

新規モデル昆虫 アブラムシの組織染色手法の検討

大澤 園子（基礎生物学研究所 技術課）

OHSAWA Sonoko : Optimization of histological techniques for a new model insect,
the aphid *Acyrtosiphon pisum*

1. 目的

半翅目の昆虫アブラムシは、共生細菌「ブフネラ」を菌細胞内に保有し、胎生単為生殖で繁殖するという特徴を持つ。新規モデル昆虫としてゲノムはすでに解読されており、顕微鏡観察のための組織染色手法もある程度は確立している。

アブラムシの組織染色では、共生細菌の観察を目的としており、成虫を解剖して、胚と菌細胞を取り出し、ホルマウントで *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) や抗体染色を行うことが通例である。しかし、

- ①全ての器官や組織を取り出すことができない
- ②親虫の体内での位置関係が維持できない
- ③外側が強く染まってしまう場合には内部の観察が困難、等の問題がある。これらの問題点の解決策として、凍結切片を用いた組織染色を検討することとした。

2. アブラムシについて

アブラムシは体長数 mm と小型で軟らかく、植物の師管液をエサとし、旺盛な増殖力を持つ昆虫である。

共生細菌ブフネラは菌細胞の外では増殖できず、アブラムシに必須アミノ酸やビタミン類を供給しており、絶対的相互依存関係にある。菌細胞は直径約 100 μm で、その細胞質はブフネラで埋め尽くされている。

また、アブラムシの生活環の大部分は雌だけの単性世代で、胎生単為生殖が繰り返される。卵ではなく幼虫を産む雌を胎生雌と呼ぶ。

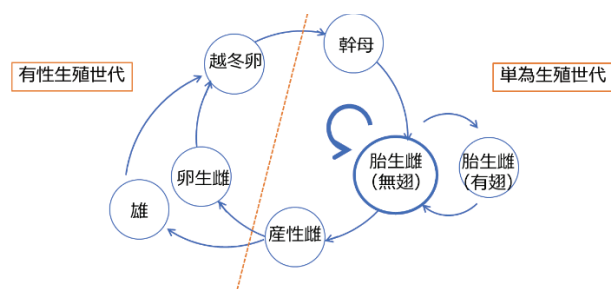


図 1. 生活環と多型

3. 方法

(1) 凍結切片の作製

サンプルとしてエンドウヒゲナガアブラムシ(学名: *Acyrtosiphon pisum*) を用いた。このアブラムシは、カラスノエンドウやシロツメクサなどのマメ科植物につき、体長約 4mm で体色は黄緑色をしている。まず最も基本的な表現型である胎生雌を用いて検討を行った。アブラムシをそのまま、またはパラホルムアルデヒド (PFA) で固定した状態で、OCT コンパウンドに包埋、凍結した。この凍結ブロックをクライオスタットで 10 μm に薄切し、親水性スライドガラス (CREST) に貼付した。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

研究室既存のホルマウント ISH プロトコールに基づいて、同様の試薬と手順で染色した。

凍結切片を 4% PFA で後固定した後、DIG プロブをハイブリダイズし、抗 DIG 抗体を反応させ、NBT/BCIP で発色反応を行い封入した。今回は、菌細胞で高発現する遺伝子 BCR1 のプロブと、形成途中の付属肢先端と発現レベルは低いものの菌細胞で発現する遺伝子 Distal-less のプロブを用いた。

(3) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)

研究室既存のホルマウント FISH プロトコールに基づいて、同様の試薬と手順で染色した。

凍結切片を 4% PFA で後固定した後、蛍光ラベルしたオリゴプロブをハイブリダイズさせ、封入し、共焦点顕微鏡で観察した。FISH プロブには、ブフネラの 16s rRNA をターゲットとして作製したプロブを用いた。

4. 結果

(1) 凍結切片の作製

胎生雌の腹部には、発生途中の胚がぎっしり詰まっている。硬い外骨格のためか、胚が詰まっている構造

のためか分からないが、きれいな凍結切片を作製することは難しかった。中身が抜けたり、偏ったり、裂けることが多く、1 切片全体できれいな状態というものは取れていない。しかし部分的には観察可能な切片が作製できたので、これらを用いて組織染色を行った。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

