

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380030

研究課題名(和文)匂い物質結合蛋白質を用いた異所発現系による昆虫の嗅覚・味覚受容体の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of odorant and gustatory receptors in insects

研究代表者

松尾 隆嗣 (MATSUO, Takashi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70301223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の嗅覚や味覚はその生態において重要な役割を担っており、昆虫の行動を理解し、これを制御する技術を開発するうえで重要なターゲットである。本研究では高速シーケンサーを利用して各種昆虫で嗅覚・味覚受容体遺伝子、および匂い物質結合タンパク質遺伝子を網羅的に同定する手法を確立した。また、非モデル昆虫において人工ヌクレアーゼを用いた嗅覚受容体ノックアウト系統の作出に成功した。これらの技術を組み合わせることによって、任意の昆虫において化学感覚にかかわる遺伝子を同定し、その機能を突然変異体を用いて解析する、リバースジェネティクスの手法が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Perception of odors and tastes plays an important role in insect ecology. Understanding chemosensory systems provides us the opportunity to understand the insect behavior and develop novel methods to control pest insects. In this study, using high-throughput DNA sequencing system, we established the method for genome wide identification of odorant- and gustatory- receptors, as well as odorant-binding proteins, in various insect species. Furthermore, we generated knock-out strains for odorant receptor genes in a non-model insect species using artificial nuclease. Combining these two methods, now it is possible to identify chemosensory genes in any insect species for functional analysis using reverse genetics.

研究分野：昆虫学

キーワード：化学感覚

1. 研究開始当初の背景

昆虫の生態において化学感覚は重要な役割を果たしている。たとえば食物の探索や選択といった局面において、化学物質は適切な食物の目印となったり、あるいは食物として不適当なものを見分ける手がかりとなったりする。また、昆虫は化学物質を用いた交信を行うことがあり、たとえば配偶相手に対する求愛に用いられる性フェロモンは、繁殖隔離や個体群動態にも深く関与している。したがって化学感覚は昆虫生態の根幹をなす重要な性質であり、昆虫の行動を理解し、これを制御する技術を開発する上で重要なターゲットである。化学感覚にかかわる生体分子には、嗅覚受容体 (Odorant Receptors)、味覚受容体 (Gustatory Receptors)、イオンチャネル型受容体 (Ionotropic Receptors)、匂い物質結合タンパク質 (Odorant-Binding Proteins) などがある。これらはいずれも対象となる化学物質に直接結合して機能を発揮すると考えられており、昆虫のゲノム中ではこれらの分子をコードする遺伝子が多数存在し、多重遺伝子属を形成している。すなわち、昆虫は多様な受容体を持つことで、複雑な環境中の化学物質を受容することを可能にしていると考えられる。したがって、それぞれの受容体がどのような機能を持つか、すなわちどのような化学物質の受容にかかわっているかを明らかにすることは、昆虫の化学感覚を明らかにしていくうえで重要な意味を持つ。

化学生態学的研究により昆虫の生態や行動に影響を及ぼす化合物については膨大な量の知見が蓄積されている。今後はそれぞれの化合物に対応する嗅覚・味覚受容体を特定することが期待される。折しも DNA シーケンサーの進歩により、どのような昆虫でも嗅覚・味覚受容体遺伝子を網羅的にクローニングすることが技術的に可能となりつつある。その中から既知の生理活性化合物に応答する受容体を特定するためには効率的な解析手法が必要になる。従来このような目的には主としてアフリカツメガエル卵細胞を用いた異所発現系により行われてきた。この方法は多大な成果を上げているものの、本来の受容体が機能する環境とは大幅に異なる環境下で試験を行っているという点で問題がある。すなわち、化学感覚にかかわる生体分子にはまだその存在や機能が知られていないものもあると考えられるが、異所発現系にはそれらの要素は含まれていない。より直接的に、生体内での受容体の機能を解析する手法の一つとして、突然変異体を用いた解析がある。解析対象の受容体遺伝子を破壊した突然変異系統を作製し、その行動や神経生理学的な性質を解析することにより、対象とする受容体の生体内での機能を明らかにすることができる。ただし、このような手法は遺伝子改変技術の確立されたモデル生物でしか用いることができず、農業害虫には適用することが困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、非モデル昆虫において嗅覚・味覚にかかわる遺伝子を網羅的に同定し、その機能を生体内で解析するための手法の確立を目的とする。このために、高速シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析、ゲノム解析を各種昆虫で行う。また化学感覚にかかわる遺伝子の突然変異体を作成し、その行動および電気生理学的性質を解析する。これらにより、非モデル昆虫においてリバースジェネティクス的手法を用いて化学感覚にかかわる遺伝子の機能解析を行うことを可能にする。

