

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21680035

研究課題名（和文） 昆虫匂い活性型イオンチャネルの抑制機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of inhibition of insect odor-gated ion channels.

研究代表者

佐藤 幸治 (SATO KOJI)

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：20444101

研究成果の概要(和文):昆虫の匂い受容体は、匂いで活性化されるイオンチャネルを構成する。受容体スクリーニングの結果、このようなイオノトロピックな機能を持つ受容体を幾つか見出した。哺乳類培養細胞再構成系を用いて、これらの受容体の活性測定を行ったところ、チャネル活性が競合阻害により抑制されることが明らかとなった。特に、カイコゲノムより新たに見出した糖活性型イオンチャネルも、糖の構造異性体により競合阻害を受けることがわかった。最後に、これらのチャネル活性に関わるアミノ酸残基を同定するために点変異体を作成し、*in vivo*, *in vitro*での活性測定を行った結果、チャネルポアを構成するアミノ酸を見出した。

研究成果の概要(英文): Insect olfactory receptors compose heteromeric ion channels activated by odorants. Receptor screening experiments revealed the genes encoding ionotropic receptors. I expressed the receptors in heterologous cells, and analyzed their activity. I found some compounds competed with a ligand at their binding site on receptors. The receptor screening of silk moth genome showed a sugar-regulated ion channel, in which structurally related sugar inhibited its binding site. Finally, mutagenesis experiment of olfactory receptor complex identified the amino acid residue contributing the function of channel pore formation.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

研究分野：感覚生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：嗅覚、味覚、イオンチャネル、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

動物が、外界に存在する餌や毒物などの化学物質を正確に認識し、それらに対して適切な行動または内分泌学的な反応を示すことは、生存、繁殖に必須の能力である。脊椎動物では、嗅覚器中の嗅神経細胞に分布する匂

い受容体ファミリーが、外界に存在する化学物質に対する高感度センサーとして機能している。これらの受容体は全て、7回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体ファミリーに属し、匂い物質と受容体の結合が、G タンパク質シグナル伝達経路を経て脱分極性のイ

オンチャネルを活性化する。しかし、昆虫の匂い受容体は7回膜貫通構造を持ちながら、匂いで活性化されるイオンチャネルとして機能するイオントロピック型受容体である。さらに昆虫の嗅神経細胞はその発現受容体に依存した自発的活動を示し、様々な匂い物質に対して、脱分極性または過分極性の双極性応答を示すことが知られている。つまり昆虫の化学感覚器における匂い識別機構には、脊椎動物とは全く異なった分子基盤が関与しており、その過分極性、つまり抑制性の応答は昆虫にユニークな化学物質の識別機構と言える。

近年、この抑制性応答に、昆虫の忌避行動が関与することが明らかにされつつある。忌避行動は吸血や繁殖行動を阻害することから、虫媒性伝染病の予防策の一つとして、虫除け剤による匂い受容体阻害機能が注目されている。抑制性応答を引き起す分子はこれまでに幾つか明らかにされているが、これらの物質が受容体のチャネル機能に及ぼす影響は未解明である。

2. 研究の目的

匂い活性型イオンチャネルは、昆虫ゲノム内で巨大なファミリーを構成している。立体構造は全く明らかにされていないが、その塩基配列情報から、類似の機能が推測される遺伝子も多数存在する。本研究ではまず、新規受容体とそのリガンド、抑制性物質の探索を行う。得られた受容体と抑制性物質の組み合わせを用いて、抑制性匂い物質が匂い受容体のどの部位を標的とし、どのように受容体と相互作用し、その結果どのような抑制性応答が生じるのか、という一連の分子機構を明らかにする。さらに変異受容体を作成し、その活性を *in vivo* および *in vitro* で測定することで、抑制性応答に関与するアミノ酸残基を同定する。

3. 研究の方法

- (1) ゲノムデータベース情報を利用して、匂い活性型イオンチャネルと類似した配列を探索し、リガンドスクリーニングを行う。匂い活性型イオンチャネルは味覚受容体や、他の動物種の機能未知の受容体と弱い配列の相同性が認められることから、抑制性応答やイオントロピックな機能を示す受容体を、動物種を越え幅広く探索する。
- (2) 遺伝子強制発現系を利用した抑制性匂い物質の作用部位の決定と、シングルチャネルレベルでの活性測定を行う。哺乳類培養細胞に受容体を発現させ、ELISA法、カルシウムイメージング法、パッチクランプ法による受容体の定量的な活性測定を行い、抑制性匂い物質の作用部

