

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22688004

研究課題名(和文)性フェロモン受容体遺伝子のフェロモン受容細胞特異的発現を決定する分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms regulating specific gene expression of sex pheromone receptor genes in the silkworm

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・特任講師

研究者番号：20506761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,400,000円、(間接経費) 4,920,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カイコガ性フェロモン受容体遺伝子の特異的発現を決定する分子機構の解明を目的とした。遺伝子組換えカイコガを利用した*in vivo*プロモーター解析から、性フェロモン主成分であるボンビコールの受容体BmOR1の発現を誘導するシス領域が上流0.3kb中に存在することを示唆した。さらに、この領域内に性決定に関与する転写因子をコードするdoublesexの認識配列に高い類似性を示す塩基配列が存在することを見出した。これらの結果は、性フェロモン受容体遺伝子の転写制御の解明に向けたきわめて重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand molecular mechanisms underlying highly specific gene expression of sex pheromone receptor genes in the silkworm *Bombyx mori*. *in vivo* promoter assay of BmOR1 gene that encodes the sex pheromone receptor for the main pheromone component of the silkworm, bombykol, indicated that 0.3 kb upstream regulatory sequences of BmOR1 can appropriately induce reporter gene expression in bombykol sensitive olfactory receptor neurons in the male antennae. Analysis of this upstream region revealed the presence of a potential binding site of doublesex protein that is a transcription factor involved in sex determination in the silkworm. These results provide important information to unravel the mechanism of sex pheromone receptor gene regulation in the silkworm.

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 遺伝子 発現制御 性フェロモン受容体 カイコガ

1. 研究開始当初の背景

オス蛾はメスの放出する性フェロモンを検出すると、プログラム化されたフェロモン源定位行動を発現し、発信源であるメスのもとへたどりつく。研究代表者らはこれまで、シンプルな性フェロモン系をもつカイコガ (*Bombyx mori*) をモデルとして、オス蛾が、なぜ同種メスの性フェロモンだけに反応し、フェロモン源定位行動を発現するかについて分子レベルで明らかにしてきた。カイコガのオスは触角上に毛状感覚子と呼ばれる性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⁽¹⁾。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、性フェロモン受容細胞の応答特性は発現する受容体の特性により決められることを示した^{(2),(3)}。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は受容細胞の応答特性を決定するだけでなく、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⁽⁴⁾。すなわち、オスカイコガの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ることが示された。これらの研究から、オスの正確な同種メスの認識は、フェロモン源定位行動を引き起こす神経回路へ接続されたフェロモン受容細胞において、同種の性フェロモンを高選択的に受容する受容体遺伝子を特異的に発現する機構により可能となると仮説を立てた。

近年、キイロショウジョウバエを用いて嗅覚受容体遺伝子の発現制御機構の研究が進められている。ショウジョウバエでは遺伝子近傍の複数のシス配列に対し、さまざまな転写因子が結合し、それらの活性の組み合わせにより発現が制御されていると考えられている⁽⁵⁻⁸⁾。性フェロモン受容体は嗅覚受容体遺伝子ファミリーに属するため、基本的には類似した機構により発現が制御されていると考えられる。代表者らは、これまでに BmOR1 と BmOR3 の上流配列をプロモーターに用いた遺伝子組換えカイコガを作出し、レポーター遺伝子の発現パターンの解析から、それぞれ 3.7kb と 5kb の上流配列を用いることで受容体遺伝子の発現を忠実に再現することに成功している⁽⁴⁾。この成果を発展させ、組換えカイコガを利用したフェロモン受容体遺伝子の *in vivo* プロモーター解析とゲノム情報を利用したバイオインフォマティクス的手法によりシス配列を同定するとともに、従来の生化学的、細胞生物学的な手法によりシス配列に作用する転写因子同定を進めること

で、性フェロモン受容体遺伝子の発現制御機構を明らかにできるとの着想に至った。

(1) Kaissling KE, et al. (1978) *Naturwissenschaften* **65**: 382-385. (2) Sakurai T, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16653-8. (3) Nakagawa T, et al. (2005) *Science* **307**: 1638-42. (4) Sakurai T, et al., (2011) *PLoS Genet* **7**: e1002115. (5) Ray A, et al. (2007) *Neuron* **53**: 353-369. (6) Ray A, et al. (2008) *PLoS Biol.* **6**: 1069-1083. (7) Tichy AL, et al. (2008) *J. Neurosci.* **28**: 7121-7129. (8) Bai L, et al. (2009) *J. Neurosci.* **29**: 12940-12947.

