

令和元年6月20日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26712027

研究課題名(和文)カイコガとその近縁種をモデルとした性フェロモン選好性の進化の遺伝子基盤の解明

研究課題名(英文) Genetic basis underlying evolution of sex pheromone preference in the silkworm and its related species

研究代表者

櫻井 健志 (SAKURAI, Takeshi)

東京農業大学・農学部・准教授

研究者番号：20506761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,700,000円

研究成果の概要(和文)：モデル昆虫であるカイコガを用いたフェロモン受容体、フェロモン結合タンパク質の遺伝子ノックアウト体の解析から、フェロモン受容体がオスのフェロモン選好性を決定する因子であることを実証した。さらに、カイコガ近縁種の触角のフェロモン応答性の単一細胞レベルでの解明および複数のフェロモン受容体のリガンド同定を行った。両者の比較から、カイコガ科のフェロモン受容体の機能の変化とフェロモン選好性との関係性に関する重要な示唆を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガ類の性フェロモン交信系は化学物質を介した種分化の研究モデルとして注目されている。本研究では、フェロモン受容のモデル昆虫であるカイコガとその近縁種のフェロモン受容体、フェロモン受容細胞の応答性を明らかにし種間比較を行うことで、フェロモン選好性とフェロモン受容体の進化に関する知見を拡張した点に意義がある。また本研究は、ゲノム編集によりフェロモン受容に關与する遺伝子ノックアウト体を作成することで、その体内での機能を初めて明らかにした点においても学術的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we first verified that a sex pheromone receptor is the determinant factor for pheromone preference in male silkworms by *in vivo* functional analyses of sex pheromone receptor and pheromone binding protein gene knockout silkworms. Then, we revealed response specificity of pheromone sensitive ORNs and functionally characterized ligands of sex pheromone receptors in related bombycidae species. From comparison between selectivity of ORNs and ligand specificity of sex pheromone receptors, we obtained an important insight into relationships between function of sex pheromone receptors and evolution of pheromone preference in male bombycidae moths.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：昆虫 性フェロモン 生殖隔離 カイコガ科 フェロモン選好性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物がどのような過程を経て現在のような莫大な種の多様性を獲得してきたか? という疑問は生物学における根源的なテーマである。種が分化するためには、同一種の中で新たな生殖隔離が起こることが重要である。このような生殖隔離の一つとしてガ類などで顕著にみられるフェロモン交信系による機構があげられる。ガ類のフェロモン交信系では、同種メスの放出する性フェロモンに対して同種のオスだけが性行動を起こすことで種間交雑を防いでおり、メスの放出する性フェロモンの化学物質と、それに対するオスの性行動発現の選好性(以下フェロモン選好性とする)の共進化が現在の多様なガ類昆虫種への種分化の機構として機能したと推定されている。そのため、オスのガのフェロモン選好性を決定している遺伝子基盤を解明し、フェロモン選好性の種間変異を産み出す遺伝的変異を明らかにすることは、フェロモン交信系の進化による種分化の機構の理解に必要不可欠である。

シンプルな性フェロモン系をもつカイコガ(*Bombyx mori*)はフェロモンの認識機構のモデル昆虫として研究が進められてきた。カイコガのオスは触角上に毛状感覚子と呼ばれるフェロモン受容に特化した嗅覚器をもつ。毛状感覚子内部には1対の受容細胞があり、それぞれフェロモン主成分であるボンピコールと副成分であるボンピカルを特異的に受容する。代表者らは、ボンピコール受容体遺伝子 *BmOR1* とボンピカル受容体遺伝子 *BmOR3* の単離解析から、これらの2つの受容体遺伝子が毛状感覚子内の1対のフェロモン受容細胞で相互排他的に発現しており、フェロモン受容細胞の応答特性が発現するフェロモン受容体の特性により決められることを示した。さらに、他種ガ類の性フェロモン受容体遺伝子をボンピコール受容細胞で異所的に発現する遺伝子組換えカイコガの解析を行い、ボンピコール受容細胞で発現する受容体の応答特性を決定するとともに、フェロモン源定位行動発現の応答特異性をも決定することを見出した。すなわち、オスカイコガではフェロモン源定位行動の発現には、ボンピコール受容細胞の神経興奮が十分であり、オスのフェロモン選好性は、ボンピコールの情報処理中枢である触角葉大系球体のトロイドと呼ばれるニューロパイルに接続されたフェロモン受容細胞で発現する受容体のリガンド特異性によって決定することが示された。このような状況下で、最近カイコガ科に属する野外種のフェロモン成分とフェロモン選好性との関連が明らかにされ、カイコガ、クワコ(*Bombyx mandarina*)、ウスバクワコ(*Rindotia menciiana*)、イチジクカサン(*Trilocha varians*)の間でオスのフェロモン選好性が異なることがわかってきた(図1)。これら3種を含むカイコガ近縁種を対象として、カイコガの知見を野外に生息する近縁種へと拡張し、それぞれの種のフェロモン選好性の遺伝的基盤を明らかにすることにより、フェロモン認識機構の進化の遺伝的基盤を解明できる状況が整ってきた。

