

平成22年4月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580060

研究課題名（和文） 昆虫におけるオレキシン受容体の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of orexin receptor-like genes in insects

研究代表者

谷合 幹代子（TANIAI KIYOKO）

独立行政法人 農業生物資源研究所 制御剤標的遺伝子研究ユニット 上級研究員

研究者番号：60370665

研究成果の概要：

オレキシン神経ペプチドは、哺乳類において摂食亢進と覚醒作用が報告されているが、無脊椎動物からは見つかっていない。オレキシン遺伝子は、昆虫のゲノム配列には見つかっていないが、その受容体遺伝子のホモログは数種昆虫のゲノム配列に存在する。本研究は、カイコとコクヌストモドの脳からオレキシン受容体遺伝子（OXR）のホモログを単離し、遺伝子が発現する時期や器官の詳細を調べることにより、摂食行動との関連を考察した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：応用昆虫学

科研費の分科・細目：

キーワード：オレキシン受容体、摂食行動、昆虫

1. 研究開始当初の背景

昆虫の摂食行動は、餌の味や匂いの感覚情報と体内の栄養状態の情報が中枢で統合され、口器や消化器官の運動を制御すると考えられている。味覚の一次中枢は主として食道下神経節であると考えられている。これまでに、数種昆虫から、腸の運動を刺激または抑制する神経ペプチド類が数多く報告されているが、受容体の同定と作用機構の解明は不十分である。また、感覚器官により受容された情報と、体内の栄養状態の情報が統合され

る中枢の場所や、数多くの神経ペプチド類の相互関係や制御機構についてはほとんど解明されていない。

哺乳類からは、脳や消化器官から多くの摂食関連の神経ペプチドが単離されており、これらが複雑に摂食行動を調節・制御していることが分かっている。このうち、オレキシンは摂食亢進と覚醒に作用し、脳の摂食中枢である視床下部で産生され、ひとつの前駆体から2種類の活性型ペプチドが切り出される。これらオレキシンペプチドは、摂食中枢およ

びその周辺で発現する2種類のG蛋白質共役受容体 (GPCR) に結合する。オレキシンニューロンの活性は、血糖値やレプチン、グレリンなどの他の摂食制御因子に影響され、その投射先は脳全体におよぶため、オレキシンは栄養状態の情報を中枢で統合し、様々な行動を制御する役割があると考えられる。

我々は、昆虫の中枢において摂食行動を制御する物質の候補を調べるため、哺乳類の摂食亢進物質のホモログを、数種昆虫のゲノム配列中に検索したところ、カイコ、コクヌストモドキ、セイヨウミツバチの3種昆虫ゲノムにオレキシン受容体ホモログが存在した。これら昆虫のゲノムには、オレキシン遺伝子そのもののホモログは見つからなかったが、オレキシン受容体ホモログのアミノ酸配列は、ヒトの2型オレキシン受容体と44~46%一致していた。このことは、オレキシン受容体は脊椎・無脊椎動物にかかわらず類似した機能を持つ可能性を示唆している。しかし、無脊椎動物におけるオレキシン受容体に関する知見は全く無いため、昆虫を用いて解析することは重要だと考えられた。

2. 研究の目的

カイコ *Bombyx mori* とコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* のゲノム配列に存在するオレキシン受容体様遺伝子を単離し、遺伝子の発現および機能解析により、摂食行動との関連を明らかにする。

(1) オレキシン受容体様遺伝子の単離

ゲノム配列から推定した、カイコのオレキシン受容体 (BmOXR) 遺伝子およびコクヌストモドキのオレキシン受容体 (TcOXR) 遺伝子を脳や中腸から単離し、全長配列を決定する。

(2) BmOXRの発現部位と時期の同定

カイコは大型昆虫なので、脳やその他の器官の解剖・摘出が容易であり、また脳-食道下神経節における摂食一次中枢が同定されている。また幼虫期に旺盛な摂食行動を示し、成虫では口器を消失して摂食しないため、摂食時期と遺伝子発現時期との関連から、受容体と摂食行動との関連が推定できる利点がある。そこで、カイコ幼虫を用いて、BmOXR遺伝子発現器官を明らかにし、眠期や蛹、成虫における発現量と比較することにより、消化器官やエネルギー貯蔵器官におけるオレキシン受容体の役割の有無を推定する。また、BmOXRとTcOXRのアミノ酸配列の一部分に対する抗体を作成し、遺伝子が蛋白質に翻訳されて器官で発現しているかどうかを解析する。さらに、中枢での発現細胞の同定を行い、オレキシンニューロンと摂食一次中枢との位置関係を解明する。

