

博士論文

昆虫嗅覚受容体応答特性解析に基づいた
行動制御剤の探索と
嗅覚受容体応答特性の
ハイスループット解析法の開発

岩松 琢磨

論文要約

害虫の防除方法として最も有効である化学的防除に用いられる殺虫剤は環境への負荷や害虫の薬剤耐性の取得などの問題があることから、殺虫剤に代わる行動制御剤の開発が求められており、その手法のひとつとして植物精油成分からの行動制御剤の探索が行われている。また、昆虫の匂い検出に関わる嗅覚受容体の匂い物質に対する応答特性情報からの昆虫に嗅覚行動を解発する匂い物質の探索は行動制御剤の開発に有効な手法であるが、これまでにその手法により行動制御剤の候補となる匂い物質を同定した例は報告されていない。本研究では衛生害虫の一種であるコロモジラミを対象として、従来の植物精油からの忌避剤の探索および昆虫嗅覚受容体応答特性情報を基にした行動制御剤の探索に取り組んだ。まず、植物精油からの忌避剤の探索として、クローブ精油の主要成分である *eugenol* がコロモジラミに対して忌避効果を有すること、*eugenol* と β -*caryophyllene* の合成混合臭がコロモジラミに対して効果的な忌避剤と成り得ることを明らかにした。次に昆虫嗅覚受容体応答特性情報を基にした行動制御剤の探索として、コロモジラミの嗅覚受容体の応答特性解析を達成し、その応答特性情報から選択した 3,4-dimethylbenzaldehyde や (+)-fenchone, dodecanal などの匂い物質がコロモジラミ生体に忌避あるいは誘引の嗅覚行動

を解発する行動制御剤候補物質であることを明らかにした。さらに昆虫嗅覚受容体応答特性情報を基にした行動制御剤の探索を促進する手法である Sf21 安定細胞系統を用いた蛍光プレートリーダーによる嗅覚受容体の応答特性のハイスループット解析手法を確立し、この手法を用いることで嗅覚受容体が応答する匂い物質の効率的なスクリーニングが可能であることを示した。

本論文では従来の植物精油からの探索方法と昆虫の嗅覚受容体の応答特性情報に基づいた行動制御剤の探索方法の二つを用いて、コロモジラミに対する効果的な行動制御剤候補の匂い物質を同定し、新たな昆虫の行動制御剤の探索方法を提案した。本論文で同定した匂い物質はコロモジラミの行動制御剤への利用可能性が期待される。さらに本論文で提案した手法を活用することで、害虫防除剤のこれまでよりも効率的な開発が可能になることも期待される。

略号注釈

AgOR: *Anopheles gambiae* Olfactory Receptor ハマダラカ嗅覚受容体.

AlOR: *Apolygus lucorum* Olfactory Receptor コアオカスミカメ嗅覚受容体.

BAL: Bombykal ボンビカール.

BmOR2: *Bombyx mori* Olfactory Receptor カイコガ嗅覚受容体(共役受容体).

BmOR3: *Bombyx mori* Olfactory Receptor カイコガ嗅覚受容体.

ClOR: *Cimex lectularius* Olfactory Receptor トコジラミ嗅覚受容体.

CquiOR: *Culex quinquefasciatus* Olfactory Receptor ネットアイエカ嗅覚受容体.

cVA: cis-Vaccenyl Acetate シス-バクセニルアセテート.

IPM: Integrated Pest Management 総合的病害虫管理.

DDT: Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane ジクロロジフェニルトリクロロエタン.

DEET: N,N-diethyl-m-toluamide N,N-ジエチル-m-トルアミド.

DMSO: Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド.

DOR: *Drosophila melanogaster* Olfactory Receptor キイロショウジョウバエ嗅覚受容体.

F: Fluorescence intensity 蛍光強度.

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry ガスクロマトグラフ質量

分析計.

GCaMP: GFP-based Ca calmodulin probe カルシウム感受性蛍光タンパク質,
本論文ではその一種である GCaMP3 および GCaMP6s を使用.

GPCR: G protein-coupled receptor G タンパク質共役受容体.

GR: Gustatory Receptor 味覚受容体.

IR: Ionotropic receptor イオノトロピック型化学感覚受容体.

NIID: National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所.

OBP: Odorant Binding Protein 匂い結合タンパク質.

OR: Olfactory Receptor 嗅覚受容体.

Orco: Olfactory receptor co-receptor 嗅覚受容体共役受容体.

ORN: Olfactory Receptor Neuron 嗅覚受容ニューロン.

PAGE: polyacrylamide gel ポリアクリルアミドゲル.

PBP: Pheromone Binding Protein フェロモン結合タンパク質.

PhOR: *Pediculus humanus corporis* Olfactory Receptor コロモジラミ嗅覚受
容体.

PhOrco: *Pediculus humanus corporis* Olfactory receptor co-receptor コロモ
ジラミ嗅覚受容体共役受容体.

PVDF: polyvinylidene difluoride ポリフッ化ビニリデン.

PxOR: *Plutella xylostella* Olfactory receptor コナガ嗅覚受容体.

RpOR: *Rhodnius prolixus* Olfactory receptor オオサシガメ嗅覚受容体.

Rt: Retention time 保持時間.

SDS: sodium dodecyl sulfate ラウリル硫酸ナトリウム.

SF: Staying Frequency to odorant 匂い物質に対する滞在頻度.

目次

論文要約	2
略号注釈	4
目次.....	7
図目次.....	11
表目次.....	13
第 1 章 序論	14
1.1 本研究の背景.....	14
1.1.1 害虫防除方法とその課題.....	14
1.1.2 昆虫の嗅覚機能	17
1.1.3 昆虫嗅覚受容体の機能解析法.....	19
1.2 本論文の目的.....	20
第 2 章 自然由来原料(植物精油)からの行動制御剤の探索	21
2.1 緒言	21
2.2 材料と方法	25
2.2.1 供試昆虫	25
2.2.2 植物精油と匂い物質	25
2.2.3 匂い物質に対する行動試験および画像解析による行動解析法	25
2.2.4 ガスクロマトグラフ質量分析計による成分分析	29
2.3 結果.....	30

2.3.1	クローブ精油を用いたコロモジラミの行動解析法の開発.....	30
2.3.2	ガスクロマトグラフ質量分析計による成分分析	32
2.3.3	クローブ精油の主要成分の各匂い物質に対する行動解析.....	34
2.3.4	eugenol と類似構造の匂い物質に対する行動解析	34
2.3.5	クローブ精油主要成分の混合効果	37
2.4	考察.....	38
2.4.1	匂い物質に対するコロモジラミの行動解析.....	38
2.4.2	クローブ精油の GC-MS 分析.....	39
2.4.3	コロモジラミに対する eugenol の忌避効果	39
第 3 章	嗅覚受容体の応答特性情報を基にした行動制御剤の探索	43
3.1	緒言	43
3.2	材料と方法	45
3.2.1	供試昆虫	45
3.2.2	cDNA 合成と嗅覚受容体候補遺伝子の単離.....	45
3.2.3	RT-PCR による組織での発現確認	46
3.2.4	アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による機能解析...	46
3.2.5	アフリカツメガエル卵母細胞における嗅覚受容体の発現確認	49
3.2.6	匂い物質に対する行動試験および画像解析による行動解析法	52
3.3	結果.....	53
3.3.1	嗅覚受容体候補遺伝子の単離.....	53
3.3.2	RT-PCR による嗅覚受容体候補遺伝子の発現解析.....	54
3.3.3	アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による PhOR の機能 解析	54

3.3.4	PhOR2 が応答を示す匂い物質に対するコロモジラミ生体の行動解析	80
3.3.5	PhOR3 が応答を示す匂い物質に対するコロモジラミ生体の行動解析	83
3.3.6	コロモジラミにおける PhOR の応答値と匂い物質に対する行動の関連性	86
3.4	考察	90
3.4.1	コロモジラミ生体における嗅覚受容体の発現様式	90
3.4.2	PhOR の応答特性解析	92
3.4.3	匂い物質に対するコロモジラミの行動解析	97
 第 4 章 嗅覚受容体応答特性のハイスループット解析法の開発 ...		102
4.1	緒言	102
4.2	材料と方法	107
4.2.1	培養細胞系統と 96 ウェルアッセイプレートの調整	107
4.2.2	匂い物質と試薬プレートの調整	107
4.2.3	蛍光プレートリーダーを用いた細胞系統の蛍光強度時間変化の測定	107
4.2.4	蛍光強度時間変化からの匂い物質に対する変化値の算出	110
4.2.5	安定細胞系統間における匂い物質に対する変化値の比較	110
4.3	結果	111
4.3.1	蛍光プレートリーダーを用いた安定細胞系統における蛍光強度時間変化の測定 条件の設定	111
4.3.2	蛍光強度時間変化からの匂い物質に対する変化値の算出方法の設定	113
4.3.4	DOR56a 系統における匂い物質に対する濃度依存応答と選択性	126
4.4	考察	129
4.4.1	蛍光プレートリーダーを用いた応答測定の条件設定	129
4.4.2	昆虫嗅覚受容体応答特性解析への利用	130

第 5 章 総括	134
謝辞	138
引用文献	139
業績	156

目次

第1章 序論

図 1- 1. 総合的害虫管理による害虫駆除方法.	15
--------------------------------	----

第2章 自然由来成分(植物精油)からの行動制御剤の探索

図 2- 1. コロモジラミ(NIID 系統).	26
図 2- 2. コロモジラミの匂い物質に対する行動解析法.	27
図 2- 3. アセトンおよびクローブ精油に対する行動解析.	31
図 2- 4. クローブ精油の GC-MS 分析.	33
図 2- 5. クローブ精油およびその主要成分の忌避効果.	35

第3章 嗅覚受容体の応答特性情報を基にした行動制御剤の探索

図 3- 1. 近隣接合法による分子系統樹.	55
図 3- 2. RT-PCR による発現解析.	57
図 3- 3. 匂い物質に対する応答測定手順.	59
図 3- 4. PhOR2 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極 膜電位固定法による応答測定.	62
図 3- 5. PhOR2 の匂い物質に対する応答特性.	64
図 3- 6. PhOR2 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質に対 する濃度依存応答.	66
図 3- 7. PhOR3 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極 膜電位固定法による応答測定.	68
図 3- 8. PhOR3 の匂い物質に対する応答特性.	70

図 3- 9. PhOR3 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質に対する濃度依存応答.	72
図 3- 10. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による応答測定.	74
図 3- 11. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による応答測定.	75
図 3- 12. 各 PhOR および PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の混合臭に対する応答.	77
図 3- 13. アフリカツメガエル卵母細胞における PhOR の発現解析.	78
図 3- 14. PhOR2 が応答する匂い物質に対する行動解析.	81
図 3- 15. PhOR3 が応答する匂い物質に対する行動解析.	85
図 3- 16. 嗅覚受容体の応答と嗅覚行動の関連性.	88

第 4 章 嗅覚受容体応答特性のハイスループット解析法の開発

図 4- 1. Sf21 細胞系統発現系における匂い物質に対する応答機序.	103
図 4- 2. 蛍光プレートリーダーでの応答測定条件の検討.	112
図 4- 3. DOR13a 安定細胞系統の各濃度の 1-octen-3-ol (10, 100nM, 1, 10, 100 μ M)に対する蛍光強度時間変化の平均値.	114
図 4- 4. 安定細胞系統における蛍光強度変化相対値の算出方法.	115
図 4- 5. 安定細胞系統の匂い物質に対する応答特性.	121
図 4- 6. DOR13a および GCaMP6s 系統における相対値の比較.	124
図 4- 7. 蛍光プレートリーダーを用いた Sf21 細胞発現系による嗅覚受容体の匂い物質に対する応答特性解析の進行手順.	125
図 4- 8. DOR56a 系統の応答特性.	127

表目次

第2章 自然由来成分(植物精油)からの行動制御剤の探索

表 2-1. ディスクフィルタへの接触率.	31
----------------------------	----

第3章 嗅覚受容体の応答特性情報を基にした行動制御剤の探索

表 3-1. PhOR の cDNA 単離用プライマー.	47
表 3-2. RT-PCR 用プライマー.	48
表 3-3. 匂い物質の混合物とそれに含まれる匂い物質.	50
表 3-4. アフリカツメガエル卵母細胞発現系での応答測定に用いた匂い物質.	51
表 3-5. 匂い物質に対する応答特性の比較.	79
表 3-6. コロモジラミの嗅覚受容体の応答特性と嗅覚行動の比較.	87

第4章 嗅覚受容体応答特性のハイスループット解析法の開発

表 4-1. 応答測定に必要な作業時間.	105
表 4-2. 蛍光プレートリーダーでの測定に用いた匂い物質.	108
表 4-3. DOR13a 安定細胞系統の各濃度の 1-octen-3-ol (10, 100nM, 1, 10, 100μM) に対する蛍光強度変化における最大値を示すスライス.	114

第1章 序論

1.1 本研究の背景

1.1.1 害虫防除方法とその課題

第二次世界大戦後から、われわれの生活環境の整備が推進され、現在では高い水準で快適な環境空間が構築されている。また、グローバル化が進んだことで国際的な人間の移動や物流が活発に行われるようになってきている。それらの過程において人間以外の生物における生活環境は著しく変化し、都市型害虫といった害虫における新たな問題が生じている。例えば、アジアや中南米の熱帯亜熱帯地域で流行し日本国内では1940年代前半以降国内感染例がないデング熱が、2014年に東京都内で症例が報告され、その後160名にも感染が広がった(Brady O.J. *et al.*, 2012; Bhatt S. *et al.*, 2013; 国立感染症研究所, 2015)。デング熱は蚊が伝搬する感染症であり、都立公園のひとつにおいて感染者から蚊、蚊から未感染者への感染経路が原因であることが判明し、大きな問題となった。このように害虫の中でも蚊やマダニなどの衛生害虫は感染症を伝搬するため、その防除は非常に重要な課題である。しかしながら、害虫駆除のために漫然と殺虫剤などを散布する防除方法では人間の健康や環境に対してリスクがあることから、殺虫剤にのみ依存した防除方法ではなく、環境にも配慮し様々な方面から害虫の防除を行う方法が必要となっている。そこで、2003年に農林水産省により農作物における病害虫の防除に関して、総合的病害虫管理(Integrated Pest Management; IPM)が新たな防除手法の指針として取り入れられた(図1-1)。IPMは周辺環境や経済性、対象種の個体群動態などを考慮し、生物的防除、物理的防除、化学的防除などの防除方法を組み合わせて実施し、人間の健康に対するリスクや環境負荷を最小限に軽減しながら総合的に病害虫の防除を行う手法と定義されている。この手法は厚生労働省でも推進され、衛生害虫の防除においても指針とされている。

生物的防除とは天敵の導入により害虫を駆除する生物農薬や人工的に不妊化とした害虫を利用した不妊虫放飼などの方法である。この方法では残留毒性が低く環境への影響が小さいこと、害虫に薬剤耐性がつきにくいこと、効果の持続性が比較的長いこと、などの長所があるが、効果が安定しない可能性があること、生態系のバランスを崩す危険性があることが問題として挙げられている。物理的防除とは熱や風、光などを利用して防除する方法であり、誘蛾灯による捕殺や黄色蛍光灯による害虫の行動抑制、防虫ネットによる害虫の侵入遮断などの方法である。この方法では環境への負荷が非常に小さいことが長所であるが、この方法一つだけでは効果が十分に得られないこと、広範囲に実施するには経済的

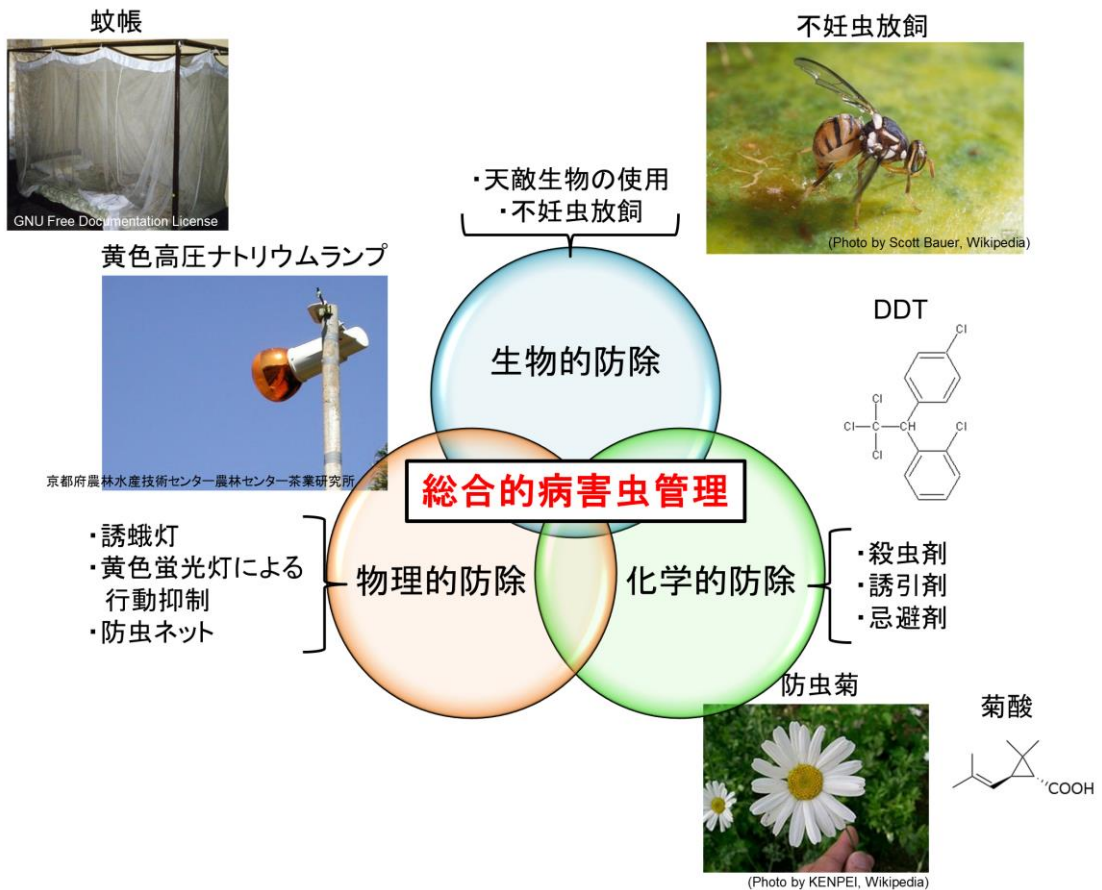


図 1- 1. 総合的害虫管理による害虫駆除方法.

負担が大きくなることが問題として挙げられている。化学的防除とは化学薬剤を使用した防除方法であり、前述したように殺虫剤の使用により防除を行う。この方法は即効的な効果を持つため、害虫による害が生じてからでも対応可能であること、殺虫剤の適用種が広いこと、そのため複数の害虫の防除を同時に実施できることが長所である。これらの防除法のうち化学的防除法は、農業において工業的に均質の農作物の大量供給が可能になるという長所もあることから、主として用いられている。また、衛生害虫の防除においても同様に、費用対効果が最も高いことから化学的防除法が主として用いられている。しかしながらこの化学的防除法では、有機塩素系の殺虫剤であるジクロロジフェニルトリクロロエタン(dichloro-diphenyl-trichloroethane; DDT)を初めとした生物濃縮の問題など、薬剤によっては環境への影響が大きいこと、同じ薬剤を連続して使用することで害虫が薬剤耐性を獲得する可能性があることが問題となっている。例えば、DDTは高い殺虫効果をもつことから第二次世界大戦期から戦後にかけて防疫対策の薬剤や農薬として利用されていたが、残留農薬や生体濃縮、発癌性などの問題から日本国内では現在は利用が禁止されている(Sutek K. 1968; Cohn B.A. *et al.*, 2015; Loomis D. *et al.*, 2015; Wagner-Schuman M. *et al.*, 2015)。また、殺虫剤の連続使用による害虫の薬剤耐性の獲得は多くの昆虫種で報告されており、薬剤耐性昆虫の蔓延につながる危険性もある(浅川, 1975; Noppun V. *et al.*, 1983; Liu M.Y. *et al.*, 1981; 浜, 1986; Roush R.T. *et al.*, 1987; Denholm I. *et al.*, 1992; Whalon M.E. *et al.*, 2008; Kikuchi Y. *et al.*, 2012; Tabashnik B.E. *et al.*, 2014; Norris L.C. *et al.*, 2015)。これらの問題点を解決するため、環境に負荷が少なく、薬剤耐性を獲得しにくい忌避剤や誘引剤などを害虫の防除に用いる取組みが進められている。

その取り組みの一つとして、自然の植物由来の天然成分を害虫防除へと利用する方法に関する注目が高まっており、様々な植物精油においてその可能性が検討されている。例えば、イヌハッカ(*Nepeta cataria*)や杉(*Cryptomeria japonica*)の植物精油はネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)やヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)に対して忌避効果をもち、ガスクロマトグラフ質量分析計(Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS)による分析および含有成分への行動試験により、これらの植物精油中の(-)-terpinen-4-olが忌避効果を持つ匂い物質として同定されている(Gu H.J. *et al.* 2009; Peterson C.J. *et al.*, 2011)。また、タンジー(*Tanacetum vulgare*)はマダニ(*Ixodes ricinus*)に対して忌避効果をもつことから、この植物精油の害虫防除への利用可能性が報告されている(Pålsson K. *et al.*, 2008)。これらのことから、植物精油および植物精油由来の天然成分は従来の化学薬剤に代わる行動制御剤としての可能性が期待されている。この方法では、慣習的に昆虫に対する効果の知見があ

ることが利点として挙げられるが、植物精油に対する行動試験による行動制御剤としての効果をもつ植物精油のスクリーニング、その植物精油の GC-MS による含有成分の分析、さらには含有成分に対する行動試験による行動制御剤としての効果がある匂い物質の特定と、薬剤としての有効性がある匂い物質の同定までに実施する試験内容が多く、約 1500 種類も存在する植物精油から、特定の昆虫に対する忌避剤を開発するには時間がかかることが想定される。そこで、この忌避剤や誘引剤などの薬剤同定の方法の一つとして、害虫である昆虫が検出可能な匂い物質の利用が有効であると考えられる。

1.1.2 昆虫の嗅覚機能

匂い物質は数万～数十万種と非常に多く存在することから、この多数の匂い物質の忌避剤や誘引剤としての効果を、昆虫生体を用いて検証するのは非常に難しい。そのため、害虫に対して有効な忌避剤や誘引剤の効率的な開発には、その宿主や食用とする植物を認識する機構などの生態を解明し、その機構を利用する方法が効果的であることが想定される。例えば、マラリアを伝搬することからアフリカ諸国を中心として脅威となっているハマダラカ(*Anopheles gambiae*)は、その宿主となるヒトを熱と二酸化炭素、匂いなどを用いて認識しており、ヒトが発散する汗に含まれる p-cresol や lactic acid, アンモニアがその認識に関与する匂い物質とされている(Hallem E.A. *et al.*, 2004; Qiu Y.T. *et al.*, 2011)。また、西ナイル熱を伝搬するネッタイエカ(*Culex quinquefasciatus*)は、宿主の体臭成分中の nonanal により宿主を認識する(Syed Z. *et al.*, 2009)。加えて、イチゴハムシ(*Galerucella griseascens*)はその寄主植物に含まれる匂い物質の cis-3-hexenyl acetate により、カイコガ(*Bombyx mori*)は桑に含まれる cis-jasmone により、それぞれの食用植物に誘引され、摂食行動を示す(Hori M. *et al.*, 2006; Tanaka K. *et al.*, 2009)。このような寄主植物の匂いへの誘引は、リンゴミバエ(*Rhagoletis pomonella*)やヤサイゾウムシ(*Listroderes costirostris*)、マツノマダラカミキリ(*Monochamus alternatus*)、アブラムシ(*Uroleuco gobonis*, *U. adenophorae*, *U. kikioense*)などの農業害虫においても確認されている(杉山ら, 1957, 1959a, b; 池田, 1981; Fein B.L. *et al.*, 1982; Hori M. *et al.*, 1999; Cha D.H. *et al.*, 2011)。このように衛生害虫を含む害虫がその宿主や寄主植物への誘引行動に匂いを利用していることから、その宿主認識に関わる機構や行動を引き起こす匂い物質を明らかとすることで、その匂い物質を利用した忌避剤や誘引剤開発が可能となる。

このような匂い物質に対する受容などに関わる昆虫の嗅覚機能の研究も進められており、昆虫はその触角に存在する嗅覚感覚子により匂いを受容することが明らかになっている。

嗅覚感覚子は表面に嗅孔という多数の孔が開いた構造をしており、その内部は感覚子リンパで満たされ、嗅覚受容ニューロン(Olfactory Receptor Neuron; ORN)の樹状突起が存在している。ORNは匂い結合タンパク質(Olfactory Binding Protein; OBP)やフェロモン結合タンパク質(Pheromone Binding Protein; PBP)の分泌を行う補助細胞(鞘生細胞, 毛生細胞, 窩生細胞)に囲まれており(Vogt R.G. and Riddiford L.M. 1981; Vogt R.G. *et al.*, 1991; Steinbrecht R.A. *et al.*, 1995; Shanbhag S.R. *et al.*, 1999, 2000), 感覚子リンパ中に樹状突起を伸ばし、脳へと投射を行う双極細胞である。嗅孔から侵入した匂い物質は OBP や PBP と結合することにより可溶化が促進され(Maida R. *et al.*, 1993; Krieger J. *et al.*, 1996; Wojtasek H, and Leal W.S. 1999), 溶解した匂い物質と ORN の樹状突起の膜上に発現する嗅覚受容体(Olfactory receptor; OR)との結合により刺激が脳へ伝達される。一般臭の場合、ORN の神経信号は脳の触角葉の常糸球体へと伝達され、この常糸球体の興奮パターンによって匂い物質の識別が行われている(Kaissling K. 1971; Galizia C.G. *et al.*, 1999, 2000; Lei H. *et al.*, 2002; Hallem E.A. and Carlson J.R. 2004; Wilson R.I. and Mainen Z.F. 2006). 嗅覚感覚子はその形態と大きさから複数のタイプに分類されており(Shanbhag S.R. *et al.*, 1999), 単一感覚子記録法によりタイプごとに匂いに対して異なる応答スペクトルを示すことが明らかとなっている(de Bruyne M. *et al.*, 1999, 2001; Hallem E.A. *et al.*, 2004; Yao C.A. *et al.*, 2005; van der Goes van Nasters W. and Carlson J.R. 2007). 各感覚子には2~4個の異なる OR を発現する ORN が存在し、これらの ORN の応答スペクトルが嗅覚感覚子の応答スペクトルとなる。

ORN の膜上に発現している OR の機能についても研究が進んでおり、昆虫における OR は7回膜貫通型のイオンチャネル型受容体であり、非常に単純な作用機構であることが明らかとなっている。昆虫の OR は共役受容体(Olfactory receptor co-receptor; Orco)と複合体を形成し、その複合体自体が匂い物質の結合により開口するイオンチャネルとしての機能を持つ。このイオンチャネルを通して細胞内に Na^{2+} , Ca^{2+} などが流入することで細胞膜の脱分極が生じ、電気信号として匂い情報が伝達される(Nakagawa T. *et al.*, 2005; Sato K. *et al.*, 2008; Glatz R. *et al.*, 2010; Kaupp U.B. *et al.*, 2010). 昆虫は多数の OR 遺伝子をゲノム中に所有しており、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)やハマダラカ、オオタバコガ(*Heliothis virescens*), カイコガなどの昆虫種において OR の遺伝子配列が同定されている(Clyne P.J. *et al.*, 1999; Vosshall L.B. *et al.*, 1999; Gao Q. *et al.*, 1999; Fox A.N. *et al.*, 2001, 2002; Tanaka K. *et al.*, 2009; Hill C.A. *et al.*, 2002; Krieger J. *et al.*, 2002, 2004). OR はそれぞれ異なる匂い物質に対して異なる強度で応答することが知られ

ており、特定の匂い物質に対して特異的に応答するものから多種類の匂い物質に対して広く応答するものまで存在する。キイロショウジョウバエやハマダラカにおいてその応答特性が解析されており、それぞれの OR によって匂い物質に対する応答特性が異なっていることが報告されている(Hallem E.A. *et al.*, 2006; Carey A.F. *et al.*, 2010)。この OR の応答特性が ORN の応答スペクトルであること(Hallem E.A. *et al.*, 2004)から、昆虫の匂いに対する応答パターンは OR の応答に依存しているといえる。昆虫はこれらの OR の応答の組み合わせにより生活環境中の匂い物質を検出しており、昆虫が検出可能な匂い物質や行動を示す匂い物質に対しては一種類以上の OR において応答が生じることが想定される。例えば、一般的に蚊などの昆虫の忌避剤として利用されている N,N-ジエチル-m-トルアミド(N,N-diethyl-m-toluamide; DEET)や methyl jasmonate はネッタイエカに対して忌避行動を解発し、これらの匂い物質に対してはその OR (*Culex quinquefasciatus* Olfactory Receptor; CquiOR)のひとつである CquiOR136 が応答を示すことが明らかとなった(Xu P. *et al.*, 2014)。ネッタイエカが忌避行動を示す DEET および methyl jasmonate が同じ OR により受容されることから、DEET や methyl jasmonate などの忌避行動を引き起こす匂い物質に応答する OR が応答を示す他の匂い物質は昆虫生体に忌避行動を解発する可能性が想定される。また、宿主に対する誘引行動を引き起こす匂い物質に応答する OR が同定できれば、その OR が応答する匂い物質から誘引効果を持つ匂い物質の同定も可能になることが想定される。これらのことから、OR の応答情報を基盤とした昆虫生体に対して忌避効果あるいは誘引効果をもつ匂い物質のスクリーニングは、行動制御剤の開発において非常に有効な手法であると考えられる。行動制御剤候補物質のスクリーニングにおいては、昆虫生体が応答を示す匂い物質を同定する手法も有効であると期待されるが、その生体の応答を測定する手法である単一感覚子記録法は、昆虫種によりその生体の大きさや触角の形態が異なっていることから、新規の昆虫に対して手技の適用が困難である。そのため、OR の応答情報に基づいたスクリーニング手法は普遍的に多数の昆虫種に適用可能であるという利点もあるが、これまでにそのような手法を用いることで、実際に忌避剤あるいは誘引剤の候補物質を同定した例は報告されていない。

1.1.3 昆虫嗅覚受容体の機能解析法

OR の匂い物質に対する応答測定は、これまでキイロショウジョウバエの形質変換体 empty neuron やアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学実験、ヨトウガ卵巣由来の Sf9 細胞発現系を用いた蛍光顕微鏡下による Ca²⁺イメージングにより行われてき

た(Wetzel C.H. *et al.*, 2001; Störtkuhl K.F. *et al.*, 2001; Kiely A. *et al.*, 2006). しかしながらこれらの手法では、手技の習熟が必須であることや一度に試行可能な匂い物質の数が限られているなどの点から、多くの匂い物質に対する応答特性を解析するには時間が必要となる。Sf9 細胞と同じくヨトウガ卵巣由来の Sf21 細胞は、遺伝子工学的に一旦遺伝子をゲノム DNA 中に導入すると、恒常的に遺伝子発現を示す安定発現系統を構築可能であるという利点をもつ。そこで、Sf21 細胞に OR, Orco およびカルシウム感受性蛍光タンパク質(GFP-based Ca calmodulin probe; GCaMP)を共発現させた安定細胞系統を構築することによって、長期的に発現させた OR の応答測定が可能となった(Mitsuno H. *et al.*, 2014). またこの安定細胞系統はカルシウム指示薬の導入が不要であるため、測定の際の利便性にも優れている、この安定細胞系統は、匂い物質に対する応答を蛍光強度の時間変化で測定可能であるため、蛍光プレートリーダーなどを用いることで、ハイスループットな応答測定が可能になると想定されるが、そのような測定手法は未だ確立されていない。

1.2 本論文の目的

本研究の目的は、衛生害虫の一種であるコロモジラミ(*Pediculus humanus corporis*)を対象として、行動制御剤としての可能性をもつ匂い物質の同定および昆虫における行動制御剤探索の新手法を確立することである。そのために、これまでに行われてきた自然由来の植物精油成分中からの探索方法と、新規手法である OR の応答特性情報に基づいた探索方法の二つの手法により行動制御剤の探索を実施する。前者の方法では、植物精油の忌避効果の確認とその植物精油の GC-MS 分析、分析結果から主要成分として同定された匂い物質の効果を評価し、さらに効果があると同定された匂い物質の効果検証を行う。後者の方法では、コロモジラミの OR (*Pediculus humanus corporis* Olfactory Receptor; PhOR)候補遺伝子の単離およびその機能解析により、匂い物質に対する応答特性を解明した後、その応答特性情報を基盤として、コロモジラミに対する行動制御剤としての効果を持つ匂い物質の同定に取り組み、新手法の有効性の検証を行う。さらに、OR の応答特性情報に基づいた行動制御剤の探索方法を促進化するため、キイロショウジョウバエの OR を発現した Sf21 細胞系統を用いて、OR の匂い物質に対する応答特性のハイスループット解析手法の開発に取り組む。

第2章 自然由来原料(植物精油)からの行動制御剤の探索

2.1 緒言

吸血性昆虫は、宿主の体臭中に含まれる匂い物質を検出することで対象となる宿主を探索し、その皮膚上から吸血する。吸血性昆虫は吸血により様々な感染症の原因となる病原体を媒介することから、衛生害虫となることが多い。これらの昆虫における宿主の探索機構の解明は、吸血性昆虫の行動を制御する誘引剤や忌避剤の開発に寄与すると考えられることから、効果的な行動制御剤開発に利用するため、吸血性昆虫の嗅覚機能や匂い物質に対する嗅覚行動に関する研究が行われている(Hallem E.A. *et al.*, 2004; Syed Z. *et al.*, 2009; Qiu Y.T. *et al.*, 2011)。

吸血性昆虫の中でもコロモジラミはヒトに対する宿主特異性を持つ外部寄生虫であり、吸血によって発疹チフスや回帰熱、塹壕熱などの感染症の原因菌である *Rickettsia prowazekii* や *Borrelia recurrentis*, *Bartonella quintana* を媒介する衛生害虫である(Cutler S.J. *et al.*, 2010; Raoult D. *et al.*, 1998)。コロモジラミによる吸血は他の吸血性昆虫と同様に搔痒感を引き起こすことから、コロモジラミに寄生されると皮膚の搔爬が生じる。コロモジラミ体内で増殖し糞とともに排出された原因菌が、この傷跡から体内に侵入することで感染症が伝搬すると考えられている(Raoult D. and Roux V. 1999)。コロモジラミが伝搬する感染症のうち発疹チフスと回帰熱に関しては、近年アフリカ諸国を中心とした断続的な流行が報告されており、特に中部アフリカのブルンジにおいては 1996 年には 3500 名、1997 年の 1 月から 5 月には約 24,000 名もの発疹チフスの患者の発生が報告されている(Bise G. *et al.*, 1997)。また、塹壕熱は 1992 年以降アメリカやヨーロッパ諸国において路上生活者に発生する再興感染症と認識されている(Regnery R. *et al.*, 1995)。このような感染症を伝搬するコロモジラミのヒトへの寄生は、下着や衣服の取り替えが困難な生活環境にある戦争難民や囚人、路上生活者などにおいて認められている(Raoult D. and Roux V. 1999)。特に先進諸国においては路上生活者への寄生が社会問題にもなっており、オランダのコトレヒト市では 1993 年から 1994 年にかけて路上生活者 31 名から合計 41 回のコロモジラミの寄生報告が(Laan J.R. *et al.*, 1996)、日本の東京都某区では 2001 年から 2003 年に路上生活者を対象に実施された健康診断においてコロモジラミの寄生率が 11%であったことが報告されている(Seki N. *et al.*, 2006)。特に日本においては路上生活者に加え、介護が必要な独居老人、簡易宿泊施設の住人に対する寄生報告もされており(沢辺ら, 2010)、社会的な問題となっている。これらのことから、他の吸血性昆虫と同様にコロモジラミの

防除は重要な課題となっている。

コロモジラミの防除には有機塩素系殺虫剤である DDT やリンデンなどが効果的であるとされ使用されてきたが、これらの化学薬剤の連続的な使用は、殺虫剤に対する薬剤抵抗性の獲得が問題として生じており、その使用が制限されている(Kitaoka M. 1952; Gratz N.G. 1997; Downs A.M. *et al.*, 1999; Dolianitis C. *et al.*, 2002; Burgess I.F. 2004; Kristensen M. *et al.*, 2006; Marshall C.J. *et al.*, 2013)。加えて、特にコロモジラミに対する殺虫効果が高いとして防除に用いられてきた DDT は発癌性があり、生物毒性が高いことから、その使用が厳しく制限されている。1980 年代後半以降、コロモジラミの発生件数が増加していること(Makigami K. *et al.*, 1999)から、これらのような化学薬剤に代わる忌避剤や誘引剤などの防除剤の開発が求められている。

これまでにクローブ(*Syzygium aromaticum*)やシトロネラ(*Cymbopogon nardus*)、センダン(*Melia azedarach*)などの数種類の植物精油はコロモジラミの近縁種であるアタマジラミ(*Pediculus humanus capitis*)に対する忌避剤としての効果をもつことが報告されている(Mumcuoglu K.Y. *et al.* 2004; Toloza A.C. *et al.* 2006; Bagavan A. *et al.* 2011; Rutkauskis J.R. *et al.* 2015)。また、コロモジラミからウサギからの吸血でも継代可能な個体を選抜して作出された Orlando 系統(Culpepper G.H. 1944, 1946, 1948)に対しては、シトロネラ、ローズマリー(*Rosmarinus officinalis*)、ユーカリ(*Eucalyptus globulus*)の 3 種類の植物精油の中でシトロネラ精油が最も忌避効果があり、その効果には含有成分の citronellal と geraniol が寄与していることが報告されている(Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1996)。この精油を含めた 44 種類の植物精油の忌避剤としての効果検証が本研究で用いたコロモジラミにおいても実施され、クローブ、桂皮(*Cinnamomum verum*)、レモングラス(*Cymbopogon citratus*)などの植物精油が忌避効果を有し、その中でも特にクローブ精油はシトロネラ精油よりもコロモジラミに対して強い忌避効果をもつことが明らかとなった(Tokuno K. *et al.*, 2014)。このことから、このクローブ精油にもコロモジラミの忌避行動を引き起こす匂い物質が含まれていることが想定され、その忌避効果に寄与する匂い物質には忌避剤としての利用可能性があることが考えられる。植物精油は一般的に植物自体から水蒸気蒸留法や溶剤抽出法などの手法により抽出される。しかしながら、抽出および精製される植物精油量は限られており低コストでの大量生産が難しいこと、原材料として使用する場合の原価が高い傾向にあることが問題として挙げられる。そこで、忌避効果をもつ植物精油中の原因となる匂い物質を同定し、その匂い物質を利用することにより、商業的に利用しやすい忌避剤の開発が可能になると考えられる。さらにそのような忌避効果をもつ匂い物質は、より効果

が高い忌避剤の開発に応用できるリード化合物として利用することが期待される。

植物精油中に含有されている匂い物質は、他の匂い物質と混合した場合にその有効効果が向上することが報告されている(Nerio L.S. *et al.*, 2010)。例えば、第1章にて前述したマラリアを伝搬する衛生害虫として研究が進められているハマダラカに対しては、白膠木(*Rhus javanica lethocolea*)やカンファーブッシュ(*Tarchoanthus camphoratus*)の植物精油中に含まれている主要成分をGC-MS分析による含有比率に基づいて混合した合成混合臭は、主要成分の単品よりも強く、もともとの植物精油に匹敵する忌避効果を示すことが明らかとなった(Omolo M.O. *et al.*, 2004)。このことから、コロモジラミに対して忌避効果をもつクローブ精油の主要成分を混合した合成混合臭は、コロモジラミに対してクローブ精油よりも強い忌避効果を示す可能性があると考えられる。したがって、植物精油の忌避効果に寄与する精油成分中の匂い物質の同定と、その忌避効果のその他の含有成分との混合効果の検証は、効果的な忌避剤開発という点で有効であると考えられる。またこのような匂い物質の同定は、昆虫における匂い物質による忌避行動解発の作用機序の解明にも有効であると考えられるが、クローブ精油からコロモジラミに対して忌避効果をもつ匂い物質の同定は未だ達成されていない。

コロモジラミの匂い物質に対する行動を評価するためには、匂い物質の効果を適切に評価できる解析手法が必要となる。Wigglesworth V.B. (1941)はヒトの匂いに対するコロモジラミの行動を、自由に濾紙の上を移動させ、それに伴い記録した行動軌跡により解析したが、各匂い物質とその濃度情報までを含めた詳細な解析には至っていない。Tokuno K. *et al.* (2014)は、植物精油を添加した羅紗布をガラスシャーレ内に敷き、雌雄各10個体のコロモジラミを用いて60分後の羅紗布上の数によって植物精油の忌避効果を検証し、前述したようにクローブ精油に対して忌避行動を示すことを報告した。しかしながら、この手法では複数個体のコロモジラミを用いているためコロモジラミの個体間の相互作用の除外が難しい。また、コロモジラミは羅紗布上を好む性質があることから、匂い物質の誘引効果の評価に応用するには正確な評価が難しいことも課題として挙げられる。これらのことから匂い物質のコロモジラミに対する忌避および誘引効果を詳細に評価可能な行動解析手法の確立が求められる。

本章では、クローブ精油のコロモジラミに対する忌避効果に寄与する匂い物質の同定およびその効果検証を第一の目的とした。まず、匂い物質のコロモジラミに対する効果の評価に利用するため、コロモジラミ個体を用いた行動解析法を確立し、その確立した手法によりクローブ精油の忌避効果を濃度依存的に評価可能であることを検証した。次に、コロ

モジラミが忌避行動を示したクローブ精油の GC-MS 分析を実施し、eugenol と β -caryophyllene がその主要成分であることを特定した。クローブ精油中の主要成分である各匂い物質に対する行動解析により、コロモジラミはこれらのうち eugenol に対して強い忌避行動を示すことを確認し、クローブ精油の忌避効果に寄与する匂い物質は eugenol であること、その忌避作用はコロモジラミの嗅覚系を介して行動を解発している可能性を示した。また、eugenol 類似物質である methyl eugenol および eugenol acetate に対する行動比較により、eugenol のみにコロモジラミに対する忌避効果があることを明らかにした。最後に eugenol および β -caryophyllene をクローブ精油の GC-MS 分析結果に基づき混合した合成混合臭に対する行動解析の結果、eugenol のコロモジラミに対する忌避効果は β -caryophyllene と混合することで増強されることを確認し、クローブ精油の主要成分の混合臭はコロモジラミに対して効果的な忌避作用を示すことを明らかにした。

2.2 材料と方法

2.2.1 供試昆虫

コロモジラミは株式会社大阪製薬にて維持されている NIID 系統の成虫(雄)を用いた(図 2-1, Yasutomi 1956). コロモジラミは温度 28°C, 相対湿度 50%, 恒暗条件下の恒温機内において, 3.5cm 四方の黒羅紗布を敷いた $\phi 70$ のガラスシャーレ内で飼育され, 一日一回ヒトの腕からの直接の吸血により給餌された. コロモジラミは吸血直後には動きが遅くなるため, 行動試験には吸血後 24 時間以上飢餓状態にした個体を用いた.

2.2.2 植物精油と匂い物質

植物精油としてクローブ精油(100%, Kotobuki fragrance Co., Ltd.), 匂い物質として eugenol, β -caryophyllene, eugenol acetate (TCI), methyl eugenol (Sigma)を使用した. クローブ精油 はアセトン(Wako)にて 0.01, 0.1, 0.1%v/v と希釈し, 試験に用いた. 同様に eugenol はアセトンにて 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1%v/v と 5 段階に希釈, その他の匂い物質は 0.1%v/v に希釈し, それぞれ行動試験に用いた.

2.2.3 匂い物質に対する行動試験および画像解析による行動解析法

コロモジラミ個体での行動試験は $\phi 90$ フィルターペーパー(Whatman)を敷いた $\phi 100 \times 20\text{mm}$ プラスチックディッシュを用いて実施した(図 2-2A). コロモジラミ個体をフィルターペーパー上に設置し, $\phi 30$ プラスチックディッシュにて拡散を防止した. クローブ精油および各匂い物質はアセトンにて目的濃度に希釈した後, $50\mu\text{L}$ を 1.1mm ディスクフィルタ(Whatman)にそれぞれ添加し, 室温のドラフトチャンバー内でアセトンを完全に揮発させた後, プラスチックディッシュの一端に設置した. その正反対側には同様の処理でアセトンを添加した 1.1mm ディスクフィルタを設置した. 拡散防止に用いていた $\phi 30$ プラスチックディッシュを $\phi 100 \times 20\text{mm}$ プラスチックディッシュの蓋と置き換えた後, 5 分間自由にコロモジラミを行動させた. 試験開始から終了までの間, プラスチックディッシュの真上からデジタルカメラ(SONY, 解像度 1920×1080)にて動画撮影を行った. 行動試験は室内灯の下で約 28~29°C の温度帯で実施した. そこで, 装置の横方向からの外部光などの影響を低減するため, 四方を黒紙で覆った装置を作成し, 試験に用いた(図 2-2B). 本装置では動画撮影のために上方を開放していることから, 上方向からの外部光などの要因がコロモジラミの行動に影響を与える可能性があった. そこで, 試験時には四方向の向きのディッシュを用意し, 行動試験を同時に実施することで外部要因の影響を低減した(図 2-2C).

A



B



図 2- 1. コロモジラミ (NIID 系統).

A: コロモジラミ成虫.

B: 頭部周辺の拡大図.

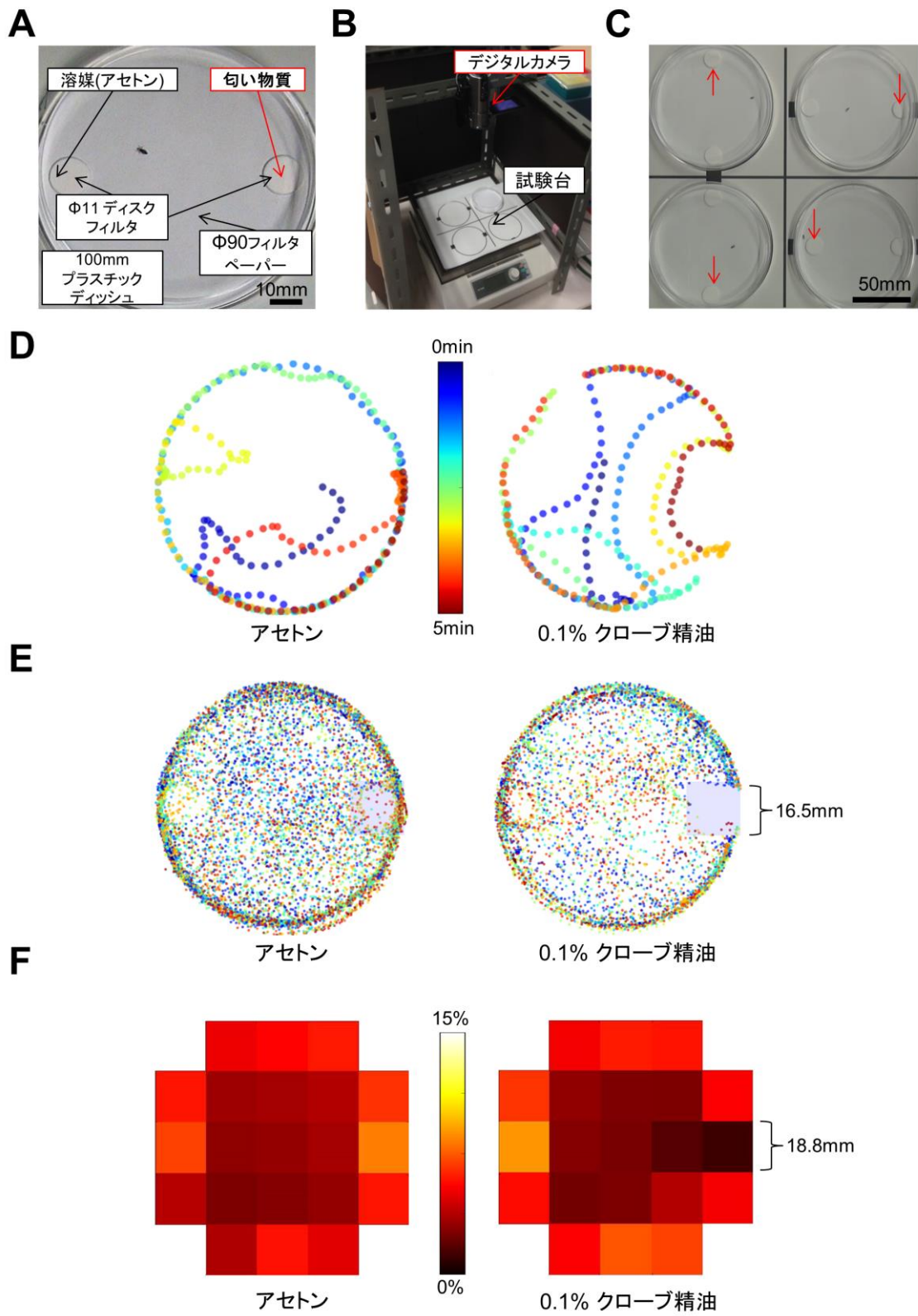


図 2- 2. コロモジラミの匂い物質に対する行動解析法.