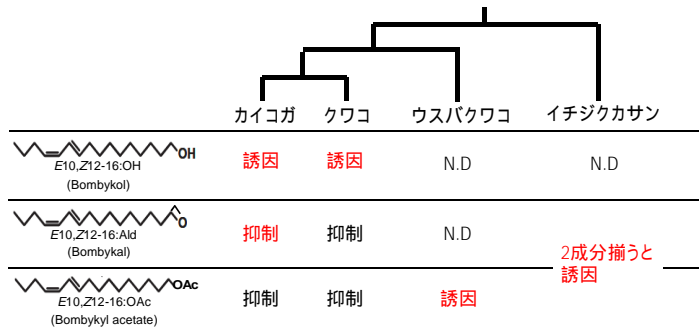


図1 カイコガ科のフェロモン選好性 赤字は同種メスの放出するフェロモン成分を示す。N.D. = 行動に影響しない

2. 研究の目的

ガ類のオスは、同種メスの放出する種特異的な性フェロモンだけに性行動を発現することで種内交配を達成する。このことから、種分化の過程で、オス蛾は新たな性フェロモンへの選好性を獲得してきたことが考えられる。本研究では、性フェロモン交信系のモデル生物として研究が進んでいるカイコガとその近縁種を対象としたフェロモン受容・識別の分子・神経機構の解析により、フェロモン選好性を決定する原因遺伝子を同定し、フェロモン認識機構の進化の遺伝子基盤を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究ではカイコガ科のうち、背景で述べたカイコガ、ウスバクワコ、イチジクカサンに加えてテンオビシロカサン(*Ernolatia moorei*)を実験対象とした。なおイチジクカサン虫体はナショナルバイオリソースカイコより分譲を受け実験に用いた。

(2) 単一感覚子記録法によるフェロモン受容細胞の応答特性の解析

イチジクカサンのオス成虫を自作のアクリルチャンパー上に、レジンボンドで固定した。銀線を複眼に刺入し、参照電極とした。視認下で毛状感覚子の基部にタングステン電極を刺入し記録を行った。匂い物質(bombykol:BOL, bombykal: BAL, bombykyl acetate: Bkyl)の刺激前1秒を自発発火として計算し、刺激後初めてのスパイク発火から1秒間のbinでスパイク本数を計算した。スパイク本数は、刺激後のスパイク発火数から自発発火数を引き算することで正規

化した。BAL, BkyI に対するスパイクは、spike2 ソフトウェアの波形解析によって、ソートした。解析後のソート結果の漏れなどを目視で再チェックし大小のスパイク波形を分類した。

(3) 遺伝子ノックアウトカイコガの作出と解析

カイコガ性フェロモン受容体遺伝子 *BmOR1*、フェロモン結合タンパク質遺伝子 *BmPBP1* のタンパク質翻訳領域の遺伝子配列を特異的に認識する TALENs を設計、構築した。構築した TALENs の RNA をカイコ卵にインジェクションすることで、*BmOR1*、*BmPBP1* の遺伝子ノックアウト系統を作出した。交配実験により、ノックアウト遺伝子をホモ化したオス成虫を対象に、フェロモンに対する行動実験による解析および生理応答の計測を行った。

