

機関番号：12601

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20880006

研究課題名（和文）昆虫の超高感度性フェロモン受容を産み出す分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism underlying highly sensitive detection of sex pheromones in insects.

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）：昆虫の超高感度な性フェロモン受容の分子機構の解明を目的とし、カイコガを対象として性フェロモン受容に関与することが報告されている性フェロモン受容体、フェロモン結合タンパク質、Sensory neuron membrane protein-1 (SNMP1)の解析を行った。その結果、性フェロモン受容細胞の匂い応答特異性はフェロモン受容体のみによって決定していることを明らかにした。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系において SNMP1 がフェロモンへの応答を上昇させる作用があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate molecular mechanisms underlying highly sensitive detection of sex pheromones in insects, we examined functional roles of sex pheromone receptor proteins, pheromone binding proteins, and sensory neuron membrane protein-1 (SNMP1) in the silkworm *Bombyx mori*. We found that the response specificity of pheromone receptor neurons is determined by the response spectrum of the expressed receptor protein. We also found that expression of SNMP1 increases the peak response amplitude of *Xenopus* oocytes expressing pheromone receptor proteins to pheromone stimulations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：昆虫分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、性フェロモン、嗅覚、分子遺伝学、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

蛾類昆虫のオスは、メスから放出され空気中に分散したごく微量の性フェロモンを超高感度で検出する性フェロモン受容系を触角上の毛状感覚子に備えている。代表者らはこれまでに、カイコガの性フェロモン主成分であるボンビコールに特異的な受容体遺伝子 (BmOR1) とフェロモン副成分であるボン

ビコールに特異的な受容体遺伝子 (BmOR3) を単離し、補助因子である BmOR2 (研究開始後に BmorOrco に改名されたため以下 BmorOrco と記述) と BmOR1 または BmOR3 を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の解析から性フェロモン成分の識別が受容体レベルで達成されることを明らかにした(1, 2)。一方で、カイコガのオスはわず

か200分子のボンピコールを受容すると行動をメスへの定位行動を発現し、ボンピコール受容細胞はわずか1分子のボンピコールを受容すると1発の活動電位を発生すると計算されているが(3)、このような高感度な受容は性フェロモン受容体を発現させた卵母細胞で再現されていない。すなわち生体内での超高感度なフェロモン受容には、受容体以外の因子が重要な機能を果たしていると推測される。

このような因子の候補として、フェロモン結合タンパク質 (PBP) と sensory neuron membrane protein-1 (SNMP1) があげられる。PBP はフェロモン受容細胞のある感覚子リンパ液中に発現すること(4)、精製タンパク質を用いた *in vitro* 結合実験でフェロモンに対して高いアフィニティーで結合することから(5)、性フェロモン分子に選択的に結合し、感覚子リンパ液中に性フェロモン分子を濃縮するとともに、受容体へのフェロモンを輸送する機能を持つことが推測されている。しかしながら、高感度な性フェロモン受容系をもつ蛾類昆虫において *in vivo* で PBP の機能解析を行った例はなく、PBP の生体内での機能は明らかにされていない。SNMP1 はフェロモン受容細胞で発現する CD36 ファミリーに属する膜タンパク質である(6)。ショウジョウバエで SNMP1 をノックアウトすると集合フェロモンに対する受容細胞の電氣的応答がみられなくなる(7)。さらに SNMP1 ノックアウトショウジョウバエに遺伝子組換えにより異所的に発現した蛾類性フェロモン受容体は、リガンドである同種の性フェロモンへの応答性がみられなくなることから(7)、SNMP1 は種を越えてフェロモン受容一般に必須な機能を果たしていることが示唆されている。しかしながら、SNMP1 の具体的な機能はわかっていなかった。

参考文献

(1) Sakurai T, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16653-8. (2) Nakagawa T, et al. (2005) *Science* **307**: 1638-42. (3) Kaissling K-E, (1987) R. H. Wright Lectures of Insect Olfaction, ed. Colbow, K. (Simon Fraser Univ., Burnaby, Canada). (4) Steinbrecht RA, et al. (1995) *Cell Tissue Res* **282**: 203-217. (5) Grater F, et al. (2006) *Structure* **14**: 1577-1586. (6) Rogers ME, et al. (2001) *J Neurobiol* **49**: 47-61. (7) Benton R, et al. (2007) *Nature* **450**: 289-293.