- A: 匂い物質に対するコロモジラミの行動試験モデル.
- B: 行動試験用装置の概観. 試験中は前面部も黒紙にて遮蔽した .
- C: 行動試験実施中の試験台. 赤矢印は匂い物質を滴下したディスクフィルタを示す.
- D: コロモジラミの行動軌跡例. 匂い物質を滴下したディスクフィルタを右側とした. アセトン(左), 0.1%クローブ精油(右).
- E: 各個体の行動軌跡の重ね合わせ. 匂い物質を滴下したディスクフィルタを右側とした. アセトン(左), 0.1%クローブ精油(右).
- F: 各区画における滞在頻度率. 匂い物質を滴下したディスクフィルタを右側とした. アセトン(左), 0.1%クローブ精油(右).

本装置の行動試験に用いる領域上の照度は照度計(T-1, コニカミノルタ)によりほぼ均一であることを確認した(248~259lux). コロモジラミの行動軌跡は, 撮影した動画から ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>)を用いて作成した. 5 分間の動画を 1 秒ごと全 300 枚の画像に分割した後, 全画像の輝度を平均し, 参照画像とした. 各秒の画像と参照画像との比較から各画像におけるコロモジラミの位置を算出し, 5 分間の行動軌跡をプロットで作成した(図 2-2D, E). この際, 画像を目視で確認し, 開始位置からほとんど移動していない個体や, プラスチックディッシュと蓋との間に潜り込み移動できなくなった個体は評価から除外した. コロモジラミの行動軌跡は匂い物質を滴下したディスクフィルタが画像の右側となるように回転させた後, 各区画(5 × 5)に分割し, プラスチックディッシュの含有率が約 10%以下とほぼプラスチックディッシュを含まない四隅の区画を除いた 21 区画における滞在頻度の比率を算出した(図 2-2F). 匂い物質のコロモジラミの行動に対する効果は, 匂い物質を滴下したディスクフィルタを含む区画における滞在頻度(Staying Frequency to odorant; SF)を用いて評価を行った.

2.2.4 ガスクロマトグラフ質量分析計による成分分析

クローブ精油の含有成分は, ガスクロマトグラフィ質量分析器(QP5050 GC-MS; Shimadzu)により分析を行った. カラムは DB-wax (0.25mm i.d. × 30m, J&W Scientific)を使用し, カラム温度は 50°Cから 230°Cまで 6°C/min にて昇温させた. ヘリウムガスをキャリアガスとして, 流速 1m/sec で使用した. イオン化エネルギーは 70eV とした. 標品として 4000 倍にアセトンで希釈した匂い物質を用いた.

2.3 結果

2.3.1 クローブ精油を用いたコロモジラミの行動解析法の開発

コロモジラミ個体を用いた行動試験および画像解析による行動解析を実施するため、植物精油の中でもコロモジラミに対して強い忌避効果をもつクローブ精油を用いて、行動解析法を開発した。まず、アセトンおよび0.1%のクローブ精油に対する行動試験を行い、それぞれの行動軌跡を作成した(図 2-2D)。次に作成した各行動軌跡の重ね合わせを行った結果、0.1%のクローブ精油を滴下したディスクフィルタを含む16.5mm四方においてプロット数が非常に減少することが確認された(図 2-2E)。さらに、そのプロット数が減少した全ての領域を含むように18.8mm四方の区画で行動軌跡を区分し、その領域内における滞在頻度をSFとしてクローブ精油の忌避効果を評価した(図 2-2F)。その結果、0.1%のクローブ精油に対するSFは 1.2 ± 0.5 とアセトンのSF(8.3 ± 0.7)と比較して有意に低くなった($P < 5.8 \times 10^{-13}$) (図 2-3A)。この行動試験系ではコロモジラミの個体はディスクフィルタに接触することが可能であることから、SFの低下がコロモジラミの嗅覚によるものであることを確認する必要がある。そのため、アセトンまたは0.1%のクローブ精油を滴下したディスクフィルタに接触する個体を数え、その比率を比較した。その結果、アセトンを滴下したディスクフィルタに触れたコロモジラミは60個体中57個体と、95.0%の個体がディスクフィルタに接触した一方、0.1%のクローブ精油を滴下したディスクフィルタに触れたコロモジラミは28個体中6個体であり、ディスクフィルタに接触した個体は21.4%と約5分の1に低下した(表 2-1)。このことから、コロモジラミはディスクフィルタに接触する前からクローブ精油を忌避していることが明らかとなり、この忌避行動が嗅覚によるものであることが示唆された。

0.1%のクローブ精油のコロモジラミに対する忌避効果をSFにより評価可能であることが示されたことから、濃度依存応答が評価可能か、0.001, 0.01%のクローブ精油を用いて検討を行った。その結果、各濃度のクローブ精油に対するSFは濃度依存的に減少し、0.01%より高濃度のクローブ精油に対するSFはアセトンに対するSFに比べて有意に低下した(図 2-3A)。また、溶媒としたアセトンに対するSFは何も滴下しない場合のSFと差異が無いことが明らかとなり、アセトンはコロモジラミの行動に影響しない溶媒であることが確認された(図 2-3A)。さらに、アセトンを滴下したディスクフィルタを含む区画と正反対のディスクフィルタを含む区画の滞在頻度を比較した結果、両区画の滞在頻度には差異が検出されず、左右両端のうち右側を匂い源として設定することはコロモジラミ雄の行動の評価に影響を与えないことが確認された(図 2-3B)。これらのことから、開発した行動解析法に

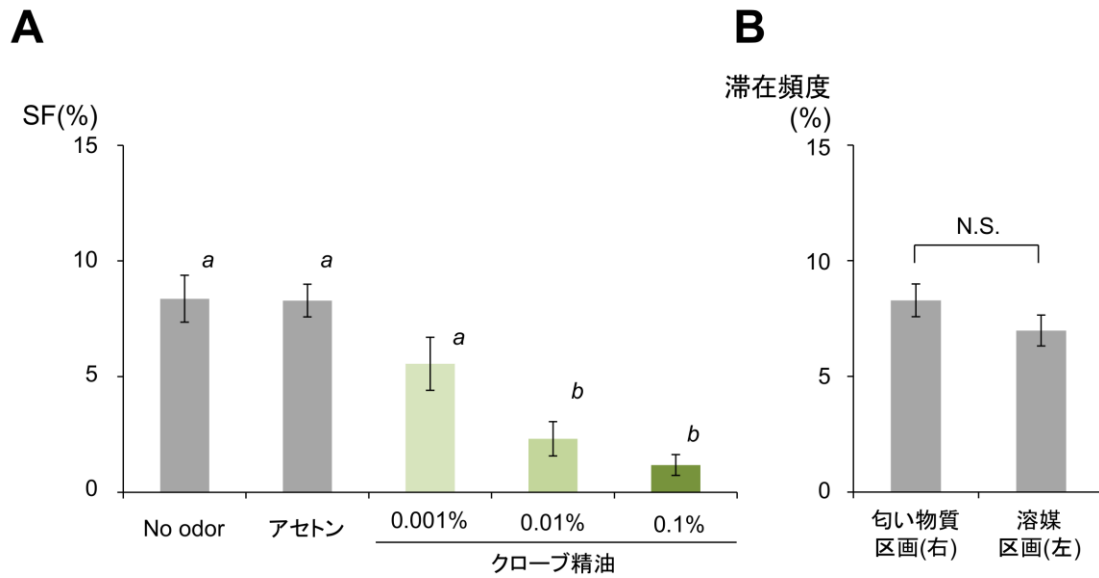


図 2- 3. アセトンおよびクローブ精油に対する行動解析.

A: クローブ精油に対する SF 値. N = 20–60. Error bar: \pm SEM. 異なる文字間(a, b)は有意差あり(*Steel-Dwass* 法による).

B: 溶媒を滴下したディスクフィルタを含む両区画における滞在頻度. N = 60.

表 2- 1. ディスクフィルタへの接触率.

	総個体数	接触した個体数	接触率
アセトン	60	57	95.0%
クローブ精油	28	6	21.4%

クローブ精油はアセトンにて 0.1%に希釈.

よりコロモジラミの匂い物質に対する行動を濃度依存的に評価可能であることが示唆された。

2.3.2 ガスクロマトグラフ質量分析計による成分分析

2.3.1 で用いたクローブ精油はコロモジラミに忌避行動を解発したことから、その精油成分には忌避効果をもつ匂い物質が含有されていることが想定される。そこで、その匂い物質を同定するため、クローブ精油の含有成分を GC-MS により分析した(図 2-4A)。その結果、クローブ精油のトータルイオンクロマトグラムにおいて、明確な 4 ピークを確認した。それぞれのピークの保持時間(Retention time; Rt)は 15.1 分, 16.5 分, 22.0 分, 24.8 分であった。各ピークにおける質量スペクトルのパターンを NIST27 and NIST147 GC-MS libraries (Shimadzu) と比較を行った結果、それぞれ β -caryophyllene, α -caryophyllene, caryophyllene oxide, eugenol であることが推定された(図 2-4B)。それらの含有比はそれぞれ 9.8, 2.1, 1.9, 86.3%であったことから、本研究において用いたクローブ精油には、主要成分として eugenol および β -caryophyllene が、微量成分として α -caryophyllene, caryophyllene oxide が含まれていることが明らかとなった。主要成分である eugenol および β -caryophyllene はクローブ精油のピークと標品のピークとなる Rt が一致することを確認した。この結果では GC-MS によりクローブ精油の含有成分を分析した先行研究で報告された methyl eugenol および eugenol acetate は検出されなかったが、クローブ精油の主成分が eugenol および β -caryophyllene であるという点においては一致した(Alma M.H. *et al.* 2007; Kegley S. *et al.*, 2010; Bagavan A. *et al.*, 2011; Dhumal T.D. *et al.*, 2015)。

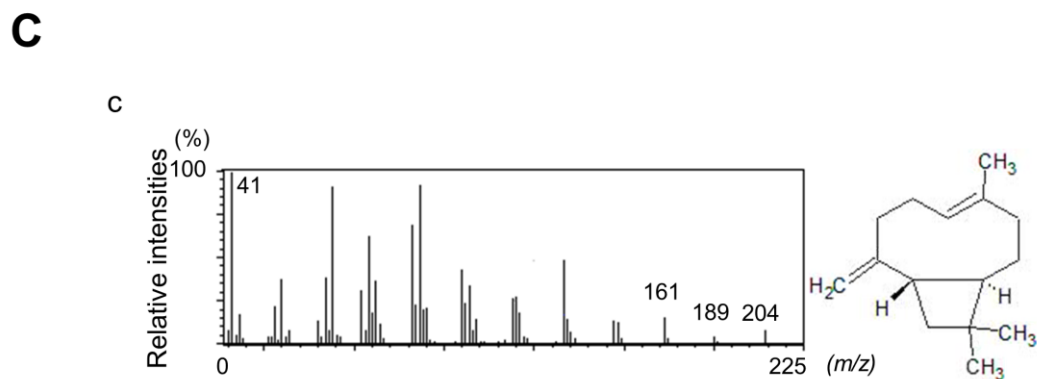
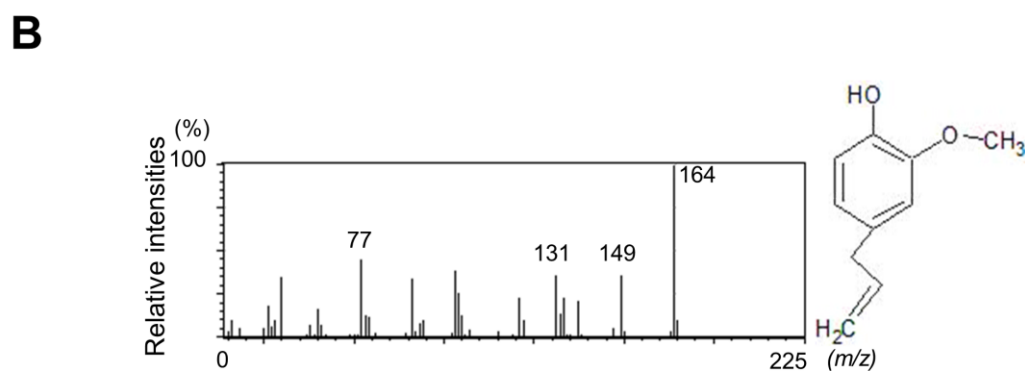
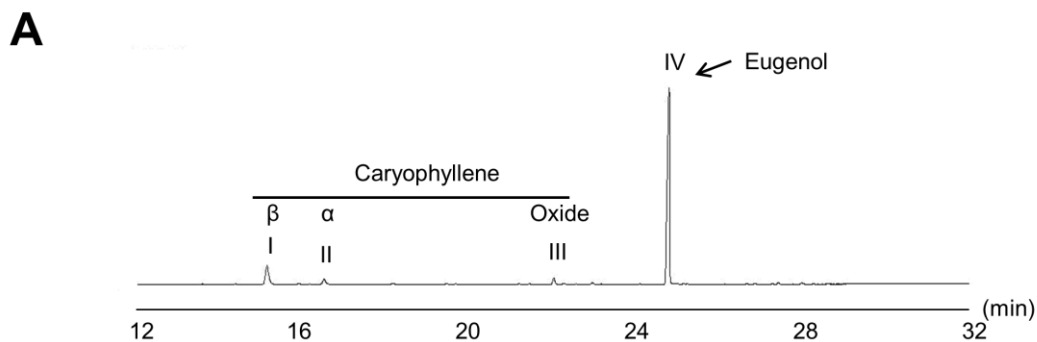


図 2-4. クローブ精油の GC-MS 分析.

A: 本研究で用いたクローブ精油のトータルイオンクロマトグラム. 化合物 I (Rt = 15.1 分), II (Rt = 16.5 分), III (Rt = 22.0 分), IV (Rt = 24.8 分) は, NIST27, NIST147 GC-MS ライブラリ(島津製作所)のマススペクトラムおよび標準品の Rt との比較によりそれぞれ β -caryophyllene, α -caryophyllene, caryophyllene oxide, eugenol と決定.

B: eugenol のマススペクトラム(化合物 II). 基準イオンおよび分子イオン: 164 (100%), 診断イオン: 149 ($[M-15]^+$, 37.5%).

C: β -caryophyllene のマススペクトラム(化合物 I). 基準イオン: 41 (100%), 分子イオン: 204 (2.5%), 診断イオン: 161 ($[M-42]^+$, 17.5%).

2.3.3 クローブ精油の主要成分の各匂い物質に対する行動解析

コロモジラミに対して忌避効果をもつクローブ精油の主要成分が *eugenol* および β -*caryophyllene* であることから、*eugenol* あるいは β -*caryophyllene* がクローブ精油の忌避効果に寄与していることが想定された。そこで、クローブ精油の忌避効果に寄与する匂い物質を特定するため、各匂い物質(0.1%)に対するコロモジラミの行動解析を実施した。その結果、クローブ精油の主要成分のうち、*eugenol* に対する SF は 3.2 ± 1.0 とアセトンの SF (8.3 ± 0.7)と比較して有意に低くなった。また、 β -*caryophyllene* に対する SF は 6.6 ± 1.1 であり、アセトンの SF (8.3 ± 0.7)と比較して低い傾向にあったが有意差は検出されなかった(図 2-5A)。さらに各濃度(0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1%)の *eugenol* に対する行動試験により *eugenol* に対する濃度依存応答を解析した結果、濃度依存的に SF が低くなり、0.001%より高濃度の *eugenol* に対してはアセトンに対する SF と比較し、有意に低くなることが確認された(図 2-5B)。クローブ精油同様に *eugenol* の忌避効果がコロモジラミの嗅覚によることを確認するため、SF が有意に低下した三段階の濃度(0.1, 0.01, 0.001%)の *eugenol* に対する行動軌跡を比較した。その結果、*eugenol* の濃度が高くなるにつれて匂い源としたディスクフィルタからの距離ごとのプロット数の増加率が少なくなり、ディスクフィルタ周辺のコロモジラミが接近しない範囲が拡大した(図 2-5C, D)。これらのことから、コロモジラミはその嗅覚により濃度依存的に *eugenol* を忌避することが明らかとなり、クローブ精油のコロモジラミに対する忌避効果は *eugenol* に起因することが示唆された。

2.3.4 *eugenol* と類似構造の匂い物質に対する行動解析

2.3.3 よりクローブ精油の主要成分のうち、*eugenol* がコロモジラミに対する忌避効果をもつことが示唆された。2.3.2 において検出されなかったが、他の先行研究ではクローブ精油の含有成分として *methyl eugenol* および *eugenol acetate* が同定されている。これらは *eugenol* のヒドロキシル基がそれぞれメチル化、アセチル化した構造類似物質であることから、これらの匂い物質も *eugenol* 同様に忌避効果をもつ可能性が想定された。また類似物質の忌避効果を比較することで、*eugenol* の忌避効果に関与する構造部位を特定できる可能性もある。そこで、*methyl eugenol* および *eugenol acetate* に対するコロモジラミの行動解析を行い、各匂い物質(0.1%)における忌避効果を比較した。その結果、*methyl eugenol* に対する SF は 6.7 ± 1.3 となり、アセトンの SF (8.3 ± 0.7)に比べて低くなる傾向にあったが有意差は検出されず、*eugenol acetate* に対する SF は 9.4 ± 1.4 とアセトンと同程度であった(図 2-5D)。このことから、*methyl eugenol* は弱いながらもコロモジラミに対して忌避効果をもつ可能性があるが、本研究においては、この 3 種類の *eugenol* 類似物質の中で

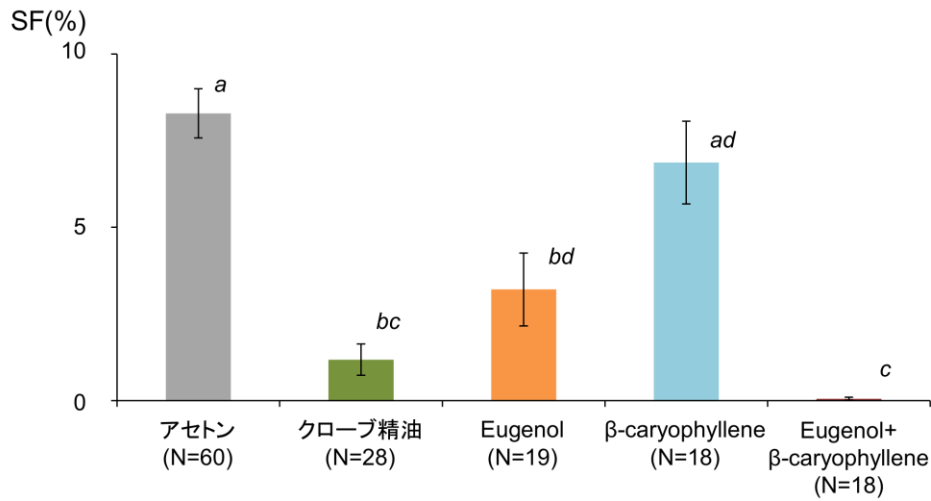
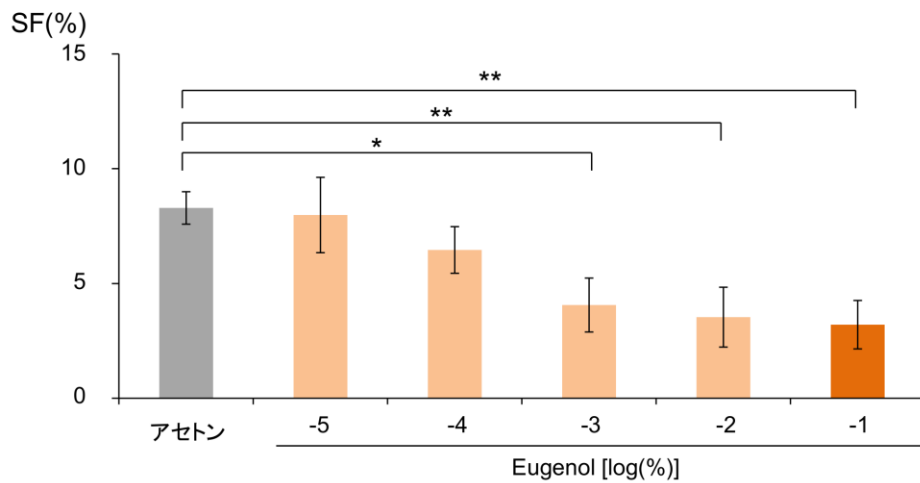
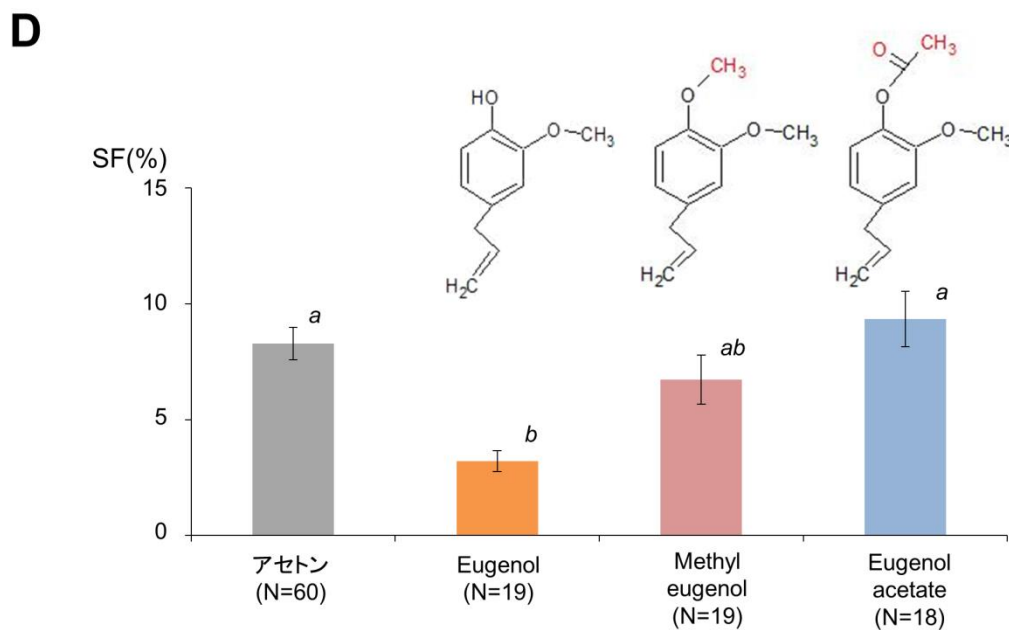
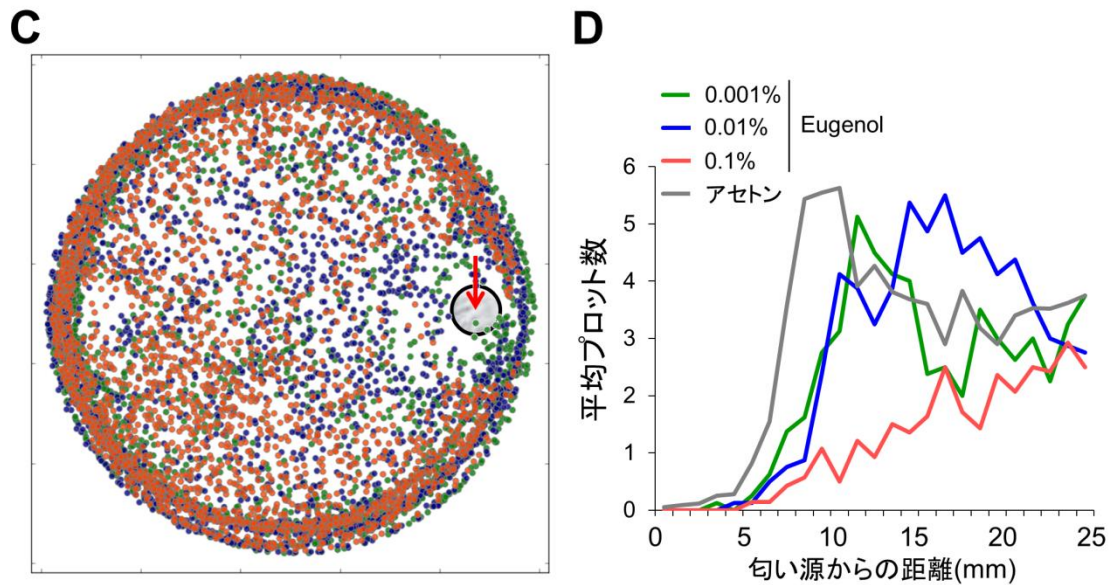
A**B**

図 2- 5. クローブ精油およびその主要成分の忌避効果.

A: クローブ精油とその主要成分に対する SF 値. クローブ精油, 各匂い物質および主要成分の混合物はアセトンにて 0.1%に希釈. Error bar: \pm SEM. 異なる文字間(a, b, c, d)は有意差あり(Steel-Dwass 法による).

B: 各濃度の eugenol に対する SF 値. N = 8–60. Error bar: \pm SEM. *: $P < 0.05$.

** : $P < 0.001$ (アセトンに対する SF 値との U 検定による).



C: 各濃度の eugenol に対する行動軌跡の重ね合わせ。匂い物質を滴下したディスクフィルタを右側とした。●: eugenol 0.1%, ●: eugenol 0.01%, ●: eugenol 0.001%。赤矢印: 匂いを滴下した濾紙の中心部(匂い源)。

D: アセトンおよび各濃度の eugenol (0.1, 0.01, 0.001%) に対する匂い源からの距離ごとにおけるプロット数。

E: eugenol 類似物質に対する SF 値。各匂い物質濃度: 0.1% / アセトン。Error bar: ± SEM。異なる文字間(a, b)は有意差あり(Steel-Dwass 法による)。

eugenol のみがコロモジラミに対する忌避効果を示した。これらのことから、eugenol がコロモジラミに対する忌避効果をもつ匂い物質であり、2.3.2 の結果を考慮してもクローブ精油の忌避効果は eugenol に起因することが示唆された。

2.3.5 クローブ精油主要成分の混合効果

2.3.2 の結果から、本章で用いたクローブ精油の主要成分は eugenol および β -caryophyllene であること、2.3.3 および 2.3.4 の結果から eugenol がクローブ精油の忌避効果に寄与することが示された。しかしながら、2.3.3 では 0.1% の eugenol の忌避効果は同濃度のクローブ精油よりも弱い傾向にあった(図 2-5A)。そこで、クローブ精油の他の主成分と混合することによって eugenol の忌避効果が増強するか検証するため、2.3.2 の結果の含有比で調整した eugenol および β -caryophyllene の合成混合臭に対するコロモジラミの行動試験を実施し、その効果をクローブ精油および eugenol 単品と比較した。その結果、合成混合臭に対する SF は 0.1 ± 0.04 となり、eugenol 単品に対する SF (3.2 ± 1.0) と比べて有意に低下し、クローブ精油に対する SF (1.2 ± 0.5) と同程度となった(図 2-5A)。このことから、eugenol および β -caryophyllene の合成混合臭は eugenol 単品よりも強く、クローブ精油と同程度の忌避効果を示すことが明らかとなり、eugenol の忌避効果が β -caryophyllene との混合により増強したことが示唆された。

2.4 考察

コロモジラミは吸血性昆虫の中でも複数の感染症を伝搬することや社会的な問題に発展していることから、その防除が衛生学的に重要な課題となっており、防除に用いる行動制御剤が求められている。そこでコロモジラミ個体を用いて、植物精油から忌避効果をもつ匂い物質の同定およびその効果の検証を実施した。また、これまでコロモジラミの個体を用いて、匂い物質に対する嗅覚行動を濃度依存応答まで評価する手法は確立されていなかった。本章では、コロモジラミの対する忌避効果をもつクローブ精油を用いて、コロモジラミの匂い物質に対する行動を評価可能な解析手法を確立した後、確立した行動解析手法を用いて、クローブ精油の忌避効果に寄与する匂い物質として **eugenol** を同定した。さらに **eugenol** はクローブ精油の他の主要成分と混合することで単品よりも強い忌避効果を示すことを明らかにし、**eugenol** と β -**caryophyllene** の合成混合臭がコロモジラミに対して効果的な忌避作用があることを見出した。ここではその結果に関する考察を記述する。

2.4.1 匂い物質に対するコロモジラミの行動解析

これまでに二次元を移動するキロショウジョウバエやカイコガなどの幼虫の匂い物質に対する行動解析がディッシュを用いた試験系で実施されてきた(Larsson M.C. *et al.*, 2004; Mooney A.C. *et al.*, 2009)。コロモジラミにおいても匂いに対する行動試験は実施されているが、匂い物質に対する行動試験およびその解析法の確立まで至っておらず、どのような匂い物質に対して嗅覚行動を示すかはほとんど明らかになっていない。そこで、他昆虫種およびコロモジラミの先行研究で実施されている行動解析手法を基として、クローブ精油を用いて匂い物質に対する行動を濃度情報まで含めて詳細に解析可能なコロモジラミの行動解析手法の確立に取り組んだ。本項ではその結果に関する考察を記述する。

本章において確立したプラスチックディッシュおよびフィルターペーパーを用いたコロモジラミの行動解析手法により、忌避効果を有するクローブ精油に対するコロモジラミの嗅覚行動を濃度依存的に評価可能であることが確認された(図 2-3A)。この手法では Wigglesworth V.B. (1941)の手法と同様にコロモジラミの個体を試験に用いていることから、他個体からの影響を排除することが可能であるといえる。また、同様の大きさのシャーレを用いたキロショウジョウバエ幼虫の匂い物質に対する行動試験では、試験開始 5 分後までシャーレ内に匂い物質の濃度勾配があることが確認されている(Mathew D. *et al.*, 2013)。このことから、本手法においても少なくとも試験時間内は匂い物質の濃度勾配が生じており、匂い物質に対する行動を評価することが可能であることが考えられる。これら

のことから、本手法は匂い物質のコロモジラミに対する効果を詳細に解析可能な有効な手法であり、忌避剤や誘引剤としての匂い物質の効果を的確に評価することが可能になると考えられる。また、コロモジラミは平面を移動する昆虫であり、本手法ではその行動を軌跡、位置情報などの二次元情報として算出することが可能となっている。そのため、プロットとして指定するサイズ、試験時間などを変更することで平面を移動する他の歩行性昆虫の行動解析にも応用可能であることが考えられ、本手法を調整・応用することで、これまでに行動解析手法が確立されていない歩行性昆虫においても匂い物質に対する行動が評価可能となることが期待される。

2.4.2 クローブ精油の GC-MS 分析

クローブ精油などの植物精油は、多くの異なる匂い物質から構成されており、その精油中の匂い物質の含有量は抽出に用いた植物部位や抽出方法により異なることが報告されている(Alma M.H. *et al.* 2007)。本章で GC-MS 分析を実施したクローブ精油には、主要成分として eugenol および β -caryophyllene が含まれていた(図 2-4A)。この結果はインドネシア産のクローブ葉からの抽出物および Sigma 社のクローブ精油の GC-MS 分析の結果と一致した(Kegley S. *et al.*, 2010)。一方、その他の先行研究で報告されている methyl eugenol および eugenol acetate は検出されなかった(Alma M.H. *et al.* 2007; Bagavan A. *et al.*, 2011; Dhupal T.D. *et al.*, 2015)。本研究で用いたクローブ精油は株式会社大阪製薬より分譲されたものであり、その精製に用いた葉や抽出方法は不明であるが、GC-MS 分析の結果がインドネシア産のクローブ葉からの抽出物や Sigma 社のクローブ精油と類似していることから、これらと同じ葉の部位もしくは抽出方法が精製に用いられている可能性がある。しかしながら、クローブ精油の主要成分が eugenol および β -caryophyllene であることには違いはなく、これらの匂い物質がクローブ精油の忌避効果に寄与していることが考えられる。

2.4.3 コロモジラミに対する eugenol の忌避効果

コロモジラミに対して忌避効果をもつ eugenol とその類似物質である methyl eugenol および eugenol acetate のコロモジラミに対する忌避効果を比較したところ、eugenol のみがコロモジラミに対して忌避効果を示すことが明らかとなった(図 2-5C)。この効果の違いについて明らかにすることは出来なかったが、3種類の匂い物質において差がある構造部位はヒドロキシル基であることからこの部位が eugenol の忌避効果に関与している可能性がある。eugenol はヒドロキシル基をもつことによって、その蒸気圧が methyl eugenol と

eugenol acetate よりも高くなることが報告されている(Rice P. *et al.*, 1994; Tsao R. *et al.*, 1995). ヒトの嗅覚の例を挙げると匂い物質は蒸気圧が高い方が空気中の拡散が促進され、匂いとして知覚され易いことが知られている(鹿島, 2014). これらのことから eugenol は methyl eugenol および eugenol acetate と比較して拡散しやすいことが考えられ、そのためコロモジラミにおいて匂いとして受容され易かった可能性が推察される.

また, eugenol を受容する OR の 3 種類の匂い物質に対する応答性の違いが関与している可能性も想定される. 昆虫の OR における構造と匂い物質の受容に関する研究はキイロシヨウジョウバエやハマダラカなどの OR の点変異体を用いて進められている. 例えば, キイロシヨウジョウバエ嗅覚受容体(*Drosophila melanogaster* Olfactory Receptor; DOR)の一つである DOR67d は雄が放出するフェロモン成分である cis-vaccenyl acetate (cVA)の受容に関与するが, その点変異体は cVA に対する応答を示さないことが報告されている (Jin X. *et al.*, 2008). また, ハマダラカ嗅覚受容体(*Anopheles gambiae* Olfactory receptor; AgOR)の一つである AgOR15 の複数の点変異体を用いて, 二番目の細胞外ループと四番目の膜貫通領域がそのリガンドへの応答に重要な役割を果たしていることが報告されている (Hughes D.T. *et al.*, 2014). 加えて, キイロシヨウジョウバエやハマダラカを初めとする昆虫の 5907 の OR アミノ酸配列を用いて, アミノ酸共進化理論に基づき OR のタンパク質構造予測を行ったところ, 得られたモデル構造のリガンド結合部位やチャネルポア部位はこれまでの機能解析によって予測されていた領域と一致することが報告されている (Hopf T.A. *et al.*, 2015). ここで Hopf T.A. *et al.*, (2015)はモデル構造は二番目の細胞外ループを含む二番目の膜貫通領域から四番目の膜貫通領域がリガンド結合ポケットを形成すると報告していることから, eugenol を受容する OR はこの二番目の膜貫通領域から四番目の膜貫通領域でベンゼン環が収容できる大きさのリガンド結合ポケットを形成することが考えられる. また, 本研究で eugenol と比較した methyl eugenol および eugenol acetate は eugenol のヒドロキシル基部位の末端がメチル基に置換されており, eugenol より親水性が低下していることから, eugenol を受容する OR のリガンド結合ポケット内のリガンド認識部位にはセリンやアスパラギンなどの親水性の高いアミノ酸が存在し, eugenol の受容に関与している可能性がある. 今後, eugenol の受容に関わる OR の同定が達成されれば, このような匂い物質の受容様式を明らかにすることが可能になると考えられる. さらに, eugenol には本研究で用いた methyl eugenol および eugenol acetate 以外にも vanillin や 2-methoxy-4-ethylphenol などの構造類似物質が存在することから, eugenol に応答を示す OR は, 忌避剤候補となる匂い物質のスクリーニングだけでなく, OR と匂い物質との構造

活性相関の研究においても有効である可能性がある。eugenol の忌避行動に関与するリガンド認識部位を決定することが出来れば、eugenol をリード化合物として、さらに効果的な行動制御剤の開発が可能となることが考えられる。加えて、この eugenol の受容に関わる OR の同定は、生体における忌避行動の作用機序の解明など、コロモジラミの生態の解明にもつながることが期待される。

植物精油の主要成分の忌避効果は他の主要成分と混合することにより、単品の忌避効果より増強される傾向にあることが示されている。例えばサシガメ (*Triatoma rubida*) においてシトロネラ精油の主要成分である citronellol と geraniol を混合した合成混合臭は各 0.165% しか含有していないにも関わらず、1.0% のシトロネラ精油と同程度以上の忌避効果をもつことが報告されている (Zamora D. *et al.*, 2015)。本章において eugenol 単品はコロモジラミに対する忌避効果をもつことが明らかとなったが、その忌避効果はクローブ精油よりも弱いことが示された (図 2-5A)。2.3.2 の GC-MS 分析の結果から、クローブ精油中の eugenol 量は 86.3% 含まれており、行動試験中には 0.0863% の eugenol しか含まれていないにも関わらず、0.1% の eugenol よりもクローブ精油の忌避効果が高かった (図 2-4, 5A)。このことから、クローブ精油の忌避効果には eugenol 以外の他の匂い物質が関与していることが示唆される。コロモジラミの Orlando 系統においてシトロネラ精油の主要成分である citronellal の忌避効果が、citronellal を約 30% しか含有しないシトロネラ精油の効果より弱かったこと (Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1996) と一致することからも、コロモジラミに対する忌避効果への他の匂い物質の関与を想定することは妥当であると考えられる。Mumcuoglu K.Y. *et al.*, (1996) は citronellal の同定後、精油中の含有成分の合成混合臭に対する試験は実施しておらず、匂い物質の合成混合臭の忌避効果の評価は行っていない。

本研究では、eugenol と同じくクローブ精油の主要成分であった β -caryophyllene を GC-MS 分析から得られた含有比で混合して調整した合成混合臭に対する行動解析により、合成混合臭がコロモジラミに対して eugenol 単品よりも強く、クローブ精油と同程度の忌避行動を解発することを明らかにし (図 2-5A)、この合成混合臭にクローブ精油と同程度のコロモジラミに対する忌避効果があることを示した。このことから eugenol の忌避効果が β -caryophyllene を混合することにより増強されたことが示された。本研究では、 β -caryophyllene との合成混合物に対する評価しか実施していないが、クローブ精油中の微量成分である α -caryophyllene, caryophyllene oxide あるいはコロモジラミに対して忌避効果がある citronellal や geraniol などの匂い物質 (Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1996) との混合により、さらにその忌避効果が増強する可能性があり、これらの合成混合臭はより効果的

な行動制御剤となることが期待される.

第 3 章 嗅覚受容体の応答特性情報を基にした行動制御剤の探索

3.1 緒言

第 1 章にて前述したハマダラカやネッタイエカなどを含む感染症を伝搬する吸血性昆虫は、その宿主の特定に温度や匂い物質を利用しており、その宿主の体臭に対して誘引行動を示すことが報告されている(Hallem E.A. *et al.*, 2004; DeGennaro M. *et al.*, 2008; Syed Z. *et al.*, 2009; Qiu Y.T. *et al.*, 2011). このことから、吸血性昆虫であるコロモジラミも同様に、その宿主の特定に温度や匂い物質を利用していることが考えられる。先行研究ではコロモジラミは 28~30°C 周辺の温度帯を好むことが報告されている(Wigglesworth V.B. 1941). この温度帯は、一般的なヒトの体表温度が 30°C 前後であること(三木ら, 1983)と一致し、コロモジラミが宿主であるヒトの探索に温度を用いている可能性を示唆している。また、同様に Wigglesworth V.B. (1941)はコロモジラミの嗅覚行動としてその宿主であるヒトの体臭に対して誘引行動を示すことを報告している。このことから、コロモジラミも他の吸血性昆虫と同じく宿主の認識に匂いを利用していることが想定されるが、コロモジラミの嗅覚機能に関する研究は進んでいない。

これまでにコロモジラミの嗅覚機能に関する研究として、その触角の形態に関して報告がされている。コロモジラミの触角には Tuft Organ, Pore Organ, Peg Organ の 3 種類の器官が存在する(Wigglesworth V.B. 1941). そのうち Tuft Organ は走査性電子顕微鏡による構造解析により、湿度の検出に関与する器官であることが報告されている(Steinbrecht R.A. 1994). また同様に構造解析によって、Pore Organ, Peg Organ が化学感覚に関連する器官であることが示唆されており、特に Peg Organ は薄いクチクラ層に多数の孔が空いた形状であり、構造的に Basiconic 型の嗅覚感覚子の構造と類似していることから、匂いの検出に関与する可能性が高いことが報告されている(Slifer E.H. *et al.*, 1980). しかしながらこの後、コロモジラミの嗅覚機能に関する研究は進んでおらず、匂いの検出に関与する感覚子および嗅覚機能の解明まで至っていなかった。その後 1990 年代にはゲノムプロジェクトが開始され、様々な生物種におけるゲノム解読の取り組みが進められてきた。コロモジラミにおいても同様にゲノム解読が進められ、2010 年に完了した全ゲノムの解読の結果、コロモジラミは 108Mb のゲノムサイズ中に 10 種類の嗅覚受容体(*PhOR*)候補遺伝子を所有することが明らかとなった(Kirkness E.F. *et al.*, 2010). キイロショウジョウバエは 180Mb,

ハマダラカは 278Mb, カイコガは 530Mb のゲノムサイズであることと比較すると, このゲノムサイズは非常に小さくなっている(Adams M.D. *et al.*, 2000; Holt R.A. *et al.*, 2002; Mita K. *et al.*, 2004; Xia Q. *et al.*, 2004). また, 他の昆虫種で同定されている OR の数(キイロショウジョウバエでは 62 種類, ハマダラカでは 79 種類, カイコガでは 66 種類)と比較しても, コロモジラミの OR の数は極端に少ない(Clyne P.J. *et al.*, 1999; Vosshall L.B. *et al.*, 1999; Gao Q. *et al.*, 1999; Fox A.N. *et al.*, 2001, 2002; Tanaka K. *et al.*, 2009; Hill C.A. *et al.*, 2002). しかしながらゲノム中に OR 遺伝子を所有していることから, コロモジラミも他の昆虫と同様に OR により環境中の匂い物質を検出している事が考えられる. さらに OR の所有数が極端に少ないことから, それぞれの OR は生体の嗅覚行動に与える影響が非常に大きいことが想定される. これらのことから, コロモジラミの OR の機能解析によって OR が応答を示す匂い物質を同定できれば, その匂い物質はコロモジラミ生体において忌避や誘引などの嗅覚行動を解発する可能性がある. このような OR の応答特性情報に基づいた忌避効果あるいは誘引効果をもつ匂い物質のスクリーニングは, 効率的な忌避剤や誘引剤の開発につながる事が考えられる.

本章では, まずコロモジラミ生体において発現している *PhOR* 遺伝子配列の単離・同定と雌雄のコロモジラミにおけるそれらの発現確認を実施した. 次にアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて機能的に発現している 5 種類の *PhOR* の匂い物質に対する応答特性解析を行い, *PhOR2* および *PhOR3* の匂い物質に対する応答特性を明らかにした. さらに第 2 章において確立したコロモジラミの匂い物質に対する行動解析手法を用いて, *PhOR2* または *PhOR3* が強い応答を示す匂い物質に対する嗅覚行動を解析した. *PhOR2* または *PhOR3* が応答を示す匂い物質のコロモジラミ生体に対する効果を評価することによって, コロモジラミ生体に対して忌避または誘引効果をもつ匂い物質を同定した. 最後に, 匂い物質に対する OR の応答性と行動の関係性を見出すため, *PhOR* の匂い物質に対する応答値と行動解析評価の指標とした SF の比較を行い, OR の応答と行動における関係性を見出した.

3.2 材料と方法

3.2.1 供試昆虫

本章では 2.2.1 と同様のコロモジラミ成虫を使用した。遺伝子の単離には-20°Cの冷凍庫にて保存したコロモジラミを、行動試験には 2.2.1 と同様のコロモジラミの雌雄を用いた。後述の 3.3.2 の RT-PCR の結果から、PhOR2 が応答する匂い物質に対しては雄のコロモジラミを、PhOR3 が応答する匂い物質に対しては雄および雌のコロモジラミを用いた。

3.2.2 cDNA 合成と嗅覚受容体候補遺伝子の単離

コロモジラミから分離した触角を含む頭部を TRIZOL Reagent (Thermo Fisher Scientific)内にて破碎し、製品プロトコルに従って total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA は Recombinant DNase I (RNase-free) (TAKARA)での処理後、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TAKARA)を用いた cDNA 合成に用いた。逆転写反応は 1µg の total RNA から oligo-dT Adaptor Primer および AMV Reverse Transcriptase を用いて 42°C30 分間、99°C5 分間の条件にて実施した。合成した cDNA は使用まで-20°Cにて保存した。NCBL のデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)から入手した *PhOR* 候補遺伝子の配列から、各遺伝子配列に特異的なプライマーを作成し、合成した cDNA から KOD FX Neo (TOYOBO)を用いて、各候補遺伝子の全長配列の PCR による増幅を行った。PCR は 94 °C2 分間(1 サイクル), 94°C10 秒間, アニーリング(温度は表 3-1 に記載)30 秒間, 68°C 90 秒間(40 サイクル)の条件にて実施した。使用したプライマーおよび各候補遺伝子のアニーリング温度は表 3-1 に示す。

増幅した PCR 産物に 10x A-attachment mix (TAKARA)を添加し、60°C30 分間で反応させて末端に dA を付加した後、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)の製品プロトコルに従い PCR 産物の精製を行った。精製した PCR 産物を用いて pGEM® -T Vector Systems (Promega)の製品プロトコルに従い、pGEM-T-Easy Vector へ遺伝子断片のサブクローニングを行った。単離した遺伝子配列は ABI310 genetic analyzer (Applied Biosystems)を用いて、配列決定を行った。決定した PhOrco の配列を用いて NCBL (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)から入手した 25 種の昆虫の Orco と、PhOR の配列を用いてトコジラミ(*Cimex lectularius*), オオサシガメ(*Rhodnius prolixus*), コアオカスミカメ(*Apolygus lucorum*)の OR 配列と ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>, Thompson J.D. *et al.*, 1994) によりアライメントを行った後、MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>, Tamura K. *et al.*, 2013)を用い

て近隣結合法による系統樹を作成した．膜貫通領域はの予測は TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)を用いて行った．

3.2.3 RT-PCR による組織での発現確認

各 *PhOR* 遺伝子の増幅は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TAKARA)と 3.2.2 にて合成した cDNA を用いて行った．3.2.2 で得られた全長配列をもとにして各遺伝子の配列特異的なプライマーを作成した(表 3-2)．コロモジラミの触角を含む頭部の発現確認の PCR は 94°C 2 分間(1 サイクル)，94°C 30 秒間，55°C 1 分間，72°C 1 分間(30~40 サイクル)，72°C 5 分間(1 サイクル)の条件にて実施した．増幅された PCR 産物は Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc.)を用いた電気泳動により解析した．コロモジラミ雌雄間における発現確認の PCR は 94°C 2 分間(1 サイクル)，94°C 30 秒間，アニーリング(55~58°C)1 分間，72°C 1 分間(30~40 サイクル)，72°C 5 分間(1 サイクル)の条件にて実施した．増幅された PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いた電気泳動の後，臭化エチジウムにより染色し可視化した．RT-PCR におけるポジティブコントロールとして *GAPDH* 遺伝子を用いた．この遺伝子に対する増幅に用いたプライマーについても表 3-2 に示す．

3.2.4 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による機能解析

ステージ V~VI のメスアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)から卵塊を摘出し，1.5mg/ml のコラゲナーゼ(Wako)を含む Ca²⁺-free のバッファ(55mM NaCl, 0.6mM KCl, 1.5mM NaHCO₃, 0.5mM MgSO₄, 47mM Tris base, pH7.6)中で 20°C 1.5 時間処理した．処理後の卵母細胞は Modified Barth's solution [0.2mM Ca(NO₃)₂, 0.26mM CaCl₂, 55mM NaCl, 0.6mM KCl, 1.5mM NaHCO₃, 0.5mM MgSO₄, 47mM Tris base, pH7.6]にて一日間培養した後，cRNA のインジェクションを実施した．cRNA は，*PhOR* 遺伝子をクローニングした pOHE72T ベクターから mMESSAGE mMACHINE (Ambion)を用いて合成した．合成した *PhOR* 遺伝子とコロモジラミ嗅覚受容体共役受容体(*Pediculus humanus corporis* Olfactory receptor co-receptor; *PhOrco*)遺伝子の cRNA は，各 25ng ずつ卵母細胞にインジェクションを行った．インジェクション後の卵母細胞は Modified Barth' solution 中で 20°C にて 2~3 日間保存した．卵母細胞の全電流は二電極膜電位固定法 [Oocyte Clamp: OC-725C (Warner)]により測定を行った．データは Digidata1322A (Molecular Devices)および pCLAMP ver.10.1 (Axon Instrument)を用いて取得した．匂い物質の混合物はそれぞれ

表 3- 1. PhOR の cDNA 単離用プライマー.

