

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660040

研究課題名(和文) 哺乳類の5大基本味を超越して宿主認識に機能する昆虫の味受容体

研究課題名(英文) Insect taste receptors which can detect more than 5 basic taste of mammals

研究代表者

佐藤 令一 (Ryoichi, Sato)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30235428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 宿主植物認識に貢献する味受容システムを解明する目的で、まずカイコガ幼虫の味受容細胞が発現している味受容体(BmGr)を明らかにすることとした。カイコガ幼虫上唇の上咽頭感覚子の感覚神経細胞塊を分取し、そこからレーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって1細胞を採取した。この細胞からはBmGr10を含む6種のBmGrの発現が確認され、イノシトール受容を決定づける組み合わせであると考えられた。一方、蛍光カルシウムプローブGCaMP3.0を用いる培養細胞の系とアフリカツメガエル卵母細胞の2電極電圧クランプ法の両方で、BmGr10のリガンドがイノシトールであることを世界で初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Host plant recognition-concerning taste detection system was attempted to be cleared. First, a member of taste receptors, BmGr which is expressing in a taste sensing cell of epipharyngeal sensillum in the labrum of Bombyx mori larvae was attempted to be cleared. A neural cell cluster of epipharyngeal sensillum was obtained using glass-capillary and single cell was dissected from it by laser capture microdissection (LCM). RT-PCT suggested that this cell expressed 6 kinds of BmGr including BmGr10 and they were considered to construct inositol receiving system. Ca²⁺ indicators, GCaMP co-expressing system and Xenopus oocyte expressing system connected to two-electrode voltage clamp were used to determine the ligand of BmGr10. From these, inositol was demonstrated to be a ligand of BmGr10.

研究分野：昆虫生理学，昆虫病理学

キーワード：味受容体 カイコ BmGr

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では、5大基本味なる味の存在が分かっている。また、それらのうちの甘味やうま味、塩味などが摂食行動の主要なゴーサインとなり、苦味は主にストップサインになることや、それらの味の分子レベルの受容機構さえも解明されている。一方、これらとかけ離れた動物である昆虫では、フラボノイドとその配糖体、サイクリトール類、インドールアルカロイドやその類縁体などの植物2次代謝産物が昆虫種固有の味として認識され、宿主植物の認識に利用されていることが示されてきた。すなわち、昆虫には第6、第7・・・の「種ごとに異なる味」があり、それらを受容することで単に「おいしい」と言った哺乳類型の漠たる認識をするのではなく、「これは自分が食うべき植物だ」といった絶対的な判断を伴う摂食が可能になると考えられてきた。しかし、味受容体に対する信頼できるリガンドアッセイ系が存在せず、絶対的な判断に使われる味とそれを受容する受容体候補の両方が揃って分かっている昆虫がなかったため、そのような判断を可能にする「昆虫が持つ味受容体の実態の解明」は実現していない。しかし、カイコのゲノム解析が終了し、65種の味受容体候補分子が同定され、さらには昨年、味受容体のリガンドアッセイ系の成功が2例報告され、受容体のリガンドを確かめるすべが生まれたことから、カイコを題材にしたなら宿主の絶対的な判断の仕組みが解明できる可能性が生じてきた。

2. 研究の目的

65種の候補から宿主の絶対的な判断に関わる昆虫種特異的な味受容体を同定する目的で、まず、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法(LCM)を用いて摂食促進に関わることが分かっている2種の味受容ニューロンを取り出す。次に、それらの単一細胞からRT-PCR(すなわちcDNA調製と発現遺伝子同定)を行い、それらに発現している味受容体をながめて「宿主の絶対的な判断に関わる昆虫種特異的な第6、第7・・・の味受容体の候補」とすべきかどうかを考察する。さらに、既に準備が終了している2種類の味受容体のリガンドアッセイ系を駆使して、それらの受容体のリガンドがこれまで示されて来た植物2次代謝産物であるか否か、リガンドとして受け取れる物質の正しいスペクトルはどんなか(それが真のリガンド類)を明らかにする。また、それらの受容体分子がどのように系統進化して生まれてきたか、例えば糖の受容体から生じたのかといった疑問に答えを出す。さらにまた、カイコとは全く異なる植物しか食べない他の昆虫のオルソログ分子を解析し、進化が宿主植物の異なる多様な昆虫を生み出した仕組みの解明へと進む。

3. 研究の方法

(1)レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)

専用のスライドグラス上に凍結切片あるいは採取した細胞を付着させた。Zeiss社製のPALM MicroBeamを用いて顕微鏡下で単細胞をレーザーで切り出して、マイクロチューブのふたに採集した。

