

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660255

研究課題名(和文) 遺伝子組換え線虫を用いた哺乳動物フェロモン探索系の構築

研究課題名(英文) Functional expressions of mammalian vomeronasal receptors for screening pheromones in transgenic *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

山下 哲郎 (Yamashita, Tetsuro)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20202377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ネコの19種類フェロモン受容体遺伝子(V1R)を線虫の忌避性嗅覚神経細胞(AWB)特異的プロモーターに連結して線虫の卵巣に導入し、ネコV1Rを嗅覚神経細胞で発現した遺伝子改変線虫を作成した。まずネコV1Rが線虫のAWB神経細胞で発現していることが確認できたので、リガンドがV1Rに結合して神経が活性化すると線虫がリガンドに忌避するという反応を指標にして、ネコ尿脂質に対する走化性指数を調べた。その結果、ネコV1Rを発現する遺伝子組み換え線虫は、ネコ尿脂質に対して有意に忌避することが分かり、遺伝子改変線虫を使った哺乳動物のフェロモン探索の可能性が期待できた。

研究成果の概要(英文)：Pheromones are bioactive compounds which release innate behavior and control physiological and reproductive statuses in conspecific species. In this study, we tried to develop a functional expression system of mammalian V1Rs for the identification of pheromones in transgenic *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). In *C. elegans*, G protein coupled receptors including olfactory receptors are mainly expressed in AWA, AWB and AWC chemosensory neurons. We generated two transgenic *C. elegans* expressing 7 or 5 of 24 V1Rs of domestic cats in AWB neurons whose activations induce avoidance behavior in the *C. elegans*. In behavioral bioassays using lipids extracted from urine of estrous female cats, the two transgenic *C. elegans* significantly avoided the lipids, while wild type *C. elegans* did not display avoidance behavior toward the lipids. These results suggest that feline V1Rs are functionally expressed in AWB neurons of the transgenic *C. elegans*.

研究分野：生化学

キーワード：フェロモン 線虫 受容体

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の尿や涙、皮脂腺や生殖腺の分泌物には、種や性、年齢、個体に特有な化学物質が多数含まれている。この中で同種の他個体に特異的な行動変化を誘起したり、内分泌系に影響を与える生理活性物質をフェロモンという。哺乳動物において、フェロモンは、鋤鼻器と呼ばれる嗅覚器官で発現している Vomeronasal Type 1 Receptor (V1R) および Vomeronasal Type 2 Receptor (V2R) で受容されることが分かっている。V1R と V2R は、嗅覚受容体 (OR) と同じ 7 回膜貫通型の G タンパク質共益受容体であり、それぞれ多重遺伝子ファミリーを形成している。V1R は揮発性物質、V2R は水溶性ペプチドを受容すること、V1R と V2R の種類は動物種によって大きく異なり、齧歯類以外の動物では V2R がすべて偽遺伝子化していることも分かっている。

これまでに様々な動物でフェロモンの関与が示唆される生物現象が見つかっている。しかしフェロモンの化学構造が同定された例はその中のごく僅かである。一般に OR に対するリガンド(におい物質)の探索は、OR を培養細胞で発現させてカルシウムイメージング法で行われる。一方 V1R や V2R の場合、培養細胞の細胞膜で受容体を発現させる手法が確立していない為、リガンド(フェロモン候補物質)の探索は動物での生物活性を指標に行われている。しかし動物個体の反応には個体差があり、また様々な外的要因の影響も受け、再現性が悪いため、リガンド探索の指標として適さない面もある。そこで V1R や V2R を機能的に細胞

