

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19261

研究課題名(和文) 体内外に分布する受容体Grの応答が司る昆虫の新行動・生理制御機構理解の幕開け

研究課題名(英文) Role of the insect ionotropic receptor, Grs in the sensing organs and internal tissues

研究代表者

佐藤 令一 (Sato, Ryoichi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30235428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトではGPCR型の味受容体が感覚器官や消化管における環境認識に重要な役割を果たしている。しかし、昆虫ではイオンチャンネル型の味受容体であるGrがそれらにおいて重要な役割を果たしていることが本研究により明らかになってきた。すなわち、カイコはクワを食べる前に小顎肢と呼ばれる感覚器官を葉に押し付けて触診し、クワであることを確かめてから噛み始めるが、そこで働くのは味受容体Grであると示された。また、カイコの中腸は、クワの成分をGrが認識して神経ペプチドを分泌することが示された。すなわち、恒常性制御中枢である昆虫の中腸ではGrが一つの重要なセンサーとして働いていることが垣間見え始めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの感覚器官や消化管における環境認識を担う分子の一つとして、これまではGPCR型の味受容体がクローズアップされてきた。またどの教科書にもこれしか載っていなかった。しかし、本研究により、昆虫では全く異なるファミリーに属する分子、イオンチャンネル型のGrが、同様の、それどころかヒトよりも更に巧みな認識の仕組みを作り上げていることが明らかになった。特に、昆虫の餌(宿主)認識がごく微量の葉っぱ表面の植物2次代謝産物の触診により実現しており、食べてもそれが何かを言い当てられないヒトの味認識に比べてはるかに優れたものであることの発見は、応用ばかりか哲学的意味においても、大変意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：In human, G-protein coupled receptors (GPCRs) play important roles in the recognition of environment using the sensing organs and gut. However, from our study, it was indicated that ion-channel type receptors, gustatory receptors (Grs) play important roles in the recognition in insects. For example, Gr6 and Gr9 was suggested to work as receptors for plant secondary metabolite, such like Chlorogenic acid and isoquercitrin on the surface of mulberry leaf, leading to realization of host plant recognition via palpation with maxillary palp without biting the leaf. In addition, the midgut of Bombyx mori was suggested to secrete a neuropeptide, tachykinin via recognizing some nutrients and plant secondary metabolites. Since Gr6 and tachykinin was expressed in the same enteroendocrine cell, tachykinin was suggested to be secreted via activation of Gr6. That is to say, in insect, Gr might be functional in the regulation of homeostasis in association with neuropeptide secretion from the midgut.

研究分野：昆虫生理学、昆虫病理学

キーワード：味受容体 イオンチャンネル型受容体 Gr 認識中枢としての中腸 宿主認識 植物2次代謝産物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

動物は環境や餌中の物質、体内を循環する物質、を認識し応答する様々なシステムを持つ。その認識に関与する受容体の代表はGタンパク連結型受容体（GPCR）だが、それ以外の受容体ファミリーが関与するとする知見も少しは知られている。例えば、ショウジョウバエにおいて明らかになり始めたものの一つに、GPCRではないイオンチャネル型の7回膜貫通型分子68種から構成される「味受容体（Gustatory Receptor: Gr）ファミリー」と呼ばれる分子ファミリーが存在する。しかし、このファミリーの役割については「Grの幾つかが感覚子において糖や苦味の味受容体として機能する」ことや、また最近「幾つかは二酸化炭素の受容体である」ことがわかってきたばかりである。一方、我々は原理の異なる二つのリガンド同定系を作り、ハエよりも後々の生理学的解析において有利なカイコのGrに対して解析を進めてきた。その結果、Gr6, 7, 53がある種のアミノ酸を認識することや、Gr9や10がある種の糖とアミノ酸を認識することが明らかになってきた。一方、Grは他の膜受容体の例に等しく、発現量が低く、その発現場所を正しく特定するにはin situハイブリダイゼーションは役に立たず、免疫染色が最も有効な方法である。そこで我々は、特異性に優れた抗血清を手堅く作り上げる方法を構築し、確実に免疫染色を成功させるノウハウを蓄積して来た。その結果、Gr6, 9, 10の発現場所は、カイコ感覚器官の神経細胞ばかりではなく、腸の内分泌細胞や脳の神経ペプチド分泌細胞であることが明らかになった（Mang et al., 2015, 2016）。また、カイコの脳においてGr9が摂食行動を促進するとされている神経ペプチド産生細胞に発現していることも明らかになった（Mang et al., 2016）。すなわち、Grは確かに食物中に含まれる「水溶性の栄養物質の認識に関与するものである」可能性が見えて来た。しかし、まだリガンド解析が進んだのはほんの69分の5分子であり、発現細胞を特定したのは69分の3分子でしかない。よって、Grファミリー分子が認識する物質の広がりやどれほどのものであるかはまだ計り知れず、Gr認識が生み出す細胞応答も単なる「味覚の脳への伝達」などと言った狭いものではないことが予想された。すなわち、ホルモンや神経ペプチドの放出を介した、ひょっとすると栄養の蓄積・代謝の制御、摂食行動制御など、全身的な生理上・行動上の制御において予想外に多様な意味を持つことが想像された。よって、昆虫のGrはもはや味受容体と呼べる範囲を逸脱した分子になった。ならば、リガンド同定と免疫染色を基盤技術としてGrファミリー分子の機能と固体における役割の解析を進めたならば、きっとカイコがGr遺伝子を69種類にまで増幅してきた理由と、現実にGrがどのようなリガンドの認識を介して、何をどのように制御するための分子として進化発達してきたか、またそれらがヒトのGPCRを越す思わぬ役割を持つことが見えてくるはずである。GPCRではないイオンチャネル型の、これまでに一部の昆虫でしか報告されてこなかった、ヒトのGPCRに依存した匂いや味および体内の栄養物質の受容システムと対比できる、69もの巨大な分子群からなる昆虫独特の物質認識システムとそこから始まる予想外に広い応答システムの全貌が明らかになってくると期待された。