(3) BmOXRおよびTcOXRのリガンド検定

哺乳類のオレキシン受容体にオレキシン

が結合すると、細胞内カルシウム濃度が上昇することを利用し、ヒトの培養細胞で発現させた受容体のリガンド結合機能を検定する系が確立している。そこで、BmOXRまたはTcOXRをヒト培養細胞で発現させ、ヒトオレキシンに対する応答性を検討する。この実験から、オレキシン受容体の機能が脊椎・無脊椎動物にかかわらず保存されているかどうか明らかとなる。また同様の検定系を利用し、カイコの体液や組織のホモジネートから内在性リガンドの精製を試みる。

3. 研究の方法

(1) オレキシン受容体様遺伝子の単離

BmOXRの部分配列は、ヒトオレキシン受容体 (OX2) のアミノ酸配列をもとに、カイコゲノム配列のtBlastn検索を行い、得られた断片配列をもとにプライマーを設計し、幼虫の脳や中腸などから作成したcDNAを鋳型にPCRを行い、部分配列を増幅した。カイコ品種は日137x支146を用いた。TcOXRはNCBIデータベースにOX2様遺伝子として登録されていた、ACCESSION番号XP_973738遺伝子の配列をもとに、プライマーを設計し、終令幼虫の頭部などのcDNAから部分配列を増幅した。次に両昆虫とも、幼虫脳のcDNAライブラリを作成し、RACE法により全長遺伝子を単離した。数種類の異なる遺伝子配列が得られたBmOXRについては、異なる遺伝子か、またはスプライシングバリエーションかを同定するため、すべての配列について、カイコゲノム情報を用いて Scaffold 解析 (<http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/>) を行った。

(2) BmOXRとTcOXRの発現部位と時期の同定

摂食期におけるBmOXRの発現部位を同定するため、正常および飢餓状態 (2日間絶食) のカイコ5令幼虫の脳、食道下神経節、胸部神経節、腹部神経節、中腸、脂肪体、真皮、気管、マルピーギ管、絹糸腺、精巢、卵巣を摘出した。発育時期については、休眠卵の4種類の時期 (休眠期、臨界期、器官形成期、蟻蚕体形成期)、1令、3眠、4令、4眠期、5令、吐糸期 (摂食を停止し繭を作り始める時期)、蛹5日目、成虫 (羽化後半日以内) を用いた。5令および蛹以外の発育時期においては、脳と中腸または頭部と中腸の2器官を摘出した。摘出器官のcDNAを合成し、プラスミドDNAを検量線として用いた絶対定量のリアルタイム定量PCRを行い、内部標準として、アクチンA3遺伝子の絶対定量値でノーマライズし、それぞれの器官を比較した。サンプリングは、複数の幼虫から行い、少なくとも3つの異なる実験区を用いて、それぞれ2回繰り返して実験を行った。

コクヌストモドキの発現時期は、卵（産卵12時間以内および産卵72時間以内）、1令、2令、3令、4令、5令、6令、蛹（蛹化後1~2日）、成虫（羽化後約2日）の体全体または3令幼虫以降は頭部とそれ以外に分け、cDNAを合成しカイコと同様に定量PCRを行った。また、コクヌストモドキの摂食行動に関わる可能性がある遺伝子として、ゲノム配列から推定された、インシュリン遺伝子のホモログ遺伝子（LIRP: XM_001814129）をクローニングし、定量PCRを行い、TcOXRの変動と比較した。コクヌストモドキの定量PCR内部標準は、リボゾーム蛋白質(rpS3)を用いた。

