

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24658049

研究課題名（和文）性フェロモン受容系の遺伝的機能改変による高感度匂いセンサカイコガの開発

研究課題名（英文）Development of odorant sensor silkmoths by genetic modification of sex pheromone detection system

研究代表者

櫻井 健志（SAKURAI TAKESHI）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：20506761

研究成果の概要（和文）：キイロショウジョウバエ一般臭嗅覚受容体の一つである Or82a をカイコガ性フェロモン主成分であるボンビコールの受容体遺伝子 BmOR1 プロモータ制御下で発現する遺伝子組換えカイコガを作出した。この組換えカイコガは、Or82a のリガンドである geranyl acetate 刺激に対して濃度依存的に、フェロモン源探索行動を発現した。また、Or82a の発現による、ボンビコール受容細胞の神経投射パターンの変化は見られなかった。これらの結果から、一般臭の嗅覚受容体の遺伝的導入によりカイコガのフェロモン源探索行動の匂い選択性を人為的に改変できることが示され、本手法を用いてオスカイコガ生体をさまざまな匂いのセンサとして利用する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We generated transgenic silkmoths expressing an odorant receptor for general odorants (Or82a) from the fruit fly under the control of the sex pheromone receptor gene promoter in the silkmoth. Male moths expressing Or82a display pheromone searching behavior in response to geranyl acetate, one of ligands of Or82a, in dose-dependent manner. Expression of Or82a does not affect projection pattern of bombykol receptor neurons. These results indicate that odor selectivity for initiation of pheromone searching behavior can be genetically modified by ectopic expression of general odorant receptors in bombykol receptor neurons, and open the way to utilize male silkmoths as biosensors for various odorants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、生体機能利用、匂いセンサ、カイコガ、嗅覚受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年われわれの生活の安全・安心の質の向上のために、環境中の匂い分子を高感度・高選択的にリアルタイムで検出し、発生源を探索するセンサへの社会的ニーズが高まっている。これまで、工学的技術に基づいた匂いセンサの開発が進められており、それらの一部は実用化されつつある。しかしながら、匂いセンサに求められる幅広いニーズに対応

できる検出感度、選択性、検出速度、対象とする匂いの種類、そして匂い源の探知能を兼ね備えたセンサシステムが構築された例はない。オスカイコガはわずか 170 分子のフェロモン主成分（ボンビコール）を触角のボンビコール受容細胞で検知すると、即発的に匂い源定位行動を発現する。これは、工学的な匂いセンサの感度の少なくとも 1000 倍以上の超高感度である。研究開始当初の時点で、

代表者らはボンピコール受容体遺伝子 (BmOR1) の単離解析から、ボンピコールの情報が入力時点から、他の匂いとは異なる経路で処理されることを明らかにしていた<sup>(1, 2)</sup>。さらに、遺伝子組換えにより、ボンピコール受容細胞に BmOR1 と構造の類似した他種蛾類のフェロモン受容体を導入することで、行動発現の匂い選択性を導入した受容体の匂い選択性へと人為的に改変できることを見出した<sup>(3)</sup>。この成果に基づき、昆虫の嗅覚受容体をボンピコール受容細胞に導入することで、嗅覚受容体の応答特性に応じて、所望の匂いを高感度かつ選択的に探知する匂いセンサとして有用なカイコガを作成できるとの着想に至った。一方で、蛾類のフェロモン受容体は昆虫嗅覚受容体ファミリーの中で特殊なグループを形成していること<sup>(4)</sup>、匂いセンサのニーズはフェロモン以外の匂い (一般臭) にあることから、カイコガを利用した匂いセンサの実現にはフェロモン受容体だけではなく、一般臭の嗅覚受容体においても同様にボンピコール受容細胞の応答改変と、それによる匂い源探索行動発現の匂い選択性を人為的に制御できることを検証する必要があった。

(1) Sakurai T, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16653-16658. (2) Nakagawa T, Sakurai T, et al. (2005) *Science* 307: 1638-1642. (3) Sakurai T, Mitsuno H, Haupt SS, Uchino K, et al. (2011) *PLoS Genet* 7: e1002175. (4) Mitsuno H, Sakurai T, et al. (2008) *Eur J Neurosci* 28: 893-902.

