

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：23201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580070

研究課題名(和文) 巣仲間認識に関わるアリ触角特異的コレステロール結合タンパク質の性状と機能解析

研究課題名(英文) Characterization of antenna-specific cholesterol-binding protein in the ant

研究代表者

石田 裕幸 (ISHIDA, Yuko)

富山県立大学・その他部局等・研究員

研究者番号：90509861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：クロオオアリワーカー触角特異的に発現するニーマンピック2型に相同性の高いタンパク質を同定した。ヒトでは細胞内のコレステロールを運搬する機能を有するが、アリでは特定の触角感覚子腔内に局在し、様々な脂肪酸、アルコール、酢酸化合物の情報伝達物質を運搬していることが、遺伝子解析、質量分析、生化学解析、円偏光二色性解析、免疫組織化学解析、触角の活動電位解析より明らかにした。さらに、結晶構造解析より、同タンパク質が構造に富み、柔軟な結合ポケットが様々なリガンドとの結合が可能であること、また低pH条件下でリガンドを放出する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified Niemann-Pick type C2 protein antenna-specifically expressed in worker of the Japanese carpenter ant, *Camponotus japonicus*. In human, this protein plays an essential role in transferring cholesterol in the cells whereas ant accumulated this protein in the basiconic sensillum and used it as a carrier protein for semiochemicals such as long-chain fatty acids, alcohols, and acetates. The protein was composed of beta-structure. The molecular mechanism of binding release was regulated by hydrogen network formation and angle change of side chain of the 112th tryptophan residue.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：ニーマンピック2型タンパク質 クロオオアリワーカー 蛍光拮抗アッセイ 円偏光二色性 GC-EAD 結晶化学 情報伝達物質

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の触角は、多数の匂い受容感覚子で覆われており、ハエ、甲虫、チョウ目種などの受容感覚子内リンパ液には、分子量約 15 万の匂い物質結合タンパク質(OBP)あるいは化学感覚子タンパク質(CSP)が高濃度に蓄積されている。これらのタンパク質は、 $\alpha$ ヘリックスの配置がジスルフィド結合によって固定され、構造変性が極めて小さく、堅いリガンド結合ポケットを保持することにより特定の疎水性の情報伝達物質と結合することが大きな特徴である。このリガンドの選択性は、配偶行動や産卵場所の選定などに寄与し、上記の昆虫種の繁栄に大きく寄与してきたと考えられている。

一方、主に地中や地上で生息する社会性昆虫のアリは視覚を効率良く利用することが出来ないため、進化の過程で嗅覚感覚器の受容体タンパク質数を増加させ、他の昆虫種よりも多くの化学物質を受容認識することで生息環境の様々な情報を得るシステムを構築してきた。特にワーカーは、女王やオス、幼虫の世話、さらに巢内の清掃、なわばりの巡視、集団による狩りなどの役割を担っており、その情報伝達物質受容分子機構の研究は、社会性の維持機構の分子レベルの解明に繋がる。

## 2. 研究の目的

クロオオアリの触角感覚子内の多くの受容神経細胞の数は1~9個であり、他の昆虫種とほぼ同等であることが報告されている。しかしワーカーで確認されるbasiconic 感覚子(オスには存在しない。)には130個もの受容神経細胞が格納されており、これら多くの細胞が、ワーカーの多様な情報伝達に関与していると考えられている。各受容神経細胞に対して、特定の情報伝達物質が対応すると仮定した場合、これまでに知られているOBP、CSPの様に、リガンド選択能の高い分子運搬システムでは、種類の異なる幾つかの情報伝達物質を

同時に機能発現させることは難しいと考えられる。

クロオオアリワーカー触角から新たに同定されたニーマンピック 2 型タンパク質(CjapNPC2)は、 $\beta$ 構造であることが推定されており、様々な情報伝達物質を感覚子腔で運搬する可能性が示されている。そこで、下記を解明することを目指した。

- (1) CjapNPC2 の塩基配列の決定する。
- (2) CjapNPC2 と結合するリガンド群の同定する。
- (3) CjapNPC2 と結合したリガンド群のうち実際に情報伝達物質として働く化合物を特定する。
- (4) CjapNPC2-リガンドの結合解離機構の解明する。
- (5) 様々な昆虫の OBP や匂い受容分子機構に関わる様々なタンパク質の同定、局在性、機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 材料

クロオオアリのワーカーと雄、クロキンバエを供試昆虫とした。

### 方法

サブトラクション PCR、PCR、RACE、DNA シークエンシング、RT-PCR、大腸菌系リコンビナントタンパク質発現、各種クロマトグラフィーによる精製、MALDI TOF 質量分析、免疫染色、円偏光二色性計測、蛍光拮抗結合アッセイ、ガスクロマトグラフィー-触角活動電位検出器、結晶化学、アフリカツメガエル卵母細胞発現系などを適用した。