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子組換え技術、ゲノム情報が利用できるカイコガをモデルとして、性フェロモン受容体の特異的発現を決定するシス配列の同定、シス配列への結合因子と作用機構を明らかにすることで、ガ類昆虫の性フェロモン受容体遺伝子の特異的発現機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換えカイコガの作出

in vivo プロモーター解析に用いた遺伝子組換え系統は転移因子 piggyBac を利用した方法により作出した。BmOR1 の開始コドンの上流配列 (0.3、0.5、1.0、2.0 kb)、BmOR3 の開始コドンの上流配列 (0.5、1.0、1.5kb) の下流に GAL4 遺伝子をつないだ遺伝子組換え用ベクターをそれぞれ構築した (図1)。構築したベクターを piggyBac のトランスポゼースを発現するヘルパーDNA とカイコ卵に共インジェクションし、次世代で組換え体を選抜し、GAL4 系統を得た。作出した組換え体を UAS-GFP 系統のカイコガと交配し、得られた次世代のオス個体の触角および脳における GFP 発現パターンを解析した。

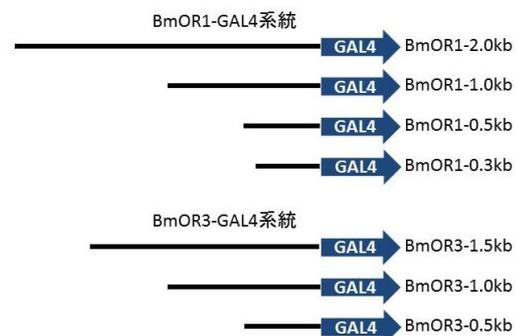


図1 BmOR1 と BmOR3 の *in vivo* プロモーター解析用ベクターの模式図 黒線がそれぞれの遺伝子の上流配列を青の矢印が GAL4 のコーディング領域とベクター配列を示す。

(2) GFP 発現パターンの解析

BmOR1、BmOR3 の発現細胞は触角葉の大系球体と呼ばれる構造の中の toroid、cumulus と呼ばれる領域にそれぞれ選択的に軸索投射をすることが明らかになっている。そこで簡便

に解析を進めるために、本研究では、GFP 発現細胞の触角葉への投射パターンを指標としてプロモーターの活性を推定した。触角葉における GFP 蛍光の有無は、成虫頭部から摘出した脳を蛍光実体顕微鏡下で調べた。また、触角葉における GFP 発現細胞の軸索投射領域は摘出後の脳を GFP 抗体および synaptotagmin 抗体で二重標識を行い、GFP 抗体を Alexa488 標識二次抗体で、synaptotagmin 抗体を Alexa546 標識二次抗体で検出することで同定した。標識後の脳をエタノール上昇系列で脱水してからサリチル酸メチル中で組織の透明化を行った。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 (Alexa488: 励起光 488nm, 505 - 550nm バンドパスフィルター、Alexa546: 励起光 543nm, 560nm ロングパスフィルター) により取得した。

(3) シス配列の探索

嗅覚受容体遺伝子のシス配列中に含まれる転写因子結合サイトは Patch プラグラム (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi>) を用いて探索した。

4. 研究成果

(1) *in vivo* プロモーター解析

カイコガの触角上には約 17,000 個のフェロモン受容細胞が存在するため、導入した上流配列のプロモーター活性を触角上で網羅的に調べるのは困難である。BmOR1、BmOR3 の発現細胞は触角葉の大系球体と呼ばれる構造の中の toroid、cumulus と呼ばれる領域に

