

論文内容の要旨

論文題目

Studies on molecular mechanisms underlying sex-pheromone reception
in the silkmoth *Bombyx mori*

(カイコガにおける性フェロモン受容機構に関する研究)

氏名 仲川 喬雄

序論

嗅覚は様々な種の生物にとって、外界の化学物質を認識する重要な感覚である。特に、昆虫は食物、交尾相手、産卵場所の探索などの行動を化学受容に強く依存しており、様々な匂いの中から特定の匂いを感度よく認知する。また、昆虫は一般的な匂い物質を認識する機構とは別に非常に高い感受性と選択性を備えたフェロモン受容機構を持つ。カイコガ性フェロモン (bombykol) は 1956 年フェロモン物質として初めて構造決定された物質であり、メスカイコガフェロモン腺から空气中へと微量放出され、受容したオスカイコガに対して婚礼ダンスを引き起こす (図 1a)。混合物として活性を示す他の鱗翅目昆虫の性フェロモンと異なり、bombykol は単一化合物で種特異的かつ高感度な生理的効果を示すことから、フェロモン受容機構解明のモデルとしてこれまで多くの研究がなされてきた。

昆虫の触角には、一般的な匂いを感知する繊毛とフェロモンを感知する繊毛の 2 種類が存在し、それぞれの繊毛には 1 対の嗅神経細胞からの樹状突起が伸びている

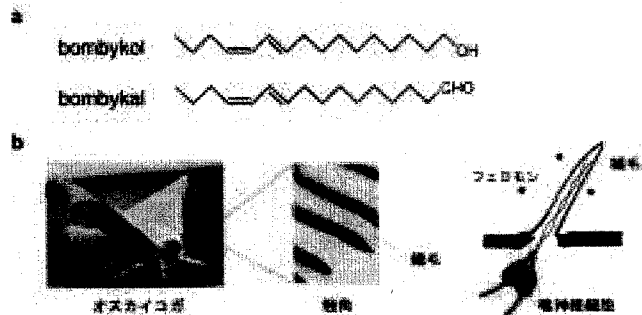


図1 カイコガの性フェロモンと触角の構造

(図1b)。これら嗅神経細胞の樹状突起上に局在している受容体によって外界からの化学物質が受容されると考えられている。

近年、ショウジョウバエのゲノム解析によって昆虫嗅覚受容体遺伝子が同定され、哺乳類嗅覚受容体と同じく G タンパク質共役型受容体ファミリー(GPCR)に属することが報告された。昆虫嗅覚受容体は、特定の匂いリガンド特異性を有し、嗅神経の応答性は発現している嗅覚受容体リガンド特異性に依存していることが示されている。このように、一般的な匂い受容機構については分子レベルでの知見が集まりつつあるが、フェロモン受容における高い感受性と選択性を生み出す分子メカニズムについては不明である。

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用し、カイコガ性フェロモン受容体候補遺伝子の機能解析を行うことを目的とした。

結果

1. アフリカツメガエル卵母細胞発現系の構築とカイコガ性フェロモン受容体の機能解析

昆虫嗅覚受容体が GPCR ファミリーに属すること、およびフェロモン刺激によってセカンドメッセンジャーが産生されるという知見から、カイコガ性フェロモン受容体も GPCR ファミリーに属すると推測された。そこで、GPCR を機能的に発現可能なアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用い、様々なシグナル経路を検出可能な系を構築した。マウス嗅覚受容体をモデルシステムとして、cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator (CFTR), $G\alpha_{15}$ を卵母細胞に共発現させることで、匂いリガンド刺激による応答を Cl 電流として検出することに成功した。

この発現系を用いて、京都大学との共同研究により同定されたオス触角特異的に発現するカイコガ性フェロモン受容体候補遺伝子 *BmOR1* (*Bombyx mori* olfactory receptor 1) の機能解析を試みた。カイコガ触角内在性 $G\alpha_q$ タンパク質である *BmG α* を共発現させることで、bombykol 刺激に対して、 Ca^{2+} 依存性 Cl チャンネルを介した電流が発生することを確認した(図2)。*BmOR1* は bombykol に対してのみ反応を示し、メスカイコガから bombykol と同時に放出される bombykal(図1a) に対しては反応を示さなかった。しかし、*BmOR1* の反応には *in vivo* で報告されているよりも高濃度の bombykol (数十 μM) が必要であり、応答率も低かった。これらの結果は、*BmOR1* が bombykol 受容体であることを示唆すると同時に、ヘテロな系で効率良くフェロモンシグナル伝達を再構成するためにはさらに何らかの因子が必要であることを示唆した。