## 4. 研究成果

### 1) CjapNPC2 の機能構造解析

CjapNPC2 は、クロオオアリワーカー触角の basiconic 感覚子の感覚子腔特異的に蓄積していた。円偏光二色性計測、結晶化学より、

CjapNPC2 は  $\beta$  構造で構成されていることを明らかにした。CjapNPC2 は長鎖脂肪酸、アルコール、酢酸など様々なリガンドと幅広く結合した。触角活動電位の結果より、CjapNPC2 と結合したリガンドの中でリノイルアルコール、酢酸ヘキサデシル、酢酸オクタデシルが情報伝達物質として利用されていることを明らかにした。さらにアポ型、オレイン酸結合型-CjapNPC2 の結晶構造を明らかにし、リガンド結合には、Lys69, Lys70, Tyr93, Trp112 が関わる水素結合ネットワークと結合ポケット内の Trp112 の側鎖の向きが重要であることを明らかにした。

以上から、ヒトは NPC2 をコレステロールキャリアタンパク質として利用しているが、アリは、感覚子腔で蓄積し、様々な情報伝達物質を運搬するキャリアタンパク質として分子進化させ、活用していると結論した。

## 2) クロキンバエ口盤特異的に蓄積する脂肪酸可溶化タンパク質の機能解析

クロキンバエにおいて、生肉摂取は幼若ホルモンやピテロジェニンの生合成、配偶行動に必須である。しかし、生肉に含まれる長鎖脂肪酸は水に不溶性であり、効率よく摂取するためには、何らかの可溶化剤の存在が推定された。

本研究ではクロキンバエ口盤特異的に蓄積する OBP 様タンパク質 (PregOBP56a) を発見した。PregOBP56a は pH 7, pH 6 では鶏肉に含まれるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸と結合し、pH 5 で解離した。

以上から、PregOBP56a は採餌中には長鎖脂肪酸を効率よく可溶化し、ハエ腸内の pH は酸性であることから、中腸への脂肪酸運搬ならびに徐放の機能を持つと提案した。

## 3) クロキンバエ嗅覚器における水透過型アクアポリンの同定、局在性、機能解析

感覚子腔には感覚子リンパが蓄積されている。感覚子リンパは、OBP、嗅覚受容体、匂い物質分解酵素の前受容イベントの反応の場を提供すると同時に受容神経細胞の樹状突起の乾燥を防ぐ役割を果たす。しかしながら、その水バランスの維持機構はこれまで明らかにされていない。

本研究では *Drosophila melanogaster* integral protein (DRIP) に相同性の高いアクアポリン (PregAQP1) を同定した。PregAQP1 は 6 個の膜貫通型領域、アスパラギン-プロリン-アラニン (NPA) モチーフを持っていた。PregAQP1 遺伝子はマキシラリーパルプで最も高く、触角でも高い発現を確認した。PregAQP1 は、マキシラリーパルプの long-grooved hair の補助細胞、触角の thick-walled sensillum の受容神経細胞に局在していた。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現機能解析より、PregAQP1 は水銀で阻害される水透過性を持っていた。

以上から PregAQP1 は嗅覚器官の水環境を維持する役割を果たすと結論した。

## 4) 食欲減退臭い物質によるクロキンバエ嗅覚神経細胞のチロシンデカルボキシラーゼ遺伝子発現の減少

クロキンバエは自然環境に存在しえない過剰量の d-リモネン臭を暴露すると食欲が生涯減退し続けることが知られている。その食欲減退機構は脳内のチラミン (TA) のタイトーの減少が関与していると考えられている。

チラミンはチロシンデカルボキシラーゼ (Tdc) によって合成され、チラミン  $\beta$  ヒドロキシラーゼ (Tbh) によってオクトパミン (OA) に変換されることが知られている。

本研究ではクロキンバエから PregTdc cDNA と PregTbh cDNA をクローニングした。両推定タンパク質は *D. melanogaster* のものと高い相同性を示した。PregTdc は触角、口盤、符節で発現し、PregTbh は頭部で発現してい

た。TA は感覚器官で、OA は脳で生合成されると考えられた。また、d-リモネン臭暴露によって触角の *PregTdc* のみ発現抑制が認められ、触角の *PregTdc* が TA タイターの減少に関与している可能性が示された。免疫染色により *PregTdc* は thin-walled sensillum に局在していた。