2. 研究の目的

本研究では、(1)多数のカイコのGrについてリガンド解析を行い、(2)興味深い結果が得られたGrに対して抗血清を作製し、(3)カイコ体内における発現細胞を特定し、(4)各種神経ペプチドに対する抗血清を作製して、(5)(2)と(4)による2重染色によるGrの認識が生み出す応答の仕組みを解析し、(6)Grが神経ペプチドの分泌制御系として機能する分子であるか否かを検討し(7)昆虫特異的に分化したGrファミリーの昆虫における意義を考察することとした。

3. 研究の方法

(1) Gr リガンドの同定

発現ベクターをトランスフェクションして Gr を発現させた HEK293T 細胞に Ca^{2+} インジケーター Fluo-4 AM を取り込ませ、還流装置上でリガンドに応答した際に出る蛍光を蛍光定量システムで検出し、応答性を定量的に評価した。

(2) リガンドが同定された Gr を発現する細胞の同定に向けた抗血清作製

これまでの成功体験に基づき、幾つかの Gr 分子について、最も長い細胞外ループ部位をグルタチオン S 転移酵素 (GST) と融合した形で大腸菌に生産させ、精製してマウスあるいはウサギに免疫して抗血清を作製した。

一方、腸内分泌細胞が応答して分泌する可能性がある神経ペプチドやホルモンやホルモンの総数は 20 ほどである。この中で、行動や筋肉の運動の制御、体中栄養成分の恒常性調節に関与すると期待される幾つかの神経ペプチドについて抗血清を作製した。Gr の際と同様にこれらを GST との融合タンパク質として生産、精製し、マウスあるいはウサギで抗血清を作製した。

(3) 免疫染色による Gr と神経ペプチド産生細胞の同定

ホルマウントの組織あるいは凍結切片をパラホルムアルデヒドで固定し、(2) で作製した抗血清で 1 次染色した。2 次染色は緑色あるいは赤色の蛍光色素で標識した抗マウスあるいは抗ウサギ血清で行った。

(4) リガンドに対する細胞の応答性の解析

(1) の実験で明らかにしたリガンド (アミノ酸、クロロゲン酸等) で本当に Gr6 発現腸内分泌細胞が (3) で示した神経ペプチドであるタキキニンを分泌するののかについては ELISA アッセイ系で評価した。

また、カイコの口器の感覚器官である小顎肢の感覚神経が本当に (1) の実験で明らかにしたリガンドに応答するののかについてはチップレコーディング法でパルスを検出して検討した。

4. 研究成果

(1) カイコの Gr のリガンド

本研究の最大の成果は、Gr6 と Gr9 が単なる糖類の受容体ではなく、クワ葉の識別に必要なクロロゲン酸とイソケルシトリンの識別に関わる受容体であることを明らかにした点である。すなわち、ヒトにはない、「植物の顔」とも言い表せる 2 次代謝産物を見分けるための受容体を昆虫がもつことを世界で初めて示した点である。