3. 研究の方法

(1) 新規受容体の探索

高速次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析およびゲノム解析を行うことにより、嗅覚受容体、味覚受容体、匂い物質結合タンパク質 (OBP) を網羅的に同定する。

(2) 突然変異体の作製

人工ヌクレアーゼ TALEN を用いたゲノム編集により、嗅覚受容体遺伝子の機能を喪失した突然変異体系統を作製する。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析手法の改良

次世代型シーケンサーを用いた RNA-seq を通常のプロトコールで行っても、昆虫の化学感覚に関連する遺伝子群の検出効率が他の遺伝子に比べて低かったため、MiSeq のロングリード性能を最大限活用できるようにライブラリー調整方法を改善した。インサートサイズが 550bp 付近になるようにライブラリーを調整し、300bp ペアエンドで塩基配列を決定、両リードの末端付近でオーバーラップさせることにより de novo アセンブルによる全長 contig 率が大幅に上がり、低発現量の遺伝子を高効率に検出できるようになった。非モデル昆虫を用いた研究ではリファレンスを利用できないため、de novo アセンブルの精度を改善する工夫により RNA-seq がより有益な新規遺伝子探索ツールとして利用できるようになった。

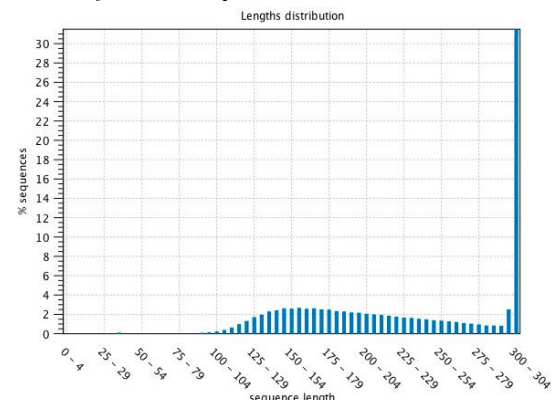


図 1: MiSeq のリードの大部分が 300bp で、短いリードの割合はわずかである。

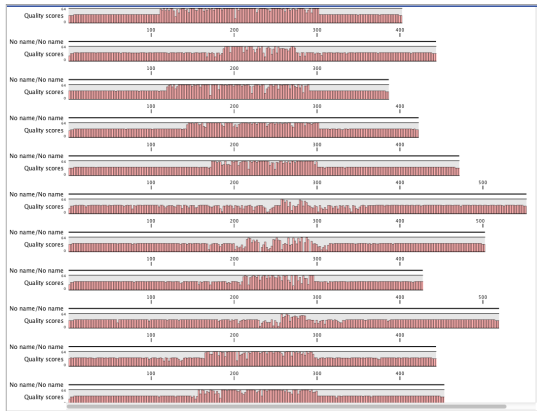


図 2: 両リードの末端付近でオーバーラップし、その部分のクオリティ値が上がっている。

(2) タマネギバエ OBP 遺伝子の網羅的探索
ロシユ 454 GS-Jr を用いてタマネギバエの触角および脚 (味覚感覚子を含む) におけるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、16 個の OBP 遺伝子を同定した。

(3) タネバエ OBP 遺伝子の網羅的探索
タマネギバエの近縁種でありながら食性が大きく異なるタネバエにおいて、同様にロシユ 454 GS-Jr を用いて触角および脚におけるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、20 個の OBP 遺伝子を同定した。その数はタマネギバエよりも多かったが、タマネギバエのデータを再解析したところ、タネバエのすべての OBP に相当する転写物が確認された。この結果、昆虫の食性の進化は OBP 遺伝子のレパートリーとは無関係であることが示唆された。

