

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15848

研究課題名（和文）昆虫イオノトロピック受容体ファミリーによって仲介される味覚シグナルの解明

研究課題名（英文）Probing taste signals mediated by insect ionotropic receptors

研究代表者

遠藤 悠（Endo, Haruka）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・特別研究員

研究者番号：50837474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫の味覚は、味覚受容体だけでなくイオノトロピック受容体（IR）にも仲介されると考えられている。本研究はカイコのIRの味覚における機能解明を目的とした。まずカイコの29種のIRの全長配列の推定を行った。RNA-seqによってIRを含む化学受容体ファミリーのカイコ味覚器官における発現レポーターを得た。ゲノム編集技術によってIR8aノックアウトカイコを作出した。これを用いた電気生理学的実験から、IR8aはカイコのクワ認識に必要な システロールの受容に関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物を食べる昆虫は優れた味覚を用いて特定の植物（宿主）のみを選択的に摂食することができる。昆虫の味覚システムを解明することは、カイコがなぜクワを食べるかといった昆虫-植物間の特異的関係を明らかにするだけでなく、害虫管理等に対する貢献が期待できる。本研究はカイコのイオノトロピック受容体について味覚器官での発現を明らかにし、IR8aを共受容体として利用するIRはカイコのクワ認識に寄与しないことを示唆する結果を得た。今後のさらなる研究によって、味覚だけで特定の植物を認識してしまう昆虫の能力の分子的・神経的基盤が明らかになると期待される。

研究成果の概要（英文）：Gustation in insects is mediated by ionotropic receptor (IR) family as well as gustatory receptor (GR) family. The present study aimed to clarify the role of IR in gustation in the silkworm *Bombyx mori*. First, 29 full-length sequences of silkworm IRs were estimated. RNA-seq analysis provided the IR expression repertoires in silkworm gustatory organs including maxillary palp, maxillary galea, and labrum. A IR8a-knockout silkworm strain was generated using the CRISPR/Cas9 system. Electrophysiological experiments using the strain suggested that IR8a is not involved in sensing β -sitosterol which is an essential compound for silkworm in host-plant recognition.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：昆虫 味覚 受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫が食物を食べるか否かの判断や、咀嚼や嚥下に付随した筋肉運動などは、内的因子の修飾も受けるが基本的には味覚すなわち食物由来の非揮発性化合物の受容によってシステムチックに規定される。例えば、カイコがクワを食べる行動は、クワ葉への咬みつぎ、咀嚼、嚥下(飲み込み)に分解できる。これらの行動は、味覚器官における鍵刺激(味覚シグナル)の受容によって惹起される。昆虫はイオンチャンネル型として機能する3つの化学受容体ファミリー(味受容体・匂い受容体・イオノトロピック受容体)を持つ。その中でも味受容体(GR)ファミリーは、味覚ニューロンにおけるセンサー分子であると考えられている。他方、イオノトロピック受容体(IR)ファミリーは嗅覚や温度、湿度などの検出に重要であると考えられてきた。しかし最近になってショウジョウバエでは4種類のIRがアミノ酸や脂肪酸を受容することが示唆された(Tauber et al., 2017; Steck et al., 2018)。つまり、GRが受容しない味覚シグナルを含め、IRが味覚受容に大きな役割も持つ可能性が出てきた。しかし今のところショウジョウバエが持つ66種のIRのうち、双翅目昆虫に特異的なIRも含めたわずか4分子に関する知見しかない。鱗翅目昆虫など他の昆虫のIR解析はほぼ手付かずのままである。

2. 研究の目的

GR以外の受容体分子も想定外に昆虫の味覚に大きな役割も持つことがわかってきた。「GR以外の味覚関連受容体候補」の筆頭はイオノトロピック受容体であるが、昆虫種によって約30~60のメンバーからなるIRファミリーと味覚シグナルとの対応関係の全貌は不明である。本研究はカイコのIRの機能解析を行い、IRによって仲介される味覚シグナルの全貌を明らかにしようとした。

3. 研究の方法

(1) カイコ IR 全長塩基配列の推定

先行研究で全長配列が同定されたオオタバコガの配列(Liu et al., 2018)を参考に、カイコのゲノム配列から全長塩基配列の推定を行った。

(2) 味覚器官における IR の発現パターン解析

RT-PCR および RNA-seq によって、カイコの味覚器官(小顎肢・小顎粒状体・上唇)に発現するIRを解析した。また、酵素処理によってカイコの味覚器官からシングルセルを単離するための条件を検討した。

