昆虫の化学感覚器に発現するイオノトロピック型化学感覚受容体

佐藤 幸治*

外界の化学物質は、五感のうち、嗅覚と味覚によって受容、識別される。この2つは合わせて化学感覚と呼ばれ、動物が最初に獲得した外界を認識する感覚系である。化学感覚が認識する化学物質は数十万ともいわれ、その多様性に対応するため、化学感覚受容体は遺伝子中で最も大きなファミリーを構成している。線虫から高等脊椎動物に至るまで、化学感覚受容体のほとんどはGタンパク質共役型受容体ファミリーに属しており、受容した化学物質の情報はGタンパク質シグナル伝達経路を経て、その下流のイオンチャンネルが活性化されることで電気信号へと変換される。しかし昆虫の嗅覚受容体や味覚受容体はGタンパク質共役型受容体と共通の7回膜貫通構造を持ちながら、匂いや味物質で直接活性化されるイオンチャンネルを構成することが明らかとなった。また神経伝達物質のイオノトロピック型受容体が、昆虫では化学感覚受容体へと進化していることも明らかになった。一方で、昆虫の化学感覚におけるGタンパク質シグナル伝達経路に関する知見は、断片的である。本稿ではこの昆虫にユニークな、化学感覚受容体として機能しているリガンド活性型イオンチャンネルについて述べる。

1. はじめに

動物が外界の物理化学環境を認識し、それらのシグナルに対し適切に反応することは、生存と繁殖において必須の能力である。外界の物理化学的なシグナルとしては、光の波長、化学物質、温度、機械圧が代表的なものとして挙げられる。これらのシグナルは「五感」に代表される、様々な感覚器に分布する末梢の感覚神経細胞によって受容される。個々の神経細胞には、それぞれの物理化学的要素を細胞内電位に変換するシグナル伝達機構が備わっており、外界の情報は活動電位として高次中枢へ伝達される。

五感のうち、最も早く系統樹上に出現したものは化学感覚である。化学感覚は主に、嗅覚器と味覚器の2つの感覚系によって構成されている。他の五感と化学感覚が大きく異なる点は、視覚や触覚が、連続性のある物理量を線形的に識別する器官であるに対し、化学感覚は外界に無数に存在する化学物質の混合物を、そのパターンと言う離散的情報として処理する点である。化学感覚の最初のステップは、末梢の神経細胞に発現する受容体タンパク質とリガンドの結合である。多様な化学物質の識別に対応するため、動物のゲノムには化学感覚受容体の大きなファミリーが存在する。

線虫から霊長類に至るまで、現在までにゲノム解読され

た動物からは、7回膜貫通型受容体が共通な嗅覚受容体として、報告されている。一方、味覚器には嗅覚同様の7回膜貫通型受容体に加え、様々なイオンチャンネルが味覚受容体として機能していることも明らかにされている。脊椎動物では、嗅覚、味覚受容体のうち、7回膜貫通型受容体に属するものは全て、Gタンパク質サブユニットと共役するGタンパク質共役型受容体である。したがって、匂いや味物質がこれらの受容体と結合すると、下流のGタンパク質シグナル伝達経路の活性化を経てイオンチャンネルが開くことで、感覚神経細胞が脱分極する。

このような7回膜貫通型受容体は、昆虫の嗅覚器や味覚器からも見つかっている。したがって、化学感覚器における受容体膜貫通構造の保存性から、全ての動物において、Gタンパク質シグナル伝達経路が化学感覚における、シグナル伝達に共通の分子基盤であると考えられていた。しかし、昆虫の嗅覚受容体や味覚受容体が、リガンド活性型イオンチャンネルの機能を有することが明らかとなり、昆虫特異的なシグナル伝達機構として注目を集めている。その一方で、昆虫の化学感覚におけるメタボトロピックなシグナル伝達経路に関しては不明なままである。本稿では昆虫の化学感覚受容体に備わるイオノトロピックな機能について概説し、現在提唱されているシグナル伝達機構のモデルについて述べる。

