

## 昆虫に特異的な窒素再利用代謝システムの機構解明

平山 力 (独立行政法人農業生物資源研究所)

hirayam@nias.affrc.go.jp

カイコの幼虫に、これまで動物では未知であったアンモニア同化経路が存在することを明らかにした。この代謝経路によりカイコは窒素老廃物であるアンモニアをアミノ酸へ同化し、絹糸タンパク質の大量合成を可能にしていた。また、カイコの幼虫が尿素分解酵素ウレアーゼを、餌である桑葉から生理活性のある状態で取り込み、尿素的再利用のために利用していることを明らかにした。

はじめに

カイコ (*Bombyx mori*) をはじめとするいわゆる絹糸昆虫は、幼虫期に絹糸腺という特殊化した器官において絹タンパク質 (主にフィブロイン) を合成し、それを蛹になる直前に絹糸として吐出し、繭を構築する。カイコの場合、終齢期 (5 齢期) に幼虫が飼料から吸収した窒素化合物の約 70% が絹タンパク質の合成に費やされる。しかしながら、この旺盛な絹糸生産を支える生体内での窒素代謝のしくみについては、謎のまま残されてきた。本研究ではカイコ 5 齢幼虫における窒素老廃物の代謝に着目することにより、効率的な絹糸生産の仕組みの一端を解き明かすことができたので、その概要を以下に紹介する。

### カイコのアンモニア同化経路

昆虫は尿酸排泄性動物であり、カイコの幼虫も窒素代謝の最終産物として尿酸の排泄を行うが、摂取した窒素量に比べるとその排泄量は極めて少ない。ところが、絹糸タンパク質フィブロインの合成がほとんど無い裸蛹系統の幼虫や人工的に絹糸腺を除去して絹糸タンパク質の合成が阻害された場合には、5 齢幼虫の尿酸排泄が著しく増加する。このことから、5 齢幼虫にとって尿酸の排泄は非常時の排泄様式であり、通常各組織で生成されるアンモニア等の窒素老廃物は速やかに絹糸タンパク質に固定され、最終的に排泄物として廃棄されるのではないかと考えた<sup>1)</sup>。この仮説を立証するため、<sup>15</sup>N 標識酢酸アンモニウムを含む飼料で、カイコ幼虫を飼育したところ、実際にアンモニア窒素が絹糸タンパク質に取り込まれていることがわかった。また、絹糸合成の活発な 5 齢後期は 5 齢前期に比べ、アンモニアを絹糸タンパク質へ同化する活性が顕著に高いことが明らかにされた (図 1)<sup>2)</sup>。さらに、カイコの各組織には、アンモニアをグルタミンのアミド基へ固定するグルタミン合成酵素 (GS) とグルタミンからグルタミン酸 2 分子を合成するグルタミン酸合成酵素 (GOGAT) の活性が見いだされた。GS は動植物を通じて普遍的に存在する酵素であるが、GOGAT は動物では全く存在が知られていない酵素であったので、これらの酵素の機能を知るため GS の特異的な阻害剤であるメ

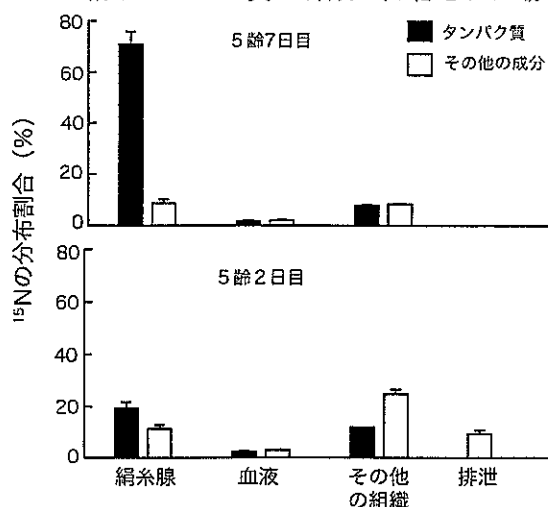


図 1. <sup>15</sup>N 標識酢酸アンモニウムの投与 12 時間後における <sup>15</sup>N の分布

チオニンスルフォキシミン (MS) を用いてアンモニア代謝への影響を調べた。MS の投与により血液や組織中のアンモニア濃度が顕著に増加する一方でグルタミン濃度は減少したことから、生体内で発生するアンモニアは速やかにグルタミンに固定されていることが明らかにされた。また、MS の投与によりアンモニア窒素の絹糸タンパク質への同化は著しく抑制されたが、グルタミンのアミド基の窒素は MS の有無にかかわらず絹糸タンパク質の窒素源として有効に利用された<sup>2)</sup>。このことから、体内で発生したアンモニアは GS/GOGAT 経路 (図 2) によりグルタミン酸に変換後、各アミノ酸に代謝されることが明らかになった。