(4) カイコガ近縁種の性フェロモン受容体候補遺伝子の単離と機能解析

次世代シーケンサーを用いた、カイコガ近縁種のオス触角のトランスクリプトーム解析でデータ収集を行った。バイオインフォマティクス的手法でデータ解析を行い、既知のガ類性フェロモン受容体遺伝子と類似性の高い遺伝子を探索し、性フェロモン受容体候補遺伝子とした。明らかになった性フェロモン受容体候補遺伝子および共受容体 *Orco* について、各種のオス触角 total RNA から RT-PCR により全長遺伝子配列の増幅を行った。RT-PCR により目的のバンドが増幅された遺伝子について、アフリカツメガエル卵母細胞用の発現ベクターにクローニングしてから、cRNA を合成した。性フェロモン受容体候補遺伝子と *Orco* の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にインジェクションし、受容体と *Orco* を共発現させた。二電極膜固定法により、フェロモン成分に対する応答計測を行った。

4. 研究成果

(1) カイコガ近縁種のフェロモン受容細胞の応答性の解析

オス触角でのフェロモン識別のメカニズムを明らかにするために、カイコガ科のフェロモン成分であるボンピコール (BOL)、ボンピカル (BAL)、ボンピキルアセテート (BkyI) に対する毛状感覚子のフェロモン受容細胞の応答特性を単一感覚子記録法により単一細胞レベルで解析した。なお、本実験では計測手法の確立および再現性のあるデータ取得のために、実験試料を定期的に入手可能であったイチジクカサンについて実施した。単一感覚子記録の結果、イチジクカサンのオス毛状感覚子からは 2 つの異なる振幅の自発発火が記録されたことから、感覚子内部に 2 つの受容細胞が存在することが示唆された。これらの 2 つの受容細胞はそれぞれ BAL と BkyI に特異的に応答を示した。また BOL にはいずれの受容細胞も応答を示さなかった (図 2)。カイコガにおいても毛状感覚子内には 2 つのフェロモン受容細胞があり、それぞれ BAL と BOL に特異的に応答する。また BAL に特異的なフェロモン受容体はイチジクカサンとカイコガの間で保存されていることから、両種のフェロモン受容系では、BAL の受容系は保存されており、もう一方の受容細胞で発現するフェロモン受容体遺伝子が種間で変化し、種間のフェロモン嗜好性の変化が生じた可能性が示唆された。

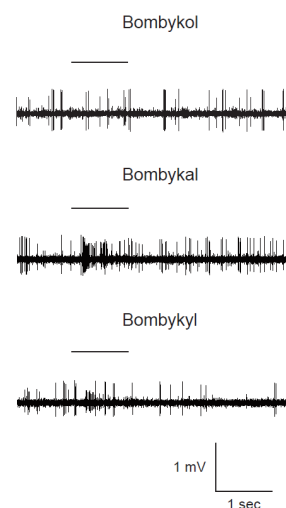


図2 イチジクカサンのオス毛状感覚子の単一感覚子記録の代表応答例

(2) 遺伝子ノックアウト体を用いたカイコガのフェロモン選択性の決定因子の同定

フェロモン受容の選択性の決定に関与する因子としてフェロモン受容体遺伝子 *BmOR1* に加えて、フェロモン結合タンパク質遺伝子 *BmPBP1* が候補として挙げられる。*BmPBP1* は感覚子リンパ液中に分泌されフェロモン分子の可溶化に働く。このとき、特定の物質を選択的に可溶化することで、フェロモン受容細胞の応答選択性に関与する可能性が示唆されていた。研究期間中に、TALENs を使用したゲノム編集による遺伝子ノックアウト体の作出がカイコガで実施できる状況となったため、これらの遺伝子のノックアウトカイコガを作出し、フェロモン選択性における生体内での機能を検証した。*BmOR1* ノックアウトカイコガでは、BOL に対するフェロモン受容細胞の応答および BOL に対するフェロモン源探索行動が完全に失われていたが、BAL に対する受容細胞の応答は野生型と変化がなかった。これらの結果から、*BmOR1* が生体内で BOL の特異的受容体として機能することが実証された。一方で、*BmPBP1* ノックアウトカイコガのオス触角では、野生型のオス触角と比較して、BOL、BAL 両成分に対する電気応答 (EAG 応答) のピーク値が、ほとんど同じ割合で低下していた (図 3)。この結果は、*BmPBP1* が両成分の可溶化に対して同等の寄与をしていることを示唆しており、カイコガにおいて *BmPBP1* はフェロモン成分の識別には関与していないと考えられる。これらの結果を統合して、カイコガの生体内におけるフェロモン識別は、フェロモン受容体 *BmOR1* のリガンド選択性で決定されていることが実証された。

