 1 ml の Dye Reagent を加えたものを 2~3 検体用意し、それらを標準として検量線を引いた。なお検量線を引く際に使用する値はそれぞれのスタンダードにおける平均値を採用した。

(4) 希釈した懸濁液を 20 μ l ずつ取り、1 ml の Dye Reagent を加えたものを 2~3 検体用意しそれぞれの吸光度を測定した。この値が検量線範囲を超えた場合は再度希釈し測定を行った。

(5) 検量線からそれぞれの懸濁液に含まれるタンパク量を算出し、以下の実験に使用した。

(c)SDS-PAGE

主に Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (12%, Bio-Rad) を使用した。また必要に応じ、以下の Protocol に従い、ゲルを作製した。なお、ゲルの作製に必要な各溶液は以下のように調製した。また電気泳動と転写用に使用する緩衝液 (Electrophoresis buffer : EP buffer) の組成も以下に示した。

††Acrylamide monomer (30%)

-Acrylamide 30 g

-Bisacrylamide 0.8 g

-上記の試薬に~80 mlの D.W. に加え、一晩攪拌した。

D.W. を加え、100 mlとした。

††4 × Running Buffer

-Tris 18.17g に D.W. を加え、一晩攪拌。

-HCl (6N) で pH 8.8 に合わせ、

D.W. を加え、100 mlとした。

††4×Stacking Buffer

-Tris 6.057 g に D.W. を加え、一晩攪拌。

-HCl (6N) で pH 6.8 に合わせ

D.W. を加え、100 mlとした。

SDS-PAGE (12%) - 2 枚作製時-

Separating gel	Stacking gel	
Acrylamide monomer (30%)	8.0 ml	Acrylamide monomer (30%) 1.0 ml
D.W.	6.7 ml	D.W. 6.3 ml
4 × Separating (Running) Buf.	5.0 ml	4 × Stacking Buf. 2.5 ml
10% APS (Ammonium persulfate)	100 µl	10% APS 100 µl
10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)	200 µl	10% SDS 100 µl
TEMED (tetramethylethylenediamine)	10 µl	TEMED 10 µl
Total	20.01 ml	Total 10.01 ml
10 × EP buffer (without SDS)		
Tris-base	30.25 g	
Glycine	144.14 g	
D.W.	1000 ml	
1 × EP buffer (SDS including)		
Transfer buffer (15% methanol)		
10 × EP buffer (without SDS)	100 ml	10 × EP buffer (without SDS) 100 ml
10% SDS	10 ml	Methanol 150 ml
D.W.	900 ml	D.W. 750 ml

懸濁液を同量の 2 × SDS Sample Buffer*と混合し、37°C, 60 min の加熱処理を行った。その後、レーンに20 µg または 50 µg のタンパク量をゲルへロードし、50V の定電圧で電気泳動を行い、separating gel に色素が入った段階で電圧を上げ、ゲルの下端 5 mm 程度まで色素が流れたところで泳動を止めた。

*2 × SDS Sample Buffer

Stock solution**

2-mercaptoethanol

10% SDS

Total

2.5 ml

0.5 ml

2.0 ml

5.0 ml

**Stock solution

BPB (Bromophenol blue)

Glycerol

4 × Stacking Buf.

上記に D.W. を適量加えて 50 ml に合わせた。

#Stock solution と 2 × SDS Sample Bufferは冷蔵保管する。

10 mg

20 mg

25 ml

(d) 転写と抗原抗体反応, 検出

(1) 主に Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (Bio-Rad) を使用した。Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels を泳動に使用した際は泳動終了後直ちに Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) で転写を行い、プロトコールは装置の 1 MINI TGX (Turbo) によった (最大 25V, 2.5A, 3 min)。

(2) 自作のゲルを泳動に使用した場合、最低 30 min は Transfer buffer にゲルを浸漬し、ゲルの平衡化と SDS の除去を行った。通常は 1 hr 処理を行い、15 min 経過毎に Transfer buffer を交換した。その間にゲルの大きさに合わせて PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride, GE Healthcare) を切り、100% メタノールに 1 min、D.W. に 5 min 浸した後、Transfer buffer に浸して親水処理を行った後、使用するまで Transfer buffer 中に静置した。また転写に使用する極厚フィルターペーパー (Bio-Rad) もゲル 1 枚につき 2 枚をあらかじめ Trans buffer に浸しておいた。その後、30 min、25V の定電圧でゲルから PVDF 膜にタンパク質を転写した。

(3) 転写後の PVDF 膜を PBS-T (Phosphate buffered saline-0.05% (w/v) Tween 20 を含む) で 2~3 回洗浄し、後の抗原抗体反応で非特異的な結合を防ぐために、PBS-T で 5% に希釈した Membrane Blocking Agent (GE Healthcare) で 2~3 hr、ブロッキングを行った。

(4) 3% BSA (PBS で希釈, SIGMA-ALDRICH Co., MO, USA) で 1/1,000~1/5,000 に希釈した *Bombyx* AQPs (AQP-Bom1, AQP-Bom2, AQP-Bom3) に対する抗 IgG を一次抗体として PVDF 膜を浸し、冷蔵庫中 (4°C) に一晩静置、またはシーソーで振盪した。

(5) PBS-T で 10 min 程度、3~4 回洗浄し、一次抗体であるウサギ抗体を抗原として認識する抗ウサギ抗体 (1/10,000 rabbit antibody in PBS-T, GE Healthcare) を二次抗体として、2~3 hr PVDF 膜を浸した。なお、使用する分子量マーカーの種類によって、検出に必要な試薬を添加した (ECL DualVue Western Blotting Markers を使用する際は、1/10,000 倍希釈となるようにキット付属の S-protein-HRP を添加、ECL Protein Molecular Weight Markers with Strep-HRP を使用する際はキット付属の HRP 標識ストレプトアビジンを 1/5,000 倍希釈となるように添加、共に GE Healthcare)。

(6) PBS-T で PVDF 膜を 10 min 程度、3~4 回洗浄し、この間に冷蔵庫から取り出して常温に戻しておいた Detection Reagent (GE Healthcare) の Reagent 1 と Reagent 2 を同量混合し、PVDF 膜表面が十分覆われるように混合液をかけ、1 min 室温で静置しイメージアナライザー (富士フイルム, 東京) で化学発光による検出を行った。

(7) 検出後の PVDF 膜は膜上に残った検出試薬を除くため 1~2 回、PBS-T で軽く洗浄したあと、新しい PBS-T で満たしたタッパーに入れ、冷蔵庫内に保管した。その後、必要に応じて以下の Stripping & Reprobing 処理を行った。

Stripping and Reprobing

(a) メンブレンからの検出試薬および抗体の除去

(1) あらかじめエアークューバーを 50°C となるように設定し、以下の操作を行った。

(2) Stripping buffer を作製し、50°C に設定しておいたエアークューバー内に 30~60 min 程度静置した。なお Stripping buffer[#] は以下の組成を用い、調製した。

# Stripping buffer	
2-mercaptoethanol	0.625 g
4 × Stacking Buf.	10 ml
10% SDS	16 ml
D.W.	54 ml
Total	80 ml

(3) Stripping buffer が十分に温まったら、PVDF 膜が浸る程度、Stripping buffer を加え、エアークューバー内で 20 min、穏やかに振盪させながら反応させた。

(4) その後、PVDF 膜から Stripping buffer を除き、さらに残った Stripping buffer を除くために PBS-T で洗浄を行った。(10 min, 3~4 回)

(5) 以下、ブロッキングから検出までは通常の Western blotting 法と同様の処理を行った。

免疫組織化学

(a)組織の固定・脱水・パラフィン包埋

(1) 滅菌済みプラスチックシャーレ (直径 6 cm, FALCON®3002, Corning) に Bouin 固定液 (飽和ピクリン酸[†]:ホルマリン:酢酸=15:5:1, 容量比, 解剖当日混合する) を入れ, あらかじめ氷冷下に置いた。

[†]ピクリン酸 (和光特級) の粉末を適量 200 ml サイズのガラス容器へ入れ, 蒸留水を 100-150 ml 程度加え, よく混合溶解させる。しばらく静置するとガラス容器底面に不溶のピクリン酸を観察することが出来る。室温で暗所に 2~3 日静置させる。黄色で透明な溶解したピクリン酸を使用する。

(2) 後腸を摘出する際は, 15~30 min 氷冷下に静置し麻酔した 5 齢幼虫を解剖皿にピンで固定し, 組織を傷つけないように注意しながら皮膚を切り開き, それぞれの部位を取り出した後に Bouin 固定液の入ったシャーレに移し, 固定を進行させた。その後, 組織を傷つけないように留意しながら新しい Bouin 固定液の入ったシャーレへと移した。

¶以降, 包埋操作終了まで試料を順次移し換える操作において, 組織を損傷させないよう細心の注意を払った。

(3) 固定液中で 30~60 min 程度経過したら, 新鮮な Bouin 固定液に移し換えた (ガラス製の透明なサンプル瓶を使用, 20~30 ml 容程度のサンプル瓶)。Bouin 固定液の液量は, 組織容 (tissue mass) の 20 倍以上を目安とした。

(4) 新しい Bouin 固定液へ移し換えたら, アスピレーターで軽く脱気して, 組織内部への Bouin 固定液の浸透を確実なものにさせた。氷冷下で 5~6 hr 静置した。1~2 hr に 1 回程度, 固定用瓶を軽く手で回して, Bouin 固定液を穏やかに攪拌した。

(5) 余った未使用の Bouin 固定液が残っている場合には, 固定開始後 3~4 hr 経過した頃に, 新しい Bouin 固定液と交換した。Bouin 固定が進行すると組織は瓶の底面に沈みやすくなるので, Bouin 固定液の交換はデカンテーションで容易に可能である。また, 以降の EtOH 系列による脱水操作でも, EtOH の交換はガラス容器を換えるのではなくて, デカンテーションによって行い, ピンセットで組織自体を傷つける可能性を最大限避けた。

(6) 固定後, 組織試料は, 70% EtOH, 90% EtOH でそれぞれ 30 min ずつゆっくりと振盪 (ローテーターを使用) させながら段階的に脱水処理した。90% EtOH をさらにもう 2 回交換し, 固定した組織を 90% EtOH 中で冷蔵庫に一晩静置した。

(7) 翌日, 再び新しい 90% EtOH (30 min) → 99.5% EtOH (30 min) → 100% EtOH[†] (30 min, 2 回) と EtOH による脱水を進めた。[†]市販の 99.5% EtOH の入ったボトル (500 ml サイズ) へ十分に乾燥させた Molecular Sieve を加えた。

(8) Xylene に浸透 (30 min, 2 回) させた。なお, 1 回目の Xylene へ入れた際にアスピレーターで 5 min 程度脱気した。

(9) あらかじめ 60°C に保たれた恒温器内で前日から溶解させてある Histosec® pastilles (without DMSO, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 中に脱水した組織を 30~60 min 浸漬した。

(10) 別の容器に溶解させてある Histosec® へ固定組織を傷つけないよう注意して移し換えることをさらに 2 回行い (30~60 min, 2 回), パラフィンの固定組織内への浸透を完全なものとした。

(11) 3 回の Histosec® への浸透後, その組織試料を新しい Histosec® 中になるべく組織の方向性分かるように包埋し, 室温で静置し, 固定させた。すぐに実験に用いることはせず, 冷蔵庫内で保存し, 切片作製の前日に台木にブロックを接着させた。

(b)パラフィン切片の作製と脱パラフィン操作

(1) パラフィンに包埋された組織はその方向性、組織の部位に留意してトリミングし、包埋組織周辺のパラフィンを少し溶解させ、木製の台木に接着させた（切片作製の前日に行い、冷蔵保存してブロックを十分に冷やしておく）。

(2) 回転式マイクローム（大和光機工業株式会社, 埼玉）を用いて、台木に取り付けた包埋組織ブロックから厚さ約 5 μm の連続切片を作製した。パラフィン伸展器を 40°C に設定し、あらかじめ蒸留水を滴下しておいた新品のスライドガラス（APS コート付き, 松浪硝子工業株式会社, 大阪）上に、その連続切片をシワが出来ないように注意して浮かべた。

(3) スライドガラス上の切片は、フロスト部分を上とするならスライドガラス中央からやや下よりに整然と並べ、十分に伸展させた。パラフィン伸展器を 40°C に保ち、一晩静置して乾燥させた。

(4) 翌日、切片を展着させたスライドガラスをステンレス製の染色カゴにセットして脱パラフィン操作を行った。脱パラフィン操作は以下の流れで行った。Xylene (15min, 2 回) \rightarrow 99.5% EtOH (15 min, 2 回) \rightarrow 90% EtOH (D.W. で調製, 15 min) \rightarrow 70% EtOH (D.W. で調製, 15 min) と、各々のステップでスライドガラスを段階的に浸漬し、脱パラフィン処理した。脱パラフィン処理後、抗原抗体反応への前処理としてスライドガラスを D.W. (5 min, 3 回) \rightarrow PBS (5 min, 3 回) に浸した。

(c)抗原抗体反応

(1) 抗血清から精製した IgG を、あらかじめ PBS によって希釈した 10% 正常ヤギ血清（Vector Laboratories Inc., CA, USA）によって、100~1,000 倍程度に希釈したものを作製しておく。

(2) 抗 AQP 抗体の非特異的結合を防ぐ為に、10% 正常ヤギ血清をスライドガラスの切片上に滴下し、約 3 hr 室温で保湿容器内に静置した。

(3) スライドガラス上の 10% 正常ヤギ血清を出来るだけ取り除いた後、切片上にあらかじめ希釈して作製した抗体を滴下し、保湿容器内に並べ冷蔵庫内で一晩静置し、抗原抗体反応を行った。なお対照実験には AQP 抗体の代わりに 10% 正常ヤギ血清で 2,000~3,000 倍に希釈した正常ウサギ血清を滴下して上記と同様に操作した。

(4) 保湿容器を冷蔵庫から取り出して実験台へ置き、室温になるのを待つ（15~20 min）。検出には蛍光または発色を用い、発色によって検出する際は同時に発色反応で用いる VECTASTAIN®Elite ABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) キット（Vector Laboratories Inc.）も冷蔵庫から出した。

(5) 切片上に添加した抗体を捨て、スライドガラスを添加した抗体別に、PBS を入れた染色壺（Wide-size）へ移し、過剰な抗体を除去するための洗浄を行った（10 min, 3 回）。

* 発色検出の際は PBS 洗浄の間、ABC キットの調製法に従って使用試薬を調製した。

(6) PBS 洗浄を終えた切片上に蛍光検出では蛍光化抗ウサギ二次抗体または抗マウス二次抗体 (Alexa Fluor, Molecular probes®, OR, USA) を、発色検出ではビオチン化された抗ウサギ二次抗体 (biotinylated anti-rabbit secondary antibody) を滴下し、室温で 2~3 hr, 保湿容器内で静置し、AQP 抗体へ二次抗体を結合させた。

* 蛍光検出はこの行程後 PBS で洗浄（10 min, 3 回）し、専用の封入剤で封入して一晩静置した。

(7) 二次抗体を捨て、PBS を入れた染色壺へスライドガラスを移し十分な洗浄（10 min, 3 回）を行った後、ABC 溶液を滴下して、室温で 1.5~2 hr 保湿容器内で静置した。

キットの説明書で、ABC 試薬は 5 ml の PBS に対して試薬 A および試薬 B をそれぞれ 2 滴ずつ加えるが発色反応が充分得られる場合、10 ml の PBS に対してそれぞれの試薬を 2 滴ずつ加えて調製した。

(8) ABC 溶液を捨て、PBS を入れた染色壺で洗浄した（10 min, 3 回）。この洗浄中（3 回目の洗浄中）にペルオキシダーゼの発色反応試薬[¶]（DAB 溶液）を調製し、暗所に保管した。

¶0.01% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) , 0.01% H₂O₂, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)

0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) 25 ml

D.W. 25 ml

10 mg/ml DAB[†] 500 µl

30% H₂O₂^{††} 16.6 µl

[†]0.1 g DABを10 mlの蒸留水に溶解させ、500 µlずつ分注し凍結保存する。

^{††}市販の30% 過酸化水素水を1.5 mlのスクリュウチューブに小出しにして冷蔵庫に置く。

(9) 専用の染色壺へ、切片が完全に浸かる程度のDAB溶液を入れておいた（スライドガラスのラベル位置・フロスト部分まで入れないように注意した）。

(10) PBSで洗浄したスライドガラスを発色反応液中に浸漬し、まず5 min反応させた。別の染色壺に水道水を入れておき、5 min経過後、その水道水入りの染色壺の中へスライドガラスを移し、反応を一旦止めて、発色反応の進行具合を光学顕微鏡下で観察した。

カバーガラスをかけないで観察するので、切片表面を乾燥させないように注意しながら観察をすること。

(11) 反応が不十分であれば、再び発色反応液中に戻し、バックグラウンドの発色が過剰にならないように途中、観察しながら室温で反応させた（最長20 minまでとした）。対照染色（正常血清または吸収抗体実験区）は特異抗体染色実験区と同時に反応させた。

(12) 水道水の入った染色壺にスライドガラスを浸漬することによって発色反応を止め、発色反応液を除去する為にさらに水道水を2回交換して洗浄した。

(13) Hematoxylin QS（Vector Laboratories Inc.）を使用して対比染色を行った。切片上にHematoxylin QSを滴下して2~3 sec後、素早く液を切り、水道水の入った染色壺にスライドガラスを浸漬した。

(14) 水道水の入った染色壺を3個用いて、スライドガラスを順次移すことによって切片を洗浄した（5 min, 3回）。最後に蒸留水の入った染色壺へ移した。

(15) 封入するための脱水処理を行った（封入専用の染色壺を準備し、それぞれの液量は展着している切片が浸かる量でよい）。スライドガラス両面の水分を切片の展着面側に特に留意してキムワイプを用いて出来るだけ除去し、70% EtOH（5 min）→90% EtOH（5 min）→100% EtOH（5 min, 3回）→Xylene（5 min, 2回）の各溶液に段階的に浸漬した。

(16) 脱水処理したスライドガラスをキムワイプ上に並べ、1枚ずつ封入剤：Mikroskopie ENTELLAN[®] neu（Merck KGaA）を1~2滴ずつ滴下し、カバーガラス（Thickness NO.1, 0.12~0.17 mm, 松浪硝子工業）によって封入した。展着している切片の量（面積）に応じて適正なサイズ（24×36, 24×40, 24×45, 24×50 mm）のカバーガラスを使用した。

(d)光学顕微鏡による観察

封入した検鏡試料は、光学顕微鏡（BX51, オリンパス株式会社, 東京）を用いて明視野像下で観察した。顕微鏡観察の結果は、光学顕微鏡へ連結させたデジタルカメラシステム（DP70, オリンパス）で記録し、コンピューターへ取り込まれた画像はAdobe[®] Photoshop[®] CS4によって処理した。

Bom3 -----MGELGTLGLDELDTGGAATISRALLAEFIGNLLLNLF~~CGC~~~~GAC~~ 42
 Bom1 -----MATKTTEKTSSIIGLSDVTDNKL-IWRQLVAELVGTFL~~LSI~~~~GV~~~~AAC~~ 46
 Bom2 MTVSATNPQSVIEVIENKVRSDVSQASGCRAMYAWCYEWRQIVSEFISTL~~LLLV~~~~F~~~~C~~~~MAC~~ 60

I

~~V~~~~K~~~~I~~~~S~~~~L~~~~E~~~~S~~~~N~~~~S~~~~E~~~~T~~~~D~~~~I~~~~L~~~~L~~~~I~~~~A~~~~L~~~~A~~~~F~~~~G~~~~L~~~~A~~~~V~~~~F~~~~A~~~~A~~~~V~~~~S~~~~A~~~~I~~~~G~~~~H~~~~I~~~~S~~~~C~~~~G~~~~H~~~~L~~~~N~~~~P~~~~A~~~~V~~~~T~~~~A~~~~G~~~~M~~~~L~~~~C~~~~T~~~~G~~~~R~~~~I~~~~K~~~~L~~~~I~~~~R~~~~A~~~~V~~~~L~~ 102
 ITINASTAPHTTS--IALCFGLLVGSIVQGI~~GHV~~~~SC~~~~GH~~~~I~~~~N~~~~P~~~~A~~~~V~~~~T~~~~A~~~~G~~~~L~~~~F~~~~A~~~~A~~~~G~~~~D~~~~I~~~~K~~~~L~~~~L~~~~K~~~~A~~~~I~~~~F~~ 104
 IP-HAGYLPQPPY-YGALGFGLVVSFNVQIF~~GH~~~~I~~~~S~~~~G~~~~A~~~~H~~~~M~~~~N~~~~P~~~~S~~~~V~~~~T~~~~L~~~~A~~~~S~~~~L~~~~I~~~~W~~~~G~~~~A~~~~I~~~~S~~~~F~~~~P~~~~L~~~~A~~~~I~~~~A~~ 118

II

YVIV~~C~~~~A~~~~G~~~~A~~~~A~~~~G~~~~S~~~~G~~~~L~~~~L~~~~K~~~~A~~~~L~~~~T~~~~P~~~~D~~~~R~~~~M~~~~A~~~~G~~~~S~~~~L~~~~G~~~~T~~~~G~~~~L~~~~G~~~~V~~~~D~~~~V~~~~T~~~~E~~~~L~~~~O~~~~G~~~~F~~~~G~~~~I~~~~E~~~~F~~~~F~~~~L~~~~G~~~~F~~~~L~~~~V~~~~F~~~~I~~~~V~~~~C~~~~G~~~~V~~ 162
 YIVV~~Q~~~~S~~~~L~~~~G~~~~A~~~~V~~~~A~~~~G~~~~A~~~~A~~~~F~~~~I~~~~R~~~~L~~~~A~~~~I~~~~P~~~~A~~~~D~~~~S~~~~I~~~~G~~~~G~~~~F~~~~G~~~~M~~~~T~~~~L~~~~P~~~~G~~~~P~~~~V~~~~T~~~~E~~~~A~~~~Q~~~~A~~~~V~~~~L~~~~V~~~~E~~~~A~~~~L~~~~I~~~~T~~~~F~~~~V~~~~I~~~~V~~~~M~~~~V~~~~M~~~~G~~~~V~~ 164
 FIVA~~Q~~~~C~~~~A~~~~G~~~~A~~~~I~~~~L~~~~G~~~~Y~~~~G~~~~L~~~~L~~~~I~~~~A~~~~V~~~~S~~~~H~~~~I~~~~D~~~~M~~~~D~~~~G~~~~V~~~~C~~~~M~~~~T~~~~L~~~~P~~~~R~~~~T~~~~E~~~~I~~~~T~~~~L~~~~F~~~~Q~~~~A~~~~L~~~~I~~~~V~~~~E~~~~A~~~~V~~~~L~~~~T~~~~A~~~~A~~~~S~~~~F~~~~L~~~~N~~~~C~~~~A~~~~C~~ 177

III

IV

~~C~~~~D~~~~A~~~~N~~~~K~~~~P~~~~D~~~~S~~~~K~~~~A~~~~T~~~~A~~~~P~~~~L~~~~A~~~~I~~~~G~~~~L~~~~T~~~~V~~~~T~~~~L~~~~G~~~~H~~~~L~~~~L~~~~A~~~~V~~~~D~~~~Y~~~~T~~~~G~~~~S~~~~A~~~~M~~~~N~~~~P~~~~A~~~~R~~~~S~~~~F~~~~G~~~~S~~~~A~~~~L~~~~V~~~~A~~~~S~~~~N~~~~W~~~~S~~~~H~~~~H~~~~W~~~~I~~~~Y~~~~W~~~~A~~~~G~~~~P~~ 222
~~C~~~~D~~~~P~~~~O~~~~R~~~~N~~~~D~~~~L~~~~K~~~~G~~~~S~~~~A~~~~P~~~~L~~~~A~~~~I~~~~G~~~~L~~~~S~~~~I~~~~T~~~~A~~~~C~~~~H~~~~A~~~~A~~~~V~~~~I~~~~P~~~~F~~~~T~~~~G~~~~S~~~~S~~~~M~~~~N~~~~P~~~~A~~~~R~~~~T~~~~F~~~~G~~~~P~~~~A~~~~L~~~~V~~~~I~~~~G~~~~N~~~~W~~~~T~~~~S~~~~Q~~~~W~~~~Y~~~~W~~~~V~~~~G~~~~P~~ 224
~~W~~~~D~~~~P~~~~V~~~~N~~~~K~~~~N~~~~Q~~~~D~~~~S~~~~V~~~~P~~~~V~~~~K~~~~F~~~~G~~~~L~~~~A~~~~I~~~~A~~~~G~~~~L~~~~S~~~~I~~~~A~~~~G~~~~G~~~~P~~~~L~~~~T~~~~G~~~~A~~~~S~~~~M~~~~N~~~~P~~~~A~~~~R~~~~S~~~~L~~~~G~~~~P~~~~A~~~~L~~~~W~~~~T~~~~G~~~~I~~~~W~~~~T~~~~G~~~~H~~~~W~~~~Y~~~~W~~~~V~~~~G~~~~P~~ 237

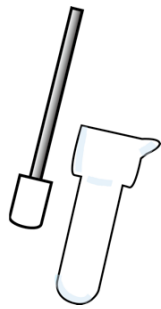
V

IAGGIAGALLYVHGFTAPPQEPPTRYRSVAGDEKELKRLDGGKLD~~D~~~~M~~~~A~~ 270
 VVGSVVAGLLYK~~F~~~~A~~~~L~~~~R~~~~I~~~~K~~~~K~~~~A~~~~G~~~~D~~~~T~~~~G~~~~S~~~~Y~~~~D~~~~F~~----- 43.1% 252
 LVGSAIAAVFYLFVWLKKEDTP----- 36.2% 259

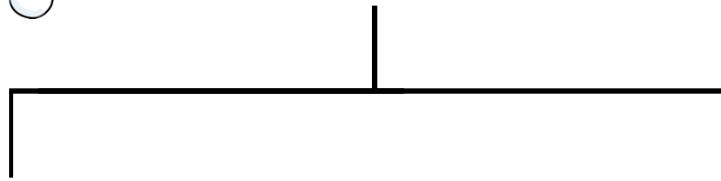
VI

Fig. 2

Comparison of the deduced amino acid sequences of three *Bombyx mori* aquaporins (AQP-Bom3 [PRIP], AQP-Bom1 [DRIP] and AQP-Bom2 [*functional* aquaglyceroporin]). Identical amino acids among the three *Bombyx* AQPs are highlighted in white letters on a black background. Six transmembrane domains deduced from the hydrophobicity profile are bold-underlined (I–VI), and two NPA boxes are located at loops B and E. Percentages represent the amino acid sequence similarity of each sequence to that of AQP-Bom3. Each antibody was raised against a synthetic peptide corresponding to each colour-highlighted sequence. Two specific AQP-Bom3 antibodies were raised against the N-terminal sequence (in mouse) and the C-terminal sequence (in rabbit).

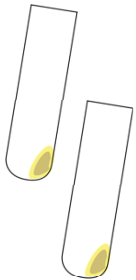


Crude homogenate
centrifuged at 1,000 g (10 min)



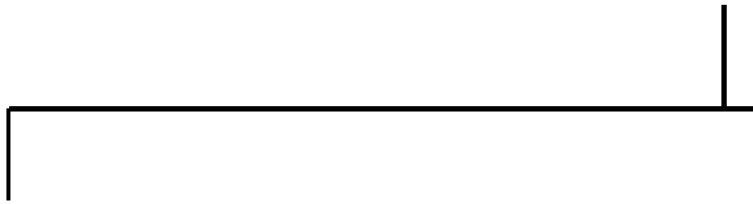
Pellet
(Unbroken cells, nuclei)

Supernatant
Membranes
centrifuged at 100,200 g (90 min)



Pellet
(total membranes)

Supernatant
(cytosol)



Sucrose density gradients
centrifuged at 93,900 g (18 hr)

sample
20
30
40
50

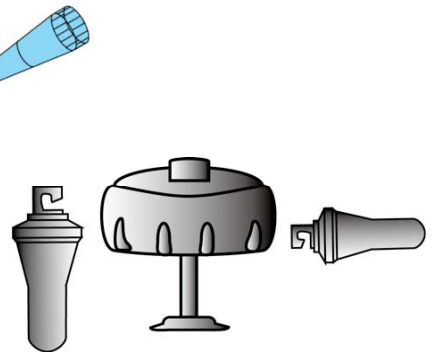


Fig. 3

Procedure scheme of membrane fractions from tissues with sucrose density gradient centrifugation. Preparing tissue 10 folds volume homogenate, the homogenate was centrifuged at 1,000 *g* for 10 min with fixed angle rotor to separate into supernatant and pellet. The supernatant was collected by decantation, then ultracentrifuged at 100,200 *g* for 90 min with fixed angle rotor. After ultracentrifugation, the pellet containing organellar membrane was suspended by same buffer preparing homogenate. The suspension loaded on discontinuous sucrose density gradients (20%, 30%, 40%, 50% sucrose including respectively), after ultracentrifuging at 93,900 *g* for 18 hr with swinging bucket rotor, collected appeared 4 fractions.