位を決定する。

- (3) アミノ酸変異受容体の評価を *in vivo*, *in vitro* で行い、受容体のイオントロピック機能に関与するアミノ酸残基を同定する。点変異法を用いて作成した変異受容体を研究方法(2)を用いて機能評価し、アミノ酸残基の絞り込みを行う。候補変異体を *in vivo* で機能評価するため、UASの下流に組み込んだ変異体ショウジョウバエを作成し、嗅神経特異的に変異受容体を発現させる。特異的リガンドを利用して標的受容体だけを刺激することにより、変異受容体の *in vivo* での機能評価を行う。培養細胞と遺伝子改変動物それぞれの結果を統合的に評価することで、アミノ酸残基の機能を決定する。

4. 研究成果

- (1) 線虫耐性幼虫フェロモンは、新規に同定されたフェロモン受容体を介して、抑制性応答を引き起すことがわかった。耐性幼虫フェロモンは生息環境が悪化した線虫の幼虫が分泌する物質で、他の幼虫の耐性幼虫への変態を促進する機能がある。耐性幼虫は環境適合性が高く、寿命を制御するフェロモンとして知られている。これまで受け手の幼虫が持つフェロモン受容体は不明であったが、線虫変異体スクリーニングと哺乳類培養細胞強制発現系の組み合わせで、その受容体とフェロモンの作用が明らかとなった。受容体は匂い活性型イオンチャネルと同様に、2種類の7回膜貫通型受容体で構成され、フェロモン受容には受容体共発現が必要であり、神経細胞に抑制性応答を引き起した。受容体はGタンパク質シグナル伝達系を利用していると考えられるが、神経細胞の抑制による寿命の制御機構として、全く新しい生物学的知見である。
- (2) 脊椎動物のアディポネクチン受容体 AdipoR1 は、細胞内へのカルシウム流入を調節することを明らかにした。昆虫匂い活性型イオンチャネルはN末端が細胞内に位置する7回膜貫通トポロジーを持っており、AdipoR1 も全く同じトポロジーを持つ膜タンパク質である。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌され、インシュリン抵抗性を改善することで II 型糖尿病に関与する重要なペプチドホルモンである。C2C12 培養繊維芽細胞の RNAi による AdipoR1 ノックダウンとアフリカツメガエル卵母細胞強制発現系による再構成実験の結果、AdipoR1 は、アディポネクチン刺激により細胞外カルシウム流入を促進することがわかった。その結果生じる細胞内カルシウム上

昇は2種類の遺伝子転写制御を介して、ミトコンドリア機能を調節することがわかった。このことは AdipoR1 を標的にした創薬が、運動機能の改善に効果があることを示唆している。

- (3) カイコガ味覚受容体 BmGr9 は六炭糖で活性制御されるイオンチャンネルを構成することを発見し、その活性化、抑制機構を明らかにした。

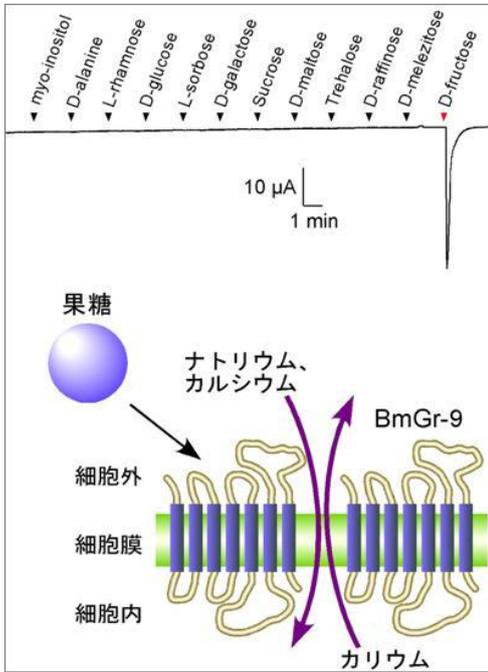


図1. BmGr9の果糖に対する応答電流とそのシグナル変換機構

味覚受容体は、匂い活性型イオンチャンネルと弱い配列の相同性があることが知られている。そこでカイコのゲノムデータベースを利用して、味細胞で発現するいくつかの味覚受容体候補遺伝子を取り出した。これらの遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、様々な味物質で刺激したところ、BmGr9 (*Bombyx mori* gustatory receptor-9) が果糖に応答することを見出した(図1)。ショウジョウバエがもつ BmGr9 類似遺伝子も検討したところ、同様に果糖に対する味覚受容体であった。この結果は、様々な昆虫に存在する BmGr9 の類似遺伝子が果糖に対する味覚受容体をコードすることを示唆している。哺乳類培養細胞に BmGr9 を導入しシングルチャンネル測定を行った結果、その細胞膜上に果糖で活性化されるイオンチャンネルが合成されていることがわかった。つまり BmGr9 そのものが、果糖で活性化されて開くイオンチャンネルであることが明らかとなった。また果糖の構造異性