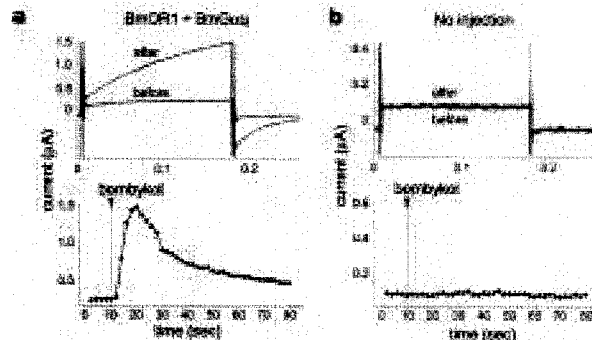


図2 *BmOR1*と*BmG α* 共発現卵母細胞のbombykolに対する応答
a, b (上段) *BmOR1*と*BmG α* 共発現卵母細胞(a)およびno injection卵母細胞(b)のbombykol(10 μM)投与前後に対する電流応答。(下段) bombykol応答電流の経時変化。

2. *Or83b* family 遺伝子 (*BmOR2*) の共発現系

哺乳類では1つの嗅神経細胞には1種類の嗅覚受容体のみを発現していることが知られている。一方、ショウジョウバエの嗅神経細胞でも1種類の嗅覚受容体遺伝子が発現していることが報告されているが、例外として *Or83b* 嗅覚受容体はほぼすべての嗅神経細胞で他の嗅覚受容体と共発現していることが知られており、さらに、他の嗅覚受容体とは異なり昆虫種間を越えて高い配列保存性を有している。このことから、*Or83b* はリガンド認識ではなく、嗅覚受容システムに不可欠な機能を担うことが示唆されていた。そこで、*Or83b* family の種間での高い配列保存性を利用し、保存配列を基に縮重プライマーを設計し、カイコガの *Or83b* orthologue である *BmOR2* をクローニングした。

次に *in situ* hybridization 法により触角嗅神経細胞での *BmOR1* との発現分布を比較した (図 3a)。

BmOR2 は多数の嗅神経細胞に発現しており、すべての *BmOR1* 発現細胞は *BmOR2* を共発現していた。この結果は、触角でのフェロモン受容においても *BmOR2* が *BmOR1* と共役して機能していることを示唆した。そこで、卵母細胞発現系において、*BmOR2* を *BmOR1* と共発現させ、*bombykol* 刺激に対する *BmOR1* 応答測定を行った。その結果、*BmOR2* の導入により卵母細胞膜画分における *BmOR1* 発現量の増加が観察され (図 3b)、*bombykol* 刺激に対して応答する卵母細胞の割合の飛躍的な増加および応答閾値濃度の減少が確認された。また、*BmGaq* 共発現で見られた Ca^{2+} - Cl^{-} 電流と異なる非選択性カチオン電流が *bombykol* 濃度依存的に検出された (図 3c)。同様に、他昆虫の *Or83b* orthologue も *bombykol* に対する応答率の上昇と膜画分における *BmOR1* 発現量の増加を引き起こすことがわかった。また、*bombykol* 刺激で生じるカチオン電流がフェロモン受容だけでなく匂い受容でも起きているのかを検証するため、匂いリガンドの同定されているショウジョウバエ嗅覚受容体 (*Or47a*) を用いてアッセイを行った。その結果、フェロモン刺激と同様に匂い刺激によっても非選択性カチオン電流が生じた。これらの結果は、*Or83b* family が昆虫の嗅覚システムにおいて、フェロモン受容および匂い受容に必須の機能を持つことを強く示唆するものである。

次に、*bombykol* 刺激によって活性化されるシグナル伝達経路を解析するために、G タンパク質阻害剤である GDPβS および4種類のイオンチャネルブロッカーの投与下において、*bombykol* 刺激に対する *BmOR1* 応答に対する影響を調べた。その結果、transient receptor potential (TRP) チャネルの阻害剤で応答の消失が確認されたが、GDPβS では応答の消失は見られなかった。この結果は、*bombykol* 刺激によるカチオン電流の発生には、G タンパク質が関与しないことを示唆するものであった。*Or83b* family は昆虫嗅覚受容体の膜移行を促進するだけでなく、リガンド刺

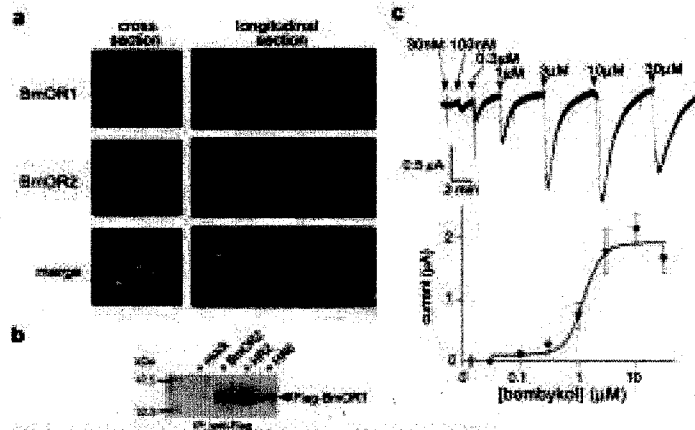


図3 *BmOR1*と*BmOR2*の共発現と*bombykol*応答

a. オスカイコガアンテナでの*BmOR1*と*BmOR2*の共発現。bar: 20 μm。b. 触角網膜画分での*BmOR1*の発現。c. *BmOR1*と*BmOR2*共発現卵母細胞の*bombykol*に対する濃度依存的応答。(上段) *bombykol*に対する電流応答。*bombykol*は指し添った濃度で10秒間ずつ投与している。(下段) 用量反応曲線。それぞれの点は電流値に対する(±s.e.m.)を示す。(n=4)