遺伝子名	Accession ID	Forward primer	Reverse primer	Tm 値
<i>PhOR2</i>	XM_002425826.1	5'-atgaaaaatcatatagatctt cacatacatag-3'	5'-tcaaggaatatatTTTTtagaa ttgttcagttg-3'	57.9°C
<i>PhOR3</i>	XM_002429325.1	5'-atggaggagttaccggata c-3'	5'-ttattttcgtctctgattgaagt aaaaatg-3'	57.9°C
<i>PhOR4</i>	XM_002427388.1	5'-atgagttttcaattggattat ttaaatgcg-3'	5'-ttaatgtttctcgccgttgata tg-3'	60°C
<i>PhOR5</i>	XM_002427389.1	5'-atggaaaaaaatttgaaaa tcacgtttattcg-3'	5'-ctaattgtatttttctctcatta ttgccc-3'	62°C
<i>PhOR6</i>	XM_002423665.1	5'-atgaaatcaaatttaacgaa ttttttttc-3'	5'-ttacttgattcaaattgtcttatt aacataag-3'	57.9°C
<i>PhOR7</i>	XM_002432724.1	5'-atggaagaaaataataattt atctaattctcc-3'	5'-ttatttagattccaattgccaa aaaaacataag-3'	57.9°C
<i>PhOrco</i>	XM_002425617.1	5'-atgggaaagtacaaacctc ac-3'	5'-ttatttcagttgaactaaaacc atgaaatag-3'	62°C

表 3- 2. RT-PCR 用プライマー.

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer	増幅断片長
<i>PhOR2</i>	5'-gcaagaggagcagtcgttg-3'	5'-gctgagaaatggtgatgatattttatta aaatc-3'	210bp
※ <i>PhOR3-1</i>	5'-gtatagaatccgtgagtgatagtatta ac-3'	5'-gcatgaagataatcaaccataacgg -3'	199bp
※ <i>PhOR3-2</i>	5'-ccgttatggttgattatcttcatgc-3'	5'-cctgtaccagggtaaatcg-3'	221bp
<i>PhOR4</i>	5'-cgtcagcgtttacgtctatc-3'	5'-ccgtccaacaaattcAAAAAGTg- 3'	215bp
※ <i>PhOR5-1</i>	5'-gatacacactaatggtcacattgatac- -3'	5'-caacgtaaataattttccaagcggtaa tg-3'	204bp
※ <i>PhOR5-2</i>	5'-gcatcaaaagacaattggaattg gacg-3'	5'-gatcaaatgtgaccattagtgtgta tc-3'	189bp
<i>PhOR6</i>	5'-gtcaatgatgacgtcacacc-3'	5'-gttgatcctccgattattgtacg-3'	200bp
※ <i>PhOR7-1</i>	5'-gcacaacaagctgtttatctgttc-3'	5'-ccagccgtgattctcggttg-3'	200bp
※ <i>PhOR7-2</i>	5'-atggaagaaaataataattatctaata tctcc-3'	5'-ttatttagattccaattgccccaaaaa cataag-3'	1236bp
※ <i>PhOrco-1</i>	5'-cttatgacgatagtcggttg-3'	5'-cacttccggatccgaaattg-3'	195bp
※ <i>PhOrco-2</i>	5'-atgggaaagtacaaacctcac-3'	5'-ttatttcagttgaactaaaaccatgaa atatg-3'	1428bp
<i>GAPDH</i>	5'-cagggaaattatggagagatgg-3'	5'-cgcatatgtagccggttg-3'	195bp

※触角での発現確認には 1 を，雌雄間での発現確認には 2 のプライマーセットを使用.

れの匂い物質をジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide; DMSO)にて各 300mM に調整した後, 1%DMSO 濃度となるように灌流液(96mM NaCl, 2.0mM KCl, 5.0mM HEPES, 1.8mM CaCl₂, 1.6mM MgCl₂, Tris base, pH7.5)にて目的濃度(3mM)に希釈したものをを用いた. 混合物に用いた匂い物質 66 種類は表 3-3 (Shirasu M. *et al.*, 2014)に, それ以外にヒトの体臭の含有成分として報告されている匂い物質や第 2 章で用いた匂い物質 24 種類(表 3-4)を応答測定に用いた. 各匂い物質はそれぞれ DMSO にて 100mM に調整した後, 1%DMSO 濃度となるように灌流液にて目的濃度に希釈したものをを用いた. 測定における刺激は 160 μ l のバッファ中に 40 μ l の濃度調整済みの溶液を添加することで行った. 内部電流は -80mV に保持した電圧で刺激に対する応答を測定した.

アフリカツメガエル卵母細胞発現系にて取得した匂い物質に対する電流値の変化値は最も強く応答を示した匂い物質(PhOR2: cyclododecanol, PhOR3: dodecanal)の電流値の変化値を用いて標準化を行った(Normalized amplitude). 濃度応答曲線は Python (<http://python-xy.github.io/>)を用いて Hill 関数式(Hill A.V. 1910)へのフィッティングを行った.

3.2.5 アフリカツメガエル卵母細胞における嗅覚受容体の発現確認

3.2.4 と同手順で生体から単離した遺伝子配列の C 末端の終止コドン直前に FLAG タグ配列(5'- GATTATAAAGATGATGATGATAAG-3'; Hopp T.P. *et al.*, 1988)を付加した PhOR の cRNA のアフリカツメガエル卵母細胞へのインジェクションを行った. インジェクション 3 日後の卵母細胞 50 個を PBS (137mM NaCl, 8.1mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.68mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, pH7.4)にて 3 回洗浄した後, 500 μ L の Lysis バッファ[150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH8.0), 1% polyoxyethylene octylphenyl ether (IGEPAL CA-630), コンブリートプロテアーゼインヒビターカクテル(Roche)]内で破碎した.十分に破碎した後, 1,000 \times g, 4 $^{\circ}$ Cにて 10 分間の遠心処理を行い, 上清を 1.5mL チューブへと回収した. FLAG タグを付加した PhOR は 1 μ g の Monoclonal ANTI-FLAG[®] M2 antibody produced in mouse (Sigma)と 4 $^{\circ}$ Cにて 1 時間免疫沈降させた後, Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GEヘルスケア)の製品プロトコルに従い, 回収し, 2 \times ラウリル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate; SDS)-ポリアクリルアミドゲル(polyacrylamide gel; PAGE)サンプルバッファ [125mM Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20% glycerine, 10% 2-mercaptoethanol]に溶解した. 回収したタンパク質は Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)の製品プロトコルに従い濃度測定を行った. 12,000 \times g で 1 分間遠心処理を行い回収した上清を 15%の SDS-ポリアクリルアミドゲル(Atto Corporation)にて分離した.

表 3- 3. 匂い物質の混合物とそれに含まれる匂い物質.

分類	匂い物質	CAS	分類	匂い物質	CAS
アミン系	1,4-diaminobutane	110-60-1	エステル系	2-phenethyl acetate	103-45-7
	Triethylamine	121-44-8		Isoamyl propionate	105-68-0
	Aniline	62-53-3		Octyl acetate	112-14-1
	Pyridine	110-86-1		Nonyl acetate	143-13-5
	Isoamylamine	107-85-7	テルペン系	(+)-fenchone	4695-62-9
	N,N-diethyl-m-toluamide	134-62-3		(-)- β -pinene	18172-67-3
	2,5-dimethylpyrazine	123-32-0		α -ionone	127-41-3
	Tyramine	51-67-2		Myrcene	123-35-3
アルコール系	1-butanol	71-36-3	大環状ケトン系	(E)- β -farnesene	502-61-4
	1-octanol	111-87-5		(+)-pulegone	89-82-7
	2-ethyl hexanol	104-76-7		Cyclododecanol	1724-39-6
	1-decanol	112-30-1	Cyclopentadecanol	4727-17-7	
	1-dodecanol	112-53-8	5-cyclohexadecen-1-one	37609-25-9	
	5-nonanol	623-93-8	Cyclohexanone	108-94-1	
	2-methyl-1-propanol	78-83-1	Cyclopentadecanone	502-72-7	
アルデヒド系	Dodecanal	112-54-9	バニリン系	Cyclododecanone	830-13-7
	Butyraldehyde	123-72-8		Vanillin	121-33-5
	Hexanal	66-25-1		Vanillin acetate	881-68-5
	Octanal	124-13-0		Isovanillin	621-59-0
	Decanal	112-31-2		O-vanilline	148-53-8
	(2E,4E)-2-4-decadienal	25152-84-5		4-methoxy-3-methylbenzaldehyde	32723-67-4
カルボン酸系	Butyric acid	107-92-6	ケトン系	3,4-dimethylbenzaldehyde	5973-71-7
	Decanoic acid	334-48-5		Diethyl ether	60-29-7
	Octanoic acid	124-07-2		3-pentanone	96-22-0
	Nonanoic acid	112-05-0		3-methyl-1-butanol	123-51-3
	Hexanoic acid	142-62-1		2-heptanone	110-43-0
ラクトン系	γ -dodecanolactone	2305-05-7	ベンゼン系	2-nonanone	821-55-6
	γ -decanolactone	706-14-9		Benzene	71-43-2
	γ -butyrolactone	96-48-0		2-phenylethyl alcohol	60-12-8
	γ -octanolactone	104-50-7		Allylbenzene	300-57-2
	γ -undecalactone	104-67-6		Ethyl benzoate	93-89-0
エステル系	Ethyl laurate	106-33-2		2-phenethyl acetate	103-45-7
	Octyl butyrate	110-39-4		Anisole	100-66-3

表 3- 4. アフリカツメガエル卵母細胞発現系での応答測定に用いた匂い物質.

分類	匂い物質	CAS
アミン系	Cadaverine	462-94-2
	Indole	120-72-9
	3-methylindole	83-34-1
アルコール系	3,5,5-trimethyl-1-hexanol	3452-97-9
	1-octen-3-ol	3391-86-4
	1-nonanol	143-08-8
	cis-2-hexen-1-ol	928-94-9
アルデヒド系	Nonanal	124-19-6
カルボン酸系	Dodecanoic acid	143-07-7
エステル系	Ethyl formate	109-94-4
	Ethyl propionate	105-37-3
	Methyl propionate	554-12-1
テルペン系	(±)-citronellal	106-23-0
	Geraniol	106-24-1
	(±)-Camphr	76-22-2
	(±)-terpinen-4-ol	20126-76-5
	1,8-cineole	470-82-6
芳香族化合物	Eugenol	97-53-0
	Eugenol acetate	93-28-7
	4,5-dimethylthiazole	3581-91-7
大環状ケトン系	2-methylcyclopentanone	1120-72-5
	3-methylcyclopentanone	1757-42-2
ベンゼン系	2,3-dimethylphenol	526-75-0
	4-methylcyclohexanol	589-91-3
	1-phenylethanol	98-85-1
ケトン系	6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0
	4-methyl-3-penten-2-one	141-79-7
	2-butanone	78-93-3

FLAG FLAG タグを付加した PhOR は転写バッファ(48mM Tris base, 39mM glycine)内でポリフッ化ビニリデン(polyvinylidene difluoride; PVDF)膜に転写し, PBST (137mM NaCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 2.7mM KCl, 1.4mM KH₂PO₄, 0.1%TWEEN20)にて洗浄後, Amersham ECL Prime Blocking Reagent (GE ヘルスケア)の製品プロトコルに従いブロッキングを行った. 以降の洗浄工程は全て PBST を用いて実施した. 洗浄後 Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO)に希釈した Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (1:1,000)と 1 時間静置し, 一次抗体と結合させた. その後洗浄し, さらに Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO)に希釈した 1:10,000 Anti Mouse IgG, HRP-linked Whole Antibody と 1 時間静置し, 二次抗体と結合させた. 洗浄後, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent にて発光させた後, ImageQuant LAS 500 (GE ヘルスケア)にて撮影した. ウェスタンブロッティングにおけるポジティブコントロールとして FLAG 配列を付加したコナガ (*Plutella xylostella*) の嗅覚受容体遺伝子 (*Plutella xylostella* Olfactory receptor; PxOR)1 を用いた(Misawa N. *et al.*, 2010).

3.2.6 匂い物質に対する行動試験および画像解析による行動解析法

PhOR が応答を示した匂い物質に対する行動試験は 2.2.3 で確立した手法を用いて実施した. 各匂い物質はアセトンにて目的濃度(0.01, 0.1, 0.1, 1.0%v/v)に希釈し, 行動試験に用いた.

3.3 結果

3.3.1 嗅覚受容体候補遺伝子の単離

PhOR 候補遺伝子として報告されている 10 種類の遺伝子配列のうち 1 種類は OBP であることから、この遺伝子配列を除いた 9 種類を対象とした。*PhOR* 遺伝子の遺伝子配列を単離するために、NCBI のデータベースから 9 種類の *PhOR* 遺伝子配列を取得した。さらに他の生物種で機能解析が進んでいる OR の遺伝子配列長(1000~1500bp)を参考にし、非常に短く部分配列の可能性がある 570bp, 774bp の遺伝子配列は今回の対象から除外して 7 種類の *PhOR* 遺伝子を対象に遺伝子配列の単離を行った。7 種類の取得した *PhOR* 遺伝子配列から作製したプライマーを用いて PCR を行い、*PhOR* 遺伝子配列を単離し、*PhOR* の cDNA 配列を決定した。*PhOR2* は全長配列が 1221bp でデータベース上の配列と 1207bp 一致した。単離した遺伝子配列は 406 アミノ酸残基をコードしており、データベース上の配列のものと 98%一致した。以下、同様に *PhOR3* は全長配列 1314bp, 1286bp 一致, 437 アミノ酸残基で 96%一致, *PhOR5* は 1209bp, 1192bp 一致, 402 アミノ酸残基で 98%一致, *PhOR6* は 1260bp, 1222bp 一致, 418 アミノ酸残基で 97%一致, *PhOR7* は 1236bp, 1215bp 一致, 411 アミノ酸残基で 95%一致, *PhOrco* は 1416bp, 1428bp 一致, 475 アミノ酸残基で 100%一致であった。同定した *PhOR* 遺伝子配列がコードするアミノ酸配列は NCBL のデータベース中のアミノ酸配列と 95~98%の範囲で一致する一方, *PhOrco* 遺伝子配列がコードするアミノ酸配列はデータベースのアミノ酸配列と 100%一致した。*PhOR* の遺伝子配列にはコロモジラミの系統により一塩基置換などを含めた多少の変異があるものの、昆虫種間で保存性が高い Orco ファミリー(Krieger J. *et al.*, 2003; Jones W.D. *et al.*, 2005) である *PhOrco* の遺伝子配列はコロモジラミ系統間においても保存性が高く、少なくとも Orlando 系統と NIID 系統の *PhOR* に関する遺伝的背景の違いは、その遺伝子配列中にわずかな変異がある程度であった。*PhOR4* に関しては、1203bp の塩基長の遺伝子配列が単離できたものの、アミノ酸配列中にナンセンス変異が生じており、コロモジラミ生体からはタンパク質として機能していると想定される配列の単離を行うことはできなかった。これらのことから、*PhOR4* を除くコロモジラミ生体で機能していると想定される 5 種類の *PhOR* および *PhOrco* の遺伝子配列を単離した。単離した各アミノ酸配列が OR として機能している可能性を検証するため、それらの膜貫通領域の予測を行ったところ、単離した *PhOR* および *PhOrco* において 7 つの膜貫通領域が予測された。このことから、単離した遺伝子配列のアミノ酸配列は 7 回膜貫通構造を形成し、OR として機能することが示唆された。

単離した遺伝子配列を用いて他種の昆虫種とのアミノ酸配列の比較を行うため、分子系統樹の作成を行った。まず、昆虫種間で保存性が高い *Orco* を対象にし、*PhOrco* のアミノ酸配列を他の昆虫種の *Orco* のアミノ酸配列と比較した。その結果、*PhOrco* はトコジラミなどの吸血性昆虫を含むカメムシ目の昆虫の *Orco* とクラスターを形成した(図 3-1A)。さらに *Orco* のアミノ酸配列の分子系統樹において、*PhOrco* とクラスターを形成したカメムシ目のうち、NCBL のデータベースから取得できた OR(トコジラミ: *ClOR*, オオサシガメ: *RpOR*, コアオカスミカメ: *AlOR*)のアミノ酸配列との分子系統樹を作成し、OR の比較を行った。その結果、*PhOR2* および *PhOR3* は他種の OR とクラスターを形成せず、本研究で用いたカメムシ目の OR の中にはアミノ酸配列が類似した OR が存在しないことが示唆された(図 3-1B)。また、*PhOR4, 5, 6, 7* の 4 種類はこれらのみでクラスターを形成したこと(図 3-1B)から、コロモジラミ特有の OR であることが示唆された。

3.3.2 RT-PCR による嗅覚受容体候補遺伝子の発現解析

コロモジラミ生体において機能発現していると想定される *PhOR* を選抜するため、*PhOR* 遺伝子の触角を含む頭部での発現を RT-PCR 法により確認した。その結果、7 種類の *PhOR* において目的断片長の増幅が確認された(図 3-2A)。このことから、7 種類の *PhOR* は触角を含む頭部において発現していることが示され、コロモジラミは環境下の匂い物質の検出にこれらの OR を用いていることが示唆された。また、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* においても目的断片長の増幅が確認されたことから、total RNA が適切に抽出されていることが示された。さらに *PhOR* の性特異的発現を検証するため、*PhOR4* を除くコロモジラミ生体で機能していると想定される 5 種類の *PhOR* のコロモジラミ雌雄における発現を RT-PCR 法により確認した。その結果、*PhOR2, 5, 6, 7* および *PhOrco* は雌雄両方において目的断片長が増幅された。また、*PhOR3* は雌において優勢的に増幅された(図 3-2B)。これらのことから、*PhOR2, 5, 6, 7* の 4 種類は雌雄共通で発現しているが、*PhOR3* は雌雄で発現量が異なっていることが示唆された。

3.3.3 アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による *PhOR* の機能解析

3.3.2 で触角を含む頭部において発現が確認された 7 種類の *PhOR* のうち、*PhOR4* の遺伝子配列中にはナンセンス変異が生じていることが 3.3.1 にて示した。そこで機能的に発現していると想定される 5 種類の *PhOR* (*PhOR2, 3, 5, 6, 7*)の機能同定のため、3.3.1 で得ら

A

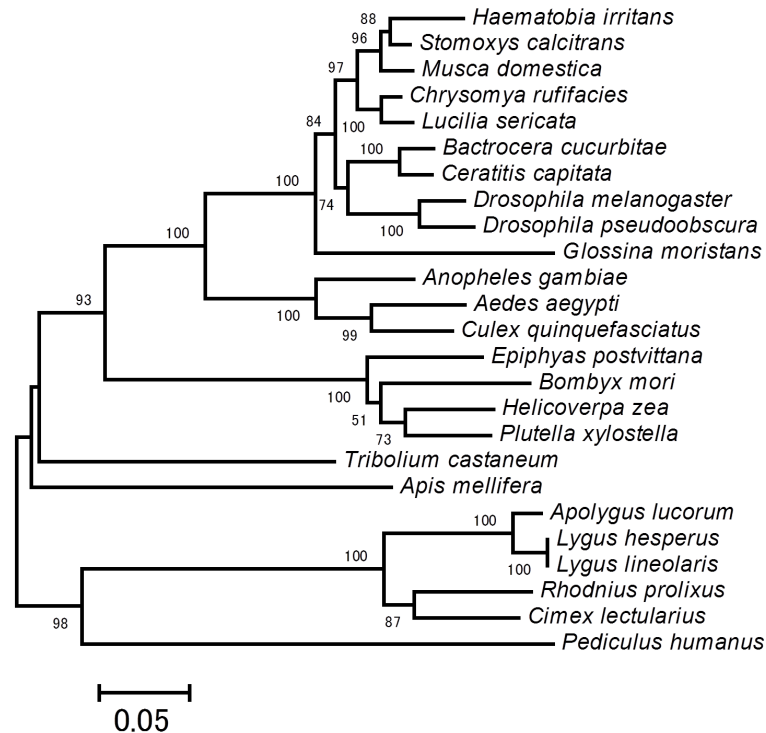


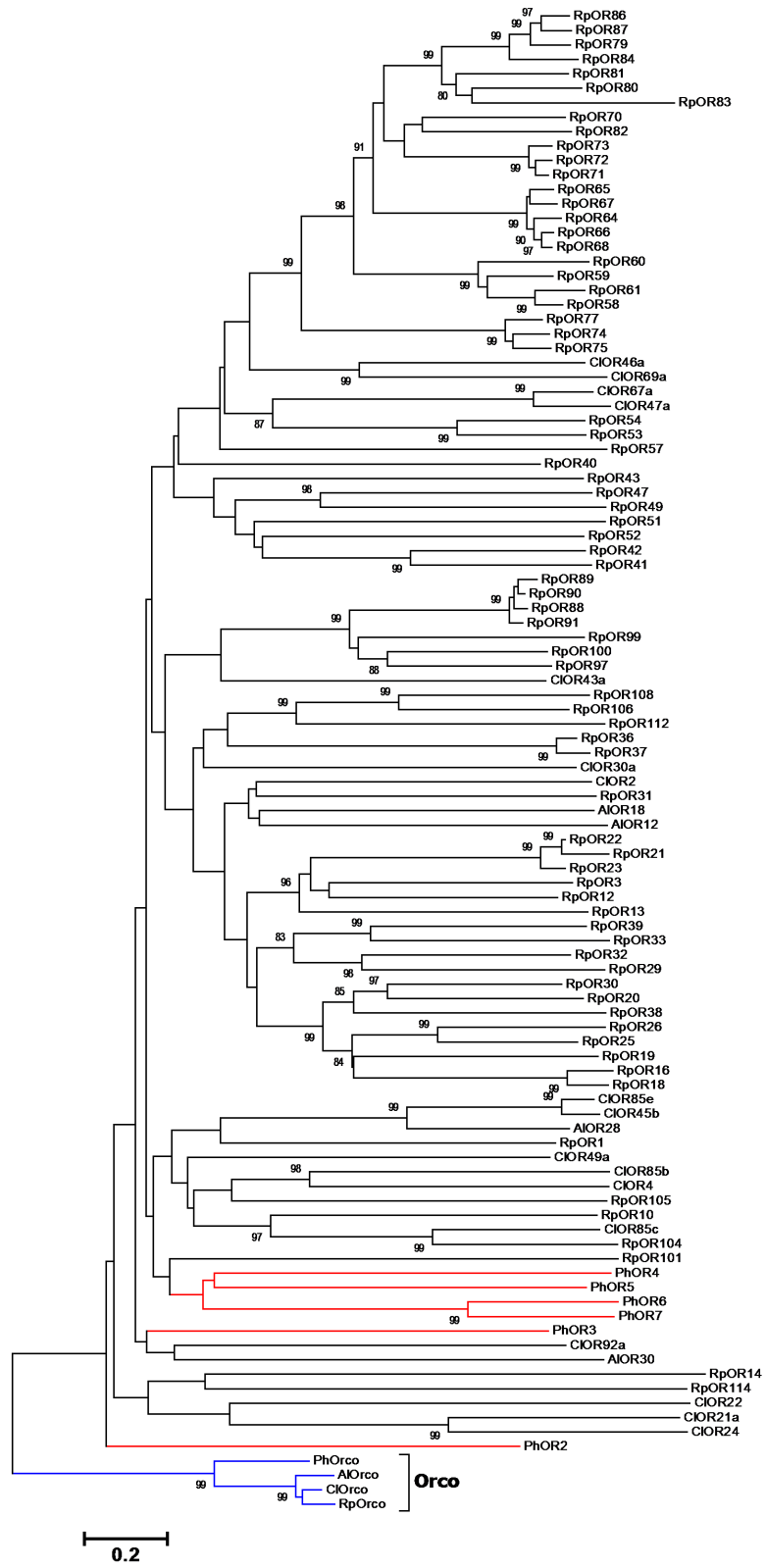
図 3- 1. 近隣接合法による分子系統樹.

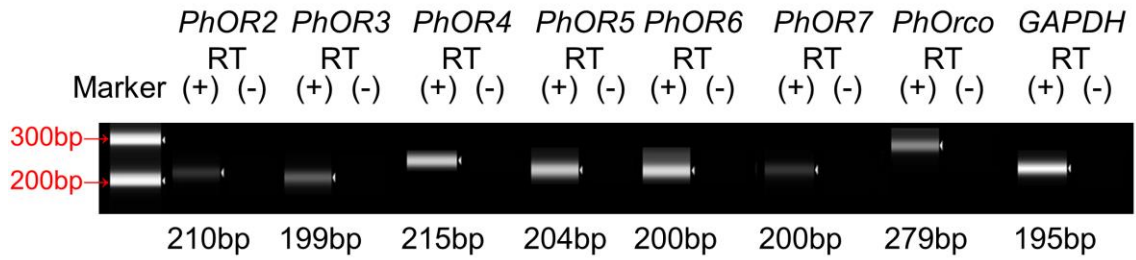
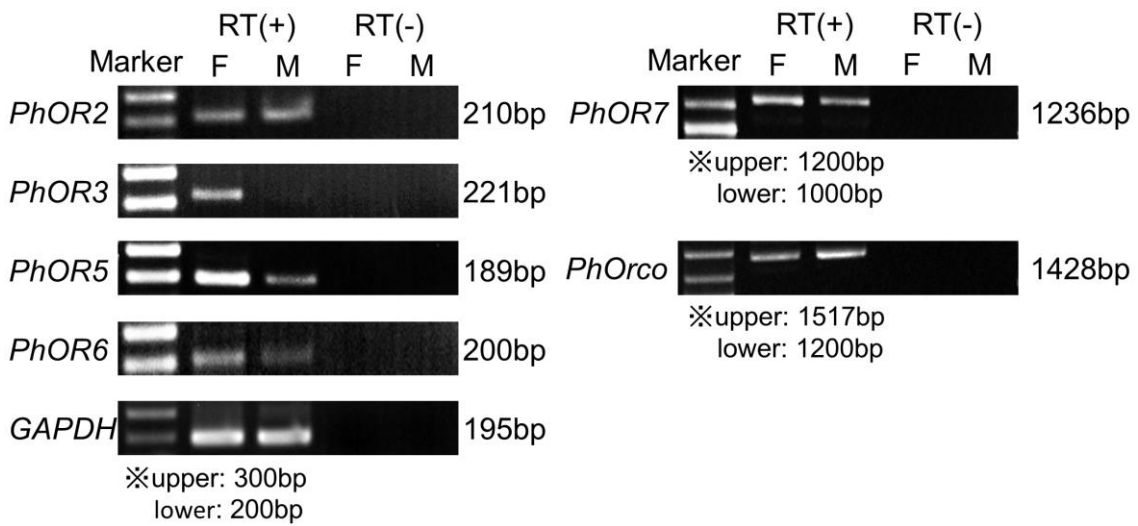
Bootstrap 値は 1,000replicate で算出した%値を示す. 枝長は下部のスケールに対応する.

A: 各昆虫種の Orco の分子系統樹. Accession numbers; *Pediculus humanus* (PhOrco): XP_002425662, *Aedes aegypti*: XP_001651426, *Anopheles gambiae*: AAX14774, *Apis mellifera*: NP_001128415, *Apolygus lucorum*: RPRC000476-PA, *Bactrocera cucurbitae*: ADK97803, *Bombyx mori*: NP_001037060, *Ceratitis capitata*: AAX14775, *Chrysomya rufifacies*: AFH96943, *Cimex lectularius*: KM275232, *Culex quinquefasciatus*: EDS33240, *Drosophila melanogaster*: Q9VNB5, *Drosophila pseudoobscura*: EAL28510, *Epiphyas postvittana*: ACJ12928, *Glossina moristans*: GMOY005610, *Haematobia irritans*: ACF21678, *Helicoverpa zea*: AAX14773, *Lucilia sericata*: AEA30005, *Lygus hesperus*: AFX73447, *Lygus lineolaris*: AFX73448, *Musca domestica*: AFH96944, *Plutella xylostella*: BAG71421, *Rhodnius prolixus*: RPRC000476-PA, *Stomoxys calcitrans*: ACF21677, *Tribolium castaneum*: CAM84014.

B: PhOR とカメムシ目の昆虫種の OR の分子系統樹. 赤枝: PhOR, 青枝: Orco.

B



A**B****図 3- 2. RT-PCR による発現解析.**

A: コロモジラミ成虫頭部(触角含む)における各遺伝子の発現確認.

B: コロモジラミ雌雄間における各遺伝子の発現確認. F: コロモジラミ雌, M: コロモジラミ雄.

れた各 PhOR と PhOrco の cDNA 配列を共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、匂い物質に対する応答を測定した。各 PhOR と PhOrco を共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞は匂い物質の混合物で刺激した後、応答を示した混合物中の単一成分ごとに刺激を行うことにより、匂い物質に対する応答を測定し、匂い物質に対する応答特性を解析した。この応答特性解析で実施した工程を図 3-3 に示す。

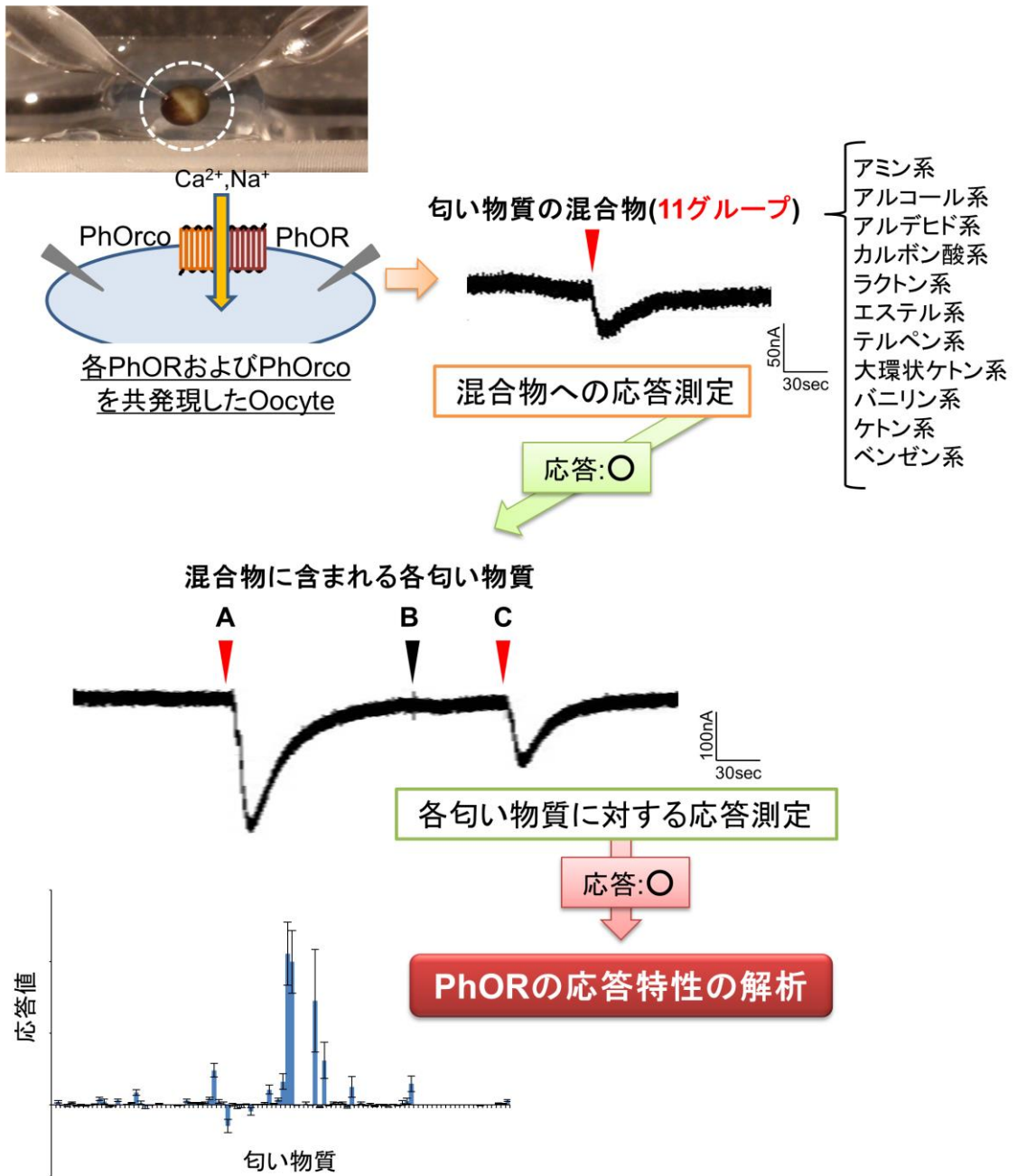


図 3- 3. 匂い物質に対する応答測定手順.

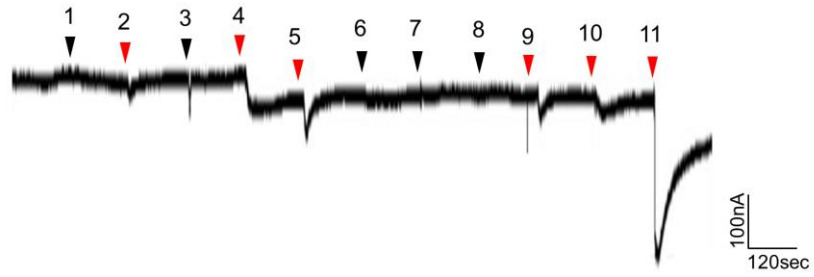
PhOR2 の応答

PhOR2 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞が応答を示す匂い物質の種類を特定するため、匂い物質の混合物に対する応答を測定した。その結果、共発現細胞はアルコール系、アルデヒド系、ベンゼン系、テルペン系、バニリン系、大環状ケトン系に対して応答を示し、特に大環状ケトン系に対しては非常に強い応答を示した(図 3-4A)。この応答を示した混合物の匂い物質の中から PhOR2 のリガンドを特定するため、混合物に含まれるそれぞれの匂い物質ごとによる刺激を行い、その応答測定を行った。各匂い物質 1mM による刺激の結果、PhOR2 は 2-ethyl-hexanol, hexanal, octanal, decanal, 2-phenylethyl alcohol, anisole, (+)-fenchone, 3,4-dimethylbenzaldehyde, o-vanillin, cyclododecanol, cyclohexanone, cyclododecanone に対して応答を示すことが明らかとなった(図 3-4B, C)。匂い物質の混合物の中には 66 種類の匂い物質しか含まれていないことから、さらに PhOR2 が応答を示す匂い物質を探索するため、その他の匂い物質に対する共発現細胞の応答測定を行った。その結果、共発現細胞は 3,5,5-trimethyl-1-hexanol, indole, 3-methylindole, 2,3-dimethylphenol, 4-methylcyclohexanol, 1-phenylethanol に対しても応答を示すことが明らかとなった(図 3-4D)。また、PhOR2 は hexanal, octanal, decanal と炭素数がそれぞれ 7, 8, 10 の直鎖のアルデヒドの 3 種類に対して応答を示したことから、これらのアルデヒドと炭素数が近い炭素数 9 の nonanal に対しても応答することが想定された。そこで、これら 4 種類のアルデヒドに対する応答を測定した結果、共発現細胞は nonanal に対しても hexanal と同程度の強度で応答を示すことが明らかとなった(図 3-4E)。これらの結果から取得した PhOR2 の匂い物質に対する選択性および有意な応答を示した匂い物質の構造について図 3-5 に示す。PhOR2 が強い応答を示す匂い物質には、cyclododecanol, 2,3-dimethylphenol, 4-methylcyclohexanol など環状構造を有する匂い物質が多く含まれる傾向にあった(図 3-5)。

PhOR2 が強い応答を示した cyclododecanol, 2,3-dimethylphenol, 4-methylcyclohexanol, octanal, 1-phenylethanol, (+)-fenchone, 3,4-dimethylbenzaldehyde および indole に対する応答感度を明らかにするため、PhOR2 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、これらの匂い物質に対する濃度依存応答を測定した。その結果、PhOR2 が最も強く応答を示した cyclododecanol に対しては 100nM の濃度においても有意な応答を示し(図 3-6)、その EC_{50} は 12.0 μ M であった。同様に試行した全ての匂い物質に対して PhOR2 は濃度依存応答を示し(図 3-6)、その EC_{50} は 2,3-dimethylphenol: 326.0 μ M, 4-methylcyclohexanol: 1030.0 μ M, 1-phenylethanol: 1419.2 μ M, (+)-fenchone: 442.2 μ M,

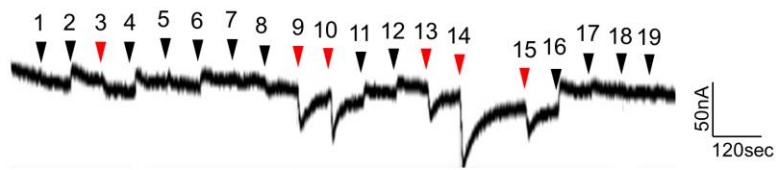
A

PhOR2+PhOrco



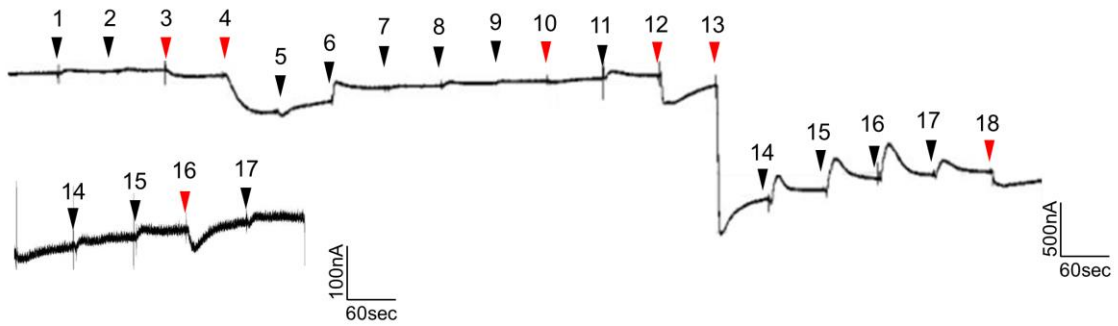
B

PhOR2+PhOrco



C

PhOR2+PhOrco



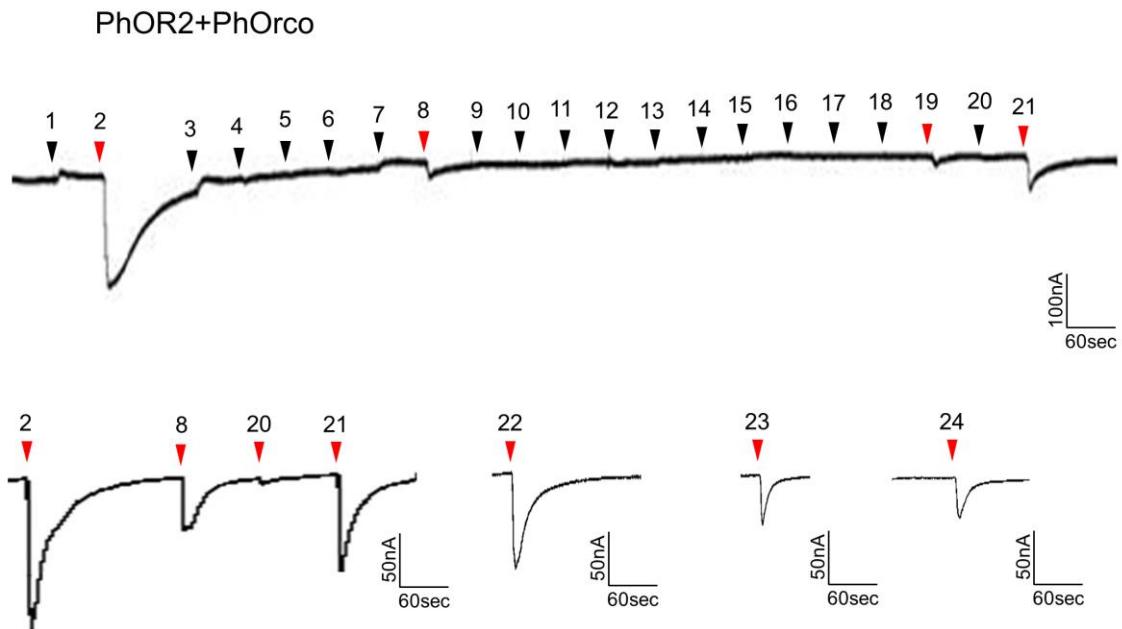
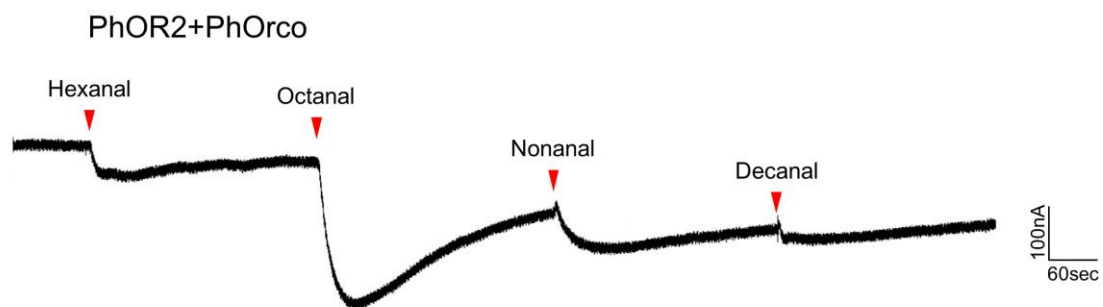
D**E**

図 3- 4. PhOR2 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による応答測定。

A: 匂い物質の混合物に対する電流値変化. 匂い物質の混合物; 1: カルボン酸系, 2: アルコール系, 3: アミン系, 4: アルデヒド系, 5: ベンゼン系, 6: エステル系, 7: ケトン系, 8: ラクトン系, 9: テルペン系, 10: バニリン系, 11: 大環状ケトン系. 各匂い物質が 3mM となるように灌流液(DMSO1%)にて希釈し使用. 赤矢印は応答を示した匂い物質の混合物を示す.

B: 匂い物質の混合物に含まれる各匂い物質に対する電流値変化. 匂い物質; 1: 1-butanol, 2: 1-octanol, 3: 2-ethyl hexanol, 4: 1-decanol, 5: 1-dodecanol, 6: 5-nonanol, 7: 2-methyl-1-propanol, 8: Benzene, 9: 2-phenylethyl alcohol, 10: Allylbenzene, 11: Ethyl benzoate, 12: 2-phenethyl acetate, 13: Anisole, 14: (+)-fenchone, 15: (-)- β -pinene, 16: α -ionone, 17: Myrcene, 18: (E)- β -farnesene, 19: (+)-pulegone. 各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%). 赤矢印は応答を示した匂い物質を示す.

C: 匂い物質の混合物に含まれる各匂い物質に対する電流値変化. 匂い物質; 1: Dodecanal, 2: Butyraldehyde, 3: Hexanal, 4: Octanal, 5: Decanal, 6: (2E,4E)-2,4-decadienal, 7: Vanillin, 8: Vanillin acetate, 9: Isovanillin, 10: O-vanilline, 11: 4-methoxy-3-methylbenzaldehyde, 12: 3,4-dimethylbenzaldehyde, 13: Cyclododecanol, 14: Cyclopentadecanol, 15: 5-cyclohexadecen-1-one, 16: Cyclohexanone, 17: Cyclopentadecanone, 18: Cyclododecanone. 各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%). 赤矢印は応答を示した匂い物質を示す.

D: 匂い物質の混合物に含まれていない各匂い物質に対する電流値変化. 匂い物質; 1: Eugenol, 2: 3,5,5-triethyl-1-hexanol, 3: 6-methyl-5-hepten-2-one, 4: 4-methyl-3-penten-2-one, 5: 2-methyl cyclopentanone, 6: 3-methyl cyclopentanone, 7: Eugenol acetate, 8: Indole, 9: 2-butanone, 10: (\pm)-citronellal, 11: Geraniol, 12: 1-octen-3-ol, 13: 1-Nonanol, 14: Cadaverine, 15: γ -decalactone, 16: Ethyl formate, 17: Ethyl propionate, 18: Methyl propionate, 19: 4,5-dimethylthiazole, 20: cis-2-hexen-1-ol, 21: 3-methyl indole, 22: 2,3-dimethylphenol, 23: 4-methylcyclohexanol, 24: 1-phenylethanol. 各匂い物質が 1mM となるように灌流液(DMSO1%)にて希釈し使用. 赤矢印は応答を示した匂い物質を示す.

E: アルデヒドに対する電流値変化. 各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%). 赤矢印は応答を示した匂い物質を示す.