(3) 脂肪酸に応答するカイコ味覚器官の同定

チップレコーディングと呼ばれる電気生理学的実験によって、カイコの味覚神経応答を記録した。

(4) IR ノックアウトカイコの作出と機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて co-receptor として知られる3つのIR(IR8a, IR25a, IR76b)についてノックアウト個体を作成し、可能なものについて電気生理学的実験を行った。

4. 研究成果

(1) カイコ IR 全長塩基配列の推定

29種類あるとされるカイコのIRファミリーのタンパク質コード配列の推定が不完全であったため、まずは先行研究で全長配列が同定されたオオタバコガの配列を参考に、カイコのゲノム配列から全長塩基配列の推定を行った。

(2) RT-PCR および RNA-seq による味覚器官における IR の発現パターン解析

味覚器官における発現解析(RT-PCR および RNA-seq)を行ったが、両者の結果はあまり合致しなかった。そのため、本来の目的である「味覚器官における主要なIRを見出すこと、IRファミリーの発現レパートリーを明らかにすること」に関しては、シングルセル RNA-seq をもってこれを達成することにした。しかし、確立できたと思われた幼虫の味覚器官の細胞単離の条件では、安定的に生細胞を単離することができず、シングルセル RNA-seq に必要なクオリティの細胞を準備することができなかった。

(3) 脂肪酸に応答するカイコ味覚器官の同定

チップレコーディングと呼ばれる電気生理学的手法によって、カイコの味覚器官の感覚毛の応答を評価した。その結果、小顎肢が一部の脂肪酸に対して比較的低濃度から応答すること、 μM 以上の脂肪酸は小顎粒状体の内側有柄感覚子で検出されること、外側有柄感覚子は脂肪酸受容に関与しないことを示唆する予備的データを得た。

(4) IR ノックアウトカイコの作出と機能解析

カイコの味覚におけるイオノトロピック受容体 (IR) ファミリーの機能を明らかにするため、29種類すべての IR の機能に必須の co-receptor と考えられている IR8a, IR25a および IR76b をノックアウトすることにした。CRISPR-Cas9 システムを用いて 3 遺伝子それぞれについてヌル変異を持つ個体を得ることに成功したが、IR25a 変異体と IR76b 変異体についてはホモ接合体を得た段階でほとんどの個体が幼虫期に死に、系統が途絶えてしまった。この原因は不明だが、同じ環境で飼育されていた他系統は若干の死亡個体こそあれ問題なく継代できていたことから、これらの IR 遺伝子欠損が、例えば摂食や免疫などに関連した、生存に重要な形質に影響を与えた可能性がある。

唯一得ることができた IR8a ノックアウトカイコについて、チップレコーディングと呼ばれる電気生理学的手法によって味覚神経の応答を調べた。本研究では味覚受容体のリガンドの範疇でないと考えられる脂肪酸やステロールに着目しており、前年度までの解析によって、カイコの複数の味覚器官の中でも小顎肢が一部の脂肪酸やステロールの受容に関わることを明らかにしてきた。したがって IR がこれらの受容に関わることを期待したが、IR8a ノックアウトカイコにおいて調べた範囲における脂肪酸やステロールに対する顕著な応答低下は認められなかった。特にカイコのクワ認識に必要な シトステロールに対する応答がまったく低下しなかったことは、IR8a がカイコのクワ認識に関与しないことを示唆している。

< 引用文献 >

Tauber et al., (2017) PLoS Genet. 13:e1007059.

Steck et al., (2018) eLife 7:e31625.

Liu et al., (2018) Insect Biochem Mol Biol.99:37-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuneto K, Endo H, Shii F, Sasaki K, Nagata S, Sato R	4. 巻 18
2. 論文標題 Diet choice: The two-factor host acceptance system of silkworm larvae.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shii Fumika, Mang Dingze, Kasubuchi Mayu, Tsuneto Kana, Toyama Tomoko, Endo Haruka, Sasaki Ken, Sato Ryoichi	4. 巻 132
2. 論文標題 Ultrasensitive detection by maxillary palp neurons allows non-host recognition without consumption of harmful allelochemicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 104263 ~ 104263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinsphys.2021.104263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 常藤加菜, 遠藤悠, 永田晋治, 伊藤克彦, 佐藤令一
2. 発表標題 カイコガ幼虫の宿主認識に關与する味受容体
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回大会 2022年3月14日
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------