

氏 名	きはら まみ <b>木原 真実</b>
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 613 号
学位授与の日付	平成 23 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専 攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>Studies on C-type lectin expressed in mouthparts (CLEM) 20 and 36 of the flesh fly, <i>Sarcophaga peregrina</i></b> (ニクバエ <i>Sarcophaga peregrina</i> の口器で発現される C タイプ レクチン (CLEM) 20 と 36 に関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 森 肇 教授 遠藤泰久 教授 伊藤雅信 准教授 小谷英治

### 論文内容の要旨

ニクバエ *Sarcophaga peregrina* の味覚器の一つである唇弁で特異的に発現する遺伝子を単離するため、唇弁の cDNA から嗅覚器である触角の cDNA を差し引く cDNA サブトラクションを行い、唇弁では発現しているが触角では発現していない遺伝子の探索を行った。その過程において、C タイプレクチンファミリーの糖鎖結合部位と相同性の高い遺伝子が単離された。その単離された遺伝子を CLEM (口器の先端で発現される C タイプレクチン) 20 と CLEM 36 と名付けた。レクチンは広く動物、植物、細菌に分布し、糖鎖と結合する。レクチンの糖鎖結合活性が摂食や口器における免疫に重要な役割を果たしている可能性があるため、この CLEM 20 と 36 の遺伝子発現および局在の詳細な解析を行った。CLEM 20 と 36 の両遺伝子は口器の先端に位置する組織でのみ発現し、また羽化後 12 時間目以降で発現し、2 日目からは大量に発現することから口吻先端部で起こる現象、つまり摂食に重要な働きをしているのではないかと考えられた。CLEM を発現している組織はこれまでに報告がなく、C タイプレクチン産生組織 (CLPT) と名付けた。CLPTにおいて CLEM 20 mRNA は筋肉近くの細胞で、CLEM 36 mRNA は吻管の開口部付近の細胞で確認された。CLEM 20 と 36 タンパク質は共に唾液中に分泌されていた。しかし、CLEM 20 タンパク質は CLPTにおいて数個の細胞で細胞質のある部分に局在していた。CLEM 36 タンパク質は細胞質全体に点状に存在し、ある特定の部位 (微絨毛) に集まっていた。CLPTにおいて CLEM 20 と 36 の mRNA およびタンパク質の局在に違いが認められた。この局在の違いは、分泌速度、產生されるタンパク質量のような唾液中への分泌過程の違いを反映しているものと考えられた。CLEM 20 と CLEM 36 は C タイプレクチンの糖鎖認識部位 (CRD) で保存されているアミノ酸に違いが認められた。これは、CLEM 20 と 36 は異なる糖結合活性を示すことが示唆された。次に、CLEM の機能を類推するため、CLPT の組織学的解析と CLEM 36 の唾液中への分泌経路を特定した。CLPT はルーメン側に微絨毛が存在する分泌性の細胞から構成されていた、個々の CLPT 細胞は管でつながり、その管は数本が一つに束ねられ、口吻の開口部に入り込んでいた。CLEM 36 は微絨毛に集まり、管に存在することが確認された。CLEM 36 は微絨毛から管を通り、唾液中に分泌さ

れていると考えられた。さらに CLPT は interpseudotaracheal papillae と神経連絡していた。Interpseudotaracheal papillae は餌を吸飲するかどうかの最終チェックを行う味覚器である。CLPT は interpseudotaracheal papillae から餌の存在や濃度の情報を受け取り、吸飲時に機能する物質を分泌していることが考えられた。CLPT は分泌性の組織であり、唾液中へ CLEM タンパク質を分泌していることから、唾液線の副腺の一つと考えられた。