(2)RT-PCRによる発現しているBmGr遺伝子の解析

組織、ガラスキャピラリーもしくはLCMで採取した細胞をlysis bufferで溶解した。ReverTra Aceで逆転写し鋳型cDNA溶液とした。各BmGr検出用のプライマーは各遺伝子上でイントロンを挟むように設計し、PCRはGo Taq Green Master Mixを用いて行った。

(3)ガラスキャピラリーを用いた上咽頭感覚子神経細胞塊の採取

カイコガ5齢幼虫の頭部を結紮した後、頭部にメチレンブルーを注射した。その後、上唇を取り外し、更にそこから内側のクチクラを取り外した。上咽頭感覚子の近傍にあり、樹状突起が上咽頭感覚子に繋がっている染色された感覚神経を、実態顕微鏡下で観察しながらアフリカツメガエル卵母細胞にcRNAを注入する際に使うガラスキャピラリーで吸引して取り出した。

(4)蛍光カルシウムプローブGCaMP3.0を用いた培養細胞によるBmGrのリガンドアッセイ

GCaMP3.0もしくはBmGrを導入した発現ベクターpcDNA3.1を混合してヒト培養細胞HEK293Tをトランスフェクションした。リガンド候補物質を反応させて蛍光顕微鏡で、反応前と後の蛍光強度の変化を比較した。

(5)アフリカツメガエル卵母細胞を用いたBmGrのリガンドアッセイ

BmGrのcRNAはPCRで増幅したcDNAを鋳型にしてmMESSAGE Mmachine T7 kitを用いて調製した。これをガラスキャピラリーでアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、3日後に2電極電圧クランプ法でリガンドアッセイを行った。

4. 研究成果

(1)カイコガ幼虫小腮粒状体で発現する味受容体BmGrの解析

まずはじめに、組織レベルでのBmGrの発現の調査をRT-PCRで行った。その結果、昆虫の最も主要な味受容器官である小腮からは、BmGr6、BmGr7、BmGr8、BmGr9、BmGr10を含む33種類のBmGrの発現が確認された。また、応答性から見て、小腮と類似した苦み受容細胞とイノシトール受容細胞があるとされる上唇からは、BmGr6、BmGr7、BmGr9、BmGr10を含む30種類のBmGrの発現が確認された。

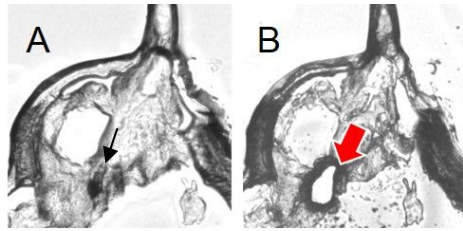


図1. 有柄感覚子のに繋がる感覚細胞のLCMによる分取. A.分取前. メチレンブルーで染色された1細胞と思われる感覚細胞が見られる. B. LCMによる分取後. 矢印の部分が切除され回収された部分.

(2)カイコガ幼虫小腮粒状体のニューロンのLCMによる分取とそれが発現する味受容体BmGrの解析

1細胞に多数のBmGrが発現してそれらの組み合わせによってリガンドの特異性が決定されているとする仮説がある.そこで、次に、小腮にある味受容細胞をLCMで単離してそこに発現しているBmGrを細胞ごとに解析することを目指した.その結果、BmGr8だけ、BmGr7だけ、BmGr7とBmGr8、BmGr7とBmGr8とBmGr10の3種、およびBmGr7とBmGr9とBmGr10の3種、の合計5パターンの糖受容体候補の発現細胞が観察された.ところで、カイコ幼虫の小腮には糖受容細胞が3種類あるとされている.しかし、これらの結果はどの細胞にどの組み合わせでBmGrが発現しているのかを予測するには不十分な結果であった.一方、これらの分取された細胞からは、これら糖受容体と思われるBmGrの他に、苦味受容体候補とされるBmGrの発現さえも同時に複数検出された.よって、これら糖受容体候補とされるBmGrの中にカイコのクワ葉摂食促進につながる受容体があるのか、それとも苦味受容体候補と言われているBmGrの中に真のクワ葉摂食促進につながる受容体があるのかの判断をするには不十分な結果となった.この様な結果は、LCMで単細胞が分取できないか、それともLCMに使われた切片がその作業に持ち込むまへの薄切作業で他の細胞のmRNAによって汚染されているために生じたと考えられた.いずれにしても、この方法では厳密な単細胞のBmGr発現解析は困難であると考えられた.