2. 昆虫の化学感覚器

多くの動物と同様に、昆虫の化学感覚器は嗅覚器と味覚器の2つに大別される(図1)。しかし昆虫は卵から孵化後、成虫に至るまで、大きな形態変化を伴う変態を繰り返すため、化学感覚器の形態は幼虫と成虫で、大きく異なる。移動能力が限られており、遠方からの化学シグナルが生存にほとんど影響しない幼虫では、化学感覚器は形態、機能共に限定的となっている。一方多くの成虫は翅を獲得しており、生息範囲が飛躍的に増大する。したがって、広大な生息範囲から限られた餌場、繁殖場所や異性を見つけ出すために、多くの成虫で嗅覚器は多様な外部形態をもち、機能も多岐にわたる。

(1) 嗅覚器

昆虫の嗅覚器は、幼虫、成虫ともに頭部前方の触角(antenna)と小腮触鬚(maxillary palp)が該当する。幼虫ではどちらも小さな棒状の突起物である。成虫の触角は高感度に化学物質を捉えるために、発達した構造を持ってお

*Koji SATO, 東京大学生産技術研究所 機械・生体系部門・ERATO 竹内バイオ融合プロジェクト(〒153-8904 東京都目黒区 駒場4-6-1 東京大学 駒場オープンラボラトリー M202)

Received 1 March 2012, Accepted 24 March 2012

り、多様性に富んでいる。小腮触鬚は幼虫同様に棒状の形態で、多様性や性的二型は報告されていない。どちらの器官も、表面は嗅神経細胞を内包する無数の感覚毛で覆われている。感覚毛の根幹には2～4個の嗅神経細胞があり、樹状突起を感覚毛内に延ばしている。感覚毛の表面は外骨格であるクチクラに覆われ、小さな穴が開いており、外部の化学物質の内部への行き来が可能となっている。クチクラ内部はリンパ液で満たされており、神経細胞が直接外界に接触することを防いでいる。したがって化学物質の情報伝達は、リンパ液を介した物質受容で行われている。

図1 昆虫の化学感覚器 A. 幼虫の嗅覚器(斜体)と味覚器。B. 成虫の嗅覚器。味覚器は口器, 脚に加え, 翅が相当する。

(2) 味覚器

昆虫の味覚器はほぼ全身に分布している。幼虫の場合は口器や脚に味細胞があり、成虫では翅にも分布する。これらの外部器官に加え、嗅覚器である触角や小腮触鬚、腸や食道にも味覚受容体が発現しているが³⁹⁾、味覚器として機能しているのか不明である。

口器の構造は、摂食する餌の種類に合わせ様々な構造をもつ。チョウやカブトムシなど、液体を摂食する昆虫では、表面張力や毛細管現象を利用して液体をとり込むための微細構造が発達している。カミキリムシやアリなど、硬い固形物を摂食する昆虫では、餌を破碎するための顎が発達している。

3. 化学感覚神経細胞に発現する受容体

外界の化学物質と神経細胞に発現する受容体の結合が、化学感覚における最初のステップである。化学物質と結合

した受容体は、内向き電流を活性化することで、神経細胞を脱分極させる。脱分極により生じた活動電位は軸索を伝わり、高次神経系へ化学物質の情報が活動電位の発火頻度として伝達される。キイロショウジョウバエの高次脳中枢では、およそ4万個の神経細胞が複雑なネットワークを形成しており、化学物質の情報は特定の組み合わせの神経細胞群に伝達される。後述するように、昆虫と脊椎動物では、全く異なった分子基盤を用いて匂いの信号が電気信号へ変換されるが、興味深いことに、嗅神経細胞から2次神経に至るまでの神経ネットワークは、昆虫と脊椎動物ではほぼ相同である。

げっ歯類で嗅覚受容体遺伝子が始めて報告されたのち⁷⁾、魚類や線虫などで次々と化学感覚受容体遺伝子群が見つかったが、昆虫の嗅覚受容体遺伝子は1999年によく報告された^{10, 14, 42)}。発見がおくれた理由として、脊椎動物や線虫の嗅覚受容体はGタンパク質共役型受容体(GPCR)遺伝子ファミリーに属していたが、昆虫の嗅覚受容体には既知のGPCRに共通なモチーフが全く見つからなかったことが挙げられる。その後、味覚受容体遺伝子ファミリーも発見され、これらの受容体群が7回膜貫通型受容体に属していたことから、昆虫における化学感覚には脊椎動物と共通した分子基盤が働いていると考えられていた。しかし、昆虫の嗅覚受容体や味覚受容体にはイオントロピックな機能が備わっていることや^{37, 39, 45)}、ほとんどの動物で神経伝達物質の受容体として機能しているイオントロピック型グルタミン酸受容体が、昆虫では嗅覚受容体として機能していることが報告されるなど⁴⁾、末梢における化学感覚の分子基盤が昆虫独特であることが次々と明らかにされた。

