

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 26 年度博士課程進学
氏名 森永 敏史
指導教員 東原 和成

論文題目

カイコ化学感覚受容体のチャネル機能の分子基盤および行動への寄与に関する研究

[背景および目的]

一般に動物は、化学感覚受容体を通して外界の匂いや味といった化学物質の情報を知覚し、摂食行動や求愛行動などといった適切な行動を選択している。古くから養蚕に用いられてきた昆虫であるカイコは、クワの葉を好んで摂食する植食性昆虫であり、化学感覚受容体を通してクワの葉の匂いや味を認識することで、クワの葉を選択的に摂食する機構を有していると考えられる。

昆虫は化学感覚受容体として、匂い物質の受容体である嗅覚受容体や味物質の受容体である味覚受容体などを有する。近年のゲノム解析技術の進歩により、様々な昆虫のゲノムが解読され始めており、カイコでは 66 種類の嗅覚受容体候補遺伝子と 76 種類の味覚受容体候補遺伝子が同定されている。

当研究室の先行研究において、カイコの化学感覚受容体の機能解析が行われ、いくつかの受容体の機能が明らかにされている。それらの受容体の中で、本研究では嗅覚受容体である **BmOr56** と味覚受容体である **BmGr9** に着目した。カイコ幼虫の嗅覚器に発現する **BmOr56** は、クワの葉に含まれ、カイコの誘引行動を強く誘起する *cis*-jasmone という匂い物質の受容体であることが明らかにされている。しかしながら、現在までに遺伝学的な研究は行われておらず、**BmOr56** が *cis*-jasmone に対する誘引行動にどの程度寄与しているかは明らかになっていない。また、カイコ幼虫の味覚器などで発現が見られる **BmGr9** は、味覚受容体の中では *in vitro* の系での機能的発現に成功した数少ない受容体の 1 つであり、単糖の一種である Fructose をリガンドとする非選択性の陽イオンチャネルとして機能することが明らかにされた。現在、昆虫味覚受容体の分子受容機構は未知の部分が多く、**BmGr9** をモデルとして研究することにより、種々の昆虫の味覚受容体の機能の解明につながる可能性が考えられる。

本研究では上記の 2 つの受容体の解析をさらに進めることで、カイコの摂食行動における化学感覚受容体の寄与の解明を目指した。具体的には 1) カイコの誘引行動における **BmOr56** の寄与の検証、2) **BmGr9** のチャネル機能の分子基盤の解析の 2 つの研究を行った。

[結果]

1. カイコの誘引行動における BmOr56 の寄与の検証

カイコの誘引行動における BmOr56 の寄与を検証するため、BmOr56 遺伝子の欠損系統の行動解析を行った。まず初めに、遺伝子操作に用いる支 108 という品種のカイコの誘引行動を観察するため、新規に誘引行動実験系を考案した。この実験系を用いて、クワの葉および *cis-jasmone* に対する誘引行動を観察したところ、支 108 のカイコは両者に対して誘引行動を示し、誘引行動実験系の確立に成功した。次に、過去の知見でカイコの誘引行動を誘起することが示されている匂い物質を用いて実験を行ったところ、*cis-jasmone* 以外の匂い物質には誘引行動を示さなかったことから、支 108 において *cis-jasmone* が強力な誘引物質であることが示唆された。さらに、BmOr56 遺伝子の欠損系統を作製して誘引行動実験を行ったところ、変異体カイコはクワの葉に対する誘引行動は依然として示したものの、*cis-jasmone* に対する誘引行動は示さなくなった。この結果から BmOr56 欠損系統では *cis-jasmone* に対する誘引行動が特異的に消失していることが明らかとなった。

2. カイコ味覚受容体 BmGr9 のチャネル機能の分子基盤の解析

BmGr9 のチャネル機能に寄与するアミノ酸残基を同定し、チャネルの機能的構造を解明することを目的として、膜タンパク質の機能解析系として広く用いられているアフリカツメガエルの卵母細胞と HEK293T 細胞を用いて、BmGr9 の機能解析を行った。

2-1 BmGr9 のチャネル特性の解析

先行研究において、BmGr9 の整流性は、リガンドである Fructose の濃度に依存することが明らかになっている。また、本研究でさらに解析を行った結果、BmGr9 の整流性は Fructose 濃度のみではなく、BmGr9 の発現量にも依存することが示唆された。そこで、Fructose 濃度や遺伝子導入量を変えてイオン交換実験を行ったところ、整流性が変化する条件においても Na⁺イオンと K⁺イオンの選択性は一定であることが明らかとなった。この結果から、BmGr9 にはリガンド濃度や発現量に応じて整流性を変化させる電位依存的な開閉機構が存在することが示唆された。

2-2 BmGr9 のポア領域の探索

BmGr9 のチャネル機能に寄与するアミノ酸残基の同定を目指した。まず膜貫通領域の予測プログラムである TMHMM を用いて膜貫通部位を予測し、BmGr9 の膜貫通構造のモデルを作成したところ、BmGr9 は 7 回膜貫通構造を持つことが示唆された。また、チャネル機能に重要なアミノ酸残基はオーソログ遺伝子間で高度に保存されていると予想されることから、BmGr9 のオーソログ遺伝子間でアミノ酸配列の多重整列を行い、保存性が高く、かつ陽イオンチャネルのイオン選択性に寄与するグルタミン酸、アスパラギン酸、チロシンを探索し、これらのアミノ酸の変異体を作製した。これら変異体の Fructose 応答性を測定したところ、複数の変異体で Fructose 応答性が変化していた。中でも、2 番目の膜貫通領域に位置する D99 と、3 番目の膜貫通領域に位置する D165 の変