で発現させ、哺乳動物の反応を指標とせずリガンドを探索できる手法を確立することが当該分野で強く求められている。

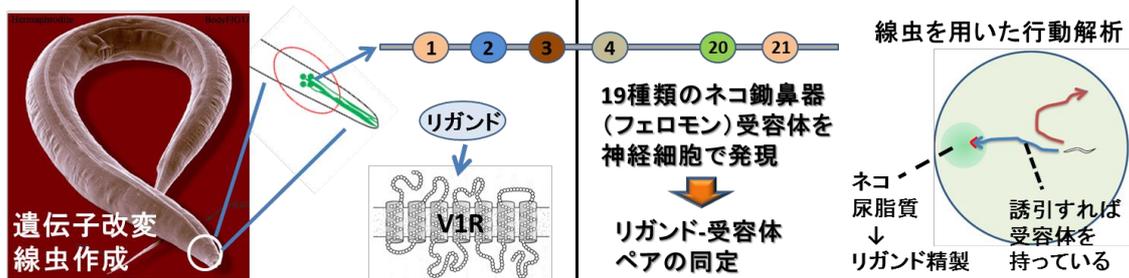
2. 研究の目的

本研究は、哺乳動物のフェロモン受容体を線虫の神経細胞で機能的に発現させ、線虫を使い動物の分泌物からフェロモンを探索できる手法の開発を目指す。具体的には、ネコの 19 種類フェロモン受容体遺伝子 (Vomeronasal Type 1 Receptor : V1R) を線虫の嗅覚神経細胞特異的プロモーターに連結して線虫の卵巣に導入し、ネコ V1R を嗅覚神経細胞で発現した遺伝子改変線虫を作成する。リガンドが V1R に結合して神経が活性化すると線虫がリガンドに誘引されるという反応を指標にして、ネコの尿から各 V1R に対応するリガンド(フェロモン候補物質)の同定を目指す。本手法は、これまで対象動物の反応を指標に行われてきたフェロモン探索法を大きく変えるもので、例えば動物試験の実施が難しかった野生動物でもフェロモン探索が可能となる画期的方法であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ネコ V1R 遺伝子発現ベクターの構築

Ensembl Genome Browser を使い、ネコのゲノムデータベースから V1R 遺伝子の探索を行った。その結果、64 種類の V1R 遺伝子が発見できたが、43 種類の V1R は偽遺伝子化していたため、21 種類の V1R 遺伝子が標的となった。ネコの鋤鼻器 RNA を鋳型にして RT-PCR を行ったところ 19 種類の V1R



遺伝子で mRNA の発現を確認できた。以上の予備的研究の結果を踏まえ、申請者らはネコの 19 種類の V1R を線虫の忌避性嗅覚神経細胞 (AWB) で発現させることにした。

V1R 遺伝子はエクソンのみでイントロンを含んでいないので、ネコのゲノムを鋳型に 19 種類の V1R 遺伝子全長を PCR で増幅する。次に PCR 産物をベクターにサブクローニングして DNA シーケンサーで配列を確認する。配列に誤りがないことを確認できたら、各 V1R 遺伝子を線虫 AWB 神経特異的プロモーター (str-1) の下流に連結し、発現ベクター 19 種類を構築した。

(2) 遺伝子改変線虫の作製

一般に哺乳動物の場合、嗅覚受容体は嗅細胞の線毛に発現しているが、各嗅細胞ではそのうち 1 種類の受容体だけを発現していることが知られている(1 嗅細胞 1 受容体ルール)。一方、線虫の場合、1 つの神経細胞に多数の受容体が発現していることが知られている(1 嗅細胞 多受容体)。そこで本研究では 19 種類の V1R を線虫の AWB 嗅覚神経細胞で発現させた。

19 種類の発現ベクターが構築出来たら、19 種類の V1R と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子 (遺伝子改変線虫と野生型線虫を識別するマーカー) の混合 DNA を線虫の卵巣にマイクロインジェクションした。DNA を注入した個体を飼育し卵を産ませると、その卵のなかにある確立で 19 種類の V1R と GFP 遺伝子を持った卵が含まれている。卵が孵化し生まれた線虫を蛍光顕微鏡で観察し、緑色蛍光を発した個体 (GFP 発現線虫) を選別して以下のリガンド探索に利用した。

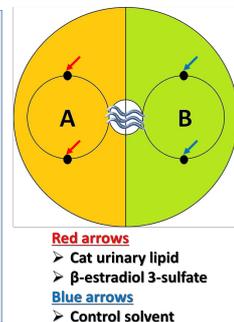
(3) 遺伝子改変線虫によるリガンド探索

ネコ V1R 遺伝子を発現した遺伝子改変線虫を使い、リガンドの探索を行う。遺伝子改変線虫で機能的な V1R が発現した場合、V1R にリガンドが結合すると AWB 神経が活性化され、線虫はリガンドから忌避する。

申請者らがこれまで取り組んできたネコの行動試験の結果より、少なくともフレーメン誘起フェロモンはネコの尿脂質画分に含まれることを突き止めた。そこでまずアガロースシャーレの一部にネコ尿脂質をスポットし、その対側に線虫を置き、スポットに線虫が誘引されるか、線虫の走化性を指標に V1R が機能的に発現しているか判別する(下図)。もし尿脂質に対する走化性が認められない場合、V1R が機能的に発現していないと考えられる。なお先行実験で野生型線虫は、尿脂質に走化性を示さなかった。

Outline of chemotaxis bioassays

1. Sample (cat urinary lipid or β -estradiol 3-sulfate) and control solvent are deposited at positions of red arrows and blue arrows, respectively.
2. About 50-100 *C. elegans* are put on center of the plate.
3. After 30 min, *C. elegans* presented in A area and B area are counted, and **chemotaxis index (C.I.)** is calculated as described below.