一般に昆虫において C タイプレクチンは免疫や発生の過程において細胞一細胞間および細胞一基質間の相互作用を仲介する役割を果たしていることが知られている。申請者は、ハエの口吻の先端部分は餌の探索や摂食を行い、外界の環境に常にさらされていることから、体内に病原体等の異物の侵入を阻止する機構が発達しているのではないかと考察した。そして、この CLEM 20 や 36 と言った C タイプレクチンはニクバエの餌の摂取時に病原体を認識・凝集し、他の免疫関連タンパク質とともに病原体の拡散を防いだり、減少させたりしているものと考察した。この CLEM のような口器特異的遺伝子によりコードされるレクチンの研究は昆虫の摂食時の免疫のメカニズムを明らかにし、昆虫の摂食行動制御への新たな知見となる可能性を示唆した。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、ニクバエ *Sarcophaga peregrina* の唇弁特異的に発現している遺伝子を cDNA サブトラクション法を用いて単離した。その結果、C タイプレクチンファミリーの糖鎖結合部位と高い相同意を示す 2 つの遺伝子を単離し、それぞれ CLEM (口器の先端で発現される C タイプレクチン) 20 と CLEM 36 と名付けた。この CLEM 20 と 36 という C タイプレクチンの遺伝子発現および局在の詳細な解析を行った。これら 2 つの C タイプレクチンの遺伝子発現は羽化後 12 時間目以降から見られ、また口器の先端に位置する組織でのみ見られることから、これら 2 つの C タイプレクチンは摂食行動と密接に関連しているのではないかと考察した。これら C タイプレクチン産生組織 (CLPT) において CLEM 20 mRNA は筋肉近くの細胞で、CLEM 36 mRNA は吻管の開口部付近の細胞で観察されることを明らかにした。さらに、CLEM 20 と 36 タンパク質は共に唾液中に分泌されていることを明らかにした。また、CLEM 20 タンパク質は CLPT において数個の細胞で細胞質のある部分に局在し、CLEM 36 タンパク質は細胞質全体に点状に存在し、ある特定の部位 (微絨毛) に集まっていることも明らかにした。申請者は、この局在の違いは唾液中への分泌過程の違いを反映しているものと考察している。これら 2 種類の C タイプレクチンの機能を類推するため、CLPT の組織学的解析と唾液中への分泌経路を特定した。CLPT はルーメン側に多数の微絨毛を持つ分泌性の細胞から構成されており、個々の CLPT 細胞は管でつながり、その管は数本毎にまとまって口吻の開口部へとつながっていることを明らかにした。特に、CLEM 36 は微絨毛に集まり、この管の内部にも存在することを明らかにした。これらのことから CLEM 36 は微絨毛から管を通り、唾液中に分泌されていることを明らかにした。このように CLPT は分泌性の組織であり、唾液中へ CLEM などの C タイプレクチンを分泌する唾液線の副腺ではないかと結論付けた。

昆虫の C タイプレクチンは発生の他に体表から侵入する病原体の排除において重要な役割を果たしていることが知られている。ハエの口吻の先端部分は常に外界の環境にさらされていることから、体内への病原体等の異物の侵入を阻止する機構が発達しているのではないかと考えられる。

そこで、申請者は CLEM 20 や 36 と言った C タイプレクチンはニクバエの餌の摂取時に病原体を認識・凝集し、他の免疫関連タンパク質とともに病原体の拡散を防いだり、減少させたりしているのではないかと考察した。本研究は、ニクバエの唇弁に存在する C タイプレクチンは昆虫の摂食時における免疫現象の存在というこれまでの昆虫の C タイプレクチンの機能とは異なるものを提案しており、今後の昆虫の摂食行動制御への新たな知見となることが期待される。

本論文の内容は、以下の学術雑誌等に発表されている。

#### 学術雑誌

Mami Yamamoto-Kihara and Eiji Kotani (2004) Isolation and characterization of a C-type lectin cDNA specifically expressed in the tip of mouthparts of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*. Insect Molecular Biology. 13, 133-140.

Mami Yamamoto-Kihara, Eiji Kotani, Hajime Mori (2011) Characterization of a novel C-type lectin cDNA, CLEM 20 cDNA, specifically expressed in mouthparts of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology. 80, 31-39.

#### 参考文献

Mami Yamamoto-Kihara, Fumiko Yukihiko, Eiji Kotani, Hajime Mori. Fine structure of C-type lectin-producing tissue (CLPT) and immunolocalization of C-type lectin expressed in mouthparts (CLEM) 36 of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*. Journal of Insect Science (投稿中)

Mami Yamamoto-Kihara, Tamako Hata, Breuer M, Seiji Tanaka. (2004) Effect of [His<sup>7</sup>]-corazonin on the number of antennal sensilla in *Locusta migratoria*. Physiological Entomology. 29, 73-77.