

審査の結果の要旨

氏名 楊 斌

昆虫の生態において化学感覚は重要な役割を果たしており、害虫制御の観点からも、昆虫の化学感覚受容のメカニズムについて、さらなる研究の進展が求められている。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識別している。ターゲットとなる害虫種において、ゲノム中に存在するすべての嗅覚受容体遺伝子を同定し、それぞれが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ができれば、その害虫種の化学感覚の全容を分子レベルで理解することが可能になる。本研究は、重要害虫であるアワノメイガを材料に、非モデル昆虫においても適用可能な、嗅覚受容体遺伝子の網羅的同定と機能解析のための新たな解析手法を確立することを目的として実施された。

1. ロシュ 454 GS-Jr を用いた嗅覚受容体遺伝子の同定

申請者はまず、触角由来のトランスクリプトーム解析による嗅覚受容体遺伝子の網羅的同定を行った。配列解析プラットフォームとして、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、Roche社の454 GSシステムがゲノム未知種における*de novo*解析には有利であると考え、GS-Jrを用いた解析を行った。その結果、29の嗅覚受容体候補遺伝子を発見したが、それらの多くについて完全長配列を得ることができなかった。これは、454 GSシステムでは総リード数が不十分だったこと、および同一塩基の反復に弱いというエラー特性のためであると考えられたため、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結論した。

2. 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

より正確で高いスループットを持つIllumina MiSeqシステムを用いて同様の解析がやり直された。オス、メスそれぞれから6,167,215および5,852,653本のリードを取得し、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。その結果、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示された。

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逆遺伝学的手法による機能解析に適した対象であると考えられる。しかしながらこのような手法はこれまで主としてモデル生物で行われており、農業害虫における有効性は未知の部分が多かった。そこで申請者は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試みた。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に成功した。これは、農業害虫において嗅覚受容体遺伝子をターゲットに突然変異体を作成した最初の研究例となった。

4. *OfurOrco* 突然変異体の表現型解析

OfurOrco はすべての嗅覚受容体の機能に必要なサブユニットである。そのため、*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。風洞実験と触角電位の測定により性フェロモン成分への応答を調べた結果、予想通り *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された。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 *in vivo* で直接的に示された。

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。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。