実験結果

1. カイコ第3のAQP, AQP-Bom3はPRIPサブファミリーに属する

昆虫の水選択的AQPはグループ1に属し (Kambara et al., 2009; Goto et al., 2011), さらに2つのサブファミリー, DRIPとPRIPに分けられる (Campbell et al., 2008)。カイコのAQP-Bom1 (Miyake and Azuma, 2008; Kataoka et al., 2009a)はDRIPタイプであり直腸 (rectum) のcDNAからクローニングされた。直腸からは別のAQPもクローニングされ, カイコにおける3番目のAQPであるのでAQP-Bom3とした。AQP-Bom3のcDNAは2,597 bpであり, 270残基のアミノ酸をコードしている (Accession no. AB458833)。このペプチドの分子量は27,728 Daと推定され, AQPに特徴的なNPAモチーフを持ち, 疎水性プロット解析によるとAQP-Bom1およびAQP-Bom2, それ以外のAQPsと同様に6ヶ所の膜貫通領域, 5ヶ所のループと細胞質側のN末端, C末端を備えていた。

系統解析からAQP-Bom3はガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*), ナンキョクユスリカ (*Belgica antarctica*), ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*), ハエの1種 (*Eurosta solidaginis*) などからクローニングされたPRIPタイプAQPと高い相同性を示し (Fig. 4), PRIPタイプに分類された。同様にカイコからクローニングされたAQP-Bom1, AQP-Bom2とAQP-Bom3の相同性はそれぞれ43.1%と36.2%であった。

2. 後腸においてAQP-Bom3のmRNAはAQP-Bom1のmRNAと発現を共にする

幼虫の主要な組織 (絹糸腺, 中腸, 後腸およびマルピーギ管: Malpighian tubule, MT) でのAQP-Bom3 mRNA発現を調査したところ, 後腸で2.6 kbにやや強く反応するバンドを得た (Fig. 5)。そこでカイコの幼虫の後腸部位, 結腸 (colon) と直腸, cMT, そして結腸周りのMTと小腸~結腸, 結腸~直腸周辺の気管を用いて *Bombyx* AQPsのノーザンブロット解析を行ったところ, AQP-Bom1は2.3 kbに結腸, 直腸およびcMTで強いシグナルが確認され, MTでやや弱いシグナルが検出された。Bom2は1.3 kbにMTでシグナルが確認され, 他の組織からは弱いシグナルが得られた。以上の結果は片岡らの報告

(Kataoka et al., 2009a)と相違なく, AQP-Bom1が後腸において, AQP-Bom2が今回はサンプルとして用いていないが中腸, MTにおいて発現していることを示した。また, ネット

タイシマカで報告された気管系での AQP 発現 (Pietrantonio et al., 2000; Duchesne et al., 2003) はカイコでほとんど確認されなかった。そして AQP-Bom3 は AQP-Bom1 と同様に結腸, 直腸およびcMT で2.6 kb にシグナルが確認された (Fig. 6)。

3. カイコの水選択的AQP, AQP-Bom1 とAQP-Bom3 タンパクの性質

mRNA の発現を踏まえてカイコの幼虫の後腸部位, 結腸と直腸 (cMT も含む), そして結腸周りの MT における AQP-Bom1, AQP-Bom2 および AQP-Bom3 のタンパクの発現を調査した。原形質膜分画を調製するためにショ糖密度勾配遠心を行い, 得られた 3 つの分画 (20%/30%, Band 2, 30%/40%, Band 3, 40%/50%, Band 4) の SDS-PAGE後, 抗 AQP-Bom1, AQP-Bom3 抗体を使用したウェスタンブロット解析に供したところ, 全ての組織で Band 2, Band 3 にバンドが検出された。また抗 AQP-Bom2 抗体を用いてウェスタンブロットを行うと, 結腸, 直腸の分画で特異的反応は検出されなかった。

抗 AQP-Bom1 抗体を用いたウェスタンブロットでは, 結腸と直腸は 118 kDa (おそらくホモ 4 量体) と 27 kDa (単量体), そして 21 kDa, 20 kDa (断片化した単量体と考えられる) にバンドが検出され, MT では 118 kDa, 27 kDa のバンドが結腸, 直腸と比較して強く検出され, 21 kDa, 20 kDa のバンドはほとんど検出されなかった (Fig. 7A)。抗 AQP-Bom3 抗体を用いたウェスタンブロットでは結腸, 直腸そして MT で 107 kDa (ホモ 4 量体) と 21 kDa (断片化した単量体) にバンドが検出され, 密度の軽い分画, Band 2 でより強く検出されていた (Fig. 7B)。

4. 後腸では AQP-Bom1 が管腔側, AQP-Bom3 が基底膜側の細胞膜に発現する

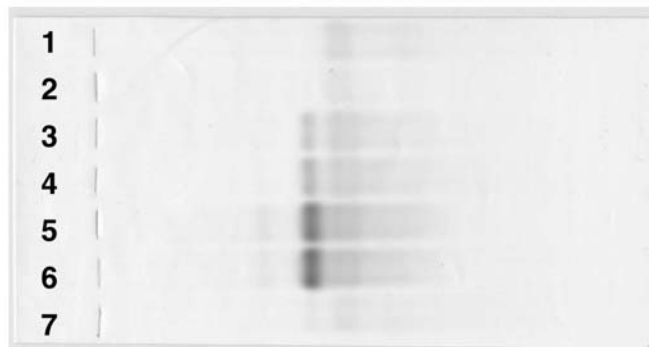
ウェスタンブロットでは特異的な反応が得られた。よって同じ抗体を用いて組織における AQP-Bom1, AQP-Bom3 の発現と局在を明らかにするため結腸と周辺の MT, そして cMT を含む直腸の免疫組織化学を行った。

抗 AQP-Bom1 抗体を用いた検出では結腸, 直腸, そして MT, cMT の管腔側 (apical) の細胞膜に AQP-Bom1 の反応が確認された (Figs. 8AとC, および 9C)。また cMT は形態的に見て細胞質に富んだ部位 (inner tubule) と細胞質に乏しく扁平な部位 (outer tubule, rectal lead) があり, outer tubule と rectal lead の反応は直腸上皮での陽性が消失するま

で抗体濃度を薄めた際も検出された。抗 AQP-Bom3 抗体を用いた検出では結腸, 直腸, MT, cMT において管腔側とは逆の血体腔, 基底膜側 (basal) の細胞膜に AQP-Bom3 の反応が確認された (Figs. 8BとD および 9AとB)。AQP-Bom3 を用いた際も, outer tubule と rectal lead MT の反応は希釈した抗体で見いだされた。rectal lead MT では AQP-Bom1 と AQP-Bom3 の抗体による 2 重染色による管腔側 (AQP-Bom1, 赤) と基底膜側 (AQP-Bom3, 緑) の染め分けも観察された (Fig. 8E)。

Fig. 4.

Multiple amino acid sequence alignments of the third *Bombyx mori* aquaporin protein (AQP-Bom3 [PRIP]). AQP-Bom3 shares sequence similarity with well-characterized insect PRIPs, including *Aedes aegypti* (XP_001656932: AaAQP2), *Anopheles gambiae* (AB523397.1: an alternate isoform of AgAQP1), *Belgica antactica* (AB602341: BaAQP1 variant B), *Polypedilum vanderplanki* (AB281619: PvAQP1), *Eurosta solidaginis* (FJ489680: EsAQP1) and *Pyrocoelia rufa* (AF420308: PrAQP) as the original 'PRIP'. Percentages represent the amino acid sequence similarity of each sequence to that of AQP-Bom3. The two NPA motifs are bolded and lined. Selectivity filter "aromatic-arginine" regions (ar/R) are highlighted with boxes. Within these insect PRIPs, "*" indicates residue identity, ":" indicates conserved residues, and "." indicates semi-conserved residues. Note that the candidate cysteine residues for mercury sensitivity are well conserved among insect PRIPs (dotted boxes).



↑ 2.6 kb

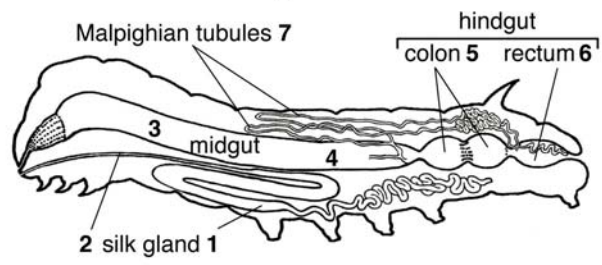


Fig. 5.

Expression and tissue distribution of the third *Bombyx mori* aquaporin. One microgram of mRNA from each tissue was subjected to formaldehyde agarose gel electrophoresis. The number in each lane denotes the specimen extracted from each epithelial region in silkworm larvae (after Kataoka et al., 2009a). After northern blotting, the nylon membrane was hybridized with the DIG-labelled anti-sense AQP-Bom3 RNA probe. 1: posterior division of middle silk gland; 2: anterior silk gland; 3: anterior midgut; 4: posterior midgut; 5: colon; 6: rectum (incl. cMT); 7: Malpighian tubules. RNA sizes (kb) were estimated from RNA standards (not shown).

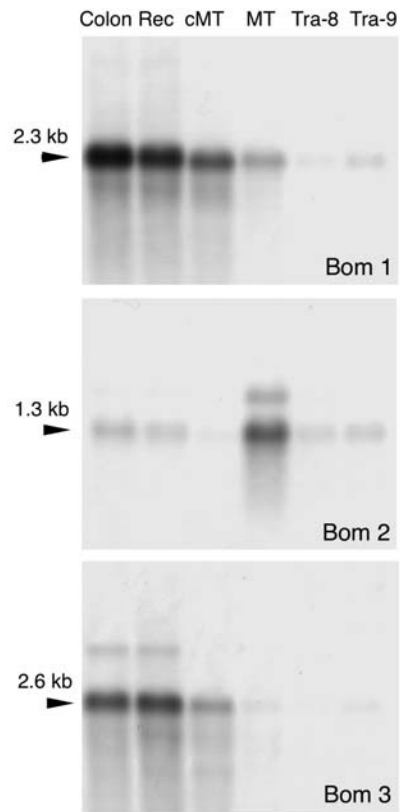
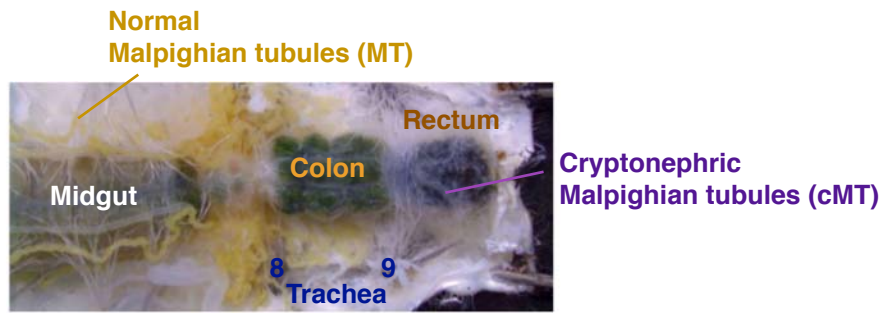


Fig. 6.

Anatomy of hindgut and expression and tissue distribution of three *Bombyx mori* aquaporins in the hindgut. One microgram of mRNA from each tissue was subjected to formaldehyde agarose gel electrophoresis. After northern blotting, three nylon membranes were hybridized with the DIG-labelled anti-sense RNA probe of AQP-Bom1, AQP-Bom2 or AQP-Bom3. The tissues were prepared from 4-day-old fifth instar larvae. Rectum: rectal epithelia (without cMTs); cMT: cryptonephric Malpighian tubules (removed from the rectal complex); MT: convoluted Malpighian tubules along the colon; Tra-8: tracheal network at the 8th spiracle connecting to the colon; Tra-9: tracheal network at the 9th spiracle connecting to the rectal complex. RNA sizes (kb) were estimated from RNA standards (not shown).

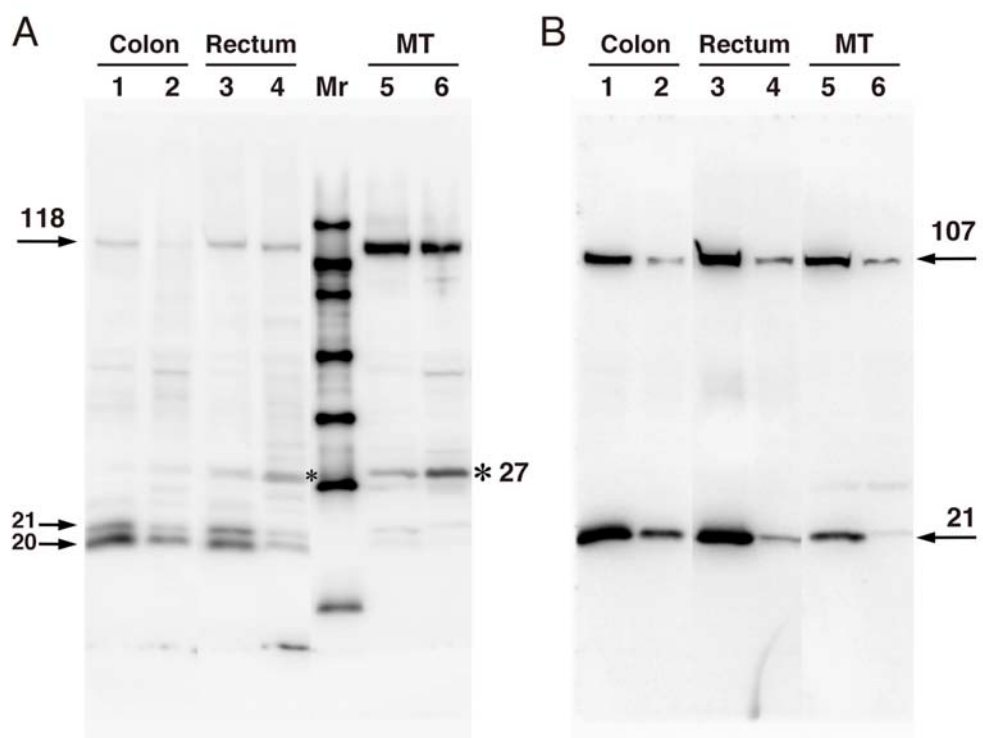


Fig. 7.

Identification of two water-specific aquaporins in the organellar membranes from the excretory epithelia of *Bombyx mori* by immunoblotting. (A) AQP-Bom1 [DRIP]. (B) AQP-Bom3 [PRIP]. After sucrose density gradient centrifugation, membrane fractions (50 µg of protein/lane) from the colon, rectum (incl. cMT) and MTs (along the colon) were subjected to SDS-PAGE (12% gel). Lanes 1, 3, 5: 20%/30% sucrose interface; Lanes 2, 4, 6: 30%/40% interface. The asterisks (*) indicate the expected monomer of AQP-Bom1 (27 kDa), and the tetrameric state (118 kDa) of AQP-Bom1 is prominent in the MT membranes. Homotetramers (107 kDa) of AQP-Bom3 were seen in all tissues, although the apparent molecular mass for the monomer (21 kDa) was rather small. Mr: the standard protein markers; 150, 100, 75, 50, 35, 25, and 15 kDa. Note that the protein size in panel B refers to Mr in panel A (panel B was the reprobated experiment after panel A).

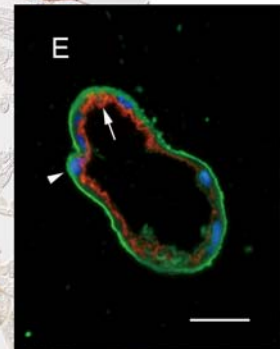
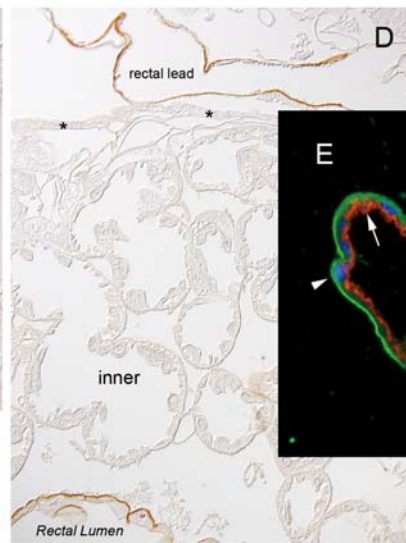
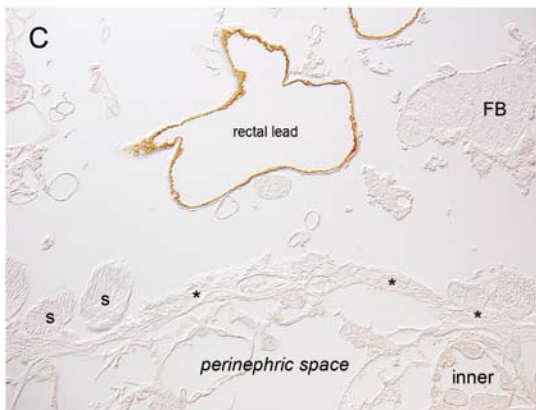
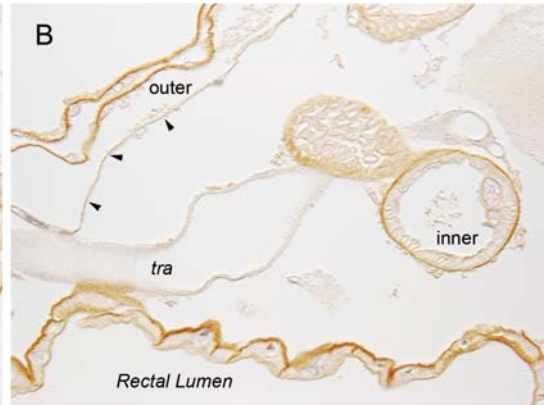
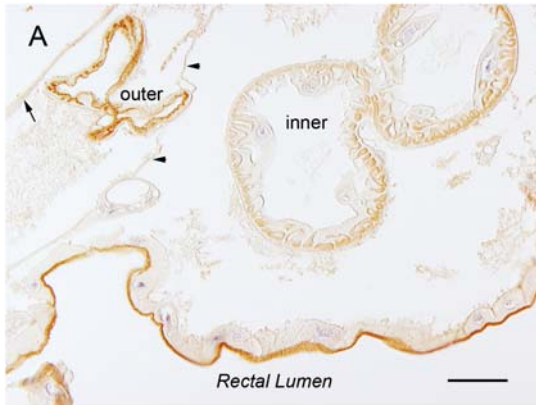


Fig. 8.

Immunocytochemistry of two water-specific aquaporins in the cryptonephric rectal complex of *Bombyx mori*. (A, C) AQP-Bom1 [DRIP]. (B, D) AQP-Bom3 [PRIP]. The outer cMT (outer) forms a thin wall with an irregular shape. The inner cMTs (inner) are characterised by a thick wall with a round shape. The rectal lead MT appears similar to the outer cMT, but with a larger shape, and is situated outside of the rectal complex. (A, B) In the inner cMTs, weak but significant staining is observed at the apical surface (A: AQP-Bom1) and at the basal surface (B: AQP-Bom3). The arrow in (A) is the perinephric membrane. Arrowheads in (A) and (B) indicate the inner perinephric membranes. tra: tracheole. (C, D) Asterisks (*) indicate the muscular sheet over the perinephric membrane. s: sphincter between the colon and rectum; FB: fat body. Note that the basal immunostainings of AQP-Bom3 are seen in the rectal epithelia (D: *bottom*); (E) Double immunofluorescence microscopy analysis of AQP-Bom1 (red: arrow) and AQP-Bom3 (green: arrowheads) in the cross section of the *rectal lead* MT. Nuclei are counterstained with DAPI (blue colour). Scale bar: 50 μm in A, B and E; 100 μm in C and D.

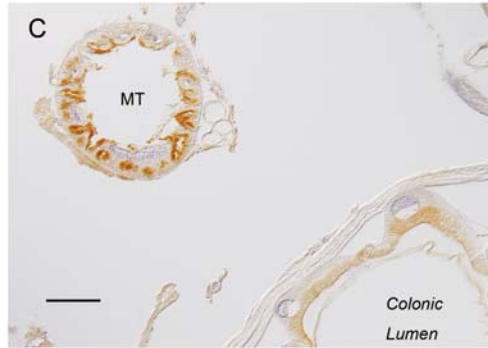
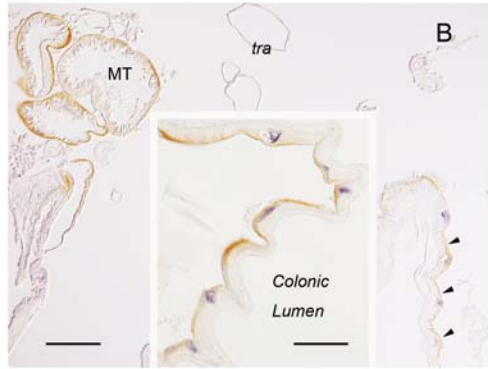
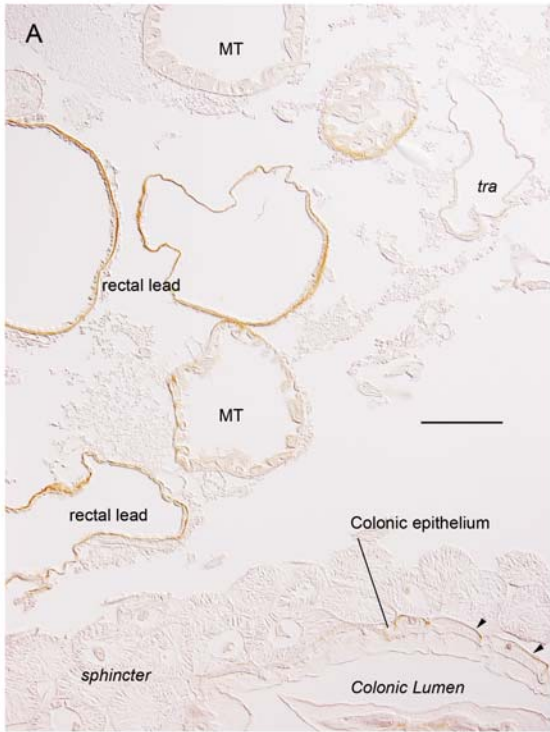


Fig. 9.

Immunocytochemistry of two water-specific aquaporins in the colon of *Bombyx mori*. (A) AQP-Bom3 [PRIP]. The rectal lead and normal MTs are observed in the region between the rectum and colon. Note that the immunoreaction occurs only at the *rectal lead* MTs, which form a very thin tubular wall with a large lumen. The basal surface of the colonic epithelia also shows positive staining (arrowheads). Note that there is no specific reaction in the normal MT (MT). (B) AQP-Bom3 [PRIP]. Three tubules (MT) situated closely together indicate the basal immunoreactions moderately and demonstrate their structural changes to the normal (convoluted) MTs. In the colonic epithelia, the basal immunoreactions (arrowheads) are clearly confirmed in the inset (enlarged). (C) AQP-Bom1 [DRIP]. The intense staining is seen at the apical surface of MT. The apical immunoreactions are clearly observed in the colonic epithelia. *tra*: tracheole. Scale bars: 100 μm in A, B; 50 μm in B (*inset*), C.

考 察

中腸から送られた消化物の水分は後腸部位において吸収される。その後、血リンパを介して再び中腸消化液として再利用されると考えられていた (Ramsay, 1976; Reynolds et al., 1985)。確かに中腸内の消化物は水分に富んでおり、それが小腸、結腸、直腸を経て肛門から排出されると押し固められた糞となっている。この水分吸収に重要な役割を果たしているのが cMT-直腸上皮複合体 (cryptonephoric rectal complex) である。構成する直腸上皮と cMT は周辺を腎周囲膜 (perinephric membrane) で覆われ、血リンパと浸透圧的な一線を画した腎周囲空間 (perinephric space) を形成している (Ramsay, 1976)。

コウチュウ目のチャイロコメノゴミムシ (*Tenebrio molitor*) では cMT-直腸上皮複合体内の浸透圧が調査され、直腸内腔から直腸上皮、そして cMT と段階的に浸透圧が高まることが分かっている。浸透圧は部位によって異なるが、直腸内腔ではおよそ 1.0 osmol/kg, 直腸上皮ではおよそ 4.0 osmol/kg, cMT はおよそ 5.8 osmol/kg である。ゴミムシなどでは空気中の水分を吸収するために浸透圧勾配を用いているが、チョウ目昆虫では同様の機構を食物からの水分吸収に利用しているのかもしれない (今野, 2007; Machin, 1979)。

一般に腎周囲空間の中は高浸透圧であり、その濃度勾配によって直腸管腔内から水を吸収し、体内へと還元することで血リンパの水分を維持していると考えられていた。だが今まで水がどのような経路で後腸から血体腔へ移動しているか、実体が不明であった。

今回の結果は後腸部位、特に直腸における transcellular な水分吸収を分子的に裏付けた。カイコ幼虫は後腸の上皮細胞と後腸周辺の一部の MT に異なる分子種の AQP を、AQP-Bom1 (DRIPタイプ) は頂端 (apical, 管腔) 側、そして AQP-Bom3 (PRIPタイプ) は基底 (basal, 血体腔) 側にと細胞極性に従って配置することで速やかな水輸送を可能にしていたのである。

その中で MT (あるいは cMT) が場所によって異なった機能を担っていることへの示唆が得られた。チョウ目昆虫幼虫の MT は 6 本で中腸～小腸 (ileum) の境目から頭側へと中腸に沿って延び、中腸の中程で U ターンして小腸と結腸周辺に折り畳まれたような構造をとる。そして直腸上皮と密着する直前の rectal lead MT を経て腎周囲空間に入り、cMT となって直腸上皮と複合体を形成する。Rectal lead MT からの cMT は細胞質の薄い扁平な

outer cMT になり、その後細胞質に富んだ inner cMT へと形態を変化させ、直腸上皮の基底側部に接近した状態で旋回し盲管に終わる (Ishimori, 1924)。

免疫染色の結果、rectal lead MT および outer cMT では抗 AQP-Bom1 抗体、抗 AQP-Bom3 抗体で反応させた際、はっきりとした染色像を得ることができたが、同一視野に入っている inner cMT や MT では反応が減弱しているようであった。このことからおそらく水は直腸管腔内から直腸上皮細胞内 (AQP-Bom1) →直腸上皮細胞内から腎周囲空間 (AQP-Bom3) →腎周囲空間から outer cMT 細胞内 (AQP-Bom3) → outer cMT 細胞内から outer tubules 管腔内 (AQP-Bom1) を経て rectal lead MT 部位の管腔内から rectal lead MT 細胞内へと入り (AQP-Bom1)、最終的に血体腔へと回収されるのであろう。これら 2 つの AQP : AQP-Bom1 と AQP-Bom3, は排泄に関する組織 (主に後腸) の輸送上皮で協調し、直腸内腔から直腸上皮、そして cMT へと段階的に高まる浸透圧の勾配に従い、水分を継続して細胞内経路によって腸管腔から血体腔へと流しているのである。イモムシの排泄において AQP 分子がどのように関与しはたらいっているかが明らかとなり、チョウ目昆虫の幼虫の cryptonephric complex が水分吸収と調節に機能する精巧かつ重要な構造であることを分子的に示した。

Inner cMT や rectal lead MT 以後の (いわゆる通常の) MT の水分吸収への寄与については浸透圧勾配の構成と維持などの観点から考えることも多々あり、更なる調査が必要である。

消化管における AQP の発現は、吸汁性・吸血性の液体摂取性昆虫でよく調べられているが、カイコのように植物葉などの固形物を摂食する昆虫においても重要であった。昆虫の消化管内で重要な機能を担う AQP であるが、消化や排泄に関わる組織以外での発現と機能が報告されつつあり、近年、PRIP タイプの AQP が卵巣で発現しているとハマダラカ (*Anopheles gambiae*)、ゴキブリ (*Blattella germanica*) と異なる昆虫種で相次いで報告された (Liu et al., 2011; Herraiz et al., 2011; Tsujimoto et al., 2013)。このことから AQP が卵形成にも関与している可能性が高いと考えられるが、その発現時期や局在、機能など未解明な点も多い。

そこで次章では消化管で明らかとなった AQP の特性を踏まえ、カイコの卵形成における AQP の発現様式を調査することとした。

第 2 章

カイコ卵形成期におけるアクアポリンの生理的役割

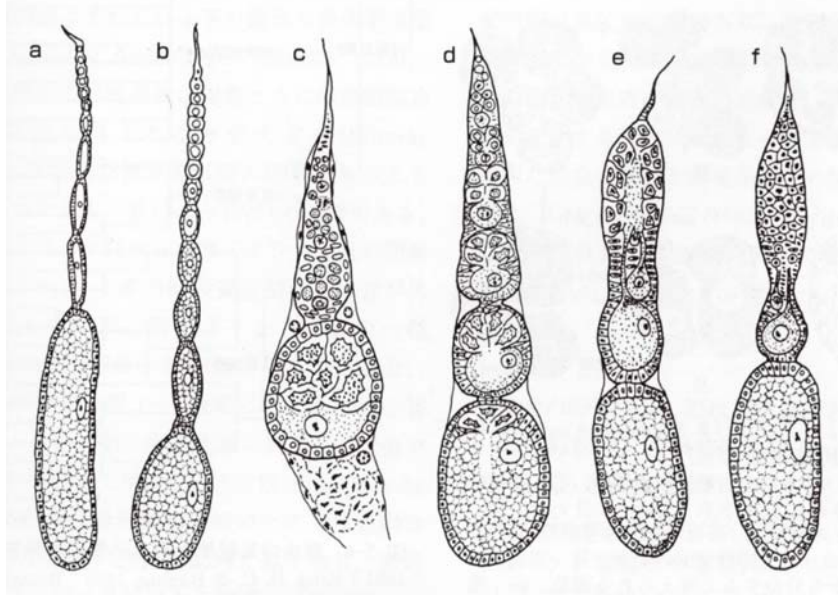
昆虫の卵巣は 1 対の卵巣小管 (ovariole) によって構成され、卵胞 (follicle) は卵母細胞 (oocyte), 濾胞細胞 (follicle cell), および栄養細胞 (nurse cell) よりなる。一部の昆虫は栄養細胞を持たず、この有無でまず無栄養室型 (panoistic type) と有栄養室型 (meroistic type) に分かれる。さらに有栄養室型の卵巣小管は卵母細胞と栄養細胞の空間的位置関係によって端栄養室型卵巣小管 (telotrophic type) と多栄養室卵巣小管 (交互栄養室) 型 (polytrophic type) の 2 つに分けられる (松崎・栗原, 1996; Fig. 10)。カイコの卵巣小管は多栄養室型卵巣小管であり、卵母細胞と隣接する 7 つの栄養細胞と濾胞細胞が卵胞を形成する (松崎・栗原, 1996)。卵母細胞はふ化後 2~3 日から吐糸直前まで第 1 次卵母細胞として徐々に成長を進め、化蛹以後は卵母細胞および栄養細胞が急激に発達・発育して著しく肥大する (大槻, 1970)。その後、メス蛹の体内で完成卵となり、受精・産下された卵は休眠と非休眠の 2 態を取るが、これは母体内で休眠ホルモン (diapause hormone) の作用を受けるか否かによって決まる。産下された休眠卵は初期胚の状態では休眠し、低温に一定期間置かれた後 (自然条件下では越冬がこれにあたる)、休眠が破れ、幼虫が孵化する。一方、非休眠卵は産下後直ちに発生を開始し、約 2 週間で幼虫が孵化する。

卵形成は胚発育に関わる遺伝情報の蓄積が行われる前卵黄形成期 (pre-vitellogenic phase) に続き、メスの脂肪体で合成される vitellogenin を代表とする各種卵黄タンパク質やグリコーゲン顆粒、脂質性顆粒などの蓄積が起こる卵黄形成期 (vitellogenic phase), 卵黄膜 (vitelline membrane), 卵殻 (chorion) 形成が進行して卵が完成する卵殻形成期 (choriogenic phase) を経て終了する (松崎・栗原, 1996; Telfer, 2009)。卵形成に関する一連の先駆的な研究はセクロピアサン (*Hyalophora cecropia*) の卵胞を用いて行われた (Telfer and Rutberg, 1960; Telfer, 1961; Telfer and Anderson, 1968)。タンパク質や脂質の取り込みに伴ってイオンや水の吸収も起こり、卵母細胞の体積を増加させる (Wang and Telfer, 1998)。この水分吸収の駆動力はおそらく卵胞に存在する V-ATPase によって創出された電気化学的な浸透圧勾配であると考えられる (Janssen et al., 1995; Harvey et al., 1998)。

近年、卵形成に PRIP タイプの AQP が関与していることがハマダラカの研究から示唆された (Liu, et al., 2011; Tsujimoto, et al., 2013)。メス成虫が吸血した後、PRIP タイプの AQP をコードする *AgAQP1* mRNA 発現が脂肪体と卵巣で上昇することが報告され (Liu et al., 2011)、続いてチャバネゴキブリでも卵巣から PRIP タイプの AQP 遺伝子 (*BgAQP1*) が同定された (Herraiz et al., 2011)。またハマダラカにおいて、*AgAQP1* スプライスバリエントである *AgAQP1A* と *AgAQP1B* が卵巣と消化管で、それぞれ発現していることが明らかにされている (Tsujimoto et al., 2013; Fig. 17)。これらの報告から PRIP タイプの AQP 遺伝子が卵巣でも発現していることが明らかとなったが、AQP タンパク質の発現の有無や機能について解明されていない点も多い。水は各種イオン (H^+ , K^+ , Na^+ , Cl^- など) の動きに伴って膜を移動し、卵でも吸水や膨潤が起こると予想される。しかし AQP が昆虫の卵形成にどう関わっているか、具体的なデータほとんど示されていない。

そこで卵形成における AQP の機能を解明するため、本章ではカイコの 2 種類の水選択的 AQPs, すなわち AQP-Bom3 (PRIP タイプ) と AQP-Bom1 (DRIP タイプ) の卵胞における発育段階での発現の様子、組織・細胞内での分布を調査した。またカイコの卵は休眠卵と非休眠卵の 2 態を取り、産下後から孵化に至るまでの期間が大きく異なる (Yamashita, 1996)。そこで休眠卵と運命付けられた卵胞、あるいは非休眠卵へと運命付けられた卵胞での AQPs の発現の比較も行った。

A



B

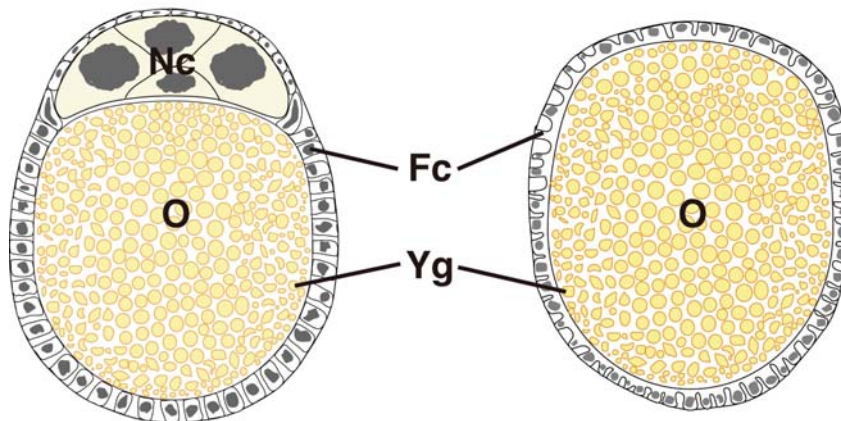


Fig. 10.