① BCR1 プローブ

BCR1 は発現量が高いのでホールマウント ISH 時にも、明確なシグナルを得ることができる。そのため、凍結切片を用いた ISH の検討に適していると考え、まず BCR1 プローブから実験を行った。PFA 既固定の凍結切片を用いた ISH で、親虫の菌細胞と胚の菌細胞を検出することができた。PFA 未固定の切片でもシグナルは検出できるが、PFA 既固定切片より弱いシグナルとなった。

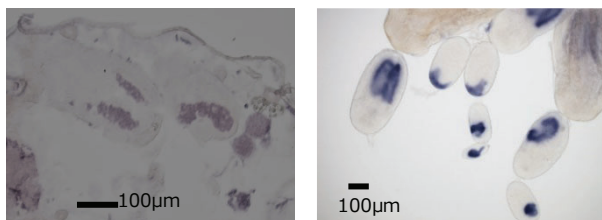


図2. BCR1 プローブによる ISH
(左：凍結切片、右：ホールマウント)

② Distal-less プローブ

Distal-less プローブのホールマウント ISH では、非特異的結合のためか中後期胚の表面が強く染まってしまう、胚の内部を観察することができなかつた。BCR1 プローブと同様の条件で凍結切片を用いた ISH を行ったところシグナルが弱かつたため、PFA 固定の有無やハイブリダイゼーション温度の条件検討を行った。

表 1. ISH の条件検討

凍結切片	PFA未固定	PFA未固定	PFA既固定
ハイブリダイゼーション温度	65℃	68℃	65℃
ISH結果			
バックグラウンド	高い	低い	高い
シグナル	検出できる	弱い	弱い

バックグラウンドとシグナルから判断して、PFA 未固定の凍結切片を用いて、ハイブリダイゼーション温度 65℃の ISH 条件を最適条件とした。ホールマウント

と同様に胚の外側に強いシグナルが見られるが、内側の菌細胞内部に弱いながらもシグナルが確認できた。

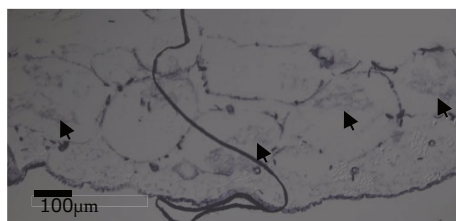


図3. Distal-less プローブによる ISH
(矢印：菌細胞)

(3) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)

ブフネラをターゲットとした FISH プローブで凍結切片を染色したところ、ホールマウント FISH と同様にブフネラを検出することができた。DAPI と共染色することで、胚や腸などが染まり、親虫の体内の位置関係を観察することが可能となった。

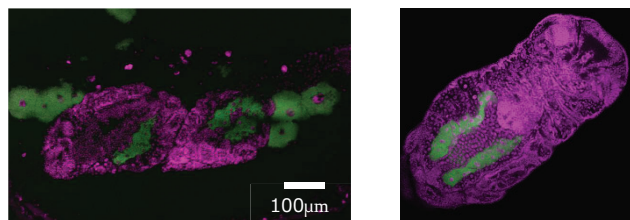


図4. ブフネラプローブ (緑) + DAPI
(左：凍結切片、右：ホールマウント)

5. 考察

Distal-less 遺伝子は、分子生物学的解析やトランスクリプトーム解析結果から、菌細胞に発現していることは知られていたが、ホールマウント ISH ではシグナルを検出することが困難であった。今回、凍結切片を用いた ISH により他の解析結果と一致する妥当な結果を得ることができた。

昆虫は硬い外骨格のために切片作製は難しいと言われているが、アブラムシでもやはり凍結切片作製は難しく、依然として課題は多い。引き続き条件検討が必要である。

ISH では、シグナルを検出することはできたものの、プローブによってはシグナルが弱くバックグラウンドが高い。凍結切片を用いた ISH プロトコールの最適化も今後の課題である。

胎生雌で実験を始めたが、今後、他の表現型 (卵生雌、雄、卵など) の凍結切片作製と組織染色も行いたい。