(4) アワノメイガにおける嗅覚受容体の探索

ロシユ 454 GS-Jr を用いた嗅覚受容体遺伝子の同定

研究を開始した時点では、ゲノム未知の生物において新規トランスクリプトーム解析を行う場合に有利な配列解析プラットフォームはまだ不明であった。Roche 社の 454 GS システムは総リード数は少ないながら 1 本のリードの長さは 500 ~ 1000bp に達する。一方 Illumina 社のシステムは 1 本のリード長は 50~250bp 程度ながら圧倒的なリード数を得られる。ゲノム既知の場合には Illumina 社のシステムが有効であることは示されていたが、ゲノム未知の場合には短いリードから正確な転写物の全長がアセンブルできるかどうかは不確かだった。そこでまずは 454 GS-Jr を用いた解析を行うことにした。羽化後 2 日目のオス、メスそれぞれ 100 匹から触角を集め、別個にライブラリを作成した。オス、メスそれぞれのライブラリについて 1 回ずつのランを行い、それぞれ 138,964 および 127,252 本のリードを得た。Roche 社純正のア

センブラーである Newbler と、Trinity のそれぞれでアセンブリを行い、その結果を比較した。得られたコンティグの長さは Trinity のほうが長い傾向にあり、コンティグの総数も多かった。Newbler は 454 システム特有のエラーに強く、より確実な結果を出力する傾向があった。得られたコンティグの中から PSI-blast および blastx を用いたカイコ嗅覚受容体に対する相同性検索により 29 の嗅覚受容体候補遺伝子を得た。これらについて、定量的 RT-PCR により各種組織における発現量の比較を行った。ほとんどの候補遺伝子は触角および口吻でのみ発現しており、嗅覚受容体である可能性が高いと考えられた。以上の結果から、GS-Jr による解析でも一定の成果は得られることが確認されたが、重大な問題点も存在した。まず、同定した新規嗅覚受容体のほぼ全てについて、完全長を得ることができなかった。これは、総リード数の少ない 454 GS システムでは、充分な数のリードが得られず、完全長をカバーできなかったためであると考えられる。また、同一塩基の反復に弱いというエラー特性により ORF 配列が断片化することが多かった。これを修正するためには同一部位を複数のリードでカバーすることが必要だが、上記の理由でリード数が少ないことが弱点を強調することにつながった。これらの問題は、リード長が長いというメリットよりも重大であり、本研究の目的である嗅覚受容体遺伝子の新規同定には適当でないという結論に達した。

イルミナ Miseq による化学感覚受容にかかわる遺伝子群の同定

Illumina Miseq システムを用いて解析をやり直すことにした。オス、メスそれぞれ 20 匹から触角を集め、別個にライブラリを作成した。発現量の解析において再現性を確認するため、3 回独立に反復を行った。計 6 つのライブラリーについて multiplex により 1 回のランを行い、オス、メスそれぞれから 6,167,215 および 5,852,653 本のリードを得た。Trinity を用いてアセンブルを行い、得られたコンティグから ORF 候補配列を抽出した。これらを PSI-blast と blastx を用いてカイコ嗅覚受容体との相同性によりスクリーニングし、45 の新規遺伝子を含む 52 の嗅覚受容体候補遺伝子を同定した。これらの配列に対してリードマッピングを行い、発現量を推定した。さらに定量的 RT-PCR も行い、リードマッピングの結果とよく一致することを確認した。これまでに同定されていた受容体はオスで特異的に発現しており、フェロモン受容体として機能している可能性が示唆された。一方、新規に同定された受容体のうちの 4 つがメスで高発現していた。これらの受容体は寄主植物の匂い、あるいはその存在が示唆されているオス性フェロモンの受容に関わっている可能性がある。

(5) 産卵刺激物質受容体の探索

アゲハチョウの食草に含まれる産卵刺激物質は前肢符節に存在する味覚感覚子によって識別される。アゲハチョウ類では近縁種間で産卵する食草が異なっており、それぞれの種で産卵刺激物質として機能する化合物が異なることが知られている。異なる食草選択が進化したメカニズムを明らかにするため、前肢符節で発現している味覚受容体・OBP 遺伝子群を網羅的に同定した。フェロモン受容体に比べて味覚受容体遺伝子の構造は多様性が高く、RNA-seq を中心とした新規遺伝子探索では、ひとつの遺伝子が複数の contig に分断されるなどいくつかの問題が生じ、全長配列を取得することが困難であったが、プロトコルの工夫によって問題を克服し、候補遺伝子の完全長と思われる配列を検出できた。また、ゲノム配列の解析もプロトコルの工夫によって contig サイズの改善に成功した。アゲハチョウ 2 種について、次世代型シーケンサーを用いてドラフトゲノムを構築し、RNA-seq との組み合わせにより化学感覚受容体遺伝子と匂い物質結合蛋白質遺伝子をそれぞれ数十種類発見した。