(A) Types of insect ovarioles. a, b are panoistic types. c, d, e, f are meroistic type. For more details, c, d are polytrophic types and e, f are telotrophic types.

(A figure from Matsuzaki and Kurihara, 1996, Baifukan Co., Ltd, p23).

(B) Vitellogenic (left) and choriogenic (right) follicle.

Nc: nurse cell, **O:** oocyte, **Fc:** follicular epithelial cell, **Yg:** yolk granule.

材 料 と 方 法

実験昆虫

カイコ品種として交雑種（春嶺×鐘月または錦秋×鐘和）に人工飼料（KIT-2515M15, 無菌養蚕システム研究所, 京都）を与えて24~26°Cで飼育した。5齢（終齢）期は約7日間摂食し、その後吐糸期に入り、約4日間経過後、蛹化した。得られたメス蛹は、卵黄蓄積期の蛹6日齢前後および卵成熟期の蛹10日齢前後の雌蛹を解剖して卵巣を摘出した。なお、蛹は蛹化約12日間経過後に成虫羽化した。

PRIPタイプAQP アライメントと相同性の比較

AQP-Bom3 (Genbank accession no. NP_001153661.1) と他の昆虫から報告されている PRIP タイプ AQP のアミノ酸配列を Geneious software を用い、clustalW にてアライメントし、相同性を比較した。使用した AQP 配列は第1章に以下の配列を加えたものである。

Anopheles gambiae (AgAQP1A: JF342682.1) , *Blattella germanica* (BgAQP1: FR744897.1) ,
Lygus hesperus (LhAQP4A: KF048099.1, LhAQP4B: KF048100.1; Fabrick, et al., 2014) 。

発育卵巣および発育後卵巣の trypan blue 染色

1% trypan blue 溶液は、1×PBS[†]で調製した。なお、trypan blue は溶解しにくいため、1% 溶液は前日に作製した。

1×PBS[†] (以下, PBSと明記)

[†]100 mlの10×PBS^{††}に900 mlの D.W. を加えた

^{††}10×PBS

NaCl 85.0 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 28.7 g

NaH₂PO₄ · 2H₂O 3.3 g

-上記の試薬を900 mlの D.W. に加え、一晩攪拌した。

-D.W. を加え、1,000 mlとした。

(1) 5日齢のメス蛹にマイクロシリンジを用いて50 µl の 1% trypan blue 溶液を注射した。

(2) 翌日、注射を行ったメス蛹を PBS を満たしたシャーレで卵巣小管を傷つけないように解剖し、新しい PBS を張った新しいシャーレに移し軽くすすいで余分な色素や組織（脂肪体など）を除去した。この作業を2~3回ほど繰り返し、以下の観察を行った。

(3) 1つの卵巣に4本ずつある卵巣小管それぞれの染色具合を光学顕微鏡 (BX 51, オリンパス) を用いて明視野像下で観察した。顕微鏡観察の結果は、光学顕微鏡へ連結させたデジタルカメラシステム (DP25, オリンパス) で記録し、コンピューターへ取り込まれた画像は Adobe® Photoshop® CS4 によって処理した。

カイコ AQP に対する特異抗体の作製・抗血清からの IgG 分画の精製 は第1章と同様に行った。

Western blotting

(a) ショ糖密度勾配遠心によるオルガネラ調製

(1) メス蛹は麻酔なしで解剖し、卵黄蓄積期（蛹化後 6 日齢, Day 6）または卵形成期（蛹化後 10 日齢, Day 10）の卵巣を摘出した。

†0.3 M Mannitol, 5 mM EDTA, 10 mM HEPES : pH 7.5 緩衝液

1 × EH buffer... 100 ml の 10 × EH buffer^{††}に 900 ml の D.W. を加えた。

*この際、54.65 g の Mannitol を加えた。

††10 × EH buffer

EDTA-Na₂ 18.612 g

HEPES 23.831 g

-上記の試薬を 900 ml の D.W. に加え、一晚攪拌した。

pH メーターで pH を計測し、

NaOH 溶液を用いて pH 7.5 に調整した。

-D.W. を加え、1000 ml とした。

(2) 解剖の際に使用した緩衝液に 0.3M NaCl を加えた液 10 ml に対して protease inhibitor cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, *EASYPack* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を 1 錠加えたものを、摘出した組織の 10 倍量 (w/v) となるように加えた。

(3) ホモジナイザーにペッスルを取り付け、対応する外套を用いて、1,500 rpm の回転速度により組織を磨砕し、10 倍量ホモジェネートを作製した。その後あらかじめ緩衝液で湿らせた 4 重のガーゼでろ過し、10 ml のメスシリンダーに受けた。続いて 4 本のチューブにおおよそ均等となるように分取し、CA-4HS ローター（トミー精工）で 1,000 g, 10 min, 4°C にて遠心を行い、回収した上清をさらに RP65T ローター（日立工機）で 100,000 g, 90 min, 4°C にて遠心し、pellet を得た。

(4) 上で得た pellet をホモジェネート作製に使用した緩衝液を適量（1 つの pellet につき 500 μl 程度を目安として）用いて懸濁し、ショ糖密度勾配遠心法に供した。

(5) 懸濁に使用した緩衝液にスクロースを 50%, 40%, 30%, 20% の濃度となるように溶解し、各種濃度のショ糖溶液を作製した。続いて 12PA チューブにそれぞれの界面を乱さないように留意しながらパストゥールピペットを用いて 50% は 2.5 ml, 40%, 30%, 20% は 2.7 ml ずつ重ね、20% のショ糖溶液を重ねた後に懸濁した sample（約 1 ml）を重ねた。

(6) RPS40-T スイングローター（日立工機）を用いて 27,500 rpm(93,900 g), 18 hr, 4°C で遠心を行った。

(7) それぞれバンド状に現れた各分画を上から順に Band 1, Band 2... とし、パストゥールピペットを用いて分画が混ざらないように留意しながら分取した。

(8) 分取した分画はマイクロピペットを用いてよく懸濁し、200 μl ずつ 0.5 ml PCR チューブに分注した。

(9) 上記で得たそれぞれのショ糖溶液分画を -30°C に凍結保存、もしくは直ちに以下の実験に供した。

(b) 総タンパク量の定量, (c) SDS-PAGE, (d) 転写と抗原抗体反応, 検出 は第 1 章と同様に行った。

免疫組織化学

(a)組織の固定・脱水・パラフィン包埋, (b)パラフィン切片の作製と脱パラフィン操作, (c)抗原抗体反応, (d)光学顕微鏡による観察 は以下の条件以外は第1章と同様に行った。

解剖する際には PBS を入れたシャーレに蛹を静置し、それぞれの卵巢小管を傷つけないように留意しながら背面 (dorsal) からピンセットを刺し、腹部末端を取り除いた。続いて Bouin 固定液を滴下し、固定を進めた後、それぞれの卵巢小管を傷つけないように留意しながら新しい Bouin 固定液の入ったシャーレへと移した。10 日齢卵巢は卵殻の形成に伴い固定液が浸透しにくいいため必要に応じ、新しい Bouin 固定液中で冷蔵庫に一晩静置した。

発育中卵胞による Swelling assay

(1) 6 日齢雌蛹より解剖して取り出した卵巢小管を 1 本ずつに分け、0.1% Collagenase (Type II, Gibco™, Invitrogen Co., CA, USA, MBS で希釈) 処理 (30 min, 室温, orbital shaker 使用) を行い、卵巢小管の卵巢鞘と固有膜を消化処理した。

(2) その後、Collagenase 溶液を取り除き、残った Collagenase 溶液を洗うために MBS を加え、取り除く操作を 2~3 回繰り返した。その際、残った卵巢鞘と固有膜を慎重に取り除いた。

(3) 先を切ってやや太くしたパスツールピペットを用いて卵胞を傷つけないように留意しながら、あらかじめ 50 μ l の 1/10 倍希釈 MBS、または 1/10 倍 MBS + 0.9 mM HgCl₂ を加えた 60 穴プレート (Nunc™ Surface 60 wells, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) に移動した。

(4) 卵胞が膨潤する様子は、光学顕微鏡 (BX51, オリンパス) を用いて明視野像下で観察した。顕微鏡観察の結果は、光学顕微鏡へ連結させたデジタルカメラシステム (DP25, オリンパス) で記録し、コンピューターへ取り込まれた画像は Adobe® Photoshop® CS4 によって処理した。

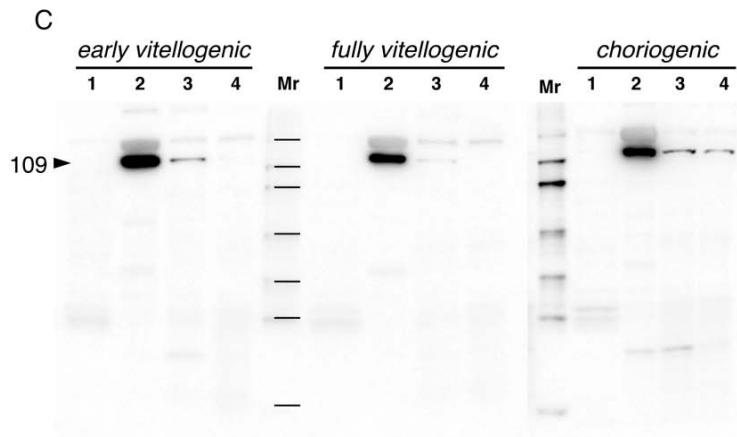
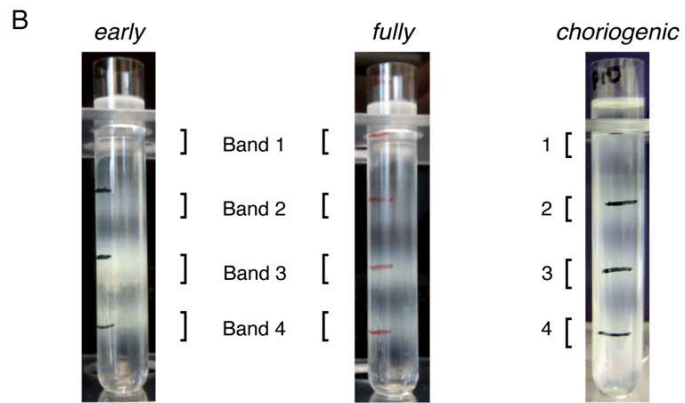
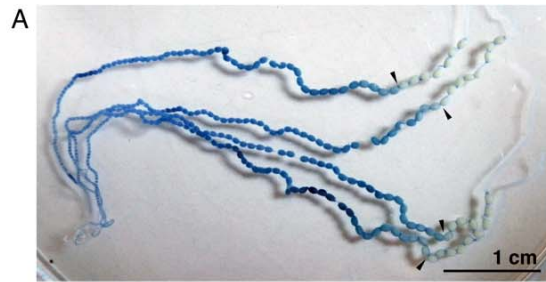


Fig. 11.

Separation of organellar membranes and isolation of the PRIP-type AQP (AQP-Bom3) from vitellogenic ovaries of the silk moth *Bombyx mori*. (A) Trypan Blue staining of vitellogenic ovaries from Day 6 female pupa. One side of the ovary comprising four ovariole chains is shown. The dye is taken up by vitellogenic follicles, but several terminal follicles in each ovariole are not stained (seen as a whitish color), indicating that they are at the end of vitellogenesis (just prior to choriogenesis). Arrowheads denote borders of critical stages. (B) Discontinuous sucrose density gradient centrifugation of ovarian membranes from Day 6 and 10 female pupae. Ovarioles from Day 6 were classified as early or fully vitellogenic follicles and fractionated by ultracentrifugation. Membrane fractions were recovered as Band 1 from the upper 20% sucrose, Band 2 at the 20%/30% interface, Band 3 at 30%/40% interface, and Band 4 at the 40%/50% interface. (C) Detection of AQP-Bom3 (PRIP) in membrane fractions prepared from early and fully vitellogenic and choriogenic follicles by immunoblotting. Lanes 1, 2, 3, and 4 represent membrane fractions recovered from Bands 1, 2, 3, and 4, respectively (see panel B). In the three preparations, a single 109 kDa polypeptide representing the AQP-Bom3 homotetramer was detected in Band 2. Mr, protein marker (150, 100, 75, 50, 35, 25, and 15 kDa).

実験結果

1. PRIPタイプ, AQP-Bom3 は卵黄形成期の卵母細胞膜に局在する

近年の研究 (Herraiz et al., 2011; Liu et al., 2011; Tsujimoto et al., 2013) から昆虫卵の主たる AQP だと考えられる PRIP タイプの AQP-Bom3 の発現を調査した。まずショ糖密度勾配遠心により調製した卵巣の膜分画をウェスタンブロット解析に供した。

その際、卵黄形成期の卵胞が多くを占める蛹 6 日齢の卵巣小管でトリパンブルー染色を行い、卵黄形成期と卵殻形成期の卵胞の境目を大まかに分けた。卵黄形成期の卵胞は色素を取り込み青く染まるが、卵殻形成期の卵胞は染色されない (Fig. 11A)。この卵巣小管を卵黄形成期の前・中期が含まれる early vitellogenic (early) と卵黄形成期の後期と卵殻形成期前期が含まれる fully vitellogenic (fully) に分け、高塩濃度条件下 (0.3 M NaCl) で膜分画の回収とショ糖密度勾配遠心を行ったところ、early および fully とともに 20% ショ糖上部, 20%/30%, 30%/40%, 40%/50% 境界面 (Band 1, Band 2, Band 3, Band 4) にそれぞれ 4 つの分画を得た (Fig. 11B)。そこでこの 4 つの分画を SDS-PAGE 後、抗 AQP-Bom3 抗体を用いてウェスタンブロットを行った所、early, fully の両者とも 20/30% 境界面の Band 2 で 109 kDa 付近に強いシグナルが検出された (Fig. 11C)。AQP-Bom3 の推定分子量は 27.7 kDa であり、この 109 kDa のシグナルは 4 量体が検出されたものだと考えられた。

ウェスタンブロットの結果から AQP-Bom3 の大部分が Band 2 でのみ検出されたため、ある特定の原形質膜に分布していると考え、蛹 6 日齢の卵巣において免疫組織化学を行い、AQP-Bom3 の組織における局在を調査した。観察の結果、卵母細胞膜で発現が検出され early vitellogenic follicle ではやや弱く (Fig. 12A および C), fully vitellogenic follicle で蛍光強度が強くなる傾向があり、高倍率での観察で卵母細胞膜に発現している様が鮮明に確認された。(Fig. 12B および 12D)。また、隣接している栄養細胞、表面を取り囲む濾胞細胞では発現はほとんど観察されず (Fig. 12A~D), 卵母-栄養細胞結合で反応が途切れる様子が確認された (Fig. 12E)。免疫前のウサギ血清を用いた対照区では卵母細胞膜の蛍光は観察されなかった (Fig. 12F)。

AQP-Bom3 が卵母細胞膜で発現していることから吸水に関与している可能性があると考えられた。そこで、実際に卵胞が吸水するか確かめるため、卵胞を用いた swelling assay を

行った。卵胞は卵巣小管の膜（卵巣鞘）で囲まれ、前後の卵胞と間濾胞組織

（interfollicular tissue あるいは interfollicular connective, 松崎・栗原, 1996; Yamauchi et al., 1984）で接着しているので、Collagenase 処理によりこれらを除いて個々の卵胞を調製し実験に使用した。1/10 MBS に浸すと、アフリカツメガエルを用いた外来発現形のような急激な（～5分）膨張は確認できなかったものの、30～60分という比較的長い時間をかけて緩やかに膨潤している様子が観察された（Fig. 13A～C）。AQPの阻害剤である塩化第二水銀（HgCl₂）を1/10 MBSに加えて同様の実験を行ったところ、60分後でも卵胞の膨潤は起こらなかった（Fig. 13D）。発育中の卵母細胞膜には多くの膜タンパク質が発現し、物質の取り込みを行っているが、水の取り込みにはAQPが主要な役割を果たしていることが示唆された。

2. DRIP タイプ, AQP-Bom1 は卵殻形成期の卵母細胞表層の卵黄顆粒に局在する

卵黄形成期に十分な量の内容物を取り込んだ卵胞はビテリン膜の形成、そしてそれに続いて起こる卵殻の蓄積を経て閉鎖形となり完成卵へと向かう（Swevers et al., 2005; Telfer, 2009）。閉鎖形となった卵母細胞は水を通さない層（卵殻など, Woods, 2005）に包まれるため、膜に存在するAQP-Bom3はその役割を終了していると考えられる。そこで卵殻形成期（蛹10日齢）の膜分画を調製しAQP発現の変化をSDS-PAGE, ウェスタンブロットにて解析した。すると、卵黄形成期で確認されたBand 2で発現が確認されたものの、シグナル強度が弱まっている傾向が見られた（Fig. 11C）。

他のAQPによる機能の補完や協調の可能性を調査するために、カイコで同定されているもう1つの水選択的AQP, AQP-Bom1（DRIPタイプ）の発現をSDS-PAGEとウェスタンブロットで解析した。するとAQP-Bom3が発現しているBand 2分画（おそらく卵母細胞膜も含まれる）よりも密度の軽いBand 1分画（20% ショ糖上部）で6日齢, 10日齢ともに27.8 kDaのバンドが検出された（Fig. 14A）。しかし6日齢のBand 1サンプルでは57.0 kDaと82.4 kDaも検出され、Band 2でも57.0 kDaが検出されたため、このバンドがオリゴマー、あるいは非特異的なバンドか検証するために抗源であるペプチドによる抗体吸収を行ったAQP-Bom1 IgGでウェスタンブロットを行った。その結果、依然としてこの57.0 kDaと82.4 kDaのバンドは検出され、27.8 kDaのバンドは消失した（Fig. 14B）の

で、27.8 kDa 以外は非特異的な反応として結論付けた。同じ抗 AQP-Bom1 IgG による免疫組織化学において、6 日齢の卵胞では濾胞細胞の卵母細胞側 (apical surface) に弱く検出された (Fig. 15A および D)。一方、10 日齢の卵胞では卵母細胞表層に強い反応が検出された (Fig. 15B)，高倍率で観察すると卵母細胞表層の卵黄顆粒やその周辺の細胞質が染色されている様子が確認された (Fig. 15E)。また AQP-Bom3 の反応は卵母細胞表層に検出されるものの、弱くなっている傾向にあった (Fig. 12G および H)。

3. 非休眠卵においてAQP-Bom1の存在する卵黄顆粒は卵母細胞表層に集積しない

カイコの休眠卵と非休眠卵では産下から孵化までの期間が大きく異なり、過去に卵殻の厚さや酸素透過性の違い、そして乾燥耐性の差などが報告されている (岡田, 1975; Sonobe et al., 1979)。そこでアクアポリンの発現が休眠卵と非休眠卵で変化している可能性を考え、産下後、非休眠卵となる卵巣を用いて休眠卵と同様にウェスタンブロット、免疫組織化学による解析を行った。

ウェスタンブロットでは抗 AQP-Bom1 抗体、抗 AQP-Bom3 抗体のどちらを用いても6 日齢、10日齢ともに休眠卵と大きな差は見られず、同様のバンドが検出された (AQP-Bom1; Fig. 16, AQP-Bom3; data not shown)。

免疫組織化学において抗 AQP-Bom3 抗体を反応させた非休眠卵は休眠卵と変わらず卵母細胞表層に陽性反応が検出され (Fig. 15J および K)，10日齢でも同様であった。抗 AQP-Bom1 抗体を反応させた際、10日齢において休眠卵では卵母細胞表層直下の卵黄顆粒に反応が見られたが (Fig. 15E)，非休眠卵では卵母細胞全体の卵黄顆粒に反応が検出された (Fig. 15C, F および I)。また抗原吸収処理を行った抗 AQP-Bom1 抗体を使用した際、この反応は陰性となった (Fig. 15H)。

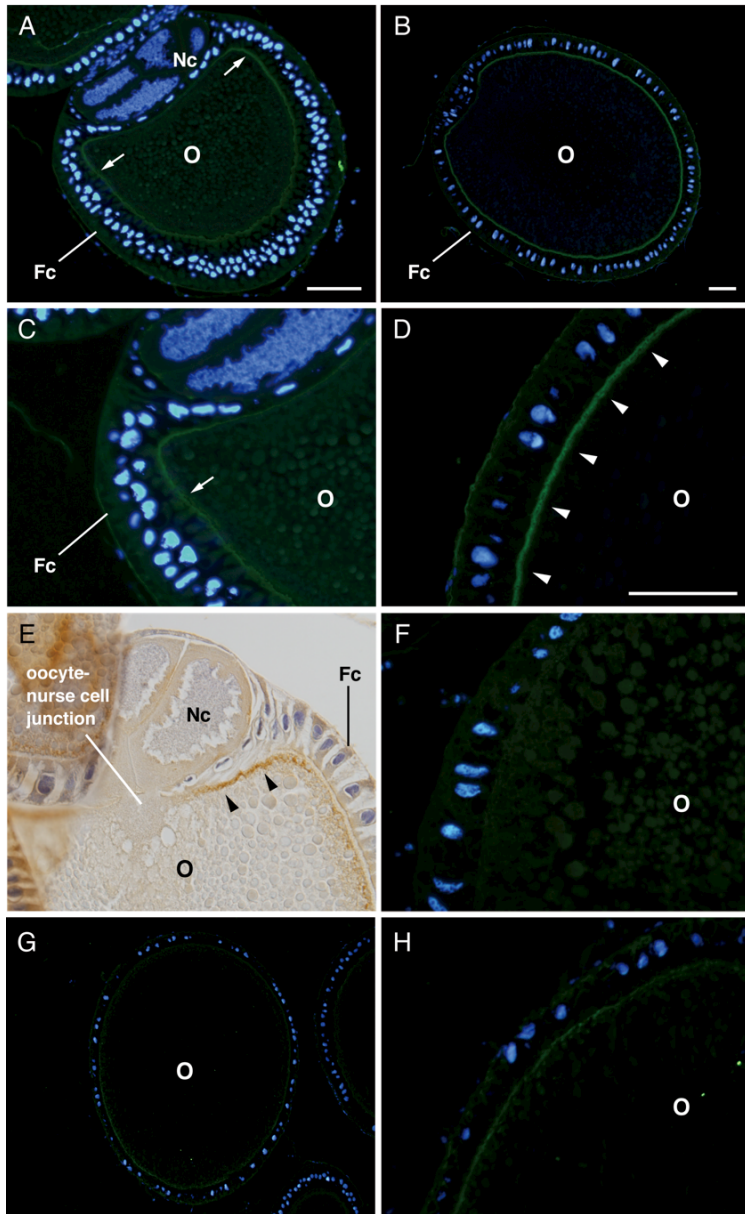


Fig. 12.

AQP-Bom3 (PRIP) in a vitellogenic and choriogenic follicle of the silk moth *Bombyx mori*, as determined by immunohistochemistry. (A) Early vitellogenic follicle; weak AQP-Bom3 immunofluorescence at the oocyte surface is denoted by arrows. (B) Fully vitellogenic follicle in which the signal (green) is visible at the oocyte surface. (C) High-magnification view of (A). (D) High-magnification view of (B). White arrowheads indicate the signal at the oocyte surface. (E) Junctional region in an oocyte (O) and nurse cells (Nc). Immunoreactivity (brown DAB deposits) is restricted to the oocyte margin (black arrowheads), while a clear intercellular space is visible between follicular epithelial cells (Fc). (F) Control staining of a fully vitellogenic follicle using preimmune rabbit IgG. (G) Choriogenic follicle from a Day 10 ovary. Immunoreactivity is weakly visible at the oocyte surface. (H) High-magnification view of (G). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue color) except in (E), in which the section was stained with hematoxylin. O, oocyte. Scale bars: 100 μ m (A, B, D). The bar in B applies to G; the bar in D to C, E, F, and H.

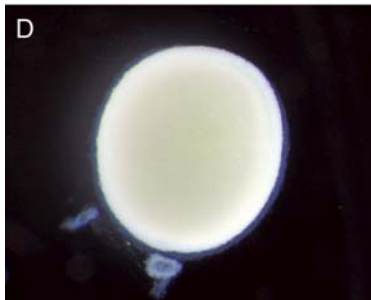
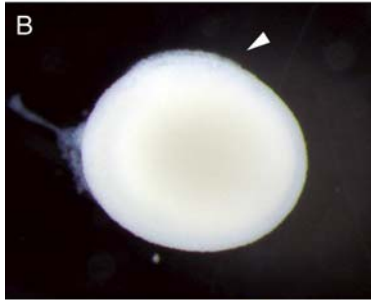


Fig. 13.

Osmotic swelling of a collagenase-treated follicle from the silk moth *Bombyx mori*. Fully vitellogenic terminal follicles were prepared from Day 6 female pupa. Volume changes were monitored under hypotonic buffer (1/10 MBS) conditions. Images show follicles (A) immediately following transfer to hypotonic buffer; (B) after 30 min; and (C) after 60 min. Arrowhead denotes volume changes in a partially naked oocyte. Amorphous, fluffy follicular epithelial cell clusters were observed at the surface. (D) Oocyte 60 min after transfer to hypotonic buffer (1/10 MBS) containing $0.9 \text{ mmol l}^{-1} \text{ HgCl}_2$. Scale bar: $100 \text{ }\mu\text{m}$ in (A). The pictures show a typical result from five different preparations.

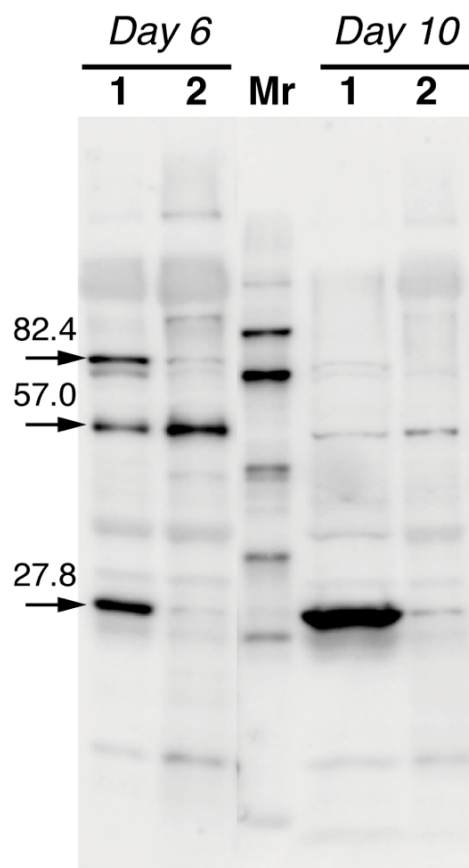
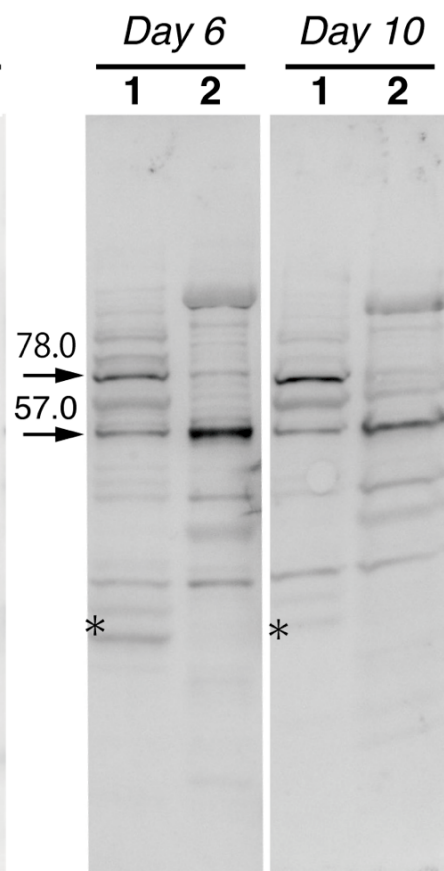
A**B**

Fig. 14.

AQP-Bom1 (DRIP) present in membrane fractions prepared from vitellogenic (Day 6) and choriogenic (Day 10) follicles from the silk moth *Bombyx mori*. Fractions were collected by sucrose density gradient centrifugation from Day 6 and 10 ovaries. (A) Membrane fractions (20 µg protein/lane) were resolved by 12% SDS-PAGE and immunoblotting. Lane 1: upper 20% sucrose zone (Band 1); lane 2: 20%/30% sucrose interface zone (Band 2). The 27.8-kDa DRIP polypeptide was abundantly recovered from the upper 20% sucrose zone from Day 10 ovaries. (B) Immunoblotting with the anti-(AQP-Bom1) antibody preabsorbed with the antigen peptide (500 µg ml⁻¹). The 27.8-kDa polypeptide band disappeared from lane 1 (*) in both Day 6 and 10 ovary preparations, whereas minor signals at 57.0 and 78.0 kDa remained and were thus deemed nonspecific. The difference in the estimated molecular mass in panels A (82.4 kDa) and B (78.0 kDa) was due to the different gels used for electrophoresis. Mr, protein marker (150, 100, 75, 50, 35, 25, and 15 kDa).