現在までに、昆虫における代表的な化学感覚受容体として、嗅覚では嗅覚受容体とイオントロピック受容体(IR)が、味覚器ではIRと味覚受容体が知られている。水棲動物である魚類などの例外を除いて、脊椎動物では、嗅覚受容体で受容される揮発性匂い物質は味覚受容体では受容されず、嗅覚と味覚受容体ではリガンドのレパートリが異なる。しかし昆虫の場合では、同一のリガンドが異なる受容体ファミリー間でオーバーラップして受容することが認められる。例えば二酸化炭素は、嗅覚器においては味覚受容体^{19, 21)}やIR²⁾で、味覚器では未知の受容体を介して受容することが報告されている¹³⁾。一方で二酸化炭素を受容する嗅覚受容体ははまだ明らかにされていない。このような幅広い受容体による化学物質の認識は、昆虫の生活史における化学感覚を介した外界認識の役割が多岐にわたっていることを示唆する。さらに感覚神経細胞と行動との間には強固な連関が認められるので、このような受容体とリガンドの組み合わせを利用して下流の神経ネットワークを明らかにすることは、行動を担う神経系の解明につながる。以下に、昆虫の化学感覚における代表的な受容体群について、概説する。

(1) 嗅覚受容体

1999年に昆虫の嗅覚受容体遺伝子ファミリーが報告されて以来、ゲノム解読の進展とともにハマダラカ、カイコ、ミツバチ、コクヌストモドキなど様々な昆虫から嗅覚受容体遺伝子ファミリーが報告されている。現在までに昆虫の嗅覚受容体は、種毎で異なった約50～300個の受容体で構成される、多様な遺伝子ファミリーを構成することが明ら

かとなっている。これらの受容体は脊椎動物の嗅覚受容体と同様に、GPCRに共通な7回膜貫通型構造を持つが、既知のGPCRのアミノ酸配列モチーフは全く持たない^{10, 42)}。さらに、膜トポロジーはGPCRとは逆で、N末端を細胞内に有する^{3, 24, 40)}。一方で、全ての昆虫で保存されているOr83bファミリー受容体 (olfactory co-receptor, Orcoと改名されたが、本稿では引用を加味してOr83bと記述する) と呼ばれる特殊な受容体の存在も明らかになった²²⁾。Or83bファミリー受容体は70%以上の高い相同性を持ち、すべての昆虫種で保存されている。しかし甲殻類からは見つかっていないことから、昆虫独自の受容体であると考えられる³⁴⁾。Or83bは、嗅覚受容体を発現する全ての嗅神経細胞で発現しているため、リガンド認識に直接関与する受容体ではないと考えられている。しかし昆虫の嗅覚応答に必須の機能を持っており、Or83bを欠損したショウジョウバエでは、ほとんどの匂いに対する反応性が失われる²²⁾。このような嗅神経細胞では、嗅覚受容体の膜発現は認められない^{3, 22)}。またOr83bは他の嗅覚受容体とヘテロ複合体を構成することから^{3, 31)}、Or83bはシャペロン様の機能を持ち、嗅覚受容体と複合体を構成することで、受容体を樹状突起上に輸送する役割があると考えられている。

ショウジョウバエでは嗅覚受容体は62種類あり、成虫ではそのうち35個が触角に、7個が小腮触鬚に発現している⁴³⁾。個々の嗅神経細胞には、これらの嗅覚受容体のうち1~3個とOr83bが特定の組み合わせで発現している。嗅神経細胞の軸索は、同一の組み合わせで受容体を発現する神経細胞同士が収束的に、触角葉の糸球体の中の特定の投射神経へシナプスする(図2)。つまり末梢では空間的に広がりを持っていた特定の受容体の情報が、2次神経で特定の神経細胞の活性化パターンへと収斂される。このような神経ネットワークはげっ歯類と共通のものである。

種ごとに少なくとも数十種類存在する多彩な嗅覚受容体と、その対応する匂い物質の組み合わせは、ショウジョウバエやハマダラカを用いて詳細な解析が行われている。特定の嗅覚受容体を欠損したショウジョウバエに、GAL4/