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では昆虫の一般臭嗅覚受容体の導入により、カイコガの匂い源定位行動を嗅覚受容体の応答特性に応じて、人為的に改変する技術の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子組換えカイコガの作出

一般臭嗅覚受容体遺伝子のボンピコール受容細胞での発現は、GAL4-UAS システムを利用して行った。ボンピコール受容細胞特異的に GAL4 を発現するドライバー系統は BmOR1-GAL4<sup>(3)</sup> を用いた。エフェクター系統として、キロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体である Or43b と Or82a のタンパク質翻訳領域を UAS 下流につないだ遺伝子組換え用ベクター (pBacUAS-Or43b, pBacUAS-Or82a) をそれぞれ構築した (図 1)。構築したベクターを転移因子 *piggyBac* のトランスポゼースを発現するヘルパー DNA とカイコ卵に共インジェクションし、次世代で組換え体を選抜し、UAS 系統を得た。確立した UAS 系統を BmOR1-GAL4 系統と交配することでボンピコ

ール受容細胞での一般臭受容体遺伝子発現系統を得た。

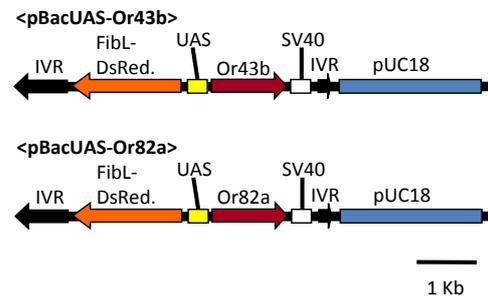


図 1 遺伝子組換えに用いたベクターの構造. UAS の下流で Or43a (上) と Or82a (下) を発現するように設計した. FibL-DsRed: 絹糸腺で DsRed を発現する選抜マーカー. IVR: *piggyBac* の逆向き反復配列. SV40: SV40 ポリ A 付加配列.

### (2) RT-PCR による遺伝子発現解析

羽化 2-6 日の GAL4 と UAS 組換え遺伝子を持つオスカイコガ触角から total RNA を抽出し、これらの total RNA を鋳型として、市販のキットを用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。PCR は導入した嗅覚受容体遺伝子配列に特異的なプライマーを用いて、上記の cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。また、同じ cDNA を鋳型として actin 遺伝子の配列特異的プライマーを用いて PCR 反応を行った。反応産物はアガロースゲル電気泳動により解析した。

### (3) 行動実験

匂いに対する行動発現の検証実験には、羽化 1-7 日のオスカイコガを用いた。丸底の透明なプラスチックケース (直径 15 cm、高さ 6 cm) にペーパータオルを敷き、ケース内にカイコガをおいた。ケース側面部に排気口と清浄空気を取り込み口を設け、プラスチックの蓋を開閉することによってケース内の換気を行った。刺激にはキロショウジョウバエの生体を利用した解析において、Or82a が最も強く反応を示す geranyl acetate を用いた<sup>(5)</sup>。匂い物質はパラフィンオイルで希釈し、該当量の geranyl acetate を浸み込ませた 1.5 x 1.5 cm のろ紙片をパスツールピペットの後部に挿入し、匂い刺激用カートリッジとした。匂い刺激は、清浄空気を毎分 1.4L の流量で送り、電気刺激装置によって空気を実験ケースへ送り込む時間 (200 ms) を制御し、三方電磁弁で刺激時のみケース内に空気を送りこんだ。フェロモン源探索行動に伴うはばたき行動を行動発現の指標とし、刺激後 10 秒以内に行動を開始し 10 秒以上持続

した個体を反応個体とした。

#### (4) フェロモン受容細胞の軸索投射パターンの解析

BmOR1-GAL4/UAS-Or82a 系統と UAS-GFP ホモ系統を交配し、BmOR1-GAL4/UAS-Or82a/UAS-GFP 系統を作出した。この系統のオス脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド中で組織を固定した。エタノール上昇系列で脱水してからサリチル酸メチル中で組織の透明化を行った。GFP 蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡（励起光 488 nm、505–550 nm バンドパスフィルター）により取得した。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子組換え系統の作出

これまで、オスカイコガのボンピコール受容細胞に他種のフェロモン受容体遺伝子を導入することで、導入した受容体のリガンド選択性へとフェロモン源探索行動の選択性を改変できることが示されていた。本研究では、フェロモンではない一般臭の嗅覚受容体について同様の改変が可能であることを検証した。そのために、キイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体遺伝子である Or43b および Or82a を UAS 下流で発現するように設計した UAS-Or43b 系統および UAS-Or82a 系統を作出した。

