

# 論文の内容の要旨

論文題目 Studies on a molecular basis underlying pheromone reception in insects

(昆虫のフェロモン受容に関わる分子機構の解析)

氏名 中川 龍郎

昆虫において、匂いやフェロモンは触角の嗅神経細胞に発現する 7 回膜貫通型の嗅覚受容体 (Olfactory receptors; Ors) によって受容され、それぞれの嗅神経細胞は発現する Or の種類によって異なる匂い感受性および匂い選択性を示す。一般に昆虫はゲノム上に 60~340 個程度の Or 遺伝子を有している。昆虫の Or は種特異性が高いことが知られているが、例外的に全ての昆虫種間で高度に保存された Or 遺伝子が 1 つ存在し、これは Orco (Olfactory receptor co-receptor) と呼ばれる。ほとんど全ての嗅神経細胞は、1 種類の通常の Or と Orco を共発現しており、これら 2 つの受容体はヘテロ複合体を形成して樹状突起膜上で匂い・フェロモン活性化型イオンチャネルとして機能する。

昆虫の匂い・フェロモン認識機構を理解するためには、嗅覚系の末梢で機能する嗅覚受容体複合体が 1. どのような選択性で匂いやフェロモンを認識し、また 2. どのような分子機構でそれらの情報を伝達するかを明らかにすることが必要不可欠である。そこで本研究では、第 1 章でアズキノメイガの性フェロモン受容体に着目しリガンドの同定を行った。第 2 章では昆虫嗅覚受容体を介した嗅覚シグナル伝達機構を詳細に明らかにすることを目指した。

## 第 1 章 アズキノメイガ性フェロモン受容体の機能解析

### 【序論】

アワノメイガ類に属するアズキノメイガ (*Ostrinia scapulalis*) の雄は、雌から分泌される E11-14:OAc, Z11-14:OAc の混合物を性フェロモンとして認識し性行動を起こすことが知られている。また、この混合物により引き起こされた性行動は抑制性フェロモンである Z9-14:OAc により抑制される。本研究は、アズキノメイガが性フェロモンや抑制性フェロモンを認識する分子機構を明らかにすることを目指した。共同研究者によって、アズキノメイガの成虫の触角から 7 つの性フェロモン受容体候補遺伝子 (OscaOr1, 3-8)、および Orco ファミリー遺伝子 (OscaOrco) がクローニングされた (図 1A)。我々は OscaOr が実際に性フェロモン受容体であるか検証するため、アフリカツメガエル卵母細胞を用いて候補受容体の機能解析を行った。

### 【結果と考察】

#### ・性フェロモン受容体候補の機能解析

アフリカツメガエル卵母細胞に 1 つの OscaOr および OscaOrco の cRNA を注入し、アズキノメイガの触角において電気応答を引き起こす 9 種類のフェロモン物質をそれぞれ投与して応答性を電気生理学的に検証した。その結果、アズキノメイガの性フェロモンである E11-14:OAc と Z11-14:OAc に対して OscaOr3, OscaOr4 が強く応答した (図 1B)。興味深いことに、OscaOr3, OscaOr4 はアズキノメイガの抑制性フェロモンである Z9-14:OAc にも応答したが、Z9-14:OAc に特異的な受容体は見出されなかった (図 1B)。

## ・抑制性フェロモン Z9-14:OAc の作用機構の解析

Z9-14:OAc に特異的な OscaOr が存在せず、さらに性フェロモンと同じ2つの受容体 OscaOr3 と OscaOr4 によって受容されるという結果は、Z9-14:OAc が抑制性フェロモンとして機能する理由を十分に説明することができない。ここで、Z9-14:OAc は OscaOr4 に対しては極めて弱いアゴニストとして作用することに着目し、Z9-14:OAc は性フェロモン物質の存在下ではアンタゴニストとしての作用を持つ可能性を推定した。この可能性を検証するため、OscaOr4 と OscaOrco を卵母細胞に共発現させ、E11-14:OAc と Z9-14:OAc を混合して投与した。その結果、E11-14:OAc に対する電気応答は混合する Z9-14:OAc の濃度依存的に抑制された (図 1C)。