UASシステムでエクトピックに様々な嗅覚受容体を発現させ、どの匂い物質に反応するかスクリーニングした結果、受容体とリガンドの対応関係は複数の受容体が複数の匂いと結合し、その逆も成立する網目状の多対多な関係を持っていることが明らかにされた^{8, 15, 16)}。また嗅神経細胞を活性化するだけでなく、抑制する匂いの存在も報告された^{8, 15)}。嗅覚器の最も重要な役割の一つは、複数の化学物質で構成された多様な餌の匂いを受容することである。そのためこのような、多対多の対応関係による認識機構(アクロスファイバーパターン)は、特定の受容体が特定の物質を符号化するという一対一対応の認識機構(ラベルライン)と比較すると、多様な自然界の匂いのカクテルの中で優位に機能する。一方で嗅覚受容体の中にはフェロモン受容体として、特定のフェロモン物質の識別に特化した機能を持つ受容体も存在する²⁹⁾。

(2) イオントロピック受容体 (IR)

イオントロピック型グルタミン酸受容体は、動物間で保存された、神経伝達物質に対する代表的な受容体である。系統樹では動物においてヒラムシで最初に出現し、NMDAやAMPA受容体を含め、脊椎動物ではおよそ20弱の遺伝子ファミリーを構成している。Bentonらは、触角で発現しているこれらのグルタミン酸受容体の配列をテンプレートとし、ショウジョウバエゲノムの相同性検索を行ったところ、新たに61個もの相同遺伝子と2個の偽遺伝子を見出し、イオントロピック受容体 (ionotropic receptors, IRs) と名付けた⁴⁾。この受容体ファミリーは、旧口動物で出現しており、脊椎動物には保存されていない。受容体数は種ごとに様々であり、10個程度から、100個近くに及ぶ。IRファミリーはその配列と発現場所から、触角に発現し昆虫種を超えて比較的保存されているグループと、種特異性が高く味覚器に発現するものとの2つに大別される¹²⁾。現在までに味覚器に発現するIRの機能は全く明らかにされていないため、以下に嗅覚受容体として機能するIRについて述べる。

嗅神経細胞の中には、気相の分子に対して反応するにもかかわらず、嗅覚受容体を発現しない細胞が存在する。IRはこのような細胞で、嗅覚受容体として機能している。嗅覚受容体や後述する味覚受容体とは異なり、3回膜貫通構造を有し、N末端は細胞外に位置する。一つの細胞内では2~3個のIRが様々な組み合わせで共発現している。この受容体共発現がエクトピックにIRを発現した嗅神経細胞や、アフリカツメガエル卵母細胞での再構成に必要十分であるため、グルタミン酸受容体同様、複合体がイオンチャネルを構成すると考えられている¹⁾。IRは餌に含まれる様々な匂い物質に加え、酸やアミンを受容する^{1, 2, 4)}。

(3) 味覚受容体

味覚受容体も嗅覚受容体同様、7回膜貫通構造を持つ受容体ファミリーとしてショウジョウバエで最初に報告された¹¹⁾。嗅覚受容体同様、多様な遺伝子ファミリーを構成するが、その機能に関しては不明な点が多い。その理由として、味覚受容体が揮発性化合物からフェロモンに至るまで幅広いリガンドに対応していること、発現様式が嗅覚受容体と異なること、膜トポロジーなど構造に関する知見がほとんど得られていないことが挙げられる。

図2 ショウジョウバエの嗅神経細胞における嗅覚受容体発現と軸索投射

昆虫が受容する代表的な味物質は、大きく甘味と苦味に分類される。昆虫の場合、味覚受容体はこれらの味物質に加え、二酸化炭素^{19, 21)}や不揮発性フェロモン²⁶⁾を受容する。さらに光受容への関与も示唆されるなど⁴⁶⁾、味覚受容体の機能は多様である。このようにリガンド認識の点からは、機能的には嗅覚受容体とのオーバーラップが認められるが、系統樹上では味覚受容体は独立したクラスターを形成している。進化上、味覚受容体群は嗅覚受容体よりも早く現れていることから³⁴⁾、脊椎動物同様、もともとは水溶性物質の識別に機能していたと思われる。多くの味覚受容体がその機能的な発現に嗅覚受容体同様、受容体共発現が必要なことから、味覚受容体でも複合体の構成が示唆されている。一方で、受容体単独発現でも機能できる受容体も報告されていることから^{9, 39)}、味覚受容には嗅覚よりも複雑な機構が関与していると考えられる。また嗅覚受容体同様、イオンチャネルの機能を持つ受容体もある³⁹⁾。