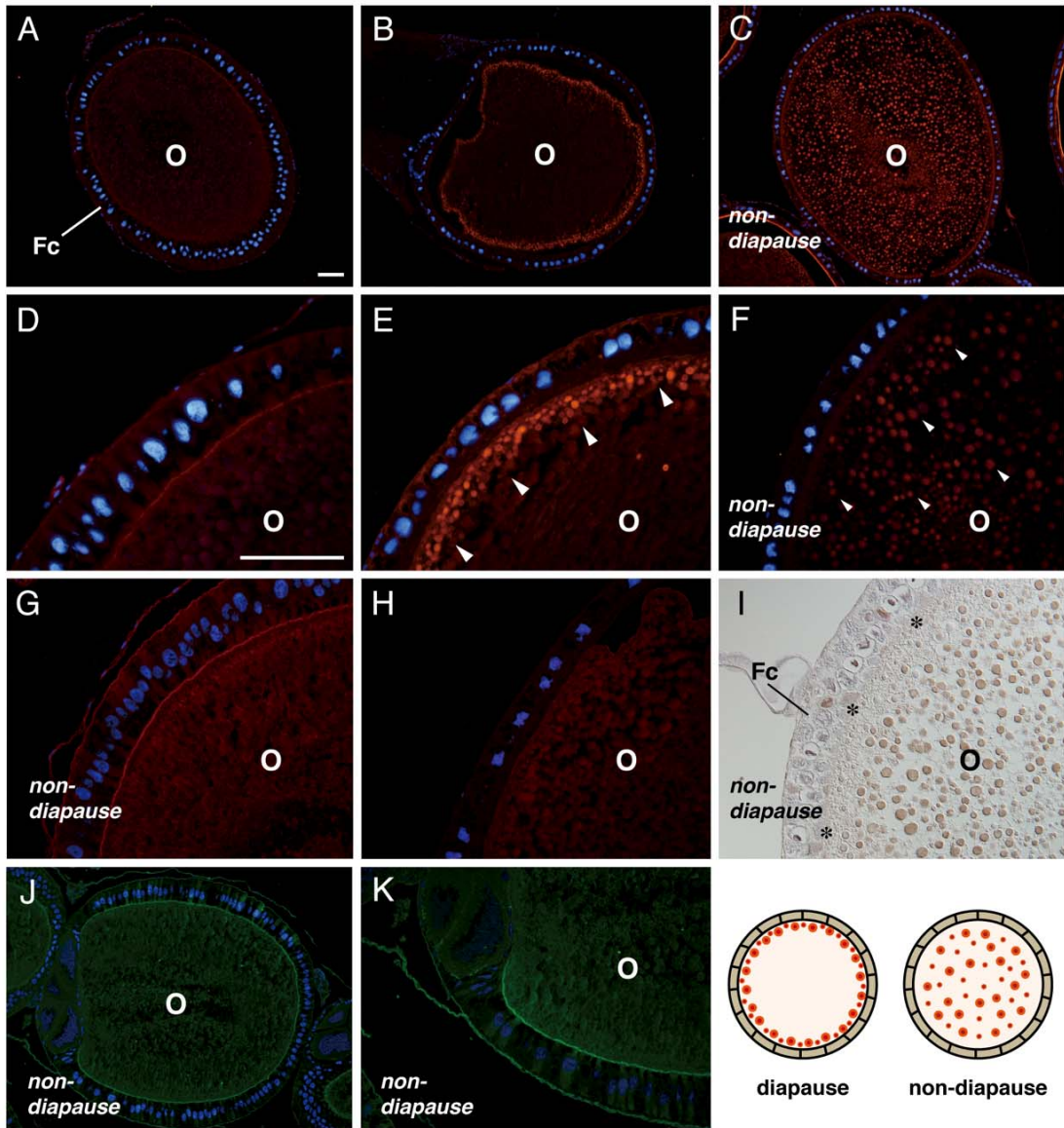


Fig. 15.

AQP-Bom1 (DRIP) (A) ~ (G), (I) and AQP-Bom3 (PRIP) (J), (K) expression during ovarian follicle development in the silk moth *Bombyx mori*. (A) Fully vitellogenic follicle from a Day 6 ovary. (B) Choriogenic follicle from a Day 10 ovary. Immunoreactivity is visible at the oocyte cortex. (C) Non-diapause-destined follicle from a Day 10 ovary; the red immunofluorescence is detected on yolk granules. (D) High-magnification view of (A). (E) High-magnification view of (B). Periphery of a choriogenic follicle; arrowheads indicate immunoreactive vesicles distributed underneath the oocyte plasma membrane. (F) High-magnification view of (C) showing the periphery of a choriogenic follicle from a non-diapause-destined Day 10 ovary. Immunoreactivity was absent at the oocyte cortex and weakly visible in the oocyte (arrowheads). (G) Non-diapause-destined follicle from a Day 6 ovary. (H) Control staining of the choriogenic follicle periphery using antibody preabsorbed with the antigen peptide done in Figure 14B. (I) Periphery of a choriogenic follicle from non-diapause-destined Day 10 ovary observed by bright field microscopy. DAB labeling is absent in the areas underneath the oocyte plasma membrane (*). (J) Similar AQP-Bom3 (PRIP) expression was observed in non-diapause-destined and diapause-destined follicles from a Day 6 ovary (see Fig. 12B). (K) High-magnification view of (J). O, oocyte; Fc, follicular epithelial cell. Scale bars: 100 μm (A, D). The bar in A applies to B, C, and J; the bar in D applies to E, F, G, H, I and K. *Bottom right:* Schematic illustration of distinct DRIP distribution patterns in diapause-destined and non-diapause-destined follicles during choriogenic phase.

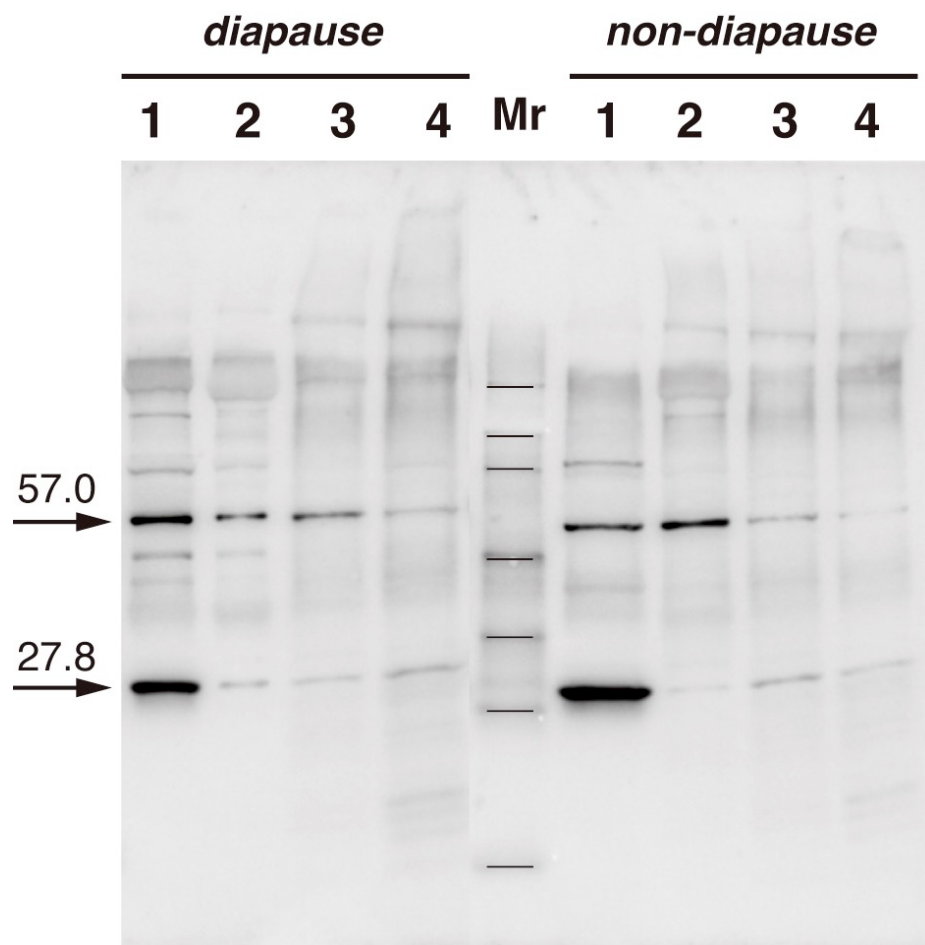


Fig. 16.

Immunoblotting of AQP-Bom1 (DRIP) in membrane fractions prepared from choriogenic follicles from diapause-destined and non-diapause-destined pupae of the silk moth *Bombyx mori*. Lanes 1, 2, 3, and 4 represent membrane fractions recovered from Bands 1, 2, 3, and 4, respectively. A 27.8-kDa polypeptide representing the AQP-Bom1 was detected in Band 1 from both preparations. The 57.8 kDa polypeptide is nonspecific. Mr, protein marker (150, 100, 75, 50, 35, 25, and 15 kDa).

考 察

セクロピアサン, そしてカイコの卵巣は多栄養室型卵巣小管からなり, それぞれの卵巣小管は様々な発育段階の卵胞を含む。卵胞は卵黄形成期で十分な内容物の取り込みを行い, サイズを発達させた後に卵殻形成期へと移行し, ビテリン膜の形成, そして卵殻の分泌を行い (Swevers et al, 2005; Telfer, 2009), 産下後の乾燥に耐えうる堅牢な防水性の卵殻を構築して完成卵へと至る (Woods, 2010)。この章ではカイコの卵形成を通じた *Bombyx* PRIP (AQP-Bom3) と *Bombyx* DRIP (AQP-Bom1) の経時的, 空間的な分布とその卵形成における生理的役割を調査した。

卵黄形成期では卵母細胞を取り囲む濾胞細胞の間に光学顕微鏡で確認できるほどの隙間が広がっている。AQP-Bom3 (PRIP) は卵母細胞膜に存在していたが, タバコスズメガの報告では H^+ V-ATPase もこの卵母細胞に発現している (Janssen et al., 1995)。卵殻形成期では濾胞細胞の間は狭まり, まず卵母細胞と血リンパの接触が断たれ, それに続くビテリン膜の形成で卵内容物の取り込みは終了する。この時期でも AQP-Bom3 は発現しているが, 物理的な障壁の構築と H^+ V-ATPase の発現の減少 (Jassen et al., 1995) から水輸送を行っているとは考えがたく, 卵の成熟に先駆けて吸水は終了していると考えられる。蛹 6 日齢, 10 日齢の卵巣からの膜分画調製には同じ重さの卵巣を用い, SDS-PAGE 分析に使用したタンパク量も同量にしているので, 発育に伴って全タンパク量中の AQP-Bom3 の占める割合は減少しているようである。だが卵殻形成期の卵巣小管では, 卵殻が重量に占める割合にも考慮する必要がある。卵黄形成期の終わりから卵殻形成期への短期間に急激な吸水が起こるとの言及があるが (Telfer and Rutberg, 1960; Telfer and Anderson, 1968; Wang and Telfer, 1998), おそらくこの時期を内容物の取り込みの最終フェーズとして卵母細胞は閉鎖系へと向かうのであろう。卵巣の AQP (特に PRIP タイプの AQP) はゴキブリ

(*BgAQP1*, Herraiz et al., 2011) とハマダラカ (*AgAQP1*, Liu et al., 2011) で発現していた。さらにハマダラカでは卵巣のみで発現する特異的な *AgAQP1A* バリエントが存在し, 転写産物である *AgAQP1A* タンパクは細胞内での局在がはっきりしないものの卵管で検出され, 卵母細胞では検出されていない (Tsujimoto et al., 2013; Fig. 17)。ハエ目もチョウ目と同じく多栄養室型卵巣小管を有するが (松崎・栗原, 1996), 卵巣内における PRIP タイプ AQP の機能はカとガでは異なるようである。またチャバネゴキブリにおいて, PRIP タ

イプ AQP (*BgAQP1*) は大部分が成熟した卵母細胞に発現していた。この *BgAQP1* は水に加えてある程度の尿素も通過させる (しかしグリセロールは通過させない) という変わった性質を持つが、メスの消化管やマルピーギ管ではほとんど発現していない (カイコの GLP, *AQP-Bom2* mRNA は中腸, マルピーギ管で発現している)。また *BgAQP1* の RNA 干渉を行っても卵の表現型, 生存率にほとんど変化が見られなかったことから他の AQP (*Blattella* DRIP?) が卵形成に関与している可能性にも言及している (Herraiz et al., 2011)。これらの卵形成に関する PRIP タイプの先行研究に加えて, 今回の結果で AQP の昆虫卵形成における具体的な生理機能の解明について一歩進めることが出来たのではないか。PRIP タイプの AQP はカメムシ目カスミカメムシ科の 1 種, *Lygus hesperus* でも報告された (Fabrick et al., 2014; Fig.17)。カメムシ目は一般的に端栄養室型卵巣小管を有し (松崎・栗原, 1996), 卵巣小管の種類による AQP 発現の違い, 機能の差などが生じるのかどうか報告が待たれる。

さらに DRIP タイプである *AQP-Bom1* が卵殻形成期の卵母細胞で検出され, 卵母細胞表層直下の卵黄顆粒に局在していた。卵殻形成期として設定した蛹 10 日齢 (交雑種ではおよそ 2 日後に羽化を迎える) では休眠ホルモンが作用していれば, 全ての卵胞が休眠卵として運命付けられている (Yamashita and Yaginuma, 1991)。この *AQP-Bom1* を含む卵黄顆粒の意義は明確ではないが, ひょっとしたら産下後の胚発育の停止と関係しているのではないだろうか。休眠予定卵では *AQP-Bom1* を含んだ卵黄顆粒は卵母細胞表層に集合しているが, その一方, 食道下神経節を除き休眠ホルモンフリーの条件で発育した卵ではこの集結は観察されなかった。休眠卵は呼吸を抑え, 代謝活性を下げることで蒸発による水分の損失を避ける (Yamashita and Yaginuma, 1991)。*AQP-Bom1* は休眠卵が産下後から孵化までの長期の乾燥と低温に耐えるための水分の保持に機能しているのかもしれない。

カイコの卵形成において AQP は比較的長い間タンパク質として存在しているようであった。だが *AQP-Bom3* が担う卵母細胞の吸水などでは発現している時期を通じ, 同様に機能しているとは考えがたく, 機能調節の機構について明らかにすることが今後の課題の 1 つである。

この章までは同定されたカイコ AQP のうち水選択的 AQP, *AQP-Bom1* と *AQP-Bom3* について述べてきたが, GLP タイプである *AQP-Bom2* の中腸やマルピーギ管における発

現, そして卵形成への関与も明らかとなりつつある。そこで次章では AQP-Bom2 の消化・排泄系における発現解析と卵形成での機能を調査した。

AQP-Bom3 MGELGTLKGLDELTGGAAT-LSRALLAEFFIGNLLNLLFGCCACVKISLES-----NSE-----
 AaAQP2 MGTSYKLGMDDELSSGRSSNSLWKALVAEFTGI FLLNFFGCAACTHA-----A-----
 AgAQP1B MGYSLGTEELSSKSSG-LWRALLAEFVGI FLLNFFAACAACTHA-----N-----
 AgAQP1A NTMGYSLGTEELSSKSSG-LWRALLAEFVGI FLLNFFAACAACTHAN-----
 PvAQP1 MAFKYSLGADDEKKGKTGTSLWKALFAEFTGI FLLNFFGCAACTHAK-----
 BaAQP1 MTMKYTLGANELSAKTHN-LWKSTLAEFTGI FLLNFFSACAACQAQAFKGTGIDTYTRITILANGTDSPEIVAENI
 BgAQP1 MAGFNVQERLGMEDTKRG---LWKALLAEFTIGNLLNYYGCAASCIAWTKDTPESVTPENEHVENPR-----
 EsAQP1 MPQKFDYSLGLDHEKSKKEHR-LWQALVAEFTIGNLLNFFAACAACQTP-----
 LhAQP4B MPDKRSRVNTLVGMNEEA--RAGDLCKAVVAEALGTLFTNYFGIMSCIALV-----P-----
 PRIP MGGFSEVVGINEFKTKRES-LWKALLAEFVGNILNYYFGCAACSCMMIAPNVAK-----P-----
 LhAQP4A MPDKRSRVNTLVGMNEEA--RAGDLCKAVVAEALGTLFTNYFGIMSCIALV-----P-----
 AQP-Bom3 --TDILLIATAFGLAVFAAVS AIGHISGGHINPAVTA GMLCTGRTKILTRAVLVVIVOCAGAAAGSGLIKALTPD-RMAG
 AaAQP2 --GDKTLISLAFGLSVFMVMSI GHSIGGCHINPAVTA GMLAAGKVSILRALM VVAOOCAGAVAGTASIKALLPE-AYQN
 AgAQP1B --GDKTLISLAFGLSVFMVMSI GHSIGGCHINPAVTA GMLAAGKVSILRALM VVAOOCAGAVAAATAIDVLI PK-SFQN
 AgAQP1A --GDKTLISLAFGLSVFMVMSI GHSIGGCHINPAVTA GMLAAGKVSILRALM VVAOOCAGAVAAATAIDVLI PK-SFQN
 PvAQP1 --GDEVLIATAFGLSVFMAAMTIGHVSGCHINPAVTFGLLAAGKVSILRALFVYLAOCVGSVAGTASLAVLTNGTEIAI
 BaAQP1 FANDLTLLIATAFGLSVFMAAMTIGHVSGCHINPAVTFGLLAAGKVSILRAVYVVAOOCAGAAAGVASINALVSGVAGAG
 EsAQP1 --ANHLVVALFGLVIMAVQSIGHVSGAHVNPVTCAMITGNLALIKGFLYVIAOOCGLSAGTAVIKAFTPNGTQ GK
 LhAQP4B --EGGTFKALAFGLAVFIATVIGNISGGHVNPAVTCGLLVAGRVVLRVAVYVIAOOCGLSAGTAAIRTLIDE-EYYG
 PRIP --GNLVQLSTLFCGFVVMVSVQALGHVSGGNINPAVTCGLLITGRTITIRAAVYVIAOOCGLAIGCAAMAKFFTPEDKVG
 LhAQP4A --GNLVQLSTLFCGFVVMVSVQALGHVSGGNINPAVTCGLLITGRTITIRAAVYVIAOOCGLAIGCAAMAKFFTPEDKVG
 AQP-Bom3 --S LGCNTSLGVDVTELOGGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSKATAPLAIGLTVTLGHLAVDMVTGSSMNPARSFGS
 AaAQP2 --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 AgAQP1B --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 AgAQP1A --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 PvAQP1 --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 BaAQP1 PRGLGNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 EsAQP1 --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 LhAQP4B --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 PRIP --K LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 LhAQP4A --G LGCNTSLKENVDDMOGIEFFLGLFLLVFLVCGVCDANKPDSRFVAPLAIGLTVTLGHLGVVETGSSMNPARSFGT
 AQP-Bom3 ALVNASNWSHHWYWGAPLGGIAGALLYVHGFTAPPQ-----PPTRYRSVAGDE---KELRLEDGGKLDMA
 AaAQP2 AFTGDNWANHWYWGAPLGGICASLLYCOVEKAPQEGE---SASERYRVAADK---ELKRLEDGKRDMA
 AgAQP1B AFTGDNWANHWYWGAPLGGVTAALLYCQLEKAPTAS-----DASERYRTSADDK---EMRRLEDGKHMA
 AgAQP1A AFTGDNWANHWYWGAPLGGVTAALLYCQLEKAPTAS-----DASERYRTSADDKVEMLNLMKHAALLESVITTT
 PvAQP1 AFTGDNWANHWYWGAPLGGIAGALLYSIFFSAPDIEV-----HRS DKYRQVTQND---KELRLEDGSA
 BaAQP1 ALITGNWWEHWYWGAPLGGVAAALLYVLAFAAPEIDS-----HAPEKYRQVTDDK---EMRRLEDNA
 BgAQP1 AVVSGIWS DHVWYWGAPLGGCSAGLLYKYVLSAAPVE-----TTEYS PV-----OLKRLEDKKEEDGMP
 EsAQP1 AFAVHNWDAHWYWGAPLGGIAGALLYTQLEKPLVHTAVKVI EYSEKYRTHADDR---EMKRLEDSTRDYA
 LhAQP4B VAMINKNWDAHWYWGAPLGGIAGALLYQFVLSAPPQ-----YSQVPGESS---TEMKRLEDKGNENSNA
 PRIP SVIINNDWEDHWYWGAPLGGIAGALLYKYVFAAPPPTGPL---KIERVYAVV TDE---KELORLAGGKQDESDP
 LhAQP4A VAMINKNWDAHWYWGAPLGGIAGALLYQFVLSAPPQEYSQVPGESS TEVRIKVLDPDESS EMKRLEDKGNENSNA

	AQP-Bom3	AaAQP1	AgAQP1B	AgAQP1A	PvAQP1	BaAQP1	BgAQP1	EsAQP1	LhAQP4B	PRIP	LhAQP4A
AQP-Bom3		56.8	56.4	53.6	52.4	50	49.1	48.4	46.3	44.9	44.5
AaAQP1	56.8		79.4	73	65.4	58.7	44.5	54.5	44.6	43	43.6
AgAQP1B	56.4	79.4		90.9	63.5	60.2	42.8	56.6	41.8	40.5	41
AgAQP1A	53.6	73	90.9		62	58.2	41.3	52.9	40	38.8	39.9
PvAQP1	52.4	65.4	63.5	62		61.8	42.7	52.3	42.7	41.6	41.6
BaAQP1	50	58.7	60.2	58.2	61.8		40.5	50.7	37.2	38.9	36
BgAQP1	49.1	44.5	42.8	41.3	42.7	40.5		38.2	45.6	42.2	43.9
EsAQP1	48.4	54.5	56.6	52.9	52.3	50.7	38.2		40.7	35.6	41.1
LhAQP4B	46.3	44.6	41.8	40	42.7	37.2	45.6	40.7		37.3	91.7
PRIP	44.9	43	40.5	38.8	41.6	38.9	42.2	35.6	37.3		36.2
LhAQP4A	44.5	43.6	41	39.9	41.6	36	43.9	41.1	41.1	36.2	

Fig. 17.

Multiple amino acid sequence alignments of the third *Bombyx mori* aquaporin protein (AQP-Bom3 [PRIP]). Realignment was done with additional data, AgAQP1A (JF342682: *Anopheles gambiae* aquaporin ovarian splice variant) , BgAQP1 (FR744897: *Blattella germanica*), LhAQP4A, LhAQP4B (KF048099 and KF048100: *Lygus hesperus*).

第 3 章

昆虫アクアグリセロポリン (Group 3 subfamily) の 特質とカイコでの存在 (幼虫中腸と卵形成期での動態)

哺乳類のアクアグリセロポリンは AQP3, AQP7, AQP9 および AQP10 の 4 種類があり、それぞれ組織における機能解析が進んでいる。例えば AQP3 は腎臓の尿濃縮や皮膚の水分保持、結腸での細胞新生を担っており、AQP3 遺伝子欠損マウスでは腎臓においては多尿、皮膚では水分量や弾力性の低下、創傷治癒の遅延、そして結腸では出血を伴う激しい大腸炎を起こして死亡する、といった破綻が観察される (Rojek et al., 2008)。AQP7 は脂肪組織でのグリセロール排出、そして腎臓ではグリセロールの再吸収に機能する。AQP9 は精巣や脳での発現が分かっており、AQP10 はヒトの消化管 (マウスでは偽遺伝子として存在) などで確認されている (小池, 2008; 石川, 2008; Rojek et al., 2008)。

昆虫のアクアグリセロポリンは報告が少なく、実際にグリセロールや尿素の輸送能が証明されたものは、昆虫で最初にクローニングされたアクアグリセロポリンであるカイコの AQP-Bom2 (Kataoka et al., 2009a) とナシヒメシクイの AQP-Gra2 (Kataoka et al., 2009b), エンドウヒゲナガアブラムシの ApAQP2 (Wallace et al., 2012), そしてごく最近、ネッタイシマカから報告された 2 種類の AQP (Drake et al., 2015) のみである。機能解析がなされた AQP において、アミノ酸配列の相同性を用いた分類では上記の他、ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) の PvAQP2 (Kikawada et al., 2008) とオオサンガメ (*Rhodnius prolixus*) の RpMIP (Echevarría et al., 2001) が含まれるが、この 2 種はグリセロールと尿素の輸送能が示されていない。これらの昆虫 AQP は系統分類によるとグループ 1 (DRIP subtype と PRIP subtype) やグループ 2 (Bib) とは異なるクラスターであるグループ 3 に属する (Kambara et al., 2009)。

カイコの AQP-Bom2 は幼虫の中腸とマルピーギ管で mRNA 発現が確認されていた (Kataoka et al., 2009a; Fig. 6)。しかし、中腸には第 1 章や第 2 章でも述べた DRIP タイプ (AQP-Bom1) も発現するので、この両者について中腸での存在について調査することとした。中腸上皮は主に円筒細胞 (columnar cell) と杯状細胞 (goblet cell) から構成され、円筒細胞は消化・吸収、杯状細胞はイオン輸送・浸透圧調節に機能すると広く理解され

ている (Dow, 1986; Terra and Ferreira, 1994)。さらにチョウ目昆虫の幼虫中腸は前腸の方から機能的・構造と形態によって少なくとも前部・中部・後部, 3つの領域ではたらきが異なる, と考えられていた (赤井, 1976; Cioffi, 1979; Gomes, et al., 2013)。中腸は幼虫の中でも大きな組織であるので, 第3章では3つの部位に分けてAQPの分布を調べることにした。

これまでの第1章および第2章ではグループ1に属する水選択的AQP (DRIPおよびPRIP)のみを調査し, もう1種類存在するAQP-Bom2 (GLP)について取り上げなかった。第3章ではこのGLP subtype, AQP-Bom2について水選択的なAQPとの異同があるか, カイコ幼虫中腸を用いて調べるところから取り掛かることとした。

中腸を構成する細胞は, 中腸の部位によってその形態が少々異なる。円筒細胞の場合, 前部では分泌型の形態を取り, 中部から後部にかけては微絨毛膜 (microvilli) を有した吸収型の形態をとる (東, 1995)。後腸は水分吸収に特化した機構を持っていると第1章で示したが, 中腸では水分だけでなく栄養分の吸収も行われている。したがって水のみでなく尿素やグリセロールも輸送するGLP subtypeの特質を捉えやすいと考えた。さらに本章では, 卵巣でもGLP subtypeの卵形成への関与の有無について調査した。

材 料 と 方 法

実験昆虫、抗体の精製、オルガネラの調製は第2章と同様に行い、使用した卵巣については第2章と同様に用意した。

また、V-ATPase 抗体はタバコスズメガの中腸の V-ATPase ホロ酵素に対する抗血清を抗体として用い、特に IgG への精製などは行っていない。

なお、中腸は下記の方法にて採取・固定した。交雑種を用い、主に絹糸腺が肥大成長する前の盛食期（5 齢3~4 日齢）幼虫から採取した。幼虫を氷冷麻酔した後、中腸組織を破らないよう皮膚を腹面側（ventral）から切り開き、緩衝液を滴下し体液を洗い流した。続いて固定液を同様に滴下し、中腸を摘出する前に軽く固定をして、中腸内容物が入ったままの組織の形状をなるべく残した。中腸へ走向している6対の気管系の位置を確認して、前腸に一番近い中腸前部（Midgut-anterior : MGI）、3対のマルピーギ管が折り返している領域を中腸中部（Midgut-middle : MGIII）および、後腸に近い中腸後部（Midgut-posterior : MGIV）の3カ所をマルピーギ管が張り付いている状態のまま切断し、それぞれの領域へ走向している黒色の気管系（tracheal system）をピンセットでつまみ、氷冷固定液の入ったシャーレへ投入した。

in situ hybridization

人為的なヌクレアーゼの混入を避けるために、必要に応じて手袋やマスクを着用した。なお、特に断らない限り試薬はRNA実験専用を購入準備し、調製した溶液は、必要に応じ RNase-free にするために DEPC 処理を行った。

(a) 組織の固定・脱水・パラフィン包埋

(1) 上記手順に従って中腸組織の各領域を採取した。なお、解剖に使用するピンセット・眼科用ハサミなどの器具類は特に滅菌処理していない。滅菌済みプラスチックシャーレ（直径 6 cm, FALCON®3002）に固定液（4% PFA/PBS[†]）を入れ、あらかじめ氷冷下に置いた。

[†]4% PFA/PBS :

8% PFA*	50 ml
10 × PBS (DEPC)	10 ml
DEPC-H ₂ O	40 ml
- kept on ice until use	

*8% paraformaldehyde :

PFA (TAAB for Electron Microscopy)	4 g
DEPC-H ₂ O	50 ml

- microwave oven (warm up to 60~70°C)

- add 2 M NaOH 50~100 μl, mix well, dissolve totally

昆虫は灌流固定をしないため溶液が透明であれば、白い微粒子がマイエル底に残っていてもよい。

(2) 3つの領域を解剖ハサミで切断すると直ちに中腸内容物が溶出してくるが、囲食膜（peritrophic membrane）に包まれた中腸内容物を取り除くと中腸組織が収縮することが多いので、最初の固定液中ではそのまま静置する（中腸組織と付着するマルピーギ管を傷つけないように注意）。

(3) 30~60 min ほど固定液中において中腸組織が固くなったのを確認してから、新しい固定液を入れた 6-Well Tissue Culture Plate（FALCON®3046）へ組織を傷つけないように注意深く移した。中腸組織へは無数の気管系が張り巡らされているので、アスピレーターで軽く脱気して、固定液の浸透を確実なものにさせた。固定液の液量は、組織容（tissue mass）の20倍以上を目安とし、冷蔵庫内で一晚（16~20 hr）固定した。6-Well Tissue Culture Plate なら周囲をパラフィルムで封じておく（サンプルに応じて 50 ml 容 Corning®チューブでもよい←液量は 20~30 ml）。

(4) 翌日、固定液をメスピペットまたはデカンテーションによって、組織を傷つけないよう注意しながら捨て、PBS-DEPC を穏やかに加え、室温で振盪させた（10 min, 3 回）。この洗浄のステップで 6-Well Tissue Culture Plate から Corning®チューブ（50 ml 容）へ替えてもよい。

- (5) 25% MeOH/PBS-DEPC を加え (Corning®チューブなら 20~30 ml) , 10~30 min 穏やかに振盪させた。振盪時間は大きな組織ではより長めに行った。
- (6) 同様に, 50% MeOH/PBS-DEPC → 75% MeOH/PBS-DEPC →100% MeOH とメタノール濃度を順次上げて脱水した (各ステップ 10~30 min) 。
- (7) 100% MeOH をもう 2 度交換した。脱水の各ステップの時間は組織の大きさに応じて変えた。
- (8) Xylene を入れたサンプル瓶 (ガラス製の透明なサンプル瓶を使用, 20~30 ml 容程度のサンプル瓶) にシャーレから組織を移し, Xylene を浸透させた (30 min, 2 回) 。1 回目の Xylene の際, 軽く脱気した。
100% Xylene 中では RNase は働かないので, 乾熱滅菌をしていないサンプル瓶を使用しても問題ない。
- (9) あらかじめ約 60°C に保った恒温器内で溶解した Paraplast Embeding Media® (Paraplast Regular, Sigma) 中に脱水した組織を浸漬した (30~60 min, 60°C) 。Paraffin は必ず前日から恒温器内で溶解させて準備しておく。
- (10) 溶解させてある別の Paraplast® へ組織を傷つけないように注意して移し換えることを 2 回行い, パラフィンの固定組織内への浸透を完全なものとした。
- (11) 合計 3 回の Paraplast® への浸透後, その組織試料を新しい Paraplast® を満たした陶器製の包埋容器へ, なるべく組織の方向性が分かるよう包埋し, 室温で静置して固化させた。試料名を鉛筆書きで記した短冊状のタグもその包埋容器へ差し込んで固化させた。直ちに実験に使用しない場合は, 包埋ブロックを冷蔵庫に保管した (固化する前に冷蔵庫へ入れると気泡や亀裂が入るので注意) 。

(b)パラフィン切片の作製と脱パラフィン操作 (免疫染色とほぼ同様の手順であるが一部異なる)

- (1) パラフィンに包埋された組織は, その方向性, 組織 (中腸・後腸など) の部位に留意してトリミングし, 包埋組織周辺のパラフィンを少し溶解させ, 木製の台木に接着させた (少なくとも切片作製の前日に行い, 冷蔵保存してブロックを十分に冷やしておく, 夏場は注意!) 。
- (2) ミクロトーム (大和光機工業株式会社製) を用いて, 台木に取り付けた包埋組織ブロックから厚さ 5~6 μm の連続切片を作製した。パラフィン伸展器を 40°C に設定し, あらかじめ DEPC-H₂O を滴下しておいた新品のスライドガラス (APS コート付, SUPER-FROST®**in situ* 専用, 松波硝子株式会社) 上に, その連続切片をシワが出来ないように注意して浮かべた。
- (3) スライドガラス上の切片は, ハイブリダイゼーションのステップを念頭に, フロスト部分を上とするならスライドガラス中央からやや下よりになるべく整然と並べ, 十分に伸展させた。40°C に保ち, 一晩静置して乾燥させた。
- (4) 翌日, 切片を展着させたスライドガラスを乾熱滅菌済のステンレス製の染色カゴにセットして脱パラフィン操作を行った。脱パラフィン操作は以下の流れで行う。Xylene (15 min, 2 回) → 100% MeOH (15 min, 2 回) → 90% MeOH (PBS-DEPC で調製) → 75% MeOH (PBS-DEPC で調製) → 50% MeOH (PBS-DEPC で調製) → 25% MeOH (PBS-DEPC で調製) と, 各々のステップを 10~15 min ずつスライドガラスを段階的に浸漬し, 脱パラフィン処理した。
- (5) スライドガラスを PBS-DEPC (5 min, 3 回) に浸した。

(c) 切片の前処理

(1) -20°C に保存した分注済みの Proteinase K stock solution* を融解させ水中に置いた。

*Proteinase K stock solution (20 mg/ml, 1000-fold)

- directly add proteinase K buffer** (2 ml twice; 0.5 ml, twice, up to 5 ml) to the package bottle of Proteinase K (Boehringer 745 723), making up to 5 ml (100 mg/5 ml)
- filtrate through Millex GV (0.22 μm)
- 160 μl aliquots kept at -20°C (29 tubes)

**Proteinase K buffer = TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8, RNase-free- H_2O , 100 ml)

- prepare "RNase-free bottle": an empty bottle which had already been made for DEPC- H_2O

1 M Tris-HCl (pH 8) † 1 ml

0.5 M EDTA (pH 8) †† 0.2 ml

DEPC- H_2O 98.8 ml

† 1 M Tris-HCl (pH 8) 12.114 g of Tris (use "RNase-free bottle")

DEPC- H_2O 90 ml

6 M HCl ca. 9.5 ml

- make up to 100 ml with DEPC- H_2O

- autoclave at 121°C for 30~40 min

†† 0.5M EDTA (50 ml, pH 8, DEPC) 9.306 g of EDTA- Na_2

- add 40 ml D.W.