2. 研究の目的

本研究では、カイコガを用いて高感度な性フェロモン受容を産み出す分子機構の解明を目的とした。この最終目標を達成するために次の情報を得ることを具体的な目的とする。

(1)BmPBP1、BomSNMP1 の *in vivo* での機能の解明

分子遺伝学的手法を用いて、カイコガの PBP (BmPBP1) または SNMP1(BomSNMP1) の遺伝子発現をノックダウンした遺伝子組換えカイコガを作出する。ボンピコール受容細胞のボンピコールに対する電氣的応答特性を野生型と比較することで、BmPBP1 や BomSNMP1 が生体内で性フェロモン感度に与える影響を明らかにし、BmPBP1 と BomSNMP1 が性フェロモン受容に必須な役割を果たすのか検証する。

(2) BmPBP1 と BomSNMP1 の作用機構の解明

アフリカツメガエル卵母細胞や培養細胞発現系を用いて、BomSNMP1 と BmPBP1 と受容体の分子間相互作用様式を検証する。*in vivo* 解析の結果と照らし合わせて、3 遺伝子の形成する分子間ネットワークの関係および作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *In situ* hybridization による遺伝子発現パターンの解析

BomSNMP1 のフェロモン受容細胞における遺伝子発現を確認するために、オス成虫触角切片に対して、性フェロモン受容体遺伝子である BmOR1 およびフェロモン受容細胞を囲んでいる支持細胞で発現することが知られている BmPBP1 との 2 重 *in situ* hybridization を行った。標識後の切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、hybridization のシグナルを取得し発現細胞の位置関係を比較した。

(2)アフリカツメガエル卵母細胞を用いた BomSNMP1 の機能分析

ヘテロ発現系での機能検証には BmorOrco と共発現することで容易に BmOR1 および BmOR3 を機能的に発現することができるアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。BmorOrco と BmOR1 または BmorOrco と BmOR3 を共発現した卵母細胞と、それらに加え BomSNMP1 を共発現した卵母細胞のフェロモン (ボンピコール、ボンピカール) への電氣的応答を比較した。計測は 2 電極膜電位固定法で -80mV に膜電位を固定した条件下で行った。

(3)遺伝子組換えカイコガを用いた *in vivo* での機能解析

in vivo の解析手法として研究開始当初は RNA 干渉による BomSNMP1、BmPBP1 のノックダウンシステムの作出と応答性の検証を計画していたが、一般的にカイコガにおける RNA 干渉の効率が低いことから、フェノタイプへの影響が検出できない可能性が推測された。そのため、当初の計画を変更し、以

下の2つの方法により *in vivo* の解析を試みた。

①コナガ性フェロモン受容体発現系統の作出と解析

PBP と SNMP1 が性フェロモン受容に必須な役割を果たすか検証するために、同種の PBP と SNMP1 を持たない他種の性フェロモン受容体をボンビコール受容細胞で発現する系統を作出した。具体的には、BmOR1 の上流配列をプロモーターとする

BmOR1-GAL4 系統と Z-11-hexadecenal (Z11-16:Ald) に特異的に反応するコナガの性フェロモン受容体 PxOR1 のエフェクター系統 UAS-PxOR1 系統を作出した。これらの遺伝子組換え系統を交配し、得られた G1 個体から両方の組換え遺伝子を持つ個体を選抜した。ボンビコール受容細胞の応答性の検証は単一感覚子記録によって行った。

②一般臭嗅覚受容細胞における外来遺伝子発現系の構築

BmPBP1 と BomSNMP1 が生体内でフェロモン受容に必須であるか検証するために、BmPBP1、BmSNMP1、BmOR1、BmOR3 を本来発現しない一般臭の嗅覚受容細胞において BmOR1 もしくは BmOR3 を発現し、これらの受容細胞のフェロモンへの応答特性を単一感覚子記録により明らかにすることを計画した。このための遺伝子組換え系統として、一般臭受容細胞を含む、ほとんど全ての嗅覚受容細胞で発現することが報告されている BmorOrco の上流配列をプロモーターとして GAL4 を発現するドライバー系統を作出した。BmorOrco-GAL4 系統の嗅覚受容細胞における遺伝子発現誘導を UAS-GCaMP との交配で得られた個体の触角および触角葉における蛍光を観察することで検証した。並行して、UAS-BmOR1、UAS-BmOR3 系統を作出した。

4. 研究成果

(1)触角における遺伝子発現パターンの解析
他種蛾類では SNMP1 の性フェロモン受容細胞での発現が報告されているが、BomSNMP1 の詳細な発現パターンは明らかにされていない。そこで、まず BomSNMP1 のフェロモン受容細胞における発現を検証するために BmPBP1 または BmOR1 と BomSNMP1 の 2重 *in situ* hybridization を行った。その結果、BomSNMP1 は BmPBP1 発現細胞に囲まれた細胞で発現しており、フェロモン受容細胞で発現することが示された(図 1A)。つづいて BmOR1 と BomSNMP1 の 2重 *in situ* hybridization を行ったところ、BomSNMP1 は BmOR1 発現細胞の一部で発現することが示された。しかし、BomSNMP1 の発現細胞の多くは BmOR1 発現細胞に隣接