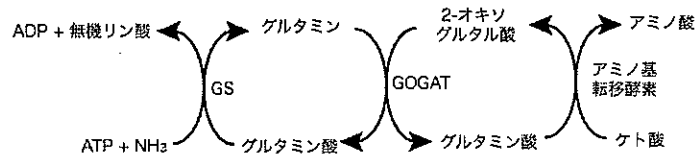


図2. GS/GOGAT経路によるアンモニア同化

### GOGAT による窒素代謝の調節

カイコの脂肪体組織および後部絹糸腺からそれぞれ GOGAT を分離・精製し、動物由来の GOGAT として初めて酵素学的・生化学的性質を明らかにした<sup>3,4)</sup>。カイコ GOGAT は分子量約 195kDa の単量体で、電子供与体として NADH を必要とする酵素で、N末端アミノ酸配列は植物由来の NADH-GOGAT と 60~70%の相同性があった。GOGAT タンパク質の発現量をウエスタンブロッティング法で調べた結果、絹糸合成の不活発な4齢幼虫期では脂肪体や消化管での発現は見られたが、絹糸腺での発現は極めて少ないことがわかった。

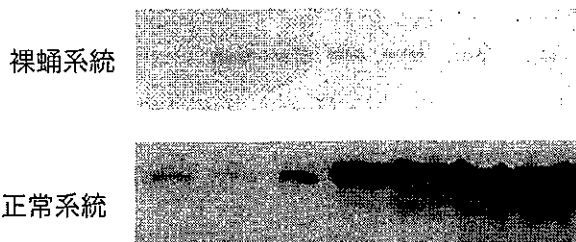
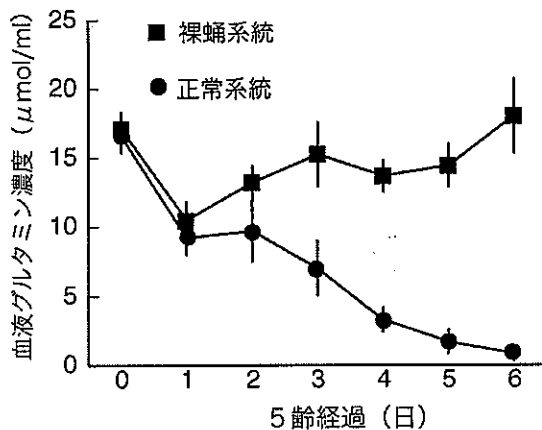


図3. 裸蛹および正常系統の後部絹糸腺GOGATの発現と血液グルタミン濃度変動

の発現は極めて少ないことがわかった。ところが、絹糸合成が活発化する5齢期に入ると、特に後部絹糸腺 GOGAT の酵素活性およびタンパク質量の顕著な増加が見られ、この GOGAT タンパク質の量的な変化に連動して血液グルタミン濃度が著しく減少することがわかった。しかし、5齢期に幼若ホルモン活性物質の連続的な投与を行うと、GOGAT の発現は抑制され、血液グルタミン濃度の減少が抑えられた。このことから、5齢期における幼若ホルモンの消失に反応して、鍵酵素である GOGAT の発現が上昇することで、絹糸合成に必要なアミノ酸の供給が開始されるものと考えられた<sup>4)</sup>。ところが絹糸タンパク質フィブロインの合成がほとんど無い裸蛹系統では、5齢期においても GOGAT の発現上昇がおこらず、血液グルタミン濃度は高い値のまま推移していた (図 3)。裸蛹系統における GOGAT の発現抑制の原因は今のところ不明だが、裸蛹系統の血液中や組織中にグリシン等のアミノ酸が顕著に蓄積していることから、

代謝系の最終産物であるこれらのアミノ酸により GOGAT の発現が制御されている可能性がある。ま

た、GOGAT はアミノ酸合成系の鍵酵素として機能すると同時に、尿酸合成系の最初の基質でもあるグルタミンの代謝プールの大きさを調節することで尿酸生成量を制御しているものと推測される (図4)。