Gr6 と Gr9 は、後で述べる通り、 μM レベルでクロロゲン酸とイソケルシトリンに応答する小顎肢のニューロンに発現していることが明らかになった。そこで、Gr6 と Gr9 がクワの葉の 2 次代謝産物であることが知られているこれらの物質の受容体である可能性を検討した。その結果、Gr6 および Gr9 発現 HEK293T 細胞は μM レベルの極めて低濃度でクロロゲン酸とイソケルシトリンに応答した。また、小顎肢のニューロンも同様に μM レベルでクロロゲン酸とイソケルシトリンに応答した。したがって、これらの Gr が小顎肢のニューロンを介してカイコに摂食促進を実現しているクロロゲン酸とイソケルシトリンの受容体である可能性が考えられた。しかし、どちらの Gr がどちらの 2 次代謝産物の受容体かは、Gr6 と Gr9 のクロロゲン酸とイソケルシトリンに対する感度が互いにほとんど違わなかったために、今後の課題として残された。

第2の成果は、実証されていなかった忌避物質受容体の存在を明らかにしたことである。

ショウジョウバエの知見を基にして、カイコの Gr は糖類の受容体グループ、忌避物質の受容体グループと CO₂の受容体グループの3グループに分かれているだろうとされてきた。しかし、「仮の忌避物質受容体グループ」と言われてきたメンバーが本当に忌避物質に応答するかに関しては一切明らかにならなかった。そこで、仮の忌避物質受容体グループのメンバーのうちから Gr16, 18, 53 についてカイコガの節食を停止させる「忌避物質」であることが知られている幾つかの物質を用いてリガンドアッセイを行った。その結果、Gr16 は 10 nM レベルのクマリンと 1 fM レベルのカフェインに応答した。また、Gr18 は 10 pM レベルのクマリン、10 nM レベルのカフェインとピロカルピンに応答した。また、Gr53 は 100 fM レベルのクマリンと 10 pM レベルのカフェインに応答した。いずれの Gr も確かに忌避物質に応答することが明らかになった。また、これらの Gr 間はいずれも広い応答スペクトルを持つことが明らかになった。Gr16 と 18 は近縁に属するが Gr53 はこれらとは進化的に離れた位置にある。したがって、仮の忌避物質受容体グループのメンバーの多くはここで見られたように応答スペクトルが広く、しかも多くの共通物質に応答するであろうと予想された。しかし、とは言いながらも、最も感度良く応答する物質は Gr ごとに異なっていた。このことは、これらの Gr が、例えば葉の表面にあるそれぞれ異なる微量物質に応答できる受容体として役割分担している可能性を示唆しているのかも知れない。

(2) Gr 発現細胞と神経ペプチド産生細胞の同定

本研究では、小顎肢、中腸内分泌細胞、血球などにおいて発現する Gr を4種類同定するとともに、中腸内分泌細胞が産生している神経ペプチドを3種、細胞レベルで確認した。すなわち、Gr は単なる味覚のための受容体ではなく、食べ物に由来する様々な物質を体内・外の細胞が認識するための受容体であることを明らかにした。

まず、餌に対する高感度のセンサーである小顎肢がごく微量のクロロゲン酸やイソケルシトリンを検出することが最初の引き金となり、カイコ幼虫の摂食行動が開始されることが明らかになった。そこでクロロゲン酸やイソケルシトリンに応答性を持つ Gr6 と Gr9 が小顎肢の感覚神経に発現しているかを調べたところ、確かに発現が確認された。よって、Gr6 と Gr9 はカイコがクワを認識して摂食を開始する機構に深く関与すると考えられた。

中腸ではこれまでに Gr6 の発現が確認されていた。一方、中腸は様々なセンサーを持ち、そのセンサーが神経ペプチド分泌を介して腸管運動や摂食行動、生理的な恒常性を調節しているのではないかと考えられ始めてきた。そこで、ニューロペプチド分泌制御のためのセンサーとして他にどのような Gr が候補になるかを検討した。その結果、Gr4, Gr9, Gr44, Gr63 が中腸に発現していることが明らかになった。すなわち、昆虫の腸には多種類のイオンチャネル型の味受容体が発現することが明らかになった。

中腸内分泌細胞に発現するとされる神経ペプチドが RT-PCR 解析を中心にして報告されてきた。しかし、タンパク質レベルで、しかも細胞を特定する形での発現確認はまだ行われていなかった。そこで、幾つかの神経ペプチドについて免疫染色法で検討したところ、確かにタキキニン、アラトスタチン、ミオサプレッシンが中腸内分泌細胞発現していることが確認された。

(3) Gr が神経ペプチド分泌制御系として機能する分子であるか否かについて

本研究は、糖やアミノ酸、クロロゲン酸と言ったクワ葉に含まれる物質が神経ペプチドであるタキキニンの分泌誘導に関わることを明らかにした。すなわち、味受容体 Gr が環境センサーとして機能し、神経ペプチド分泌を介して行動や体内の様々な恒常性の制御に関わる可能性を示した。