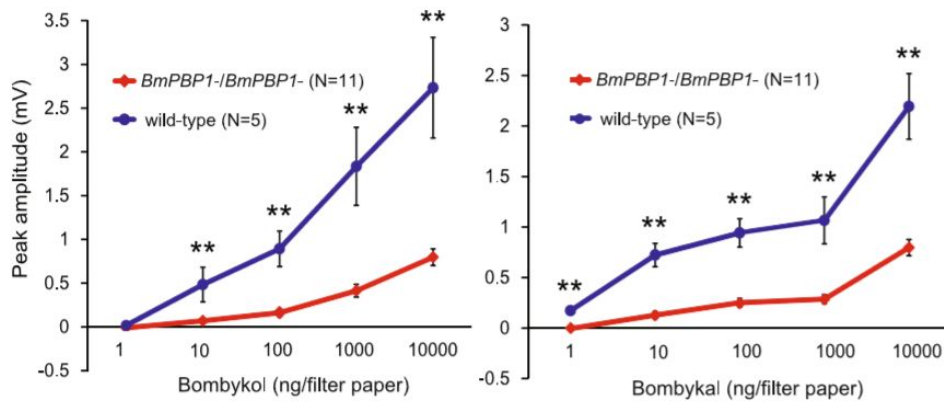


図3 BmPBP1 ノックアウトカイコガオス触角の EAG 応答
野生型（青）と比較して、ノックアウトカイコガ（赤）では BOL、BAL の両方に対して
応答が低下した。（Shiota et al., 2018 雑誌論文 より引用）

(3) カイコガ近縁種の性フェロモン受容体遺伝子の単離と機能同定

カイコガのノックアウト体の解析から、フェロモン受容体のリガンド選択性が性フェロモン成分の特異的認識の決定因子であることが示された。そこで、(1)で示された種間の生体でのフェロモン受容細胞の応答性の変化の元にある遺伝子基盤を明らかにするため、カイコガ近縁種触角の RNA シークエンスのデータを利用して、各種の性フェロモン受容体遺伝子の候補配列を探索した。その結果、イチジクカサン、ウスバクワコ、テンオビシロカサンにおける、カイコガ性フェロモン受容体遺伝子 (*BmOR1*, *BmOR3*) および性フェロモン受容体類似遺伝子 (*BmOR4-6*) の相同遺伝子が存在することが明らかになった (図 4)。また、昆虫の匂い、フェロモン受容体の共受容体として機能する *Orco* 遺伝子の相同遺伝子も明らかになった。

つづいて、上記の性フェロモン受容体候補遺伝子のうち生体試料が入手可能であったカイコガ、イチジクカサン、テンオビシロカサンについて遺伝子をクローニングし、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用した二電極膜電位固定法によりリガンドの同定を行った。その結果、カイコガの BAL 受容体である *BmOR3* の相同遺伝子はいずれの種においても BAL に対して選択的に応答することがわかった。BAL はカイコガ近縁種間を通じて利用されているフェロモン成分であることから、受容体の機能も種間を通じて保存されていることが考えられる。一方で、カイコガの BOL 受容体である *BmOR1* の相同遺伝子は、高濃度の BOL に対して微弱な応答を示す卵母細胞もみられたが、安定して応答を得ることはできず、BOL に対する有意な応答は検出されなかった。また *BmOR1* 相同遺伝子は BAL と *Bkyl* に応答を示さなかったことから、カイコガ *BmOR1* とは異なる物質をリガンドとする可能性が示唆された。今回、受容体の応答計測を行った3種のうちカイコガ以外は BOL をフェロモン成分として利用しておらず、イチジクカサンについては GC-EAD で BOL への応答が検出されないことが報告されている。そのため、*BmOR1* の BOL への応答性は BOL をフェロモン成分として利用する過程でカイコガ(クワコ)が獲得した機能である可能性がある。また *Bkyl* に応答を示した受容体として、イチジクカサンのカイコ *BmOR5* 相同遺伝子があげられる。ただし、この受容体は *Bkyl* だけでなく BAL にも応答を示し、感度、応答強度はともに BAL に対する応答の方が高かったため、(1)で示したイチジクカサンのフェロモン受容細胞の *Bkyl* に対する選択的な応答を遺伝子レベルで説明するにはいたらなかった。

