

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成24年度博士課程入学

氏名 楊 斌

指導教員 松尾 隆嗣

論文題目

アワノメイガにおける嗅覚受容体遺伝子の同定と突然変異体の作製

(Identification and targeted mutagenesis of odorant receptor genes in *Ostrinia furnacalis*)

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、害虫制御の観点からもさらなる研究の進展が求められている。

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。

これまで、化学感覚にかかわる受容体の機能解析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。

アワノメイガ *Ostrinia furnacalis* (チョウ目：ツトガ科) は広くアジア地域においてトウモロコシをはじめとした多くの農作物に被害を与えている重要害虫である。近縁のヨーロッパアワノメイガ *O. nubilalis* やアズキノメイガ *O. scapularis* とは異なる性フェロモン組成を持つことから、フェロモン交信系の進化に関する研究対象としても注目を集めている。アワノメイガの性フェロモンはほぼ同濃度の2つの成分(E)-12-および(Z)-12-tetradecenyl acetate から構成されている。これまでに9つの嗅覚受容体遺伝子がフェロモン受容体の候補としてクローニングされており、このうちの1つ *OfurOR4* についてはフェロモン受容体活性を持つことが異所発現系を用いた解析により確認されている。一方で、寄主植物の匂いに対応した嗅覚受容体については全く分かっていない。一般に昆虫のゲノム中には数十の嗅覚受容体遺伝子が存在することが普通であり、アワノメイガにも未同定の嗅覚受容体が多数存在するものと思われる。

本研究では、アワノメイガの嗅覚受容体を対象に、非モデル生物においても適用可能な解析手法を確立することを目的とした。これは大別して2つの部分から構成される。まず、触角由来のトランスクリプトーム解析により、嗅覚受容体遺伝子を網羅的に同定した(第1章、第2章)。続いて、TALENを用いたゲノム編集により嗅覚受容体遺伝子の突然変異体を作成し(第3章)、その行動と電気生理学的な性質を性フェロモンへの応答の観点から解析した(第4章)。

1. ロシュ 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454GSシ

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実だった。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、十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。

2. イルミナ Mi seq による化学感覚受容にかかわる遺伝子群の同定

第1章での結果を受けて、Illumina Mi seq 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。

3. 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 75.0%、*OfurOrco* については 62.9% の高い率で突然変異系統を得ることができた。

4. *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。

以上、本研究は非モデル生物であるアワノメイガにおいて、網羅的に嗅覚受容体遺伝子を同定し、またその突然変異体を作成することができることを示した。本研究で用いた手法は他の重要害虫にも適用することが可能であり、したがって本研究の成果は、害虫における化学感覚受容の分子機構解明に技術的な面から大きく貢献するものと考えられる。