以上、本研究の結果から、アズキノメイガの性フェロモン (E11-14:OAc、Z11-14:OAc) に応答する受容体は OscaOr3 および OscaOr4 であることが明らかになった。また、抑制性フェロモンである Z9-14:OAc は、OscaOr3 のアゴニスト、OscaOr4 のアンタゴニストであることが示唆され、また Z9-14:OAc に特異的に応答する受容体は見出されなかった。これらの結果から、Z9-14:OAc は OscaOr4 発現嗅神経細胞の性フェロモン応答を抑制することにより、アズキノメイガの性行動の抑制を引き起こしているというモデルが推定される。

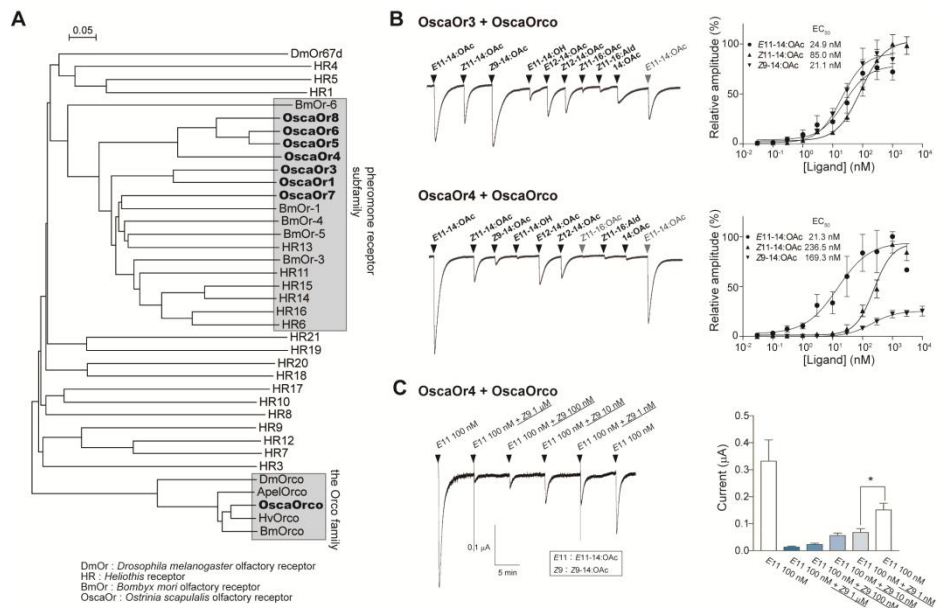


図 1 アズキノメイガ性フェロモン候補受容体の機能解析

(A) 昆虫フェロモン受容体および Orco 受容体の系統樹。(B) (左) OscaOr3+OscaOrco、OscaOr4+OscaOrco 発現卵母細胞の代表的な応答波形。各フェロモン物質は 10  $\mu$ M で投与した。(右) E11-14:OAc、Z11-14:OAc、Z9-14:OAc に対する OscaOr3、OscaOr4 の用量-作用曲線。(C) OscaOr4+OscaOrco 発現卵母細胞に E11-14:OAc および Z9-14:OAc を混合して投与した応答波形 (左) および応答値のまとめ (右)。性フェロモン応答は抑制性フェロモンの濃度依存的に抑制された。\* $p < 0.05$ , Mann-Whitney's U-test,  $n = 4$ 。