以上から d-リモネンは、thin-walled sensillum の嗅覚受容神経細胞における *PregTdc* の発現を抑制、それによって TA の産生量を減少させたと結論した。TA は、シナプス接合部を介してこの嗅覚受容神経細胞から脳の触角葉の神経細胞へ輸送されると考えられており、忌避臭い情報の伝達を担っていると考察した。

## 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. Ishida, Y., Tsuchiya, W., Fujii, T., Fujimoto, Z., Miyazawa, M., Ishibashi, J., Matsuyama, S., Ishikawa, Y., and Yamazaki, T. (2014) Niemann-Pick type C2 protein mediating chemical communication in the worker ant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, 3847-3852. DOI: 10.1073/pnas.1323928111

2. Ishida, Y., Ishibashi, J., and Leal, W. S. (2013) Fatty acid solubilizer from the oral disk of the blowfly. PLoS ONE, 8, e51779. DOI: 10.1371/journal.pone.0051779

3. 宮澤光博、石田裕幸、Leal, W. S. (2012) カイコ蛾フェロモン結合タンパク質のフォールディングと動的挙動。蚕糸・昆虫バイオテック、81、131-137.

4. 石田裕幸 (2012)

昆虫の嗅覚・味覚受容に与る感覚子の機能と水の関係。蚕糸・昆虫バイオテック、81、23-30.

5. Ishida, Y., Nagae, T., and Azuma, M. (2012) A water-specific aquaporin is expressed in the olfactory organs of the blowfly, *Phormia regina*. J. Chem. Ecol., 38, 1057-1061. DOI: 10.1007/s10886-012-0157-z

6. Ishida, Y., and Ozaki, M. (2012) Aversive odorant causing appetite decrease down-regulates *tyrosine decarboxylase* gene expression in the olfactory receptor neuron of the blowfly, *Phormia regina*. Naturwissenschaften, 99, 71-75. DOI: 10.1007/s00114-011-0865-1

[学会発表](計4件)

1. クロキンバエ口盤特異的に蓄積する脂肪酸可溶性タンパク質の同定、局在性、機能解析

石田裕幸・石橋純・Walter S. Leal  
平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会  
2013 年 3 月 18 日～19 日  
農林水産技術会議事務局筑波事務所本館

2. クロキンバエの匂い受容器官で発現するアクアポリンの同定、局在性、機能解析石田裕幸・永江知音・東政明

2012 年日本蚕糸学会合同支部大会  
2012 年 11 月 10 日～11 日  
信州大学繊維学部

3. クロキンバエにおける忌避匂い物質による食欲減退機構：チラミン合成酵素、代謝酵素、受容体遺伝子の発現と局在性

石田裕幸・尾崎まみこ  
第 56 回日本応用動物昆虫学会大会  
2012 年 3 月 27～29 日  
近畿大学奈良キャンパス

4. クロオオアリワーカー触角特異的ヒトコレステロール結合タンパク質類似タンパク質の同定、発現、性状解析  
石田裕幸・土屋渉・石橋純・宮澤光博・山崎俊正  
平成 24 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会  
2012 年 3 月 18 日～19 日  
九州大学箱崎キャンパス文系地区

〔その他〕

ホームページ等

富山県立大学

[http://www.pref.toyama.jp/cms\\_press/2014/20140226/00013949.pdf](http://www.pref.toyama.jp/cms_press/2014/20140226/00013949.pdf)

農業生物資源研究所

<http://www.nias.affrc.go.jp/press/2014/20140224/index.html>

東京大学

<https://sites.google.com/a/utlae.org/jp/home/announcements/fushanxianlidaxue%E3%80%81shengwuyan%E3%80%81zhubodatonogongtongyanjiugapnasnijiezai>

共同通信 P R ワイヤー、CNET Japan、産経新聞、中日新聞、農業協同組合新聞、日本農業新聞、化学工業日報、北日本新聞、富山新聞など様々なメディアで本研究成果（雑誌論文 1）が紹介された。

講演

クロオオアリワーカー触角特異的情報伝達物質運搬タンパク質の同定、機能解析、構造決定

石田裕幸

名古屋大学大学院生命農学研究科

2014 年 3 月 28 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

石田 裕幸 (ISHIDA, Yuko)

富山県立大学・生物工学科・嘱託研究員

研究者番号：90509861

### (2)研究分担者

山崎 俊正 (YAMAZAKI, Toshimasa)

独立法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・ユニット長

研究者番号：40360458

### (2)研究分担者

宮澤 光博 (MIYAZAWA, Mitsuhiro)

独立法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・ユニット長

研究者番号：90370684

### (3)連携研究者

石橋 純 (ISHIBASHI, Jun)

独立法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え研究センター・主任研究員

研究者番号：20391576