既に述べた Gr と神経ペプチドの中に同じ中腸内分泌細胞で発現するものがあるかについて検討したところ、タキキニンが Gr6 発現細胞に、また、ミオサプレッシンが Gr9 発現細胞に産生され蓄積していることが明らかになった。すなわち、Gr6 がタキキニンの、また、Gr9 がミオサプレッシンの分泌制御に関わる可能性が考えられた。

Gr による中腸に到達した味物質のセンシングが神経ペプチド分泌を制御しているかを調べる手始めとして、まず Gr6 が受容することができるクロロゲン酸や、それを含む桑葉入りの人口飼料を感じて中腸がタキキニンを血体腔中に分泌するかを調べた。その結果、いずれも中腸のタキキニン分泌を促進することが明らかになった。

<引用文献>

- Dingze Mang, Min Shu, Haruka Endo, Yasutaka Yoshizawa, Shinji Nagata, Shingo Kikut, Ryoichi Sato. Expression of a sugar clade gustatory receptor, BmGr6, in the oral sensory organs, midgut, and central nervous system of larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2015. 70, 85-98.
- Dingze Mang, Min Shu, Shiho Tanaka, Shinji Nagata, Tomoyuki Takada, Haruka Endo, Shingo Kikuta, Hiroko Tabunoki, Kikuo Iwabuchi, Ryoichi Sato. Expression of the fructose receptor BmGr9 and its involvement in the promotion of feeding, suggested by its co-expression with neuropeptide F1 in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2016. 75, 58-69.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Kana Tsuneto, Tomoyuki Takada, Mayu Kasubuchi, Takayuki Yamagishi, Satomi Adegawa and Ryoichi Sato. BmGr10 is a putative functional gustatory receptor in the myo-inositol neuron in the epipharyngeal sensillum. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. (査読あり) 2019. 88, 7-15. DOI, 10.11416/jibs.88.1_007.
2. Takayuki Yamagishi, Haruka Endo, Keisuke Fukumura, Shinji Nagata, Tohru Hayakawa, Satomi Adegawa, Mayu Kasubuchi and Ryoichi Sato. The plant secondary metabolite chlorogenic acid induces the secretion of a regulatory hormone, tachykinin, from the silkworm midgut. *Peptides*. (査読あり) 2018. 106, 21-27. DOI, 10.1016/j.peptides.2018.06.004.
3. Mayu Kasubuchi, Fumika Shii, Kana Tsuneto, Takayuki Yamagishi, Satomi Adegawa, Haruka Endo and Ryoichi Sato. Insect taste receptors relevant to host identification by recognition of secondary metabolite patterns of non-host plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり) 2018. 499, 901-906. DOI, 10.1016/j.bbrc.2018.04.014.

〔学会発表〕(計9件)

1. 遠藤悠, 常藤加菜, 佐藤令一. カイコの摂食促進物質に応答する味覚受容体. 平成 31 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会. 2019 年 3 月 23 日. 農工大小金井キャンパス.
2. 常藤加菜, 遠藤悠, 志井文香, 佐々木謙, 永田晋治, 佐藤令一. カイコガ幼虫における味覚情報に制御された宿主摂食機構の解明. 平成 31 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会. 2019 年 3 月 23 日. 農工大小金井キャンパス.
3. Takayuki Yamagishi and Ryoichi Sato. A plant secondary metabolite induces secretion of a feeding regulatory hormone, tachykinin from endocrine cells of the silkworm midgut. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. August 23, 2018. Orthodox Academy of Crete, Greece.
4. Mayu Kasubuchi, Fumika Shii, Kana Tsuneto, Ryoichi Sato. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. August 23, 2018. Orthodox Academy of Crete, Greece.
5. Shogo Uno, Haruka Endo and Ryoichi Sato. Characterization of novel hormone-producing cells expressing gustatory receptors in the fat body of silkworm, *Bombyx mori* larvae. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. August 23, 2018. Orthodox Academy of Crete, Greece.
6. Fumika Shii, Mayu Kasubuchi, Kana Tsuneto and Ryoichi Sato. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. August 23, 2018. Orthodox

Academy of Crete, Greece.

7. Kana Tsuneto, Haruka Endo, Ken Sasaki and Ryoichi Sato. Ultrasensitive chemosensory neuron in silkworm identify its host plant without biting. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. August 23, 2018. Orthodox Academy of Crete, Greece.
8. Haruka Endo, Kana Tsuneto and Ryoichi Sato. Silkworm gustatory receptors tuned to phagostimulants. The 10th International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA. August 23, 2018. Orthodox Academy of Crete, Greece.
9. 山岸孝幸・佐藤令一. 昆虫消化管の神経ペプチド分泌機構の解析. 第3回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会. 2017年11月18日. 東大柏キャンパス.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。