するボンビコール受容細胞で検出された(図 1B)。これらの結果は、BomSNMP1 がボンビコール受容細胞ではなくボンビコール受容細胞で主に発現していることを示唆している。

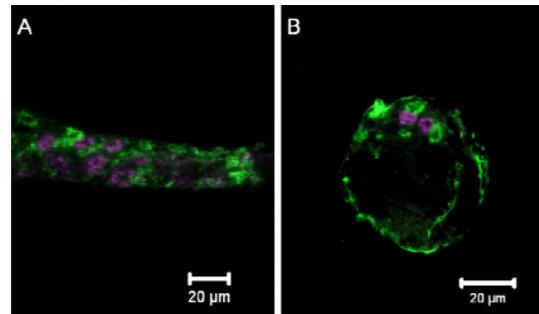


図 1 BomSNMP1 のオス触角における発現パターン。(A) BmPBP1 (緑) と BomSNMP1 (マゼンタ) の 2重 *in situ* hybridization。(B) BmOR1 (緑) と BomSNMP1 (マゼンタ) の 2重 *in situ* hybridization。

(2)BomSNMP1 のフェロモン応答への影響

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用して BomSNMP1 のフェロモン受容における機能を検証した。興味深いことに BmOR1、BmOR3 とともに BomSNMP1 を共発現した卵母細胞では、電氣的応答のピーク電流値が増加する傾向がみられた(図 2)。この増加は特に BmOR3 について顕著だった。一方で、BmOR1、BmOR3 とともに応答の閾値濃度は BomSNMP1 の発現によって変化はみられなかった。今後、詳細な解析を行い、この作用のもとにある分子機構を明らかにしていきたい。

(3)コナガフェロモン受容体発現カイコガの解析

コナガ性フェロモン受容体である PxOR1 をボンビコール受容細胞で発現する遺伝子組換えカイコガを作出し、単一感覚子記録によりフェロモンへの応答性を検証した。PxOR1 発現ボンビコール受容細胞はボンビコールに加えて、PxOR1 のリガンドである Z11-16:Ald に特異的に応答を示した。この結果から、PBP と SNMP1 はフェロモン受容細胞の匂い特異性には関与しないことが示唆された。つづいて、PxOR1 発現ボンビコール受容細胞のボンビコールと Z11-16:Ald に対する濃度依存性を比較したところ、Z11-16:Ald に対する感度はボンビコールの約 10 分の 1 だった(図 3A)。mRNA 発現量と受容細胞の応答感度の比較を行ったところ、PxOR1 の発現量は BmOR1 と比較して 10 分の 1 程度であったため(図 3B)、発現量の違いが応答感度の低下の原因の一つであると考えられる。

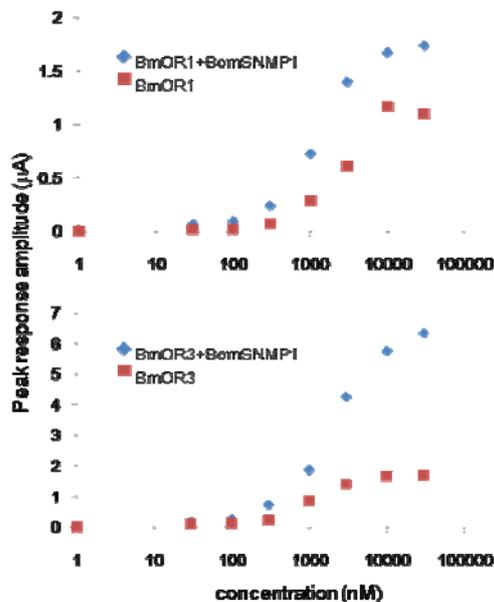


図 2 BomSNMP1 発現によるボンビコール (上、N=5)、ボンビカール (下、N=3) に対する応答のピーク電流値の増加。

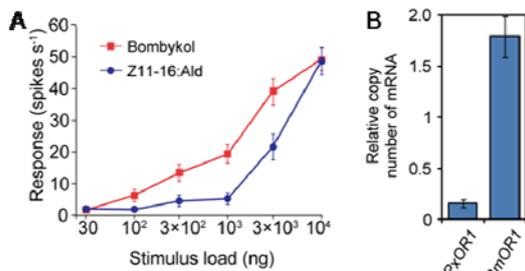


図 3 (A)PxOR1 発現ボンビコール受容細胞のボンビコール (赤)、Z11-16:Ald (青) に対する濃度依存曲線 (B)PxOR1 発現オスカイコガ触角の PxOR1 と BmOR1 の発現量の比較。(Sakurai et al., PLoS Genetics, inpress から改変して引用)