嗅覚受容体と異なって、味覚受容体とリガンドの対応付けはほとんど行われていない。Gr5aは単独で甘味であるトレハロース受容体として機能する、ショウジョウバエで最初にリガンド同定された味覚受容体であるが⁹⁾、糖に対する別の受容体であるGr64aと同じく、少なくともGr64fという別の味覚受容体との共発現が生体での糖感知に必要である¹⁷⁾。しかし同じく甘味物質である果糖に対する受容体ファミリー (Gr43a ファミリー) は、哺乳類培養細胞やアフリカツメガエル卵母細胞で、他の味覚受容体との共発現なしで、果糖受容体として機能する³⁹⁾。一方で苦味の受容には少なくとも3つ、または4つの受容体の共発現が必要である²³⁾。さらに、二酸化炭素の感知には味覚受容体ペアが関与している^{19, 21)}。以上のように味覚受容体の場合、リガンドと受容体の対応付けに加え、機能的な受容体の組み合わせも明らかにする必要があり、昆虫における味覚受容の分子基盤は、嗅覚と比べ、未だ解明されていない点が多い。

4. 嗅覚受容体のシグナル伝達機構

(1) Gタンパク質を介したシグナル伝達機構

脊椎動物の嗅覚受容体はGPCRファミリーに属するため、受容体と結合した化学物質の情報はGタンパク質シグナル伝達系を介して、高次中枢へ情報伝達される。匂い物質と結合した嗅覚受容体の構造変化は、下流のGタンパク質を活性化し、細胞内セカンドメッセンジャー濃度 (主にcAMP) を上昇させる。セカンドメッセンジャーは環状ヌクレオチド作動性イオンチャネルを開口させ、細胞内にカチオンが流入し、その結果、嗅神経細胞が脱分極する。環状ヌクレオチド作動性イオンチャネルはカルシウムコンダクタンスも備えるので、匂いを受容した嗅神経細胞では細胞内カルシウム濃度上昇が生じ、引き続きカルシウム活性化型クロライドチャネル (TMEM16B) を開口させ、クロライド流出が生じる。クロライド流出は内向き電流であるが、TMEM16Bには脱分極を増幅させる機能はなく⁵⁾、嗅神経細胞は外界に直接面する神経細胞であるため、様々な塩環境への適応に関与すると考えられる³⁸⁾。

このような脊椎動物の嗅覚器におけるシグナル伝達機構は、嗅覚受容体がロドプシン同様に7回膜貫通構造を持つGPCRに属すること、GPCRシグナル伝達経路のノックアウトマウスで匂い応答がほぼ完全に消失することで明ら

かとなった²⁷⁾。線虫でも嗅覚受容体はGPCRであり、そのシグナル伝達経路の変異体が匂い応答性に異常を示すことから、昆虫でもゲノム中の嗅覚受容体ファミリーとGタンパク質関連分子の探索が行われた。しかし前述の通り、昆虫の嗅覚受容体は7回膜貫通構造を備えるが、既知のGPCRのアミノ酸モチーフは見つからず、さらにN末端を細胞内に有するGPCRとは逆さまの膜トポロジーであった。また全ての昆虫で高度に保存されているOr83bと複合体を構成することがわかった。つまりゲノムから得られた情報からは、昆虫の嗅覚シグナル伝達におけるGタンパク質の関与は示唆されなかった。

一方で、生化学的アプローチから、匂い物質により産生されるセカンドメッセンジャーが報告された。まずカイコガの触角をフェロモンであるボンピコールで刺激すると、cGMPとIP₃濃度が上昇したが、cAMPは変化しないことが報告された^{6, 49)}。さらにショウジョウバエのphospholipase Cの変異体では、匂い応答性が1/3~2/3程度に減弱し³⁶⁾、Gq変異体でも匂い感受性が減少することが報告された²⁰⁾。以上の報告から、昆虫の嗅覚トランスダクションにおけるIP₃シグナル伝達経路の関与が示唆された。実際、昆虫嗅覚受容体を発現したアフリカツメガエル卵母細胞は、匂い刺激により、IP₃を介したクロライド電流を活性化する^{36, 44)}。しかしながら脊椎動物と異なって、IP₃シグナル伝達経路は高々、匂い応答の半分程度にしか影響を与えないことや、嗅覚受容体の活性化がGタンパク質サブユニットの活性化やセカンドメッセンジャーの産生を伴わないこと^{37, 40)}、様々なGaサブユニットの変異が匂い応答に影響を与えないことも報告されている⁴⁷⁾。したがって、昆虫の嗅覚器におけるGタンパク質シグナル伝達機構の役割は、限定的なものであると思われる。