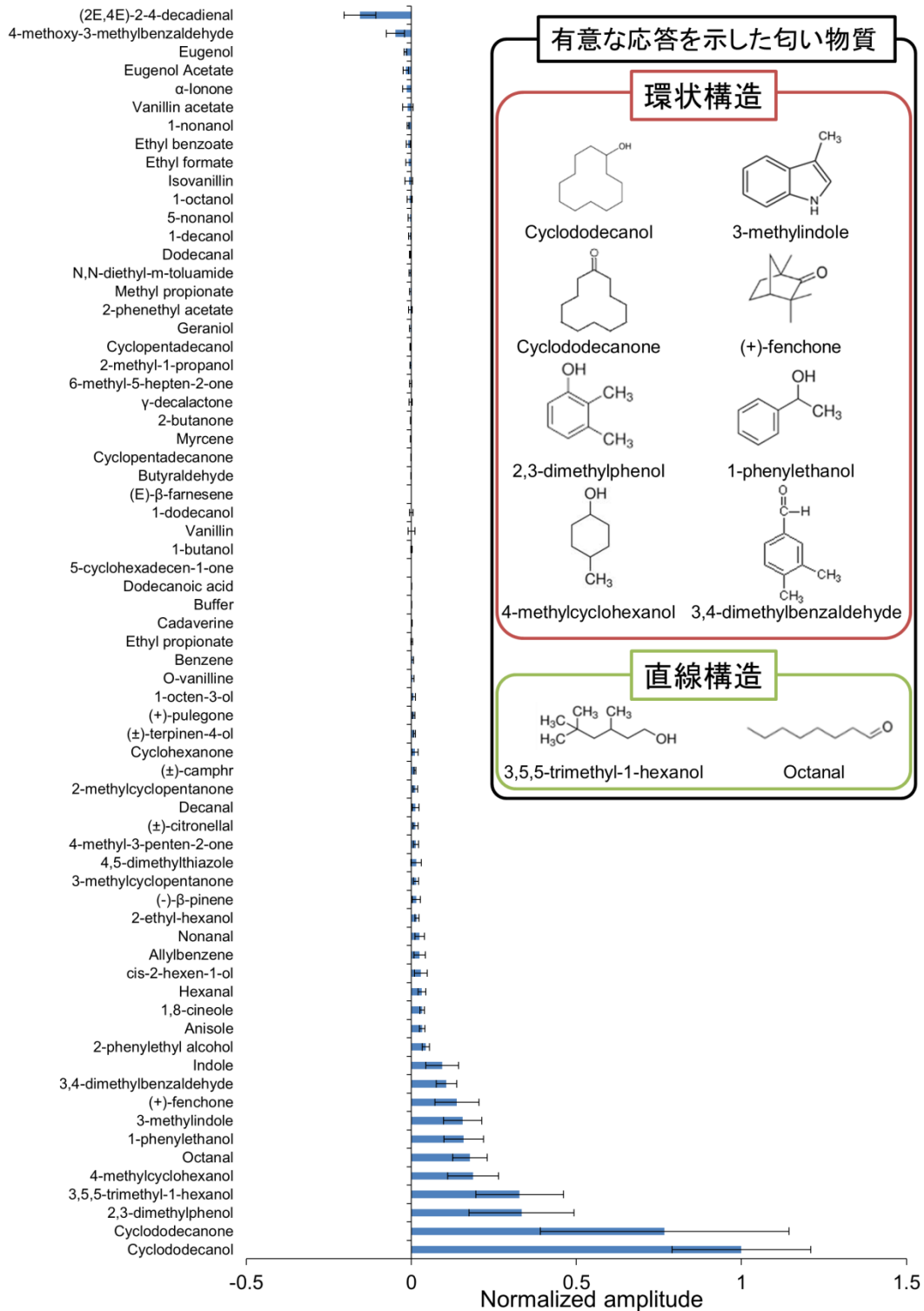


図 3- 5. PhOR2 の匂い物質に対する応答特性.

各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%). N = 2 [(2E,4E)-2-4-decadienal, 4-methoxy-3-methylbenzaldehyde, α -ionone, vanillin acetate, ethyl

benzoate, isovanillin, 1-octanol, 5-nonanol, dodecanal, N,N-diethyl-m-toluamide, 2-phenethyl acetate, cyclopentadecanol, 2-methyl-1-propanol, myrcene, cyclopentadecanone, (E)- β -farnesene, vanillin, 1-butanol, 5-cyclohexadecen-1-one, dodecanoic acid, benzene, (\pm)-terpinen-4-ol, (\pm)-camphr, decanal, (-)- β -pinene, allylbenzene], 3 [eugenol acetate, 1-nonanol, ethyl formate, methyl propionate, γ -decalactone, 2-butanone, 1-dodecanol, cadaverine, ethyl propionate, 1-octen-3-ol, 2-methylcyclopentanone, (\pm)-citronellal, 4-methyl-3-penten-2-one, 4,5-dimethylthiazole, 3-methylcyclopentanone, indole, 1-phenylethanol, octanal, 4-methylcyclohexanol, 2,3-dimethylphenol] , 4 [eugenol, 1-decanol, butyraldehyde, O-vanilline, (+)-pulegone, cyclohexanone, nonanal, 1,8-cineole, 3,4-dimethylbenzaldehyde, (+)-fenchone], 5 (geraniol, 6-methyl-5-hepten-2-one, 2-ethyl-hexanol, cis-2-hexen-1-ol, hexanal, anisole, 2-phenylethyl alcohol, 3-methylindole, 3,5,5-trimethyl-1-hexanol, cyclododecanone), 7 (cyclododecanol), 22 (Buffer). Error bar: \pm SEM. 各電流値は cyclododecanol1mM に対する変化量の平均値を用いて標準化した。

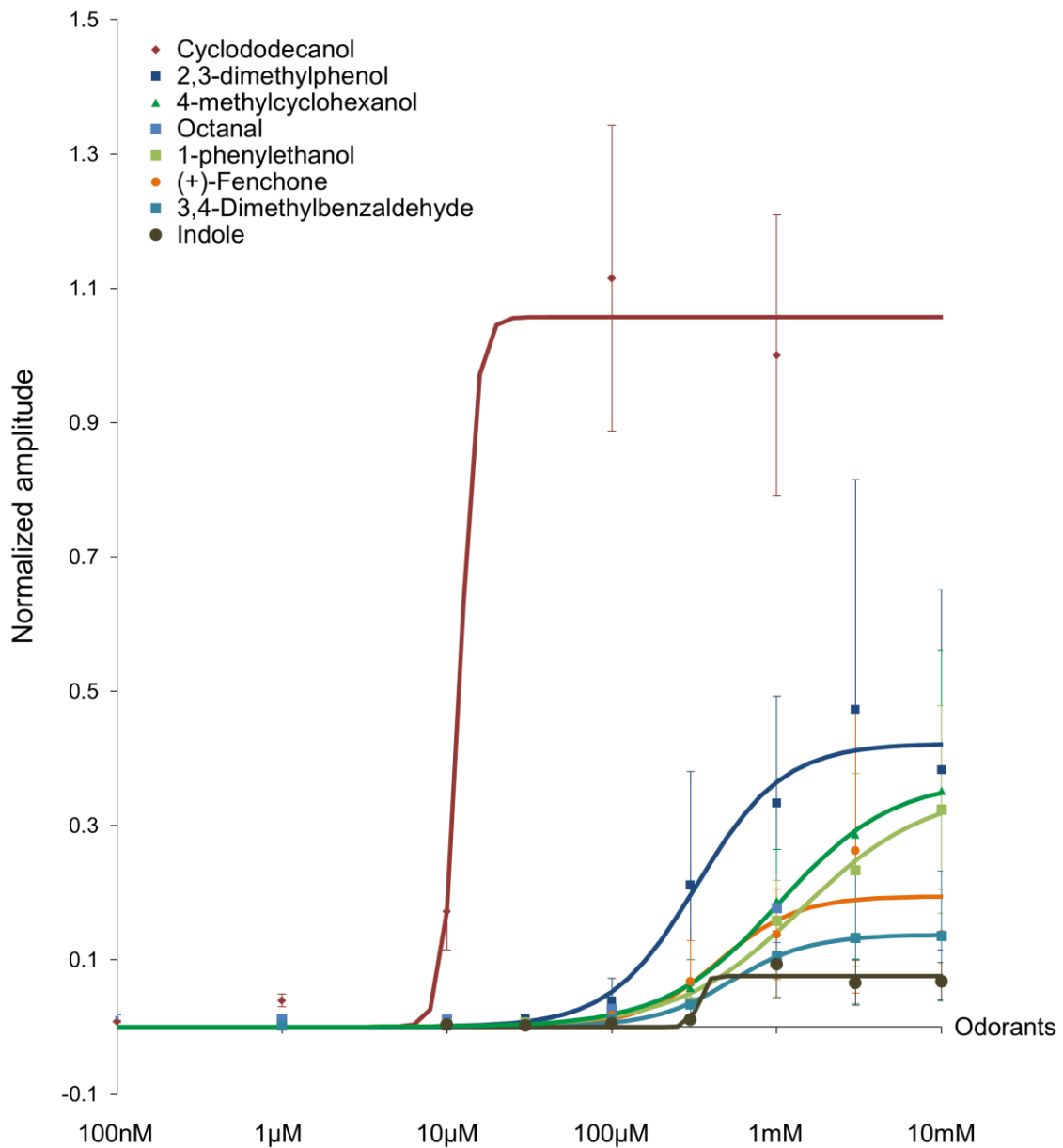


図 3- 6. PhOR2 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質に対する濃度依存応答。

N = 3 (2,3-dimethylphenol, 4-methylcyclohexanol, octanal, 1-phenylethanol, indole), 4[(+)-fenchone, 3,4-dimethylbenzaldehyde], 7 (cyclododecanol). Error bar: \pm SEM. 各匂い物質に対する濃度応答曲線における電流値は cyclododecanol 1mM に対する変化量の平均値を用いて標準化した。

3,4-dimethylbenzaldehyde: 529.4 μ M, indole: 333.3 μ M であった。octanal に対しては Hill 式の関数の係数が算出できず、フィッティング曲線および EC₅₀ を算出することは出来なかった。これらの結果から、PhOR2 は応答強度、検出感度の点において cyclododecanol に最も強く応答を示すことが明らかとなった。

PhOR3 の応答

PhOR3 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞が応答を示す匂い物質の分類を特定するため、匂い物質の混合物に対する応答を測定した。その結果、共発現細胞はカルボン酸系、アルコール系、アルデヒド系に対して応答を示した(図 3-7)。アフリカツメガエル卵母細胞自体のアミン系の匂い物質の混合物に対する電流値の低下は非常に短時間に生じ、直ちに定常状態に戻る(図 3-11A, B)が、PhOR3 と PhOrco を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞は、アミン系の刺激に対して電流値が低下した後、なだらかに定常状態へと復帰した(図 3-7A)。この電流値の軌跡が異なることから、PhOR3 はアミン系の混合物に対して応答を示していると考えられた。これらの応答を示した匂い物質の混合物の中から PhOR3 のリガンドを特定するため、混合物に含まれるそれぞれの匂い物質ごとによる刺激を行い、その応答測定を行った。各匂い物質 1mM による刺激の結果、decanoic acid, decanol, DEET, dodecanal, hexanal, octanal, decanal に対して応答を示すことが明らかとなった(図 3-7B)。PhOR3 においても PhOR2 と同様に匂い物質の混合物に含まれる 66 種類以外の匂い物質に対する共発現細胞の応答測定を行った。その結果、共発現細胞は geraniol, 6-methyl-5-hepten-2-one, nonanal に対しても応答を示すことが明らかとなった(図 3-7C)。これらの結果から取得した PhOR3 の匂い物質に対する選択性および有意な応答を示した匂い物質の構造について図 3-8 に示す。PhOR3 が強い応答を示す匂い物質には、dodecanal などの直鎖アルデヒド系、6-methyl-5-hepten-2-one, geraniol などの直鎖の匂い物質が多く含まれる傾向にあった。

PhOR3 の応答感度を明らかにするため、PhOR3 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、PhOR3 が強く応答を示すアルデヒドである dodecanal, テルペン系である geraniol, 多くの昆虫の忌避剤として用いられている DEET に対する濃度依存応答を測定した。その結果、PhOR3 が最も強く応答を示した dodecanal に対しては 100 μ M の濃度から有意な応答を示し(図 3-9)、その EC₅₀ は 138.8 μ M であった。PhOR3 は試行した全ての匂い物質に対して濃度依存的に応答を示し(図 3-9)、その EC₅₀ は geraniol: 749.7nM, DEET: 4450.7 μ M であった。これらの結果から PhOR3 は dodecanal に対して最

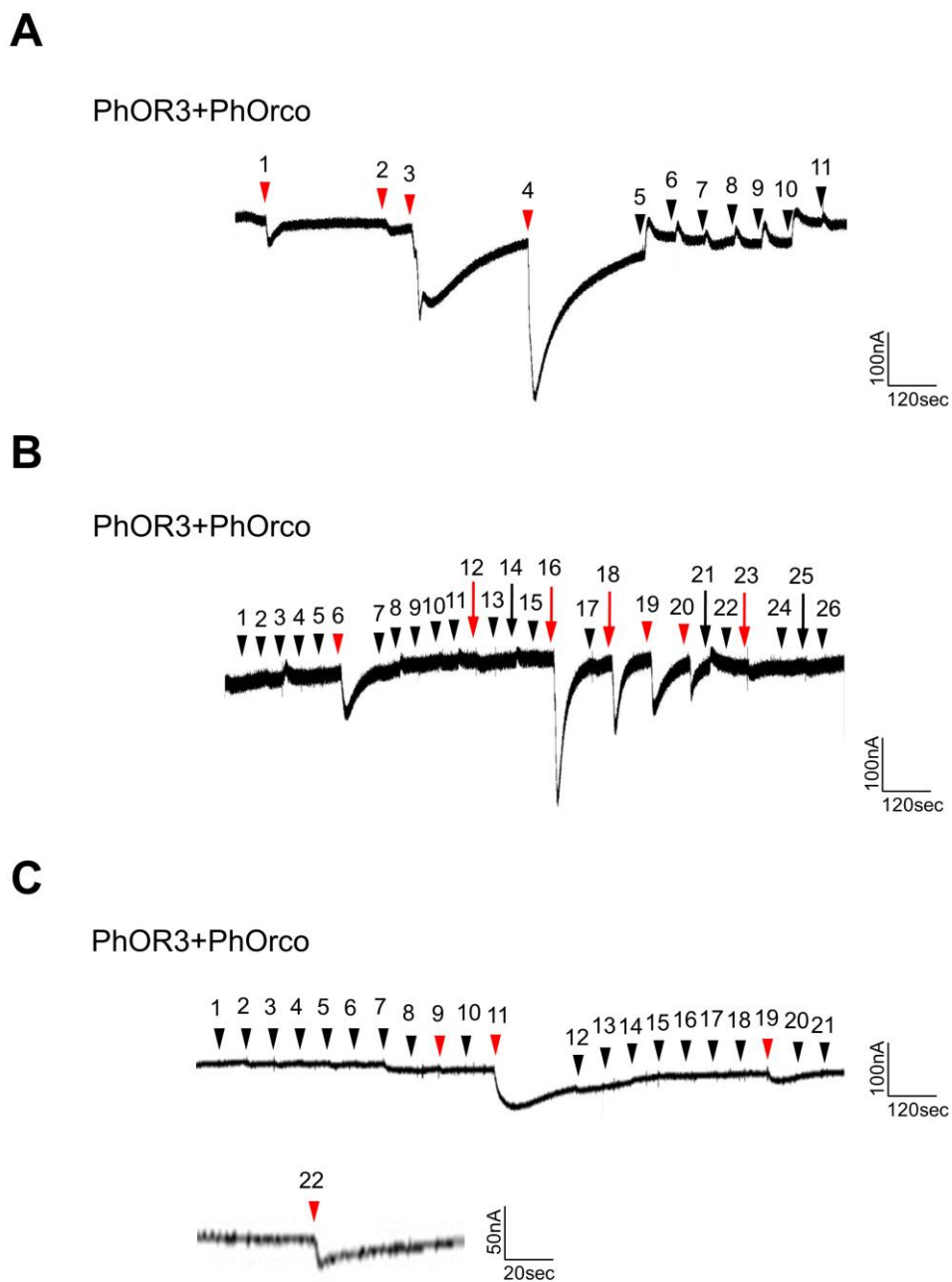


図 3- 7. PhOR3 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による応答測定.

A: 匂い物質の混合物に対する電流値変化. 匂い物質の混合物; 1: カルボン酸系, 2: アルコール系, 3: アミン系, 4: アルデヒド系, 5: ベンゼン系, 6: エステル系, 7: ケトン系, 8: ラクトン系, 9: テルペン系, 10: バニリン系, 11: 大環状ケトン系. 各匂い物質が 3mM となるように灌流液(DMSO1%)にて希釈し使用.

赤矢印は応答を示した匂い物質の混合物を示す。

B: 匂い物質の混合物に含まれる各匂い物質に対する電流値変化。匂い物質; 1: 1,4-diaminobutane, 2: Triethylamine, 3: Aniline, 4: Pyridine, 5: Isoamylamine, 6: N,N-diethyl-m-toluamide (DEET), 7: 2,5-dimethylpyrazine, 8: Tyramine, 9: 1-butanol, 10: 1-octanol, 11: 2-ethyl hexanol, 12: 1-decanol, 13: 1-dodecanol, 14: 5-nonanol, 15: 2-methyl-1-propanol, 16: Dodecanal, 17: Butyraldehyde, 18: Hexanal, 19: Octanal, 20: Decanal, 21: (2E,4E)-2-4-decadienal, 22: Butyric acid, 23: Decanoic acid, 24: Octanoic acid, 25: Nonanoic acid, 26: Hexanoic acid. 各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液 (DMSO1%). 赤矢印は応答を示した匂い物質を示す。

C: 匂い物質の混合物に含まれていない各匂い物質に対する電流値変化。匂い物質; 1: 3-methyl indole, 2: cis-2-hexen-1-ol, 3: 4,5-dimethylthiazole, 4: Methyl propionate, 5: Ethyl propionate, 6: Ethyl formate, 7: γ -decalactone, 8: Cadaverine, 9: 1-Nonanol, 10: 1-octen-3-ol, 11: Geraniol, 12: (\pm)-citronellal, 13: 2-butanone, 14: Indole, 15: Eugenol acetate, 16: 3-methyl cyclopentanone, 17: 2-methyl cyclopentanone, 18: 4-methyl-3-penten-2-one, 19: 6-methyl-5-hepten-2-one, 20: 3,5,5-triethyl-1-hexanol, 21: Eugenol, 22: Nonanal. 各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%). 赤矢印は応答を示した匂い物質を示す。

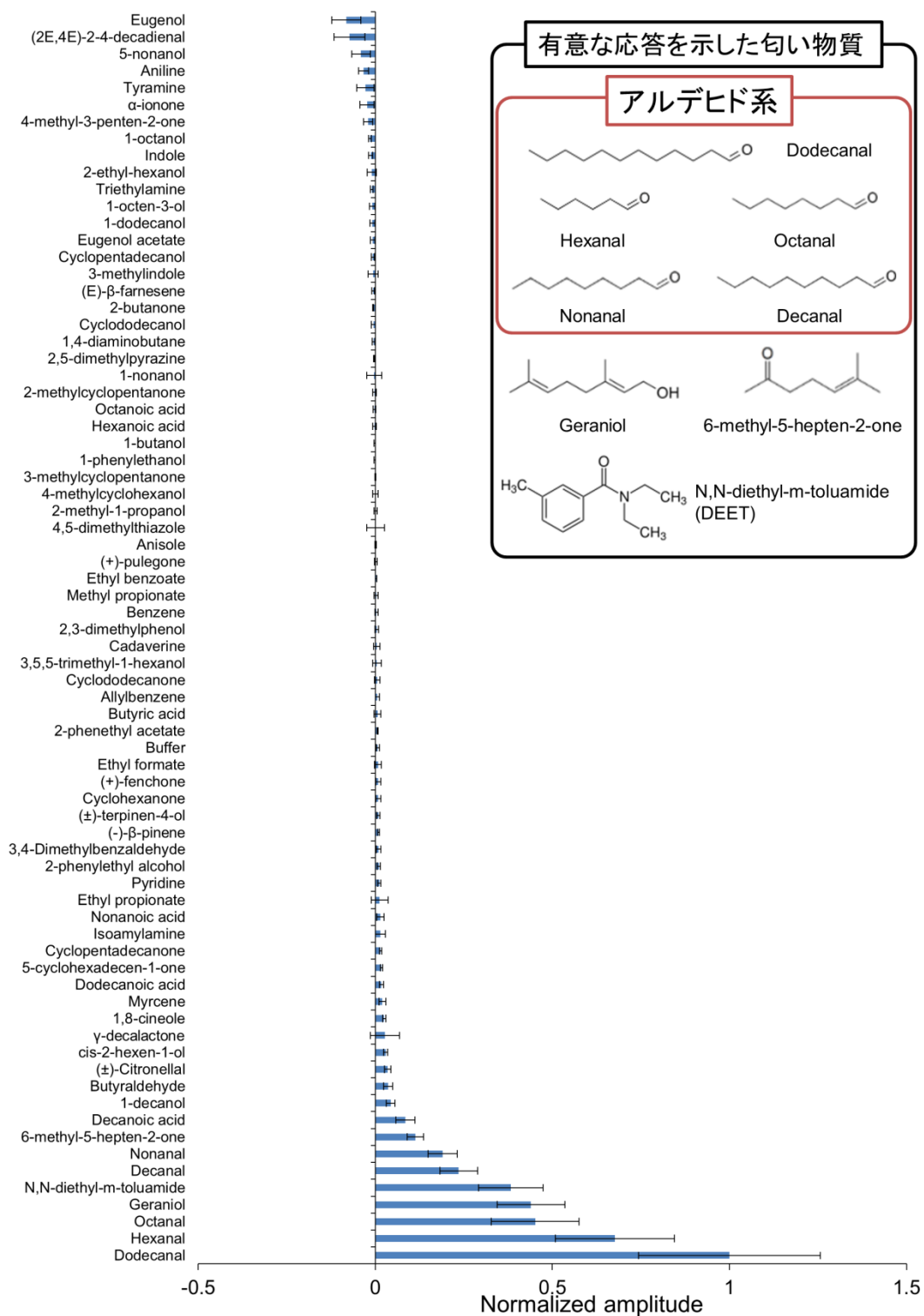


図 3- 8. PhOR3 の匂い物質に対する応答特性.

匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%). N = 2 [(2E,4E)-2-4-decadienal, 5-nonanol, aniline, tyramine, α -ionone, 4-methyl-3-penten-2-one, 1-octanol,

triethylamine, 1-octen-3-ol, 1-dodecanol, eugenol acetate, cyclopentadecanol, (E)- β -farnesene, 2-butanone, cyclododecanol, 1,4-diaminobutane, 2,5-dimethylpyrazine, 1-nonanol, 2-methylcyclopentanone, octanoic acid, hexanoic acid, 1-butanol, 1-phenylethanol, 3-methylcyclopentanone, 4-methylcyclohexanol, 2-methyl-1-propanol, 4,5-dimethylthiazole, ethyl benzoate, methyl propionate, benzene, 2,3-dimethylphenol, cadaverine, cyclododecanone, allylbenzene, butyric acid, 2-phenethyl acetate, ethyl formate, cyclohexanone, (\pm)-terpinen-4-ol, (-)- β -pinene, 3,4-dimethylbenzaldehyde, pyridine, ethyl propionate, nonanoic acid, isoamylamine, cyclopentadecanone, 5-cyclohexadecen-1-one, myrcene, 1,8-cineole, γ -decalactone, (\pm)-citronellal], 3 (decanoic acid, octanal), 4 [indole, 2-ethyl-hexanol, 3-methylindole, anisole, (+)-pulegone, 3,5,5-trimethyl-1-hexanol, (+)-fenchone, 2-phenylethyl alcohol, dodecanoic acid, cis-2-hexen-1-ol, nonanal), 5 (geraniol, N,N-diethyl-m-toluamide, geraniol, dodecanal), 6 (butyraldehyde, 1-decanol, 6-methyl-5-hepten-2-one), 7 (decanal, hexanal), 8 (eugneol), 18 (Buffer). Error bar: \pm SEM. 各電流値は dodecanal に対する変化量の平均値を用いて標準化した。

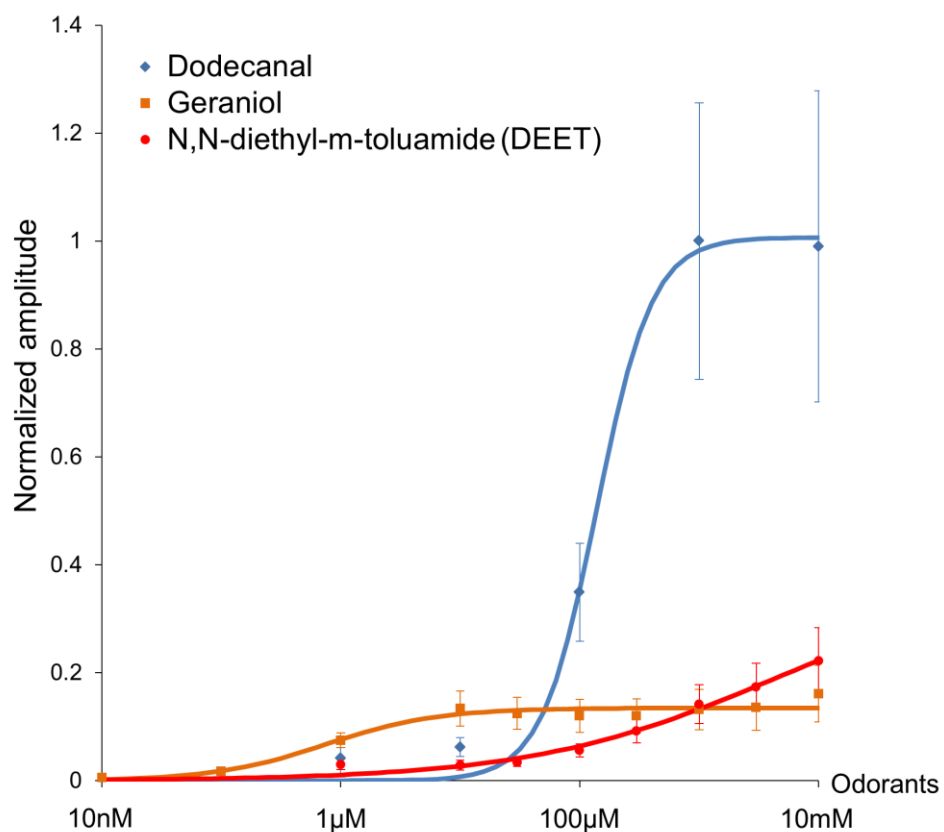


図 3- 9. PhOR3 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質に対する濃度依存応答.

N = 5. Error bar: \pm SEM. 各匂い物質に対する濃度応答曲線における各電流値は dodecanal 1mM に対する変化量の平均値を用いて標準化した.

も強い応答強度で応答を示すこと、応答強度は低いものの低濃度の geraniol に対して応答を示すことが明らかとなった。

PhOR5, 6, 7 の応答

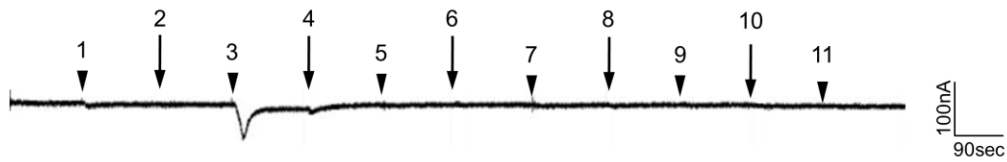
PhOR5, 6, 7 のそれぞれと PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞が応答を示す匂い物質の分類を特定するため、匂い物質の混合物に対する応答を測定した。その結果、共発現細胞はどの匂い物質の混合物に対しても応答を示さなかった(図 3-10A-C)。

PhOrco の応答

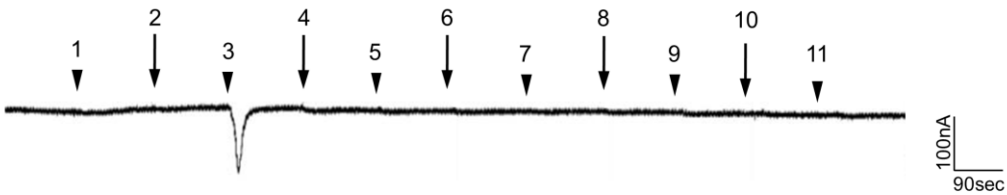
アフリカツメガエル卵母細胞にて測定した応答が PhOR の応答であることを示すため、まず PhOrco のみを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を匂い物質の混合物にて刺激し、その応答を測定した。その結果、PhOrco 発現細胞はアミン系の匂い物質の混合物に対して強い応答を示したが、その他の匂い物質の混合物に対して応答を示さなかった(図 3-11A)。この応答が PhOrco の応答か確認するため、遺伝子導入未実施のアフリカツメガエル卵母細胞を用いてアミン系に対する応答測定を行った。その結果、この卵母細胞においてもアミン系に対して応答を示し、アミン系の匂い物質の混合物は卵母細胞自体が応答することが確認された(図 3-11B)。このことから、PhOrco 発現細胞はアミン系以外の匂い物質の混合物に対しては応答を示さないこと、アミン系に対する応答はアフリカツメガエル卵母細胞由来であることが示唆された。これらのことから、後述の PhOR と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質に対する応答測定において、匂い物質に対する応答は PhOR の応答と考えられるが、アミン系の匂い物質の混合物に対して応答を示した場合はその応答を十分に精査する必要があることが明らかとなった。

A

PhOR5+PhOrco

**B**

PhOR6+PhOrco

**C**

PhOR7+PhOrco

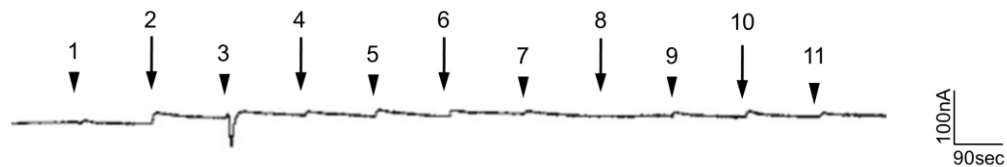


図 3- 10. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による応答測定.

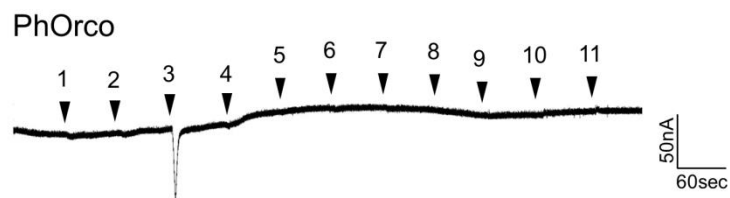
匂い物質の混合物に対する電流値変化. 匂い物質の混合物; 1: カルボン酸系, 2: アルコール系, 3: アミン系, 4: アルデヒド系, 5: ベンゼン系, 6: エステル系, 7: ケトン系, 8: ラクトン系, 9: テルペン系, 10: バニリン系, 11: 大環状ケトン系. 各匂い物質が 3mM となるように灌流液(DMSO1%)にて希釈し使用.

A: PhOR5 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の電流値変化.

B: PhOR6 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の電流値変化.

C: PhOR7 と PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の電流値変化.

A



B

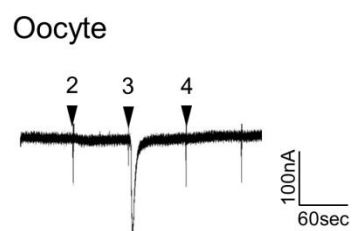


図 3- 11. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二電極膜電位固定法による応答測定.

A: PhOrco のみを発現したアフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質混合物への電流値変化.

B: アフリカツメガエル卵母細胞の匂い物質混合物への電流値変化. 匂い物質の混合物; 1: カルボン酸系, 2: アルコール系, 3: アミン系, 4: アルデヒド系, 5: ベンゼン系, 6: エステル系, 7: ケトン系, 8: ラクトン系, 9: テルペン系, 10: バニリン系, 11: 大環状ケトン系. 各匂い物質が 3mM となるように灌流液 (DMSO1%)にて希釈し使用.

これまでに実施した PhOR2, 3, 5, 6, 7 の匂い物質の混合物に対する応答を図 3-12 に示した。匂い物質の混合物に対しては、PhOR2 がアルコール系、アルデヒド系、ベンゼン系、テルペン系、バニリン系、大環状ケトン系に、PhOR3 がカルボン酸系、アルコール系、アミン系、アルデヒド系に応答すること、PhOR5, 6, 7 は本研究で試行した匂い物質の混合物に対しては応答を示さないことが明らかとなった(図 3-12)。また、アフリカツメガエル卵母細胞膜上において PhOR がタンパク質として発現しているかウェスタンブロッティングにより確認を行った。その際、膜画分からのタンパク質の回収前に FLAG タグ配列を付加した PhOR2 および 3 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞が、これまでの応答測定にて応答を示した匂い物質(PhOR2: cyclododecanol, PhOR3: dodecanal)に対して応答を示すことを確認した。FLAG タグ配列を付加した PhOR の発現を FLAG タグ抗体により検出した結果、すべての PhOR において 40~45kDa の間に明確なバンドが検出され、この 40~45kDa 付近のバンドは蒸留水のみでのインジェクションを行ったアフリカツメガエル卵母細胞(Mock 処理区)においては検出されなかった(図 3-13)。本研究におけるアフリカツメガエル卵母細胞における OR の発現解析は先行研究と同条件で検出を行った。この条件下では PxOR1 の分子量は 49kDa であるが 40kDa 付近にバンドが検出されており、SDS-PAGE では OR のバンドは実際の分子量よりも短い位置に検出されることが報告されている(Misawa N. *et al.*, 2010)。図 3-13 で示したバンドサイズは実際の PhOR の分子量(PhOR2: 47kDa, PhOR3: 51kDa, PhOR5: 48kDa, PhOR6: 49kDa, PhOR7: 48kDa)と同じ関係性で短い位置に発現していることから、これらは PhOR のバンドであり、各 PhOR がアフリカツメガエル卵母細胞においてタンパク質として発現していることが示唆された。

各匂い物質に対する応答特性情報を取得した PhOR2 および PhOR3 が有意に応答を示した匂い物質に対する応答強度を表 3-5 に示した。ここで記載したほとんどの匂い物質に対して PhOR2 あるいは PhOR3 のどちらか一方しか応答を示さないが、アルデヒド系である hexanal, octanal, nonanal に対しては PhOR2 および PhOR3 が応答を示すことが明らかとなった。

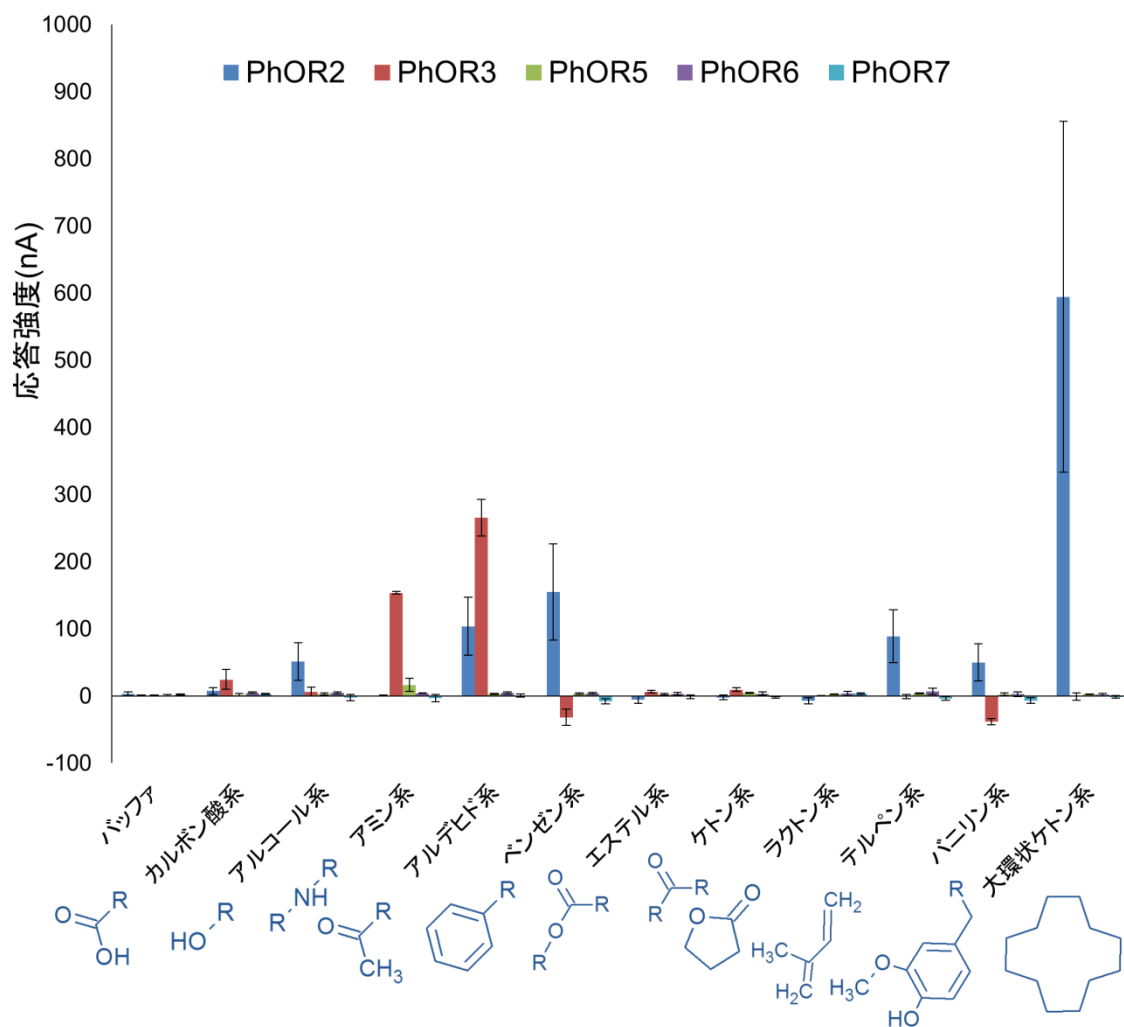


図 3-12. 各 PhOR および PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞の混合臭に対する応答.

N = 3-4 (PhOR2), 3 (PhOR3), 5(PhOR5, 6, 7). 各匂い物質が 3mM となるように灌流液(DMSO1%)にて希釈し使用.

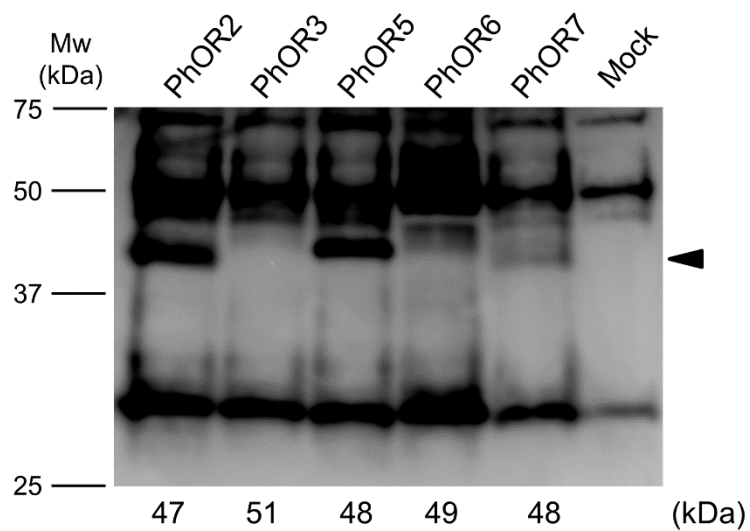


図 3- 13. アフリカツメガエル卵母細胞における PhOR の発現解析.
 SDS-PAGE には 1mg のタンパク質を使用した. マーカーとしたタンパク質の分子量を左に記載. 黒矢印: FLAG 配列を付加した OR.

表 3- 5. 匂い物質に対する応答特性の比較.

	PhOR2	PhOR3
N,N-diethyl-m-toluamide (DEET)	●	++
Indole	+++	●
3-methylindole	+++	●
Dodecanal	●	+++
Hexanal	+	++
Octanal	+++	++
Nonanal	+	+
Decanal	●	+
(+)-fenchone	++	●
Geraniol	●	++
1,8-cineole	+	●
Cyclododecanol	++++	●
3,4-dimethylbenzaldehyde	++	●
2,3-dimethylphenol	+++	●
4-methylcyclohexanol	+++	●
1-phenylethanol	+++	●
6-methyl-5-hepten-2-one	●	+
2-phenylethyl alcohol	+	●
Anisole	+	●

++++: >300nA, +++: >100nA, ++: >50nA, +: >15nA, ●: 応答無. 赤字: 行動試験に用いた匂い物質.

3.3.4 PhOR2 が応答を示す匂い物質に対するコロモジラミ生体の行動解析

PhOR2 が応答を示す匂い物質がコロモジラミ生体の行動に与える影響を明らかにし、コロモジラミ生体における PhOR2 の機能に関する知見を得るため、3.3.3 において PhOR2 が有意に応答を示すとして表 3-5 に記した匂い物質(0.1%アセトン希釈)に対する行動を 2.3.1 で確立した行動解析法を用いて評価した。ここでは、3.3.2 において PhOR2 はコロモジラミの雄雌に共通して発現していることが明らかとなっていることから、2.3.1 と同様に雄のコロモジラミを用いて PhOR2 が応答した匂い物質に対する行動解析を実施した。その結果、2,3-dimethylphenol, octanal, 1-phenylethanol, 3-methylindole, 3,4-dimethylbenzaldehyde, indole に対する SF はそれぞれ 0.2 ± 0.1 , 5.0 ± 0.7 , 3.3 ± 1.0 , 3.8 ± 0.6 , 0.9 ± 0.5 , 4.4 ± 0.9 とアセトンに対する SF (8.3 ± 0.7)と比較して有意に低下したことから、これらの匂い物質は雄のコロモジラミに忌避行動を解発することが示唆された(図 3-14A)。また、(+)-fenchone に対する SF は 15.0 ± 2.5 となり、アセトンに対する SF と比較して有意に上昇したことから、この匂い物質は雄のコロモジラミに誘引行動を解発することが示唆された(図 3-14A)。しかしながら、cyclododecanol を初めとする他の匂い物質に対する SF はアセトンに対する SF と比較して差異が確認できなかった。このことから 0.1%のこれらの匂い物質は雄のコロモジラミに忌避あるいは誘引の嗅覚行動を解発しないことが示された(図 3-14A)。

次に 0.1%の匂い物質においてアセトンの SF と比較して SF に有意差が確認された匂い物質に対してコロモジラミが濃度依存的な行動を示すか確認するため、0.001, 0.01%の各匂い物質に対する行動解析を実施し、各濃度(0.001, 0.01, 0.1%)の匂い物質に対する SF を比較した。その結果、2,3-dimethylphenol, 1-phenylethanol, 3,4-dimethylbenzaldehyde, indole に対する SF は濃度依存的に減少したことから、コロモジラミはこれらの匂い物質に対して濃度依存的に忌避行動を示すことが明らかとなった(図 3-14B)。さらに(+)-fenchone に対する SF は濃度依存的に増加したことから、コロモジラミはこの匂い物質に対して濃度依存的に誘引行動を示すことが明らかとなった(図 3-14B)。また、0.001%の octanal に対する SF は 11.80 ± 1.38 とアセトンに対する SF (8.3 ± 0.7)と比較して有意に上昇した一方、0.1%の octanal に対する SF は 4.6 ± 0.9 とアセトンに対する SF と比較して有意に低下することが確認された(図 3-14C)。このことから、コロモジラミは高濃度の octanal に対して忌避行動を示し、低濃度の octanal に対して誘引行動を示したことから、コロモジラミは octanal の濃度により異なる行動を示すことが明らかとなった。octanal はその濃度によりコロモジラミに対して異なる行動を解発することから、同様に PhOR2 が応答を示すアルデ

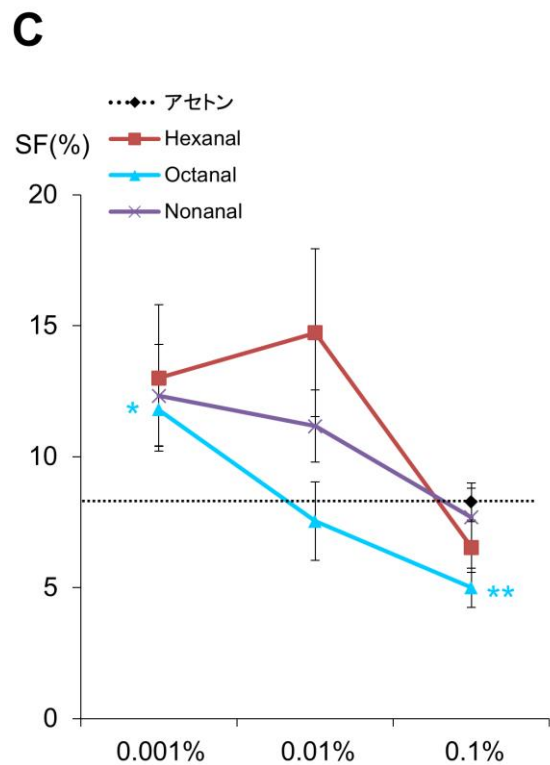
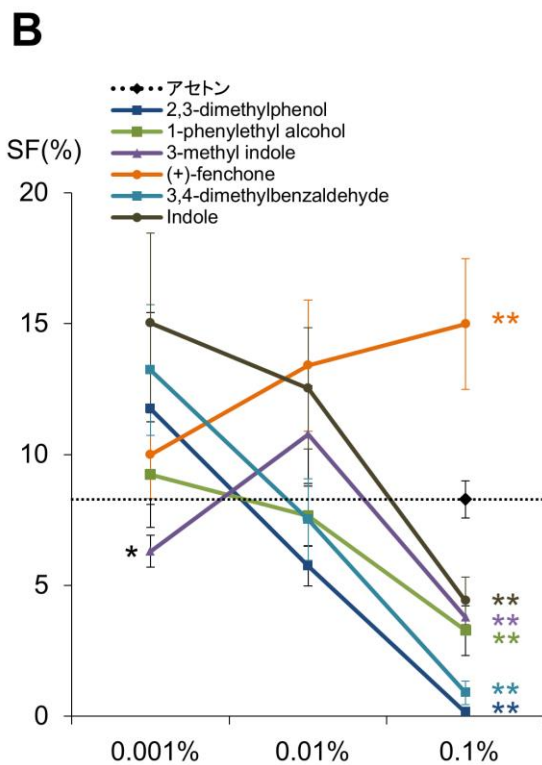
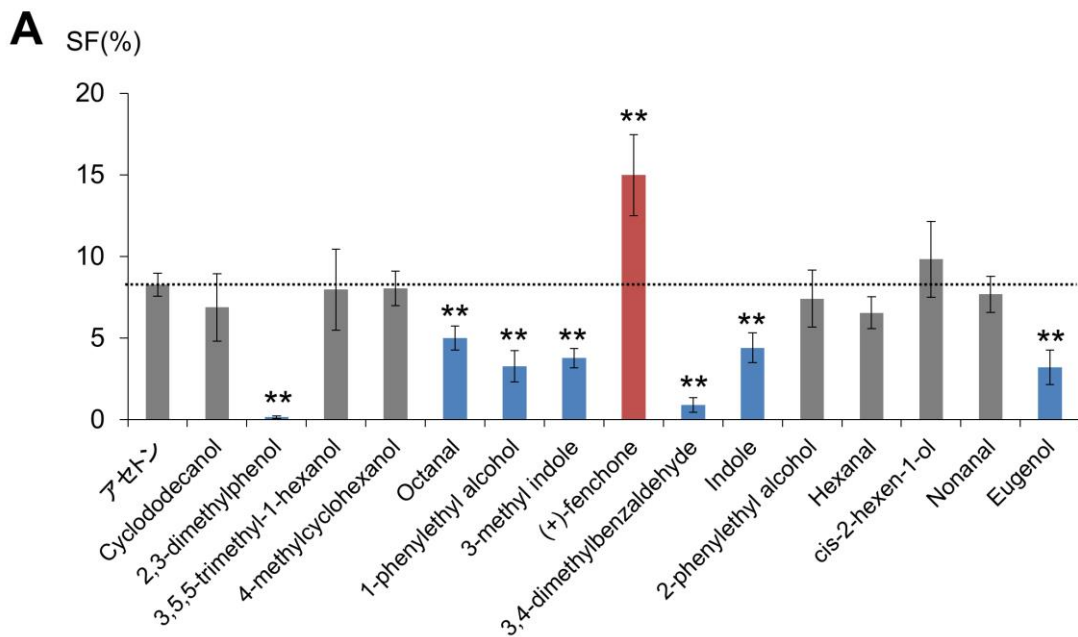


図 3- 14. PhOR2 が応答する匂い物質に対する行動解析.

Error bar: \pm SEM. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.001$ (アセトンに対する SF 値との U 検定による).

A: 各匂い物質に対する SF 値. 各匂い物質濃度: 0.1% / アセトン. $N = 10-60$.

青: SF が有意に低くなった匂い物質, 赤: SF が有意に高くなった匂い物質. 第 2 章との比較のため, eugenol に対する SF を記載.