- add 5 M NaOH, make up to 50 ml

- DEPC 50 μl

- well mix at 37°C for 2~3 hr

- autoclave at 121°C for 40~50 min

(2) スライドガラスのフロスト部分に日付, サンプル名, Proteinase K 処理の条件等をシャープペンシルで記入した (Proteinase K 処理は組織中の RNA を露出させる過程なので, 処理時間の最適化が必須!)。

(3) 乾熱滅菌した染色壺 (Wide-size) へ Proteinase K/PBS† (作製した 100 ml 全量) を加え, あらかじめ 37°C 下に置いた (酵素処理なので温度条件に注意する, 昆虫組織では 25°C が適切な場合もある)。

†Proteinase K/PBS (10~20 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 100 ml 作製)

- prepare 200 ml-size of the Erlenmeyer flask (sterilized)

- add 10 ml of $10 \times$ PBS (DEPC) and 90 ml of DEPC- H_2O

- add 80 μl of Proteinase K stock solution* (final 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ←100 μl 加えると 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

(4) 5~30 min 処理後, PBS-DEPC を入れた染色壺 (Wide-size) へ切片を移した。

(5) 時々, 軽く揺すって PBS-DEPC を捨てた (1 回目の洗浄は 2~3 min 程度)。

(6) 新しい PBS-DEPC を加えて, ゆっくりと振盪させた (5 min, 3 回)。

(7) 当日調製した 4% PFA/PBS (100 ml) を乾熱滅菌した染色壺 (Wide-size) へ入れ, そこへスライドガラスを 1 枚ずつ展着している切片に注意しながら投入し, 室温で 20~30 min 固定させた。

(8) 固定液を捨て, PBS-DEPC での洗浄を繰り返した (5 min, 3 回)。

(9) 再度, 25% MeOH (PBS-DEPC で調製) → 50% MeOH (in PBS-DEPC) → 75% MeOH (in PBS-DEPC) → 100% MeOH, と各ステップを 10~15 min ずつスライドガラスを段階的に浸漬し脱水処理した。

100% MeOH を終えたスライドガラスは乾熱滅菌した染色壺に立てて風乾させた。

(d) Hybridization

(1) Pre-hybridization solution[¶]が十分にあるかどうかを確認し、足りなければ25 ml ずつ分注してある Formamide# を -20°C から取り出して溶解させておいた (55~65°C にセットしてあるハイブリダイゼーションインキュベーターを使用, 2 台使用すると便利)。

[¶]Pre-hybridization solution (50 ml) : 50% Formamide, 5 ×SSC, 1% SDS

Formamide#	25 ml
20 × SSC (pH 6 or 7)	12.5 ml
10% SDS	5.0 ml
DEPC-H ₂ O	7.5 ml

#Formamide (Fluka47671, Ultra for molecular biology) をそのまま使用

Store in 25 ml aliquots at -20°C with Corning® tube (50 ml size)

組織切片の *in situ* hybridization においては, Whole mount *in situ* hybridization (Miyake and Azuma, 2008) とは異なり, Pre-hybridization blocking step は通常必要ない。[¶]Pre-hybridization solution は^{¶¶}Hybridization solution を調製するためのベースにしているだけである。

(2) RNAプローブ (anti-sense probe および sense probe) は, Hybridization solution^{¶¶}で 200~400 ng/ml の濃度に希釈する。使用する際には, 沸騰水浴中で 5 min 加熱処理した後, 温度設定を高めにしたハイブリダイゼーションインキュベーター (~65°C) にて加温しておく。

^{¶¶}Hybridization solution :

50% Formamide, 5 × SSC, 1% SDS, 200 µg/ml tRNA, 50 µg/ml Heparin

Formamide#	25 ml
20 × SSC (pH 6 or 7, DEPC)	12.5 ml
10% SDS	5 ml
DEPC-H ₂ O	7.5 ml
20 mg/ml tRNA*	500 µl
20 mg/ml Heparin**	125 µl

*20 mg/ml tRNA (Boehringer 109 495, baker's yeast, 100 mg)

- directly add DEPC-H₂O to the bottle
- make up to 5 ml (100 mg/5 ml)
- filtrate through Millex GV (0.22 µm)
- ca. 500 µl aliquots kept at -20°C (10 tubes)

**20 mg/ml Heparin (Fluka51550, sodium salt, RNase inhibitor)

- directly add DEPC-H₂O to the bottle
- make up to 5 ml (100 mg/5 ml)
- filtrate through Millex GV (0.22 µm)
- ca. 500 µl aliquots kept at -20°C (10 tubes)

(3) 風乾させたスライドガラス, カバーガラス, 湿潤箱[§]を準備する。スライドガラスのフロスト部分にプローブの種類など克明に記載しておく。

[§]滅菌 2 号角シャーレ (栄研器材社製) 内に Drummond®のMicropipette を Xylene で底面に固着させ, スライドガラスを載せるように加工したもの。角シャーレの両端 2 か所にはキムワイブを折りたたんで, Pre-hybridization solution (~2 ml) を滴下させて十分に湿らせておく。

(4) 切片を展着したスライドガラスにプローブを 200~300 µl 添加し, その上からカバーガラスをかぶせ, 水平保持に注意して湿潤箱内に並べ, フタをしてハイブリダイゼーションインキュベーター内へ速やかに入れた。

1 枚の湿潤箱内に 3 枚並べることが可能だが, プローブごとに湿潤箱を変えた方が混乱は少ない。

(5) 全てのプローブのセットが終わったら, それぞれの湿潤箱をハイブリダイゼーション用の袋などに包み蒸発を防いだ。

(6) 55~65°C で, 一晚 (12~18 hr) 静置した (振盪の必要はない)。

(e) 発色反応によるシグナルの検出

(1) Washing solution (*in situ*)[†] および 2 × SSC を調製し、ハイブリダイゼーションインキュベーター内であらかじめ加温しておく（事前に融解させた Formamide の有無を確認すること）。

[†]Washing solution (*in situ*) : 25% Formamide, 2 × SSC (Fluka47671#250 ml 容瓶を使用)

Formamide (Fluka47671#)	50 ml
20 × SSC (pH 6 or 7, DEPC)	20 ml
DEPC-H ₂ O	130 ml

(2) ハイブリダイズさせているプローブの種類だけ、染色壺 (Small-size, 乾熱滅菌済) を準備し、それぞれに(1)で加温した Washing solution (*in situ*) を約 20 ml ずつ入れて、ハイブリダイゼーションインキュベーター内にセットしておいた。

(3) ハイブリダイゼーションさせたスライドガラスにかぶせたカバーガラスは Washing solution (*in situ*) 中で自然にはがすか、切片がはがれ落ちないように注意しながらはがす。プローブごとに準備した染色壺 (Small-size) へスライドガラスを沈め、65°C で洗浄する (30 min)。切片が Washing solution に浸かっているかをよく確認し、液量が足りない場合、Washing solution を補充した。

(4) それぞれの染色壺内の Washing solution を捨て、新しい Washing solution を約 20 ml ずつ入れて洗浄を繰り返した (65°C, 30 min)。

(5) Washing solution を捨て、ハイブリダイゼーションインキュベーター内で加温しておいた 2 × SSC を加え洗浄した (65°C, 30 min)。この前後で、0.2 × SSC (200~300 ml) を調製し、ハイブリダイゼーションインキュベーター内で加温しておく。

(6) 2 × SSC を捨て、0.2 × SSC を加え、洗浄した (65°C, 30 min, 2 回)。

(7) 0.2 × SSC を捨て、染色壺 (Small-size) を室温に出し、Maleic acid buffer + Tween20 (MABT[†]) を加え、洗浄した (室温, 5 min, 3 回)。

[†]MABT : 100 mM maleic acid (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20

Maleic acid buffer (pH 7.5)	200 ml
20% Tween 20	1 ml

(8) スライドガラスを 1 枚ずつ丁寧に、切片周辺の余分な水分をキムワイプで吸い取る。防湿箱内に並べ、スライドガラス中央に展着している切片へ Pre-block solution^{††} を滴下させ、室温で 2~4 hr 静置させた (スライドガラス上の切片を乾かさないように注意)。

^{††}Pre-block solution : 2% blocking powder, 10% goat serum in MABT (10 ml 調製)

10% Blocking Reagent stock solution	2 ml
Goat serum (Vector Lab.)	1 ml
MABT	7 ml

(9) 上記(8)の操作中に、2 μl の Anti-DIG-ALP を 10 ml の Pre-block solution に加え、1 : 5000 希釈の Working solution を作製した。

(10) Pre-block solution を捨て (ノーザンハイブリダイゼーションとは異なり再利用しない)、Working solution を切片上に滴下し防湿箱に並べる。防湿箱は冷蔵庫内に水平保持に注意して移し、スライドガラス上に液が載っていることを目視確認し、蓋をかぶせ冷蔵庫内で一晩静置させた。

(11) 翌日、室温に戻し、anti-DIG-ALP を捨て (回収しない、余った未使用の希釈した anti-DIG-ALP も 1 週間以内には使い切るようにする)、スライドガラスを染色壺 (Wide-size) へ移し、MABT を加えて洗浄した (10 min, 3~4 回)。

(12) MABT を捨て、Detection buffer (NTMT) †で洗浄する (室温, 5 min, 2 回)。

†NTMT : 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20 (200 ml)

5 M NaCl	4 ml
1 M Tris-HCl (pH 9.5)	20 ml
1 M MgCl ₂	10 ml
20% Tween 20 (←p.23)	1 ml
D.W.	165 ml

(13) Color substrate solution (*NBT/BCIP stock solution 200 µl in 10ml NTMT の割合, と記載されている) を染色壺 (Small-size) へ加え、遮光下で静置した (室温)。染色壺 (Wide-size) を用い節約するなら、Color substrate solution は、NBT/BCIP stock solution 500 µl in 50 ml NTMT で調製する。反応が早いと予想される場合は、2~3 hr 経過後、通常の PBS (免疫組織化学用やタンパク実験用) を入れた染色壺へスライドガラスを移して、一旦反応を停止させ、光学顕微鏡で観察した。一般に中腸組織は一晚暗黒下で静置させた。

*肉眼で見て溶液状態であっても遠心 (10,000 rpm, 30 sec 程度) して、微細な沈殿物を除いて分取すること！

(14)翌日、PBS で2~3 回洗浄することで反応を止めた。最後に 4% PFA/PBS# (または 3.7% ホルムアルデヒド) で 15~60 min 程度処理して、シグナルを固定した。固定液を捨て、PBS を何度か交換して洗浄した。

1 日以上経過した古いものも使用可。発色反応終了後は PBS-DEPC を使う必要はない。

(15) NBT/BCIP の反応物は深青紫色であるので、発色結果の強度に応じて、VECTOR® Hematoxylin Nuclear Counterstain (Gill's Formula, Vector Lab.) による対比染色を行った。

(16) DAPI 染色する場合は、PBS 洗浄の終わったスライドガラスを 2 回、蒸留水で洗浄し、切片の間際まで余分な水分をキムワイプで吸い取ってから、VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Lab.) を 1~2 滴、滴下してカバーガラスで押さえてから蛍光顕微鏡下で観察した。

微分干渉で観察する場合、(15)や(16)のように核を染色する必要はないかもしれない。

実験対象の細胞によって判断する。

(17) DAPI 染色を行わない場合は、PBS 洗浄の終わったスライドガラスを 2 回、蒸留水で洗浄し、切片の間際まで余分な水分をキムワイプで吸い取ってから、免疫組織化学など通常の封入用の脱水シリーズを使用し、70% EtOH→90% EtOH→100% EtOH 3 回→Xylene 2 回と、各々のステップ 5 min ずつスライドガラスを段階的に浸漬し、脱水処理した。100% EtOH から Xylene に移す際は、キムワイプで余分なエタノール分をなるべく吸い取ってから移した。

この脱水処理にはバックグラウンドや非特異的なシグナルを下げる効果もある。しかし、目的のシグナルが弱い場合は脱水過程で、色素が多少溶け出たまま陽性のシグナルも弱くなってしまうことがある。その時は脱水前に蒸留水に浸けていたスライド上の切片にカバーガラスをかぶせ、写真撮影し、その後、脱水処理に移った。

(18)脱水処理したスライドガラスをキムワイプ上に並べ、スライドガラス 1 枚ずつ、封入剤 Mikroskopie

ENTELLAN® neu (Merck) を 1~2 滴ずつ滴下し、カバーガラス (Thickness NO.1, 0.12~0.17mm, 松波硝子株式会社) によって封入した。展着している切片の量 (面積) に応じて適正なサイズ (24 × 32, 24 × 40, 24 × 45 あるいは 24 × 50 mm) のカバーガラスを使用した。

Western blotting と免疫染色は第 1 章と同様に行った。

実験結果

1. 中腸部位による AQP mRNA の発現

カイコ幼虫中腸は組織の容積として体内で大部分を占める (Kajiura and Yamashita 1989) , 比較的長い組織である。よって中腸を前部・中部, および後部に分けてカイコ AQP の mRNA の発現, 特に *AQP-Bom1* と *AQP-Bom2* を調査した。その結果, *AQP-Bom1* は主に中腸の中部で発現し, 2.3 kb のシングルバンドとして検出された。そして *AQP-Bom2* は中部と後部にのみ発現し, 1.3 kb のはっきりしたバンド, および 1.9 kb の薄いバンドとして見出された (Fig. 18) 。なお中腸の前部ではこの 2 つのバンドはあまり確認されなかった。片岡ら (Kataoka et al., 2009a) が報告したノーザンブロット解析の結果, *AQP-Bom1* は後腸で大量に発現し, *AQP-Bom2* は主に中腸とマルピーギ管で発現していた。今回の結果から中腸では主に *AQP-Bom1* と *AQP-Bom2* が発現するが, 中腸部位によって AQP の分布に差があるようであった。この 2 つと比べ, *AQP-Bom3* の発現は中腸でほとんど見られなかった。

2. *in situ* hybridization による中腸上皮細胞内 AQP mRNA の発現観察

幼虫中腸の部位により 2 つの AQP の発現に差が認められたので, さらに詳しく調査するために中腸上皮細胞における AQP mRNA の発現を *in situ* hybridization によって調べた。DIG にて標識した *AQP-Bom1* のアンチセンスプローブを用いた場合, 中腸中部の円筒細胞の細胞質に陽性の反応が検出された (Fig. 19A) 。反応は後部の円筒細胞にも確認できたが, 中部と比較してやや弱いものであった (Fig. 19B) 。また, センスプローブによるコントロール実験ではシグナルは認められなかった (Fig. 19C) 。

DIG にて標識した *AQP-Bom2* のアンチセンスプローブを用いた際, 中腸後部の円筒細胞, 特に微絨毛直下の細胞質 (apical cytoplasm) で強い反応が検出されたが (Fig. 19D) , 中腸前部では *AQP-Bom2* アンチセンスプローブを用いても反応は検出されず (Fig. 19E) , また *AQP-Bom1* アンチセンスプローブでも同様であった。この細胞内における mRNA 発現はノーザンブロット解析で得られたデータを支持するものであり, 2 種類の AQP mRNA は円筒細胞に発現していることが判明した。また, 中腸の部位により空間的に異なった発現をすることも示された。

3. AQP-Bom1 と AQP-Bom2 は円筒細胞の管腔側に発現する

mRNA 発現の実験から AQP-Bom1 と AQP-Bom2 は共に中腸中部と後部の円筒細胞で発現することが示された (Fig. 19A, B および D)。そこで、AQP-Bom1, AQP-Bom2 を認識する抗ペプチド抗体を用いた免疫組織化学を行い、膜タンパク質としての局在を調査した。この抗ペプチド抗体は第 1 章および第 2 章でも使用したものである (Fig. 2)。

中腸中部において、AQP-Bom1, AQP-Bom2 は円筒細胞の管腔側に確認された。とりわけ、一部の微絨毛構造を持たない丸く膨らんだ部位にも見出された (Fig. 20A および B)。比較のため、V-ATPase 抗体を用いた免疫組織化学を行ったところ、杯状細胞の管腔側表層に特異的な反応が検出された (Fig. 20C)。免疫前抗体によるコントロール実験では中腸組織全体において染色されなかった (Fig. 20D)。

中腸後部において、管腔側の上皮細胞は全体を通じ典型的な微絨毛構造を示し (Cioffi, 1979; Gomes et al., 2013), AQP-Bom1, AQP-Bom2 の両者が特異的に検出された (Fig. 21A および B)。AQP-Bom1 の反応は DAB の半定量的な検出の結果から中部のそれよりも弱くなっているようであった (Figs. 20A および 21A)。そして V-ATPase 抗体による検出では杯状細胞の管腔側に非常に顕著な反応が検出された (Fig. 21C)。免疫前抗体を用いた反応では中腸後部のどの場所でも染色は確認されなかった (Fig. 21D)。中腸前部では AQP-Bom1, AQP-Bom2 両方の免疫組織化学で円筒細胞の管腔側に弱い染色が確認されるに過ぎず、V-ATPase を用いた際でも杯状細胞管腔側での反応は弱いものであった。

4. 卵胞の AQP-Bom2 は発育段階によって局在を変化させる

第 2 章で卵胞には AQP-Bom1 と AQP-Bom3 の 2 種類の水選択的 AQP が発現していることを示したが、幼虫中腸やマルピーギ管で発現している AQP-Bom2 が発育中の卵巣では発現しているのだろうか。そこで卵胞での有無を調べることにした。卵黄形成期 (Day 6) では休眠卵となる卵巣, 非休眠卵となる卵巣をそれぞれ 20%~50% の非連続ショ糖密度勾配遠心によって分けた分画を用いたところ、休眠卵と非休眠卵ともに Band 1 の分画に 70.4 kDa のバンドが検出された。さらに休眠卵は Band 2 と Band 3, 非休眠卵では Band 2 と Band 3 に加えて Band 0 (ホモジェネートを重層した部分に残った分画) で 71.2 kDa のバンドが検出された (Fig. 22; Day 6)。このバンドが 2 量体であるのか 3 量体であるかは判

然としないが、おそらくAQP-Bom2 のオリゴマーだと考えられる。卵殻形成期 (Day 10) では休眠卵, 非休眠卵ともに Band 1 で71.2 kDa と 70.4 kDa のバンドがダブルットに検出され, Band 2, Band 3, Band 4 では 71.2 kDa のバンドのみが検出された。また Band 4 のバンドはやや濃く検出される傾向にあった (Fig. 22; Day 10)。

そこで免疫組織化学で卵胞における AQP-Bom2 の局在を休眠卵を用いて確認したところ, 卵黄形成期の卵胞では濾胞細胞の卵母細胞側 (頂端側) に強い反応が確認された (Fig. 23A および B)。この発育が進み卵殻形成期になると, この反応は卵母細胞の表層に存在する小さな顆粒にシフトしていた (Fig. 23C~E)。DAB 染色の切片を拡大して観察してみると所々に他の顆粒よりも濃染される顆粒が観察された (Fig. 23F)。また非休眠卵でも同様の結果を得た。

また H^+ V-ATPase 抗体を用いた卵黄形成期の卵胞では濾胞細胞細胞質全体にやや弱い反応が検出され, さらに卵母細胞表層の原形質膜からやや下に強い反応が検出された (Fig. 22G および H)。

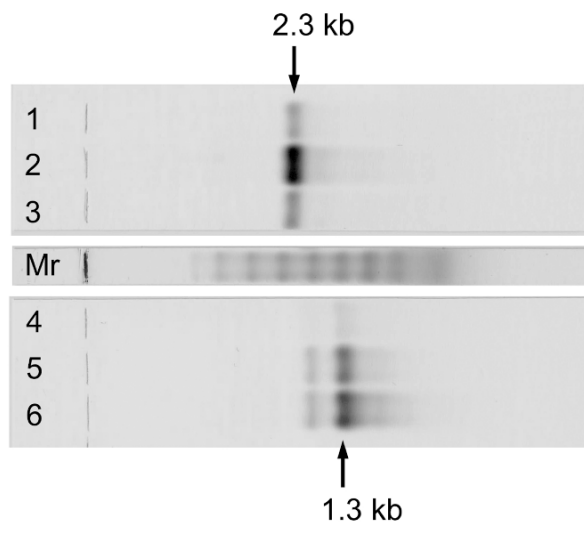


Fig. 18.

Expression of two *Bombyx mori* aquaporins along the midgut of silkworm larvae. One μg of mRNA from the anterior (lanes 1 and 4), the middle (lanes 2 and 5) and the posterior midgut (lanes 3 and 6) was subjected to formaldehyde agarose gel electrophoresis. After the Northern blots, two nylon membranes were hybridized with the DIG-labeled antisense RNA probe of AQP-Bom1 (lanes 1~3) and AQP-Bom2 (lanes 4~6), respectively. The RNA standard markers (Mr lane: 0.28~6.58 kb ssRNA) were also electrophoresed in the same gel and transferred to the nylon membrane.

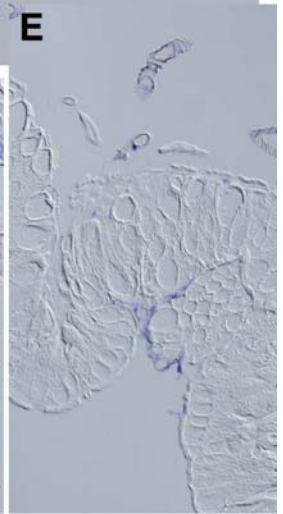
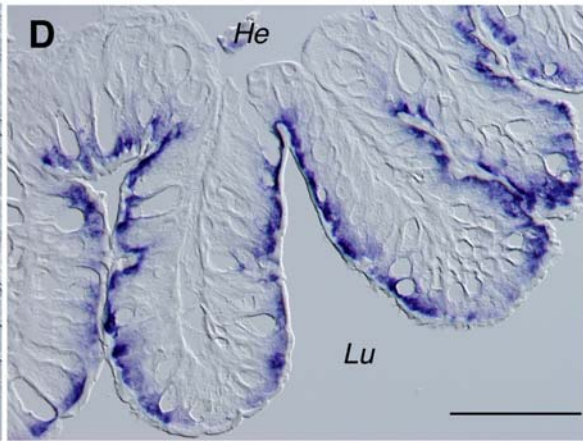
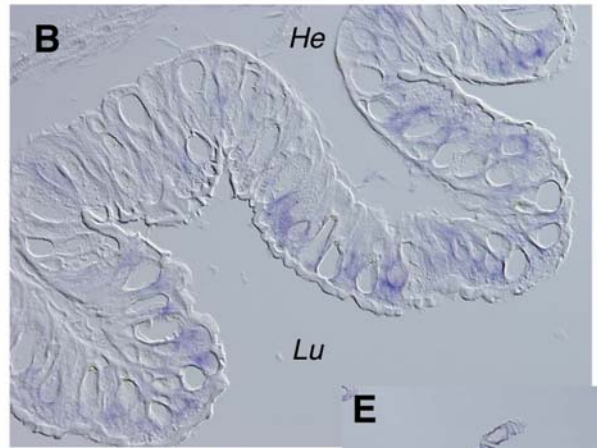
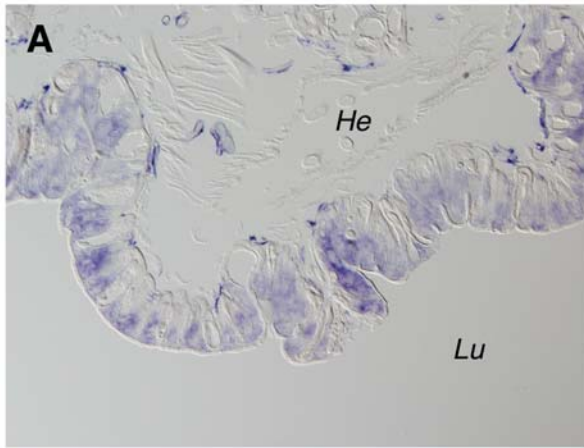


Fig. 19.

In situ hybridization for *Bombyx mori* aquaporin mRNA expression in the midgut of silkworm larvae. (A, B) A DIG-labelled antisense riboprobe for AQP-Bom1 was hybridized with the sections from the middle midgut (A) and the posterior midgut (B). (C) The posterior midgut with the sense probe for AQP-Bom1. (D) The posterior midgut with the antisense probe for AQP-Bom2. (E) The anterior midgut with the antisense probe for AQP-Bom2. *He*: Hemocoele. *Lu*: Lumen. The scale bar, 200 μ m (applies to all panels).

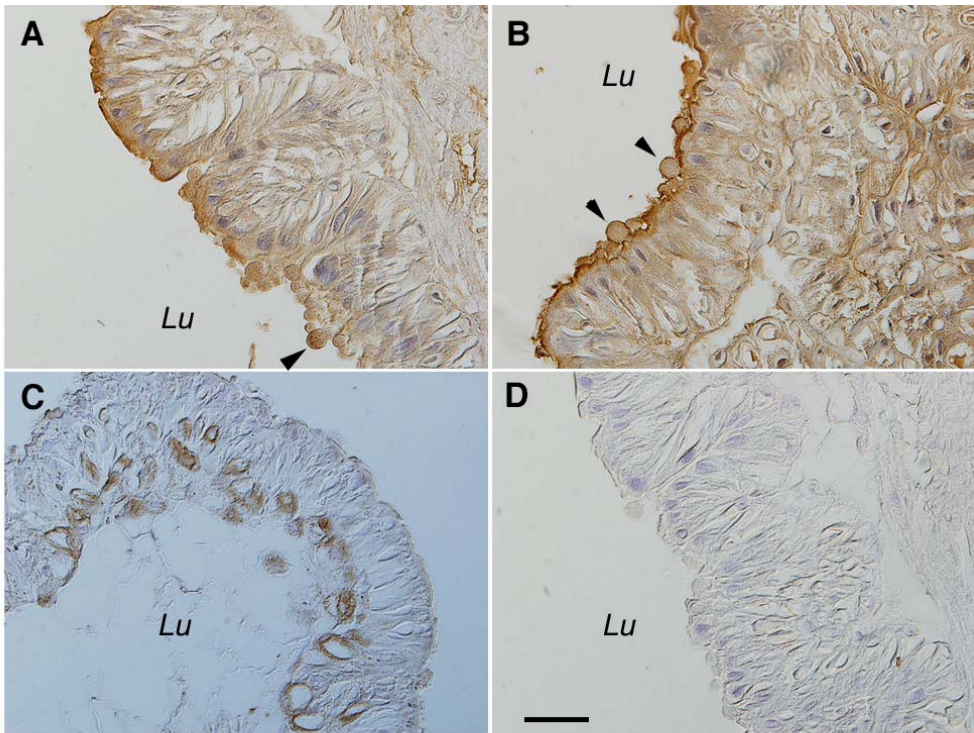


Fig. 20.

Localization of two *Bombyx mori* aquaporins and V-ATPase at the middle midgut of silkworm larvae. (A) Immunohistochemistry of AQP-Bom1 (a water-specific DRIP subtype). (B) Immunohistochemistry of AQP-Bom2 (an aquaglyceroporin subtype). (C) Immunohistochemistry of V-ATPase. (D) The control staining with the IgG fraction prepared from the preimmune serum. Note that the apical surface often shows some budding spheres (arrowheads) from the columnar cells. Lu: Lumen. The scale bar, 100 μm (applies to all panels).

