

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21688003

研究課題名（和文） 匂い物質結合蛋白質による昆虫の行動制御のメカニズム

研究課題名（英文） The biological role of odorant-binding proteins in insect behavior

研究代表者

松尾 隆嗣 (MATSUO TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70301223

研究成果の概要（和文）： 匂い物質結合蛋白質が昆虫の行動に与える影響を、分子・細胞・個体レベルで解析した。その結果、キイロショウジョウバエの匂い物質結合蛋白質 OBP57d と OBP57e が分子レベルではトリデカン酸ともっともよく結合することが分かった。これらの匂い物質結合蛋白質がトリデカン酸に対する忌避行動に関わることが確認され、匂い物質結合蛋白質の分子機能と行動への影響がリンクしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： Biological roles of odorant-binding proteins were studied at the multiple levels. At the molecular level, synthesized OBP57d and OBP57e from *Drosophila melanogaster* showed highest affinity to tridecanoic acid in the in vitro binding assay. At the behavioral level, *D. melanogaster* showed avoidance to tridecanoic acid in the oviposition-site selection assay. These results proved a link between the molecular function and the biological role of OBPs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	9,400,000	2,820,000	12,220,000

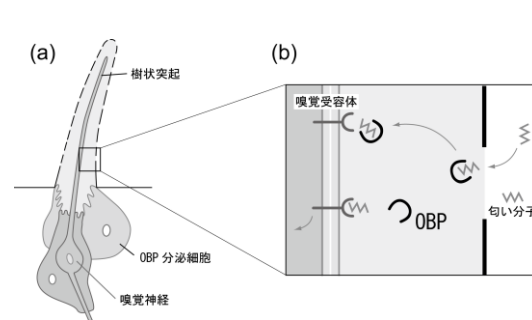
研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫分子生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 匂い物質結合蛋白質 昆虫の化学感覚毛は内部が中空になっており、細胞外に分泌された体液で満たされている。化学感覚神経の樹状突起は体液中に浮いた状態にあり、その細胞膜上の受容体は体液によって外気から遮断・保護されている。OBP は化学感覚毛内部の体液中に分泌され 10mM という高濃度で存在する。現在最も広く受け入れられている OBP の生物学的機能に関するモデルは、疎



水性が高く体液層を通過できないフェロモンや匂い分子を OBP が可溶化して受容体まで輸送する (トランスポーター) というものであるが、直接的な証明はなされていない。他にも、OBP と匂い分子の複合体が受容体を活性化する (アダプター)、匂い分子が体液中に蓄積するのを防ぐ (クエンチャー)、匂い分子を分解・除去する (スカベンジャー)、などの仮説が提唱されている。

(2) セイシェルショウジョウバエの特異な食性を決定する遺伝子、*Obp57d* と *Obp57e* セイシェルショウジョウバエはその名のとおりセイシェル諸島の一部の島にのみ生息しており、健康飲料として有名な「タヒチアン・ノニ」ジュースの原料となるヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*) の果実のみを繁殖場所としている。ヤエヤマアオキの果実は、昆虫一般に対して毒性を示すヘキサ酸とオクタン酸を高濃度で含んでおり、他のショウジョウバエは寄り付かない。反対にセイシェルショウジョウバエはヤエヤマアオキの果実を好む。セイシェルショウジョウバエはキイロショウジョウバエから見て最も近縁な種のひとつであり、不妊ではあるが両者の間に F1 世代を得ることができる。これを利用して遺伝学的解析を行い、ヘキサ酸とオクタン酸に対する嗜好性の違いに関与する遺伝子座として *Obp57d* と *Obp57e* を同定した (Matsuo et al. 2007 PLoS Biology)。

(3) *Obp57d/e* 突然変異体は産卵場所選択における嗜好性が変化している 遺伝子ターゲットングによりキイロショウジョウバエの *Obp57d* および *Obp57e* 遺伝子の突然変異体を作製し行動を解析したところ、これらの系統は味覚に基づいた産卵場所の選択において、ヘキサ酸とオクタン酸に対する嗜好性が変化していることがわかった (Harada et al. 2008 Genes & Genetic Systems)。一方で、摂食行動および嗅覚による忌避行動には違いが無かった。*Obp57d* と *Obp57e* は脚にある味覚感覚毛だけで特異的に発現していることがその理由であると考えられる。

(4) *Obp57d* および *Obp57e* 遺伝子の急速な進化 キイロショウジョウバエに続いて全ゲノム配列が決定されたウスグロショウジョウバエ (*D. pseudoobscura*) の *Obp57d/e* 遺伝子座には、一つの OBP 遺伝子しか存在しなかった。系統学的にこの 2 種間に位置する 25 種から相同なゲノム領域の DNA 配列を決定し比較したところ、この 2 つの OBP 遺伝子はもともと一つだった OBP 遺伝子の重複によって最近生じたこと、その後急速に進化して機能分化したと推測されることが分かった (Matsuo 2008 Genetics)。アミノ酸座位ごとに進化速度を比較した結果、機能分化に

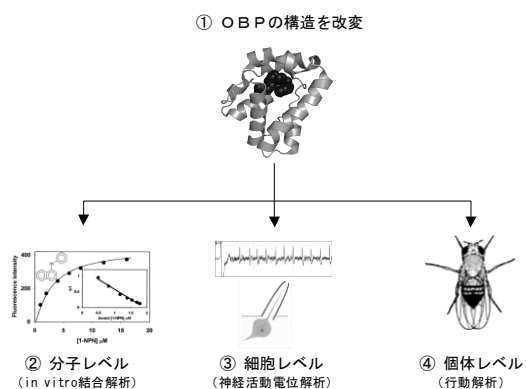
寄与しているアミノ酸が推定された。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により *Obp57d* および *Obp57e* 突然変異体の味覚嗜好性が変化していることが示されたが、なぜ OBP によって行動が変化するのか、そのメカニズムは依然として解明できていない。本研究ではこれら 2 つの OBP がヘキサ酸やオクタン酸分子とどのように相互作用し、その結果神経活動にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。本研究では、キイロショウジョウバエの OBP 突然変異体と構造改変 OBP を用いて分子・細胞・個体の 3 つのレベルから多面的に解析することにより、化学感覚受容を介した昆虫の行動制御における OBP の生物学的機能を明らかにすると共に、他の昆虫が持つ OBP をキイロショウジョウバエに導入してその機能を解析するための実験系を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、これまでに行ってきた突然変異体を用いた行動解析に加えて、神経生理学的手法と生化学的手法を取り入れ、OBP の機能について分子・細胞・個体の 3 つの階層から多面的に解析する。神経生理学的手法としては細胞外電位記録による味覚感覚神経からの活動電位解析を行い、感覚器における細胞レベルで OBP の有無が神経活動にどのような違いを引き起こしているかを明らかにする。生化学的手法としては大腸菌で合成した OBP を用いてヘキサ酸・オクタン酸およびその他の化合物との *in vitro* 結合解析を行い、OBP57d と OBP57e それぞれの結合特異性を明らかにする。



(2) 上記の 3 つの階層からなる多面的解析に、アミノ酸置換を加えた改変 OBP を組み合わせる。これまでに行った進化的解析により OBP57d と OBP57e の機能に重要であると推定されたアミノ酸のそれぞれを置き換えた改変 OBP のシリーズを作製する。突然

変異体に遺伝子導入することにより野生型 OBP を改変 OBP に置換した形質転換体が得られ、これを行動解析と神経活動電位解析に用いる。一方で同じ改変 OBP を大腸菌で合成し、*in vitro* 結合解析を行う。これらの結果を統合することにより、①OBP のどのような部位の改変が、②分子レベルでの結合特性にどのような違いを生じ、③それが神経活動にどのような影響を与え、④結果として行動にどのような変化をもたらすのか、について一貫した知見を得る。

#### 4. 研究成果

##### (1) OBP の分子レベルでの機能

大腸菌を用いて合成した組み換えタンパクの結合特性について解析を行った。キイロショウジョウバエ由来 OBP57d および OBP57e に加えて、遺伝子重複を経験しておらず祖先型遺伝子の機能を維持している可能性があるウスグロショウジョウバエ由来 OBP57de について、蛍光分光光度計を用いた *in vitro* 結合解析により各種化合物に対する親和性を測定した。この測定法は内在性の蛍光を用いるため異なる OBP 間で直接結果を比較することができない。そこで GC-MS を用いた直接的な結合解析もあわせて行い、蛍光による結合解析結果を校正する手法を考案した。これを用いて炭素数の異なる直鎖脂肪酸について結合親和性を測定したところ、3つの OBP のいずれも、炭素数13のトリデカン酸をもっともよく結合することが明らかになった。

また、進化的に保存された11のアミノ酸座位について、個々にアルギニンに置換した改変型 OBP を合成し、同様に結合活性を測定した。その結果、半数の改変型については結合特性に変化はなかった。これらのアミノ酸は OBP の機能に特段の影響は持たないと考えられる。一方、残りの半数については合成したポリペプチドを正しい形に巻き戻すことができなかつた。これらのアミノ酸は OBP が正しい立体構造をとるために必要であると考えられる。

##### (2) OBP の細胞レベルでの機能

電気生理学的な手法により OBP の化学感覚毛中での機能について解析を試みたが、分子レベル、あるいは個体レベルで活性のある物質について信頼性のある神経応答をとることができず、OBP の機能についても明らかにすることができなかった。

##### (3) OBP の個体レベルでの機能

分子レベルでの解析により結合することが明らかになったトリデカン酸について、その生物学的な意味を明らかにするため行動レベルの反応を調べた。疎水性が高いトリデカン酸を用いた産卵場所選択行動実験を行うために、培地の組成を改良して新しいアッ

セイ系を開発した。その結果、野生型のキイロショウジョウバエはトリデカン酸を忌避することが確認できた。一方、OBP57d と OBP57e の遺伝子ノックアウト系統はトリデカン酸を忌避しなくなった。Gal4/UAS システムによりそれぞれの OBP 遺伝子を復帰させると、トリデカン酸に対する忌避行動が復活した。これらの結果から、OBP の分子レベルでの結合特性と個体レベルでの行動特性が対応していることが示された。

#### 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9件)

①Matsuo T. Contribution of olfactory and gustatory sensations of octanoic acid in the oviposition behavior of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Applied Entomology and Zoology*, 47: 137-142, 2012. 査読有  
DOI:10.1007/s13355-012-0100-3

②Harada E, Nakagawa J, Asano T, Taoka M, Sorimachi H, Ito Y, Aigaki T, Matsuo T. Functional evolution of duplicated odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 7: e29710, 2012. 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0029710

③Takahashi KR, Matsuo T, Takano-Shimizu-Kouno T. Two types of cis-trans compensation in the evolution of transcriptional regulation. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 108: 15276-15281, 2011. 査読有  
DOI:10.1073/pnas.1105814108

④Mitaka H, Matsuo T, Miura N, Ishikawa Y. Identification of odorant-binding protein genes from antennal expressed sequence tags of the onion fly, *Delia antiqua*. *Molecular Biology Reports*, 38: 1787-1792, 2011. 査読有  
DOI:10.1007/s11033-010-0293-x

⑤Yasukawa J, Tomioka S, Aigaki T, Matsuo T. Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *Gene*, 467: 25-34, 2010. 査読有  
DOI:10.1016/j.gene.2010.07.006

⑥Koganezawa M, Haba D, Matsuo T, Yamamoto D. The shaping of male

courtship posture by lateralized gustatory inputs to male-specific interneurons. *Current Biology*, 20: 1-8, 2010. 査読有  
DOI:10.1016/j.cub.2009.11.038

⑦松尾隆嗣 ショウジョウバエの食性の進化と行動 昆虫と自然、45: 12-15, 2010. 査読無

⑧松尾隆嗣 ショウジョウバエの食性進化と化学感覚受容 生物科学、61: 24-31, 2009. 査読無

他 1 件

〔学会発表〕 (計 8 件)

①Matsuo T. Evolution of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2011, Nagoya, 2011.6.1.

②Matsuo T. Evolution of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. Beijing International Symposium on Cellular and Molecular Mechanisms of Chemoreception, Beijing, 2010.9.3

③Matsuo T. Genetic analysis of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*; their evolution and biological roles. Fifth Asia Pacific Conference on Chemical Ecology, Hawaii, 2009.10.28

④Matsuo T. Rapid evolution of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. Association for Chemoreception Sciences 31st annual meeting, Florida, 2009.2.24

他 4 件

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sites.google.com/site/matzoiresearch/>

## 6. 研究組織

研究代表者

松尾 隆嗣 (MATSUO TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
准教授

研究者番号：70301223