異体では Fructose 応答性がほぼ消失したことから、チャネルの機能に大きく影響を与えるアミノ酸残基であると考えられた。

次に、各々の変異体を用いてイオン交換実験を行い、BmGr9 のイオン選択性に影響を与えるアミノ酸を探索したところ、5 番目に膜貫通領域に位置する E337Q と 7 番目の膜貫通領域に位置する Y437F の 2 つの変異体でイオン選択性が変化することが明らかとなった。この結果から、5 番目と 7 番目の膜貫通領域がポア領域を構成することが示唆された。

次に、MTSET 試薬を用いて、ポア領域の付近に位置するアミノ酸を探索した。MTSET はシステイン残基と非共有結合を形成することで、陽イオンの流れを阻害する試薬である。保存性の高いアミノ酸残基のシステイン変異体を作製し、MTSET による Fructose 応答の阻害効果を測定したところ、E76C、Y186C、Y332C、E337C の変異体が MTSET による Fructose 応答の阻害を受けることが明らかとなった。この結果から、これらのアミノ酸残基が位置する 1 番目、4 番目、5 番目の膜貫通領域がポア領域付近に位置することが示唆された。

2-3 BmGr9 のオリゴマー状態の検証

BmGr9 のオリゴマー中に含まれるサブユニットの数を解析した。ヒト由来の培養細胞である HEK293T 細胞に BmGr9 遺伝子を導入し、タンパク質のリジン残基同士を架橋する DSS という架橋剤で処理した後に、抗 BmGr9 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、4 量体と考えられるサイズのタンパク質が検出された。

また、細胞膜近傍の蛍光のみを検出することが出来る全反射顕微鏡を用いて、BmGr9 のオリゴマー状態を検証した。GFP タグを付加した BmGr9 遺伝子を導入した卵母細胞の細胞膜上の蛍光を観察し、1 つのオリゴマー由来の輝点の蛍光を観察したところ、4 量体であることを示唆する結果が得られた。以上の 2 つの実験結果から、BmGr9 は 4 量体を形成して機能することが示唆された。

BmGr9 がオリゴマーを形成して機能することが示唆されたことから、Fructose 応答性が消失した D99 や D165 などの変異体を野生型の遺伝子と混合してチャネル特性を測定したところ、イオン透過性や MTSET の感受性が変化することが明らかとなった。以上の結果から、BmGr9 がオリゴマーを形成することが機能的な解析からも支持され、また D99 や D165 を含む 2 番目と 3 番目の膜貫通領域がポアを構成することが示唆された。

2-4 電位依存的な開閉機構に関わるアミノ酸残基の探索

カイコの一品種である錦秋×鐘和と白/C の BmGr9 遺伝子のアミノ酸配列を比較したところ、6 カ所のアミノ酸残基が異なっていた。そこで 2 種の BmGr9 の機能比較を行ったところ、白/C の配列の方が内向き整流性が弱いことが明らかとなった。この結果から、錦秋×鐘和と白/C の BmGr9 配列で異なるアミノ酸残基のいずれかが電位依存的な開閉機構に寄与すると考えられた。そこで、2 つの配列で異なるそれぞれのアミノ酸残基に変異を導入した結果、1 番目の膜貫通領域の細胞内直下に位置する G53S が整流性に寄与することが明らかとなった。この結果から、膜貫通領域の細

胞内直下に位置するアミノ酸残基同士の相互作用によって、電位依存的な開閉機構が生じている可能性が示唆された。そこで、細胞内領域と膜貫通領域の境界周辺に位置し、電荷を持つか、または電気陰性度の高いアミノ酸残基の変異体を作製し、内向き整流性を測定したところ、R117の変異体では内向き整流性が顕著に弱くなることが明らかとなった。しかし、R117の変異体においても電位依存的な開閉機構は完全には消失していなかったことから、電位依存的な開閉機構には細胞内の膜貫通領域直下に位置する複数のアミノ酸残基が関与することが示唆された。

2-5 ショウジョウバエの化学感覚神経を用いた BmGr9 のリガンド特異性の検証

先行研究の知見から、BmGr9 を卵母細胞に導入したときのリガンド特異性は、実際の生体内のリガンド特異性と異なる可能性が考えられた。そこで、より生体内の環境に近いショウジョウバエの化学感覚神経に BmGr9 遺伝子を導入し、リガンド特異性を検証した。その結果、BmGr9 は Fructose に加えて、卵母細胞では応答を示さない Sucrose にも応答も示すことが明らかとなった。以上の結果から、実際の生体内では BmGr9 が卵母細胞と異なるリガンド特異性を示す可能性が示唆された。

[総括]

本研究では、昆虫の化学感覚受容体の行動への寄与と、チャネル構造の解明を目的とした。

BmOr56 に関する研究では、BmOr56 が *cis*-jasmone に対する誘引行動に大きく寄与する受容体であることが明らかとなった。しかし、BmOr56 の欠損系統でもクワの葉に対する誘引は正常に見られたことから、カイコの誘引行動には *cis*-jasmone 以外の匂い物質も寄与することが示唆された。今後は *cis*-jasmone 以外の匂いにも着目することで、カイコの誘引行動の機構の包括的な解明が期待される。

また、BmGr9 に関する研究では、BmGr9 が電位依存的な開閉機構を有することが示唆され、ポア領域を構成する膜貫通領域と電位依存的な開閉機構に寄与するアミノ酸残基の候補が同定された。さらに、BmGr9 は生体内と *in vitro* の発現系では異なるリガンド特異性を有する可能性が示唆された。本研究で得られた知見をもとに、種々の昆虫味覚受容体に関する研究が発展していくことが期待される。