体であるブドウ糖などの他の糖類は、BmGr9 と果糖の結合を阻害する作用を持つことも明らかになった。

これまで昆虫が味を感じる分子メカニズムは全く明らかにされておらず、本成果によりその一端が明らかとなった。特に、味覚受容に嗅覚同様、イオントロピック型受容体とその抑制という共通の分子基盤が関与していることは、全く新しい生物学的知見と言える。

- (4) 匂い活性型イオンチャンネルのチャンネルポア構成に関与するアミノ酸残基を同定した。匂い活性型イオンチャンネルは申請者が明らかにした、2種類の匂い受容体で構成される新規のイオンチャンネルファミリーである。しかし、そのチャンネル構成に寄与するタンパク質に関して、どちらのタンパク質が関与するのか、複数の研究グループから矛盾するモデルが報告されていた。

点変異体解析の結果、匂い活性型イオンチャンネルを構成する2種類のタンパク質の双方から、チャンネルコンダクタンスに影響を与えるアミノ酸残基を見出した。この変異受容体を発現するショウジョウバエ嗅神経細胞のユニット記録により、これらのアミノ酸残基は実際にチャンネル活性に影響を与えることを確認できた。以上の結果から、匂い活性型イオンチャンネルのチャンネル構成には複合体を構成する全てのタンパク質が関与することが証明された。

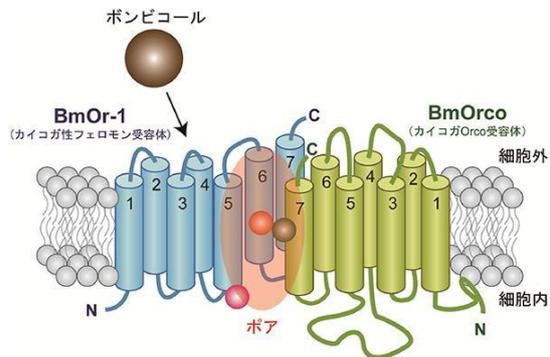


図2. BmGr9の果糖に対する応答電流とそのシグナル変換機構

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① 佐藤 幸治、昆虫の化学感覚器に発現するイオントロピック型化学感覚受容体、比較生理生化学、査読あり、29巻、2012、50-57

- ② Nakagawa T, Pellegrino M, Sato K, Vosshall LB, Touhara K. Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex. PLoS ONE、査読あり、7 巻、2012、e32372 doi:10.1371/journal.pone.0032372
- ③ Sato K, Tanaka K, Touhara K. Sugar-regulated cation channel formed by an insect gustatory receptor. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America、査読あり、108 巻、2011、11680-11685、doi: 10.1073/pnas.1019622108
- ④ Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, Nakagawa T, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. Nature、464 巻、査読あり、2010、1313-1319、doi:10.1038/nature08991
- ⑤ 佐藤 幸治、昆虫の 7 回膜貫通型嗅覚受容体複合体が構成する匂い活性型イオンチャネル、日本薬理学雑誌、134 巻、査読なし、2009、248-253
- ⑥ Kim K, Sato K, Shibuya M, Zeiger DM, Butcher RA, Ragains JR, Clardy J, Touhara K, Sengupta P. Two chemoreceptors mediate developmental effects of dauer pheromone in *C. elegans*. Science、326 巻、査読あり、2009、994-998、doi: 10.1126/science.1176331

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Sato K. Insect chemosensory receptor channels. The 58th Annual Meeting of the Entomological Society of America、2010 年 12 月 12 日、San Diego, USA
- ② 佐藤 幸治、匂い物質によるイオンチャネル型昆虫嗅覚受容体の競合阻害、日本農芸化学会 2010 年度東京大会、2010 年 3 月 30 日、東京
- ③ Sato K. Insect chemosensation via ligand-gated cation channels. The European Chemoreception Research Organisation XIX Congress、2009 年 9 月 24 日、Villasimius, Italy
- ④ Nakagawa T, Sato K, Touhara K. Putative amino acids involved in ion channel activities of insect olfactory receptors. 11th European Symposium for Insect taste and olfaction、2009 年 9 月 19 日、Villasimius, Italy

〔図書〕（計 2 件）

- ① 佐藤 幸治、化学物質に対する昆虫の反応行動とその役割、化学受容の科学、2012、pp. 189-201、化学同人、京都
- ② Sato K, Touhara K. Insect Olfaction: Receptors, Signal Transduction, and Behavior, In Results and Problems in Cell Differentiation、2009、pp.121-138、Springer, Berlin

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

- http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20100401.html
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2011/20110628-1.html>
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2012/20120308-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 幸治 (SATO KOJI)
東京大学・生産技術研究所・特任講師
研究者番号：20444101