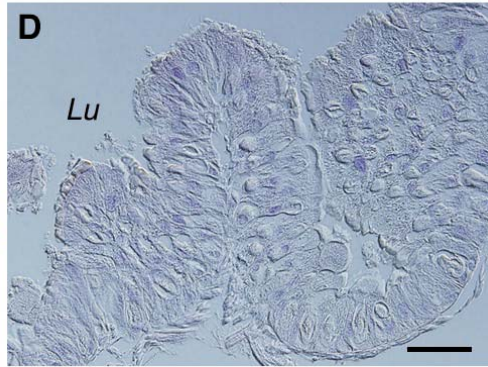
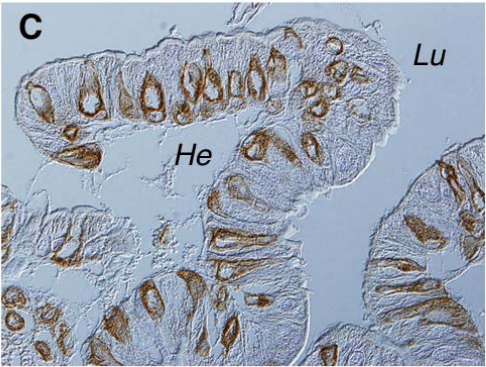
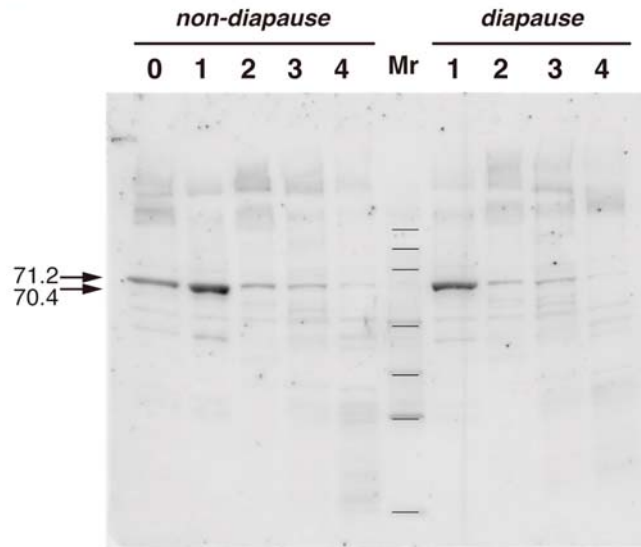


Fig. 21.

Localization of two *Bombyx mori* aquaporins and V-ATPase at the posterior midgut of the silkworm larvae. (A) AQP-Bom1. (B) AQP-Bom2. (C) V-ATPase. Note that the immunolabelling at the goblet cell apical membranes is prominent in the posterior midgut. (D) The control staining. *He*: Hemocoel. *Lu*: Lumen. The scale bar, 100 μm (applies to all panels).

Day 6



Day 10

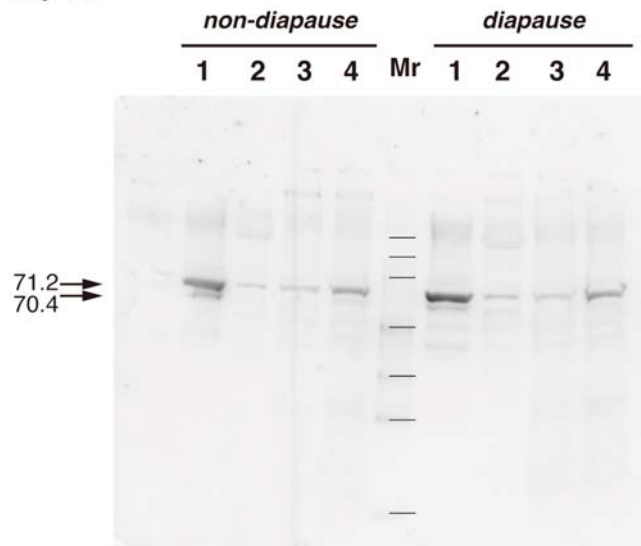


Fig. 22.

AQP-Bom2 (GLP) present in membrane fractions prepared from diapause and non-diapause follicles from Day 6 (vitellogenic) and Day 10 (choriogenic) *Bombyx mori* pupae. Fractions were collected by sucrose density gradient centrifugation from Day 6 and 10 ovaries, each non-diapause-destined and diapause-destined. Using non-diapause-destined ovary from Day 6 pupae, membrane fractions were separated 5 fractions (new appeared fraction named Band 0, upper Band 1). Each fraction (20 µg protein/lane) was resolved by 12% SDS-PAGE and immunoblotting. In Day 6 non-diapause; Lane 0: nearly sample zone (Band 0); lane 1: 20% upper sucrose zone (Band 1); Lane 2: 20/30% interface zone (Band 2) Lane 3: 30%/40% interface zone (Band 3), and Lane 4: 40%/50% interface (Band 4),

Day 6 diapause and both Day 10; Lane 1: Band 1, Lane 2: Band 2, Lane 3: Band 3, and Lane 4: Band 4. The 71.2 kDa GLP polypeptide was detected Day 6 non-diapause Lane 0 and both Lane 2, 3. In both Lane 1, slightly lower 70.4 kDa polypeptide was detected.

In Day 10, doublet bands of 71.2 kDa and 70.4 kDa were detected at both Lane 1. The 71.2 kDa band also was detected in both Lane 4.

Mr, protein marker (150, 100, 75, 50, 35, 25, and 15 kDa).

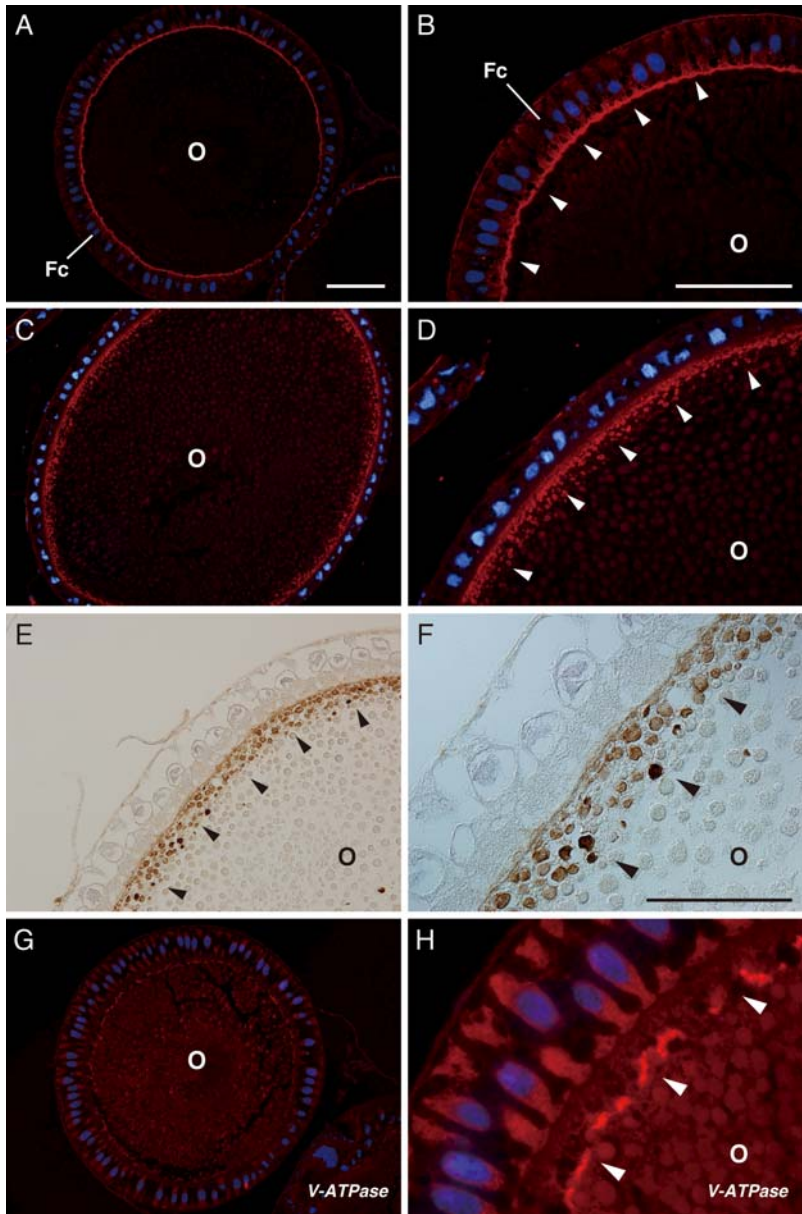


Fig. 23.

AQP-Bom2 (GLP) in a vitellogenic and choriogenic follicle of the silk moth *Bombyx mori*, as determined by immunohistochemistry, partly used anti V-ATPase antibody (G, H).

(A) Vitellogenic follicle AQP-Bom2 immunofluorescence at the follicular epithelial cells (Fc) apical surface. (B) High-magnification view of (A), signal was denoted by arrowheads. (C) Choriogenic follicle AQP-Bom2 immunofluorescence at the yolk granules near oocyte (O) cortex. (D) High-magnification view of (C), signal was denoted by arrowheads. (E) Choriogenic follicle AQP-Bom2 signal was detected by DAB staining. (F) High-magnification view of (E). (G) Vitellogenic follicle, V-ATPase immunofluorescence at the underneath oocyte surface. (H) High-magnification view of (G), signal was denoted by arrowheads. Weak signal was detected in whole body of follicular epithelial cells. Nuclei were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (blue color) except in (E, F), in which the section was stained with hematoxylin. O, oocyte. Scale bars: 100 μm (A, B) and 50 μm (F). The bar in A applies to C and G; the bar in B to D and E; the bar in F to H.

考 察

ほとんどのチョウ目昆虫の幼虫は葉を食べ、水を自発的に飲まない。ゆえに摂食した葉から得た水で体内の水分を維持する必要がある。消化・吸収は中腸を中心に行われ、続く後腸では排泄や解毒がなされ、最終的には押し固められた糞として排泄される。第1章では後腸における水分吸収とそれに関与する水選択的 AQP について議論したが、本章では中腸で主に発現する GLP subtype (AQP-Bom2) について調べ、さらに蛹期の卵巢でも調査した。

後腸において主要な AQP は AQP-Bom1 と AQP-Bom3 であったが、中腸における主要な AQP は AQP-Bom1 と AQP-Bom2 であり、AQP-Bom3 は中腸全体を通して円筒細胞、杯状細胞の基底膜側で AQP の目立った反応を確認することはできず、transcellular な水輸送は後腸と比較して低いようであった。詳細な議論をするためには中腸での AQP の発現量を推定する必要があるものの、中腸を前部・中部・後部に分けて観察した際、AQP-Bom1 (特に中部に発現; Fig. 18) と AQP-Bom2 (特に中部～後部に発現; Fig. 18) が異なった場所で発現するという事は円筒細胞の管腔側で水、あるいは非電荷物質の輸送がそれに沿った場所で行われていることを示しているのではないだろうか。

一般的に中腸の円筒細胞が消化と栄養分の吸収を行うと考えられている (Terra and Ferreira, 1994)。チョウ目昆虫幼虫の中腸管腔は通常、極めて強いアルカリ性の消化液で満たされており (Dow, 1984)、その消化液は囲食膜を介して管腔内で対向流系をなす (Santos et al., 1984)。チョウ目昆虫の唾液腺は器官の実態としても小さく、さらに位置として前腸で開口しているため、唾液は中腸内容物と直接混ざらない。したがって盛食期の幼虫では中腸で数種類の酵素を含んだ大量の消化液を分泌する必要がある (Dow, 1986)。中腸中部の円筒細胞管腔側に存在する消化酵素の分泌に関与しているであろう丸く膨らんだ部分 (bleb) にも発現する (Fig. 19A および B) ことから、AQP のうちでも特に AQP-Bom1 は消化液の分泌に機能していると考えられる。中腸中部には消化液の分泌に特化した領域が存在するのかもしれない。

AQP-Bom2 は中腸後部、典型的な微絨毛構造を持つ非常に折り重なった上皮で多く発現していた (Cioffi, 1979; Gomes et al., 2013)。幼虫の中腸で実際に生理的に輸送される溶質は不明であるが、中腸後部において AQP-Bom2 はどうやら AQP-Bom1 と違った役割を担っているようである。カイコ幼虫は血リンパ中に 20 mM 近くの尿素を保持しており

(Sumida et al., 1990) , AQP-Bom2 は血リンパと中腸管腔内間の尿素輸送に機能するのかもしれない。

そして卵胞では、AQP-Bom2 は卵黄形成期の濾胞細胞、続く卵殻形成期では表層付近の卵黄顆粒に局在していた。濾胞細胞は卵内容物の取り込みを直接的、あるいは間接的に支持し、さらに卵特異的タンパクの合成、卵殻の分泌などを行う (Anderson and Telfer, 1969; Sato and Yamashita, 1991; 松崎・栗原, 1996) 。休眠卵と非休眠卵を用いたウェスタンブロット解析によるタンパク質発現の傾向、免疫組織化学による観察での発現部位に差はなかったが、発育中の休眠卵は非休眠卵に比べて総脂質量が多く (Ichimasa and Hasegawa, 1973) , 脂質組成も異なっている (Shimizu, 1992) ことが知られている。昆虫卵でも最も割合の多い脂質は、トリアシルグリセロールであり、これは遊離脂肪酸とグリセロールから合成される (Ziegler and Van Antwerpen, 2006) 。濾胞細胞の AQP-Bom2 がグリセロールの取り込みに関与しているならば、その輸送活性によって脂質量に変化が生じることも考えうる。だが、卵巣に休眠ホルモンが作用すると脂質増加が促進される一方で、完成卵時点での総脂質量は一概に休眠卵の方が多いたとは限らず、これには蛹末期におこる卵の脂質減少の程度が影響する (Ichimasa and Hasegawa, 1973) 。

また卵胞全体の脂質分析では卵母細胞内の組織構造や脂質の偏在を無視した分析となるため、量の比較のみとなってしまう、質的な点からも休眠卵と非休眠卵の違いを観るには別の卵胞解析手段の導入が必要である。さらに産下後でも休眠卵・非休眠卵の代謝、特に炭水化物に関するものは大きく異なり (Chino, 1957; 柳沼ら, 2008; 2011) , 受精後に産み落とされた卵での調査も卵における GLP の機能を知る上で重要であろう。なお哺乳類において GLP は脂肪細胞からのグリセロール排出に関与している例もあり (Hara-Chikuma and Verkman, 2005; Rojek et al., 2008; Verkman, 2011) , AQP-Bom2 の卵における機能を追究するには休眠卵と非休眠卵のグリセロールや尿素の輸送活性などを調べる必要がある。これは 20 世紀に行われてきた休眠ホルモンの作用機構の研究を全く別の切り口から調べることにもなりうる。

また、発育中の卵で H^+V -ATPase は濾胞細胞細胞質全体と卵母細胞表層のやや下に分布していた。濾胞細胞で検出された反応はおそらく内膜系の H^+V -ATPase が染色されたものだと考えられる。そして卵母細胞で見出された H^+V -ATPase は物質の取り込みに際して必要となる濃度勾配の創出のために機能しているであろう。

昆虫の GLP は実際にクローニングされているものが少なく (Kataoka et al., 2009a, b; Wallace et al., 2012; Drake et al., 2015) , GLP 研究からの中腸機能の再検証, 卵胞発育への関与の観点からも今後, より多くの昆虫種での報告を待望する。

第4章

総合考察

水は生物の中で起きる様々な生化学的反応に欠かせない。昆虫は小型無脊椎動物で、体液（血リンパ）量もわずかである。しかし、わずかな体液しか持たない小さな昆虫であっても水分管理機構がはたらき、乾きに耐える体の仕組みが成り立っている。カイコ幼虫で水分の貯蔵庫（reservoir）はまず第一に血リンパ（hemolymph）である。血リンパには水分以外に、血糖（トレハロース）やアミノ酸、血清タンパク質など様々な溶質が存在しており、5齢（終齢）幼虫では血リンパは吐糸を開始するまで平均して体重の40%前後を維持している（Kajiura and Yamashita, 1989）。5齢摂食期のクライマックスでは絹糸腺が幼虫体重の30~40%を占め（Miyake and Azuma, 2008）、中腸も幼虫体重の5~10%を維持して吐糸期を迎える（Kajiura and Yamashita, 1989）。開放血管系を持つ昆虫ではある意味、各組織・器官は血リンパ中に浸った状態といえる。組織と組織は血リンパを介して双方に影響を与え、血リンパの浸透圧変化もそれぞれの組織に影響を及ぼすであろう。カイコのようなチョウ目昆虫では、栄養生理に特化した時期（幼虫世代）と生殖生理に特化した時期（蛹〜成虫世代）を切り離してその一生を組み立てている。まず幼虫期では摂食し、体を大きくすること（growth and development）が個体にとっての至上命題と位置付けられる（東, 1995, 2003; 今野, 2007）。したがって幼虫期には消化・排泄系の生理機能がきわめて重要である。幼虫を解剖して内部を観察しても明らかなように腸管、特に中腸は絹糸腺が極大成長するフェーズを迎えてもカイコ体内の大部分を占める。一方、繭形成を経て蛹期になると摂食を停止し、異化と同化といった代謝における一連の生化学的プロセスはほぼ個体内でのやりくりが変わる。そして雌蛹ではこの時期に本格的な卵形成を開始する。幼虫〜蛹〜成虫へと成長する過程で、必要な水分をいかにやりくりするか。本研究では水分代謝に直接関わるAQPの実体を精査し、カイコ個体の浸透圧調節（osmoregulation）において組織特異的な発現を示す3つのAQPの生理的役割を追究した。

1. 昆虫のアクアポリン研究

昆虫のアクアポリン（AQP）はまず半翅目昆虫のオオヨコバイのろ過室からcDNAクローニングされ、タンパク質分子としても初めてその存在について報告された（Le Cahérec

et al., 1996; 1997)。オオヨコバイはカメムシ目 (Hemiptera) のヨコバイ亜目 (Homoptera) に属し、木部道管から吸汁するタイプの昆虫である。オオヨコバイのろ過室の膜面分には、MIP ファミリーに属する疎水性の高い膜タンパク質 (25 kDa hydrophobic polypeptide) が大量に存在することが知られていた。そこで MIP ファミリー、現在でいう AQP に保存された NPA box 配列 (Fig.1 参照) を利用して、オオヨコバイのろ過室の mRNA から相同性のある cDNA がクローン化された。赤血球膜からの AQP1 の発見と同様に水輸送活性も確認された。またこのオオヨコバイの AQP はアミノ酸配列でヒトの AQP1 および AQP4 と 43% のホモロジーを有することも示された (Le Cahérec et al., 1996)。

ろ過室は咽喉直後に存在し、吸汁した多量の道管液 (xylem sap) から水だけが直接中腸終末部やマルピーギ管へバイパスされる。これによって濃縮された道管液が中腸管腔内を通過し、中腸上皮組織で消化・吸収される。つまり、ろ過室は大量の水分中に含まれるわずかな栄養成分 (アミノ酸や糖) を効率よく濃縮し、摂取するために特化した構造体であり、過剰な水を受動輸送によって速やかにバイパスし体液の低浸透圧化を防いでいる (東, 2008; Cohen, 2013)。

一方、カメムシ目昆虫でもエンドウヒゲナガアブラムシやジャガイモガリキジラミ (*Bactericera cockerelli*) のように、ショ糖やフラクトースに富む高浸透圧の篩管液 (phloem sap) を吸汁する昆虫からも AQP が特定されている。しかしその水輸送はオオヨコバイなどとは逆方向、すなわち吸汁液の希釈のために機能していると考えられる (Shakesby et al., 2009; Ibanez et al., 2014)。

このような AQP の存在は、様々な陸上動物における水分調節の活発な組織 (例: カエルの皮膚, カモの鼻腺, Suzuki and Tanaka, 2009; Müller, et al., 2009) で AQP が同定されることから合目的であるといえる。

昆虫 AQP 研究は、オオヨコバイからの報告以降、吸血性のハエ目昆虫 (カやハエなど) から遺伝子としていくつか同定された (Elvin et al., 1999; Pietrantonio et al., 2000; Echevarría et al., 2001; Duchesne et al., 2003)。

近年では吸汁性のタバココナジラミやカスミカメムシの 1 種 (*Lygus hesperus*) などの農業害虫からも報告されており (Mathew et al., 2011; Fabrick et al., 2014), ハマダラカやツツエバエ (*Glossina morsitans morsitans*) でも研究が進められている (Liu et al., 2011; Tsujimoto et al., 2013; Benoit et al., 2014a)。

吸血行動は一過性であり、一度に大量かつ高濃度の動物血液が腸管内に流入してくる。そのため消化・排泄系に連動した浸透圧調節のしくみと機能の解明、そして病原

媒介性昆虫の制御法の開拓といった双方の視点から AQP 研究が進められている (Benoit et al., 2014b)。

では、積極的な水飲み行動をとらない昆虫で水分代謝はどのように調節されているのであろうか。カイコのような葉を食べるチョウ目昆虫の幼虫は植物葉を長期間、断続的かつ大量に摂取している (solid/plant feeder; Dow, 1986)。ヨコバイなどはほとんど水分である植物汁液を絶え間なく吸う、という食性をもつ。ゆえに速やかに水をバイパスするためのろ過室という特別な構造体を有するが、一方、カイコ幼虫は食下したエサ (クワ葉や人工飼料) から水を摂取することになる。その水分吸収の鍵は後腸に分布する AQP のはたらきによることが推定されていた (東, 2005)。その後、ホモロジークローニングにより、カイコ幼虫から NPA box 配列を有する 2 種類の AQP がクローン化された (AQP-Bom1 および AQP-Bom2; Kataoka et al., 2009a)。両者共に予想されたアミノ酸配列中に AQP の特徴である 6 回膜貫通領域を有し、推定分子量はそれぞれ約 26 kDa および 28 kDa であった。両者の推定アミノ酸配列は 41.6% の相同性を持ち、カイコ幼虫体内でそれぞれの AQP の mRNA 発現を調査したところ、AQP-Bom1 は組織非特異的な分布を示した。しかし、特に消化管系の末端に位置する後腸 (結腸および直腸) で圧倒的な mRNA 発現が見い出されていた (Kataoka et al., 2009a)。

昆虫の消化管 (腸管) は一般に前腸・中腸・後腸に大きく分かれるが (東, 2003), ほとんどのチョウ目昆虫の幼虫ではソーセージ状の中腸が体腔内の大部分を占め、幼虫時代は食べて成長すること、つまり栄養生理の時期に特化した組織形態を有することを示す。必然的に、食下した植物葉の消化・吸収、すなわち物質輸送・透過機構は中腸に集中している (東, 1995; 2003)。確かに中腸でも水輸送に関わる AQP-Bom1 の有意な mRNA 発現を認めたが、後腸 (結腸および直腸) のその比ではなかったため (東, 2005), 当時から水輸送機能は中腸よりも後腸の関与が大きいと予測されていた。後腸の組織形態学、そして大食 (gluttony) の結果である大量排糞 (東・三宅, 2004) を支える生理学について、教科書的な記述が古くからある。しかし、中腸の研究と比較すると後腸は昆虫生理学・生化学の研究対象として今まであまり取り上げられなかった器官であった。AQP-Bom1 のクローニング後に、別の水選択的 AQP (AQP-Bom3) が同定され、チョウ目幼虫の後腸の水分吸収におけるアクアポリンの生理的役割を第 1 章で示すことができた。

2. カイコ後腸 (hindgut) の細胞生理 —アオムシ・イモムシの排泄機構—

昆虫学の教科書には古くから cryptonephric rectal complex が登場する (Gullan and Cranston, 1994; Klowden, 2002)。これは一部のコウチュウ目とチョウ目幼虫のみが有する水分透過やイオン調節のための複合体とされている。Cryptonephric rectal complex の存在が最初に報告されたのは今から約 40 年前で、釣り具店でも飼料として販売されているコウチュウ目昆虫のチャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*) の幼虫からであった (Grimstone et al., 1968)。その後、チョウ目幼虫の後腸でも同様な複合体の存在が確認された (Ramsay, 1976)。Cryptonephric rectal complex 内のマルピーギ管では3 Mにも達する KCl が水分吸収に機能しているとされ (O'Donnell and Machin, 1991)、チャイロコメノゴミムシダマシの幼虫はほとんど水分を含まない食下物から直腸上皮細胞を介して水分を吸収するだけでなく、気管系・肛門から水蒸気までも水として吸収し利用しているといわれる (Bradley, 1985)。穀物の貯蔵倉庫ではときどき、いわゆる貯穀害虫 (stored insects) が大発生して厄介な問題になる。貯蔵倉庫内は害虫たちにとって雨風・風水や捕食者・天敵から隔てられた非常に安全な空間である。その一方でそこは人工の乾燥地ともいえず、水分の供給は期待できない。このような環境に棲息する昆虫の多くは甲虫類で、非常に水分含量の少ない固形物を食物としている。きわめて水分に乏しい環境下でもこれらの昆虫が生存可能である背景には、直腸、特に cryptonephric rectal complex による水分吸収が大きく貢献しているのであろう (今野, 2007; Machin, 1979)。

カイコ結腸においても直腸と同程度のアクアポリンの遺伝子発現が認められ、水輸送機能が活発であることが示唆された (Kataoka et al., 2009a)。カイコ幼虫では、食下物は中腸から結腸に送り込まれ、さらに結腸の収縮により直腸に移動し糞塊となり、結腸の内容物が2~3回送り込まれた後、体外に排泄される (福原・佐竹, 1985)。一方、タバコスズメガ幼虫では糞塊は回腸 (ileum: カイコの結腸に相当) において既に形成されており、それがそのままの形で直腸に運ばれ排泄される (Reinecke et al., 1973)。同じチョウ目昆虫の幼虫でも寄主植物の栄養価や水分含量が組織の形態の違いや体内水分の調節機構、さらにはその排泄様式にも反映されていることを伺わせる。カイコ幼虫の結腸の内容物が完全に硬くならず、わずかに柔らかいことが、水分バランスを維持するために重要な意味を持っているのかもしれない。タバコスズメガ幼虫では、体内の水分収支 (water economy) に働いているのは直腸だけであり、回腸にはその上皮細胞の形態観察から水透過性がないと主張されている

(Reynolds and Bellward, 1989)。カイコの結腸上皮細胞は直腸と同様に扁平であることや、ペースト状であった中腸内容物の水分率が結腸へ移動することで、次第に堅くなっていることから、結腸でも AQP-Bom1 および AQP-Bom3 による transcellular な水分吸収が行われていると考えられる。

結腸周辺をよく観ると、結腸の周辺部のマルピーギ管は、小腸から結腸にかけての領域だけが6本とも cryptonephric rectal complex 内のマルピーギ管のように、非常にジグザグ状でかつ複雑に入り組んでいる (Fig.6, 写真参照)。さらに、この領域だけが前腸に始まる消化管系のなかで唯一大量の脂肪体で取り囲まれており、直腸の cryptonephric rectal complex のように閉鎖された系ではないものの、結腸、マルピーギ管、脂肪体の三者が連携して、脂肪体での尿酸顆粒の形成やイオン (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) 調節に機能しているのではないかと想像される。後腸は外胚葉由来の器官であり、結腸と直腸の上皮細胞はともにクチクラによって裏打ちされている。結腸のそれは直腸よりも比較的厚く、あたかも上皮細胞を保護しているかのようである。後腸のクチクラ層の水透過性は比較的高いと言われていることから (Maddrell and Gardiner, 1980), おそらく結腸が圧搾機 (squeezer) として機能することで内容物から水分を物理的に排除しているのかもしれない。

このカイコから最初に特定した AQP-Bom 1 のクローニング後 (Kataoka et al., 2009a), 第1章で述べたように直腸から別の水選択的 AQP (AQP-Bom3) を同定した。後腸での2種類の AQP の生理的役割については以下のように考えることができる。カイコ幼虫のマルピーギ管は幼虫の体軸方向に沿って3対存在し、中腸と後腸の境界から体腔内へ出て、中腸に沿って幼虫の頭部方向へ細長く伸び、中腸中部のところでUターンして再び後腸側に戻り、直腸に密着した状態で盲管に終わる。直腸の管腔にある食下物 (植物葉) に含まれる水分を直腸上皮細胞から吸収し、さらに直腸上皮細胞層に密着配置するマルピーギ管を介して水やミネラルを血液へリサイクルする機構があると古くから考えられていた

(Klowden, 2002; 東, 2005)。中腸の管腔内で食下物は水分を含んでいてペースト状態であるが、水輸送にはたらく AQP-Bom1 および AQP-Bom3 を有する結腸および直腸を通過する際に、水分吸収が進む。直腸には排泄される直前の1粒の糞が詰まっており、1粒ずつ固形の堅い糞として排泄される。2種類の AQP の実際は、おのおのが上皮細胞の頂端部

(apical) 並びに基底部 (basal) におけるそれぞれの原形質膜に位置することを第1章で示した。模式図に示したように、直腸管腔内容物 (gut contents) からの水分吸収は、

cryptonephric MTを順次流れることで血リンパ中へ戻る (Fig. 24)。このように単層の上皮細胞層の極性に合わせて AQP を配置させることは、哺乳類の腎臓でも示されており、その部位における水通過が活発であることを示している。また、チョウ目幼虫の後腸、とりわけ直腸の主要な働きの 1 つとして水やイオン輸送があり、同じように単層の上皮細胞で構成される中腸の役割 (第 3 章参照) と異なっていることの一つの事例であるといえる。

2 種類の水選択的 AQP の働きで植物葉に由来する水分を効率よく吸収する後腸でのプロセスは、カイコ以外のアオムシやイモムシでも同様に水分の少ない固形粒状の糞を排泄するものが多いことを説明している。カイコを絶食させると排泄 (排糞) 量は最初の 24 時間に集中しており、1 日の絶食で中腸や後腸はほぼカラになる。絶食から 72 時間が経過すると体重も減少する (東, 2008)。しかし、絶食状況下でも即座に死の危機的な状況に陥ることは回避されているのであろう。カイコ 5 齢幼虫で絶食 3~4 日が生死の境目というあたりは、災害時におけるヒトの救命救助のタイムリミットとほぼ同様であることと類似している。カメムシ目昆虫でみられるろ過室の機能は、摂取した植物汁液からの水を選択的通過、つまり排水である。一方、cryptonephric rectal complex も水を選択的に通過させるが、その機能は食下物からの水の回収作業である。このことがチョウ目幼虫では乾き (渴き) に対抗する構造的基盤になっているといえよう。では、なぜ細胞が 1 種類の AQP を原形質膜の両極に配置させるのではなく、複数の水選択的 AQP を極性ごとに原形質膜へ配置しなければならないのか。その生理的意義については、膜タンパク質の極性ソーティングに関する細胞生物学上の基本的な問題でもあり、さらなる研究が必要である。

3. 昆虫の卵形成とカイコ卵休眠の特質

昆虫の卵形成に関するビテロジェニン研究は昆虫生化学の一時代を席捲していた。まず William H. Telfer のグループが 1950~60 年代にかけて先駆的に進めたセクロピアサンを用いた研究が昆虫全般に波及し、リポフォリン・貯蔵タンパク質 (arylphorin や storage protein) などのビテロジェニン以外のタンパク質研究も加速させた (Kanost et al., 1990)。その後、ビテロジェニンレセプターの研究などに発展し、卵形成についての多くの課題が解明された (Swevers et al., 2005; Telfer, 2009)。1990 年代に入って Telfer らの研究は卵を成長させ、大きくするファクターは何か? といった卵形成の調節機構の解明にシフトし、電気生理学的なアプローチを加えて精力的に進められた (Telfer and Woodruff,

2002)。また 1990 年代以降のプロトンポンプ (H^+ V-ATPase) に関する急速な理解の進展 (東, 1995; Harvey et al., 1998; Beyenbach and Wiczorek, 2006; Baumann and Walz, 2012) も卵形成の機構の解明に一役かっている。卵においても H^+ V-ATPase によるプロトンの能動輸送機構が、卵母細胞や栄養細胞内外の電気化学的電位差の創出と Ca^{2+} による調節などに関与していることも示された。プロトンの勾配によって原形質膜を介した多くの物質の流れが生じる。その 1 つが水分子であるが、卵形成における水分子の関わりはあまり言及されることなく今日に至っていた。第 2 章では、これまで幼虫の絹糸腺 (Miyake and Azuma, 2008) や後腸 (Kataoka et al., 2009a; 第 1 章) で取り組まれたカイコ幼虫 AQP の成果蓄積を土台にして、卵形成過程におけるカイコ蛹 AQP の存在について調査した。AQP クローンの遺伝子情報をもとにした特異的抗体 (Fig. 2) を用いてタンパク質レベルへのアプローチを行うことができた。