## 第 2 章 昆虫嗅覚受容体複合体を介した嗅覚シグナル伝達機構の解析

### 【序論】

近年我々は、複合体はそれ自身が匂いやフェロモンによって直接活性化される非選択性陽イオンチャネルであることを明らかにした (Sato et al. Nature. 2008, Wicher et al. Nature. 2008)。しかし、複合体がどのような分子機構によって匂い活性化型チャネルとして機能するかは未だに不明である。具体的には、以下の2つの点が現在議論的となっている。1 つめは、複合体の活性化に環状ヌクレオチドが関与するかという点である。2 つめは、複合体のイオン透過に関わる分子機構についてである。そこで本研究ではこれら 2 つの疑問点を解消し、昆虫嗅覚受容体を介した嗅覚シグナル伝達機構についての議論に決着をつけることを目指した。

### 【結果と考察】

#### 2-1. 昆虫嗅覚受容体の匂い応答における環状ヌクレオチドの役割の解明

##### ・環状ヌクレオチドは昆虫嗅覚受容体複合体に対して細胞外側から作用する

環状ヌクレオチドは細胞内セカンドメッセンジャーとして機能すると予想されていたため、これまで昆虫嗅覚受容体の環状ヌクレオチド感受性は細胞外から膜透過型の環状ヌクレオチドアナログを投与することにより検証されてきた。しかしこれらの報告は、環状ヌクレオチドが細胞外から作用する可能性も示唆

している。環状ヌクレオチドの作用部位を検証するため、昆虫嗅覚受容体複合体を発現させた卵母細胞に対して膜非透過型（通常）の環状ヌクレオチド（cGMP, cAMP）を細胞外から投与した。その結果、カイコガ性フェロモン受容体 BmOr-1 とカイコガ Orco 受容体 BmOrco を共発現させた細胞は cGMP, cAMP に対して感受性を示した。応答の大きさは、ボンビコールに対する応答と比較して 10~20%程度であった。この結果は、BmOr-1-BmOrco 複合体に対して環状ヌクレオチドが細胞外側から作用することを示唆する。

### ・環状ヌクレオチドは BmOr-1 側のサブユニットに作用する

次に、環状ヌクレオチドが BmOr-1-BmOrco 複合体を構成するサブユニットのうち、BmOr-1、BmOrco のどちらに結合するか検証した。いくつかの通常の Or（BmOr-1, Or47a, AgOr2）および Orco ファミリー受容体（BmOrco, Orco, AgOrco）を様々な組み合わせで卵母細胞に発現させ、環状ヌクレオチドに対する感受性の有無を検証した。その結果、環状ヌクレオチド感受性は通常の Or 側のサブユニットに依存していることが示唆された。

### ・環状ヌクレオチドは BmOr-1-BmOrco のボンビコール応答を抑制する

成虫のカイコガにおいて、触角の嗅感覚子内腔を満たしているリンパ液中に膜透過型の cGMP (db-cGMP) を投与すると、ボンビコールに対する電気応答が抑制される

（Redkozubov, Chem Senses, 2000）。この報告に基づき、環状ヌクレオチドが細胞外側から BmOr-1-BmOrco 複合体のフェロモン応答を抑制するという仮説を立てた。仮説を検証するため、BmOr-1-BmOrco 複合体を発現させた卵母細胞に対してボンビコールと cGMP または cAMP を混合して投与した。その結果、cGMP、cAMP の存在下では BmOr-1-BmOrco 発現卵母細胞のボンビコール応答が有意に抑制された（図 2）。

以上の結果から、環状ヌクレオチドは BmOr-1-BmOrco 複合体のボンビコール応答を細胞外側から抑制する作用を持ち、すなわち複合体のフェロモン応答において細胞内セカンドメッセンジャー以外の役割を担う可能性が示唆された。