(3) BmOXRとTcOXRのウエスタン解析

BmOXRに対して、以下の部分配列を認識する3種類の抗体を作成した。抗体1:全バリエーションに共通するN末端の細胞外と考えられる部分に含まれる13アミノ酸配列；抗体2:バリエーションa特有のC末端細胞内と考えられる領域に含まれる12アミノ酸配列；抗体3:バリエーションb特有のC末端細胞内と考えられる領域に含まれる17アミノ酸配列。TcOXRに対しては、N末端細胞外と考えられる領域に含まれる16アミノ酸配列を認識する抗体を1種類作成した。これら抗体は、キャリアを含む合成ペプチドをウサギに免疫して採取した血清を使用した。ウエスタンブロッティングはカイコ幼虫から頭部および中腸を半分に分けて（前部中腸、後部中腸）抽出し、コクヌストモドキは幼虫の個体全体を使用した。サンプルは少量のプロテアーゼインヒビターを含むPBS中でホモジネートし、1,000g遠心上清を10,000遠心上清と沈殿物に分け、沈殿物は少量のPBSに懸濁し、還元条件下で1.5%のSDS-PAGEゲル電気泳動後、PVDF膜に転写し、抗体反応後、HRP標識抗ウサギ抗体ヤギ抗体で検出した。

(4) BmOXRとTcOXRのリガンド検定

pCDNAベクターにBmOXRとTcOXR遺伝子およびヒトオレキシン受容体(OX2)をクローニングし、リポフェクチンを用いてHEK293細胞にトランスフェクションし、ゼオシンで選抜した。ノーザンブロッティングにより遺伝子発現を確認した細胞株に、さらにエクオリン遺伝子を含むpCDNAベクターをトランスフェクションし、G418で選抜し、受容体とエクオリンを恒常的に発現する細胞株を作成した。

培養細胞は、セレンテラジン処理をして3~4時間培養した後、PBSに懸濁して20ulのリガンド溶液に加え、直ちにルミノメーターで30秒間カウントした。リガンドとして、市販のヒトオレキシンA(0.1-10uM)、コクヌストモドキの摂食関連ペプチドの候補として、3種類のタキキニン、2種類のサルファキニン、5

種類のピロキニンのアミド化ペプチドを合成し、0.1-10uMの水溶液を用いた。またカイコの脂肪体および中腸をPBSでホモジネートし、逆相カートリッジを通し、40~80%アセトニトリルで溶出した分画を、溶媒を除去後、水に溶解したものを用いた。

(5) in situハイブリダイゼーション

BmOXRとTcOXRは全長遺伝子または約300bpの部分配列をpGEMベクターにクローニングし、ロッジ社のDIG RNAラベリングキットを用いてRNAプローブを作成した。作成したプローブの断片化は、超音波処理、アルカリ処理、95°C1時間処理などを試みた。カイコまたはコクヌストモドキの幼虫の脳または中腸を抽出し、パラホルムアルデヒドで固定後、常法に従ってタンパク除去および再固定後、48°Cで20時間ハイブリダイゼーションし、DIGの検出は、HRP標識抗DIG抗体のNBT/BCIP染色法と、FITC標識抗DIG抗体の蛍光観察法などを試みた。

4. 研究成果

(1) BmOXRとTcOXR遺伝子の単離

BmOXRは脳および中腸のcDNAから940bpの部分配列を、TcOXRは終令幼虫の頭部および中腸のcDNAから348bpの部分配列を増幅した。RACE法は、コクヌストモドキについては、終令幼虫の頭部cDNAライブラリを用いて行い、5'および3'端とも1種類の配列が得られ、TcOXRのORF全長1,395bp(464アミノ酸残基)を単離した。カイコ5令幼虫脳のcDNAライブラリによるRACE法では、5'端は2種類、3'端は3種類の異なる配列が得られ、両端配列をプライマーとしたPCRから、4種類の遺伝子を単離した。これらがコードする蛋白質をBmOXRa、BmOXRb、BmOXRc、BmOXRbLと名付けた(それぞれ374、480、345、531アミノ酸残基)。BmOXRa、BmOXRb、BmOXRcは、共通のN末端を持つがC末端配列が異なる。