(2) 匂い活性型イオンチャネルによるシグナル伝達

アフリカツメガエル卵母細胞を用いた昆虫嗅覚受容体の異所的発現解析から、昆虫嗅覚受容体は単独でも、IP₃シグナル伝達経路を介して匂い応答を発生しうることが報告されている。しかしその応答は微弱であり、閾値も高く、生体の高感度な匂いセンサーの性質を反映したものではなかった。一方で、昆虫の嗅覚受容体はOr83bと共発現しており、Or83b欠損ショウジョウバエではほとんどの匂い応答が消失した²²⁾。Or83bは嗅覚受容体と複合体を構成しているため^{3, 31)}、Or83bが嗅覚トランスダクションに本質的な役割を持つことが考えられた。そこで仲川等は、カイコガのフェロモン受容体であるBmOr-1とカイコガのOr83bであるBmOr-2をアフリカツメガエル卵母細胞に共発現させたところ、メスから放出されるフェロモンであるボンピコールに対する応答性がほぼ生体レベルまで回復した²⁹⁾。このとき、ボンピコール刺激はGタンパク質シグナル伝達経路を活性化しなかったことから、昆虫の嗅覚トランスダクションの分子基盤は、嗅覚受容体複合体が活性化するGタンパク質非依存的なシグナル伝達経路が、その本質であると考えられた。

筆者等は、匂い刺激により嗅覚受容体複合体が活性化するイオンチャネルを同定するため、様々な昆虫嗅覚受容体複合体を哺乳類培養細胞で発現させ、その電流を解析したところ、嗅覚受容体複合体そのものが、匂いで活性化される非選択的なカチオンチャネルを構成することがわかり、

図3 匂い活性型イオンチャネルの2つのモデル図 A. Sato et al., 2008によるモデル³⁵⁾。受容体複合体で匂い活性型イオンチャネルを構成する。B. Wicher et al., 2008によるモデル⁴³⁾。Or83bがチャネルを構成し、2つの経路でチャネルが活性化される。

Gタンパク質非依存的な昆虫の嗅覚トランスダクションモデルを提唱した(図3 A)³⁷⁾。このチャネルはサブユニットの組み合わせを変えると、電流電圧関係、薬剤感受性やシングルチャネルコンダクタンスが変化する。またGタンパク質シグナル伝達経路を活性化させても嗅覚受容体複合体は活性化されず、逆に、複合体はGタンパク質シグナル伝達系を活性化しなかった。以上の結果は、嗅覚受容体複合体そのものが昆虫の嗅覚シグナル伝達に必要な十分であることを示唆している。その後、Newcomb等のグループが、より詳細な薬理学的解析を行い、嗅覚受容体の下流にGタンパク質が存在しないことを報告した⁴⁰⁾。Gタンパク質非依存的な匂い応答は、昆虫間で広く行き渡った匂い応答機構であると思われる。

筆者等と同時に、Hanssonのグループも嗅覚受容体複合体による匂い活性型イオンチャネルの構成を報告しているが⁴⁵⁾、そのチャネル構成は我々とは全く異なるものであった。彼らはショウジョウバエ嗅覚受容体 Or22aと Or83bを共発現した HEK293細胞は、匂いに対して応答潜時の短い速い応答成分と、遅い応答成分の2つを示すことを見出した。また Or83b 単独で環状ヌクレオチドに対するチャネル活性があることも見出し、その点変異体を用いて、カリウム透過性に関与するアミノ酸残基を特定した。以上の結果から彼らは、匂い受容を受け持つ受容体にはGタンパク質依存的、および非依存的な2つの経路が存在し、Or83bで構成するチャネルがその2つの経路により異なった時間軸で活性化されると結論付けた。つまり、匂いと結合した受容体はまず、Gタンパク質非依存的に Or83bを直接活性化し、速い反応を生み出し、その後Gs経路を介したcAMPの濃度上昇が遅い反応を生じさせる、というモデルを提唱した(図3 B)。しかしながら、匂い刺激によるcAMP濃度上昇は高々30%程度であり、Gs経路の匂い応答に対する貢献度は低いと思われる。