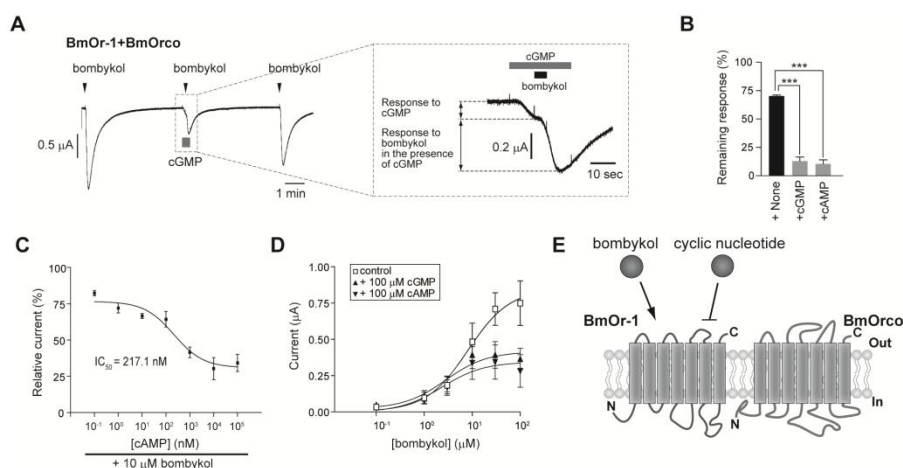


図 2 環状ヌクレオチドは BmOr-1-BmOrco 複合体のボンビコール応答を非競動的に抑制する (A) BmOr-1+BmOrco 発現卵母細胞の代表的な応答波形。矢尻および長方形はそれぞれ 1 μM ボンビコールおよび 100 μM cGMP の投与を示す。破線内は cGMP によるボンビコール応答の抑制を示す。(B) 環状ヌクレオチドによるボンビコール応答の抑制のまとめ。\*\*\*p<0.001, unpaired Student's t-test, n=3-4. (C) cAMP によるボンビコール応答の濃度依存的な抑制。(D) 環状ヌクレオチド存在下、非存在下でのボンビコール応答の用量-作用曲線。(E) 環状ヌクレオチドによる BmOr-1-BmOrco の抑制を示すモデル図。

## 2.2. 昆虫嗅覚受容体のイオンチャネル活性に関わるアミノ酸部位の同定

### ・BmOr-1 および BmOrco の部位特異的変異体のイオン透過能の解析

一般に陽イオンチャネルでは Glu、Asp、Tyr がポアを形成しイオンの選択的な透過に関わる。そこで、BmOr-1 および BmOrco のアミノ酸配列のうちそれぞれ昆虫フェロモン受容体ファミリー、Orco ファミリーの中で保存性が高い Glu、Asp、Tyr を探索した。その結果、BmOr-1 の 29 ヶ所、BmOrco の 54 ヶ所のアミノ酸部位が見出された。これらの計 83 ヶ所のアミノ酸部位をポアを形成するアミノ酸の候補とし、それぞれの部位の点変異体を作製してアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、変異による BmOr-1-BmOrco 複合体のイオン透過能への影響を電気生理学的に解析した。その結果、BmOr-1、BmOrco の複数の点変異体（合計 13 ヶ所）において野生型と異なる電流-電圧関係が測定された。

### ・BmOr-1-BmOrco 複合体の K<sup>+</sup>のイオン選択性に関わるアミノ酸部位の同定

次に、野生型と異なる電流-電圧関係を示した 13 種類の点変異体において、イオン選択性が変化しているかをイオン組成交換実験により検証した。その結果、BmOr-1 の C 末端側の領域の 2 ヶ所 (D299, E356)、

BmOrco の C 末端側の領域の 1 ヶ所 (Y464) のアミノ酸部位の点変異体は野生体と有意に異なるイオン選択性 ( $P_K/P_{Na}$ ) を示した (図 3A,B,C)。この結果からこれら 3 ヶ所のアミノ酸部位は複合体のポア構造に寄与するアミノ酸である可能性があると考えられた。

