

1.3. 昆虫変態過程における血球細胞の役割

和田久司 (薬学部 3年)

指導教員

中西義信 (医薬保健研究域薬学系 教授)

1. 背景と研究目的

完全変態するショウジョウバエでは、蛹の体内で幼虫組織の崩壊と成虫組織の構築が起こる。この際幼虫組織を構成する細胞のほぼすべてが死に、残りのわずかの細胞が急激に分裂することで成虫組織を形成することが知られています。この変態過程において生存し続ける細胞には血球細胞であるヘモサイトが挙げられます。このヘモサイトはショウジョウバエだけで確認される細胞ではなく、他の昆虫にも広く確認される他の細胞を貪食する食細胞として働いていることが知られ、個体の免疫では重要な役割を担うことも知られています。しかし変態過程においてどのような役割を担うのかは知られていません。そこで本研究ではこのヘモサイトによる貪食が変態過程において重要な役割を担うのではないかと考え、変態過程におけるヘモサイトの役割の解明を目的としました。

2. 研究方法

2.1. ヘモサイトの除去

蛹期ヘモサイトにアポトーシスを誘導する *rpr*・*hid* という分子を発現させ、蛹期のヘモサイトを除くことでどのような影響が生じるかを調べる実験。今回は蛹期に飼育温度を調節することで目的の分子の発現を調節できるように以下のように掛け合わせを行った。また陰性コントロールとして野生型のハエ (*w*) と目的の遺伝子を有するが、その発現が起こらないものとかけ合わせも行った。

(i) ヘモサイトに *rpr*・*hid* を発現させる掛け合わせ

srp-*GAL4* × *UAS-rpr.hid;tub-GAL80^{ts}*

(ii) 陰性コントロール

• *w* × *srp-GAL4*

• *w* × *UAS-rpr.hid;tub-GAL80^{ts}*

• *w* × *w*

ただしヘモサイトに *rpr*・*hid* を発現させるためには陽性コントロールのように2種類

の遺伝子を同時に有する必要があるが、陰性コントロールのものはどちらか一方のみかどちらの遺伝子も持たないために発現できないようになっている。ここで *srp-GAL4* はヘモサイト特異的に分子を発現させるための遺伝子であり、*UAS-rpr.hid;tub-GAL80^{ts}* は温度感受性により発現時期を調節して目的の分子を発現できるようにしたものです。

2.2. ヘモサイトの食食能を抑制

食食に必要な分子の *shi* を蛹期特異的に、その働きを抑制させることで変態過程における食食の重要性を調べる実験。この実験においても温度を調節することで *shi* の分子の働きを抑制し食食能の抑制を試みた。陽性コントロールと陰性コントロールは以下のよう準備しました。

(i) 陽性コントロール (ヘモサイトに *shi^{ts}* を発現)

srp-GAL4 × *UAS-shi^{ts}*

(ii) 陰性コントロール

• *w* × *srp-GAL4*

• *w* × *UAS-shi^{ts}*

• *w* × *w*

ただし *shi^{ts}* は通常 *shi* として食食を惹起するが、温度を変化させることでその働きを抑制できる分子である。また陽性コントロールのように2種類の遺伝子を同時に有する場合のみ *shi^{ts}* を発現することができる。したがって陰性コントロールのようにどちらか一方のみあるいはどちらも持たない場合には目的の遺伝子を発現できないようになっています。

3. 研究成果と考察

2.1: ヘモサイトの除去

• 成虫への羽化は全く起こりませんでした。

かけ合わせに利用したバイアルから陰性コントロールのもののみ成虫を回収することができましたが、目的の掛け合わせでは蛹からの羽化が起きず成虫が得られませんでした。得られた成虫の数は下表のようになった。

陽性コントロール	w	w/+;srp-GAL4/+	w/UAS-rpr.hid;tub-GAL80 ^{ts/+}
平均 0 (n=3)	M 9.5(n=2)	M 21(n=2)	M 10(n=3)
標準偏差 0	SD	SD	SD 0.54

(表中の n は利用したパイアルの数)

2.2 : 食食能の抑制

- ・羽化が起こったが、その多くの成虫が翌日には死んでしまいました。
- ・蛹期で shi の働きを抑制したままのものは全く羽化が起きませんでした。

目的の掛け合わせでは 60 匹回収しましたが、翌日に生存していた成虫は 17 匹でした。また陰性コントロールのものではすべて 25 匹ずつ回収しましたが、すべての成虫が生存したままでした。下表は回収したうちで生存した成虫の数を示したものです。また目的の掛け合わせのもので、蛹の状態にいるものに shi の働きを抑制し続けたものでは成虫への羽化が起きませんでした。

陽性コントロール	w	w/+;srp-GAL4/+	w/+;UAS-shi ^{ts/+}
平均 8.5 (n=2)	M 25 (n=2)	M 25 (n=2)	M 25 (n=2)
標準偏差	SD	SD	SD

この実験結果から成虫への羽化にはヘモサイトが必要であると考えられます。特にヘモサイトの働きとして知られる食食能を抑制した場合においても羽化が起きなかったことから、ヘモサイトによる食食が変態過程には必要であることが考えられます。しかし今回の実験ではヘモサイトの食食ではどのような細胞を標的としているのかは知ることができません。ただし変態過程において幼虫由来の細胞の多くが死ぬことから、ヘモサイトはこれらの細胞を食食して処理し、成虫組織を構築していく上で何らかの形で寄与していることは間違いありません。変態過程においてヘモサイトがどのように関与していくかを調べていくためには食食を受ける細胞は具体的にどのような細胞であるか、食食を行った後、食食したものをどのように利用しているのかを調べる必要があると思われれます。

4. 結論

ショウジョウバエ血球細胞であるヘモサイトによる食食は成虫への羽化に必要なであ

る。

5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切なるご指導とご助言を頂きました金沢大学大学院医学系研究科博士後期課程在籍の倉石貴透さん、また指導教員である中西教授をはじめ、荒井教授、平山准教授、生体防御応答学研究室の各研究室員に心より感謝いたします。

参考論文

1)Patrice Eslin.et al,Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup.*Journal of Insect Physiology*.44(9),Sep 1998,807-816

2)Eva Kurucz. et al. Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*.*PNAS*.1(100),March 4,2003,2622-2627

3)Tanya A, et al.Responses of Host Hemocytes During the Initiation of the Squid-Vibrio Symbiosis.*Biol Bull* .212,29-39,Feb 2007

4)Susann Beetz. et al. Differences between larval and pupal hemocytes of the tobacco hornworm,*Manduca sexta*, determined by monoclonal antibodies and density centrifugation. *Journal of Insect Physiology*.50(2004),805-819

5)Ahmed M.A.Ibrahim and Yonggyun Kim.Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*.*Journal of Insect Physiology*,52(9),Sep,2006,943-950