(3) 嗅覚受容体複合体のチャネルポアへの貢献

以上のように現在、昆虫の嗅覚シグナル伝達機構として、2つの矛盾するモデルが提唱されている。これらの矛盾は以下の通りである。

- ・嗅覚受容体によるGタンパク質 α サブユニットの活性化
- ・環状ヌクレオチドに対する感受性
- ・チャネルポアを構成するサブユニット構成

以上の矛盾点を加味して、両者を融合したモデルも提唱されている³⁰⁾。しかし、その後の研究の進展から、チャネルサブユニット構成と環状ヌクレオチド感受性に関して、全容が明らかになりつつある。

Zwibelのグループは10万種以上の化合物スクリーニングにより、ハマダラカ嗅覚受容体に対するユビキタスなアゴニスト (*N*-(4-ethylphenyl)-2-((4-ethyl-5-(3-pyridinyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl) thio) acetamide, VUAA1) を見出した¹⁸⁾。シングルチャネル記録により、VUAA1は Or83bに結合し、Or83b 単独で非選択的なカチオンチャネルを構成しうることが明らかとなった。実際、Or83b 単独で多量体を構成しうることとも報告されている³¹⁾。ただし Or83b 単独で構成するイオンチャネルは、環状ヌクレオチドに対する感受性は示さない。また Or83b 以外の受容体サブユニットを変化させると、アデニル酸シクラーゼの活性化剤や環状ヌクレオチドに対する応答性が変化することから³⁷⁾、環状ヌクレオチドの作用部位は、匂い受容を司る受容体サブユニットであると考えられる。しかしこれらの研究では、膜透過型の薬剤を用いた薬理学的試験によりその効果が検討されているため、その作用部位が細胞内か細胞外のどちらであるかは不明である。

一方で、匂い受容に関わる嗅覚受容体サブユニットが、チャネルポアとして関与することも示唆されている。筆者等はカルシウムチャネル阻害剤であるルテニウムレッドが、匂い活性化電流の内向き電流を阻害し(未発表)、阻害効果はサブユニットの組み合わせに依存的であること、匂い受容側のサブユニットが外向き整流性に影響を与えることを見出した。また、ルテニウムレッドの効果やイオン透過性は Or83b 以外の嗅覚受容体によっても異なることから^{32,33)}、Or83bだけでなく、匂い受容に関与する嗅覚受容体もチャネルポアとして機能すると考えられている。

以上のことから、ヘテロな複合体を構成した嗅覚受容体では、全てのサブユニットがチャネルポアに寄与することが考えられている。環状ヌクレオチドは Or83b 以外の受容体サブユニットに作用するが、その結合部位などは一切明らかでなく、またその作用としても匂い応答のモジュレーションなどが示唆されており、その機能解明に今後の研究が待たれる。

5. 味覚受容体のシグナル伝達機構

(1) Gタンパク質を介したシグナル伝達機構

脊椎動物では嗅覚と比べ、味覚におけるシグナル伝達機構は複雑であり、Gタンパク質シグナル伝達経路に加え、pH感受性チャネルやナトリウムチャネルなど様々なシグナル伝達関連分子が機能している。1992年に、味覚受容体の同定に先駆けて、脊椎動物の味細胞からGタンパク質(gustducin)がクローニングされたことから²⁵⁾、昆虫における味覚のシグナル伝達機構としてGタンパク質シグナル伝達経路が検討された。まず味細胞にGqが発現していることが報告され、糖受容におけるPLCシグナル伝達経路の関与が示唆された⁴¹⁾。また二酸化炭素受容体として機能する味覚受容体の応答は、Gq経路により増幅される⁴⁷⁾。これら

の結果から、味覚受容体のシグナル伝達機構にはPLC経路が大きな役割を持つことが示唆されている。一方で、糖応答におけるGsタンパク質の関与も指摘されており、嗅覚受容体同様に、味覚受容体のシグナル伝達機構におけるGタンパク質の役割はほとんど不明である。