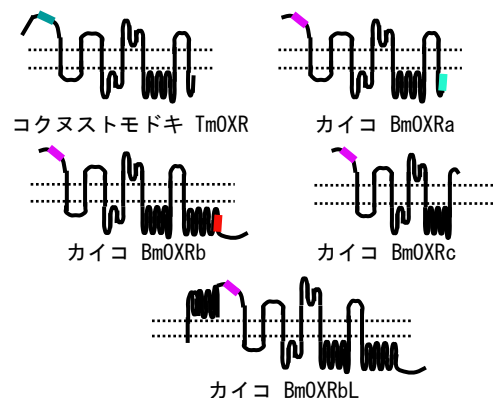


図1. TmOXRとBmOXRの構造模式図（破線は細胞膜）

抗ペプチド抗体作成に用いた部分をカラーで示した。

またBmOXRbとBmOXRbLはC末端が共通し、N末端の長さが異なっていた。これらがGPCR膜

蛋白質の特徴を備えているかを、SOSUIプログラムを用いて推定すると(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)、TcOXR、BmOXRa、BmOXRbは7回膜貫通領域を持っており、GPCRと考えられた。BmOXRcは膜貫通領域が6個のみで、BmOXRbLは膜貫通領域が8個と推定されるため、N末端とC末端が細胞外または細胞内の同じ方向に位置する可能性も考えられた。ゲノム配列のScaffold解析から、4種類のBmOXR4は、すべて第20染色体に位置する一遺伝子からのプライミングバリエーションであることが分かった。

(2) BmOXRの発現部位と時期

BmOXR遺伝子の定量PCRは、すべてのバリエーションに共通する部分配列 (bmoxr-common) と、各バリエーション特有な部分配列を増幅する、計5種類のプライマーセットを用いて行った。幼虫器官の中では、脳と食道下神経節が比較的高い発現量を示したが、その他の調べたすべての器官でも発現がみられた。5令起蚕時に絶食状態にした飢餓幼虫では、脳、食道下神経節、絹糸腺、生殖器官など複数の器官で発現量が数倍~数十倍に増加していた。蛹における調べたすべての器官 (脳-神経節、中腸、脂肪体、気管、マルピーギ管、精巣、卵巣) および成虫の脳と中腸でも発現がみられた。頭部における発現量は、幼虫期、蛹期、成虫期と成長するに従い3~5倍に増加したが、中腸における発現量は、幼虫期と蛹期では一定していたが、成虫期の発現はほとんど無かった。幼虫中腸では、前部と後部の発現量に差は無かった (図2)。また、眠期と摂食期では、脳と中腸における発現量は同等だった。胚期と1令幼虫では、ほとんど発現がみとめられなかった。これらすべての結果において、バリエーションによる発現器官や時期の違いはみられず、バリエーションによる発現特異性は無かった。しかし発現量については、それぞれ異なっており、bmoxr-commonの発現量に比較し、その他のバリエーションの発現量は数%しか無く、まだ同定していないバリエーションの存在が示唆された。

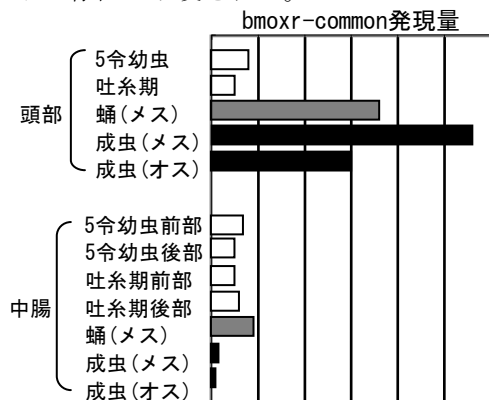


図2. 頭部と腸におけるBmOXR遺伝子発現量

(3) TcOXRの発現時期

個体全体をサンプルとして定量した場合、産下12以内の卵では、ほとんど発現がみられなかったが、3日目の卵から成虫まで、すべての時期でTcOXR遺伝子の発現がみられ、1令幼虫で最も高く発現した後、令を経るに従い減少し、蛹から成虫にかけて再び増加した。摂食関連遺伝子の可能性が高い遺伝子として比較したLIRPも同様の変動を示したが、1令幼虫より蛹から成虫で高い発現がみられたことはTcOXRと異なっていた (図3)。頭部だけのサンプルでも同様の結果だった。頭部とそれ以外の体全体は、同様な発現量だったことから、カイコと同様に、脳と脳以外の多くの器官で発現することが示唆された。