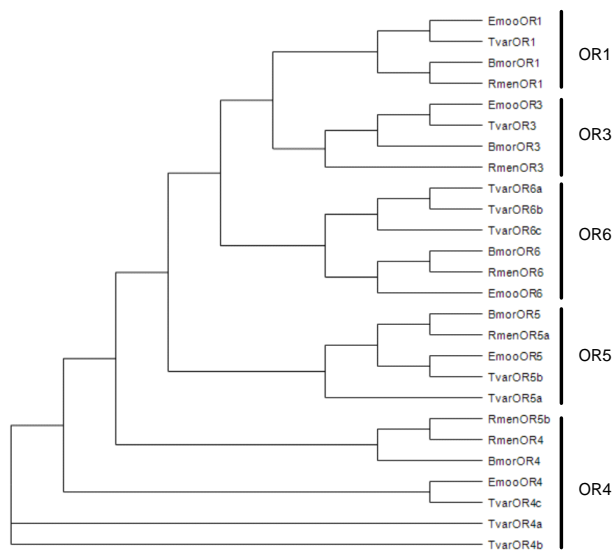


図 4 カイコガ科のフェロモン受容体候補遺伝子の分子系統樹

分子系統樹はカイコガ (*BmorOR*)、ウスバクワコ (*RmenOR*)、イチジクカサン (*TvarOR*)、テンオビシロカサン (*EmooOR*) のフェロモン受容体候補遺伝子のアミノ酸配列について近隣結合法により作成した。

本研究ではモデル昆虫であるカイコガを用いて、フェロモン受容体 BmOR1、BmPBP1 のノックアウト体の解析から、これらの遺伝子の生体内での機能を初めて実証することに成功した。この成果により、BmPBP1 はフェロモン受容の高感性には重要であるが、選択性には関与していないことを示し、BmOR1 がオスのフェロモン選好性を決定する因子であることを明らかにした。さらに、カイコガ近縁種の触角の応答解析およびフェロモン受容体の機能解析から、カイコガと近縁種のフェロモン成分のうち BOL と BAL について、フェロモン受容体の機能とフェロモン選好性との関係性に関する重要な示唆を得ることに成功した。一方で、Bkyl1 の特異的受容体の同定にはいたっていない。アフリカツメガエル卵母細胞は昆虫のフェロモン受容体の機能同定に有効な方法ではあるが、受容体によって再構成の効率は異なり、本研究で対象とした受容体はこの発現系ではリガンド同定が困難であった可能性がある。そのため、本研究で機能同定にいたらなかった受容体を他の発現系やノックアウト体の作出・解析などの方法で機能を検証することにより、今後 Bkyl1 特異的受容体を同定できる可能性がある。なお、当初計画の方法論の問題から、研究期間内にフェロモン情報が触角葉で識別される仕組みとフェロモン選好性との関係の解明にはいたらなかった。本研究で同定したフェロモン受容体の情報をもとに、今後引き続き分析を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Yusuke Shiota, Takeshi Sakurai, Takaaki Daimon, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Fujii, Shigeru Matsuyama, Hideki Sezutsu, Yukio Ishikawa, Ryohei Kanzaki, *In vivo* functional characterization of pheromone binding protein-1 in the silkworm, *Bombyx mori*, *Scientific Reports*, 査読有, 8, 2018, article 13529. Doi.org/10.1038/s41598-018-31978-2.

Takeshi Fujii, Takeshi Sakurai, Katsuhiko Ito, Takeshi Yokoyama, Ryohei Kanzaki, Lipid droplets in the pheromone gland of wild silkworm *Bombyx mandarina*, *Journal of Insect Biotechnology & Sericology*, 査読有, 87, 2018, 29-34. Doi.org/10.11416/jibs.87.2_029.

櫻井健志, 力類の高選択的・高感度な性フェロモン受容の分子機構, *昆虫と自然*, 査読無, 53, 2018, 13-17.

Megumi Sumitani, Takeshi Sakurai, Katsumi Kasashima, Sayaka Kobayashi, Keiro Uchino, Ryohei Kanzaki, Toshiki Tamura, Hideki Sezutsu, Establishment of a specific cell death induction system in *Bombyx mori* by a transgene with the conserved apoptotic regulator, mouse Bcl 2 associated X protein (mouse Bax), *Insect Molecular Biology*, 査読有, 24, 2015, 671-680. Doi: 10.1111/imb.12192.

Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Akihisa Mikami, Keiro Uchino, Masashi Tabuchi, Feng Zhang, Hideki Sezutsu, Ryohei Kanzaki, Targeted disruption of a single sex pheromone receptor gene completely abolishes *in vivo* pheromone response in the silkworm, *Scientific Reports*, 査読有, 5, 2015, article 11001. DOI: 10.1038/srep11001.

櫻井健志, 神崎亮平, カイコガの高選択的・高感度な性フェロモン認識の分子・神経基盤、蚕糸・昆虫バイオテック、査読有、83 巻、2014 年、115 - 127.

[学会発表](計 16 件)

塩田裕介, フェロモン結合タンパク質遺伝子ノックアウトカイコガの触角葉内でのフェロモン受容神経の応答キネティクス, 第 63 回日本応用動物昆虫学会, 2019 年

Yusuke Shiota, Analysis of temporal antennal response kinetics associated with efficient pheromone source localization in the silkworm, *Bombyx mori*, 日本比較生理生化学会第 40 回大会, 2018 年

櫻井健志, 遺伝子組換えカイコガを利用したフェロモン受容体遺伝子の発現制御領域の探索, 第 61 回日本応用動物昆虫学会, 2017 年

塩田裕介, フェロモン結合タンパク質遺伝子ノックアウトカイコガの神経生理応答のキネティクス・フェロモン源探索行動解析, 第 61 回日本応用動物昆虫学会, 2017 年

櫻井健志, カイコガのフェロモン受容システムを利用した匂いセンサ昆虫の開発, 平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(招待講演), 2017 年

櫻井健志, 昆虫の嗅覚メカニズムを利用した匂いセンサ, e ビジネス異業種交流会(招待講演), 2016 年

櫻井健志, 昆虫嗅覚受容体の機能的再構成系の構築と匂いセンサへの応用, 第 68 回日本生物工学会年次大会(招待講演), 2016 年

Yusuke Shiota, Temporal kinetics analysis of pheromone responses of pheromone binding protein knockout silkworm, *Bombyx mori*, 第 38 回日本比較生理生化学会, 2016 年

Takeshi Sakurai, Development of insect antenna-based odorant sensor, Japanese

Society of Comparative Physiology and Biochemistry mini-symposium “ Environmental Sensing and Behavior ” (招待講演)(国際学会), 2016年

Takeshi Sakurai, Physiological and behavioral analysis of pheromone binding protein gene knockout silkmoth, The 17th International Symposium of Olfaction and Taste (国際学会), 2016年

櫻井健志, フェロモン結合タンパク質遺伝子ノックアウトカイコガの生理・行動解析, 第60回日本応用動物昆虫学会, 2016年

櫻井健志, Molecular and neural mechanisms of sex pheromone perception in the silkmoth *Bombyx mori*, CompBiol2015 広島大会(招待講演), 2015年

櫻井健志, Establishment and behavioral analysis of pheromone binding protein gene knockout silkmoth, CompBiol2015 広島大会, 2015年

Takeshi Sakurai, A single sex pheromone receptor mediates bombykol responses in the silkmoth, 8th Asia-Pacific Chemical Ecology Conference (招待講演)(国際学会), 2015年

Takeshi Sakurai, Genetic manipulation of odorant response of the silkmoth antennae, Symposium in HFSP kickoff meeting (招待講演)(国際学会), 2015年

櫻井健志, 遺伝子組換えカイコガを利用した性フェロモン受容体遺伝子の in vivo プロモーター解析, 日本味と匂学会第48回大会, 2014年

[図書](計 2 件)

並木重宏, 櫻井健志, 朝倉出版, 昆虫の脳をつくる, 2018年, 224ページ(45-61ページ)
Ryohei Kanzaki, Kei Nakatani, Takeshi Sakurai, Nobuo Misawa, Hidefumi Mitsuno, Wiley, Essentials of Machine Olfaction and Taste, 2016年, 336ページ(3-48ページ)

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 大門 高明

ローマ字氏名: (DAIMON, Takaaki)

研究協力者氏名: 光野 秀文

ローマ字氏名: (MITSUNO, Hidefumi)

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。