#### (2) RT-PCR による遺伝子発現解析

遺伝子組換えカイコガにおいてデザイン通りに嗅覚受容体遺伝子が発現していることを RT-PCR 法により検証した。その結果、BmOR1-GAL4 と UAS-Or43b または UAS-Or82a の組換え遺伝子を持つ系統のオス触角において UAS 下の嗅覚受容体遺伝子断片の増幅が検出されたことから、受容体遺伝子の発現が確認された（図 2）。これらの結果から、各系統において設計通りに導入した嗅覚受容体遺伝子の発現が誘導されていることが示され

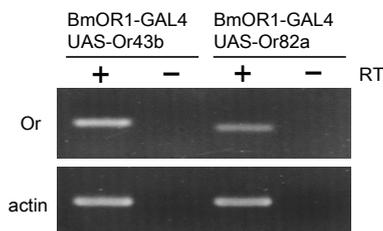


図 2 遺伝子導入した嗅覚受容体 (Or) の遺伝子発現。GAL4/UAS 系統のオス触角でそれぞれキイロショウジョウバエの Or43b (左) と Or82a (右) の遺伝子断片が増幅された。-は逆転写酵素を加えずに RT-PCR を行ったネガティブコントロールを示す。ハウスキーピング遺伝子である actin の増幅を行い、実験全体のポジティブコントロールとした (下)。

た。

#### (3) geranyl acetate に対するフェロモン源探索行動発現の検証

作出した 2 系統のうち、解析の簡便化のために geranyl acetate に対して高選択的に応答を示すことが報告されている Or82a 発現系統を対象として、行動実験を行った。Or82a を発現する BmOR1-GAL4/UAS-Or82a 系統のオスは geranyl acetate に対して濃度依存的にフェロモン源探索行動を発現した（図 3）。一方で、Or82a を発現しない GAL4、UAS だけをもつ系統では BmOR1-GAL4 系統において高濃度でわずかに行動がみられるものの、ほとんどの個体で行動は発現しなかった。また、geranyl acetate に対して応答しないことが報告されている Or43b<sup>(5)</sup> を発現する BmOR1-GAL4/UAS-Or43b では高濃度の geranyl acetate に対して行動発現が観察された、これは、BmOR1-GAL4 系統と同程度の割合だった。そのため、Or82a を発現しない系統での高濃度の geranyl acetate に対する行動発現は BmOR1-GAL4 組換え遺伝子による影響である可能性が考えられる。

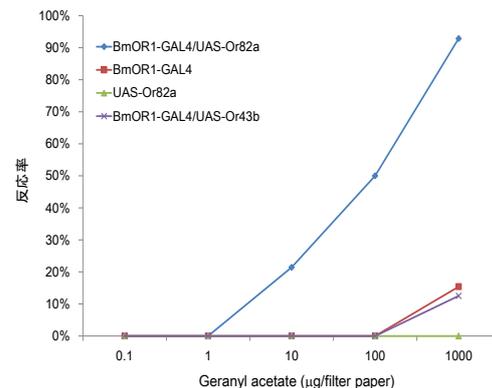


図 3 Or82a 発現系統の geranyl acetate に対するフェロモン源探索行動の発現。Or82a を発現する BmOR1-GAL4/UAS-Or82a 系統は geranyl acetate に対して濃度依存的にフェロモン源探索行動を発現した。

#### (4) 一般臭嗅覚受容体発現による軸索投射への影響の検証

一般臭の嗅覚受容体の異所的発現が、ボンピコール受容細胞の触角葉への軸索投射パターンに影響を及ぼすか検証した。ボンピコール受容細胞は触角葉の大糸球体のトロイドと呼ばれる領域に選択的に投射することが代表者らにより示されている<sup>(3)</sup>。Or82a と GFP を同時にボンピコール受容細胞で発現させ、触角葉における GFP 蛍光パターンを調べ

たところ、ボンピコール受容細胞の軸索は大系球体のトロイド領域に選択的に投射していることが明らかになった(図4)。この結果は、嗅覚受容体がフェロモン受容細胞の軸索投射に関与しないことを示唆するものであり、Or82a 発現オスカイコガでは、geranyl acetate の情報はボンピコールの情報と同様に処理され行動が解発されたことが示唆された。