(3)上唇の上咽頭感覚子ニューロンのガラスキャピラリー(インジェクター)を用いた分取とその細胞が発現する味受容体BmGrの解析

以上で述べたように、凍結切片からLCMで、他の細胞からのmRNAの汚染なしに単細胞を採取することは困難であると考えられた.そこで、次に薄切工程を経ずにLCMを行う方法を試みた.すなわち、アフリカツメガエルの卵母細胞にRNAを注入する際に使うガラス

キャピラリーで味受容細胞を採取し、それをガラスに貼りつけたのち、単一細胞と思われる部分をLCMで採取し、RT-PCRの材料にすることとした.その結果、その細胞からはBmGr4、BmGr7、BmGr9、BmGr10、BmGr63およびBmGr67の6種のBmGrが検出された.この結果は世界で初めて味受容に関わる単一細胞で発現しているGr遺伝子を示した結果と期待された.現在このデータの再現性について検討を行っている.上咽頭感覚子にはイノシトール受容細胞があると報告されている.このBmGr発現パターンがイノシトール受容細胞のリガンド特異性を決定している可能性が考えられた.

(4) 蛍光プローブGCaMP3.0を用いた培養細胞によるBmGrのリガンド同定

発光タンパク質エクオリンを用いたリガンド同定系の成功例が報告されている.しかし、我々が行った限りではその実験の再現性は確認できなかった.そこで、エクオリンよりもカルシウムに対する親和性が高い、すなわち受容体へのリガンドの応答をより感度よく検出できる可能性がある蛍光プローブGCaMP3.0を用いた培養細胞を用いたBmGrのリガンド同定の構築を試みた.

まず、GCaMP3.0とBmGr9をHEK293T細胞に共発現させ、BmGr9の糖への反応性を検討した.その結果、リガンドであると報告されているフルクトースを添加した場合にのみ細胞の発する蛍光の強度が増加した.そこで次

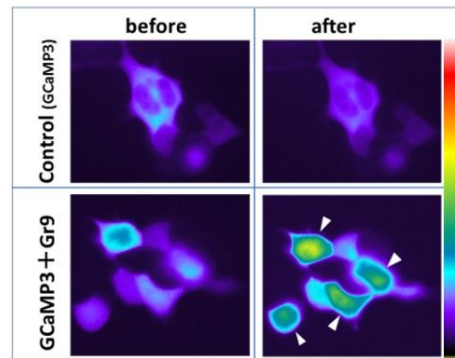


図2. 蛍光カルシウムプローブGCaMP3.0とBmGr9を共発現させたHEK293T細胞のフルクトース応答能. 左はフルクトース添加前、右はフルクトース添加後に得られた画像を示す. また、上は対象区のGCaMP3.0だけを発現する細胞、下はGCaMP3.0とBmGr9を共発現させた細胞を示す. 応答によって生じた蛍光の相対強度は右のカラーバーで表示した.

にGCaMP3.0とBmGr6、7、8もしくは10をHEK293T細胞に共発現させ、それらのBmGrの糖への反応性を検討した.BmGr6、7および8はショウジョウバエのGr64のホモログであると考えられ、それらのリガンドは糖であろうと期待された.また、BmGr10のリガンドに関してはまったく未知であった.その結果、

BmGr10 発現細胞が myo-イノシトールに
応答することが明らかになった。すなわち、
BmGr10 のリガンドが myo-イノシトール
であることが世界初めて示唆された。一方、
他の受容体の応答はまったく確認できな
かった。

(5) アフリカツメガエル卵母細胞を用いた
BmGr のリガンドアッセイ系による BmGr10
のリガンドの同定

アフリカツメガエル卵母細胞に BmGr9 を
発現させて、2 電極電圧クランプ法で応答
を電流として計測する系が既に報告されて
いる。そこで、同様の系を立ち上げて、
確かに BmGr9 がフルクトースに
応答することを確認した。次に、この系
を用いて、BmGr10 についてリガンドの
探索を行った。その結果、BmGr10 発
現卵母細胞は epi-イノシトールと myo-
イノシトールに
応答することが明らかになった。すなわ
ち、(4)の結果を含めて、BmGr10 がイ
ノシトールを受容することを異種発現系
で世界で初めて実証したと考えている。
また、この仕事展開すればやがては宿
主識別に
関与する認識システムの全貌が見えて
くるものと期待された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Dingze Mang, Chiharu Morita, Kazuya Shimomura, Natsuo Tomita, Shingo Kikuta, Ryoichi Sato. Distribution of A Gustatory Receptor Expressing Cells in the Midgut of the Silkworm, *Bombyx mori* Larvae. The 4th Asia-Pacific ConBmGress of Sericulture and Insect Biotechnology. April 23-25, 2015. Haeundae BmGrand Hotel, Busan, Korea.
2. Dingze Mang, Chiharu Morita, Kazuya Shimomura, Natsuo Tomita, Shingo Kikuta, Ryoichi Sato. Distribution of a gustatory receptor expressing cells in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* larvae. 第 37 回日本分子生物学会年回. 2014 年 11 月 26 日 パシフィコ横浜 横浜
3. 下村和哉, 佐藤令一. カイコガ味受容細胞における味受容体の発現パターン解析. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド 神戸

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤令一 (SATO RYOICHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30235428