第 1 章でも研究対象とした、グループ 1 サブファミリーに属する DRIP subtype (AQP-Bom1) 並びに PRIP subtype (AQP-Bom3) は、幼虫の直腸上皮細胞やそれと密着する cryptonephric MT では、同一の細胞の両極ドメインに局在し、transcellular な水通過が活発に働いていることが示唆された。第 2 章では雌蛹の卵巣において卵黄蓄積期 (vitellgenic phase) では、PRIP subtype (AQP-Bom3) が卵母細胞の原形質膜に分布することで水吸収に関与し、もう一方の DRIP subtype (AQP-Bom1) は卵殻形成期 (choriogenic phase) に、卵母細胞中の卵黄顆粒に出現することが明らかになった。さらに、後者の DRIP の分布様式がカイコ卵の休眠性が変わることによって大きく変わることを見いだした。受精前の母体内での卵成熟過程で、休眠ホルモン分泌器官 (食道下神経節 : suboesophageal/subesophageal ganglion) の摘出によって休眠性を変更すると、DRIP の卵母細胞における分布が大きく変化するのである (Fig. 15)。この発見はこれまでの休眠ホルモンの作用機構に関する研究では、あまりスポットを当てられていなかった卵形成終盤での事象であり、今後の研究展開が待望される。今後、休眠卵として産下された卵が一定の冷蔵期間 ($5^{\circ}C$) を経験して休眠覚醒する過程で第 2 章に示した DRIP の分布がどのように推移するか、その動向の調査が機能解明のカギとなるであろう。ただし、第 2 章では、AQP, 特に DRIP subtype が卵内のどこに分布するかを示したに過ぎず、水分子の存在の実態を示したわけではない。休眠卵では DRIP subtype の AQP が卵母細胞の辺縁の卵黄顆粒に偏っていたこと

が判っただけである。通常、AQPは細胞の原形質膜に存在する。ゆえにそれぞれの組織の生理的役割を鑑みて、吸収あるいは分泌（もしくはそれ以外も行っているかもしれない）といった機能の推定が可能となる。だが、卵黄顆粒のDRIPの分布は免疫組織化学の結果ではDRIPが顆粒膜上に凝集しているようにも見える一方で、顆粒内にパッケージされているとも考えられる。つまり、水チャネルは完成卵の中で、産下された後に来たる休眠期、そして胚発生に向けた準備をしているのではないか。この点は未解明なことも多く残っており、さらなる研究により突き詰めていきたい。昆虫の変化に富んだライフスタイルの変化の中で、卵（初期胚）という最もシンプルで未発達、かつ変化に富んだ時期におけるAQPのはたらしの研究は、昆虫AQP研究の新しいページを拓くかもしれない。また、蚕糸学やその基礎となる昆虫生化学の発展（茅野, 1980）と共に推進されてきた「カイコ卵休眠の生化学・分子生物学」へ少しでも寄与する一助となることも期待したい。

野外の昆虫には卵態で休眠するものも多い（安藤, 1984）。葉の裏面や樹皮の内側、土の表層近くなど、温湿度など外界の環境を受ける場所で、日本の温帯域で棲息する昆虫であれば半年以上、卵で休眠を続けるものも多い。休眠はネムリユスリカにみられるアンヒドロピオシス（無水生命）ではない。カイコの休眠卵の内部には重さの約60%の水分が保持されている（茅野, 1980）。休眠において、高濃度（～数百mMオーダー）のグリセロール・ソルビトール・トレハロースなどが凍結や低温耐性を付与し、越冬に際して細胞内タンパク質や生体膜の安定化に関与しているのは明らかだが（泉, 2010）、水分も保管しておかねばならない。やがて春が訪れ、外気温の上昇と共に休眠が卵内の胚が発生を開始する際、卵内に蓄えられた水が、幼虫分化を進める上で必須となる。カイコのように比較的堅牢な卵殻で保護されている昆虫では、足りない水分を卵外から確保することは容易ではない。ゆえに卵内の水分をいかに維持するかが、のちの発生に重要となる。多くの昆虫のからだは小さく、体液が1 μ l未満という昆虫も珍しくない。冬季は寒さと同時に乾燥という局面を持ち、昆虫卵も例外なく陸上生物の宿命である乾燥に耐えている姿を示している。

4. 多機能性アクアポリンとしての Group 3 サブファミリー —昆虫アクアポリンファミリーの特質—

一般に、アクアポリンは大きく2つの先祖型から分岐してきたと考えられており、1つは水選択性のもの（狭義のアクアポリン水チャネル, AQP 0~2, AQP 4~6, AQP 8）並びに、

水以外も通過可能なもの（アクアグリセロポリン, AQP 3, 7, 9, 10）に大別され、さらに、NPA Box 配列に不規則性のあるスーパーアクアポリン（AQP 11, 12）が加わって、哺乳類のアクアポリンは 13 種類存在することが確定している（Abascal et al., 2014）。一方、昆虫のモデル生物であるショウジョウバエにおいてはそのゲノム情報から 8 種類の AQP 遺伝子が存在すると推定されている（Ishibashi et al., 2011）。しかし現在、水輸送機能を持つと確認されているのは cDNA クローニングから同定されていた 1 種（DRIP subtype）のみである（Kaufmann et al., 2005）。本研究では、カイコ幼虫および発育中の卵胞において少なくとも 3 種類の AQPs（AQP-Bom1, AQP-Bom2, AQP-Bom3）が、遺伝子産物、そして膜タンパク質としての組織特異的な発現と分布を示すことを明らかとした（第 1～3 章）。既に神原ら（Kambara et al., 2009）が示したように、昆虫 AQP の系統が哺乳類の AQP の系統と異なるのと同様に、カイコの 3 種類の AQPs も哺乳類の AQP の系統と異なる。第 1 章で述べたように昆虫 AQP は少なくとも 4 つのクラスターに分かれ（Kambara et al., 2009; Goto et al., 2011）、そこへ近縁の AQP 遺伝子群としてダニ目 AQP クラスターが加わって、5～6 クラスターから成る節足動物の AQP ファミリーを構成する（Benoit et al., 2014b）。当研究室では上記の 3 種の AQP 以外の AQP をカイコゲノムから 2～3 種類推定している。昆虫では上述のように系統分類学的にはだいたい数種類の AQP に分かれるが、遺伝子の同定に加えて、水輸送の機能解析、組織特異的な発現、そして AQP 膜タンパク質としての同定まで試みた研究になると、かなり限られてくる。具体的には、グループ 1 サブファミリーに属する DRIP subtype と PRIP subtype（カイコではそれぞれ AQP-Bom1 と AQP-Bom3 に該当）およびグループ 3 サブファミリーにグループ分けされるアミノ酸配列において比較的ヘテロなクラスターである（カイコは AQP-Bom2 が該当）。グループ 2 サブファミリーは、*Drosophila big brain* タンパク質（Bib）群で、水チャネル機能はない。グループ 4 サブファミリーは、哺乳類のスーパーアクアポリンに近い群である。いずれにしても、昆虫綱の主要な目や進化上でカギとなる昆虫種の推定上の AQP 遺伝子について、広範な解析を行わないことには全体像は見えてこないであろう。現在、非モデル昆虫でのゲノム解析が世界各地で進展しているので、それらの遺伝子情報が集積されてくると、今後、Benoit et al. (2014b) の総説で述べている節足動物の 6 つの AQP クラスターもまた修正される可能性がある。昆虫 AQP の研究が開始された当初、オオヨコバイの AQP（AQPcic :

Le Cahérec et al., 1996) のように、グループ 1 ファミリーの DRIP subtype に属するものの報告が相次いだ。これらは推定アミノ酸配列で哺乳類 AQP と比較すると、AQP4 と約 4 割程度の相同性をもつことが分かっていた。また、昆虫 AQP の水輸送活性を実験的に調べると、水のみを通過させたことから昆虫の AQP ファミリーではグリセロール輸送能が長い進化の過程で失われているものと認識されていた (Ishibashi, 2006; Ishibashi et al., 2011) 。ところが、当研究室で DRIP subtype (AQP-Bom1) と同じ頃にクローニングされていた AQP-Bom2 がグリセロールおよび尿素を通過させ、哺乳類で解明されていたアクアグリセロポリン (GLP) の機能を示すことが判明した (Kataoka et al., 2009a) 。昆虫の GLP は哺乳類の GLP とは、グリセロールチャネルの構造特性が異なっており、アミノ酸の一次構造のみで機能を推定することの危うさと実験的な証明の重要性が示されることとなった。次いで、当研究室で同じくチョウ目昆虫のナシヒメシンクイ幼虫から 2 番目の昆虫 GLP を報告した (Kataoka et al., 2009b) 。その後、エンドウヒゲナガアブラムシの 2 番目の AQP (ApAQP2) がいくつかの多価アルコールも輸送する多機能性 GLP であることが報告された (Wallace et al., 2012) 。アミノ酸配列でこれら 3 種類の昆虫 GLP は、先のグループ 1 (DRIP subtype と PRIP subtype) やグループ 2 (Bib) とは明瞭に分かれるグループ 3 サブファミリーに属することが次第に明らかになってきた。今年早々、ネッタインマカからのこのグループ 3 サブファミリーに属する 2 種類の AQPs (AeAQP4, AeAQP5) が報告された。この 2 つは GLP であり、グリセロール・尿素以外にも多価アルコール輸送能を有することが示された (Drake et al., 2015) 。昆虫 GLP は報告された事例が少数であり、調査が進むにつれ、それぞれの昆虫の生活様式 (食性や棲息環境など) に適応した新奇の GLP(s) が発見されることも今後予想される。

この限られた昆虫 GLP のデータから垣間見ることができると共通した事実は、このグループ 3 の遺伝子の発現組織が、中腸やマルピーギ管であるということである。確かにカイコ GLP (AQP-Bom2) は、中腸やマルピーギ管で主たる遺伝子発現がみられることは当研究室の先行研究 (Kataoka et al., 2009a) でも示されていた。そこで第 3 章では、実験解析に扱いやすいカイコ幼虫中腸を使って、特に AQP-Bom2 (GLP subtype) に着目した。

5. 幼虫中腸とカイコ卵巣にも存在する AQP-Bom2 –Group3 サブファミリーの生理機能の解明をめざしてー

昆虫の能動輸送機構や浸透圧調節に関する研究の歴史も、第2章で述べた昆虫の卵形成の研究と並んで古く、1950年代まで遡る (Ramsay, 1954)。しかし、昆虫細胞の構造と機能の両面から徹底的な研究が推進されたのは1990年代以降である (東, 1995)。タバコスズメガ幼虫の中腸は、これらの研究に汎用され、 H^+ V-ATPase が細胞内外でのエネルギー勾配を形成し、イオン輸送や溶質輸送 (solute transport) に必要な電気化学的エネルギー ("proton-motive force") を創出していることが明らかされた (Wieczorek, 1992)。現在では、生物界に広く存在する普遍的なプロトンポンプとして個々の細胞生理における重要性が認識され、定着している (森山, 2000; 孫ら, 2002; Beyenbach and Wieczorek, 2006)。チョウ目幼虫の中腸上皮組織は主に円筒細胞および杯状細胞から構成される (Cioffi, 1979)。杯状細胞の原形質膜で機能する H^+ V-ATPase による能動輸送機構によって中腸管腔内が強アルカリ性に維持されていること、円筒細胞が消化酵素の分泌センターで、分解されたアミノ酸や糖の吸収を行っていることはチョウ目幼虫において広く認識、理解されていた (東, 1995; 2003)。しかし、昆虫の中腸における AQP についてはあまり研究されていなかった。第3章に示したように、いずれの AQP であっても、円筒細胞の頂端側の原形質膜に局在していること、中腸の前腸側に近い 1/3 のエリアでは発現が低いことが示された。中腸では後腸と異なり、AQP に関しては、頂端側原形質膜においてだけ、つまり、one membrane で水通過を調節しているのであろう。基底部側の原形質膜は、血液の浸透圧やイオン濃度の影響に常にさらされているはずであるが、少なくとも水通過は起こっていたとしても浸透現象 (permeation) などゆっくりしたものではないかと推定される。チョウ目幼虫の中腸が *in vivo* において水分子に対してあまり通過させない機構を有し、水分子はもう一方の AQP-Bom1 の主たる発現組織である後腸の働きに委ねられているとするならば、幼虫個体としての水分管理機能を考える上でたいへん興味深い。

カイコ5齢幼虫の血液中には尿素が 10~20 mM のレベルで存在する (Sumida et al., 1990)。これは血糖トレハロース濃度にも匹敵する無視できない量である。この尿素はクワで幼虫を飼育していると吐糸期にはほとんど消失する。それはクワ生葉に由来するウレアーゼが中腸上皮経由で幼虫体内へ取り込まれて作用する結果であると解釈されている (平山,

2003)。したがって、5 齢幼虫をずっと人工飼料で飼育し続けると血液中に尿素がそのまま残留することになる。食下物（クワ葉や人工飼料）が中腸で代謝利用されて尿素が生成すると（Hirayama et al., 1999），尿素は尿酸と違って水に溶けやすいので血リンパ中への輸送などは、AQP-Bom2 の機能によると推定される。人工飼料で幼虫を飼育すると血液浸透圧は、クワ葉飼育のそれと比べて明らかに 10% 程度高くなっているが（塚田ら, 1986），人工飼料で飼育した幼虫がクワで飼育した幼虫と比べて、少し浮腫んだように見える背景には、このような幼虫体内での尿素の動向が影響しているのかもしれない。現在のところ絹糸腺で AQP-Bom2 の存在については否定的であるが（Miyake and Azuma, 2008），人工飼料を摂食し成長したカイコの繭に尿素が高濃度に検出されている事実（平山, 2003）も見逃せない。なにせよ人工飼料によって育ち熟蚕となった個体は、浸透圧調節において病的とまでは言えないものの、生理的な歪みを生じているのであろう。

多くの糸を吐く昆虫は下唇腺を持つが、カイコなどはこの下唇腺が転化した絹糸腺を持つ（森本, 2003b）。この絹糸腺はカイコ 5 齢幼虫の熟蚕期（吐糸期）には幼虫体重の 4 割にも達する（Kajiura and Yamashita, 1989）。幼虫個体の水分コントロールを議論する上で、営繭による液状絹の排出（吐糸行動）は、消化管系による排泄と並んで無視できない。カイコが糸を吐く、つまり絹タンパク質を排出しているということは、窒素態化合物（アミノ酸の集合体であるタンパク質）の排出という意義もあり、カイコ研究者の間で古くから、繭形成の生物学的意義として認識されている。絹糸昆虫は単に外敵を防ぐための通気性・保湿性に優れた「住まい」を造っているだけではないのだ。吐糸、そして営繭というやり方で窒素態を排泄する、という意味で絹糸昆虫での絹糸腺の果たす役割は個体の水分管理のみならず過剰な窒素態管理のために重要であろう（平山, 2003）。中腸後部とマルピーギ管に AQP-Bom2 が AQP-Bom1 より発現量が高い事実は、尿素輸送における両者のつながり、中腸からマルピーギ管への流れ、を考えると興味が尽きない。昆虫は個々の種によって食性が異なり、消化管（中腸）が実行している生理生化学的反応もそれに対応したものとなる。したがって哺乳類の研究のように事象を一般化することは容易ではない。だが、多くの食性を持つがゆえに多様な細胞機能や生体膜機能を発展させ、生き抜く姿を鑑みることに昆虫個体、それを構成する組織や器官そして細胞を研究する醍醐味がある。哺乳類、例えばヒトの生存戦略と大きく異なる昆虫の、個性あふれる生存戦略の「技」は、今後も細胞生物学の 1 つの研究領域としてだけでなく、農業問題への応用展開課題としても研究者の関心を引き続けるであろう。

昆虫での最初のアクアポリン (AQP_{ic}) のクローニングと機能解析 (Le Cahérec et al., 1996) からまもなく 20 年が経過しようとしている。今では科学技術の発展もあって非モデル昆虫での遺伝子解析が比較的容易に行われるようになりつつある。現在、アクアポリン研究も単に遺伝子としての同定や機能解析にとどまることなく、組織の中での生理的役割を実験的に証明できる状況が整ってきた。手法の発展によって、昆虫の生きざまに深く関わる現象や古くから知られている有名な事実などに対して、その生物学的意義、キーとなる分子について直接アプローチする研究が増えつつある。これからのアクアポリン研究も膜タンパク質としての特徴付けにとどまることなく、昆虫の重要な生理現象との関係に結びつくテーマへ研究の奥行きと幅を拡げる視点が必要であろう。昆虫のアクアポリン研究というと、病原媒介昆虫や農業害虫（液体摂取性昆虫が多い）を中心とした排泄や解毒などとの関連が世界的に注目されつつある。そのような中でカイコを用いたアクアポリン研究でもって、どこまで新しい展開を示せるか、この先 3~5 年後の成果に期待したい。

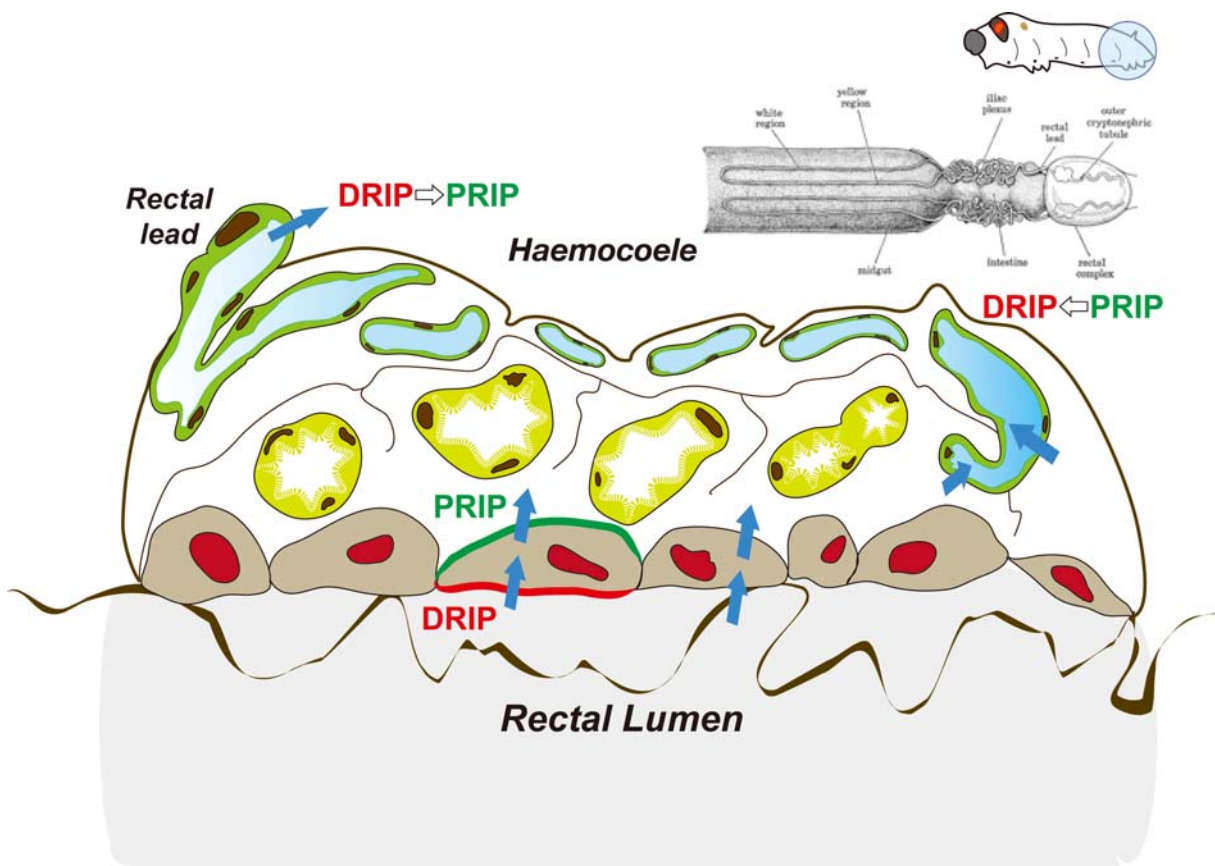


Fig. 24.

Proposed water route in the cryptonephric rectal complex of a silkworm larva, *Bombyx mori*. Water is first retrieved across the rectal epithelial cells (light-brownish cytoplasm) from the rectal lumen, following the gate of DRIP/PRIP in a series. The numbers (1–6) denote the putative recycling of water to the haemocoel. Note that the cryptonephric Malpighian tubules (cMT) consist of the outer cMTs (greenish cytoplasm) and the inner cMTs (yellowish cytoplasm). Drawing based on Ishimori (1924) and Ramsay (1976).

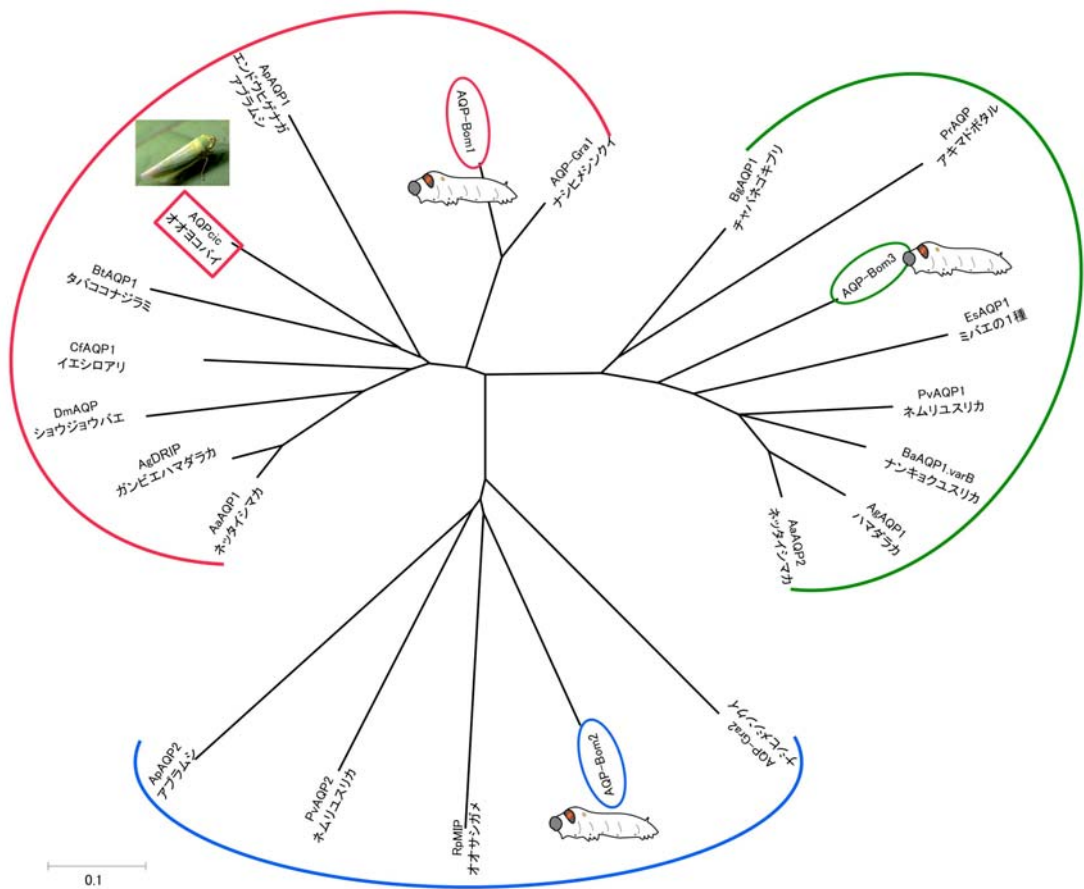


Fig. 25.

Unrooted phylogenetic tree of insect aquaporin amino acid sequences constructed by the neighbor-joining method. The phylogenetic tree of 22 full-length insect AQPs. Tree constructed using MEGA (5.05). The robustness of phylogenetic results was tested by bootstrap analysis using 1,000 replicates. The alignments determined by MUSCLE. Accession numbers are as follows: AQP-Bom1, AQP-Bom2, AQP-Bom3: *Bombyx mori* (AB178640, AB245966, AB458833), AQP-Gra1,2 *Grapholita molesta* (AB469882, AB469883), AQPcic, *Cicadella viridis* (Q23808), DmAQP (isoform B): *Drosophila melanogaster* (NM_078973), PrAQP: *Pyrocoelia rufa* (AF420308), AaAQP1: *Aedes aegypti* (AF218314, ABF18340), AgAQP1,2: *Anopheles gambiae* (JF342682, AB523397), ApAQP1,2: *Acyrtosiphon pisum* (NP_001139376, AK340435), BaAQP1 (variant B): *Belgica antarctica* (AB602341), BgAQP1: *Blatella germanica* (FR744897), BtAQP1: *Bemisia tabaci* (EU127479), CfAQP1: *Coptotermes formosanus* (AB433197), EsAQP1: *Eurosta solidaginis* (FJ489680), PvAQP1,2: *Polypodium Vanderplanki* (AB281619, AB281620), RpMIP: *Rhodnius prolixus* (AJ250342).

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、学部以来様々な暖かいご指導ならびにご鞭撻、ご叱正、ご失笑を賜りました鳥取大学農学部の東 政明 教授に鳴謝いたします。東先生の叱咤激励なくしてこの研究を成し遂げることはできませんでした。

様々な意義深いご意見とご助言を下された鳥取大学農学部害虫制御学分野の中 秀司 准教授に御礼を申し上げます。そして学部以来、研究のみならず様々な面でお世話になり、ご助言を頂きました山口大学農学部の小林 淳 教授に心から感謝いたします。

また学位論文審査委員として多くのご指摘とご助言を賜りました島根大学生物資源科学部の泉 洋平 助教、そして山口大学理学部の山中 明 准教授にお礼を申し上げます。山中先生には学位論文作成にあたり、数多くのご指導と激励を賜りましたことを重ねて御礼申し上げます。

実験手法についてご指導とご助言頂きました島根大学生物資源科学部の山本 達之 教授、島根大学生物資源科学部の秋吉 英雄 准教授、滝上 俊平 博士に感謝いたします。

さらに様々な技術指導、実験への惜しみないご協力を頂きました永江 知音 博士、日々種々のご教示、激励をくださいました森林総合研究所の神原 広平 博士に深謝いたします。

これまで様々なご協力をしてくださいました昆虫機能学分野の皆様方、害虫制御学分野の皆様方に厚くお礼申し上げます。

結びとして今まで陰日向なく支え続けて下さいました母に拝謝するとともに、遠く離れた地から声援を送り続けてくれた親朋、そして周りの友人たちに厚く御礼を申し上げます。

2015 年 6 月 12 日

丸山 麻理弥

引用文献

- Abascal, F, Irisarri, I. and Zardoya, R. (2014) Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1840**, 1468-1481.
- Agre, P. (2006) The aquaporin water channels. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **3**, 5-13.
- Agre, P., Bonhivers, M. and Borgnia, M. J. (1998) The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J. Biol. Chem.*, **273**, 14659-14662.
- 赤井 弘 (1976) 7. 消化管。昆虫超微形態学, pp. 237-285, 東京大学出版会, 東京。
- Anderson, L. M. and Telfer, W. H. (1969) A follicle cell contribution to the yolk spheres of moth oocytes. *Tissue & Cell*, **1**, 633-644.
- 安藤喜一 (1984) 卵休眠をめぐる諸問題。遺伝, **38**, 6-11。
- 東 政明 (1995) 鱗翅目昆虫中腸の構造とその生理機能 - 最近の進歩 -。日本蚕糸学雑誌, **64**, 1-18。
- 東 政明 (2003) 消化管とその機能。昆虫学大辞典 (三橋淳 総編集)。pp. 227-232, 朝倉書店, 東京。
- 東 政明 (2005) 昆虫のくらしとアクアポリン。みずみずしい体のしくみ-水の通り道「アクアポリン」の働きと病気-, 第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集 (佐々木成 編)。pp. 63-71, (株)クバプロ, 東京。
- 東 政明 (2008) 昆虫の水代謝。からだと水の事典, pp. 94-100, 朝倉書店, 東京。
- 東 政明・三宅誠司 (2004) 昆虫と水、アクアポリン。日本比較内分泌学会ニュース, **115**, 19-21。
- Baumann, O. and Walz, B. (2012) The blowfly salivary gland - A model system for analyzing the regulation of plasma membrane V-ATPase. *J. Insect Physiol.*, **58**, 450-458.
- Benoit, J. B., Hansen, I. A., Attardo, G. M., Michalková, V., Mireji, P. O., Bargul, J. L., Drake, L. L., Masiga, D. K. and Aksoy, S. (2014a) Aquaporins are critical for provision of water during lactation and intrauterine progeny hydration to maintain tsetse fly reproductive success. *PLoS ONE*, **8**, e2517.
- Benoit, J. B., Hansen, I. A., Szuter, E. M., Drake, L. L., Burnett, D. L. and Attardo, G. M. (2014b) Emerging roles of aquaporins in relation to physiology of blood-feeding arthropods. *J. Comp. Physiol. B*, **184**, 811-825.
- Beyenbach, K.W. and Wiczorek, H. (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.*, **209**, 577-589.
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A. and Agre, P. (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 425-458.
- Bradley, T. J. (1985) The excretory system: structure and physiology. In Kerkut, G. A., Gilbert, L. I. (Eds), *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology Vol. 4. Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion*. pp.421-446, Pergamon Press, Oxford.
- Campbell, E. M., Ball, A., Hoppler, S. and Bowman, A. S. (2008) Invertebrate aquaporins: a review. *J. Comp. Physiol. Biol.*, **178**, 935-955.
- Chino, H. (1957) Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the *Bombyx* silkworm. *Nature*, **180**, 606-607.
- 茅野春雄 (1980) 昆虫の生化学。p. 146, 東京大学出版会, 東京。
- Cioffi, M. (1979) The morphology and fine structure of the larval midgut of a moth (*Manduca sexta*) in relation to active ion transport. *Tissue & Cell*, **11**, 467-479.
- Cohen, E (2013) Water homeostasis and osmoregulation as targets in the control of insect pests. *Adv. Insect Physiol.* **44**, 1-61.