(6) 味覚感覚子の機能解析

アゲハチョウ味覚感覚子において、電圧特性の異なる 3 種類の味覚ニューロンが同時に活動することが、産卵活性に必須であることを発見した。昆虫の化学感覚のしくみを理解する上で、重要な知見であると思われる。

(7) リバースジェネティクスによるアワノメイガ嗅覚受容体の機能解析

ゲノム編集を用いた OfurOR4 および OfurOrco 遺伝子突然変異体の作製

突然変異体を用いた遺伝子機能解析はモデル生物において多大な成果を上げている。嗅覚受容体遺伝子は、その機能を失っても致死とはならないため、突然変異体を用いた機能解析に適した対象であると考えられる。そこで TALEN を用いた遺伝子破壊により、アワノメイガ嗅覚受容体遺伝子の突然変異系統の作製を行った。ターゲットとする受容体には、アワノメイガにおいてすでにその機能が明らかになっている OfurOR4 と OfurOrco を選定した。各種条件と方法を検討した結果、初期胚に TALEN RNA を微量注入することにより、OfurOR4 については 38.9%、OfurOrco については 55.0% の高い率で突然変異系統を得ることができた。

OfurOrco 突然変異体の表現型解析

OfurOrco 突然変異体はすべての嗅覚受容体の機能を失っていると期待されるため、性フェロモン成分を用いた風洞実験と触角電位の測定を行った。その結果、OfurOrco 突然変異体は行動レベルでも触角応答レベルでも性フェロモンへの反応を失っていること

が確認できた。これにより、嗅覚受容体がフェロモン受容に必要であることが直接的に示された。

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 8 件)

Hideki Nishikawa, Takuro Iijima, Rei Kajitani, Junichi Yamaguchi, Toshiya Ando, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Asao Fujiyama, Shunichi Kosugi, Hideki Hirakawa, Satoshi Tabata, Katsuhisa Ozaki, Hiroya Morimoto, Kunio Ihara, Madoka Obara, Hiroshi Hori, Takehiko Itoh, Haruhiko Fujiwara (2015) A genetic mechanism for female-limited Batesian mimicry in *Papilio* butterfly. *Nature Genetics* 査読有 47(4):405-409. DOI: 10.1038/ng.3241

Bin Yang, Katsuhisa Ozaki, Yukio Ishikawa, Takashi Matsuo (2015) Identification of Candidate Odorant Receptors in Asian Corn Borer *Ostrinia furnacalis*. *PLoS One* 査読有 10(3):e0121261. DOI:10.1371/journal.pone.0121261

Shinya Ohta, Yousuke Seto, Koichiro Tamura, Yukio Ishikawa, Takashi Matsuo (2014) Identification of odorant-binding protein genes expressed in the antennae and the legs of the onion fly, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). *Applied Entomology and Zoology* 査読有 49(1):89-95. DOI:10.1007/s13355-013-0226-y

Nagamine Keisuke, Kayukawa Takumi, Hoshizaki Sugihiko, Matsuo Takashi, Shinoda Tetsuro, Ishikawa Yukio (2014) Cloning, phylogeny, and expression analysis of the Broad-Complex gene in the longicorn beetle *Psacotha hilaris*. *SpringerPlus* 査読有 3:539. DOI: 10.1186/2193-1801-3-539

Ryuda, M., Calas-List, D., Yamada, A., Marion-Poll, F., Yoshikawa, H., Tanimura, T., Ozaki, K. (2013) Gustatory sensing mechanism coding for multiple oviposition stimulants in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Journal of Neuroscience* 査読有 33:914-924. DOI:10.1523/JNEUROSCI.1405-12.2013

Sachiko Tomioka, Toshiro Aigaki, Takashi Matsuo (2012) Conserved cis-regulatory elements of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *Genes and Genetic Systems* 査読有