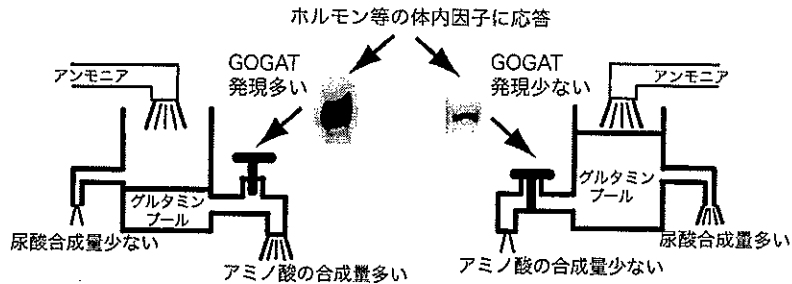


図4. GOGATによる窒素代謝調節の概念図

桑葉ウレアーゼを利用した尿素リサイクル

カイコの5齢幼虫の血液中にはアルギニンに由来する窒素老廃物である尿素が多量に存在するが、幼虫を桑葉で飼育した場合には、吐糸を開始する頃になると急激に減少し、ほとんど検出されなくなることが知られている。これは、5齢末期の幼虫の血液中に尿素分解酵素であるウレアーゼの活性が出現し、尿素がアンモニアへと分解されるためであり、尿素から生じたアンモニアは上述の代謝経路により最終的に絹糸タンパク質に同化されることが判明した<sup>5,7)</sup>。ところが、人工飼料で飼育したカイコでは、血液中にウレアーゼ活性が出現しないため、絹糸タンパク質の窒素源としては全く利用されなかった。桑葉中には強いウレアーゼ活性があるのに対し、人工飼料中にはウレアーゼ活性が全くないことから、血液に出現するウレアーゼは桑葉に由来すると考えられた。そこで、桑葉から精製したウレアーゼを人工飼料に塗布して5齢後期の幼虫に摂取させると、血液中にウレアーゼの活性が出現することが確認された。さらに、桑葉で飼育したカイコの血液からウレアーゼを分離し、桑葉ウレアーゼと比較したところ、N末端のアミノ酸配列や(図5)、分子量等の性質が同一であった<sup>6,7)</sup>。このことは、桑葉ウレアーゼが分解されずに、そのままの形でカイコの消化管から吸収されていることを示している。さらに、ビオチンで標識した桑葉抽出タンパク質をカイコに摂取させ、血液中に検出されるタンパク質の解析を行ったところ、血液中に取り込まれる主要なタンパク質はウレアーゼだけであることも明らかになった。また、カイコ消化管は5齢末期にだけウレアーゼ結合能を有することから、消化管細胞表面にウレアーゼと結合する受容体タンパク質が発現していることが示唆された。以上の結果から、5齢末期において桑葉タンパク質の中から、ウレアーゼが選択的に取り込まれ、尿素リサイクルのために利用されていることが明らかとなった<sup>8)</sup>。

カイコ MKLTPREIEKLDLHNAGFLA  
クワ \*\*\*\*\*  
ナタマメ \*\*\*S\*\*\*V\*\*\*G\*\*\*Y\*\*

図5. ウレアーゼN末端アミノ酸配列の比較

\*はカイコのウレアーゼと同じアミノ酸であることを示す

おわりに

本研究でカイコの窒素老廃物の再利用機構が明らかにされた。GOGAT の発現によりアンモニアから始まる窒素代謝の流れが制御され、絹糸合成に必要なアミノ酸の供給が調節されている点は、GOGAT の人為的な制御により絹糸生産性の改善につながる可能性を示しており、農業上重要な知見であると思われる。また、カイコにとって単なる飼料とみなされていた桑葉に「ウレアーゼの供給」

のような極めて高度の機能性があることを証明したが、このことは絹糸生産の面だけでなく昆虫と植物の相互関係や共進化を考える上でも、新たな視点を与えるものと考えられる。このようなカイク特異的な代謝機能の研究が蚕糸学のみならず、農業昆虫学全体の進展に貢献できれば幸いである。

#### 謝辞

一連の研究は蚕糸・昆虫農業技術研究所（現独立行政法人農業生物資源研究所）生産技術部人工飼料研究室で行われたものです。本研究の遂行にあたり、種々のご教示と激励を頂いた新保博博士（現農業生物資源研）、中村匡利博士（現農業生物資源研）、渡辺喜二郎氏に厚く御礼申し上げます。さらに、蛋白質の精製・分析手法を懇切丁寧にご教授頂いた齊藤準博士（現京都工芸繊維大学）、共同研究者として多くの実験に御協力頂き、貴重な御助言を頂いた杉村雅広博士、今野浩太郎博士（現農業生物資源研）にも厚く感謝いたします。研究のとりまとめにあたっては、東京大学大学院の小林正彦教授（現名誉教授）には終始格別のご指導とご高配を賜りました。心から御礼申し上げます。また、蚕糸学会の諸先生方や研究所の多くの皆様にも、温かい激励と貴重なご助言を頂きました。ここに記して、心より御礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Hirayama C, Konno K, Shinbo H. (1996) Utilization of ammonia as a nitrogen source in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 42, 983-988.
- 2) Hirayama C, Konno K, Shinbo H. (1997) The pathway of ammonia assimilation in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 43, 959-964.
- 3) Hirayama C, Saito H, Konno K, Shinbo H. (1998) Purification and characterization of NADH-dependent glutamate synthase from the silkworm fat body (*Bombyx mori*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 473-82.
- 4) Hirayama C, Nakamura M. (2002) Regulation of glutamine metabolism during the development of *Bombyx mori* larvae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1571, 131.
- 5) Hirayama C, Sugimura M, Shinbo H. (1999) Recycling of urea associated with the host plant urease in the silkworm larvae, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 45, 15-20.
- 6) Hirayama C, Sugimura M, Saito H, Nakamura M. (2000) Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*. *Phytochemistry*. 53, 325-30.
- 7) Hirayama C, Sugimura M, Saito H, Nakamura M. (2000) Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 46, 1415-1421.
- 8) Sugimura M, Hirayama C, Nakamura M. (2002) Selective transport of mulberry leaf urease from the midgut into the larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 47, 1133-1138.

Investigation of nitrogen recycling system in the silkworm, *Bombyx mori*  
Chikara Hirayama ( National Institute of Agrobiological Sciences)  
hirayam@nias.affrc.go.jp