- Dow, J. A. T. (1984) Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **246**, R633-R635.
- Dow, J. A. T. (1986) Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.*, **19**, 187-328.
- Drake, L. L., Rodriguez, S. D. and Hansen, I. A. (2015) Functional characterization of aquaporins and aquaglyceroporins of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.*, **5**: 7795.
- Duchesne, L., Hubert, J.-F., Verbavatz, J. M., Thomas, D. and Pietrantonio, P. V. (2003) Mosquito (*Aedes aegypti*) aquaporin, present in tracheolar cells, transports water, not glycerol, and forms orthogonal arrays in *Xenopus* oocyte membranes. *Eur. J. Biochem.*, **270**, 422-429.
- Echevarría, M., Ramírez-Lorca, R., Hernández, C. S., Gutiérrez, A., Méndez-Ferrer, S., González, E., Toledo-Aral, J. J., Ilundáin, A. A. and Whitembury, G. (2001) Identification of new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, **442**, 27-34.
- Elvin, C. M., Bunch, N., Liyou, E., Pearson, J., Gough, J. and Drinkwar, R. D. (1999) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an aquaporin-like gene from adult buffalo fly (*Haematobia irritans exigua*). *Insect Mol. Biol.*, **8**, 369-380.
- Engel, A., Fujiyoshi, Y., Gonen, T. and Walz, T. (2008) Junction-forming aquaporins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **18**, 229-235
- Fabrick, J. A., Pei, J., Hull, J. and Yoll, A. J. (2014) Molecular and functional characterization of multiple aquaporin water channel proteins from western tarnished plant bug, *Lygus hesperus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 125-140.
- Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H. and Chaumont, F. (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 1213-1228.
- Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Machado, E. A. and Miranda, K. (2013) Ultrastructure and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell Tissue Res.*, **352**, 313-326.
- Goto, S. G., Philip, B. N., Teets, N. M., Kawarasaki, Y., Lee, Jr, R. E. and Denlinger, D. L. (2011) Functional characterization of an aquaporin in the Antarctic midge *Belgica antarctica*. *J. Insect. Physiol.*, **57**, 1106-1114.
- Grimstone, A. V., Mullinger, A. N. and Ramsay, J. A. (1968) Further studies on the rectal complex of the mealworm *Tenebrio molitor*, L. (Coleoptera, Tenebrionidae). *Phil. Trans. Roy. Soc. B*, **253**, 344-382.
- Gullan, P. J. and Cranston, P. S. (1994) 3.7 The excretory system and waste disposal. *The insects an outline of Entomology*. pp. 85-90, Chapman & Hall, London.
- Hara-Chikuma, M. and Verkman, A. S. (2006) Physiological roles of glycerol transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **63**, 1386-1392.
- Harvey, W. R., Maddrell, S. H. P., Telfer, W. H. and Wiczorek, H. (1998) H⁺ V-ATPases energize animal plasma membranes for secretion and absorption of ions and fluids. *Am. Zool.*, **38**, 426-441.
- Harvey, W. R., Boutilier, R. G. and Nelson, N. (Eds.) (2010) Proton-motive ATPases. *J. Exp. Biol.*, **203**, 1-170. (Special Issue).
- 林 希一郎 (2010) 生物多様性とは何か考える。はじめて学ぶ生物多様性と暮らし・経済。pp 6-10, 中央法規, 東京。
- Herraiz, A., Chauvigne, F., Cerda, J., Belles, X. and Piulachs, M. D. (2011) Identification and functional characterization of an ovarian aquaporin from the cockroach *Blattella germanica* L. (Dictyoptera, Blattellidae). *J. Exp. Biol.*, **214**, 3630-3638.
- 平山 力 (2003) 昆虫の特異な窒素再利用システム。生物と化学, **41**, 164-170。
- Hirayama, C., Sugimura, M. and Shinbo, H. (1999) Recycling of urea associated with the host plant urease in the silkworm larvae, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **45**, 15-20.
- 福原敏彦・佐竹諒士 (1985) 家蚕幼虫の前腸および後腸の収縮運動について。日本蚕糸学雑誌, **54**, 82-86。
- Ibanez, F., Hancock, J. and Tamborindeguy, C. (2014) Identification and expression analysis of aquaporins in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*. *PLoS ONE*, **9**, e111745.
- Ichimasa, Y. and Hasegawa, K. (1973) Studies on the mode of action of the diapause hormone with special reference to lipid metabolism in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **42**, 380-392.

- 石橋賢一 (2005) アクアポリンの仲間たち。みずみずしい体のしくみ-水の通り道「アクアポリン」の働きと病気-，第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集（佐々木成 編）。pp. 10-18, (株)クバプロ，東京。
- Ishibashi, K. (2006) Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes. *Biochem. Biophys. Acta*, **1758**, 989-993.
- Ishibashi, K., Kondo, S., Hara, S. and Morishita, Y. (2011) The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am. J Physiol. Integr. Comp. Physiol.*, **300**, R566-R576.
- Ishimori, N. (1924). Distribution of the Malpighian vessels in the wall of the rectum of lepidopterous larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **17**, 75-86.
- 石川三衛 (2008) メタボリックシンドロームにもアクアポリンは関連しているのですか。水とアクアポリンの生物学（佐々木成 編集）。pp. 155-158, 中山書店，東京。
- 泉 洋平・積木久明 (2010) 低温耐性に及ぼす体内成分。昆虫の低温耐性（積木久明・田中一裕・後藤三千代 編）。pp. 60-65, 岡山大学出版会，岡山。
- Janssen, I., Hendrickx, K., Klein, U. and de Loof, A. (1995) Immunolocalization of a proton V-ATPase in ovarian follicles of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **28**, 131-141.
- Jung, J. S., Bhat, R. V., Preston, G. M., Guggino, W. B., Baraban, J. M. and Agre, P. (1994) Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 13052-13056.
- Kajiura, Z. and Yamashita, O. (1989) Super growth of silk glands in the dauer larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by a juvenile hormone analogue. *J. Sericult. Sci. Jpn.*, **58**, 39-46.
- Kambara, K., Takematsu, Y., Azuma, M. and Kobayashi, J. (2009) cDNA cloning of aquaporin gene expressed in the digestive tract of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera; Rhinotermitidae). *Appl. Entomol. Zool.* **44**, 315-321.
- Kanost, M.R., Kawooya, J.K., Law, J.H., Ryan, R.O., van Heusden, M.C. and Ziegler, R. (1990) Insect haemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.*, **22**, 299-396.
- Kataoka, N., Miyake, S. and Azuma, M. (2009a) Aquaporin and aquaglyceroporin in silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, **18**, 303-314.
- Kataoka, N., Miyake, S. and Azuma, M., (2009b) Molecular characterization of aquaporin and aquaglyceroporin in the alimentary canal of *Grapholita molesta* (the oriental fruit moth) comparison with *Bombyx mori* aquaporins. *J. Insect Biotec. Sericol.*, **78**, 81-90.
- Kaufmann, N., Mathai, J. C., Hill, W. G., Dow, J. A. T., Zeidel, M. L. and Brodsky, J. L. (2005) Developmental expression and biophysical characterization of a *Drosophila melanogaster* aquaporin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **289**, C397-C407.
- Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Fujita, M., Śnigórska, K., Watanabe, M. and Okuda, T. (2008) Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 514-520.
- Klowden, M. J. (2002) Excretory Systems. *Physiological Systems in Insects.*, pp.231-251, San Diego, Academic Press.
- 小池 伸 (2008) 消化管からの水の吸収とアクアポリンの関わりについて教えてください。『水とアクアポリンの生物学』3. アクアポリン（佐々木成 編集）。pp. 116-119, 中山書店，東京。
- 今野浩太郎 (2007) 4. 栄養・消化・排泄。昆虫生理生態学（河野義昭・田付貞洋 編）。pp. 32-55, 朝倉書店，東京。
- Le Cahérec, F., Deschamps, S., Delamarche, C., Pellerin, I., Bonnet, G., Guillam, M.-T., Thomas, D., Gouranton, J. and Hubert J.-F (1996) Molecular cloning and characterization of an insect aquaporin. Functional comparison with aquaporin 1. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 707-715.
- Le Cahérec, F., Guillam, M.-T., Beuron, F., Cavalier, A., Thomas, D., Gouranton, J. and Hubert J.-F (1997) Aquaporin-related proteins in the filter chamber of homopteran insects. *Cell Tissue Res.*, **290**, 143-151.

- Lee, K. S., Kim, S. R., Lee, S. M., Lee, K. R., Sohn, H. D. and Jin, B. R. (2001) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the aquaporin homologue from the firefly, *Pyrocoelia rufa*. *Korean J. Entomol.*, **31**, 269-279.
- Liao, S., Audsley, N. and Schooley, D. A. (2000) Antidiuretic effects of a factor in brain/corpora cardiaca/corpora allata extract on fluid reabsorption across the cryptonephric complex of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, **203**, 605-615.
- Liu, K., Tsujimoto, H., Cha, S. J., Agre, P. and Rasgon, J. L. (2011) Aquaporin water channel AgAQP1 in the malaria vector mosquito *Anopheles bambiae* during blood feeding and humidity adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**, 6062-6066.
- Machin, J. (1979) Compartmental osmotic pressures in the rectal complex of *Tenebrio* larvae: evidence for a single tubular pumping site. *J. Exp. Biol.*, **82**, 123-137.
- Maddrell, S. H. P. and Gardiner, B. O. C. (1980) The permeability of the cuticular lining of the insect alimentary canal. *J. Exp. Biol.*, **85**, 227-237.
- Mathew, L. G., Campbell, E. M., Yool, A. J. and Fabrick, J. A. (2011) Identification and characterization of functional aquaporin water channel protein alimentary tract of whitefly, *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 178-190.
- 松崎守夫・栗原守久 (1996) 卵形成 Oogenesis。昆虫発生学 (上) (安藤裕・小林幸生 監修, 日本節足動物発生学会 編)。pp. 21-47, 培風館, 東京。
- Misof, B. and 100 authors. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346**, 763-767.
- 光岡 薫 (2008) どのくらいの速さでアクアポリンは水分子を通過させるのでしょうか。水とアクアポリンの生物学 (佐々木成 編集)。pp. 98-100, 中山書店, 東京。
- Miyake, S. and Azuma, M. (2008) Developmental expression and the physiological role of aquaporin in the silk gland of *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.*, **77**, 87-93.
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B. and Worm, B. (2011) How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol.*, **9**, e1001127.
- 森本 桂 (2003a) 2. 昆虫の分類・同定。昆虫学大辞典 (三橋淳 総編集)。pp. 19-21, 朝倉書店, 東京。
- 森本 桂 (2003b) 4. 昆虫の形態。昆虫学大辞典 (三橋淳 総編集)。pp. 131-169, 朝倉書店, 東京。
- 森山芳則 (2000) 第7章 液胞型 ATPase—細胞の中に酸のプールを作るポンプ。シリーズ・バイオサイエンスの新世纪, 第7巻, 生体膜のエネルギー装置 (吉田賢右・茂木立志 編著)。pp. 89-101, 共立出版, 東京。
- Müller, C., Sandler, M. and Hildebrandt, J-P. (2006) Downregulation of aquaporins 1 and 5 in nasal gland by osmotic stress in ducklings, *Anas platyrhynchos*: implications for the production of hypertonic fluid. *J. Exp. Biol.* **209**, 4067-4076.
- Neely, J. D., Christensen, B. M., Nielsen, S. and Agre, P. (1999) Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochem.*, **38**, 11156-11163.
- O' Donnell, M. (2008) Insect excretory mechanisms. *Adv. Insect Physiol.*, **35**, 1-122.
- O' Donnell, M. J and Machin, J. (1991) Ion activities and electrochemical gradients in the mealworm rectal complex. *J. Exp. Biol.*, **155**, 375-402.
- Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **256**, 2079-2082.
- 岡田益吉 (1975) 昆虫の休眠とコリオン。植物防疫, **29**, 105-110。
- 大槻良樹 (1970) 8. 生殖と発生。カイコによる新生物学実験—生物科学の展開— (森 精 編)。pp. 104-120, 筑波書房, 東京。
- Petschenka, G., Offe, K., J. and Dobler, S. (2012) Physiological screening for target site insensitivity and localization of Na⁺/K⁺-ATPase in cardenolide-adapted Lepidoptera. *J. Insect Physiol.*, **58**, 607-612.
- Pietrantonio, P. V., Jagge, C., Keeley, L. L. and Ross, L. S. (2000) Cloning of an aquaporin-like cDNA and *in situ* hybridization in adults of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insect Mol. Biol.*, **9**, 407-418.

- Ramsay, J. A. (1954) Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae). *J. Exp. Biol.*, **31**, 104-113.
- Ramsay, J. A. (1976) The rectal complex in the larvae of Lepidoptera. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **274**, 203-226.
- Reinecke, J. P., Cook, B. J. and Adams, T. S. (1973) Larval hindgut of *Manduca sexta* (L) (Lepidoptera: Sphingidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.*, **2**, 277-290.
- Reynolds, S. E. and Bellward, K. (1989) Water balance in *Manduca sexta* caterpillars: water recycling from the rectum. *J. Exp. Biol.*, **141**, 33-45.
- Reynolds, S. E., Nottingham, S. F. and Stephens, A. E., (1985) Food and water economy and its relation to growth in fifth-instar larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, **31**, 119-127.
- Rojek, A., Praetorius, J., Frøkiaer, J., Nielsen, S. and Fenton, R. A. (2008) A current view of the mammalian aquaglyceroporin. *Annu. Rev. Physiol.*, **70**, 301-27.
- Santos, C. D., Ribeiro, A. F., Ferreira, C. and Terra, W. R. (1984) The larval midgut of the cassava hornworm (*Erimyia ello*) Ultrastructure, fluid fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tissue Res.*, **237**, 565-574.
- 佐々木成・石橋賢一 編 (2008) からだと水の事典。朝倉書店、東京。
- 佐々木成 (2005) 腎臓で尿を作るしくみ。みずみずしい体のしくみ-水の通り道「アクアポリン」の働きと病気-, 第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集, (佐々木成 編) pp. 146-152, (株)クバプロ, 東京。
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1991) Synthesis and secretion of egg-specific protein from follicle cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **21**, 233-238.
- Shakesby, A. J., Wallace, I. S., Isaacs, H. V., Pritchard, J., Roberts, D. M. and Douglas, A. E. (2009) A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 1-10.
- Shimizu, I. (1992) Comparison of fatty acid compositions in lipid of diapause and non-diapause eggs of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 713-716.
- 孫 (和田) 戈虹・村田佳子・和田 洋・二井将光 (2002) 動物細胞の外に多彩な酸性コンパートメントを形成するプロトンポンプ。リソソームから骨吸収窩, アクロソームまで。細胞工学, **21**, 222-229.
- Sonobe, H., Ikeda, M. and Kaizuma, H. (1979) Oxygen permeability of the chorion in relation to diapause termination in *Bombyx* eggs. *Experientia*, **35**, 1650-1651.
- Staniscuaski, F., Paluzzi, J., Real-Guerra, R., Carlini, C. R. and Orchard, I. (2013) Expression analysis and molecular characterization of aquaporins in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.*, **59**, 1140-1150.
- Sumida, M., Yamada, Y., Tanaka, Y., Shimabukuro, J., Ohnishi, M., Mori, H. and Matubara F. (1990) Changes in urea in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* in the fourth and the fifth larval instars and effect of starvation in the fifth instar on the level of urea in the pharate adults. *Comp. Biochem. Physiol.*, **97A**, 373-379.
- Suzuki, M. and Tanaka, S. (2009) Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **153**, 231-241.
- Swever, L., Raikhel, A. S., Sappington, T. W., Shirk, P. and Iatrou, K. (2005) Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. pp. 87-155, *Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 1, Reproduction and Development*, Gilbert, L. I., Iatrou, K. and Gill, S. S., eds. Elsevier Pergamon, Oxford.
- 武村政春 (2014) 2-4 生体構成物質。ベーシック生物学。pp. 26-27, 裳華房, 東京。
- 谷口和弥 (2000) 第 8 章 P 型 ATPase のイオン輸送。シリーズ・バイオサイエンスの新世紀, 第 7 巻, 生体膜のエネルギー装置 (吉田賢右・茂木立志 編著) pp. 102-117, 共立出版, 東京。
- 田付貞洋 (2007) 5. 呼吸・循環・血液。昆虫生理生態学。(河野義明・田付貞洋 編) pp. 53-60, 朝倉書店, 東京。
- Telfer, W. H. (1961) The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturnid moths. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 747-759.

- Telfer, W. H. (2009) Egg formation in Lepidoptera. *J. Insect Sci.*, **9**, 50.
- Telfer, W. H. and Anderson, L. (1968) Functional transformations accompanying the initiation of a terminal growth phase in the *Cecropia* moth oocyte. *Dev. Biol.*, **17**, 512-535.
- Telfer, W. H. and Rutberg, L. D. (1960) The effects of blood protein depletion on the growth of the oocytes in the cecropia moth. *Biol. Bull.*, **118**, 352-366.
- Telfer, W. H. and Woodruff, R. I. (2002) Ion physiology of vitellogenic follicles. *J. Insect Physiol.*, **48**, 915-923
- Telfer, W. H., Huebner, E. and Smith, D. S. (1982) The cell biology of vitellogenic follicles in *Hyalophora* and *Rhodnius*. R.C. King, H. Akai (Eds), *Insect Ultrastructure, Vol. 1 Plenum*, pp.118-149. New York.
- 寺山 守 (2009) 2. 昆虫学の基礎, 2.1 形態。最新応用昆虫学。(田付貞洋・河野義明 編) pp. 9-24, 朝倉書店, 東京。
- Terra, W. R. and Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 1-62.
- Tsujimoto, H., Liu, K., Linser, P. J., Agre, P. and Rasgon, J. L. (2013) Organ-specific splice variants of aquaporin water channel AgAQP1 in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*, **8**: e75888
- 塚田益裕・早坂昭二・大槻良樹・北沢敏男・小松計一 (1986) 5 齢期におけるカイコの絹糸腺乾物量と体液の浸透圧。日本蚕糸学雑誌。 **55**, 64-67。
- Verkman, A. S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.*, **118**, 3225-3232.
- Verkman, A. S. (2011) Aquaporins at glance. *J. Cell Sci.*, **124**, 2107-2112.
- Wallace, I. S., Shakesby, A. J., Hwang, J. H., Choi, W., G., Martinkova, N., Douglas, A. E. and Roberts, D. M. (2012) *Acrythosiphon pisum* AQP2: A multifunctional insect aquaglyceroporin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 627-635.
- Wang, Y. and Telfer W. (1998) Cyclic-AMP-induced water uptake in a moth ovary: inhibition by bafilomycin and anthracene-9-carboxylic acid. *J. Exp. Biol.*, **201**, 1627-1635.
- Wieczorek, H. (1992) The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. *J. Exp. Biol.*, **172**, 335-343.
- Woods, H. A., Bonnecaze, R. T. and Zrubek, B. (2005) Oxygen and water flux across eggshells of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, **208**, 1297-1308.
- Woods, H. A. (2010) Water loss and gas exchange by eggs of *Manduca sexta*: Trading off costs and benefits. *J. Insect Physiol.*, **56**, 480-487.
- 柳沼利信・新美輝幸・塩見邦博 (2008) カイコ胚休眠の分子機構。化学と生物, **46**, 206-213。
- 柳沼利信・新美輝幸・塩見邦博 (2011) 第 12 章 休眠ホルモンによるカイコガ胚休眠の調節。脱皮と変態の生物学 昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う。(園部治之・長澤寛道 編) pp 269-291, 東海大学出版会, 神奈川。
- 山元大輔 (2009) 2. 6. 1 消化, 吸収, 排泄。最新応用昆虫学。(田付貞洋・河野義明 編) pp 93-96, 朝倉書店, 東京。
- Yamashita, O. (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.*, **42**, 669-679.
- Yamashita, O. and Yaginuma T. (1991) Silkworm eggs at low temperatures: implications for sericulture. pp. 424-445 in *Insects at Low Temperature*, Lee Jr., R. E. and Denlinger, D. L., eds. Chapman and Hall, New York.
- Yamauchi, H. and Yoshitake N. (1984) Developmental stages of Ovarian follicles of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Morphol.*, **179**, 21-31.
- Zelenina, M., Zelenin, S., Bondar, A. A., Brismar, H. and Apria, A. (2002) Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **283**, F309-F318.

Ziegler, R. and Van Antwerpen, R. (2006) Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **36**, 264-272.

和 文 摘 要

昆虫の浸透圧調節に関する研究や卵形成機構の研究は、古く 1950～60 年代まで遡る。当時は生理学研究のモデル生物として昆虫は活用され、生物科学の発展を牽引していた。しかし、それらのプロセスにおける水やイオンのチャネルやトランスポーターの役割について、昆虫細胞の構造と機能の両面から研究が本格化したのは 1990 年代以降である。幼虫～蛹～成虫へのダイナミックな過程をたどる昆虫のからだの中で、食性や生息環境の変動に応じて生じる水分の過不足に対して、小さな昆虫でもホメオスタシスが必要とされる。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、本研究では、チョウ目幼虫のカイコにおける細胞内外での水輸送を担うアクアポリン水チャネル (AQP) の生理機能を調査し、組織特異的な発現を示す 3 つのカイコ AQP の生理的役割を追究した。博士学位論文骨子は以下に要約される。

(1) 昆虫は摂食 (吸汁) と排糞 (排尿) の動的なバランスを維持している。からだの成り立ちが開放血管系であるので、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。カイコ幼虫の排泄器官である消化管最後部の直腸は、マルピーギ管 (腎臓の相同器官) の終末端が密着し、複合器官 (rectal complex) を構成する。ここでの単層上皮組織で、水選択的な輸送を担う 2 種類の AQP は、直腸上皮細胞やマルピーギ管細胞の原形質膜の極性ドメイン (頂端部: apical および 基底部: basal) にそれぞれ局在分布していたことから、水分子は組織構築する上皮細胞を transcellular (経細胞経路) で輸送されると推定された。イモムシ・アオムシの仲間では堅い固形粒状の糞を排泄することが多いので、後腸複合体での AQP の生理的役割は、食下物からの水の再吸収 (水リサイクル) 機能にあることが示唆された。チョウ目幼虫の多くは、通常直接の水飲み行動をとらないが、この消化管最末端、直腸での水輸送の細胞機能が、個体の水分維持に関与していると考えられた。

(2) カイコ雌蛹では、わずか 1 週間で卵形成が完了し、1 匹の雌が約 500 粒程度の次世代を産生する。1 つの細胞である卵 (卵胞) が急速に発達する過程における AQP の存在意義を調査した。ここでも先の (1) で取り上げた水選択的輸送を司る 2 種類の AQP が膜タンパク質として存在していることを証明した。そのうちの 1 つ (幼虫後腸では基底部原形質膜に局在する AQP) は、卵胞が卵黄蓄積する時期、すなわち卵母細胞が膨潤する時期に発現していることがわかった。1950～60 年代に昆虫卵の吸水プロセスが研究されていたが、その過程には AQP が関与していることを実験的に証明した。もう一方 (後腸では頂端部原形質膜に局在する AQP) は、卵殻形成され母

体内で完成卵となる時期に、卵母細胞の辺縁部の卵黄顆粒内に集積することが判明した。こちらのAQPは卵母細胞の原形質膜には分布していなかったため、完成卵という閉鎖系の中での水輸送には直接関係していないと推定された。

(3) 上記の2種類のAQPとは別のAQPが、カイコ幼虫消化管の主要部分である中腸(midgut)で発現している。このAQPは水だけでなくグリセロールや尿素をも通過させるタイプ(アクアグリセロポリン:GLP)で、前述(1)の後腸には存在せず、その組織特異的機能について調査した。幼虫中腸上皮組織を構成している消化吸収における物質輸送・透過機能を担う円筒細胞において、GLPのmRNAが発現していることをin situハイブリダイゼーション法によって証明した。さらにこのGLPタイプのAQPは、円筒細胞の頂端側原形質膜だけに局在分布することも示した。このGLPは中腸でも後腸側に近い領域で特に偏って発現しており、水輸送とは別の尿素などの輸送に関係していることが示唆された。さらに、卵胞では濾胞細胞に出現し、卵の成長に従って発現場所を卵母細胞表層の卵黄顆粒に移すことから、上記(2)で述べた2種類の水選択的AQPとは別の挙動を卵成熟過程で示すことから、グリセロールなどの卵黄蓄積への関与が示唆された。

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。チョウ目幼虫では間断なく植物葉を摂取することによって個体内の水分を確保し、かつ、排泄前の再吸収で乾きに強い体制を維持していることが伺われた。また、卵形成という次世代への水分移譲にもAQPが一定の機能を有することも明らかとなった。吸血性昆虫において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するので、消化・排泄系の連動した機能と個体の浸透圧調節のしくみを解明する研究が、海外では進展している。昆虫で最初のAQPの同定と機能解析からまもなく20年が経過しようとしている。非モデル昆虫での遺伝子解析が比較的容易に行われるようになった現在において、AQP研究も単に遺伝子としての同定や機能解析に止まることなく、組織の中での生理的役割を実験的に明確にできる状況が整ってきた。重要な農業害虫や感染媒介昆虫の新しい制御への応用展開も期待される。

英文摘要

The entry and exit of water from cells is a fundamental process of life. Insects represent the first animals that emerged from aquatic habitats to terrestrial environments. The concept of water transport in insects was first hypothesized in the 1950s to 60s, and since then much work on insect osmoregulation has focused on the gain and loss of water from their small bodies. There has been much interest in the extremely rapid fluid secretions in Malpighian tubules (MTs), which operate in a similar manner to kidneys, and facilitate water movement across plasma membranes in response to osmotic gradients.

Molecular characterization of insect AQPs has advanced rapidly and a classification system for insect AQPs has been refined in the last decade as a result of the rapid accumulation of genetic information for non-model insects. Most insect AQPs tested experimentally are water-specific, and are grouped into one AQP cluster, comprising the DRIP (*Drosophila* intrinsic protein) and PRIP (*Pyrocoelia rufa* integral protein) subfamilies. These are active in fluid-transporting epithelia, e.g. the filter chamber in hemipteran insects, the cryptonephric rectal complex in lepidopteran caterpillars, and MTs in many classes of Insecta, and regulate cellular and extracellular water transport and prevent unnecessary water loss and desiccation. Another AQP gene cluster (the Group 3 subfamily) includes aquaglyceroporins (GLPs), although insect GLPs are structurally distinct from vertebrate GLPs. The existence of only a handful of these has been experimentally demonstrated, and they appear to occur predominantly in the midgut, a digestive and absorptive center in insects. Our understanding of the physiological significance of Group 3 is still in the early stages. Nonetheless, there is emerging evidence that it may contain crucial multifunctional non-charged solute transporters central to insect survival strategies such as diapause (insect hibernation), reproduction, and symbiosis. These provide new insights into insect water balance regulation. This thesis was summarized on following three points.

(1) Molecular basis for water recycling in the hindgut: Two water-specific aquaporins at the apical and basal plasma membranes in an insect epithelium

Larval lepidopteran and coleopteran insects have evolved a specialized cryptonephric in the hindgut in which water is constantly and rapidly taken up before defecation. In the silkworm, *Bombyx mori*, the movement of water through the epithelia within the cryptonephric rectal complex is likely facilitated by the two aquaporins, AQP-Bom1 and AQP-Bom3. Both are functionally water-specific and are predominantly expressed in the

hindgut (colon and rectum). Phylogenetically, AQP-Bom1 and AQP-Bom3 belong to the DRIP and PRIP subfamilies, respectively, of the insect AQP clade. In immunoblot analyses using antipeptide antibodies for each *Bombyx* AQP, the predicted molecular mass for the respective AQPs were around 25 kDa, and further indicated that both tended to be oligomerised as a homotetramer (~110 kDa). AQP-Bom1 [DRIP subtype] was exclusively expressed at the apical plasma membrane of colonic and rectal epithelial cells, whereas AQP-Bom3 [PRIP subtype] was expressed at the basal plasma membrane of these cells. This polarized localisation of DRIP/PRIP was also observed in the outer cryptonephric Malpighian tubules (outer cMT) and in the six tubules just outside the cryptonephric rectal complex (*rectal lead* MT). In the rectal epithelia, water is transported from the rectal lumen to the perinephric space and then deposited into the lumen of the outer cMT; the water then goes through the tubular lumen to exit the complex and is finally transported across the *rectal lead* MT. It is concluded that rectal water retrieval into the hemocoel occurs at the very limited region of the water-permeable sites in MT epithelia after passing the rectal and cMT epithelia and that the high osmotic permeability is due to the presence of two distinct water-specific AQPs (DRIP and PRIP) in the epithelial cells of lepidopteran hindgut.

(2) Insect water-specific aquaporins in developing ovarian follicles of the silk moth *Bombyx mori* : roles in hydration during egg maturation

Egg formation in terrestrial insects is an absorptive process, accommodated not only by packing proteins and lipids into yolk but also by filling chorions with water. An osmotic swelling of ovarian follicles takes place during oocyte maturation. This study investigated the role of the AQP in the osmotic uptake of water during oogenesis in the silk moth *Bombyx mori*. Using the antibodies specifically recognizing previously characterized AQPs, two water-specific subtypes—AQP-Bom1 and AQP-Bom3— belonging to the DRIP and PRIP subfamilies of the insect AQP clade, respectively, were identified in the developing ovaries of *B. mori*. During oocyte growth, *Bombyx* PRIP was distributed at the oocyte plasma membrane where it likely plays a role in water uptake and oocyte swelling and may be responsible for oocyte hydration during fluid absorption by ovarian follicles. During the transition from vitellogenesis to choriogenesis during oocyte maturation, *Bombyx* DRIP expression became abundant in peripheral yolk granules underlying the oocyte plasma membrane. The restricted DRIP localization was not observed in non-diapause-destined follicles, in which DRIP was evenly distributed in medullary yolk granules. There was no difference in PRIP distribution

between diapause- and non-diapause-destined follicles. The diapause-destined oocytes encase DRIP protein into the peripheral yolk granules, where DRIP might be inert and this would be reflected in the metabolic arrest associated with diapause after fertilization and egg oviposition.

(3) **Physiology of aquaglyceroporin in the silkworm, *Bombyx mori***

Finally, I investigated the expression and localization of AQPs in the midgut of silkworm larvae and in the developing ovaries in order to elucidate their functions, and found that AQP-Bom1 (DRIP subtype) and AQP-Bom2, an aquaglyceroporin (GLP) subtype are mainly expressed in the middle and posterior midgut. *In situ* hybridization studies using digoxigenin-labelled RNA probes derived from an open reading frame of each AQP revealed that AQP mRNA is present in the columnar cells of the middle and posterior midgut. Immunohistochemical studies using an antipeptide antibody against each AQP molecule revealed that the positive reaction was localized at the apical surface of the columnar cells. However, H⁺-translocating vacuolar-type ATPase (V-ATPase) was specifically immunolocalized to the goblet cell apical membranes in the middle and posterior midgut. This suggests that the columnar cells are responsible for water movement in the midgut. As AQP-Bom2 is a GLP that transports glycerol and urea, and is mostly distributed in the posterior midgut, AQP-Bom2 functions together with AQP-Bom1 as a water-specific AQP subtype found along the length of the midgut. An osmoregulatory network of AQPs enables the silkworm larvae to pool and maintain luminal wetness in the midgut using water taken in during feeding. In the developing ovaries, the GLP subtype was found at the apical surface of the follicular epithelial cells faced on the oocyte plasma membranes. Since there have no indication of DRIP as well as PRIP at the follicular epithelia cells, the GLP subtype may play a certain role for some solute transport (glycerol or another polyol) other than water.

学位論文の基礎となる学術論文

1. Mariya Maruyama, Kohei Kambara, Hideshi Naka and Masaaki Azuma (2015) Insect water-specific aquaporins in developing ovarian follicles of the silk moth *Bombyx mori*: roles in hydration during egg maturation. *The Biological Bulletin*. (in press) [本編第 2 章]
2. Mariya Maruyama and Masaaki Azuma (2015) Aquaporins are expressed in the columnar cells of the midgut epithelium of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology & Sericology*. (accepted for publication) [本編第 3 章]

参考論文

1. Masaaki Azuma, Tomone Nagae, Mariya Maruyama, Naoya Kataoka and Seiji Miyake (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. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 523-533.
2. 丸山 麻理弥・永江 知音・東 政明 (2012) 後腸の水代謝とアクアポリンの役割 — 鱗翅目幼虫が絶食に強いしくみ —。蚕糸・昆虫バイオテック (日本蚕糸学会和文誌), **81**, 3-10.