(4)一般臭受容細胞における遺伝子発現系の構築

(3)の解析から、フェロモン受容細胞の特異性は発現する受容体によって決定していることが明らかになったが、高感度性に関する PBP と SNMP1 の機能には言及できなかった。そこで、BmPBP1、BmSMNP1、BmOR1、BmOR3 を本来発現しない一般臭の嗅覚受容細胞において BmOR1 もしくは BmOR3 を発現する系統の構築を進めた。BmorOrco-GAL4/UAS-GCaMP 系統の触角における GCaMP の蛍光を観察した結果、オス成虫の触角中の多数の嗅覚受容細胞での蛍光が検出された (図 4 左)。さらに、嗅覚受容細胞の投射先である触角葉での蛍光シグナルを観察したところ、触角葉全体で蛍光

シグナルがみとめられた (図 4 右)。これらの結果は、一般臭嗅覚受容細胞を含むほとんどの嗅覚受容細胞で GCaMP が発現していることを示しており、本系統を用いることで一般臭嗅覚受容細胞において外来遺伝子の発現を誘導できることがわかった。並行してエフェクター系統として UAS-BmOR1、UAS-BmOR3 系統を樹立した。しかしながら、これらの系統の作出に予定以上の期間を要したため補助事業期間中での機能解析にはいたらなかった。本研究で時間と労力を最も要する組換え系統の作出は完了したため、今後速やかに機能解析を行い、BmPBP1 と BomSNMP1 の非存在下でフェロモン受容体を発現させ、フェロモン応答感度を検証し、これら 2 遺伝子のフェロモン受容における生体内での機能を明らかにする予定である。

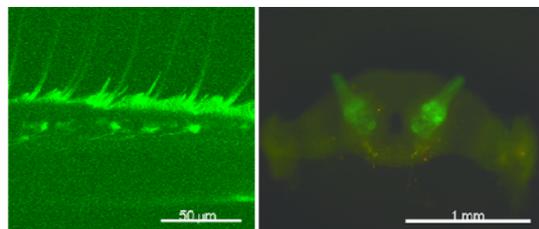


図 4 BmorOrco-GAL4/UAS-GCaMP オス触角 (左)、オス脳 (右) の蛍光写真

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 3 件)

1. Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Stephan Shuichi Haupt, Keiro Uchino, Fumio Yokohari, Takaaki Nishioka, Isao Kobayashi, Hideki Sezutsu, Toshiki Tamura, Ryohei Kanzaki, A single sex pheromone receptor determines chemical response specificity of sexual behavior in the silkworm *Bombyx mori*. PLoS Genetics, 査読有 (in press)

2. Ryohei Kanzaki, Noriyasu Ando, Takeshi Sakurai, Tomoki Kazawa (2008) Understanding and Reconstruction of the Mobiligence of Insects Employing Multi-Scale Biological Approaches and Robotics. Advanced Robotics 22: 1605-1628 (査読有)

3. Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, (他 8 名中 2 番目) (2008) Identification of receptors of main sex-pheromone components of three Lepidopteran species. European Journal of Neuroscience 28: 893-902 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

1. 櫻井健志「フェロモン源定位行動発現の匂い特異性を決定する分子・神経基盤」第55回日本応用動物昆虫学会, 2011年3月27-29日, 九州大学, 福岡
2. 櫻井健志「カイコガフェロモン源定位行動の発現におけるボンビコール受容細胞の役割」第5回移動知シンポジウム, 2010年3月1-3日, 松島、宮城
3. 櫻井健志「カイコのフェロモン情報処理からバイオロボットへ」天皇陛下御在位20年慶祝行事公開シンポジウム, 2009年11月18日, つくば国際会議場、茨城
4. 櫻井健志「種認識における性フェロモン受容体の役割」第53回日本応用動物昆虫学会, 2009年3月28-30日, 北海道大学, 北海道

〔図書〕(計2件)

1. S. Shuichi Haupt, Takeshi Sakurai, Shigehiro Namiki, Tomoki Kazawa, Ryohei Kanzaki, The Neurobiology of Olfaction Frontiers in Neuroscience (ed. Anna Menini) CRC Press, 72-112, 2009
2. 櫻井健志. 昆虫の分子生物学ーポストゲノムの昆虫研究ー(神村学, 日本典秀, 葛西真治, 竹内秀明, 畠山正統, 石橋純 編) 共立出版, 231-238, 2009

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.rcast.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

なし

(3) 連携研究者

なし