Chemotaxis index

$$C.I. = \frac{A-B}{A+B}$$

A < B A = B A > B
-1 ~ ±0 ~ +1
avoidance attraction

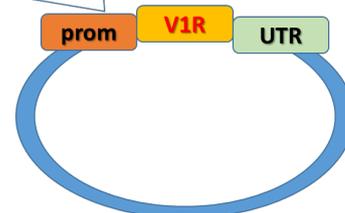
4. 研究成果

(1) 線虫導入用ベクター作製

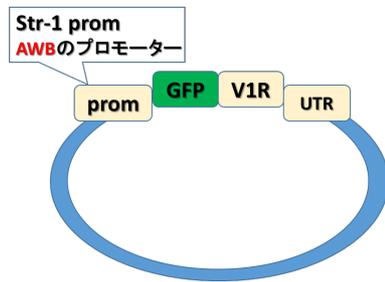
Gateway クローニングを用いて、忌避性匂い物質の受容に関わる AWB 細胞のプロモーターを組み込んだ str-1 prom - V1R - 3'-UTR ベクター 21 種と V1R の N 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をつけた str-1 prom - GFP-V1R-3'-UTR ベクターを作成した。

Str-1 prom

忌避性神経細胞 (AWB) のプロモーター

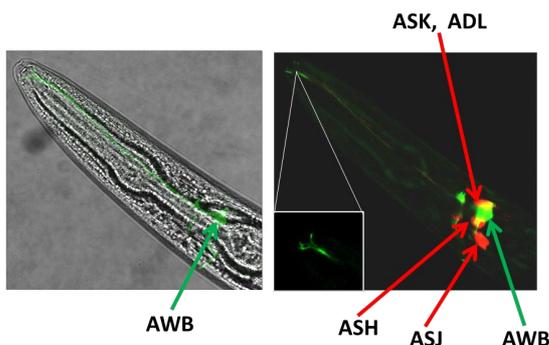


V1RのN末端にGFPが付くようにプラスミドを構築



(2) 線虫 V1R の発現部位の解析

線虫では神経細胞の位置関係が明らかになっている。AWB 細胞とその周りの脂溶性カルボシアニン色素 (DiD) で染まる細胞の模式図を図 6 に示した。これらの細胞の位置関係から、AWB で V1R が発現するかどうかを確認した。明視野と緑色蛍光の画像および緑色蛍光と赤色蛍光の二重蛍光画像、感覚繊毛のズーム画像を下図に示した。GFP と DiD で染まった細胞の位置関係から、GFP が光っているのは AWB 細胞だとわかった。また、外界からの刺激を受け取る感覚繊毛でも GFP が発現し、その形態が AWB の特徴の分岐した形であることから GFP が AWB で発現していることがわかった。

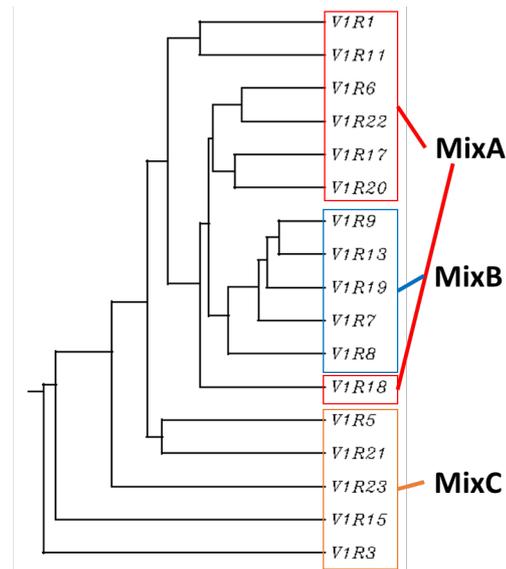


AWB神経細胞での発現を確認

(3) ネコ V1R を発現したトランスジェニック線虫の活性確認

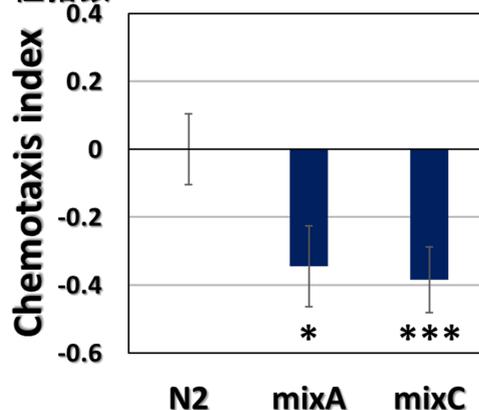
17種類のネコ V1R を 3つのグループに分け、7種、5種、5種のネコ V1R を発現する遺伝子組み換え線虫 (MixA、MixB、MixC) を作成した。MixB については、マーカー