B: 各匂い物質に対する濃度応答曲線. N = 11-60.

C: アルデヒドに対する濃度応答曲線. N = 11-60.

ヒドである hexanal および nonanal においても濃度により異なる行動を示す可能性が想定された。そこで、各濃度(0.001, 0.01, 0.1%)の hexanal および nonanal に対する行動試験を実施した。その結果、有意差は検出されなかったが、0.001%の匂い物質に対する SF はアセトンに対する SF と比較して上昇し、0.1%の匂い物質に対しては低下するという octanal と同様の傾向にあった(図 3-14C)。これらのことから、雄のコロモジラミは octanal, hexanal, nonanal の 3 種類の匂い物質に対して低濃度の場合は誘引行動を、高濃度の場合は忌避行動を示すことが示唆された。

3.3.5 PhOR3 が応答を示す匂い物質に対するコロモジラミ生体の行動解析

PhOR3 が応答を示す匂い物質がコロモジラミ生体の行動に与える影響を明らかにし、コロモジラミ生体における PhOR3 の機能に関する知見を得るため、PhOR3 が応答を示すとして表 3-5 に記した匂い物質(0.1%アセトン希釈)に対する行動を 2.3.1 で確立した行動解析法を用いて評価を行った。3.3.2 においてコロモジラミの雌における PhOR3 の発現量は雄における発現量より高いことが明らかとなっていることから、まずコロモジラミ雌を用いて、PhOR3 が応答を示した匂い物質である dodecanal, hexanal, geraniol, DEET, 6-methyl-5-hepten-2-one に対する行動解析を実施した。その結果、これらの匂い物質に対する SF はアセトンに対する SF (9.2 ± 0.8)と比較して低下する傾向にあり、特に dodecanal, DEET における SF は 6.7 ± 0.4 , 6.0 ± 0.7 となり、アセトンに対する SF に比べて有意に低下することが確認された(図 3-15A)。このことから、これらの匂い物質がコロモジラミ雌において忌避行動を解発することが示唆された。

コロモジラミ雌雄間において PhOR3 の発現量が異なることから、匂い物質に対する行動においても雌雄間において差があることが想定され、その差異が PhOR3 の生体における機能同定につながる可能性がある。そこで、コロモジラミ生体における PhOR3 の機能を解析するため、コロモジラミ雌において有意に SF が低下した匂い物質である dodecanal, DEET および先行研究において忌避効果をもつと報告されている geraniol (Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1996)を含めた匂い物質に対する行動の濃度依存性を解析した。ここで 3.3.3 において DEET, geraniol に対する応答強度は最も強く応答した dodecanal の約 5 分の 1 程度の応答強度を示したこと(図 3-9)から、DEET, geraniol に対する試験は dodecanal よりも高濃度で実施し (DEET, geraniol: 0.01, 0.1, 1.0 %, dodecanal: 0.001, 0.01, 0.1%), SF を比較した。行動解析の結果、dodecanal に対する SF は、コロモジラミ雄において濃度依存的に増加したが、コロモジラミ雌においては濃度依存的に減少することが確認された(図 3-15B)。また、DEET

および geraniol に対する SF は, コロモジラミ雄においてはアセトンに対する SF と差異がなかったが, コロモジラミ雌においては濃度依存的に減少することが確認された(図 3-15B). これらのことから, dodecanal, DEET および geraniol は, コロモジラミ雌においてのみ忌避行動を引き起こす匂い物質であることが示唆された.

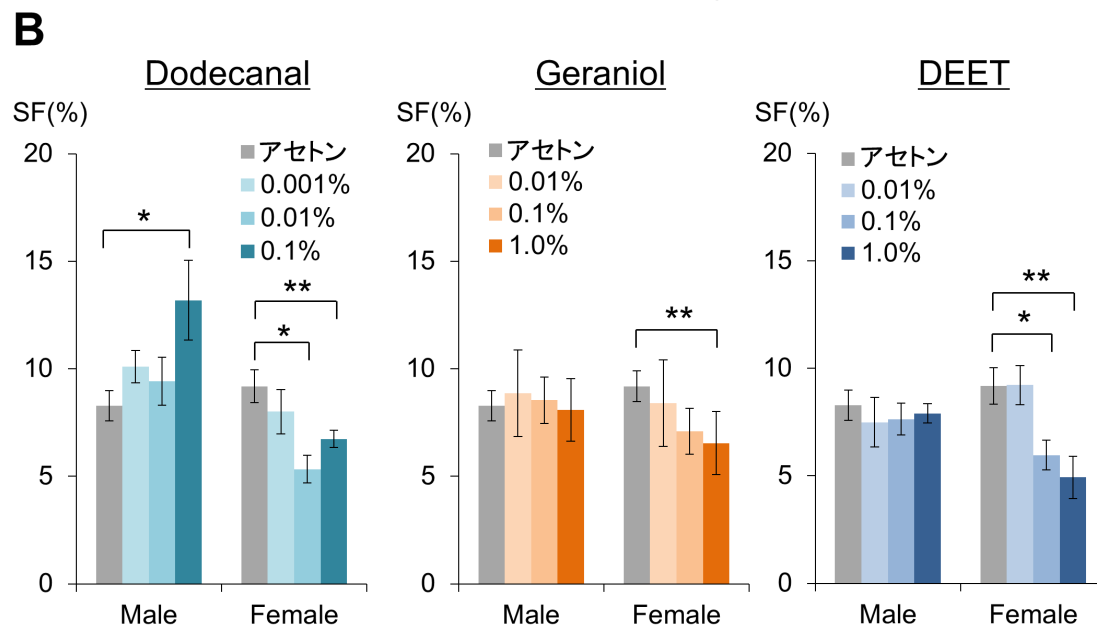
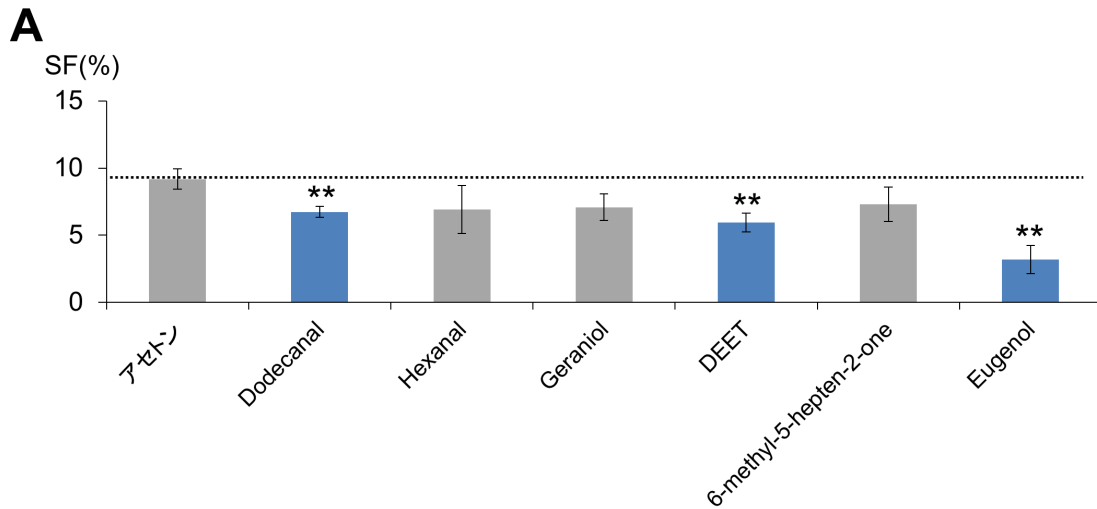


図 3- 15. PhOR3 が応答する匂い物質に対する行動解析.

Error bar: \pm SEM. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.001$ (アセトンに対する SF 値との U 検定による).

A: 各匂い物質に対する SF 値. 各匂い物質濃度: 0.1% / アセトン. $N = 8-55$.
 青: SF が有意に低くなった匂い物質. 第 2 章との比較のため, eugenol に対する SF を記載.

B: 各濃度の匂い物質に対する雌雄ごとの SF 値. $N = 8-60$.

3.3.6 コロモジラミにおける PhOR の応答値と匂い物質に対する行動の関連性

コロモジラミにおける PhOR の応答と行動との関連性を明らかにするため、3.3.3 で取得したアフリカツメガエル卵母細胞の応答値(匂い物質 1mM)と 3.3.4 および 3.3.5 で取得した匂い物質に対する SF (0.1% / アセトン)との比較を行った。表 3-6 に PhOR および PhOrco を共発現したアフリカツメガエル卵母細胞における匂い物質に対する応答値とコロモジラミ雌雄における SF を示す。

表 3-6 を基にして、PhOR の応答値とコロモジラミの SF を比較した。ここでは比較のため、雌雄のコロモジラミにおける SF をアセトンに対する SF により標準化した値 (Normalized SF)を用いた。PhOR2 は cyclododecanol に対して最も強く応答を示したが、雄のコロモジラミに対して忌避行動あるいは誘引行動を解発しなかった。また、PhOR2 は 4-methylcyclohexanol, 3,4-dimethylbenzaldehyde および(+)-fenchone に対して同程度の応答強度を示したが、雄のコロモジラミは 4-methylcyclohexanol に対しては忌避も誘引行動も示さず、3,4-dimethylbenzaldehyde に対しては忌避行動、(+)-fenchone に対しては誘引行動と、これらの匂い物質に対して匂い物質ごとに異なる行動を示した。これらのことから、PhOR2 の応答とコロモジラミ雄における行動の傾向は一致しないことが確認された(図 3-16A)。

PhOR3 が応答を示す匂い物質に対して、雌のコロモジラミは dodecanal および DEET に対する SF がアセトンと比較して有意に低下したことから有意な忌避行動を、hexanal や geraniol, 6-methyl-5-hepten-2-one に対する SF がアセトンと比較して低下したことからわずかな忌避行動を示すことが示唆された。PhOR3 の発現量が少ない雄においては dodecanal, DEET および geraniol に対して忌避行動を示さなかったことに対して、PhOR3 が優勢的に発現している雌においてはこれらの匂い物質に対して忌避行動を示した(図 3-15B)。また、DEET は様々な昆虫の忌避剤として用いられているが、その作用機序は明らかとなっておらず、OR 以外の化学感覚受容体が関与している可能性も示されている。そこで、DEET を除いた一般臭に対する PhOR3 の応答値とコロモジラミ雌におけるその匂い物質に対する SF の値を比較した結果、PhOR3 の応答値が高くなるにつれて SF が低くなる傾向があることが明らかとなった(図 3-16B)。これらことから、PhOR3 はコロモジラミ雌における一般臭に対する忌避行動に関与する可能性が示唆された。

表 3- 6. コロモジラミの嗅覚受容体の応答特性と嗅覚行動の比較.

	応答強度		SF	
	PhOR2	PhOR3	Male	Female
N,N-diethyl-m-toluamide (DEET)	●	++	±	-
Indole	+++	●	-	NT
3-methylindole	+++	●	-	NT
Dodecanal	●	+++	+	-
Hexanal	+	++	-	-
Octanal	+++	++	-	NT
Nonanal	+	+	±	NT
Decanal	●	+	+	NT
(+)-fenchone	++	●	±	±
Geraniol	●	++	±	±
1,8-cineole	+	●	-	-
Cyclododecanol	++++	●	-	-
3,4-dimethylbenzaldehyde	++	●	±	±
2,3-dimethylphenol	+++	●	-	-
4-methylcyclohexanol	+++	●	±	±
1-phenylethanol	+++	●	±	NT

応答強度; +++++: >300nA, ++++: >100nA, ++: >50nA, +: >15nA, ●: 応答無.

SF; +: >13%, ±: 13-7% (忌避あるいは誘引行動は解発されず), -: < 7%, NT: (Not tested: 行動試験未実施).

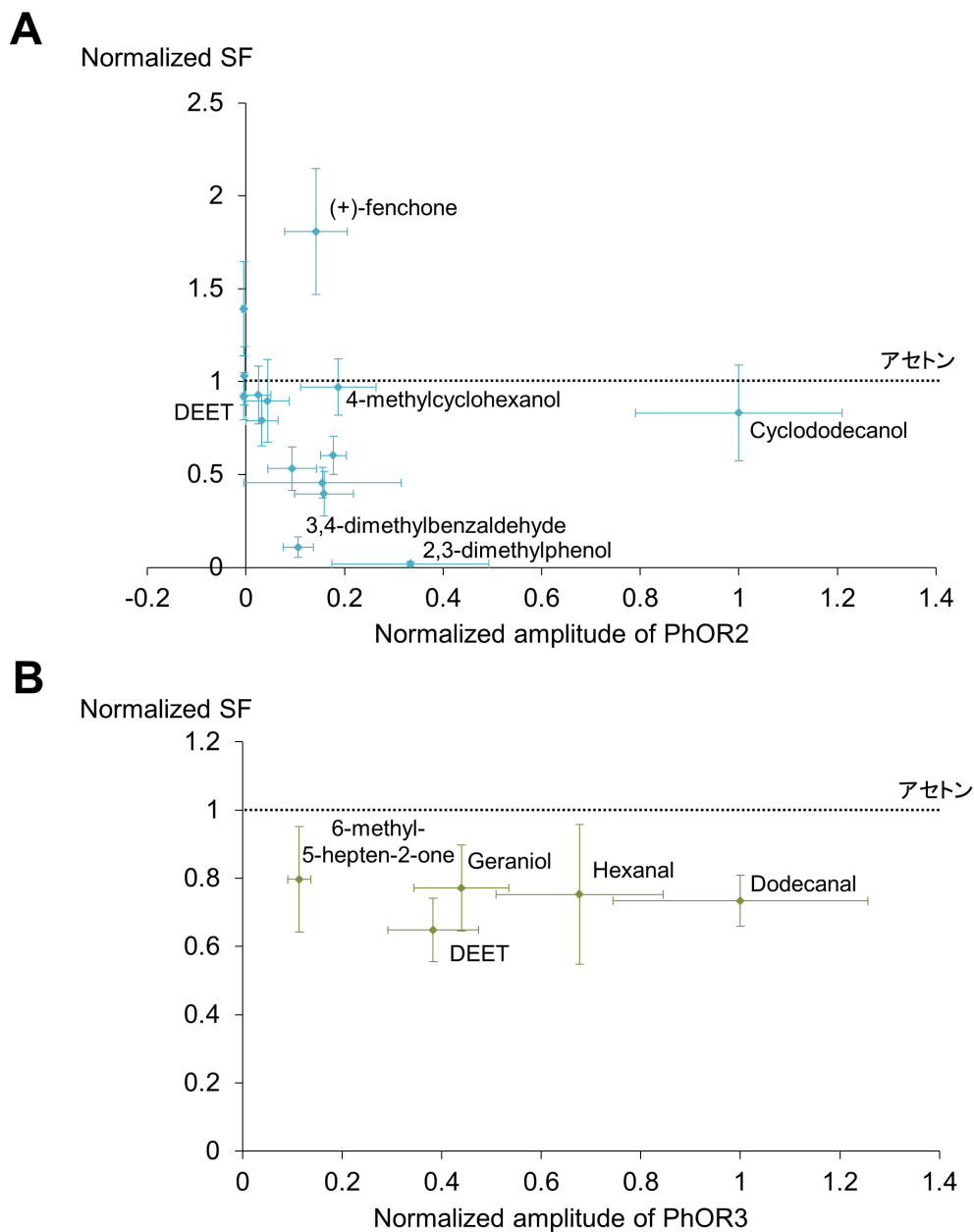


図 3- 16. 嗅覚受容体の応答と嗅覚行動の関連性.

SF 値は各匂い物質濃度: 0.1% / アセトン, 応答値は各匂い物質濃度: 1mM / 灌流液(DMSO1%)を用いた. Error bar: \pm SEM.

A: コロモジラミ雄における SF 値と PhOR2 の応答値の関係. N = 8–60 (Normalized SF). N = 4–9 (Normalized amplitude). 各 SF 値はアセトンに対する SF 値を, 各電流値は cyclododecanol に対する変化量の平均値を用いて標準化した.

B: コロモジラミ雌における SF 値と PhOR3 の応答値の関係. N = 8–55

(Normalized SF). N = 6–9 (Normalized amplitude). 各 SF 値はアセトンに対する SF 値を, 各電流値は dodecanal に対する変化量の平均値を用いて標準化した.

3.4 考察

複数の感染症の原因菌の媒介や社会的な問題に発展していることから、コロモジラミの防除は衛生学的に重要な課題である。その防除剤となる忌避剤や誘引剤の開発において昆虫生体の嗅覚機能の解明、特に嗅覚受容体の匂い物質に対する応答特性の解析とその利用は有効な手段であることが考えられる。本章において、昆虫の OR の応答特性情報に基づいた行動制御剤候補物質となる匂い物質の同定を実施する対象昆虫としてコロモジラミを用いた。ここでは本章で実施した、嗅覚受容体 PhOR のコロモジラミ生体における発現解析およびアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた機能解析、さらにその応答特性情報から選択した匂い物質のコロモジラミ生体に対する匂い物質の効果評価、および嗅覚受容体応答と嗅覚行動の比較の結果に関する考察を記述する。

3.4.1 コロモジラミ生体における嗅覚受容体の発現様式

コロモジラミは、世界中でその感染が報告されている吸血性昆虫であるが、汎世界種であり、すべてが同じ種であることが報告されている(Kim K.C. *et al.*, 1986)。しかしながら DDT の散布による駆除や各国間の感染者に伴う移動などにより、コロモジラミにおいて遺伝的に分化が進んでいる可能性がある。実際に、ゲノム解読に用いられたコロモジラミの Orlando 系統は、ウサギからの吸血に適応した系統(Culpepper G.H. 1944, 1946, 1948)であり、他のコロモジラミと比較してヒトへの宿主特異性が低下していることから、本研究にて用いた NIID 系統とでは *PhOR* の遺伝子配列などの遺伝的背景が異なっている可能性が想定された。また、これまでコロモジラミにおける *PhOR* の発現様式に関する報告はなく、生体での発現に関しては明らかになっていなかった。そこで、NIID 系統のコロモジラミ生体において機能的に発現している *PhOR* を同定するため、コロモジラミ生体からの *PhOR* 遺伝子配列の単離、同定とその発現様式の解析に取り組んだ。本項ではその結果に関する考察を記述する。

コロモジラミは 10 種類の *PhOR* 候補遺伝子を所有するが、そのうち 1 種類は OBP, 2 種類は 570bp, 774bp と非常に短い配列であることから、7 種類の *PhOR* 候補遺伝子を対象として遺伝子配列の単離と同定、その発現解析を実施した(図 3-2)。単離した遺伝子配列がコードするアミノ酸配列をデータベースのアミノ酸配列と比較したところ、PhOrco の保存性は非常に高いことが明らかとなった。ハマダラカの Orco 変異体は匂い物質に対する ORN の応答が欠失したことが報告されており(DeGennaro M. *et al.*, 2013)、昆虫において様々な OR との複合体形成に関わる Orco に変異が生じると匂い情報を適切に処理できなく

なると考えられることから、Orco の保存性は高くなっていることが推定される。これまで昆虫の系統樹ではコロモジラミが属する咀嚼目はカメムシ目とアザミウマ目と準新翅類のクラスターを形成するとされていた(Kristensen N.P. 1991)が、リボソーム DNA をはじめとした 1478 種の遺伝子配列を用いて作成した系統樹では準新翅類は単系統群でなく、咀嚼目はハエ目やハチ目などの完全変態昆虫と近縁であることが報告されている(Misof B. *et al.*, 2014)。しかしながら、PhOrco のアミノ酸配列を他昆虫種の Orco と比較すると、トコジラミを初めとするカメムシ目の昆虫種とクラスターを形成し(図 3-1A)、Orco のアミノ酸配列は Kristensen N.P. (1991)の種分化の系統樹と一致することが示された。Misof B. *et al.*, (2014)の系統樹の作成にはひとつの PhOR (PHUM327990)が用いられているが、このアミノ酸配列は昆虫の OR に特徴的な 7 回膜貫通構造を形成しないことから、OR の配列情報が適切に系統樹に反映されていない可能性があり、Orco や他の PhOR の配列情報を用いることで昆虫の進化系統樹の異なる知見が得られる可能性が推察される。また、カメムシ目の OR のアミノ酸配列と PhOR のアミノ酸配列の比較により、PhOR4, 5, 6, 7 はコロモジラミ特有の OR であること(図 3-1B)が示され、これらの OR がコロモジラミ独自の生態に関与している可能性が考えられた。今後 OR の配列が未解明なケジラミ(*Pthirus pubis*)などの他のシラミ亜目の昆虫の OR と比較することでこれらの OR がコロモジラミ特有の OR であるかを明らかにすることができるのではないかと期待される。また、他昆虫種間の OR 同士では近接する OR 同士でもアミノ酸の一致度が低く(図 3-1B)、昆虫の OR のアミノ酸配列には多様性があることが示されたことから、昆虫はその生活環境に適応するため、多様な OR をもつようになったことが推察される。

昆虫はその発育段階において OR の発現量が増加することが報告されており、その例として、カイコガの蛹期から成虫期にかけてフェロモン受容体 BmOR1 の発現量が増加すること(Sakurai T. *et al.*, 2004)が挙げられる。本研究における発現解析の結果、コロモジラミ成虫は 5 種類の PhOR (PhOR2, 3, 5, 6, 7) と PhOrco により環境下の匂い物質を検出していること、PhOR2, 5, 6, 7 は雌雄共通で発現、PhOR3 は雌で優勢的に発現していること(図 3-2)が示唆されたが、ここではコロモジラミの成虫のみを使用して発現解析を行っているため、PhOR の発現様式およびその生体における機能が雌雄間で異なっていると決定することはできなかった。そのため、幼虫期や成虫への変態後の日数など各発育段階ごとのコロモジラミを用いた PhOR の発現解析を実施することで、それぞれの PhOR の各発育段階における機能解明に繋がることが期待される。

キイロシヨウジョウバエはそのゲノム中に 62 種類の OR を所有しているが、そのうち成

虫の触角において機能発現しているのは 32 種類と 52%程度である(Vosshall L.B. *et al.*, 2000). コロモジラミ成虫において機能発現している *PhOR* はゲノム中に所有される *PhOR* の 60%であることから, この *PhOR* の数が妥当であると考えられるが, この OR の数は非常に少ない. コロモジラミはその生活環のすべてを宿主であるヒトの体表上で過ごす(徳永, 1943; Buxton P.A. 1947; 素木, 1958; Zama K. 2013). そのため, キイロシヨウジョウバエの幼虫のように周囲に餌が存在しており, ハマダラカやアカイエカのように遠い距離から宿主や餌の匂いを検出する必要がなく, 宿主の吸血可能な皮膚の表面を認識できれば, その生存には十分であることが考えられる. また, OR の他に匂いの受容体として機能するキイロシヨウジョウバエのイオンチャネル型受容体(Ionotropic receptor; IR, Benton R. *et al.*, 2009; Croset V. *et al.*, 2010; Rytz R. *et al.*, 2013)の配列情報と相同性が高い遺伝子配列をコロモジラミのゲノム中から検索したところ, 12 種類の遺伝子配列が検出された(Iwamatsu T. *et al.*, unpublished). キイロシヨウジョウバエはゲノム配列中に 66 種類の IR を所有していること(Rytz R. *et al.*, 2013)と比較してもコロモジラミにおける匂い物質の検出に関わる受容体の数は非常に少ないといえる. これらのことから, コロモジラミは様々な匂い物質を受容する機会が少なく, 多くの OR や IR を所有する必要がなかったのではないかと推察される. コロモジラミはこの少ない OR や IR により環境下の匂い物質の検出, 識別を行っていることから, 昆虫において各 OR や IR からの情報がどのように統合, 処理され行動が解発されるのかを解明する好適なモデルになることが期待される.

3.4.2 PhOR の応答特性解析

OR の応答特性は, キイロシヨウジョウバエやハマダラカなどを初めとした昆虫において解析が進められている(Hallem E.A. *et al.*, 2006; Carey A.F. *et al.*, 2010). 昆虫の嗅覚機能において, 匂い物質という化学情報は, OR によって受容され電気信号に変換されることから, 昆虫は環境下の匂い物質を OR により検出しているといえる(Touhara K. *et al.*, 2009). このことから, ある昆虫の OR の匂い物質に対する応答特性の解明により, その OR を所有する昆虫が検出可能な匂い物質の同定が可能であり, OR が応答を示す匂い物質は昆虫の生体行動に効果をもつ可能性がある. そこで, コロモジラミに対する忌避剤あるいは誘引剤などの行動制御剤としての可能性がある匂い物質の探索に利用するため, アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた測定法により, コロモジラミ生体から単離した *PhOR* の匂い物質に対する応答特性の解析に取り組んだ. 本項ではその結果に関する考察を記述する.

コロモジラミは先行研究において, ヒトの体臭に誘引されること, 複数の植物精油に対

して忌避行動を示すこと(Wigglesworth V.B. 1941; Tokuno K. *et al.*, 2014)が明らかとなってきたが、匂い物質に対する嗅覚行動はほとんど明らかになっておらず、どのような種類の匂い物質に対して OR が応答を示すか不明であった。そのため、PhOR の応答性が未知の状況から、数万~数十万種の匂い物質から応答を示す匂い物質を探索するのは非常に困難であることが想定された。そこで、OR の匂い物質に対する応答性解析において、OR がどのような種類の匂い物質に応答を示すかの初期のスクリーニングに用いられる匂い物質の混合物(Shirasu M. *et al.*, 2014)を用いて、PhOR が応答を示す匂い物質の種類の特定を行った。コロモジラミ生体での発現が確認された 5 種類の PhOR をそれぞれ PhOrco と共にアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、匂い物質の混合物に対する刺激を行い、その応答を測定した結果、PhOR2 および PhOR3 が匂い物質の混合物に対して応答を示した(図 3-12)。さらに匂い物質の混合物に含まれる各匂い物質およびその他の匂い物質に対する応答測定を行い、PhOR2 および PhOR3 の応答特性を解析した結果、それぞれが異なる匂い物質に応答を示した(図 3-5, 8)。

PhOR2 はベンゼン環などの環状構造をもつ 2,3-dimethylphenol や 1-phenylethanol, 4-methylcyclohexanol に対して応答を示すことが報告されている(Pelletier J. *et al.*, 2015)。本研究において PhOR2 が有意な応答を示した匂い物質と比較しても、3,4-dimethylbenzaldehyde, 3-methylindole がベンゼン環を、また他に応答を示した cyclododecanol は C12 の大環状構造、(+)-fenchone は二環性構造などの環状構造をもつ匂い物質が多く存在した(図 3-5)。これらのことから、PhOR2 のリガンド結合ポケットには環状構造が入り込む広い疎水性領域が存在することが考えられる。また PhOR2 が有意な応答を示した匂い物質の多くはヒドロキシル基もしくはアルデヒド基の親水性が高い官能基をもつことから、リガンド認識部位には親水性のアミノ酸が関与していることが推察される。これらの匂い物質の構造に共通する特徴を見出すため、Dragon6 (アフィニティサイエンス社)を用いて分子記述子の比較を行ったが、応答強度と強い相関を示す分子記述子を見出すことはできなかった。このことから PhOR2 の応答には匂い物質の複数の分子記述子が関与していることが考えられる。また Pelletier J. *et al.*, (2015)が報告している匂い物質に対する EC₅₀ は 2,3-dimethylphenol: 103.0μM, 4-methylcyclohexanol: 120.0μM, 1-phenylethanol: 1300.0μM であり、本研究における 4-methylcyclohexanol に対する EC₅₀ とは 1 桁の感度の差があった。Pelletier J. *et al.*, (2015)が用いている PhOR2 のアミノ酸配列は NCBL のデータベースと 100%と一致しており、本研究で用いた PhOR2 のアミノ酸配列と 2%の違いがあることから、この変異により PhOR2 のリガンド結合ポケットが変化

していることが考えられた。TMHMMによりそれぞれの膜貫通領域の予測を行ったところ、本研究において単離した PhOR2 の配列は 2 番目の外側の領域(163~191aa)と 4 番目の膜貫通領域(192~214aa), 3 番目の内部領域(215~265aa)において NCBL のデータベースのアミノ酸配列(2 番目の外側の領域: 163~194aa, 4 番目の膜貫通領域: 195~217aa, 3 番目の内部領域: 218~265aa)において違いが検出された。この領域は Hopf T.A. *et al.*, (2015)によりリガンド結合ポケットを形成するとされた部位であることから、本研究と Pelletier J. *et al.*, (2015)が用いた PhOR2 のリガンド結合ポケットには違いがあることが考えられる。しかしながら、本研究の PhOR2 と NCBL データベースのアミノ酸配列では置換部位が 9 残基存在し、どのアミノ酸が 4-methylcyclohexanol の認識に関与しているか特定することは出来なかった。この 9 残基のアミノ酸の点変異体を用いた応答測定を実施することで PhOR2 の 4-methylcyclohexanol の認識に関与するアミノ酸を明らかにすることが出来るであろう。Hopf T.A. *et al.*, (2015) の手法に基づいて、EV-folds (<http://evfold.org/evfold-web/newprediction.do>)にて PhOR2 の立体構造予測を行ったところ、最も高スコアであったモデルでもその数値が 1.426 と DOR85b のスコア値(4.594, Hopf T.A. *et al.*, 2015)と比べて低くなり、予測精度が高いモデル予測には至らなかった。この手法では EV-folds のデータベース中のアミノ酸配列とマルチプルアライメントを行い、構造予測を行うため、類似したアミノ酸配列が多い方が予測精度が高くなる。そのため、データベース中に近縁種の OR 情報が DOR と比べて少ない PhOR の精度の高い立体構造予測は難しかったことが推察される。将来的にコロモジラミの近縁種の OR のアミノ酸配列情報が拡充されれば、この手法を用いて PhOR2 の精度の高い予測が可能になると考えられる。

PhOR3 は dodecanal や geraniol などの直鎖状の匂い物質に対して有意な応答を示した(図 3-8)。またベンゼン環をもつ DEET に対しても応答を示すことが明らかとなった。PhOR3 が応答を示す匂い物質の構造に共通する特徴を見出すため、Dragon6 を用いて分子記述子の比較を行ったが、応答強度と強い相関を示す分子記述子を見出すことはできなかった。しかしながら応答を示す匂い物質には直鎖状の匂い物質が多く含まれていることから、PhOR3 のリガンド結合ポケットは細長い形状をしていることが考えられる。また、最も強い応答強度を示した dodecanal は疎水性が高いこと、dodecanal より親水性が高い geraniol および DEET に対しては低い応答強度を示したこと(図 3-9)から、疎水性のアミノ酸がリガンド認識部位に関与していること、このアミノ酸部位が PhOR3 の応答強度に関与することが考えられた。また、応答強度は低いものの、dodecanal より geraniol の方が低い EC₅₀を示したこと(図 3-9)から、低濃度の geraniol に対しても PhOR3 のチャンネルが開き、

応答を示したことが考えられる。このことから PhOR3 は geraniol の認識に関わるアミノ酸部位のひとつが PhOR3 のチャネル作用に関与している可能性があるが、これらのリガンド認識に関わる機構を解明するためには、点変異体などを用いた応答測定により PhOR3 の匂い物質の認識部位を明らかにすることが必要となる。また、PhOR3 においても Hopf T.A. *et al.*, (2015) の手法に基づいて立体構造予測を行ったが、その最高スコアは 0.615 と PhOR2 よりも低く、精度の高いモデル予測には至らなかった。PhOR3 についても PhOR2 同様にコロモジラミ近縁種の OR 情報が拡充されることで精度の高い予測が可能になると考えられる。

ここで、PhOR3 が応答を示した DEET は様々な昆虫の忌避剤として用いられているが、その受容、忌避に関する機構は未だ不明な点が多い。例えば、ネッタイシマカの CquiOR136 が DEET に対して応答を示す他、キイロショウジョウバエでは DEET は Orco である Or83b に作用することが報告されている (Ditzen M. *et al.*, 2008)。また、ネッタイシマカでは雌の Orco 変異体は DEET の存在下においてもヒトに対して誘引行動を示すが、DEET に接触すると忌避行動を示すことから、嗅覚以外の感覚も DEET の検出に関与していることが報告されている (DeGennaro M. *et al.*, 2008)。DEET の昆虫における受容に関しては OR 以外の受容体が DEET の検出に関与している報告もあり、キイロショウジョウバエにおいては IR40a の変異体は DEET に対する忌避行動を示さなくなることから、IR40a が DEET の検出に関与しているとされている (Kain P. *et al.*, 2013)。このように昆虫における DEET の受容機構に関しては未だ明らかになっていないが、コロモジラミに対して忌避効果がある DEET が PhOR3 により受容されること (図 3-8, 9) が本研究において明らかとなった。このことからコロモジラミにおいては DEET の受容には OR が関与することが示された。しかしながら、コロモジラミにおいても IR が存在していることから、今後これらの受容体の DEET に関する応答を解析することにより、コロモジラミにおける DEET の受容機構に関わる受容体を明らかにする必要がある。コロモジラミにおいて DEET の受容機構を解明することができれば、昆虫における DEET の受容機構の解明へと発展することが期待される。

PhOR2 あるいは PhOR3 が応答を示した匂い物質には植物由来の匂い物質とヒトの体臭由来の匂い物質が含まれていたが、PhOR2 および PhOR3 とともに応答を示す匂い物質は octanal, nonanal などヒトの体臭成分中に含まれる (Hase S. *et al.*, 2001; Seya T. *et al.*, 2010; Ruzsanyi V. *et al.*, 2012; Mochalski P. *et al.*, 2014) と報告されている直鎖のアルデヒドであることが明らかとなった (表 3-5)。また特に nonanal は吸血性昆虫であるアカイエカやダニの一種 *Amblyomma cajennense* において宿主の特定に用いられている匂い物質であ

る(Syed Z. *et al.*, 2009; Soares S.F. *et al.*, 2012). これらのことから、コロモジラミが宿主であるヒトの体臭の検出にこれらのアルデヒド系の匂い物質を利用していることは十分に可能性があると考えられる。これらのアルデヒド系の匂い物質は他の生物種の体臭に含まれていることも報告されている(Syed Z. *et al.*, 2009)が、ヒトと他の生物種との含有量の違いは明らかになっていない。コロモジラミはヒトの体臭には誘引される(Wigglesworth V.B. 1941)が、他の生物種の体臭には忌避行動を示すことから、それらの生物種の体臭成分とヒトの体臭成分中の PhOR2 および PhOR3 が応答を示したアルデヒド系の匂い物質の量を比較することにより、コロモジラミが誘引されるアルデヒド系の匂い物質の含有量、含有比率を明らかにすることができる可能性がある。また、本研究ではアフリカツメガエル卵母細胞自体のアミン系に対する応答の原因を特定することは出来なかったが、混合物に対する応答は確認できなかったため、アミン系の各匂い物質は混合物とすることでアフリカツメガエル卵母細胞自体に何らかの影響を及ぼすことが推察される。

OR の匂い物質に対する応答特性はそれぞれの OR で異なっており、様々な匂い物質に広く応答する OR や限られた匂い物質に応答を示す OR が存在する(Hallem E.A. *et al.*, 2006; Carey A.F. *et al.*, 2010). 例えば、ショウジョウバエの DOR56a は geosmin に対して特異的に応答を示す OR であることが報告されている(Stensmyr M.C. *et al.*, 2012). 本研究では、匂い物質の混合物に対して応答を示した PhOR2 および PhOR3 の応答特性解析を達成したこと(図 3-5.), さらに PhOR5, 6, 7 は試行した匂い物質に対して応答を示さなかった(図 3-10, 12)がアフリカツメガエル卵母細胞の膜上に発現していることを確認したこと(図 3-13)から、本研究で試行した匂い物質は PhOR5, 6, 7 のリガンドではないことを明らかにした。コロモジラミはヒトの体臭の他に糞に含まれる炭酸水素アンモニウムに対して集合行動を示すが、その効果は糞全体の効果より弱いことから、他の匂い物質がこの集合行動に関係する可能性を述べている(Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1986). 図 3-1B にて PhOR5, 6, 7 はコロモジラミ特有の OR である可能性が示唆されたことから、これらの PhOR はこのような糞への集合行動などの嗅覚行動に用いられている OR の可能性がある。今後、コロモジラミの糞に含有されている匂い物質の GC-MS 分析による特定および含有成分の匂い物質に対するアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた応答測定は PhOR5, 6, 7 の匂い物質に対する応答特性の解明に発展する可能性がある。将来的に本研究において応答特性解析を達成した PhOR2, 3 に加え、PhOR5, 6, 7 の 5 種類の PhOR の匂い物質に対する応答特性を解明することは、コロモジラミの OR を用いた匂い物質の認識、識別パターンの解明にも寄与することが期待される。

第2章にて忌避剤として同定した eugenol に対する忌避行動は嗅覚系を介して解発されていることを明らかにした(図 2-5C). eugenol に対して応答を示すネッタイエカの CquiOR73 は PhOR2 が応答を示した 2,3-dimethylphenol にも応答を示すこと(Xu P. *et al.*, 2013)から PhOR2 が eugenol に対して応答を示す可能性があったが, PhOR2 は eugenol に対して応答を示さなかった(図 3-5). ここでこの2種類の OR の全長のアミノ酸配列を比較したところ, その identity は 20.16%となり, 最も相同性が高いタバコスズメ(*Manduca sexta*)の OR34 (LN885125)との identity (21%)と同程度の数値であった. さらにリガンド結合ポケットを形成するとされている2番目から4番目の膜貫通領域(PhOR2: 147aa, CquiOR73: 155aa)のアミノ酸配列を比較すると20アミノ酸残基しか一致しなかった. また eugenol に応答を示すハマダラカの AgOR65 (Bobkov Y. *et al.*, 2014)と CquiOR73 を比較しても19アミノ酸残基しか一致しなかった. これらのことから, 応答特性に近い OR でもそのアミノ酸配列の相同性は低く, OR の匂い物質に対する応答特性はそのアミノ酸配列に依存していないことが推察された. また, PhOR2 以外の PhOR(3, 5, 6, 7)の eugenol に対する応答測定を行った結果, どの PhOR も eugenol に対して応答を示さないことが明らかとなった(図 3-8, Iwamatsu T. *et al.*, unpublished). カイコガにおいて BmOR1 と BmOR2 を発現したアフリカツメガエル卵母細胞はそのリガンドのフェロモン成分である bombykol と 3-hexen-1-ol との合成混合臭に対して bombykol 単品より強い応答を示したことから, OR は匂い物質の合成混合臭に対して単体の匂い物質とは異なる応答を示すことが報告されている(Namiki S. *et al.*, 2008). また, コロモジラミはそのゲノム中に12種類の IR を所有している. これらのことから eugenol のコロモジラミにおける受容様式として, 1) eugenol と β -caryophyllene の混合臭とした場合に OR が示すこと, 2) コロモジラミの IR が eugenol に対して応答を示すこと, が推察される. そこで今後は5種類の PhOR の合成混合臭に対する応答測定および IR の eugenol に対する応答測定を行い, eugenol の受容様式の解明に取り組みたいと考えている. 2.4.3において前述したが, eugenol に応答を示す OR は忌避剤候補物質のスクリーニングやコロモジラミの忌避行動の作用機序の解明などへの発展の可能性が期待される.

3.4.3 匂い物質に対するコロモジラミの行動解析

これまでにキイロショウジョウバエやカイコガなどの昆虫の匂い物質に対する行動解析が実施されてきた(Larsson M.C. *et al.*, 2004; Mooney A.C. *et al.*, 2009). 特にキイロショウジョウバエにおいて匂い物質と行動の関係性について研究が進められており, 幼虫におい

で発現している OR が強く反応する匂い物質に対して誘引行動を示すことが報告されている(Mathew D. *et al.*, 2013). しかしながら各 OR と行動の関係性に関しては未だ不明な点が多い. そこで, OR の応答特性情報を基とした昆虫の行動制御剤の同定を達成するため, 本章で達成した PhOR の応答特性情報から匂い物質を選択し, それらに対するコロモジラミの行動解析を実施した. さらに, OR と生体の行動の関係性を見出すため, コロモジラミの PhOR の応答値とコロモジラミ生体の匂い物質に対する SF の比較を行った. 本項ではその結果に関する考察を記述する.

PhOR2 および PhOR3 が応答する匂い物質に対するコロモジラミの行動解析の結果から, PhOR2 が応答を示す匂い物質は匂い物質によりコロモジラミに忌避あるいは誘引行動を解発すること, PhOR3 が応答を示す匂い物質に対してコロモジラミの雌は忌避行動を示す傾向にあることが明らかとなった(図 3-14, 15). PhOR2 は 3,4-dimethylbenzaldehyde および (+)-fenchone に対して同程度の応答値を示したが, コロモジラミ生体において異なる嗅覚行動を解発したこと, PhOR2 が最も強く応答を示す cyclododecanol はコロモジラミ生体に行動を解発しなかったことから, PhOR2 の応答値と行動の傾向には関係性が無いことが示唆された(図 3-16A). 本論文と時期を同じくして Pelletier J. *et al.*, (2015)により, PhOR2 が強く応答を示す 2,3-dimethylphenol, 4-methylcyclohexanol および 1-phenylethanol に対してコロモジラミが忌避行動を示すことから PhOR2 がコロモジラミの忌避行動に関与する OR であると報告された. 本研究において 2,3-dimethylphenol, 1-phenylethanol および 3,4-dimethylbenzaldehyde に対してコロモジラミは忌避行動を示し, 中でもベンゼン環をもち疎水性が高い 2,3-dimethylphenol および 3,4-dimethylbenzaldehyde はコロモジラミに対して第 2 章で同定した eugenol よりも強い忌避効果を示した(図 3-14A). 昆虫の体表のクチクラは一般的に疎水性が高い炭化水素にて覆われていることから, これらの匂い物質が昆虫体表に付着しやすかったことも強い忌避効果を示す要因のひとつとして考えられる. コロモジラミは DEET や geraniol に対して忌避行動を示す(図 3-15A; Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1996)が, これらの匂い物質や eugenol に対して PhOR2 が応答を示していないことから, PhOR2 はコロモジラミにおいて DEET や geraniol, eugenol とは異なる忌避行動の解発機構に関係する OR であることが考えられる. しかしながら, これらの匂い物質より PhOR2 が強く応答する cyclododecanol に対してコロモジラミが忌避行動を示さず, PhOR2 の応答強度がコロモジラミの忌避行動と関連しないこと(図 3-14A, 3-16A)から, PhOR2 が応答することでコロモジラミに忌避行動を解発すると結論付けることはできなかった. キイロシヨウジョウバエの IR84a が応答を示す匂い物質の中には phenylacetic acid などのベンゼン

環をもつ匂い物質が含まれること(Rytz R. *et al.*, 2013)などから、コロモジラミの IR が 2,3-dimethylphenol および 3,4-dimethylbenzaldehyde の受容に関与する可能性,あるいは cyclododecanol に対して IR が応答を示す可能性が考えられる. 前者の場合は PhOR2 の応答値と行動の傾向には関係性が無く, PhOR2 が複数の受容体を用いた応答パターンによる匂い物質の検出において機能していることが推察される. また, 後者の場合は cyclododecanol を受容する IR からの情報入力があることで忌避行動が解発されなかった可能性が考えられ, PhOR2 が応答することでコロモジラミの忌避行動が解発されることが推察される. 本研究において機能同定には至らなかったこれらの受容体の匂い物質に対する応答測定, 応答特性解析によって PhOR2 が関与する忌避行動の解発機構における PhOR2 以外の受容体の関与を検証することは, コロモジラミにおける PhOR2 を介した忌避行動の解発機構の解明に繋がることが期待される. 一方, PhOR3 のみが強い応答を示す匂い物質である dodecanal, DEET, geraniol は, PhOR3 の優勢的な発現が示唆された雌のコロモジラミにおいてのみ, 濃度依存的に忌避行動を解発することが明らかとなり(図 3-15), PhOR3 が応答することでコロモジラミに忌避行動が解発されることが示唆された. このうち DEET, geraniol は先行研究においてもコロモジラミに対する忌避効果が報告されている(Mumcuoglu K.Y. *et al.* 1996). また, dodecanal はコリアンダー(*Coriandrum sativum*)やホソバイヌダテ(*Polygonum minus*), ウマノズクサ(*Aristolochia delavayi*)などのネッタイシマカにおいて殺虫作用や抗菌作用が報告されている植物の抽出物の主成分であり(Chung I.M. *et al.*, 2012; Li Z.J. *et al.*, 2013; Ahmad R. *et al.*, 2014), コロモジラミに対する忌避効果は本研究において初めて明らかにされた. PhOR3 の応答値(1mM)と SF 値(0.1%)を DEET 以外の一般臭に限定して比較した場合, PhOR3 の応答値が高くなるにつれて SF 値が低くなる傾向があった(図 3-15B). このことから, PhOR3 がより強く応答を示す一般臭の匂い物質は, コロモジラミ雌に対してより効果的な忌避効果をもつ可能性が推察される. 今後は本研究において試行した 93 種類以外の匂い物質に対する PhOR3 の応答特性情報を拡充することにより, その情報を基盤としてさらに効果的な忌避剤の探索が可能になると考えられるが, 実際の昆虫の匂い検出においては, 匂い物質の揮発度や気中の匂い物質の感覚子リンパへの溶解度などが関与することが想定されるため, 行動試験にて提示した匂い物質濃度にてコロモジラミの OR が刺激されているとはいい難しく, PhOR3 の応答値とコロモジラミにおける忌避行動を明確に関連付けるためにもさらなる匂い物質に対する応答測定や行動試験が必要となる. また dodecanal に対して雄が誘引行動を示したことから, IR などにより dodecanal が受容され, 雄での誘引行動が解発された可能性があり,

PhOR3 も PhOR2 同様に複数の受容体を用いた応答パターンによる匂い物質の検出においても機能していることも考えられる。そのため、コロモジラミ生体における PhOR3 の機能を解明するためには、IR などの他の匂い物質を受容する受容体の応答の関与を検証し、PhOR3 が応答することでコロモジラミの忌避行動が解発されることを示す必要があるだろう。

匂い物質は複数の OR により受容され、昆虫はその応答パターンにより匂い物質を認識し、嗅覚行動を示す(Larsson M.C. *et al.*, 2004; Hallem E.A. and Carlson J.R. 2006; Carey A.F. *et al.*, 2010). PhOR2 および PhOR3 が共通して応答を示す octanal, hexanal, nonanal などのアルデヒド系の匂い物質はヒトの体臭や他の生物種の体臭に含まれる匂い物質であり(Hase S. *et al.*, 2001; Syed Z. *et al.*, 2009; Seya T. *et al.*, 2010; Ruzsanyi V. *et al.*, 2012; Soares S.F. *et al.*, 2012; Mochalski P. *et al.*, 2014), その濃度によって異なる行動をコロモジラミ生体に解発することが明らかとなった。このことからコロモジラミは PhOR2 および PhOR3 の応答パターンにより異なる行動を示している可能性がある。本研究においては、これらの混合臭に対しての行動試験は実施しておらず、PhOR2 と PhOR3 の応答値と忌避あるいは誘引行動の関係性の解明までには至っていない。今後ヒトおよび他の生物種の体臭成分中の含有比を参考に、PhOR2 および PhOR3 の概算の応答比率(PhOR2:PhOR3 = 5:5 など)を示す匂い物質の混合比率(hexanal:octanal = 54:46 など)を検討し、その合成混合臭に対する行動試験を実施することでコロモジラミのアルデヒド系の混合物に対する行動傾向を明らかにすることができ、ヒトの体臭に誘引される機構の解明に繋がることが期待される。

本研究において昆虫嗅覚受容体の応答特性情報から選択した匂い物質のうち、2,3-dimethylphenol および 3,4-dimethylbenzaldehyde に対する SF が 0.2 ± 0.1 , 0.9 ± 0.5 と第 2 章で同定した eugenol の SF (3.2 ± 1.0)より低く、eugenol と β -caryophyllene の合成混合臭と同程度の値(0.1 ± 0.04)となった(図 2-5A, 3-14A)。このことから本章の手法を用いることで第 2 章の手法と同程度の忌避効果をもつ匂い物質の同定が可能であったといえる。本研究では第 2 章においてクローブ精油がコロモジラミに対する忌避効果をもつと知見があったこと、クローブ精油の含有成分が少なかったことから両手法に差が見られなかったが、第 2 章の手法を用いて新規の昆虫行動制御剤候補物質を探索する場合、約 1500 種類の植物精油から対象昆虫に対する忌避効果があるものを同定する必要があること、対象とする植物精油によっては多くの主要成分が含有されていることから行動試験に費やす時間が多くなるが、本章の手法では、OR の応答値を参考に行動試験に用いる匂い物質を選択

するため、行動試験に費やす時間は本研究で費やした時間と大きく変化しないことが推察される。これらのことから今後の様々な昆虫種の行動制御剤の探索において本手法は有効な手法であるといえ、多くの昆虫種へ適用することで効率的な行動制御剤が開発可能となることが期待される。

第 4 章 嗅覚受容体応答特性のハイスループット解析法の開発

4.1 緒言

衛生害虫を初めとする昆虫の忌避剤や誘引剤の開発において、OR の応答特性情報を基盤として昆虫生体に行動を解発する匂い物質を探索することが有効な手法であることを第 3 章において示した。しかしながら、本研究においても利用したアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学実験は、一度に一つの卵母細胞の一種類の匂い物質に対する応答しか測定できないこと、卵母細胞の生存期間の問題から長期間に及ぶ連続した応答測定は難しいことから、大量の昆虫の OR の機能同定や多数の匂い物質に対する応答特性解析への利用は適していないことが考えられる。この問題を解決するため、OR の異所発現系としてヨトウガ卵巣由来の Sf21 細胞発現系の利用が検討され、この細胞発現系を用いることで蛍光顕微鏡下での Ca^{2+} イメージング法により長期的な OR の応答測定が可能となった (Mitsuno H. *et al.*, 2014)。この Sf21 細胞は発現させた OR の応答特性に従い、匂い物質に対して蛍光強度変化を示すことから、高感度、高選択性の昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ素子としての応用も可能であり、この細胞を利用することで、これまでの工学的技術に基づくセンサやバイオセンサの性能を超える匂いセンサが構築可能であることが期待される (Mitsuno H. *et al.*, 2014)。この Sf21 細胞発現系を用いることで OR の効率的な機能解析が可能になることが考えられる。

この Sf21 細胞系統発現系を用いた OR の応答測定の原理を図 4-1 に示す (光野ら, 2015)。Sf21 細胞に遺伝子工学的に OR, Orco および GCaMP を導入して構築した安定細胞系統では、その細胞膜上に OR および Orco の複合体が、細胞質に GCaMP が発現している。安定細胞系統に提示した匂い物質が細胞膜上の OR に結合すると、OR と Orco の複合体で形成されたイオンチャネルが開口し、細胞外から細胞内へと Ca^{2+} を含むカチオンを流入させる。流入した Ca^{2+} が細胞内の GCaMP と結合することで細胞自体の蛍光強度が増加する。この細胞の蛍光強度変化を蛍光顕微鏡などにより測定することで、OR と匂い物質との応答性を蛍光強度の数値情報として取得することが可能である。また、この細胞は発現した OR の応答特性に従うことから、導入する OR を変更することで他の OR の応答測定にも利用可能という特徴をもつ。この Sf21 細胞発現系を用いることで多種類の OR の機能解析が可能であることが想定されるが、この Sf21 細胞発現系の応答測定手法として用いられている蛍

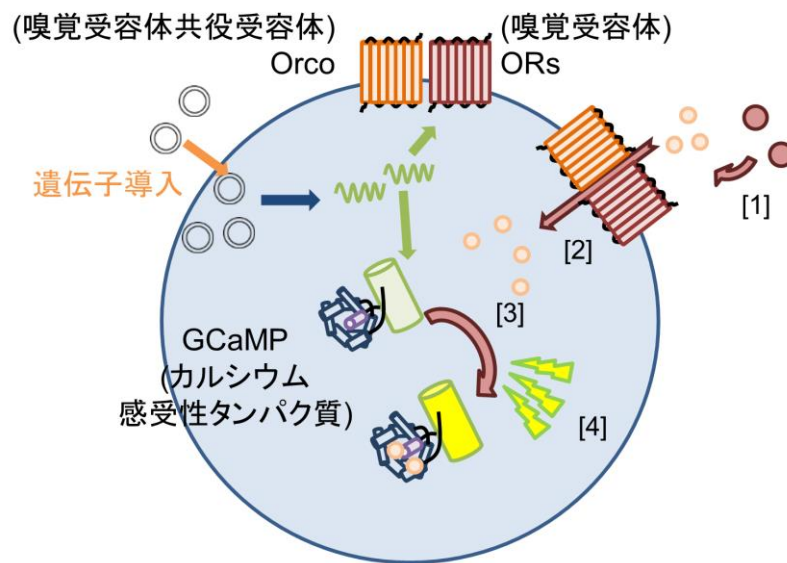


図 4- 1. Sf21 細胞系統発現系における匂い物質に対する応答機序.