激に対して、新規シグナル伝達経路の活性化を誘導することが明らかとなった。

3. カイコガ触角でのフェロモン受容機構

カイコゲノムデータベースを用いて、新たに4つのオス特異的あるいはオスで優位に発現する嗅覚受容体を同定し、フェロモンに対する反応を検証した。4つの受容体のうち、BmOR3はbombykolに強く反応を示した。この反応はbombykol濃度依存的に起こり、BmOR1のbombykolに対する応答よりも閾値が低かった(図4a)。しかし、構造類似物質であるセチルアルコール

(C₁₆-OH) および、他の匂い物

質41種には反応を示さなかった。BmOR3のオス触角における発現を *in situ* hybridization で確かめたところ、BmOR3はBmOR2と共発現しており、BmOR1とはそれぞれ隣り合った細胞で排他的に発現していることが示された(図4b)。さらに、BmOR1, BmOR3を発現する嗅神経細胞がフェロモン受容細胞であるのかを確かめるためフェロモン結合タンパク質(PBP)との発現比較を行った。PBPのmRNAは触角のフェロモン感受性繊毛内の嗅神経細胞を取り巻く支持細胞に発現していることが知られている。その結果、BmOR1, BmOR3発現細胞は共にPBP発現細胞に囲まれるように局在していた。これらの結果は、BmOR1, BmOR3がフェロモン感受性繊毛内の二対の細胞にそれぞれ対になるように発現していることを示唆する。このことは、bombykalがオスカイコガのフェロモン感受性繊毛に内在する二対の嗅神経細胞のうち、bombykolに反応を示さない細胞を活性化するという電気生理実験の結果と一致しており、カイコガフェロモン受容システムにおいて、BmOR1がbombykol受容体として、BmOR3がbombykal受容体として機能していることを強く示唆する結果である(図4c)。

結論

本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的応答を指標にして、オス特異的に発現している嗅覚受容体がこれまで数十年間未知であった性フェロモンの受容体であることを見出した。この2種の受容体(BmOR1, BmOR3)はオスフェロモン感受性繊毛内の隣同士の嗅神経細胞に発現しており、それぞれがカイコガ性フェロモンbombykol, bombykalに反応することを明らかにした。さらに、Or83b family 遺伝子が様々な昆虫の匂い受容およびフェロモン受容に共通の機能を有し、7回膜貫通型受容体としてこれまで知られている機能以外の役割を担うことが示唆された。高感度、高選択性を備えた究極の分子認識システムといえる昆虫の性フェロモン認識機構について、受容体レベルでの知見を与えた初めての結果である。

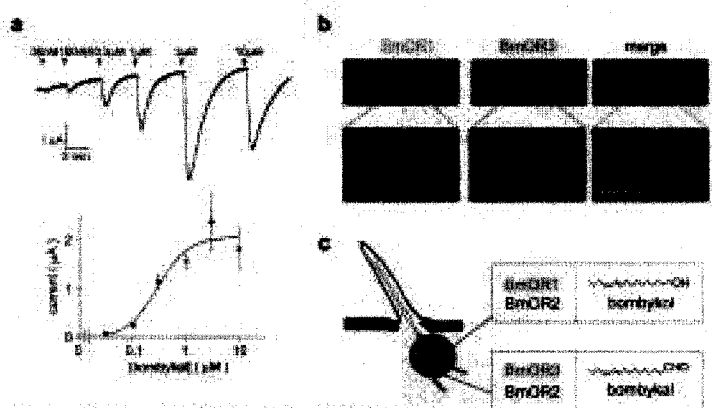


図4 BmOR3のbombykal応答と触角での局在
a. BmOR3とBmOR2共発現嗅神経細胞のbombykalに対する濃度依存的反応。(上段) bombykalに対する電流応答。bombykalは飽和濃度で10秒間ずつ取り替えている。(下段) 用量反応曲線。それぞれの点は電流値に対する(\pm s.e.m)を示す。(n=4) b. オスカイコガアンテナでのBmOR1とBmOR3の局在 bar, 20 μ m c. フェロモン感受性繊毛。BmOR1とBmOR3は隣り合う嗅神経細胞に発現し、それぞれbombykolとbombykalを受容する。