である GFP の発現が認められなかったため、実験では MixA と MixC を使用した。ネコ尿脂質に対する走化性指数を調べた結果、忌避行動を示すことがわかった。



V1Rのアミノ酸配列の相同性を参考にして、3つのグループに分けてマイクロインジェクション

ネコV1Rを発現する遺伝子組み換え線虫のネコ尿脂質に対する走化性指数

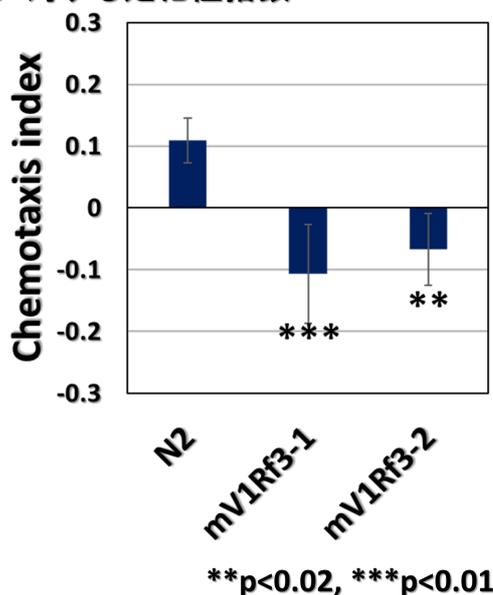


(4) マウス V1Rf 3 を発現させた線虫での解析

これまでの研究で、ネコ V1R を発現させた線虫がフェロモンを含む尿脂質に対して、行動レベルで有意に応答することは確認できた。しかし、トランスジェニック線虫を

使ったリガンド探索系の有用性を検証する
 為に、マウスで既知のリガンド 受容体ペ
 アで同様の実験を行った。まず、ネコ V1R
 と同様にマウス V1Rf3 線虫導入用ベク
 ターを作成し、線虫にマイクロインジェク
 ションして mV1Rf3 発現線虫を作成した。作
 成した mV1Rf3 発現線虫を使って、既知の
 リガンドである 3-硫酸 エストラジオー

マウスV1Rf3を発現する遺伝子組 み換え線虫のβエストラジオール に対する走化性指数



ルナトリウム塩に対する反応を行動アッセ
 イで調べた。その結果、図に示すようにマ
 ウス V1Rf3 を AWB 神経細胞で発現する 2
 系統のトランスジェニックマウスで有意な
 忌避活性が認められた。

以上の結果、AWB 神経細胞で哺乳動物の
 V1R が機能的に発現している可能性が強く
 示唆され、遺伝子改変線虫を使った哺乳動
 物のフェロモン探索の可能性が期待できた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

- Miyamoto, R., Wakabayashi, T., Yamashita, T., and Miyazaki, M. (2016) Functional expressions of

mammalian vomeronasal receptors for
 screening pheromones in transgenic
Caenorhabditis elegans. 1st UGAS,
 Iwate University International
 Symposium. Morioka, Japan

- 宮崎雅雄 ネコ特有な尿臭の生合成経
 路解明 . Chemosensory and Behavior
 Workshop 2015. 箱根
- 米田稔、山下 哲郎、宮崎雅雄 .ネコの
 フレーメン誘起フェロモン候補物質で
 ある新規遊離分岐鎖脂肪酸の同定、第
 38 回分子生物学会年会・第 88 回生
 化学会大会 合同大会(神戸).2015 年 12
 月 2 日
- 宮崎雅雄 動物への進化で獲得したネ
 コ特有なケミカルシグナルの生合成機
 構、新学術領域研究「天然物ケミカルバ
 イオロジー」地区ミニシンポジウム(名
 古屋) 2015 年 5 月 14 日、招待講演

〔図書〕(計 1 件)

- 宮崎雅雄 (2016) 哺乳動物の嗅覚コミ
 ュニケーション . におい・かおり環境
 学会誌 . 47 : 25-33.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 哲郎 (YAMASHITA TETSURO)
 岩手大学・農学部・教授
 研究者番号 : 20202377

(2) 研究分担者

宮崎 雅雄 (MIYAZAKI MASAO)
 岩手大学・農学部・准教授
 研究者番号 : 20392144

若林 篤光 (WAKABAYASHI Tokumitsu)
 岩手大学・理工学部・助教
 研究者番号 : 30332498