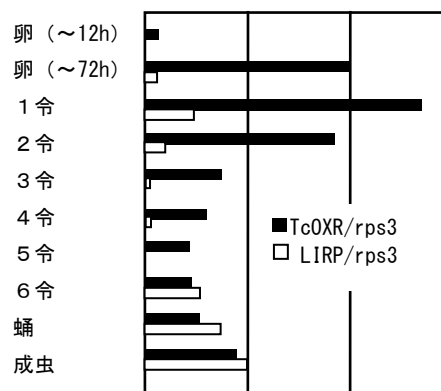


図3. 成長段階におけるTcOXR遺伝子発現の変化 (5令でのLIRPのデータはない)

(4) BmOXRとTcOXRのウエスタン解析

図1で模式的に示した受容体のカラーで示した一部アミノ酸配列に相当する合成ペプチドに対する抗体により、カイコ幼虫の脳、神経節、中腸におけるBmOXRと、幼虫頭部と腸におけるTcOXR蛋白質をウエスタンブロッティングにより検出したところ、カイコの中腸と食道下神経節において、抗BmOXRa抗体では約62kDa、抗BmOXRb抗体では約80kDaのバンドが主なバンドとして検出された。(アミノ酸配列から推定される分子量は、それぞれ約43kDaと約55kDa。BmOXRbLは61kDa)。コクヌストモドキ終令幼虫の頭部と腸では、抗TcOXR抗体が反応する主バンドの分子サイズは推定されるサイズより小さく、脳と腸において、ほとんど発現していないか非常に低発現であると考えられた。

(5) BmOXRとTcOXRのリガンド検定

BmOXRa、BmOXRb、TcOXRの3遺伝子について、HEK293細胞で恒常的に発現することに成功した。同細胞内で恒常的に発現させたエクオリンと、基質セラランテラジンがカルシウム結合により発光する系を利用して、

リガンド検定を行った。対照として発現したOX2は、ヒトオレキシンAに応答したが、BmOXRa、BmOXRb、TcOXRはいずれもほとんど応答しなかった。また、カイコ幼虫の脂肪体と中腸抽出物も全く応答しなかった。また TcOXR は、Hause ら (Frontiers in Neuroendocrinology, 2008:142-165)による系統樹解析から、ショウジョウバエのタキキニン受容体やサルファキニン受容体などと近いサブグループに含まれているため、コクヌストモドキから単離されているタキキニン類、サルファキニン類、ピロキニン類のうち、受容体が未同定のものを合成し、リガンドとして用いたが、いずれも全く応答しなかった。

(6) in situ ハイブリダイゼーション

カイコにおいてもコクヌストモドキにおいても、脳の in situ は全くシグナルが得られなかった。カイコ脳については、専門業者に委託したが、全くシグナルが得られなかった。一方、カイコ中腸では NBT/BCIP 染色でシグナルが得られた。コクヌストモドキの腸は全くシグナルが得られなかったが、腸の末端につながる一部分に、FITC 標識抗 DIG 抗体の結合がみられる部分があったが、非常に小さい組織のため、同定することが困難だった。手法の改善を試みているが、シグナル検出の問題は、BmOXR、TcOXR とも発現量が低いことが原因と考えられた。

(7) 考察

カイコのオレキシン受容体様遺伝子は、脳や食道下神経節での発現が比較的高いものの、その他の様々な臓器で一樣に発現すること、また摂食期である幼虫期より、成虫期により高い発現がみられることから、摂食行動を主として制御するものではないと考えられる。本研究では受容体の機能を特定することや、発現細胞の特定ができなかった。今後、リガンドが同定されることにより、より具体的な機能解明が可能になると考えられる。哺乳類のオレキシンが、摂食亢進だけでなく、覚醒や栄養状態の恒常性の維持などに幅広く関わっているが、昆虫においては眠期や蛹期でも活動期と同様に発現がみられたため、覚醒との関連は示唆されなかった。しかし、飢餓カイコにおいて、数種の臓器で正常カイコより高い発現がみられたことと、5令幼虫において、絹糸腺や生殖器官など栄養を取り込む器官での発現が比較的高いことから、栄養状態の制御に関わる可能性があると考えられた。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷合 幹代子 (TANIAI KIYOKO)

独立行政法人農業生物資源研究所・制御剤標的遺伝子研究ユニット・上級研究員