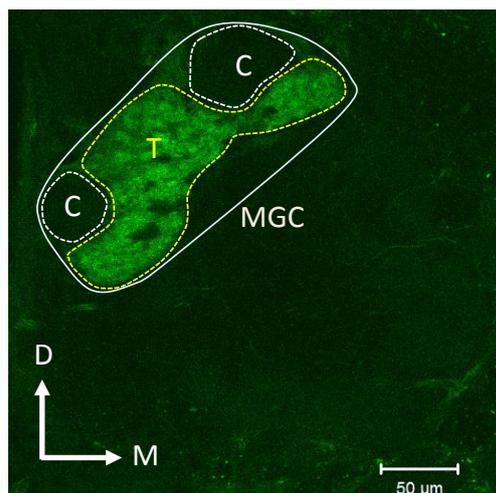


図4 BmOR1-GAL4/UAS-Or82a/UAS-GFP オスカイコガ触角葉の共焦点顕微鏡写真。GFP 蛍光が大系球体 (MGC) のトロイド領域に限定していることから、Or82a の発現によってボンピコール受容細胞の投射領域に変化がないことが示された。D; dorsal, M; medial, T; トロイド, C; キュミュラス, MGC; 大系球体

上記の結果から、カイコガのボンピコール受容細胞において一般臭の嗅覚受容体を発現させることで、カイコガのフェロモン源探索行動発現の匂い選択性を導入した受容体の応答特性に改変することが可能であると結論した。一方で、行動発現の感度という点については、ボンピコールに対する応答閾値の約 1,000-10,000 倍の匂い物質が必要であり、ボンピコールと同等の高感度性は得られなかった。この原因の一つとして、フェロモン受容細胞を浸す感覚子リンパ液中に一般臭を効率的に溶解・濃縮する匂い結合タンパク質が存在しない可能性があげられる。本研究に関連して、キイロショウジョウバエの触角で発現する匂い結合タンパク質の解析を行ったところ、匂い結合タンパク質の種類により、異なる匂い選択性を持つことを示唆する結果が得られている。本研究期間中には、高感度化に向けて、嗅覚受容体に対応する匂い結合タンパク質遺伝子を導入した遺伝子

組換えカイコガの作出と解析を行うにはいたらなかった。このように感度に関する課題として今後の改善の余地が残されたが、本研究により一般臭の嗅覚受容体の導入により行動選択性の改変が可能であることが示され、カイコガ生体を利用した匂い源探知センサ昆虫への道が拓かれたといえる。

(5) Hallem EA, Carlson JR (2006) *Cell* 125: 143-160.

## 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0件)

〔学会発表〕(計4件)

1. 櫻井健志、光野秀文、神崎亮平、Expression pattern and functional analysis of sensory neuron membrane protein-1 (SNMP1) in the silkworm *Bombyx mori*、日本比較生理生化学会第34回大会、2012年7月6日-2012年7月8日、湘南国際村センター、神奈川
2. 三觜裕之、櫻井健志、藤井毅、光野秀文、石川幸男、神崎亮平、ショウジョウバエ 匂い結合タンパク質を利用した気中匂い分子の高効率可溶化技術の開発、日本味と匂学会第46回大会、2012年10月3日-2012年10月5日、大阪大学吹田キャンパス、大阪
3. 櫻井健志、光野秀文、田渕理史、瀬筒秀樹、神崎亮平、カイコガ sensory neuron membrane protein-1 の発現パターンと機能解析、第57回日本応用動物昆虫学会、2013年3月27日-2013年3月29日、日本大学生物資源科学部、神奈川
4. 三觜裕之、櫻井健志、藤井毅、光野秀文、石川幸男、神崎亮平、匂い結合タンパク質を利用した匂い物質可溶化技術の開発、第57回日本応用動物昆虫学会、2013年3月27日-2013年3月29日、日本大学生物資源科学部、神奈川

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.imi.i.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 健志 (SAKURAI TAKESHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特  
任助教  
研究者番号：20506761

(2) 研究分担者

内野 恵郎 (UCHINO KEIRO)  
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子  
組換えカイコ研究開発ユニット・研究員  
研究者番号：90563627

(3) 連携研究者

光野 秀文 (MITSUNO HIDEFUMI)  
東京大学・先端科学技術研究センター・特  
任研究員  
研究者番号：60511855