87(5):323-329. DOI:10.1266/ggs.87.323

Takashi Matsuo (2012) Contribution of olfactory and gustatory sensations of octanoic acid in the oviposition behavior of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Applied Entomology and Zoology* 査読有 47(2):137-142. DOI:10.1007/s13355-012-0100-3

Eriko Harada, Jun Nakagawa, Tsunaki Asano, Masato Taoka, Hiroyuki Sorimachi, Yoshihiro Ito, Toshiro Aigaki, Takashi Matsuo (2012) Functional evolution of duplicated odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *PLoS One* 査読有 7(1):e29710. DOI:10.1371/journal.pone.0029710

〔学会発表〕(計 12 件)

尾崎克久・武藤愛・小寺正明・吉川寛 「NGS を使ったアゲハチョウの食草選択に関わる化学感覚受容体遺伝子の探索」 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会 2015 年 3 月 27 日 山形大学(山形県山形市)

尾崎克久・小寺正明・武藤愛・吉川寛 「ゲノム解読と RNA-seq によるアゲハチョウの食草選択に関わる化学感覚遺伝子候補の探索」 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

尾崎克久・小寺正明・武藤愛・吉川寛 「アゲハチョウと食草を結ぶ遺伝子の解析」 生命情報科学若手の会第 6 回研究会 2014 年 10 月 29 日 理化学研究所 CDB(兵庫県神戸市)

尾崎克久 「非モデル生物のためのシーケン斯拉イブラリー作成と de novo ゲノムアセンブル 進化学夏の学校: NGS データ解析デモンストレーション」 日本進化学会第 16 回大阪大会 2014 年 8 月 24 日 高槻現代劇場(大阪府高槻市)

Katsuhisa Ozaki, Masasuke Ryuda, Masaaki Kotera, Ai Muto, Hiroshi Yoshikawa “Evolution of gustatory sensing mechanism for host recognition in swallowtail butterflies.” 日本進化学会第 16 回大阪大会 2014 年 8 月 23 日 高槻現代劇場(大阪府高槻市)

楊斌、石川幸男、松尾隆嗣 「アワノメイガにおけるフェロモン受容体遺伝子ノックアウト系統の作製」 第 58 回日本応

用動物昆虫学会大会 2014 年 3 月 27 日 高知大学(高知県高知市)

尾崎克久・龍田勝輔・武藤愛・小寺正明・吉澤靖貴・吉川寛 「アゲハチョウ食性進化の仕組み」 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会 2014 年 3 月 27 日 高知大学(高知県高知市)

尾崎克久・龍田勝輔・吉川寛 「味覚受容体を中心とする食草選択のしくみの解明」 日本進化学会第 15 回つくば大会 筑波大学(茨城県つくば市)

楊斌、石川幸男、松尾隆嗣 「アワノメイガにおける嗅覚受容体候補遺伝子の同定」 国際化学生態学会議 2013 年 8 月 20 日メルボルン(オーストラリア)

尾崎克久 「アゲハチョウのゲノムデータベースを作るための Nextera 改善」 GS 現場の会第三回研究会 2013 年 9 月 4 日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

尾崎克久・龍田勝輔・吉川寛 「アゲハチョウの産卵刺激物質レセプターと食草認識のメカニズム」 第 8 回化学生態学研究会 2013 年 6 月 28 日 湯の川プリンスホテル渚亭(北海道函館市)

Yang Bin, Yukio Ishikawa, Takashi Matsuo “Identification of candidate odorant receptors in *Ostrinia furnacalis*”. 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会 2013 年 3 月 28 日 日本大学(神奈川県藤沢市)

〔図書〕(計 1 件)

尾崎克久 他、羊土社、「次世代シーケンズ解析スタンダード — 非モデル生物の遺伝子発現を見る RNA-Seq と de novo ゲノム」 2014、404

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.brh.co.jp/research/lab01/>

https://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/069/research_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 隆嗣 (MATSUO, Takashi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 70301223

(2) 研究分担者

尾崎 克久 (OZAKI, Katsuhisa)

株式会社生命誌研究館・研究員
研究者番号: 60396223

(3) 連携研究者

石川 幸男 (ISHIKAWA, Yukio)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号 : 6 0 1 2 5 9 8 7

田村 浩一郎 (TAMURA, Koichiro)
首都大学東京・理工学研究科・教授
研究者番号 : 0 0 2 5 4 1 4 4