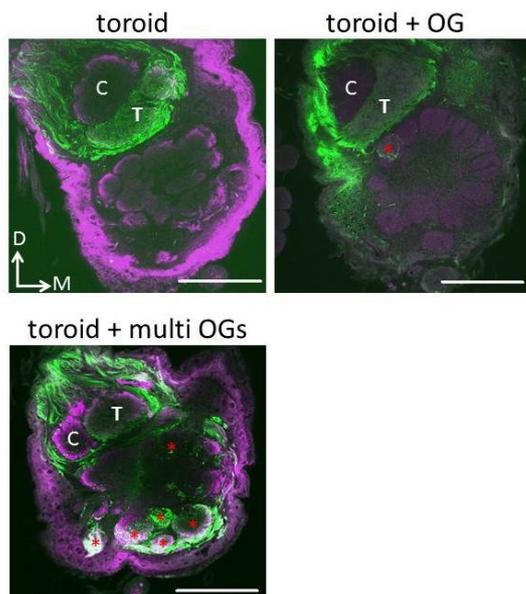


図 2 BmOR1(0.5kb)-GAL4/UAS-GFP 系統における GFP 発現細胞の軸索投射パターンの例 toroid のみ(左上)、toroid と常系球体 1 つ(右上)、toroid と多数の常系球体(左下)の 3 つのパターンが観察された。アスタリスクは GFP 陽性の系球体を示す。OG: 常系球体、C: cumulus、T: toroid、D: dorsal、M: medial。スケールバー: 100 μ m。

表 1 BmOR1-GAL4 系統の触角葉における GFP 発現パターンの個体数内訳

系統名	toroid only	toroid + 1OG	toroid + multi OG
OR1-0.3kb-#1	6	2	0
OR1-0.3kb-#2	7	0	0
OR1-0.5kb-#1	0	4	8
OR1-0.5kb-#2	2	0	2
OR1-0.5kb-#3	9	5	12
OR1-1kb-#1	4	0	2
OR1-1kb-#2	0	2	0
OR1-2kb-#1	2	0	2

それぞれ選択的に軸索を投射することが明らかになっている。そこで、本研究では、簡便に解析を進めるために、GFP 発現細胞の触角葉への投射パターンを指標としてフェロモン受容細胞におけるプロモーターとしての活性を推定した。

BmOR1 の上流配列を用いた系統のオス触角葉ではいずれの個体でも、toroid で GFP の発現が検出された。また cumulus で GFP の発現が検出された個体は観察されなかった。一方で、一部の個体では toroid に加えて、一般臭の情報処理に関与する常系球体で GFP の発現が検出され、GFP 陽性の系球体の分布パターンは大きく 3 つに大別された(図 2)。表 1 に個々の GAL4 系統における 3 パターンの個体の内訳を示す。これらの 3 パターンは上流配列 0.5-2kb をプロモーターとして用いた、いずれの場合でも観察された。さらに同一系統の個体間でも異なる分布パターンが観察されたことから、プロモーター中のシス配列やゲノム中の挿入部位以外の何らかの要因により、発現パターンが影響を受けたことが考えられる。一方で、最も短い上流配列である 0.3kb をプロモーターに利用した場合では、ほとんどの個体の触角葉で toroid だけに GFP 陽性シグナルが検出され、多数の常系球体で陽性シグナルが検出された個体 (toroid + multi OG) はなかったため、上流 0.3-0.5kb 中にさまざまな嗅覚受容体遺伝子の発現を活性化し得るシス配列が存在している可能性がある。これらの結果から、今回用いたプロモーター領域は内在の発現を完全に再現するには十分でないものの、BmOR1 の上流 0.3kb 以内にポンピコール受容細胞での発現誘導に関与するシス配列が存在することが強く示唆された。

そこで、BmOR1-0.3kb 系統のオス触角の GFP 発現細胞を確認した結果、GFP 陽性細胞はオスの触角全体で検出され、その分布パターンはポンピコール受容細胞の存在する毛状感覚子の分布と類似していることがわかった。これらの受容細胞の形態を共焦点顕微鏡下で詳細に解析したところ、フェロモン受容器である毛状感覚子内に樹状突起を伸ばしていることがわかり、GFP 発現細胞がポンピコール受容細胞であることが確認された(図 3)。

BmOR3 に関しては 0.5kb, 1.0kb, 1.5kb の上流領域をプロモーターとした GAL4 系統を作成し、同様の解析を行ったが、いずれの系統においても触角葉の cumulus における GFP

発現は観察されなかったことから、BmOR3 のポンピカル受容細胞での発現にはさらに上流領域に含まれるシス配列が必要である可能性が示唆された。

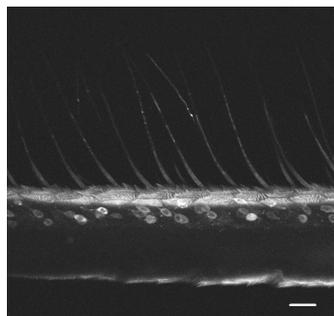


図3 BmOR1(0.3kb)-GAL4/UAS-GFP 系統のオス触角蛍光像 毛状感覚子内に樹状突起を伸ばしているフェロモン受容細胞で GFP 蛍光がみられる。スケールバー：20 μm