昆虫の OR, Orco, GCaMP を恒常的に発現する安定細胞系統は以下の経路で匂い物質に対する応答を示す.

1. 昆虫の嗅覚受容体と匂い物質が結合.
2. 細胞内にカルシウムイオンが流入.
3. 流入したカルシウムイオンが細胞内の GCaMP と結合.
4. GCaMP の蛍光強度が増加することで細胞自身の蛍光強度が増加.

光顕微鏡下での Ca^{2+} イメージング法には、多くの匂い物質に対する応答測定には多大な時間が必要になるという問題点がある。匂い物質は数万～数十万種も存在することから、様々な匂い物質に対する応答特性解析を可能にするためには、この測定を一括して行うことが可能なハイスループットな解析手法が求められる。

その手法として、細胞の蛍光強度変化を一括して測定可能な蛍光プレートリーダーの利用が考えられる。蛍光プレートリーダーはヒトの味覚受容体や嗅覚受容体など、Gタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)を初めとした受容体の機能解析に利用されている(Koizumi A. *et al.*, 2011; Caers J. *et al.*, 2014; Trimmer C. *et al.*, 2014)。また、蛍光プレートリーダーは昆虫の OR の機能解析にも利用されている。例えば、ネッタイシマカとハマダラカの間で相同性が高い OR を発現させた T-REx293 細胞系統の匂い物質に対する応答測定を蛍光プレートリーダーにより実施し、この OR が indole に対して強い応答を示したことが報告されている(Bohbot J.D. *et al.*, 2010)。またリンゴウスチャイロハマキ(*Epiphyas postvittana*)の OR を発現させた HEK293 細胞系統の匂い物質に対する応答測定を蛍光プレートリーダーにより可能であることも報告されている(Corcoran J.A. *et al.*, 2014)。これらのことから、蛍光プレートリーダーを用いることで昆虫の OR を発現させた細胞系統の匂い物質に対する応答測定が可能であることが示されている。しかしながら、これらの先行研究では、細胞内へのカルシウムの流入を検出するために Fluo4-AM などの蛍光カルシウム指示薬が使用されており、測定工程において色素導入のための 30~45 分の静置と細胞の洗浄を行う必要があるため、それらの工程に必要な時間の短縮は難しいという問題がある。また、安定して受容体の応答測定を行うためには蛍光カルシウム指示薬の導入時間も厳密に設定する必要があり、利便性の高い手法とはいえない。一方、安定細胞系統とした Sf21 細胞系統には、恒常的に GCaMP が発現しており、測定に際して蛍光カルシウム指示薬の導入が不要である。そのため、この安定細胞系統を用いることで測定に必要な時間を短縮することが可能になり、よりハイスループットな解析手法を確立することができると考えられるが、蛍光プレートリーダーを用いて Sf21 安定細胞系統の匂い物質に対する応答を測定する手法は確立されていない。ここで、Sf21 細胞系統発現系を用いた OR の機能解析手法である光顕微鏡下での Ca^{2+} イメージング法と蛍光プレートリーダーを用いた手法における複数種の匂い物質の測定に必要な作業時間の概算を表 4-1 に示す。ここでは、96 種類の匂い物質に対する応答測定を仮定している。 Ca^{2+} イメージング法では準備から測定終了まで全工程で作業時間は 520 分間必要となるが、蛍光プレートリーダーを用いた手法では作業時間は 60 分間と約 9 分の 1 に短縮することが可能である。このこと

表 4- 1. 応答測定に必要な作業時間.

作業内容	アフリカツメガエル	Ca ²⁺	プレートリーダー
	卵母細胞	イメージング	(FDSS/ μ CELL)
	時間(分)		
測定細胞の準備	180(+30 分/系統)	10	20
96 種類の匂い物質の調整	30	30	30
培養培地から測定溶液への置換	30	5	5
96 種類の匂い物質に対する	480	480	
応答測定	(5 分/試行×96)	(5 分/試行×96)	5
総作業時間	720 分	525 分	60 分

からもハイスループットな解析手法として蛍光プレートリーダーの利用は有効であるといえる。

本章では、蛍光プレートリーダーにより Sf21 細胞系統の安定細胞系統の匂い物質に対する応答の測定手法および OR の匂い物質に対する応答特性のハイスループットな解析手法の確立を目的とした。まずカイコガ性フェロモン受容体(*Bombyx mori* Olfactory Receptor; BmOR3)とカイコガ嗅覚受容体共役受容体 BmOR2 および GCaMP3 を発現させた Sf21 安定細胞系統(BmOR3 系統)を用いて、蛍光プレートリーダーにおける測定条件の検討を行った。検討した項目は、(1): 1 ウェルあたりに添加する細胞数、(2): 細胞のウェルへの添加後から応答測定までの静置時間、である。次にキイロショウジョウバエの嗅覚受容体 DOR13a および DOR83b, 条件検討で用いた BmOR3 系統で発現させた GCaMP3 より高感度とされる GCaMP6s (Chen T.W. *et al.*, 2013)を発現させた Sf21 安定細胞系統(DOR13a 系統)と GCaMP6 のみを発現させた Sf21 安定細胞系統(GCaMP6s 系統)とを用いて、蛍光プレートリーダーを用いた OR の匂い物質に対する応答測定手法について以下の順序で検討を行った。まず、発現させた DOR13a のリガンドである 1-octen-3-ol (de Bruyne M. *et al.*, 2001; Nissler A. 2007; Schmucker M. *et al.*, 2007; Kreher S.A. *et al.*, 2008)を刺激に用いて、匂い物質に対する蛍光強度の時間変化から同一の安定細胞系統内における蛍光強度変化値の算出法を設定した。次に DOR13a 系統と GCaMP6s 系統の様々な種類の匂い物質に対する蛍光強度の時間変化を測定し、算出した蛍光強度変化値をそれぞれの細胞系統におけるネガティブコントロール区とポジティブコントロール区の蛍光強度変化値により補正することで、細胞系統間の蛍光強度変化値を比較する方法を設定した。さらに補正した蛍光強度変化値を比較し、DOR13a 系統において有意に蛍光強度変化値が増加する匂い物質に対して濃度依存応答を測定し、DOR13a 系統が応答を示す匂い物質を同定した。これにより Sf21 細胞系統に発現させた昆虫の OR の応答を蛍光プレートリーダーにより測定可能であることを示し、OR の応答特性のハイスループット解析手法を確立した。最後に、確立したハイスループット解析手法により、キイロショウジョウバエの嗅覚受容体 DOR56a および DOR83b, GCaMP6 を発現させた Sf21 安定細胞系統(DOR56a 系統)の匂い物質に対する応答特性を解析した。

4.2 材料と方法

4.2.1 培養細胞系統と 96 ウェルアッセイプレートの調整

培養細胞系統としてヨトウガ卵巣由来の Sf21 細胞(Thermo Fisher Scientific)に OR, Orco および GCaMP を遺伝子導入し、構築した安定発現系統を用いた。安定細胞系統は抗生物質(10 μ g/mL blastcidin, 300 μ g/mL zeocin; Thermo Fisher Scientific)を添加した Grace's insect medium (Thermo Fisher Scientific)にて 27 $^{\circ}$ C 条件下の恒温機内で継代・維持した。96 ウェルアッセイプレートは、継代後 3 日後の安定細胞系統を用いて調整した。継代・維持しているフラスコから安定細胞系統を回収した後、目的の細胞数に調整した細胞懸濁液 100 μ L を Corning[®] CellBIND[®] 96 well plates (Corning)の各ウェルに添加した。調整した 96 ウェルアッセイプレートは 27 $^{\circ}$ C 条件下の恒温機内にて 24 時間静置した後、リンガー液(140mM NaCl, 5.6mM KCl, 4.5mM CaCl₂, 11.26mM MgCl₂, 11.32mM MgSO₄, 5mM HEPES, 9.4mM Glucose, pH7.2) 80 μ L に置換してから 15 分間静置し、蛍光プレートリーダーFDSS/ μ CELL(浜松ホトニクス)での測定に用いた。

4.2.2 匂い物質と試薬プレートの調整

匂い物質は、酸系やアルコール系、アルデヒド系やアミン系など様々な分類に属するものを用いた。試行した匂い物質は表 4-2 に示す。匂い物質はそれぞれ DMSO にて 100mM に調整した後、1%DMSO 濃度となるようにリンガー液にて目的濃度に希釈し、Corning 96 Well Storage Plat (Corning)の各ウェルに添加し、試薬プレートとして安定細胞系統の刺激に用いた。また、安定細胞系統の蛍光のポジショナルコントロールとしてカルシウムイオンフォアである ionomycin (Sigma)を用いた。

4.2.3 蛍光プレートリーダーを用いた細胞系統の蛍光強度時間変化の測定

調整した 96 ウェルアッセイプレートを用いて、励起光波長 480nm, 発光波長 540nm にて 0.5 秒(1 スライス)間隔で各ウェルの蛍光強度の時間変化の測定を行った。蛍光強度測定の開始 15 秒後(31 スライス目)に各匂い物質 8 μ L を 20 μ L/sec の速度で分注チップにて試薬プレートから 96 ウェルアッセイプレートへと添加し、安定細胞系統への匂い物質の刺激を行った。蛍光強度の測定は測定開始から 360 秒間(721 スライス)行った。

表 4- 2. 蛍光プレートリーダーでの測定に用いた匂い物質.

分類	匂い物質	CAS	分類	匂い物質	CAS	
アミン系	2,3,5-trimethylpyrazine	14667-55-1	アルデヒド系	Octanal	124-13-0	
	Pyridine	110-86-1		Nonanal	124-19-6	
	2,5-dimethylpyrazine	123-32-0		Furfural	98-01-1	
	Pyrazine	290-37-9		Trans-2-hexenal	6728-26-3	
	2-ethyl-3,(5 or 6)-dimethylpyrazine	55031-15-7		Hexanal	66-25-1	
	Cadaverine	462-94-2		Acetic acid	64-19-7	
	Indole	120-72-9		Butyric acid	107-92-6	
アルコール系	1-propanol	67-63-0	カルボン酸系	Heptanoic acid	111-14-8	
	1-butanol	71-36-3		2-Methylbutyric acid	116-53-0	
	1-pentanol	71-41-0		Octanoic acid	124-07-2	
	2-ethyl hexanol	104-76-7		Hexanoic acid	142-62-1	
	1-hexanol	111-27-3		Isovaleric acid	503-74-2	
	2-methyl-1-butanol	137-32-6		2-methylheptanoic acid	1188-02-9	
	3-methyl-2-buten-1-ol	556-82-1		2-methylhexanoic acid	4536-23-6	
	3-hexanol	623-37-0		7-octenoic acid	18719-24-9	
	3,5,5-trimethyl-1-hexanol	3452-97-9		2-furoic acid	88-14-2	
	1-dodecanol	112-53-8		Adipic acid	124-04-9	
	1-octen-3-ol	3391-86-4		Valeric acid	109-52-4	
	2-propanol	71-23-8		ラクトン系	γ-decalactone	706-14-9
	1-nonanol	143-08-8			σ-decalactone	705-86-2
	3-methyl-1-butanol	123-51-3	エステル系	Propyl acetate	109-60-4	
	1-octanol	111-87-5		Ethyl acetate	141-78-6	
	cis-2-hexen-1-ol	928-94-9		Isoamyl acetate	123-92-2	
	cis-3-hexen-1-ol	928-96-1		Amyl acetate	628-63-7	
	1-hepten-3-ol	4938-52-7		Ethyl 3-hydroxybutyrate	5405-41-4	
	4-methylcyclonexanol mixture of cis and trans	589-91-3		Ethyl hexanoate	123-66-0	
	Geosmin	19700-21-1		Methyl octanoate	111-11-5	
アルデヒド系	2-methylbutyraldehyde	96-17-3		Ethyl formate	109-94-4	
	Benzaldehyde	100-52-7		Ethyl propionate	105-37-3	
	Heptanal	111-71-7		Methyl propionate	554-12-1	
	Decanal	112-31-2	Pentyl acetate	628-63-7		

分類	匂い物質	CAS	分類	匂い物質	CAS
テルペン系	β -caryophyllene	87-44-5	大環状ケトン系	Cyclohexanone	108-94-1
	(\pm)-citronellal	106-23-0		2,3-dimethyl-2-cyclopenten-1-one	1121-05-7
	Geraniol	106-24-1		2-methylcyclopentanone	1120-72-5
	Linalool	78-70-6	ケトン系	3-methylcyclopentanone	1757-42-2
	(+)-fenchone	4695-62-9		4-methyl-2-pentanone	108-10-1
	(1R)-(-)-fenchone	7787-20-4		6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0
	(R)-(-)-carvone	6485-40-1		4-methyl-3-penten-2-one	141-79-7
	(S)-(+)-carvone	224-16-8		5-nonanone	502-56-7
	Linalyl acetate	115-95-7		2-butanone	78-93-3
芳香族化合物	Eugenol	97-53-0	2-acetoxy-3-butanone	4906-24-5	
	Eugenol acetate	93-28-7	2-heptanone	110-43-0	
	m-cresol	108-39-4	2-nonanone	821-55-6	
	4,5-dimethylthiazole	3581-91-7	2-acetylthiophene	88-15-3	
硫黄系	Dimethyl sulfide	75-18-3	塩素系	1-chlorododecane	112-52-7

4.2.4 蛍光強度時間変化からの匂い物質に対する変化値の算出

蛍光強度(Fluorescence intensity; F)の時間変化の測定結果から、匂い物質刺激時まで(1-31 スライス)の蛍光強度の平均値[Faverage(1-31)], 匂い物質による刺激後の蛍光強度最大値(FMax)あるいは蛍光強度の最大値周辺の平均値(Faverage)を抽出し、匂い物質による蛍光強度変化値[$\Delta F/F(\%)$]の算出に用いた。蛍光強度変化値の算出式を以下に示す。

$$\textcircled{1} [\Delta F/F(\%)] = (F_{\text{Max}} - [F_{\text{average}}(1-31)]) / [F_{\text{average}}(1-31)] \times 100$$

$$\textcircled{2} [\Delta F/F(\%)] = (F_{\text{average}} - [F_{\text{average}}(1-31)]) / [F_{\text{average}}(1-31)] \times 100$$

4.2.5 安定細胞系統間における匂い物質に対する変化値の比較

DMSO1%を含むリンガー液滴下区をネガティブコントロール区(NC), ionomycin 10 μ M 滴下区をポジティブコントロール区(PC)として、ネガティブコントロール区(NC)の蛍光強度変化値[$\Delta F/F(\text{NC})$]およびポジティブコントロール区(PC)の蛍光強度変化値[$\Delta F/F(\text{PC})$]を用いて、4.2.4の②の式にて算出した各安定細胞系統の匂い物質に対する蛍光強度変化値[$\Delta F/F(\text{Odorant})$]の補正を行い、相対値(Relative value of fluorescence intensity)を算出した。蛍光強度変化相対値算出の式を以下に示す。

$$\begin{aligned} & \text{(Relative value of fluorescence intensity)} \\ & = \{ [\Delta F/F(\text{Odorant})] - [\Delta F/F(\text{NC})] \} / \Delta F/F(\text{PC}) \times 100 \end{aligned}$$

補正後の蛍光強度変化相対値を OR 安定発現細胞系統と GCaMP6s 系統間にて比較を行い、OR 安定発現細胞系統における蛍光強度変化値が GCaMP6s 系統における蛍光強度変化値より有意(*t*検定, $P < 0.05$)に大きくなる匂い物質をリガンド候補として選択した。その後、選択した匂い物質の各濃度(3.3, 10, 30 μ M)を用いて OR 発現安定細胞系統と GCaMP6s 系統の刺激を行い、補正後の蛍光強度変化相対値を比較した。補正後の蛍光強度変化相対値が OR 安定発現細胞系統において濃度依存応答を、かつその蛍光強度変化相対値が GCaMP6s 系統における蛍光強度変化相対値と有意差が検出された匂い物質をリガンドとして同定した。

4.3 結果

4.3.1 蛍光プレートリーダーを用いた安定細胞系統における蛍光強度時間変化の測定条件の設定

蛍光プレートリーダーによる安定細胞系統の匂い物質に対する応答測定条件を BmOR3 系統と発現させた BmOR3 のリガンドであるボンビカール(bombykal; BAL) (Nakagawa T. *et al.*, 2005)を用いて設定した。まず、最も効率的に安定細胞系統の刺激に対する蛍光強度変化を取得するために、刺激に対する蛍光強度変化が最大となる 1 ウェルあたりの細胞数を検討した。細胞懸濁液中の安定細胞系統の数を 0.5×10^5 , 1.0×10^5 , 1.5×10^5 , 2.0×10^5 , と 4 段階になるように調整した 96 ウェルアッセイプレートを、27°C 条件下の恒温機内にて一晩静置した後、BAL 10 μ M および ionomycin 10 μ M に対する蛍光強度の時間変化を測定し、その蛍光強度の時間変化から刺激後の蛍光強度の最大値を 4.2.4 の①の式にて算出した。その結果、BAL に対する最大値はそれぞれ、 12.3 ± 1.6 , 15.0 ± 0.9 , 14.8 ± 0.3 , 10.0 ± 0.5 , ionomycin に対する最大値はそれぞれ、 77.9 ± 2.0 , 140.5 ± 4.9 , 133.9 ± 0.3 , 122.2 ± 0.3 となり、BAL および ionomycin に対する刺激後の蛍光強度の最大値がともに細胞数が 1.0×10^5 の時に最も大きくなった(図 4-2A)。このことから、安定細胞系統の刺激に対する蛍光強度変化量を最も効率的に取得可能な細胞数は 1.0×10^5 であることが示された。

次に、細胞懸濁液の 96 ウェルアッセイプレートの各ウェルへの滴下後、底面に定着して状態が安定するまでの静置時間を設定するため、細胞のウェルへの添加後から応答測定までの静置時間の検討を行った。 1.0×10^5 に調整した細胞懸濁液を 96 ウェルアッセイプレートの各ウェルに添加した後、27°C 条件下の恒温機内にて、1, 20, 24 時間(1h 区, 20h 区, 24h 区)と 3 段階の時間に分けて静置した。静置後、BAL に対する濃度依存応答を測定し、①の式にて算出した蛍光強度最大値から濃度依存曲線を作成した。その結果、20, 24h 区では BAL の濃度が増加するに従い、蛍光強度変化の最大値も増加したが、1h 区では、30, 100nM の濃度に対して蛍光強度の増加が確認されず、さらに 300nM の BAL に対する蛍光強度変化値は 20h 区および 24h 区と比較して小さくなった(図 4-2B)。このことから、安定細胞系統はウェルへの滴下後、底面に安定して定着させるために 20~24 時間程度は静置する必要があることが示された。

これらのことから、蛍光プレートリーダーでの測定条件を以下のように設定した。

1: 1 ウェルあたりの細胞数… 1.0×10^5

2: ウェルに添加した後の静置時間…24 時間

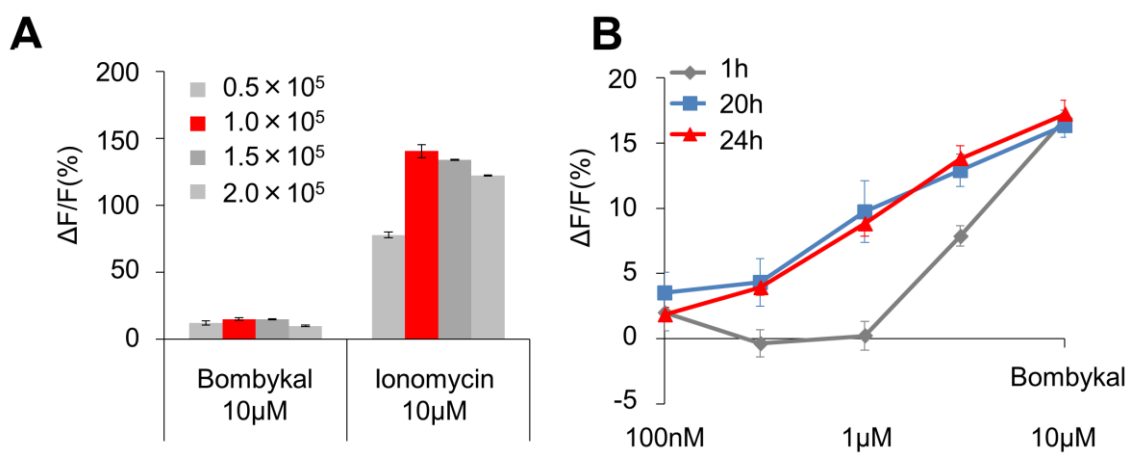


図 4- 2. 蛍光プレートリーダーでの応答測定条件の検討.

A: 細胞数ごとの蛍光強度変化. 各匂い物質濃度: 1mM / リンガー液(DMSO1%). N = 12. Error bar: ± SEM.

B: 静置時間ごとの Bombykal に対する濃度用量曲線. N = 3 (1, 20h), N = 10 (24h). Error bar: ± SEM.

4.3.2 蛍光強度時間変化からの匂い物質に対する変化値の算出方法の設定

蛍光プレートリーダーにおいて測定した蛍光強度の時間変化から匂い物質に対する応答値を算出するため、DOR13a 系統とそのリガンドである 1-octen-3-ol を刺激に用いて、匂い物質に対する蛍光強度の時間変化からの蛍光強度変化値[$\Delta F/F(\%)$]の算出法を設定した。ここでは 4.3.1 で設定した条件を測定条件として用いた。

匂い物質に対する蛍光強度の変化の値とするピーク値を設定するため、1-octen-3-ol (10, 100nM, 1, 10, 100 μ M)の刺激に対する蛍光強度の時間変化を測定し、蛍光強度値が最も高くなる刺激後の時間を選出した。その際の蛍光強度の時間変化および最大値のスライス数を図 4-3, 表 4-3 に示す。DOR13a 系統は発現させた OR のリガンドである 1-octen-3-ol に対して濃度依存的に蛍光強度の増加を示すこと(図 4-3A)から、この 1-octen-3-ol 各濃度に対する応答のピーク値の範囲に、他の匂い物質に対する応答も含まれることが想定される。そこで、各濃度に対する蛍光強度変化のピーク値を含むスライス範囲の特定を行った。DOR13a 系統における低濃度の 1-octen-3-ol に対する蛍光強度は最大値に到達した後、低下する傾向にあり、高濃度の 1-octen-3-ol に対する蛍光強度は最大値に到達した後、しばらく高い蛍光強度値を示す傾向にあった(図 4-3)。各濃度における最大値のスライス数からスミルノフ・グラブズ検定により外れ値を除外した結果、各濃度の 1-octen-3-ol に対する最大値のスライス数は 84~276 の範囲であることが示された(表 4-3)。このことから、ピーク値としてこの範囲の値を用いれば、匂い物質に対する蛍光強度変化を把握可能であることが示唆され、この範囲の蛍光強度の平均値を変化値として用いることとした。次に、測定した蛍光強度の時間変化から DOR13a 系統の 1-octen-3-ol に対する濃度依存曲線を作成した。その結果、DOR13a は 1-octen-3-ol に対して濃度依存的に蛍光強度変化値を増加させ、特に 100nM 以上の 1-octen-3-ol に対してはリンガー液滴下区と比較して有意に蛍光強度変化値が増加した(図 4-4B)。このことから、蛍光プレートリーダーにて安定細胞系統の匂い物質に対する応答を取得可能であることが示された。これより後の実験では蛍光強度変化値は 4.2.4 の②の式により算出した。

匂い物質に対する安定細胞系統の蛍光強度変化が発現させた OR に依存することを確認するため、同様の濃度系列の 1-octen-3-ol に対する GCaMP6s 系統の蛍光強度の時間変化を測定し、1-octen-3-ol に対する濃度依存曲線を作成した。その結果、GCaMP6s 系統はどの濃度の 1-octen-3-ol の刺激に対しても蛍光強度の変化を示さなかった(図 4-4B)。このことから、DOR13a 系統において確認された 1-octen-3-ol に対する濃度依存応答は発現させた OR によるものである可能性が示され、蛍光プレートリーダーを用いることで OR の匂い物

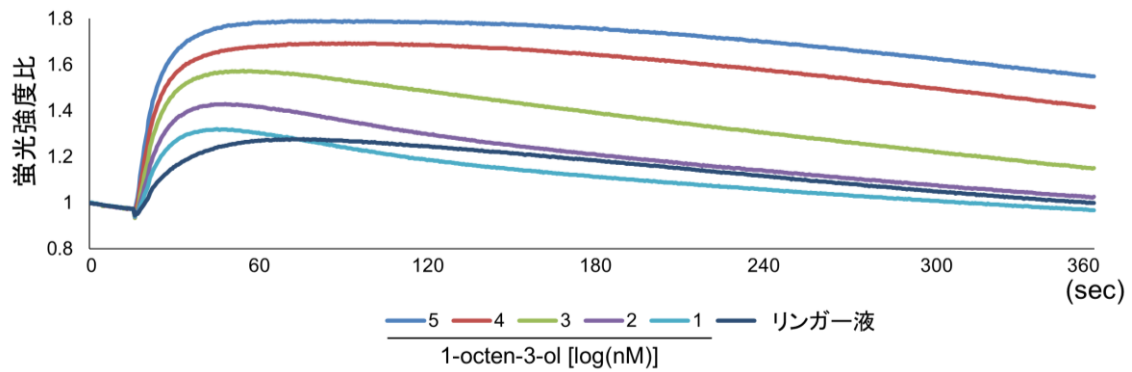


図 4- 3. DOR13a 安定細胞系統の各濃度の 1-octen-3-ol (10, 100nM, 1, 10, 100μM)に対する蛍光強度時間変化の平均値。

N = 12.

表 4- 3. DOR13a 安定細胞系統の各濃度の 1-octen-3-ol (10, 100nM, 1, 10, 100μM)に対する蛍光強度変化における最大値を示すスライス。

1-octen-3-ol [log (nM)]	5	123	132	133	139	143	145	146	149	162	162	163	165	168	175	176	176		
		184	186	187	189	192	193	198	205	212	227	228	237	240	243	257	300		
	4	107	114	119	121	130	142	143	145	152	156	159	161	164	166	167	169		
		174	179	184	184	184	201	202	203	238	246	247	258	260	260	276			
	3	94	94	101	102	103	103	105	105	106	107	108	109	109	109	111	111	111	
		114	114	116	116	117	117	118	122	123	123	123	124	127	134	154	158		
	2	90	90	90	92	92	93	94	95	96	96	96	98	98	98	98	99		
		100	101	101	102	103	103	104	107	107	108	109	109	110	113	115			
	1	81	84	85	86	87	89	90	91	91	91	92	92	92	93	95			
		95	96	96	98	98	98	98	100	100	101	102	103	104	106				
リンガー液	113	116	116	117	118	121	122	128	129	140	142	142	145	146	146	147	149		
	149	151	156	157	160	161	166	170	172	175	178	180	182	182	182	183	185		
	186	186	206	224															

赤字： 外れ値(スミルノフ・グラブズ検定による)。

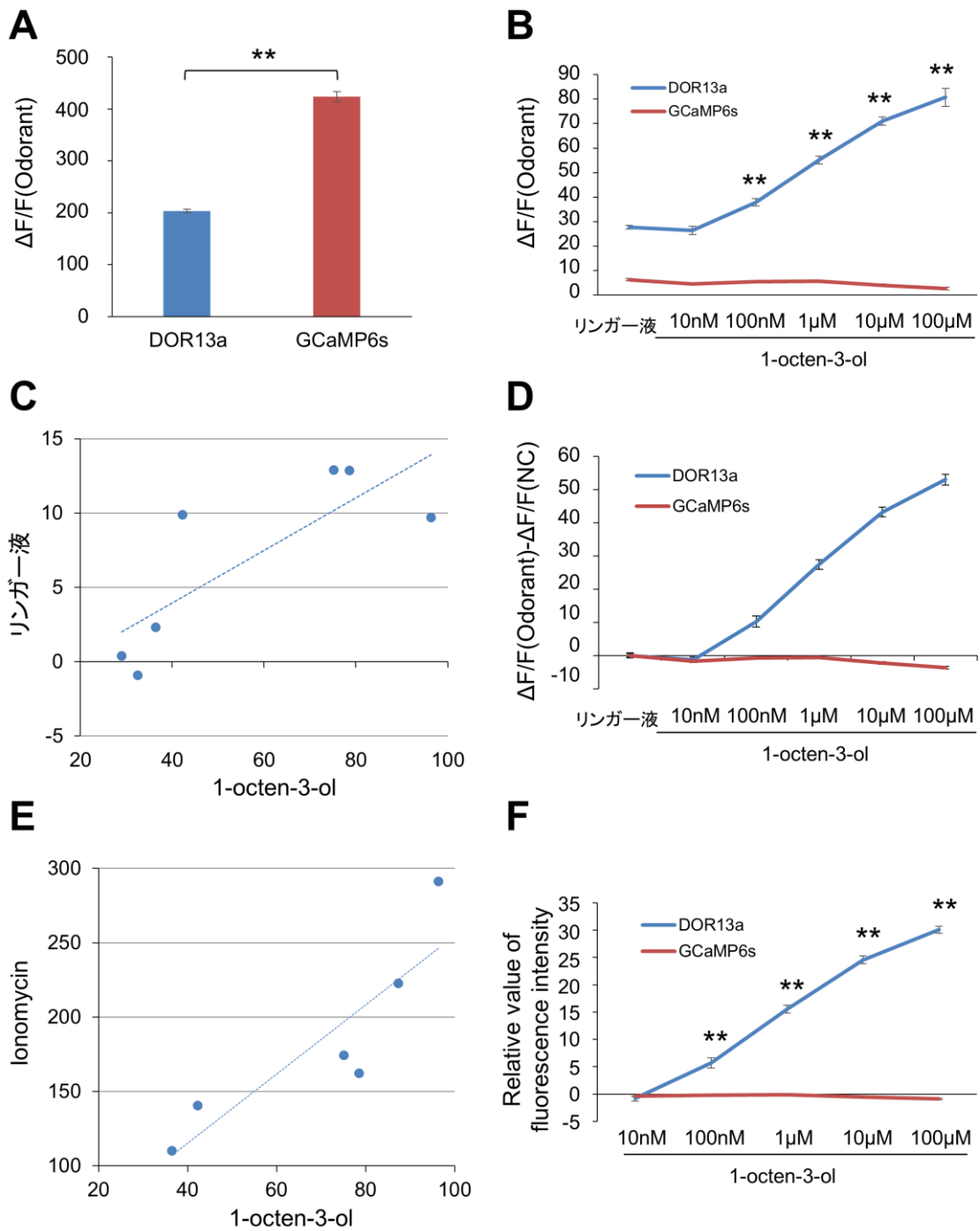


図 4- 4. 安定細胞系統における蛍光強度変化相対値の算出方法.

Error bar: \pm SEM.

A: DOR13a 系統における ionomycin 10 μ M に対する蛍光強度変化量. N = 24.

** : P<0.001 (*t* 検定による).

B: 各安定細胞系統における 1-octen-3-ol に対する濃度用量曲線. N = 24.

** $P < 0.001$ (リンガー液に対する t 検定による).

C: DOR13a 系統における 1-octen-3-ol $10\mu\text{M}$ およびリンガー液に対する蛍光強度変化量の関連性. 相対係数: 0.80.

D: リンガー液に対する蛍光強度変化量により補正した濃度用量曲線. $N = 24$.

E: DOR13a 系統における 1-octen-3-ol $10\mu\text{M}$ および ionomycin $10\mu\text{M}$ に対する蛍光強度変化量の関連性. 相対係数: 0.88.

F: ionomycin 蛍光強度変化量により補正した濃度用量曲線. $N = 24$.

* $P < 0.05$. ** $P < 0.001$ (GCaMP6s 系統の相対値との t 検定による).

質に対する応答を測定可能であることが示唆された。しかしながらここで、DOR13a 系統と GCaMP6s 系統の間ではリンガー液および ionomycin を滴下した際の蛍光強度変化値に有意差が検出され(図 4-4A), 両系統間の蛍光強度変化値を単純に比較できないという問題が明らかとなった。そこで、両系統間の匂い物質に対する蛍光強度変化値を比較するため、各系統における蛍光強度変化値を相対的に補正する方法を検討した。

各系統における蛍光強度変化値を補正する方法として、リンガー液滴下区と ionomycin 滴下区の蛍光強度変化値を利用することが考えられた。そこで、その方法が適応可能か検討するため、匂い物質(1-octen-3-ol 10 μ M)滴下区とこれらの両区の蛍光強度変化値の関係性を比較した。匂い物質(1-octen-3-ol 10 μ M)滴下区とリンガー液滴下区の蛍光強度変化値の関係性を明らかとするため、同一の 96 ウェルアッセイプレート内での両区の蛍光強度変化値を複数の 96 ウェルアッセイプレートにて比較した。その結果、1-octen-3-ol に対する蛍光強度変化値とリンガー液に対する蛍光強度変化値の間の相関係数は 0.80 となり、強い相関を示すことが確認された(図 4-4C)。そこで図 4-4B で示した DOR13a 系統および GCaMP6s 系統の 1-octen-3-ol に対する濃度依存曲線をリンガー液に対する蛍光強度変化値で補正した。その結果、リンガー液および最も低濃度である 10nM の 1-octen-3-ol に対する蛍光強度変化値が一致することが確認された(図 4-4D)。次に、匂い物質(1-octen-3-ol 10 μ M)滴下区と ionomycin 滴下区の蛍光強度変化値の関係性を明らかとするため、同一の 96 ウェルアッセイプレート内での両区の蛍光強度変化値を複数の 96 ウェルアッセイプレートにて比較した。その結果、1-octen-3-ol に対する蛍光強度変化値と ionomycin に対する蛍光強度変化値の間の相関係数は 0.88 となり、強い相関を示すことが確認された(図 4-4E)。そこで、図 4-4D で示した DOR13a 系統および GCaMP6s 系統の 1-octen-3-ol に対する濃度依存曲線を ionomycin に対する蛍光強度変化値で補正を行った。その結果、最も低濃度である 10nM の 1-octen-3-ol に対する蛍光強度変化値は両系統間においてほぼ同程度の値を示し、100nM 以上の 1-octen-3-ol に対する蛍光強度変化値は DOR13a 系統において GCaMP6s 系統よりも有意に増加し、さらにその増加量は濃度依存的に大きくなった(図 4-4F)。これらの結果から、匂い物質に対する蛍光強度変化値は、リンガー液および ionomycin に対する蛍光強度変化値と相関関係にあることが示され、匂い物質に対する蛍光強度変化量はリンガー液および ionomycin に対する蛍光強度変化値により補正することが可能であることが示唆された。この算出に用いる計算式は 4.2.5 に記載した。これより後は 4.2.5 の計算式により補正した蛍光強度変化値は相対値と記載する。この方法では、リンガー液による補正により匂い物質の滴下による物理的衝撃を、ionomycin による補正によって細胞系統の蛍光強度を

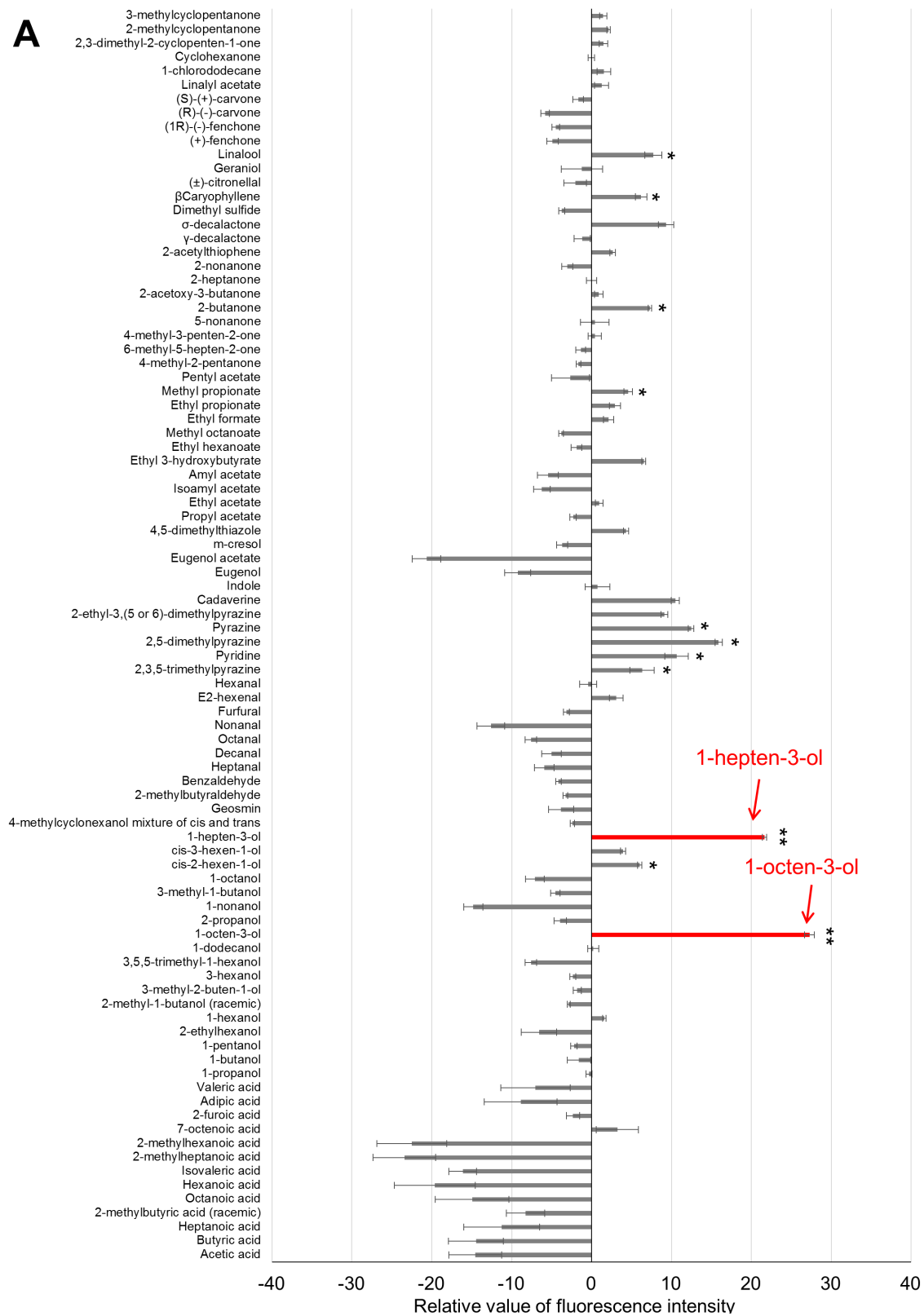
除去可能であると考えられ、図 4-4F で示したこの補正方法により作成した DOR13a 系統の濃度依存曲線は、発現させた DOR13a に依存することが示唆された。このことから、DOR13a 系統において測定された 1-octen-3-ol に対する相対値は Sf21 細胞由来の応答ではなく、発現させた OR の応答であり、蛍光プレートリーダーを用いることで、Sf21 細胞系統に発現させた OR の濃度依存的応答を測定可能であることが示された。

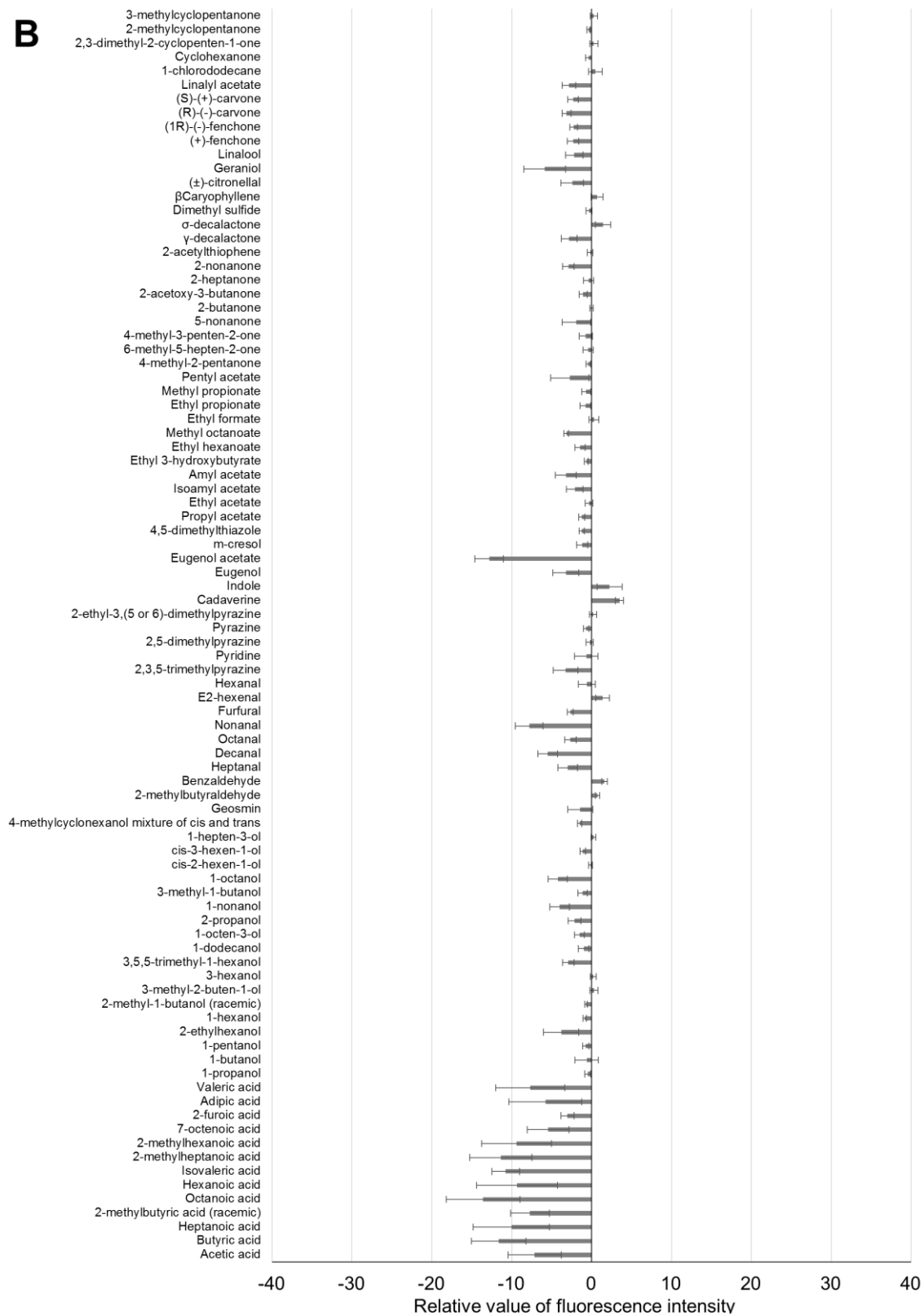
4.3.3 安定細胞系統間での蛍光強度変化値の比較による DOR13a 系統の匂い物質に対する応答特性解析

蛍光プレートリーダーにより DOR13a 系統の蛍光強度の時間変化を測定することで、DOR13a のリガンドである 1-octen-3-ol に対する濃度依存応答を取得可能であることが 4.3.2 において確認された。そこで、発現させた OR の 1-octen-3-ol 以外の匂い物質に対する選択性についても同様の手法にて解析可能であることを確認するため、多様な匂い物質(表 4-2)に対する DOR13a 系統の蛍光強度変化を測定し、その相対値を算出した。その結果、DOR13a 系統は 1-octen-3-ol の他に 1-hepten-3-ol, N-methyldiethanolamine, 2-propylphenol, cis-2-hexen-1-ol, 2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine などの匂い物質に対して大きな相対値を示した(図 4-5A)。

これらの蛍光強度変化が Sf21 細胞系統の応答ではなく発現させた OR によるものであることを確認するため、GCaMP6s 系統においても同じ匂い物質(表 4-2)に対する測定を実施し、4.2.5 の計算式により算出した相対値を各系統間において比較した。その結果、11 種類の匂い物質(1-octen-3-ol, cis-2-hexen-1-ol, 1-hepten-3-ol, 2,3,5-trimethylpyrazine, pyridine, 2,5-dimethylpyrazine, pyrazine, linalool, methyl propionate, 2-butanone, β -caryophyllene)に対する相対値が、DOR13a 系統と GCaMP6s 系統との間において有意差を示すことが確認された(図 4-5A-C)。これらの匂い物質のうち、リガンドであることが同定されている 1-octen-3-ol を除く 10 種類の匂い物質に対する応答が発現させた OR の応答であることを確認するため、各匂い物質(3.3, 10, 30 μ M)に対する濃度依存応答を測定し、相対値から作成した濃度依存曲線を DOR13a 系統と GCaMP6s 系統間において比較した。その結果、1-hepten-3-ol に対する相対値は 3 段階の全ての濃度においてリンガー液に対する蛍光強度変化値に対して有意に大きくなること、濃度依存的に増加することが確認された(図 4-6A, B)。また、cis-2-hexen-1-ol に対する相対値は 10, 30 μ M の濃度において、pyridine および 2,3,5-trimethylpyrazine に対する相対値は 30 μ M の濃度において GCaMP6s 系統における各匂い物質に対する相対値に対して有意に大きくなること、濃度依存的に増加する

A



B

C

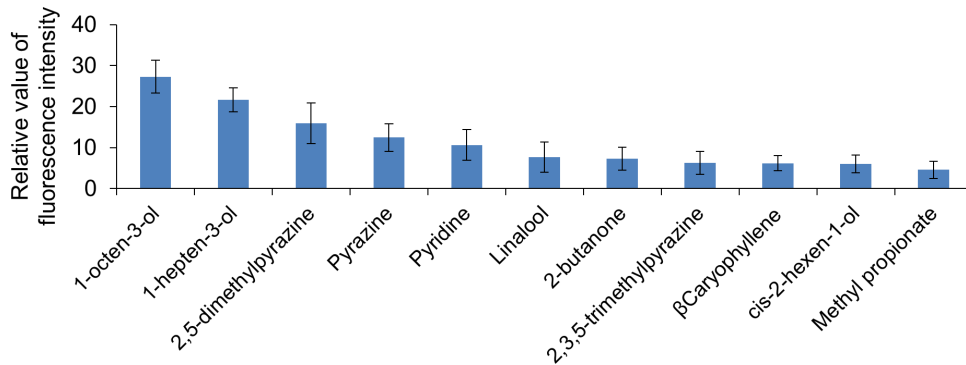


図 4- 5. 安定細胞系統の匂い物質に対する応答特性.

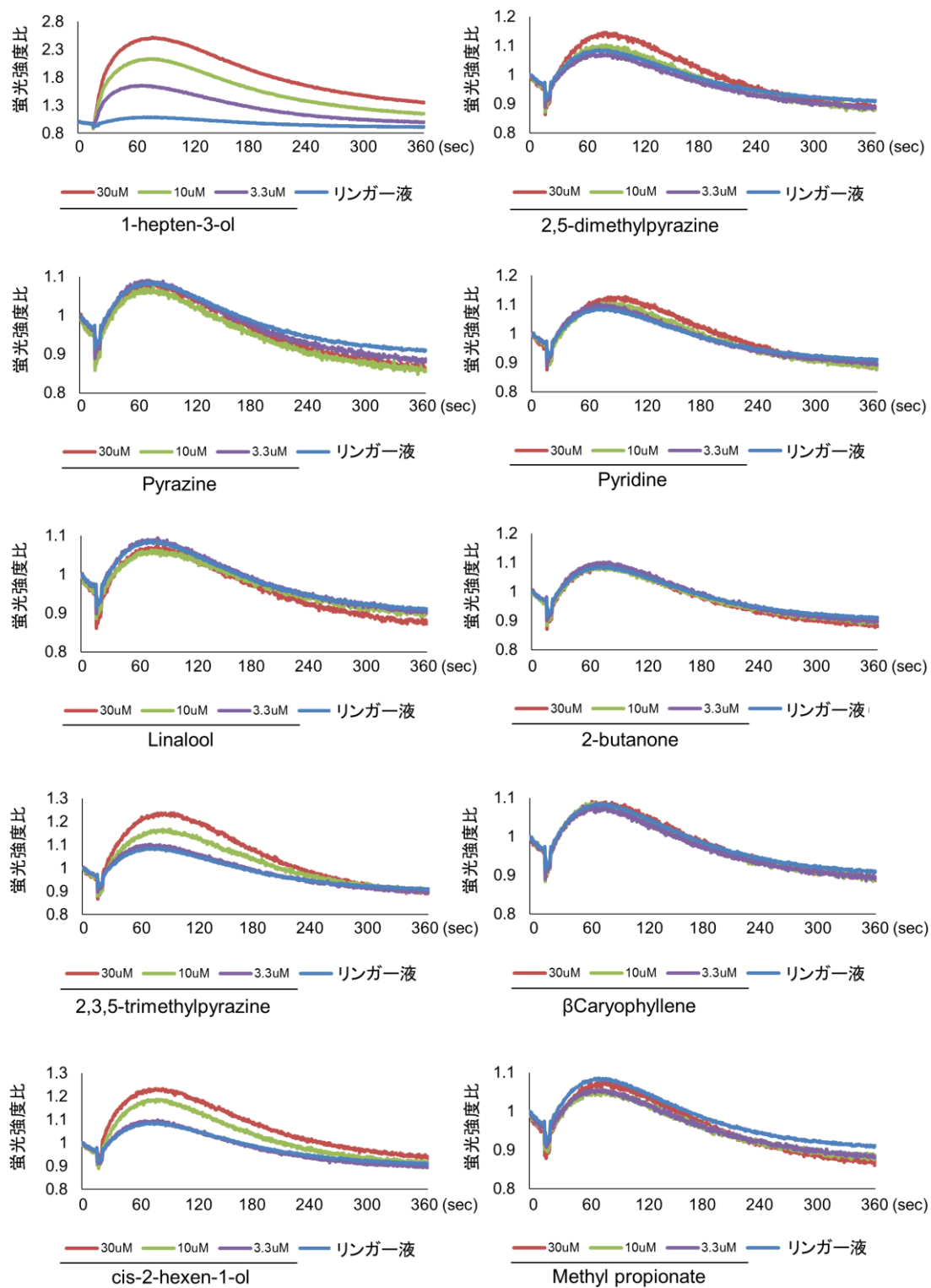
各匂い物質濃度: 10 μ M (終濃度). Error bar: \pm SEM.

A: DOR13a 系統の選択性. N = 7. *: P<0.05. **: P<0.001. (GCaMP6s 安定細胞系統の相対値との *t* 検定による).

B: GCaMP6s 系統の選択性. N = 9.

C: GCaMP6s 系統の相対値と有意差が検出された匂い物質に対する DOR13a 系統の相対値. N = 7.

ことが確認された(図 4-6A, B). DOR13a 系統の相対値が 1-octen-3-ol に加え, 1-hepten-3-ol, cis-2-hexen-1-ol, pyridine, 2,3,5-trimethylpyrazine に対して濃度依存応答を示したことから, これらの匂い物質が DOR13a 系統のリガンドであることが示唆された. これらのことから, 蛍光プレートリーダーにより安定細胞系統の匂い物質に対する応答特性と濃度依存応答を測定可能であることを示し, Sf21 細胞系統に発現した昆虫の OR の匂い物質に対する応答特性をハイスループットに解析する手法を確立した. この手法を用いた OR の応答特性解析のフローを図 4-7 に示す.

A

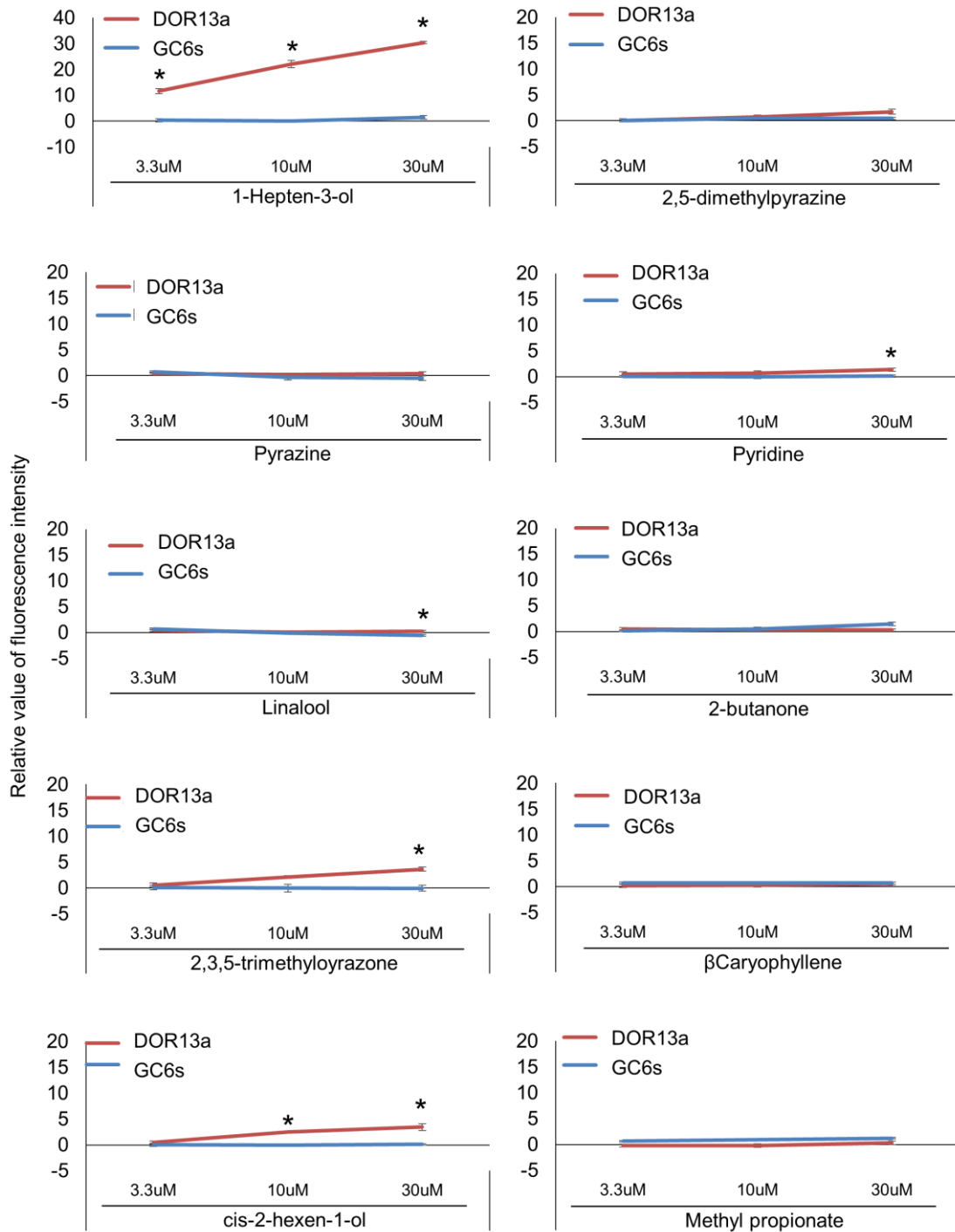
B

図 4- 6. DOR13a および GCaMP6s 系統における相対値の比較.

A: DOR13a 系統の各匂い物質(3.3, 10, 30μM)に対する蛍光強度時間変化.

B: DOR13a および GCaMP6s 系統の各匂い物質に対する濃度用量曲線. N = 4.

Error bar: ± SEM. *: P<0.05 (GCaMP6s 系統の相対値との *t*検定による).

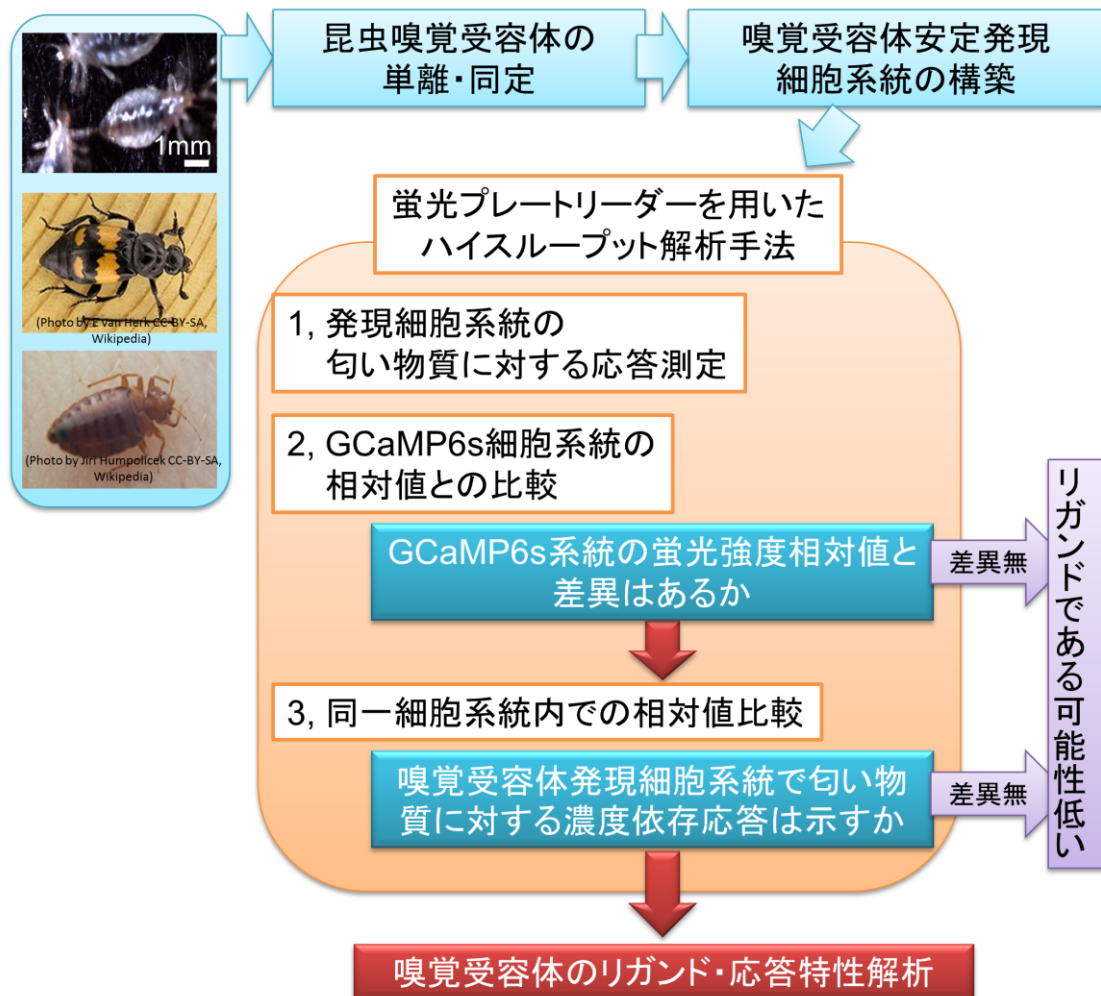


図 4-7. 蛍光プレートリーダーを用いた Sf21 細胞発現系による嗅覚受容体の匂い物質に対する応答特性解析の進行手順.

4.3.4 DOR56a 系統における匂い物質に対する濃度依存応答と選択性

安定細胞系統に発現させた OR の匂い物質に対する濃度依存応答を含む応答特性の解析が蛍光プレートリーダーにより可能であることを, DOR13a 系統を用いて 4.3.2 および 4.3.3 で示した. そこで, DOR13a と異なる応答特性をもつ OR においても本手法により匂い物質に対する濃度依存応答を含む応答特性の解析が可能であることを確認し, 本手法の有効性を検証するため, DOR56a 系統を用いてその匂い物質に対する濃度依存応答および応答特性の解析を行った.

DOR56a 系統のリガンドである geosmin (Stensmyr M.C. *et al.*, 2012) に対する濃度依存応答を測定するため, geosmin (100pM, 1, 10, 100nM, 1, 10 μ M) の刺激に対する蛍光強度変化を測定し(図 4-8A), 4.2.5 の計算式により算出した相対値から濃度依存曲線を作成した. 同様に GCaMP6s 系統においても geosmin の濃度系列の刺激に対する蛍光強度の時間変化を測定し, 濃度依存曲線を作成した後, geosmin に対する両系統の濃度依存応答を比較した. その結果, 100pM の geosmin に対する相対値は両系統間において差はなく, ほぼ同程度の値を示し, 1nM 以上の geosmin に対する相対値は DOR56a 系統において GCaMP6s 系統よりも有意に増加し, さらにその増加量は濃度依存的に大きくなった(図 4-8B). このことから, DOR56a 系統においても DOR13a 系統と同様, 蛍光プレートリーダーにより匂い物質に対する濃度依存応答を測定可能であることが示された.

また, DOR56a 系統のその他の匂い物質に対する選択性を解析するため, 表 4-2 の各匂い物質の刺激に対する蛍光強度の時間変化を測定し, 4.2.5 の計算式によりその相対値を算出し, GCaMP6s 系統における匂い物質に対する相対値との比較を行った(図 4-5B, 4-8C). その結果, DOR56a 系統における geosmin に対する相対値が GCaMP6s 系統と比較して有意に大きくなることが確認され, DOR56a 系統は発現させた DOR56a の応答特性に従い, その蛍光強度を増加させることが示された. これらのことから, 本研究で確立した Sf21 細胞に発現した昆虫の OR の匂い物質に対する応答特性のハイスループット解析手法により, 数種の OR の濃度依存応答を含む匂い物質に対する応答特性の解析が可能であることが示唆された.

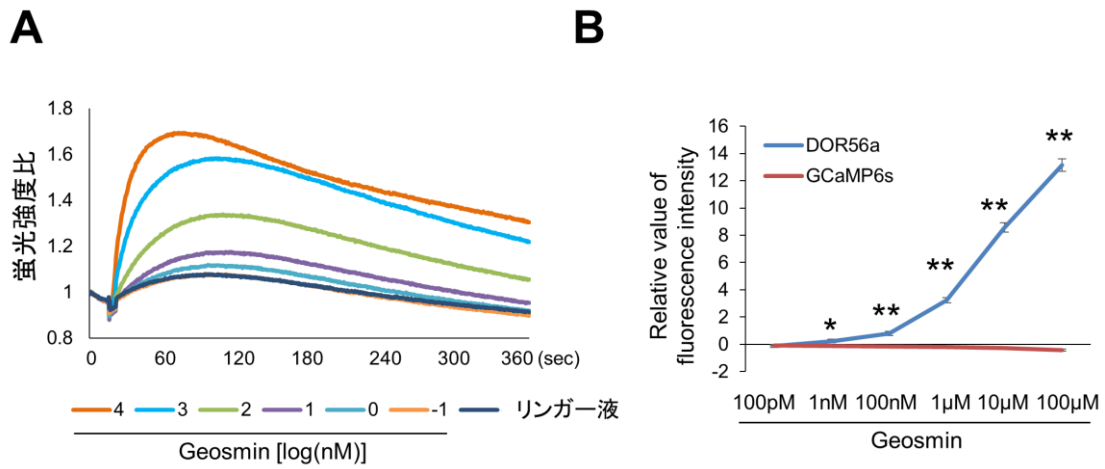
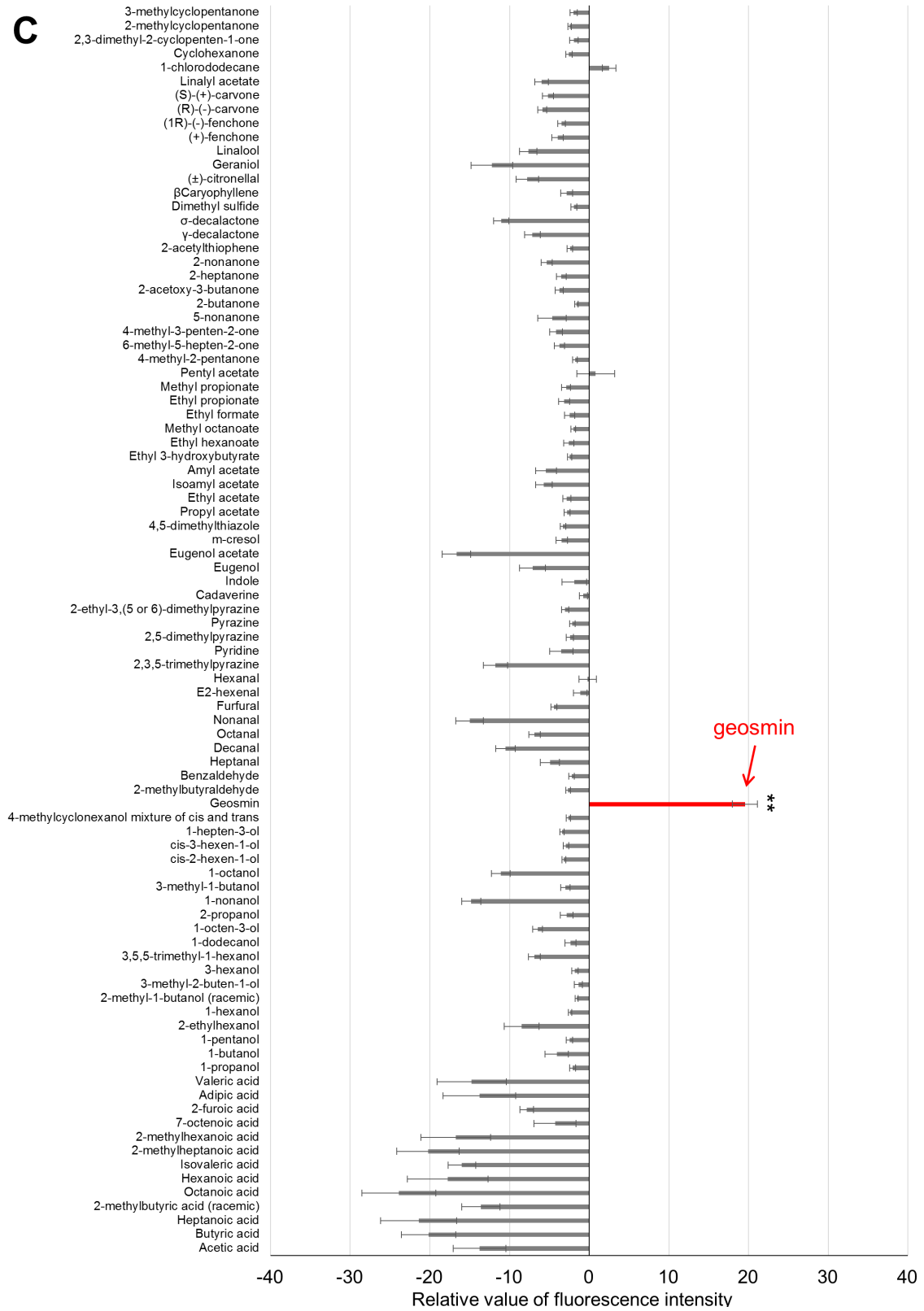


図 4- 8. DOR56a 系統の応答特性.

A: 各濃度の geosmin (100nM, 1, 10, 100nM, 1, 10μM) に対する蛍光強度時間変化.

B: geosmin に対する相対値の濃度用量曲線. N = 36 (DOR56a), 24 (GCaMP6s). Error bar: \pm SEM. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.001$ (GCaMP6s 系統の相対値との t 検定による).

C: 匂い物質に対する選択性. 各匂い物質濃度: 10μM (終濃度). N = 7. Error bar: \pm SEM. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.001$. (GCaMP6s 系統の相対値との t 検定による).

C

4.4 考察

昆虫はその OR により環境下の匂い物質を検出し、嗅覚行動を示すことから、OR の機能解析はその嗅覚機能を明らかにするための有効な手法である。同時に第 3 章で示したように、OR の機能同定によって昆虫が検出可能な匂い物質の特定が可能であることから、その効率的な機能同定の手法確立は効率的な忌避剤や誘引剤の開発に寄与することが考えられる。本章において、昆虫の OR の応答測定に蛍光プレートリーダーを利用することに着目し、多数の匂い物質に対する応答特性の解析を達成するため、これまでに機能解析に用いられてきたアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的手法や Ca^{2+} イメージング法などの既存手法よりも迅速な応答特性解析が可能になるハイスループット解析手法の確立に取り組んだ。これまでに Sf21 細胞に OR, Orco および GCaMP を共発現させることにより匂い物質の刺激に対して自身の蛍光強度を増加する細胞を作出する技術が確立しており、昆虫の OR の機能解析法の一つとして利用されている。ここでは本章で実施した、蛍光プレートリーダーを用いた OR のハイスループット解析手法の開発に関する考察を記述する。

4.4.1 蛍光プレートリーダーを用いた応答測定の設定

OR や GPCR などの膜上で機能する受容体の機能解析においてハイスループットに応答を測定可能なプレートリーダーの利用が進んでいる。例えば、薬物探索や薬物動態の分野では GPCR の機能解析にプレートリーダーが用いられている (Raphemot R. *et al.*, 2013, Tewson P.H. *et al.*, 2013, Cai B. *et al.*, 2014, Furman C.A. *et al.*, 2014)。また、プレートリーダーによる OR の応答測定、機能解析の例としてヒトの OR の例が挙げられる。ヒトはゲノム中に約 400 種類の OR を所有しており、これまでアフリカツメガエル卵母細胞発現系による電気生理学実験や蛍光顕微鏡下による Ca^{2+} イメージング法ではその 6% ほどのリガンドしか同定されていなかったが、機能未知の OR の機能解析を加速させるため、HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイの発光系を利用したプレートリーダーによる OR の応答測定手法が確立され、328 種の OR の 26 種の匂い物質に対する応答解析が実施された (Wetzell C.H. *et al.*, 1999; Spehr M. *et al.*, 2003; Sanz G. *et al.*, 2005; Shirokova E. *et al.*, 2005; Matarazzo V. *et al.*, 2005; Jacquier V. *et al.*, 2006; Neuhaus E.M. *et al.*, 2006; Keller A. *et al.*, 2007; Menashe I. *et al.*, 2007; Saito H. *et al.*, 2009; Jaeger S.R. *et al.*, 2013; Trimmer C. *et al.*, 2014)。プレートリーダーによる応答測定手法は昆虫の OR の機能解析においても有効であることから、昆虫の OR を発現させた Sf21 安定細胞系統の匂

い物質に対する応答を効率的に取得するため、蛍光プレートリーダーによる安定細胞系統の応答測定条件の設定を行った。本項ではその結果に関する考察を記述する。

蛍光プレートリーダーによる測定において、1 ウェル当たりの細胞数を 1.0×10^5 個、添加後の静置時間を 24 時間と条件として設定した。BmOR3 系統を用いた検討の結果、 1.0×10^5 の細胞数の条件で BAL に対する蛍光強度値が最大となった(図 4-2A)が、 1.5×10^5 および 2.0×10^5 とでは細胞数が増えるに従い BAL に対する蛍光強度変化値が小さくなった。顕微鏡下でウェル内の細胞状態を確認したところ、 1.0×10^5 の区ではウェルの 8~9 割の領域に細胞が存在したが、 2.0×10^5 の区では細胞同士が重なっている領域が確認された。蛍光プレートリーダーによる測定では 96 ウェルアッセイプレートの底面部から細胞の励起および蛍光強度の測定を行うため、ウェルの底面部の細胞の蛍光強度しか測定できない。このことから細胞数が多く、重なっている状態では底面部の細胞にまで匂い物質の刺激が到達しておらず、蛍光強度が増加しないことが考えられた。また、顕微鏡下でウェル内の細胞状態を確認したところ、1h 区のウェル底面部において細胞が接着していない領域が多く存在していたことから、 1.0×10^5 の細胞懸濁液の滴下後 24 時間静置することで底面の細胞数が測定に適切な数になることが考えられる。しかしながら、遺伝子導入後に構築した Sf21 安定細胞系統は系統により若干成長速度が異なること(Iwamatsu T. *et al.*, unpublished)から、調整後の 96 ウェルアッセイプレートは蛍光プレートリーダーでの測定前に細胞の状態の確認が必要となる。本研究においては、DOR13a 系統および DOR56a 系統ともにプレートリーダーでの測定前に、顕微鏡下にて底面に付着している細胞数が 8~9 割であることを試行ごとに確認した。将来的に多数の安定細胞系統の応答測定を連続して実施する際には、各安定細胞系統の成長速度を把握し、適切な細胞数、静置時間の条件を見直すことで、この細胞数の確認の手間を排除し、さらにハイスループットな応答特性解析が可能になると考えられる。

4.4.2 昆虫嗅覚受容体応答特性解析への利用

キイロショウジョウバエの成虫の触角には 32 種類の OR が発現しており、哺乳類などと同様に、これらの OR の組み合わせによって匂い物質を識別している(Malnic B. *et al.*, 1999; Vosshall L.B. *et al.*, 2000, 2001; Kajiya K. *et al.*, 2001; Hallem E.A. *et al.*, 2004; Hallem E.A. and Carlson J.R. 2004). さらにキイロショウジョウバエでは、個々の OR の匂い物質に対する応答特性がデータベース化されており、特定の匂い物質に対して応答を示す OR とその応答値の検索が可能となっている(Galizia C.G. *et al.*, 2010). このような

OR の匂い物質に対する応答特性データの蓄積は、第 3 章で示した忌避剤や誘引剤の探索などの様々な方面に活用できることから、非常に価値が高いといえる。このことから、長期的に連続して応答測定が可能な Sf21 安定細胞系統の匂い物質に対する応答を蛍光プレートリーダーにより測定する手法は、OR の匂い物質に対する応答特性データの蓄積を促進させる有効な手法であると期待される。そこで、蛍光プレートリーダーにより OR の応答特性をハイスループットに解析可能な手法を確立するため、キイロショウジョウバエの DOR13a を対象とし、その手法確立および確立した手法を用いた DOR13a および DOR56a の多数の匂い物質に対する応答特性解析を実施した。本項ではこれらの結果に関して考察を記述する。

蛍光プレートリーダーによって多種類の匂い物質に対する蛍光強度変化を一括して測定することが可能であるが、先行研究で実施されている昆虫の OR の機能解析では、プレートリーダーにて測定された蛍光強度値やその最大値と最小値の比を比較に用いている (Bohbot J.D. *et al.*, 2010; Corcoran J.A. *et al.*, 2014)。本研究においては N-methyldiethanolamine, 2-propylphenol などの匂い物質に対して DOR13a 系統および GCaMP6s 系統の両系統ともに蛍光強度が増加したことから、細胞自体が匂い物質に対して応答を示していると考えられる匂い物質が存在することが明らかとなった。このことから蛍光プレートリーダーで測定した蛍光強度値をそのまま応答とすると細胞自体の応答を除外しておらず OR の応答を正しく評価出来ていない可能性があった。そこで、蛍光強度変化値から OR の応答を適切に抽出するため、DOR13a 系統の 1-octen-3-ol に対する濃度依存応答を用いて、応答ピーク値となるスライス範囲の設定や蛍光強度変化値の相対値への補正方法を検討した。この方法にて算出した DOR13a 系統の 1-octen-3-ol に対する相対値の濃度依存曲線は濃度依存的に増加し、さらに同様に補正した GCaMP6s 系統の相対値と有意差が検出されることが明らかとなった(図 4-4F)。これらのことから、本手法により算出された相対値は細胞自体の応答を除外した OR の応答であることが考えられる。この際、各安定細胞系統の NC 区および PC 区の蛍光強度変化値に差があることが確認された(図 4-4A, B)。この要因については明らかにすることはできなかったが、各安定細胞の基底状態の蛍光強度や蛍光を呈する細胞の割合が異なっていることから、安定細胞系統における GCaMP の発現量や割合に差異がある可能性がある。しかしながら本手法により補正した結果、最も低濃度の 1-octen-3-ol に対する相対値は両系統間で一致し、その相対値は濃度依存応答を示すことから、この補正手法により OR の応答を適切に評価可能であると考えられる。DOR13a 系統および GCaMP6s 系統の匂い物質に対する相対値の比較、濃度依存応答

の比較から、これまで報告されていない DOR13a のリガンドとして 1-hepten-3-ol を同定した。この応答相対値は 21.7 ± 2.9 とリガンドである 1-octen-3-ol の 27.3 ± 4.0 に次いで強い応答を示した。本研究ではその他にも濃度依存応答を示した匂い物質が確認されたが、それらの相対値は非常に小さいことが確認された(図 4-5A-C)。ここでは DOR13a の 94 種類の匂い物質に対する応答特性解析を達成した。さらに N-methyldiethanolamine, 2-propylphenol などの匂い物質に対する DOR13a 系統および GCaMP6s 系統の応答相対値間には有意差が検出されず、リガンドと同定されなかった。今後さらに多くの匂い物質に対する応答特性解析を実施することで、OR のリガンドを同定する際にはこのような細胞自体が応答を示す匂い物質の扱いを考慮する必要があるが、本論文にて提案する解析手法(図 4-7)における GCaMP6s 系統の相対値との比較を行うことで、このような匂い物質をリガンドとしてしまう疑陽性を防止することが可能であると考えられる。

本研究で試行した匂い物質の中には、蛍光強度変化値から算出した相対値が低下する匂い物質が存在した(図 4-5A,B, 図 4-8C)。昆虫の OR は生体内やアフリカツメガエル卵母細胞での異所発現時には自発的にそのチャンネルが開閉していることが報告されており (de Bruyne M. *et al.*, 1999; de Bruyne M. *et al.*, 2001; Dobritsa A.A. *et al.*, 2003; Hallem E.A. *et al.*, 2004; Hallem E.A. and Carlson J.R. 2006; Sato K. *et al.*, 2008), 本研究にて用いた OR を発現した Sf21 細胞系統には OR から一定量の Ca^{2+} の流入が生じていることが考えられる。一般的には細胞内の Ca^{2+} は $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体などによって細胞外へと排出されているが、相対値が低下する匂い物質と OR との結合により OR の自発的な開閉が閉じたままになったことで、一時的に Sf21 細胞内の Ca^{2+} 量が低下し、相対値が低下したことが考えられる。本研究において検証することはできなかったが、今後はある OR を発現させた安定培養細胞系統の OR の既知のアンタゴニストに対する応答測定を蛍光プレートリーダーを用いて実施し、アンタゴニストに対する応答測定の可否を検証することで、本研究の手法がアゴニストに加え、アンタゴニストに対する応答測定、スクリーニングも可能な手法として発展する可能性が考えられる。

本研究にて確立した蛍光プレートリーダーによる測定では、DOR13a 系統が 1-octen-3-ol に対して 100nM, DOR56a 系統が geosmin に対して 1nM から有意な応答を示した(図 4-4F, 4-8B)。これまで蛍光顕微鏡下の Ca^{2+} イメージング法にて解析された DOR13a 系統および DOR56a 系統の応答感度(DOR13a 系統: 1 μM , DOR56a 系統: 300nM)と比較すると、蛍光プレートリーダーを用いた応答測定の方がより高感度に OR の応答を測定可能であるといえる。また 100 μM のリガンドに対する蛍光強度の実測値(補正前の値)を比較すると、本研

究にて確立した蛍光プレートリーダーによる測定では DOR13a 系統は $80.7 \pm 1.7\%$, DOR56a 系統は $61.4 \pm 2.0\%$ と蛍光顕微鏡下の Ca^{2+} イメージング法の蛍光強度の変化値 (DOR13a 系統: $37.2 \pm 6.0\%$, $1\mu\text{M}$, DOR56a 系統: $19.6 \pm 1.8\%$) と比べて大きくなった。蛍光顕微鏡下の Ca^{2+} イメージング法では一度に 200 個の細胞の一つ一つの応答を測定してその平均値を応答強度としているが、蛍光プレートリーダーを用いた応答測定では 1.0×10^5 個の応答を一括して測定し、複数のウェルの平均値を応答強度として使用しているため、使用している細胞数が非常に多い。そのため蛍光強度の変化値が大きくなり、蛍光顕微鏡下の Ca^{2+} イメージング法より高感度に測定可能であったことが考えられる。加えて本研究と同じ蛍光プレートリーダーを用いて HEK293 細胞に発現させたハマダラカの OR の応答を測定した先行研究では 100nM からの応答を取得可能であることが報告されている (Bohbot J.D. *et al.*, 2010)。DOR56a 系統では 1nM からの応答を取得可能であること (図 4-8B) から、他の蛍光プレートリーダーを用いた応答測定手法より高感度に OR の応答を測定可能な手法確立を達成したといえる。

本章では、昆虫の OR を発現させた安定細胞系統の匂い物質に対する応答を、蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットかつ高感度に測定する手法を確立した。この手法により、DOR13a 系統および DOR56a 系統の匂い物質の応答特性の解析を達成した。この手法によりさらに多種類の OR の応答特性解析が進行するものと考えられる。現段階ではキイロショウジョウバエの OR を発現している安定細胞系統しか構築されておらず、他生物種の OR についてこの手法が適用可能かは明らかとなっていないが、蛍光顕微鏡下での Ca^{2+} イメージング法においてリガンドに対して応答を示す安定細胞系統であれば、この手法が適用可能であると考えられる。将来的には多種類の昆虫種の OR を発現した安定細胞系統においても検討を行い、様々な昆虫種の OR の機能解析にこの手法を適用可能であることを示したいと考えている。

第5章 総括

害虫の中でも感染症を伝搬する衛生害虫は我々の健康に被害を与えるため、その防除が重要な課題となっている。その防除の取り組みには、人間の健康や環境へのリスクを配慮して生物的防除、物理的防除、化学的防除などの防除法を組み合わせた総合的病害虫管理が取り入れられている。これらの防除法の中でも殺虫剤を用いた化学的防除法が最も費用対効果が高く、利用されやすいが、環境への負荷が大きいことや害虫の薬剤耐性の取得の問題から、自然由来の植物精油の含有成分から探索した行動制御剤の有効性が注目されている。また、衛生害虫を含む害虫はその宿主や寄主植物への誘引行動に匂いを利用していることから、昆虫の嗅覚機能を利用した行動制御剤に関する期待も高まっている。昆虫はORの応答により匂い物質を検出していることから、ORの応答特性情報を基盤とした忌避効果あるいは誘引効果を持つ匂い物質のスクリーニングは行動制御剤開発において有効な手法であると考えられるが、これまでにそのような手法を用いることで、実際に行動制御剤の候補物質を同定した例は報告されていない。

本研究では、衛生害虫の中でもヒトに対する宿主特異性が高いコロモジラミを対象として、まず、忌避効果がある植物精油からその忌避効果に寄与する匂い物質の同定とその効果の検証を行った。さらにORの応答特性情報を基盤とした行動制御剤の探索が有効であることを示すため、コロモジラミのPhORの応答特性解析およびPhORが応答する匂い物質に対する行動解析を実施し、本手法の有効性を検証した。さらにその手法による行動制御剤探索を促進させるため、ORの応答特性解析に応用可能となる蛍光プレートリーダーを用いたハイスループット解析手法を確立した。第2章では、コロモジラミが忌避行動を示すクローブ精油を用いて行動解析手法を確立し、その手法を用いた行動解析によりクローブ精油中のeugenolがその忌避効果に寄与していること、eugenolの忌避効果はクローブ精油の主要成分である β -caryophylleneとの混合により増強することを明らかとした(図2-5A)。しかしながら、クローブ精油中のeugenolと β -caryophylleneの含有量は、種類や採取部位によってeugenol: 48.82~95.2%, β -caryophyllene: 1.39~36.94%と差が大きいことや本研究で同定した成分以外の微量成分が含まれていること(Kegley S. *et al.*, 2010)が報告されていることから、eugenolと β -caryophylleneおよび他の匂い物質との様々な組み合わせの忌避効果を検証し、最も効果的な忌避効果を示す組み合わせを見出すことで、コロモジラミの行動制御剤開発に効果的に応用することが可能になると考えられる。

第3章では、コロモジラミ触角・頭部からのPhOR遺伝子配列の単離およびその機能同

定を達成し(図 3-5, 6, 8, 9), 第 2 章で確立したコロモジラミの行動解析法を用いた匂い物質への行動解析により, PhOR が応答を示す匂い物質の中からコロモジラミの行動制御剤と成り得る複数の匂い物質を同定した(図 3-13~15). さらに機能同定を達成した PhOR のひとつである PhOR3 の一般臭への応答とその匂い物質に対する行動傾向には関係性があることを明らかにしたこと(図 3-16B)から, この PhOR が応答する匂い物質のさらなるスクリーニングによって, 効果的なコロモジラミに対する行動制御剤候補物質を同定できる可能性を示した. これらのことから, 本研究で提案する昆虫の OR の応答特性情報を基盤にした行動制御剤の探索が有効な手法であることが示唆された. しかしながら, 本研究ではその他の 3 種類の PhOR の機能同定には至っておらず, これらの PhOR が匂い物質に対してどのような応答特性を示すかは不明である. また, コロモジラミのゲノム中には IR などの匂い物質の検出に関わる他の化学感覚受容体も存在していることから, 複数の受容体を用いて環境下の匂い物質を検出していることが推定される. 現段階では機能同定に至っていないこれらの受容体の応答特性を解明することにより, 将来的にコロモジラミの匂い物質の認識, その識別に用いる受容体の応答パターンを解明することが可能となり, さらに効果的な行動制御剤の同定も可能になることが期待される.

第 4 章では, OR が応答する匂い物質の効率的なスクリーニングへの活用を目的として, キイロショウジョウバエの OR および Orco, カルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP を共発現した Sf21 細胞を用いて OR の匂い物質に対する応答特性のハイスループットな解析手法の確立に取り組んだ. この手法により昆虫の OR を発現させた安定細胞系統の匂い物質に対する応答を, 蛍光プレートリーダーを用いてハイスループットかつ高感度に測定することが可能となり, OR が応答する匂い物質の効率的なスクリーニングが可能となった(図 4-5, 8). 本研究で確立したハイスループット解析手法(図 4-7)では, 細胞自体が応答を示す可能性がある N-methyldiethanolamine, 2-propylphenol などの匂い物質をリガンド候補物質から除外することが可能であるが, これらの匂い物質に対して応答を示す OR の応答を適切に評価可能か現段階では不明である. そのため, このような匂い物質に対して応答を示す OR を発現した安定細胞系統を用いて, 匂い物質に対する応答測定の可否を検証する必要がある. そこで匂い物質に対する Sf21 細胞系統由来の応答が除外できず, OR の応答測定が困難な場合には, 細胞特性が異なる他の細胞系統を用いることも考慮する必要がある. 例えば, 昆虫の OR の機能解析には今回使用した Sf21 細胞系統の他に T-REx293 細胞系統や HEK293 細胞系統が用いられている(Bohbot J.D. *et al.*, 2010; Corcoran J.A. *et al.*, 2014). これらの細胞系統を基として, OR, Orco および GCaMP を共発現させた安定細胞

系統を構築することで Sf21 細胞系統由来の応答が確認される匂い物質に対しても応答測定が可能になることが推察される。また、本研究では、DOR13a 系統と DOR56a 系統が発現している OR 以外のキイロショウジョウバエの OR やコロモジラミを初めとした他の昆虫種の OR の応答特性解析にまでは至っていない。この要因として、現段階で構築されている安定細胞系統が DOR13a 系統および DOR56a 系統のみであることが挙げられる。今後、コロモジラミの PhOR を初めとした昆虫の OR を発現した安定細胞系統の効率的な構築技術を確立することにより、様々な昆虫の OR の匂い物質に対する応答特性をハイスループットに解析することが可能になるであろう。

ここで用いた Sf21 安定細胞系統は、これまでの匂いセンサ性能を超えた匂いセンサの構築に利用可能であることが期待されている(Mitsuno H. *et al.*, 2014)。この匂いセンサは高感度、高選択的に匂い物質を検出可能であることから、疾病の早期発見などヘルスケア分野での応用も期待されている。実際に疾病に伴って特定の匂い物質が検出されることが報告されており(Shirasu M. *et al.*, 2011)、膀胱癌の診断マーカーとして 2-nonenal や dodecanal の利用可能性が示されている(Jobu K. *et al.*, 2012)。この匂い物質のうち、dodecanal に対しては本研究で機能同定した PhOR3 が強く応答を示すことが明らかとなったことから、この PhOR3 の安定細胞系統を構築することで、膀胱癌を診断可能な匂いセンサに応用可能であることが期待できる。また、コロモジラミはヒトに特異的に寄生し、その体臭に誘引行動を示すこと(Wigglesworth V.B. 1941)が報告されており、他の生物種の体臭には忌避行動を示す傾向にあるとされている。ヒトと他の生物の体臭成分を GC-MS 分析などにより比較することで、体臭に対する行動の違いを解発する匂い物質を特定できる可能性がある。この匂い物質はコロモジラミの行動制御剤と成り得ることも期待されるとともに、この匂い物質に対して応答を示す OR を発現させた Sf21 安定細胞系統は、ヒトの体臭を検出する匂いセンサに応用できることも期待される。

本研究では、コロモジラミを対象として、自然由来の植物精油から忌避効果をもつ匂い物質を同定した。さらに OR の応答特性情報を基盤とした行動制御剤の探索が行動制御剤の新たな探索手法として有効であることを示し、OR の応答特性のハイスループット解析手法の確立を達成した。新規の昆虫行動制御剤の探索において、対象とした昆虫の匂い物質に対する嗅覚行動や植物精油の忌避効果などが未知の場合、OR の応答特性情報を基盤とした行動制御剤の探索手法は OR が応答を示す匂い物質は昆虫生体に嗅覚行動を解発する可能性が高いこと、行動制御剤探索において律速となる行動試験の回数を低減することが可能になることが植物精油成分からの忌避剤探索手法に対する優位点となる。これらのこ

とから、本研究にて提案した手法を活用することで昆虫の行動制御剤と成り得る匂い物質の効率的なスクリーニングが可能となることが考えられ、本手法は効果的な行動制御剤の開発に寄与することができると考えられる。また、本手法は OR の応答特性情報を基盤としていることから、昆虫生体における匂い物質の受容様式や生体における OR の機能解明に発展することも期待される。

本研究で行動制御剤としての可能性を示した 3,4-dimethylbenzaldehyde や(+)-fenchone, dodecanal などの匂い物質や今後本手法を用いることで同定する匂い物質を、実際に行動制御剤の製品開発に利用するためには実用化への検討が必要となる。例えば、対象とする昆虫の生育環境に則した環境下での行動試験により、匂い物質の効果範囲や使用する濃度を決定する必要がある。また、製品とした際の効果的な使用量や効果の持続性の検証も必要不可欠となる。とはいえ、数万～数十万種の匂い物質の行動制御剤としての可能性を、対象の昆虫生体を用いて網羅的に検討することと比較すれば、新規の行動制御剤の開発に費やす期間は本手法を用いることで劇的に短縮されることが可能である。

現在、衛生害虫を初めとする害虫の防除は日本国内だけでなくアフリカにおけるマラリア対策や都市型害虫の発生など、世界中で深刻な課題となっている。本論文において検証した行動制御剤の探索手法は日本国内だけでなく、世界中における害虫防除への活用にまで発展する可能性があり、多数の人々の健康や安心安全な生活に広く貢献できるものと期待される。

謝辞

本研究の進行にあたり，多くの方々にお世話になりました。

東京大学先端科学技術研究センター副所長の神崎亮平教授には，本研究を実施する機会を与えてくださるとともに数々のご指導やご助言，ご援助を頂きました。心より御礼申し上げます。同研究センターの高橋宏知講師には研究に対する貴重なご助言を頂きました。深く感謝いたします。また，本研究の進行にあたり，研究方針や実験技術などさまざまな面に対し，ご指導，ご助言を頂きました東京大学先端科学技術研究センターの櫻井健志特任講師，光野秀文特任助教に心より御礼申し上げます。

本論文審査の副査をご快諾頂き，多くのご助言を頂きました，東京大学先端科学技術研究センターの浜窪隆雄教授，石北央教授，国立感染症研究所昆虫医科学部部長の沢辺京子博士に心より御礼申し上げます。また，浜窪隆雄教授にはウェスタンブロッティングの検出にもご協力頂きました。石北央教授には本論文の構成や図表など詳細な箇所にまでご助言頂きました。沢辺京子博士には本研究の背景であるコロモジラミの社会問題に関するご助言や本研究に用いたコロモジラミの入手にもご協力頂きました。深く感謝いたします。

本研究を通して，様々なご助言，ご協力を頂きました。本研究に用いたコロモジラミは株式会社大阪製薬の吉岡由明氏よりご提供いただきました。ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた分析には東京大学農学生命科学研究科の石川幸男教授，藤井毅特任助教(現東京農工大学特別研究員)にご指導いただきました。東京工業大学精密工学研究所の中本高道教授から匂い物質を分譲いただきました。蛍光プレートリーダーを用いた測定には浜松ホトニクス株式会社の伊藤博康博士，同片岡卓治氏にご助言いただきました。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析にはライフテクノロジーズジャパン株式会社の村上聡博士にご指導，ご助言いただきました。豊橋技術科学大学の三澤宜雄特任講師には研究方針の客観的なご意見やご助言をいただきました。コロモジラミの行動解析手法に関しては神戸大学大学院理科学研究科の北條賢特命助教にご助言いただきました。ウェスタンブロッティングの検出に関しては東京大学先端科学技術研究センターの早田敬太博士にご指導頂きました。Ca²⁺イメージング法における画像解析に関しては東京大学先端科学技術研究センターの並木重宏博士にご指導いただきました。コロモジラミの行動の画像解析の開発に関しては神崎研究室の宮本大輔氏にご協力いただきました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

技術補佐員の中島裕子氏，糸井川茜氏，土屋純子氏には細胞の継代や実験環境の整備などを行っていただきました。おかげで快適に研究を進めることができました，心より御礼申し上げます。三田毅氏，照月大悟氏，塩田裕介氏，Maneerat Termtanasombat 氏を初めとする研究室の諸氏諸兄に感謝いたします。

引用文献

- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., Baxendale J., Bayraktaroglu L., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K.C., Busam D.A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J.M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L.B., Davies P., de Pablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A.D., Dew I., Dietz S.M., Dodson K., Doup L.E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B.C., Dunn P., Durbin K.J., Evangelista C.C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A.E., Garg N.S., Gelbart W.M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J.H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N.L., Harvey D., Heiman T.J., Hernandez J.R., Houck J., Hostin D., Houston K.A., Howland T.J., Wei M.H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G.H., Ke Z., Kennison J.A., Ketchum K.A., Kimmel B.E., Kodira C.D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A.A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T.C., McLeod M.P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N.V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S.M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D.M., Nelson D.L., Nelson D.R., Nelson K.A., Nixon K., Nusskern D.R., Pacleb J.M., Palazzolo M., Pittman G.S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M.G., Reinert K., Remington K., Saunders R.D., Scheeler F., Shen H., Shue B.C., Sidén-Kiamos I., Simpson M., Skupski M.P., Smith T., Spier E., Spradling A.C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A.H., Wang X., Wang Z.Y., Wassarman D.A., Weinstock G.M., Weissenbach J., Williams S.M., Woodage T., Worley K.C., Wu D., Yang S., Yao Q.A., Ye J., Yeh R.F., Zaveri J.S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X.H., Zhong F.N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H.O., Gibbs R.A., Myers E.W., Rubin G.M., Venter J.C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Alma M.H., Ertas M., Nitz S., Kollmannsberger H. (2007) Chemical composition of content of essential oil from the bud of cultivated Turkish Clove. *Bio Res.* **2**, 265-269.
- Ahmad R., Baharum S.N., Bunawan H., Lee M., Mohd Noor N., Rohani E.R., Ilias N.,

- Zin N.M. (2014) Volatile profiling of aromatic traditional medicinal plant, *Polygonum minus* in different tissues and its biological activities. *Molecules* **19**, 19220-19242.
- 浅川 勝 (1975) 農業害虫の殺虫剤抵抗性の実態. *植物防疫*. **29**, 257-261.
- Bagavan A., Rahuman A.A., Kamaraj C., Elango G., Zahir A.A., Jayaseelan C., Santhoshkumar T., Marimuthu S. (2011) Contact and fumigant toxicity of hexane flower bud extract of *Syzygium aromaticum* and its compounds against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Parasitol Res.* **109**, 1329-1340.
- Benton R., Vannice K.S., Gomez-Diaz C., Vosshall L.B. (2009) Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell* **136**, 149-162.
- Bhatt S., Gething P.W., Brady O.J., Messina J.P., Farlow A.W., Moyes C.L., Drake J.M., Brownstein J.S., Hoen A.G., Sankoh O., Myers M.F., George D.B., Jaenisch T., Wint G.R., Simmons C.P., Scott T.W., Farrar J.J., Hay S.I. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504-507.
- Bise G., Coninx R. (1997) Epidemic typhus in a prison in Burundi. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 133-134.
- Bobkov Y., Corey E., Ache B. (2014) An inhibitor of Na⁺/Ca²⁺ exchange blocks activation of insect olfactory receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* **2**, 1104-1109.
- Bohbot J.D., Jones P.L., Wang G., Pitts R.J., Pask G.M., Zwiebel L.J. (2011) Conservation of indole responsive odorant receptors in mosquitoes reveals an ancient olfactory trait. *Chem Senses* **36**, 149-160.
- Brady O.J., Gething P.W., Bhatt S., Messina J.P., Brownstein J.S., Hoen A.G., Moyes C.L., Farlow A.W., Scott T.W., Hay S.I. (2012) Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* **6**, e1760.
- Burgess I.F. (2004) Human lice and their control. *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 457-481.
- Buxton P.A. (1947) *The Louse: An Account of the Lice Which Infest Man, Their Medical Importance and Control* (Second Edition), Edward Arnold, London.
- Caers J., Peymen K., Suetens N., Temmerman L., Janssen T., Schoofs L., Beets I. (2014) Characterization of G protein-coupled receptors by a fluorescence-based calcium mobilization assay. *J Vis Exp.* **28**, e51516.
- Cai B., Chen X., Liu F., Li J., Gu L., Liu J.R., Liu J. (2014) A cell-based functional assay using a green fluorescent protein-based calcium indicator dCys-GCaMP. *Assay Drug Dev Technol.* **12**, 342-351.
- Carey A.F., Wang G., Su C.Y., Zwiebel L.J., Carlson J.R. (2010) Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature* **464**, 66-71.

- Cha D.H., Powell T.H., Feder J.L., Linn C.E.Jr. (2011) Identification of host fruit volatiles from three mayhaw species (*Crataegus* series *Aestivales*) attractive to mayhaw-origin *Rhagoletis pomonella* flies in the southern United States. *J Chem Ecol.* **37**, 961-973.
- Chen S., Luetje C.W. (2012) Identification of new agonists and antagonists of the insect odorant receptor co-receptor subunit. *PLoS One* **7**, e36784.
- Chen T.W., Wardill T.J., Sun Y., Pulver S.R., Renninger S.L., Baohan A., Schreiter E.R., Kerr R.A., Orger M.B., Jayaraman V., Looger L.L., Svoboda K., Kim D.S. (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295-300.
- Chung I.M., Ahmad A., Kim S.J., Naik P.M., Nagella P. (2012) Composition of the essential oil constituents from leaves and stems of Korean *Coriandrum sativum* and their immunotoxicity activity on the *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **34**, 152-156.
- Clyne P.J., Warr C.G., Freeman M.R., Lessing D., Kim J., Carlson J.R. (1999) A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron* **22**, 327-338.
- Cohn B.A., La Merrill M., Krigbaum N.Y., Yeh G., Park J.S., Zimmermann L., Cirillo P.M. (2015) DDT Exposure in Utero and Breast Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* **100**, 2865-2872.
- Corcoran J.A., Jordan M.D., Carraher C., Newcomb R.D. (2014) A novel method to study insect olfactory receptor function using HEK293 cells. *Insect Biochem Mol Biol.* **54**, 22-32.
- Croset V., Rytz R., Cummins S.F., Budd A., Brawand D., Kaessmann H., Gibson T.J., Benton R. (2010) Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genet.* **8**, e1001064.
- Culpepper G.H. (1944) The rearing and maintenance of a laboratory colony of the body louse. *Am J Trop Med.* 327-329.
- Culpepper G.H. (1946) Rearing body lice on rabbits: scientific note. *J Econ Entomol.* **39**, 660.
- Culpepper G.H. (1948) Rearing and maintenance of a laboratory colony of body lice on rabbits. *Am J Trop Med.* **28**, 499-504.
- Cutler S.J. (2010) Relapsing fever--a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol.* **108**, 1115-1122.
- de Bruyne M., Clyne P.J., Carlson J.R. (1999) Odor coding in a model olfactory organ: the *Drosophila* maxillary palp. *J. Neurosci.* **19**, 4520-4532.

- de Bruyne M., Foster K., Carlson J.R. (2001) Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* **30**, 537-552.
- DeGennaro M., McBride C.S., Seeholzer L., Nakagawa T., Dennis E.J., Goldman C., Jasinskiene N., James A.A., Vosshall L.B. (2013) orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature* **498**, 487-491.
- Denholm I., Rowland M.W. (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. *Annu Rev Entomol.* **37**, 91-112.
- Dhumal T.D., Waghmare J.S. (2015) A pediculicidal activity of clove oil. *IJPSR* **6**, 857-865.
- Ditzen M., Pellegrino M., Vosshall L.B. (2008) Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science* **319**, 1838-1842.
- Dobritsa A.A., van der Goes van Naters W., Warr C.G., Steinbrecht R.A., Carlson J.R. (2003) Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* **37**, 827-841.
- Dolianitis C., Sinclair R. (2002) Optimal treatment of head lice: is a no-nit policy justified? *Clin Dermatol.* **20**, 94-96.
- Downs A.M., Stafford K.A., Coles G.C. (1999) Head lice: prevalence in school children and insecticide resistance. *Parasitol Today* **15**, 1-4.
- Fein B.L., Reissig W.H., Roelofs W.L. (1982) Identification of apple volatiles attractive to the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *J Chem Ecol.* **12**, 1473-1487.
- Fox A.N., Pitts R.J., Robertson H.M., Carlson J.R., Zwiebel L.J. (2001) Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* and evidence of down-regulation in response to blood feeding. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 14693-14697.
- Fox A.N., Pitts R.J., Zwiebel L.J. (2002) A cluster of candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Chem Senses* **27**, 453-459.
- Furman C.A., Roof R.A., Moritz A.E., Miller B.N., Doyle T.B., Free R.B., Banala A.K., Paul N.M., Kumar V., Sibley C.D., Newman A.H., Sibley D.R. (2014) Investigation of the binding and functional properties of extended length D3 dopamine receptor-selective antagonists. *Eur Neuropsychopharmacol.* **25**, 1448-1261.
- Galizia C.G., Sachse S., Rappert A., Menzel R. (1999) The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Neurosci.* **5**, 473-478.
- Galizia C.G., Menzel R. (2000) Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns. *Curr Opin Neurobiol.* **4**, 504-510.

- Galizia C.G., Münch D., Strauch M., Nissler A., Ma S. (2010) Integrating heterogeneous odor response data into a common response model: A DoOR to the complete olfactome. *Chem Senses* **35**, 551-563.
- Gallardo A., Mougabure C.G., Picollo M.I. (2009) *Pediculus humanus capitis* (head lice) and *Pediculus humanus humanus* (body lice): response to laboratory temperature and humidity and susceptibility to monoterpenoids. *Parasitol Res.* **105**, 163-167.
- Gao Q., Chess A. (1999) Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics* **15**, 31-39.
- Glatz R., Bailey-Hill.K. (2010) Mimicking nature's noses: from receptor deorphaning to olfactory biosensing. *Prog Neurobiol.* **93**, 270-296.
- Gratz N.G. (1997) Human lice, their prevalence, control and resistance to insecticides: a review, 1985–97. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Division Control Tropical Diseases, WHO Pesticide Evaluation Scheme, 1997. Report WHO/CTD/ WHOPES/97.8, 7: 176-179.
- Gu H.J., Cheng S.S., Lin C.Y., Huang C.G., Chen W.J., Chang S.T. (2009) Repellency of essential oils of *Cryptomeria japonica* (Pinaceae) against adults of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae). *J Agric Food Chem.* **57**, 11127-11133.
- 浜 弘司 (1986) 各種殺虫剤に対するコナガの抵抗性スペクトル. *日本応用動物昆虫学会誌.* **30**, 277-284.
- Hallem E.A., Carlson J.R. (2004) The odor coding system of *Drosophila*. *Trends Genet.* **20**, 453-459.
- Hallem E.A., Ho M.G., Carlson J.R. (2004) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* **117**, 965-979.
- Hallem E.A., Nicole F.A., Zwiebel L.J., Carlson J.R. (2004) Mosquito receptor for human-sweat odorant. *Nature* **427**, 212-213.
- Hallem E.A., Carlson J.R. (2006) Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell* **125**, 143-160.
- Hase S., Gozu Y., Nakamura S., Kohno Y., Sawano K., Ohta H., Yamazaki K. (2001). 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J Invest Dermatol.* **116**, 520-524.
- Hill A.V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol.* **40**, 4-7.
- Hill C.A., Fox A.N., Pitts R.J., Kent L.B., Tan P.L., Chrystal M.A., Cravchik A., Collins F.H., Robertson H.M., Zwiebel L.J. (2002) G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 176-178.

- Holt R.A., Subramanian G.M., Halpern A., Sutton G.G., Charlab R., Nusskern D.R., Wincker P., Clark A.G., Ribeiro J.M., Wides R., Salzberg S.L., Loftus B., Yandell M., Majoros W.H., Rusch D.B., Lai Z., Kraft C.L., Abril J.F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P.W., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturverdi K., Christophides G.K., Chrystal M.A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans C.A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M.E., Hladun S.L., Hogan J.R., Hong Y.S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J.J., Lobo N.F., Lopez J.R., Malek J.A., McIntosh T.C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S.D., O'Brochta D.A., Pfannkoch C., Qi R., Regier M.A., Remington K., Shao H., Sharakhova M.V., Sitter C.D., Shetty J., Smith T.J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L.Q., Topalis P., Tu Z., Unger M.F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K.J., Wortman J.R., Wu M., Yao A., Zdobnov E.M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S.C., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth C.W., Louis C., Kalush F., Mural R.J., Myers E.W., Adams M.D., Smith H.O., Broder S., Gardner M.J., Fraser C.M., Birney E., Bork P., Brey P.T., Venter J.C., Weissenbach J., Kafatos F.C., Collins F.H., Hoffman S.L. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129-149.
- Hopf T.A., Morinaga S., Ihara S., Touhara K., Marks D.S., Benton R. (2015) Amino acid coevolution reveals three-dimensional structure and functional domains of insect odorant receptors. *Nat Commun.* **6**, 6077. doi: 10.1038/ncomms7077.
- Hopp T.P., Prickett K.S., Price V.L., Libby R.T., March C.J., Cerretti D.P., Urdal D.L., Conlon P.J. (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Nature Biotechnol.* **6**, 1204-1210.
- Hori M. (1999) Role of host plant odors in the host finding behaviors of aphids. *Appl. Entomol. Zool.* **34**, 293-298.
- Hori M., Ohuchi K., Matsuda K. (2006) Role of host plant volatile in the host-finding behavior of the strawberry leaf beetle, *Galerucella vittaticollis* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Appl. Entomol. Zool.* **41**, 357-363.
- Hughes D.T., Wang G., Zwiebel L.J., Luetje C.W. (2014) A determinant of odorant specificity is located at the extracellular loop 2-transmembrane domain 4 interface of an *Anopheles gambiae* odorant receptor subunit. *Chem Senses.* **9**, 761-769.
- 池田俊弥 (1981) マツノマダラカミキリの宿主選択と誘引物質. *植物防疫* **35**, 395-400.
- Jacquier V., Pick H., Vogel H. (2006) Characterization of an extended receptive ligand

- repertoire of the human olfactory receptor OR17-40 comprising structurally related compounds. *J Neurochem.* **97**, 537-544.
- Jaeger S.R., McRae J.F., Bava C.M., Beresford M.K., Hunter D., Jia Y., Chheang S.L., Jin D., Peng M., Gamble J.C., Atkinson K.R., Axten L.G., Paisley A.G., Tooman L., Pineau B., Rouse S.A., Newcomb R.D. (2013) A Mendelian trait for olfactory sensitivity affects odor experience and food selection. *Curr Biol.* **23**, 1601-1605.
- Jin X., Ha T.S., Smith D.P. (2008) SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **31**, 10996-11001.
- Jobu K., Sun C., Yoshioka S., Yokota J., Onogawa M., Kawada C., Inoue K., Shuin T., Sendo T., Miyamura M. (2012) Metabolomics study on the biochemical profiles of odor elements in urine of human with bladder cancer. *Biol Pharm Bull.* **35**, 639-642.
- Jones W.D., Nguyen T.T., Kloss B., Lee K.J., Vosshall L.B. (2005) Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr Biol.* **15**, R119-R121.
- Kain P., Boyle S.M., Tharadra S.K., Guda T., Pham C., Dahanukar A., Ray A. (2013) Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. *Nature* **502**, 507-512.
- Kaissling K.E. (1971) Insect olfaction. *Handbook of Sensory Physiology IV*, Springer Verlag, Heidelberg, 351-431.
- Kajiya K., Inaki K., Tanaka M., Haga T., Kataoka H., Touhara K. (2001) Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci.* **21**, 6018-6025.
- 鹿島長次 (2014) 匂いを生かすも殺すも温度次第. *身の回りの匂いを化学する.* 64-80.
- Kaupp U.B. (2010) Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci.* **11**, 188-200.
- Kegley S., Conlisk E., Moses M. (2010) Clove Oil (Eugenol). Herbicide Risk Assessment Chapter 6, Marin Municipal Water District, Berkeley, California.
- Keller A., Zhuang H., Chi Q., Vosshall L.B., Matsunami H. (2007) Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature* **449**, 468-472.
- Kiely A., Authier A., Kralicek A.V., Warr C.G., Newcomb R.D. (2006) Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells. *J Neurosci Methods* **159**, 189-194.
- Kikuchi Y., Hayatsu M., Hosokawa T., Nagayama A., Tago K., Fukatsu T. (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**, 8618-8622.
- Kim K.C., Pratt H.D., Stojanovich C. (1986) The Sucking Lice of North America: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press,

University Park, Pennsylvania.

- Kirkness E.F., Haas B.J., Sun W., Braig H.R., Perotti M.A., Clark J.M., Lee S.H., Robertson H.M., Kennedy R.C., Elhaik E., Gerlach D., Kriventseva E.V., Elsik C.G., Graur D., Hill C.A., Veenstra J.A., Walenz B., Tubío J.M., Ribeiro J.M., Rozas J., Johnston J.S., Reese J.T., Popadic A., Tojo M., Raoult D., Reed D.L., Tomoyasu Y., Kraus E., Mittapalli O., Margam V.M., Li H.M., Meyer J.M., Johnson R.M., Romero-Severson J., Vanzee J.P., Alvarez-Ponce D., Vieira F.G., Aguadé M., Guirao-Rico S., Anzola J.M., Yoon K.S., Strycharz J.P., Unger M.F., Christley S., Lobo N.F., Seufferheld M.J., Wang N., Dasch G.A., Struchiner C.J., Madey G., Hannick L.I., Bidwell S., Joardar V., Caler E., Shao R., Barker S.C., Cameron S., Bruggner R.V., Regier A., Johnson J., Viswanathan L., Utterback T.R., Sutton G.G., Lawson D., Waterhouse R.M., Venter J.C., Strausberg R.L., Berenbaum M.R., Collins F.H., Zdobnov E.M., Pittendrigh B.R. (2010) Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**, 12168-12173.
- Kitaoka M. (1952) DDT resistant lice in Tokyo. *Jpn J Med Sci Biol*. **5**, 75–88.
- Koizumi A., Tsuchiya A., Nakajima K., Ito K., Terada T., Shimizu-Ibuka A., Briand L., Asakura T., Misaka T., Abe K. (2011) Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**, 16819-16824.
- Kreher S.A., Mathew D., Kim J., Carlson J.R. (2008) Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron* **59**, 110-124.
- Krieger J., von Nickisch-Roseneck E., Mameli M., Pelosi P., Breer H. (1996) Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**, 297-307.
- Krieger J., Raming K., Dewer Y.M., Bette S., Conzelmann S., Breer H. (2002) A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur J Neurosci*. **16**, 619-628.
- Krieger J., Klink O., Mohl C., Breer H. (2003) A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A* **189**, 519-526.
- Krieger J., Grosse-Wilde E., Gohl T., Dewer Y.M., Raming K., Breer H. (2004) Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (*Heliothis virescens*). *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**, 11845-11850.
- Kristensen M., Knorr M., Rasmussen A.M., Jespersen J.B. (2006) Survey of permethrin and malathion resistance in human head lice populations from Denmark. *J Med Entomol*. **43**, 533-538.
- Kristensen N.P. (1991) Phylogeny of Extant Hexapods. *In: The Insects of Australia*, 2nd ed..

国立感染症研究所ウイルス第一部第2室：デングウイルス感染症情報
(<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/dengue.htm>)

厚生労働省結核感染症課：デング熱の国内感染症例について(第一報), 2014年8月27日

厚生労働省結核感染症課：デング熱の国内感染症例について(第三十八報), 2014年10月31日

Laan J.R. van der, Smit R.B.J. (1996) Terug van weggeweest: de kleepluis (*Pediculus humanus* var. *corporis*). *Ned. Tijdschr Geneesk.* **140**, 1912-1915.

Larsson M.C., Domingos A.I., Jones W.D., Chiappe M.E., Amrein H., Vosshall L.B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* **43**, 703-714.

Lei H., Christensen T.A., Hildebrand J.G. (2002) Local inhibition modulates odor-evoked synchronization of glomerulus-specific output neurons. *Nat Neurosci.* **6**, 557-565.

Li Z.J., Njateng G.S., He W.J., Zhang H.X., Gu J.L., Chen S.N., Du Z.Z. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the edible aromatic plant *Aristolochia delavayi*. *Chem Biodivers* **11**, 2032-2041.

Light J.E., Toups M.A., Reed D.L. (2008) What's in a name: the taxonomic status of human head and body lice. *Mol Phylogenet Evol* **47**, 1203-1216.

Liu M.Y., Tzeng Y.J., Sun C.N. (1981) Diamondback moth resistance to several synthetic pyrethroids. *J. Econ. Entomol.* **74**, 393-396.

Loomis D., Guyton K., Grosse Y., El G.F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Mattock H., Straif K. (2015) Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol.* **16**, 891-892.

Maida R., Steinbrecht A., Ziegelberger G., Pelosi P. (1993) The pheromone binding protein of *Bombyx mori*: purification, characterization and immunocytochemical localization. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 243-253.

牧上久仁子, 矢口昇 (1999) わが国の都市部における住所不定者および痴呆高齢者等におけるコロモジラミ症. 病原微生物検出情報 (IASR) **20**, 135.

Malnic B., Hirono J., Sato T., Buck L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**, 713-723.

Marshall C.J., Yoon K.S., Lee S.H., Pittendrigh B.R. (2013) Human lice: past, present and future control. *Pestic Biochem Physiol.* **106**, 162-171.

Matarazzo V., Clot-Faybesse O., Marcet B., Guiraudie-Capraz G., Atanasova B., Devauchelle G., Cerutti M., Etiévant P., Ronin C. (2005) Functional characterization of two human olfactory receptors expressed in the baculovirus Sf9 insect cell system. *Chem Senses* **30**, 195-207.

- Mathew D., Martelli C., Kelley-Swift E., Brusalis C., Gershow M., Samuel A.D., Emonet T., Carlson J.R. (2013) Functional diversity among sensory receptors in a *Drosophila* olfactory circuit. *Proc Natl Acad Sci USA*. **110**, E2134-E2143.
- Menashe I., Abaffy T., Hasin Y., Goshen S., Yahalom V., Luetje C.W., Lancet D. (2007) Genetic elucidation of human hyperosmia to isovaleric acid. *PLoS Biol*. **30**, e284.
- 三木吉治, 松田光司, 奈良有美子 (1983) 皮膚温の計測と末梢血管疾患への応用. 永井書店, 末梢血管疾患の無侵襲診断法, 96-111.
- Misawa N., Mitsuno H., Kanzaki R., Takeuchi S. (2010) Highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. **35**, 15340-15344.
- Misof B., Liu S., Meusemann K., Peters R.S., Donath A., Mayer C., Frandsen P.B., Ware J., Flouri T., Beutel R.G., Niehuis O., Petersen M., Izquierdo-Carrasco F., Wappler T., Rust J., Aberer A.J., Aspöck U., Aspöck H., Bartel D., Blanke A., Berger S., Böhm A., Buckley T.R., Calcott B., Chen J., Friedrich F., Fukui M., Fujita M., Greve C., Grobe P., Gu S., Huang Y., Jermini L.S., Kawahara A.Y., Krogmann L., Kubiak M., Lanfear R., Letsch H., Li Y., Li Z., Li J., Lu H., Machida R., Mashimo Y., Kapli P., McKenna D.D., Meng G., Nakagaki Y., Navarrete-Heredia J.L., Ott M., Ou Y., Pass G., Podsiadlowski L., Pohl H., von Reumont B.M., Schütte K., Sekiya K., Shimizu S., Slipinski A., Stamatakis A., Song W., Su X., Szucsich N.U., Tan M., Tan X., Tang M., Tang J., Timelthaler G., Tomizuka S., Trautwein M., Tong X., Uchifune T., Walz M.G., Wiegmann B.M., Wilbrandt J., Wipfler B., Wong T.K., Wu Q., Wu G., Xie Y., Yang S., Yang Q., Yeates D.K., Yoshizawa K., Zhang Q., Zhang R., Zhang W., Zhang Y., Zhao J., Zhou C., Zhou L., Ziesmann T., Zou S., Li Y., Xu X., Zhang Y., Yang H., Wang J., Wang J., Kjer K.M., Zhou X. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*. **6210**, 763-767.
- Mita K., Kasahara M., Sasaki S., Nagayasu Y., Yamada T., Kanamori H., Namiki N., Kitagawa M., Yamashita H., Yasukochi Y., Kadono-Okuda K., Yamamoto K., Ajimura M., Ravikumar G., Shimomura M., Nagamura Y., Shin-I.T., Abe H., Shimada T., Morishita S., Sasaki T. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res*. **11**, 27-35.
- Mitsuno H., Sakurai T., Namiki S., Mitsuhashi H., Kanzaki R. (2014) Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. *Biosens Bioelectron*. **65**, 287-294.
- 光野秀文, 櫻井健志, 岩松琢磨, 神崎亮平 (2015) 培養細胞の蛍光計測を応用した匂いセンサー. 株式会社エヌ・ティーエス, 感覚デバイス開発, 174-181.
- Mochalski P., Unterkofler K., Hinterhuber H., Amann A. (2014) Monitoring of selected

- skin-borne volatile markers of entrapped humans by selective reagent ionization time of flight mass spectrometry in NO⁺ mode. *Anal Chem.* **86**, 3915-3923.
- Mooney A.C., Robertson H.M., Wanner K.W. (2009) Neonate silkworm (*Bombyx mori*) larvae are attracted to mulberry (*Morus alba*) leaves with conspecific feeding damage. *J Chem Ecol.* **35**, 552-559.
- 素木得一 (1958) 衛生昆虫. 北隆社, 東京.
- Mumcuoglu K.Y., Galun R., Bach U., Miller J., Magdassi S. (1996) Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Entomol Exp Appl.* **78**, 309-314.
- Mumcuoglu K.Y., Magdassi S., Miller J., Ben-Ishai F., Zentner G., Helbin V., Friger M., Kahana F., Ingber A. (2004) Repellency of citronella for head lice: double-blind randomized trial of efficacy and safety. *Isr Med Assoc J.* **12**, 756-759.
- Nakagawa T., Sakurai T., Nishioka T., Touhara K. (2005) Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* **307**, 1638-1642.
- Namiki S., Iwabuchi S., Kanzaki R. (2008) Representation of a mixture of pheromone and host plant odor by antennal lobe projection neurons of the silkworm *Bombyx mori*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* **5**, 501-515.
- National institute of infectious diseases (2015) Infectious Agents Surveillance Report. *IASR* **36**, 35-37.
- Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E. (2010) Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol* **101**, 372-378.
- Neuhaus E.M., Mashukova A., Zhang W., Barbour J., Hatt H. (2006) A specific heat shock protein enhances the expression of mammalian olfactory receptor proteins. *Chem Senses* **31**, 445-452.
- Nissler A. (2007) Ligand search for genetically identified *Drosophila* olfactory receptors using calcium-imaging [thesis]. University of Konstanz, Konstanz, Germany.
- Noppun V., Miyata T., Saito T. (1983) Susceptibility of four strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L., against insecticides. *J. Pesticide Sci.* **8**, 595-599.
- Norris L.C., Main B.J., Lee Y., Collier T.C., Fofana A., Cornel A.J., Lanzaro G.C. (2015) Adaptive introgression in an African malaria mosquito coincident with the increased usage of insecticide-treated bed nets. *Proc Natl Acad Sci USA.* **112**, 815-820.
- Omolo M.O., Okinyo D., Ndiege I.O., Lwande W., Hassanali A. (2004) Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* **65**, 2797-2802.
- Pålsson K., Jaenson T.G., Bäckström P., Borg-Karlson A.K. (2008) Tick repellent

- substances in the essential oil of *Tanacetum vulgare*. *J Med Entomol.* **45**, 88-93.
- Pelletier J., Xu P., Yoon K.S., Clark J.M., Leal W.S. (2015) Odorant receptor-based discovery of natural repellents of human lice. *Insect Biochem Mol Biol.* **66**, 103-109.
- Peterson C.J., Coats J.R. (2011) Catnip Essential Oil and Its Nepetalactone Isomers as Repellents for Mosquitoes. In: Paluch G.E., Coats J.R. (ed) Recent Developments in Invertebrate Repellents. Washington, DC, pp59–65.
- Qiu Y.T., Smallegange R.C., VAN Loon J.J., Takken W. (2011) Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto to components of human breath, sweat and urine depend on mixture composition and concentration. *Med Vet Entomol.* **25**, 247-255.
- Raoult D., Ndiokubwayo J.B., Tissot-Dupont H., Roux V., Faugere B., Abegbinni R., Birtles R.J. (1998) Outbreak of epidemic typhus associated with trench fever in Burundi. *Lancet* **352**, 353-358.
- Raoult D., Roux V. (1999) The body louse as a vector of reemerging human diseases. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 888-911.
- Raphemot R., Weaver C.D., Denton J.S. (2013) High-throughput screening for small-molecule modulators of inward rectifier potassium channels. *J Vis Exp.* **71**, e4209.
- Regnery R., Childs J., Koehler J. (1995) Infections Associated with Bartonella species in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **21**, 94-98.
- Rice P.J., Coats J.R. (1994) Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (*Diptera: Muscidae*), red flour beetle (*Coleoptera: Tenebrionidae*) and the southern corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *J. Econ. Entomol.* **87**, 1172-1179.
- Roush R.T., McKenzie J.A. (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu Rev Entomol.* **32**, 361-380.
- Rutkauskiis J.R., Jacomini D., Temponi L.G., Sarragiotta M.H., da Silva E.A., Jorge T.C. (2015) Pediculicidal treatment using ethanol and *Melia azedarach* L. *Parasitol Res.* **114**, 2085-2091.
- Ruzsanyi V., Mochalski P., Schmid A., Wiesenhofer H., Klieber M., Hinterhuber H., Amann A. (2012) Ion mobility spectrometry for detection of skin volatiles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **911**, 84-92.
- Rytz R., Croset V., Benton R. (2013) Ionotropic receptors (IRs): chemosensory ionotropic glutamate receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect Biochem Mol Biol.* **9**, 888-897.
- Saito H., Chi Q., Zhuang H., Matsunami H., Mainland J.D. (2009) Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Sci Signal.* **60**, ra9.
- Sakurai T., Nakagawa T., Mitsuno H., Mori H., Endo Y., Tanoue S., Yasukochi Y.,

- Touhara K., Nishioka T. (2004) Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **47**, 16653-16658.
- Sanz G., Schlegel C., Pernellet J.C., Briand L. (2005) Comparison of odorant specificity of two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for antagonism. *Chem Senses* **30**, 69-80.
- Sato K., Pellegrino M., Nakagawa T., Nakagawa T., Vosshall L.B., Touhara K. (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* **452**, 102-107.
- 沢辺京子, 葛西真治, 富田隆史, 佐々木年則, 小林睦 (2010) 日本と諸外国のアタマジラミにおける *Bartonella quintana* 遺伝子保有状況. *病原微生物検出情報 (IASR)* **31**, 355-357.
- Schmucker M., de Bruyne M., Hähnel M., Schneider G. (2007) Predicting olfactory receptor neuron responses from odorant structure. *Chem Cent J.* **1**, 11.
- Seki N., Sakai T., Sawabe K., Sasaki T, Matsuoka M., Arakawa Y., Marui E., Kobayashi M. (2006) Epidemiological studies on Bartonella quintana infections among homeless people in Tokyo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**, 31-35.
- Seya T., Nagai N., Tamura T. (2010) Analysis of Human Body Odor Components Adhered to Clothes by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of the Japan Research Association for Textile End-Uses.* **51**, 333-337.
- Shanbhag S.R., Muller B., Steinbrecht R.A. (1999) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 1. Types, external organization, innervation and distribution of olfactory sensilla. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **28**, 377-397.
- Shanbhag S.R., Muller B., Steinbrecht R.A. (2000) Atlas of olfactory organs of *Drosophila melanogaster* 2. Internal organization and cellular architecture of olfactory sensilla. *Arthropod Struct. Dev.* **29**, 211-229.
- Shirasu M., Touhara K. (2011) The scent of disease, volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *J Biochem.* **150**, 257-266.
- Shirasu M., Yoshikawa K., Takai Y., Nakashima A., Takeuchi H., Sakano H., Touhara K. (2014) Olfactory receptor and neural pathway responsible for highly selective sensing of musk odors. *Neuron* **81**, 165-178.
- Shirokova E., Schmiedeberg K., Bedner P., Niessen H., Willecke K., Raguse J.D., Meyerhof W., Krautwurst D. (2005) Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J Biol Chem.* **280**, 11807-11815.
- Slifer E.H., Sekhon S.S. (1980) Sense organs on the antennal flagellum of the human

- louse, *Pediculus humanus* (Anoplura). *Journal of Morphology* **164**, 161-166.
- Soares S.F., Borges L.M. (2012) Electrophysiological responses of the olfactory receptors of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) to host-related and tick pheromone-related synthetic compounds. *Acta Trop.* **124**, 192-198.
- Spehr M., Gisselmann G., Poplawski A., Riffell J.A., Wetzell C.H., Zimmer R.K., Hatt H. (2003) Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* **299**, 2054-2058.
- Steinbrecht R.A. (1994) The tuft organs of the human body louse, *Pediculus humanus corporis* - cryofixation study of a thermo-/hygrosensitive sensillum. *Tissue Cell* **26**, 259-275.
- Steinbrecht R.A., Laue M., Ziegelberger G. (1995) Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.* **282**, 203-217.
- Stensmyr M.C., Dweck H.K., Farhan A., Ibba I., Strutz A., Mukunda L., Linz J., Grabe V., Steck K., Lavista-Llanos S., Wicher D., Sachse S., Knaden M., Becher P.G., Seki Y., Hansson B.S. (2012) A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*. *Cell* **151**, 1345-1357.
- Störtkuhl K.F., Kettler R. (2001) Functional analysis of an olfactory receptor in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 9381-9385.
- 杉山章平, 松本義明 (1957) ヤサイゾウムシ孵化幼虫のアリル及びフェニルカラシ油に対する走化性. *農学研究* **45**, 5-13.
- 杉山章平, 松本義明 (1959a) 数種カラシ油類のヤサイゾウムシ孵化幼虫に対する誘引性. 食葉性昆虫の宿主決定に関する研究II. *農学研究* **46**, 150-157.
- 杉山章平, 松本義明 (1959b) ヤサイゾウムシに対するセリ科植物の誘引性. 食葉性昆虫の宿主決定に関する研究III. *農学研究* **47**, 141-148.
- Sutek K. (1968) [Nobel prize for Paul Hermann Müller in 1948 for discovery of DDT insecticide]. *Wiad Lek.* **21**, 1698.
- Syed Z., Leal W.S. (2009) Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**, 18803-18808.
- Tabashnik B.E., Mota-Sanchez D., Whalon M.E., Hollingworth R.M., Carrière Y. (2014) Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. *J Econ Entomol.* **107**, 496-507.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- 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**, 881-890.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tsao R., Lee S., Rice P.J., Jensen C., Coats J.R. (1995) Monoterpenoids and their synthetic derivatives as leads for new insect control agents. *In Synthesis and Chemistry of Agrochemicals IV; ACS Symposium Series 584*, American Chemical Society: Washington, DC, 312-324.
- Tewson P.H., Quinn A.M., Hughes T.E. (2013) A multiplexed fluorescent assay for independent second-messenger systems: decoding GPCR activation in living cells. *J Biomol Screen.* **18**, 797-806.
- 徳永雅明 (1943) 医用昆虫学 (上巻). 診断と経験社, 大阪.
- Tokuno K., Yoshioka Y. (2014) Repellent effect of several essential oils against *Pediculus humanus humanus*. *Med Entomol Zool.* **65**, 78.
- Tolozza A.C., Zygadlo J., Cueto G.M., Biurrun F., Zerba E., Picollo M.I. (2006) Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J Med Entomol.* **43**, 889-895.
- Touhara K., Vosshall L.B. (2009) Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu Rev Physiol.* **71**, 307-332.
- Trimmer C., Snyder L.L., Mainland J.D. (2014) High-throughput analysis of mammalian olfactory receptors: measurement of receptor activation via luciferase activity. *J Vis Exp.* **2**, 88.
- van der Goes van Naters W., Carlson J.R. (2007) Receptors and neurons for fly odors in *Drosophila*. *Curr Biol.* **17**, 606-612.
- Vogt R.G., Riddiford L.M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* **293**, 161-163.
- Vogt R.G., Prestwich G.D., Lerner M.R. (1991) Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J Neurobiol.* **22**, 74-84.
- Vosshall L.B., Amrein H., Morozov P.S., Rzhetsky A., Axel R. (1999) A spatial map of olfactory receptor expression in *Drosophila* antennae. *Cell* **96**, 725-736.
- Vosshall L.B., Wong A.M., Axel R. (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell* **102**, 147-159.

- Vosshall L.B. (2001) The molecular logic of olfaction in *Drosophila*. *Chem Senses* **26**, 207-213.
- Wagner-Schuman M., Richardson J.R., Auinger P., Braun J.M., Lanphear B.P., Epstein J.N., Yolton K., Froehlich T.E. (2015) Association of pyrethroid pesticide exposure with attention-deficit/hyperactivity disorder in a nationally representative sample of U.S. children. *Environ Health* **14**, 44.
- Wetzel C.H., Oles M., Wellerdieck C., Kuczkowiak M., Gisselmann G., Hatt H. (1999) Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci.* **19**, 7426-7433.
- Wetzel C.H., Behrendt H.J., Gisselmann G., Störtkuhl K.F., Hovemann B., Hatt H. (2001) Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**, 9377-9380.
- Whalon M.E., Mota-Sanchez D., Hollingworth R.M. (2008) Global Pesticide Resistance in Arthropods, Centre Agric Biosci Intl, Oxfordshire, UK.
- Wigglesworth V.B. (1941) The sensory physiology of the human louse *Pediculus humanus corporis* De Geer (Anoplura). *Parasitology* **33**, 67-109.
- Wilson R.I., Mainen Z.F. (2006) Early events in olfactory processing. *Annu Rev Neurosci.* **29**, 163-201.
- Wojtasek H., Leal W.S. (1999) Conformational change in the pheromone-binding protein from *Bombyx mori* induced by pH and by interaction with membranes. *J Biol Chem.* **43**, 30950-30956.
- Xia Q., Zhou Z., Lu C., Cheng D., Dai F., Li B., Zhao P., Zha X., Cheng T., Chai C., Pan G., Xu J., Liu C., Lin Y., Qian J., Hou Y., Wu Z., Li G., Pan M., Li C., Shen Y., Lan X., Yuan L., Li T., Xu H., Yang G., Wan Y., Zhu Y., Yu M., Shen W., Wu D., Xiang Z., Yu J., Wang J., Li R., Shi J., Li H., Li G., Su J., Wang X., Li G., Zhang Z., Wu Q., Li J., Zhang Q., Wei N., Xu J., Sun H., Dong L., Liu D., Zhao S., Zhao X., Meng Q., Lan F., Huang X., Li Y., Fang L., Li C., Li D., Sun Y., Zhang Z., Yang Z., Huang Y., Xi Y., Qi Q., He D., Huang H., Zhang X., Wang Z., Li W., Cao Y., Yu Y., Yu H., Li J., Ye J., Chen H., Zhou Y., Liu B., Wang J., Ye J., Ji H., Li S., Ni P., Zhang J., Zhang Y., Zheng H., Mao B., Wang W., Ye C., Li S., Wang J., Wong G.K., Yang H. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**, 1937-1940.
- Xu P., Choo Y.M., Pelletier J., Sujimoto F.R., Hughes D.T., Zhu F., Atungulu E., Cornel A.J., Luetje C.W., Leal W.S. (2013) Silent, generic and plant kairomone sensitive odorant receptors from the Southern house mosquito. *J Insect Physiol.* **9**, 961-966.

- Xu P., Choo Y.M., De La Rosa A., Leal W.S. (2014) Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**, 16592-16597.
- Yao C.A., Ignell R., Carlson J.R. (2005) Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *J. Neurosci.* **25**, 8359-8367.
- Yasutomi K. (1956) Studies on the insect-resistance to insecticides : IV Relative toxicity of pp'-DDT and related materials (I). *Jpn. J. Sanit. Zool.* **7**, 87-93.
- Zama K. (2013) Relationship between Primates and Lice. *Primate Res.* **29**, 87-103.
- Zamora D., Klotz S.A., Meister E.A., Schmidt J.O. (2015) Repellency of the components of the essential oil, citronella, to *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, and *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol.* **52**, 719-721.

業績

投稿論文

- [1] Takuma Iwamatsu, Daisuke Miyamoto, Hidefumi Mitsuno, Yoshiaki Yoshioka, Takeshi Fujii, Takeshi Sakurai, Yukio Ishikawa, Ryohei Kanzaki. (2016) Identification of repellent odorants to the body louse, *Pediculus humanus corporis*, in clove essential oil. *Parasitol Res.* doi:[10.1007/s00436-016-4905-9](https://doi.org/10.1007/s00436-016-4905-9).
- [2] Takuma Iwamatsu, Daisuke Miyamoto, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Ryohei Kanzaki. (In preparation) An olfactory receptor for DEET in body lice, *Pediculus humanus corporis*.

国際学会での発表

- [1] Takuma Iwamatsu, Hidefumi Mitsuno, Tomoki Kazawa, Takeshi Sakurai, Ryohei Kanzaki. (2014) A high-throughput functional assay system of insect odorant receptors expressed in Sf21 cells. 2014ICN/JSCP, Sapporo, Japan.
- [2] Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Takuma Iwamatsu, Shigehiro Namiki, Ryohei Kanzaki. (2014) Development and performance evaluation of a novel cell-based odorant sensor element. 2014ICN/JSCP, Sapporo, Japan.
- [3] Mitsuno Hidefumi, Sakurai Takeshi, Iwamatsu Takuma, Nakajima Yuko, Kanzaki Ryohei. (2014) Development of novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. Second World Congress of the Digital Olfaction Society, Tokyo, Japan.
- [4] Takuma Iwamatsu, Daisuke Miyamoto, Hidefumi Mitsuno, Yoshiaki Yoshioka, Takeshi Sakurai, Ryohei Kanzaki. (2015) Search for odorants inducing olfactory behavior on the body louse, *Pediculus humanus corporis*, based on the response of olfactory receptor. The 8th Asia-Pacific Association of Chemical Ecologist (APACE) Conference. California, USA.

国内学会での発表

- [1] Takuma Iwamatsu, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Ryohei Kanzaki. (2013) Performance evaluation of Sf21 cells expressing *Drosophila* ionotropic receptors for odorant sensor element. 日本味と匂い学会第47回大会, 仙台, 日本.
- [2] 岩松琢磨・伊藤克彦・天竺桂弘子・横山 岳・蜷木 理・村上聡・高橋理・石倉隆・花岡秀樹. (2014) カイコ系統間におけるハウスキーピング遺伝子の比較. 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能学術講演会, 神奈川, 日本.
- [3] 村上聡・高橋理・小野崎登喜郎・花岡秀樹・岩松琢磨・伊藤克彦・天竺桂弘子・蜷木 理.

- (2014) 次世代 DNA シーケンサを用いたカイコ全ゲノム解析. 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能学術講演会, 神奈川, 日本.
- [4] 光野秀文・櫻井健志・岩松 琢磨・田中亜紀子・並木重宏・神崎亮平. (2014) 昆虫の嗅覚受容体を利用した細胞利用型匂いセンサ素子の性能評価. 平成 26 年度日本農芸化学会, 神奈川, 日本.
- [5] Takuma Iwamatsu, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Ryohei Kanzaki. (2014) Behavioral responses of body lice, *Pediculus humanus corporis*, to human body-odor components. 日本味と匂い学会第 48 回大会, 静岡, 日本. ※CHEMICAL SENSES 英文抄録あり
- [6] 岩松琢磨・宮本大輔・光野秀文・櫻井健志・神崎亮平. (2015) 匂い物質に対するコロモジラミの行動解析. 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会, 山形, 日本.
- [7] 村上聡・岩松琢磨・橋詰航・浅野士郎・高橋理・長谷要一・近藤真人・村木美帆・徳永裕子・伊藤克彦・蜷木理・横山岳. (2015) カイコ短命系統ゲノムの変異検出. 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 札幌, 日本.
- [7] 岩松琢磨. (2015) 嗅覚受容体の応答特性に基づいたコロモジラミの行動を解発する匂い物質の探索. 第三回ケモビ研究会, 神奈川, 日本

学術雑誌等又は商業誌における解説, 総説

- [1] 光野秀文・櫻井健志・岩松琢磨・神崎亮平. 培養細胞の蛍光計測を応用した匂いセンサ. (2014) 株式会社エヌ・ティーエス, 感覚デバイス開発, 第 3 章第 3 節 p174-181.
- [2] 岩松琢磨. (2014) 虱の害益. 日本比較生理生化学会学会誌, 31, p240-241.

特許等

- [1] 複数成分の混合による植物精油成分のコロモジラミに対する忌避効果の相乗作用. 平成 27 年 12 月 21 日出願, 特願 2015-248317. 岩松琢磨(25%), 神崎亮平(25%), 櫻井健志(25%), 光野秀文(25%).

受賞

- [1] Best Student Oral Presentation Award. Search for odorants inducing olfactory behavior on the body louse, *Pediculus humanus corporis*, based on the response of olfactory receptor. The 8th Asia-Pacific Association of Chemical Ecologist (APACE) Conference. 平成 27 年 9 月 25 日.