本研究の結果は、昆虫嗅覚受容体複合体のポア構造は通常の Or と Orco の両方のサブユニットにより形成されていることを示唆する。

### 【結語】

本研究では、新規のリガンド活性化型イオンチャネルである昆虫嗅覚受容体複合体が、匂いに対して応答する際の分子基盤を詳細に解析した。本研究により、昆虫嗅覚受容体複合体には環状ヌクレオチドや抑制性フェロモン物質による活性の調節機構が存在する可能性が示唆された。また、昆虫嗅覚受容体複合体がイオンを透過させる機構には複合体を構成する 2 種類のサブユニットの複数のアミノ酸が関わる可能性が示唆された。

本研究は、昆虫が匂いやフェロモンを認識する分子基盤の全貌を解明する上で重要な知見を提供するものであり、特に、昆虫嗅覚シグナル伝達機構に関する議論に決着をつけた点で意義深いものである。

### 【発表論文】

1. Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, **Nakagawa T**, Vosshall LB, Touhara K. (2008). "Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels." *Nature* 452(7190): 1002-6.
2. Miura N, **Nakagawa T**, Tatsuki S, Touhara K, Ishikawa Y. (2009). "A male-specific odorant receptor conserved through the evolution of sex pheromones in *Ostrinia* moth species." *Int J Biol Sci* 5(4): 319-30.
3. Tanaka K, Uda Y, Ono Y, **Nakagawa T**, Suwa M, Yamaoka R, Touhara K. (2009). "Highly selective tuning of a silkworm olfactory receptor to a key mulberry leaf volatile." *Curr Biol* 19(11): 881-90.
4. Miura N, **Nakagawa T**, Touhara K, Ishikawa Y. (2010). "Broadly and narrowly tuned odorant receptors are involved in female sex pheromone reception in *Ostrinia* moths." *Insect Biochem Mol Biol* 40(1): 64-73.
5. Iwabu M, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Sato K, **Nakagawa T**, Funata M, Yamaguchi M, Namiki S, Nakayama R, Tabata M, Ogata H, Kubota N, Takamoto I, Hayashi YK, Yamauchi N, Waki H, Fukayama M, Nishino I, Tokuyama K, Ueki K, Oike Y, Ishii S, Hirose K, Shimizu T, Touhara K, Kadowaki T. (2010). "Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1." *Nature* 464(7293): 1313-9.
6. **Nakagawa T**, Pellegrino M, Sato K, Vosshall LB, Touhara K. "Amino acid residues contributing to function of the heteromeric insect olfactory receptor complex." *PLoS ONE* 7(3): e32372

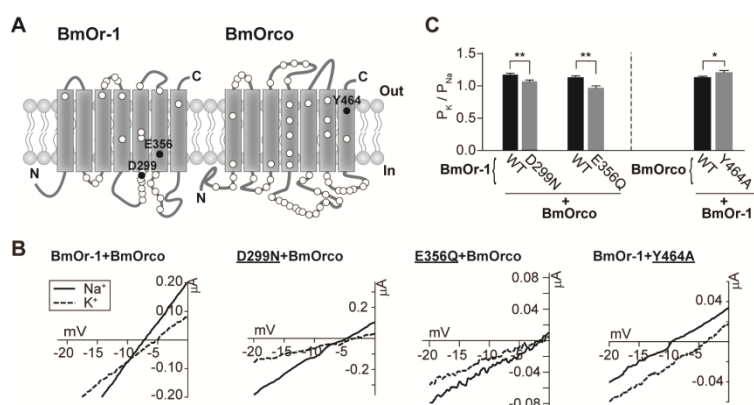


図3 BmOr-1 D299N, E356Q および BmOrco Y464A の点変異によるイオン選択性への影響 (A) 変異導入部位の模式図。(B) Na<sup>+</sup> 溶液 (実線)、K<sup>+</sup> 溶液 (破線) における野生体および各変異体の電流-電圧関係。(C) 各変異体のイオン透過率比 ( $P_K/P_{Na}$ ) のまとめ。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs WT, unpaired Student's t-test (n=5-8)