(2) 上流配列の解析

in vivo プロモーター解析の結果に基づき、BmOR1 上流 0.3kb に含まれる転写因子結合サイトを探索した。その結果、この領域内にカイコガの性決定に関与する転写因子をコードする doublesex の認識配列に高い類似性を示す塩基配列が存在することが見出された。そこで、doublesex タンパク質と BmOR1 上流 0.3kb 配列との結合実験を検討したが、*in vivo* プロモーター解析に当初の予定より長期間を要したため、doublesex が BmOR1 の転写制御因子の一つである実証にはいたらなかった。

本研究では、全く未知であったカイコガの性フェロモン受容体遺伝子の転写制御がわずか 0.3kb 内の上流配列で制御されていることを示し、そしてその配列中にシス配列の候補配列を推定することに成功したことから、BmOR1 の転写制御の解明に向けてきわめて重要な知見が得られたと考えられる

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 4 件)

Sakurai T*, Namiki S*, Kanzaki R (2014) Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkworm *Bombyx mori*. *Frontiers in Physiology* 5: Article 125. *equal contribution (査読有)

Tabuchi M*, Sakurai T*, Mitsuno H, Namiki S, Minegishi R, Shiotsuki T, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Haupt SS, Nakatani K, Kanzaki R (2013) Pheromone responsiveness threshold depends on temporal integration by

antennal lobe projection neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110 (38): 15455-15460. *equal contribution (査読有)

Fujii T, Fujii T, Namiki S, Abe H, Sakurai T, Ohnuma A, Kanzaki R, Katsuma S, Ishikawa Y, Shimada T (2011) Sex-linked transcription factor involved in a shift of sex-pheromone preference in the silkworm *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108: 18038-18043. (査読有)

櫻井健志, 田淵理史, 神崎亮平 (2013) カイコガにおける性フェロモンの特異的認識メカニズム. *日本味と匂学会誌* 20: 25-31. (査読無)

[学会発表](計 7 件)

櫻井健志, 光野秀文, 三上晃久, 内野恵郎, 田淵理史, Zhang Feng, 瀬筒秀樹, 神崎亮平 (2014) 性フェロモン受容体遺伝子ノックアウトカイコガの生理・行動学的解析. *第58回日本応用動物昆虫学会* (高知, 高知大学, 3月27-29日)

Sakurai T, Mitsuno H, Uchino K, Tabuchi M, Zhang F, Sezutsu H, Kanzaki R: (2013) A single sex pheromone receptor mediates physiological and behavioral responses to a sex pheromone in the silkworm *Bombyx mori*. *The 13th European Symposium for Insect Taste and Olfaction* (Villasimius, Italy, September 22-28)

櫻井健志, 光野秀文, 内野恵郎, 田淵理史, Zhang Feng, 瀬筒秀樹, 神崎亮平 (2013) 性フェロモン受容体遺伝子ノックアウトカイコガの生理・行動学的解析. *日本味と匂学会第47回大会* (仙台, 仙台市民会館, 9月5-7日)

櫻井健志, 田淵理史, 神崎亮平, “オス蛾の性フェロモン選択性と高感性の分子・神経基盤” *第46回日本味と匂学会大会* (大阪大学コンベンションセンター, 大阪, 2012年10月3-5日) (招待講演) Sakurai T, Tabuchi M, Kanzaki R (2012)

Specificity and sensitivity of sex pheromone perception in the silkworm *Bombyx mori*. *The 12th International Society of Developmental & Comparative Immunology, JADCI sponsored special symposium “Recognition Mechanisms -Current topics in comparative biology-*” (Hilton Fukuoka Seahawk, Fukuoka, Japan, July 9-13) (招待講演)

櫻井健志, 田淵理史, 神崎亮平 (2012) オス蛾の性フェロモン選択性と高感性の分子・神経基盤. *第56回日本応用動物昆虫学会大会* (奈良, 近畿大学, 3月27

日-3月29日)
櫻井健志, 光野秀文, Haupt Stephan
Shuichi, 内野恵郎, 横張文男, 小林功,
西岡孝明, 瀬筒秀樹, 田村俊樹, 神崎亮
平(2011)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大会(九州,
3月29日)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

任講師

研究者番号: 20506761

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし