

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 岩松 琢磨

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、生物濃縮や発癌性などの人や環境への負荷が大きいこと、薬剤の連続使用により害虫が薬剤耐性を獲得する問題があることが報告されていることから、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おり、殺虫剤に代わる行動制御剤の開発が求められている。その手法のひとつとして自然由来の植物精油に含有される匂い物質成分からの行動制御剤の探索が行われているが、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、特定の昆虫に対して効率的に忌避剤を開発するためには課題が多い。そこで害虫である昆虫生体が検出可能な匂い物質の利用が有効であると考えられており、その嗅覚機構などに関する研究が進められている。昆虫はその生活環境下の匂い物質をその触角に存在する嗅覚感覚子により受容すること、さらにこの嗅覚感覚子の匂い物質に対する応答

性は感覚子内に存在する嗅覚受容ニューロンに発現する嗅覚受容体 (Olfactory receptor; OR) に依存することが明らかとなっている。昆虫はこのORの応答の組み合わせにより匂い物質を検出、認識していることから、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。

衛生害虫の一種であるコロモジラミ (*Pediculus humanus corporis*) 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* を媒介すること、特に先進国では路上生活者への寄生が社会問題になっていることから、その防除が重要な課題となっている。しかしながら、その防

除に用いられてきたDDTは発癌性生物毒性の点からその使用が厳しく制限されており、化学薬剤に代わる忌避剤や誘引剤などの新規の防除剤の開発が求められている。コロモジラミはその遺伝子配列中に10種類のOR(*Pediculus humanus corporis* Olfactory Receptor; PhOR)候補遺伝子を所有することが明らかとなり、他種の昆虫と同様にORにより匂い物質を検出している事が示された。このORの数は他種の昆虫(キイロショウジョウバエ62種, ハマダラカ79種)と比較して非常に少ないことから、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、嗅覚受容体応答特性情報を基にした行動制御剤の探索の対象昆虫として適しているといえる。

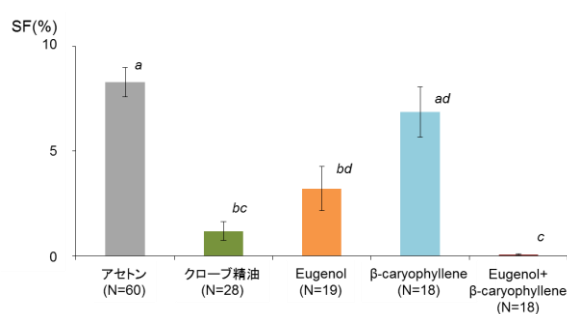
そこで、本論文では、コロモジラミの行動制御剤の同定を目的として、植物精油含有成分からの忌避剤の探索および昆虫嗅覚受容体応答特性情報を基にした行動制御剤の探索に取り組んだ。さらに昆虫嗅覚受容体応答特性情報を基にした行動制御剤の探索を促進手法として応用可能となる手法として、匂い物質に対して蛍光強度にて応答を示すSf21安定細胞系統(ORおよびカルシウム感受性蛍光タンパク質: GCaMPを遺伝子工学的に発現させた系統)を用いた蛍光プレートリーダーによる嗅覚受容体の応答特性のハイスループット解析手法の開発に取り組んだ。

1) 植物精油含有成分からの忌避剤の探索

コロモジラミに対して最も強い忌避効果を有するクローブ精油からの忌避効果を有する匂い物質の同定およびその効果検証を実施した。まず、コロモジラミに対して忌避効果を有するクローブ精油を用いて滞在

頻度(Staying frequency; SF)により行動解析手法を確立した。次に確立した手法を用いてクローブ精油のGC-MS分析により主要成分と同定された匂い物質(eugenol, β -caryophyllene)に対する行動試験を実施し、コロモジラミはeugenolに対して濃度依存的に忌避行動を示すこと、 β -caryophylleneに対しては忌避も誘引行動も示さないことから、クローブ精油の忌避効果に主要成分であるeugenolが寄与していることを明らかとした(図1)。さらにGC-MS分析の結果から得られた比率で混合したeugenolと β -caryophylleneの混合臭はコロモジラミに対してeugenol単品よりも強い忌避効果を示したことから、eugenolの忌避効果は同じく主要成分である β -caryophylleneとの混合により相乗的に増強されること(図1)を明らかとし、こ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示した。

図 1. クローブ精油およびその主要成分の忌避効果。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。



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。

2) 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

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、PhORの機能解析および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に対する効果検証を実施した。まずPhORの遺伝子配列情報から6種類のPhOR(2, 3, 4, 5, 6, 7)を対象として選択した。次に、コロモジラミ生体からの遺伝子配列の単離を行い、機能的な遺伝子配列であった5種類のPhORを単離した。この際、単離したPhOR4の遺伝子配列にはナンセンス変異が生じており、機能的な遺伝子配列を単離することはできなかった。機能的な遺伝子配列であった5種類のPhORのコロモジラミ雌雄における発現確認を行い、PhOR2, 5, 6, 7が雌雄の頭部において発現していること、PhOR3が雌の頭部において優勢的に発現していることをRT-PCRにより明らかとした。これら5種類のPhOR(2, 3, 5, 6, 7)の90種類の匂い物質に対する応答特性を、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて解析し、PhOR2が cyclododecanol, (+)-fenchone, 3,4-dimethylbenzaldehyde などに対して、PhOR3が dodecanal, geraniol, N,N-diethyl-m-toluamide (;DEET) に対して応答を示すことを明らかとした(表1)。一方、PhOR5, 6, 7は本論文で試行した90種類の匂い物質に対する応答を示さなかった。PhOR2あるいはPhOR3が強く応答を示した匂い物質に対する行動試験を実施し、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(図2)。コロモジラミ生体に嗅覚行動を解発する匂い物質のORの応答特性情報からの同定を達成したこと

から、嗅覚受容体の応答特性情報を用いた匂い物質の効率的なスクリーニングが行動制御剤開発において有効であることを示した。またPhORの匂い物質の応答値とコロモジラミ生体における行動傾向を比較し、PhOR2の応答とコロモジラミにおける行動の傾向は一致しないことを明らかにした。また雌で優勢的に発現しているPhOR3が応答する匂い物質に対して雄のコロモジラミはgeraniol, DEETに対しては忌避行動を示さず、dodecanalに対しては誘引行動を示した一方、雌のコロモジラミは3種類の匂い物質に対して濃度依存的に忌避行動を示したこと、PhOR3の応答値が高くなるにつれてコロモジラミ雌が忌避行動を示したことから、PhOR3の応答特性解析により行動制御剤候補物質の同定の可能性を示した。

表1. PhOR2およびPhOR3が強い応答を示した匂い物質。

	PhOR2	PhOR3
DEET	·	++
Indole	+++	·
3-methyl indole	+++	·
Dodecanal	·	+++
(+)-fenchone	++	·
Geraniol	·	++
Cyclododecanol	++++	·
3,4-dimethylbenzaldehyde	++	·
2,3-dimethylphenol	+++	·
1-phenylethyl alcohol	+++	·

++++: >300nA, +++: >100nA, ++: >50nA, +: >15nA, ·: No response.

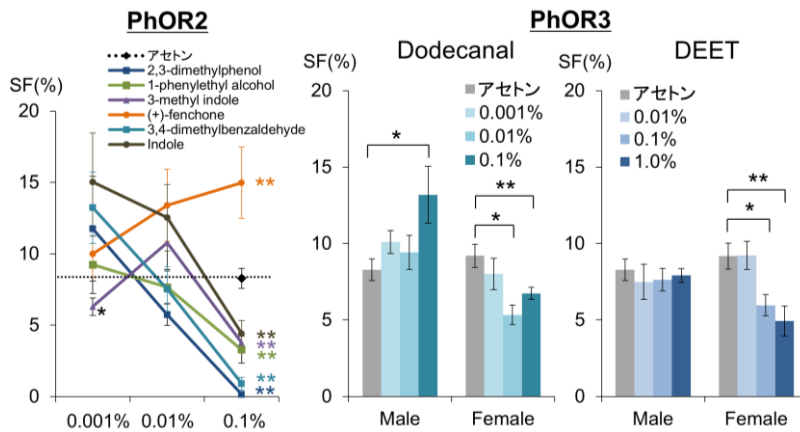


図 2. PhOR2 および PhOR3 が応答を示す匂い物質のコロモジラミに対する行動解発効果。N = 8-60. Error bar: \pm SEM. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.001$ (アセトンに対する SF 値との U 検定による)。

3) 嗅覚受容体の応答特性のハイスループット解析手法の開発

当研究室で構築されていた嗅覚受容体安定発現細胞システムを用いて、蛍光プレートリーダーによる測定条件の設定およびORの応答解析手法の確立に取り組んだ。測定条件として、1ウェルあたりの細胞数 (1.0×10^5 個)、ウェルへの播種後の静置時間 (24時間) を設定した。さらにその条件下で測定した匂い物質に対する蛍光強度変化値からORの応答を抽出する手法を確立し、匂い物質に対するOR安定発現細胞 (OR+GCaMP) とGCaMP安定発現細胞 (GCaMP) の蛍光強度変化を比較することでORの応答特性を解析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。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果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、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果的な開発が可能になることも期待される。