(2) 味覚受容体が構成する糖制御型イオンチャネル

嗅覚受容体と比較して、味覚受容体では受容体とそのリガンドの対応付けや、異所的発現に関する研究は、ほとんど進展していない。したがって、味覚受容体が担うシグナル伝達機構は、ほとんどが不明となっている。このように研究の進展が困難な大きな理由として、嗅覚受容体と異なると、味細胞では様々な組み合わせで、2〜4種類以上の味覚受容体が共発現していることが挙げられる。現在までに、様々な組み合わせによる味覚受容体共発現による味覚応答の再現は成功例がなく、前述のようにGタンパク質シグナル伝達経路など受容体以外の関連分子の共発現が必要であることが指摘されてきた。しかし、筆者等はイオンチャネルとして機能する味覚受容体の同定に成功し、その結果、脊椎動物にはないユニークな昆虫味覚受容体の機能が明らかとなった。

図4 BmGr-9のモデル図 低濃度の果糖でナトリウム電流が活性化され、高濃度でカチオン非選択的な電流が生じる。果糖と受容体の結合は、他の六炭糖で競合阻害される。複合体構成は不明である。

これまでにシグナル伝達機構が明らかにされた昆虫の味覚受容体は、カイコガの果糖受容体BmGr-9のみである³⁹⁾。筆者等の研究グループはカイコガゲノムデータベースより得られた味覚受容体遺伝子群のうち、RT-PCRにより味覚器で発現する受容体を幾つか絞りこんだ。これらの受容体を単独でアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、味物質のスクリーニングを行ったところ、BmGr-9からのみ内向き電流応答が測定され、その反応は果糖特異的であった。HEK293Tなどの様々な哺乳類培養細胞でも、受容体単独発現で果糖特異的な電流応答が確認できたため、我々はBmGr-9が単独でチャネルとして機能すると仮説立て、その検証を行った。匂い活性型イオンチャネルと同様の実験を行った結果、果糖応答電流はGタンパク質経路非依存的な非選択的なカチオンチャネル電流であり、受容体単独発現が応答を生じさせるに必要十分であることを見出した。つ

まり我々は、BmGr-9がそれ単独で、果糖で活性化されるイオンチャネルとして機能すると結論付けた(図4)。研究を始めて当初、果糖活性化電流が様々な内向き整流性を示したことから、複数のチャネルの関与が疑われた。しかし応答の大きさと整流性に明瞭な相関が認められたことから(佐藤、未発表)、チャネルが果糖の濃度依存的に内向き整流性を示すことがわかった。したがって、この受容体には複数のリガンド結合部位があるか、複合体を構成することのどちらかが予測されるが、チャネル構成などの生化学的特性は明らかでない。また、この受容体は果糖の構造異性体で競合阻害を受ける。つまり果糖という甘味が、他の糖によって抑制されてしまう。BmGr-9は幾つかの昆虫で保存されているGr43a味覚受容体ファミリーに属し、Gr43aも果糖に対して応答する。したがって、Gr43aは果糖で活性化されるイオンチャネルファミリーを構成する可能性がある。またBmGr-9以外にも、BmGr-8が他の受容体との共発現なしに、甘味物質であるイノシトールに対する受容体として機能することが報告された⁴⁸⁾。BmGr-8がイオンチャネルを構成するかは定かでないが、この受容体は、嗅覚受容体同様に7回膜貫通型でありながら、N末端を細胞内に有する。これらの結果は味覚受容体の中には、これらの受容体の他にもイオンチャネルとして機能するものが存在していることを示唆している。これまでに、果糖やイノシトールなどの糖類がカイコの摂食行動に影響を与えることはわかっているが、実際にこれらの受容体を介した行動であるかは不明である。また、これらの受容体による脱分極が活動電位へ変換され、高次神経系へ伝わるかはわかっていない。しかしセンチニクバエの味細胞には、糖で直接活性化される非選択的なカチオンチャネルコンダクタンスが存在し²⁸⁾、今後、受容体の変異体解析により、味覚受容体が構成するイオンチャネルの生体での役割が明らかになると期待される。

これらの甘味受容体の他に、異所的発現によりリガンド同定された味覚受容体としてショウジョウバエのGr5aが報告されており、単独でS2ショウジョウバエセルラインに導入することでトレハロース受容体として機能する⁹⁾。しかし変異体解析では、Gr5aはGr64fとの共発現が必要であることや、S2には他の受容体が発現している可能性があるため、Gr5aが単独で機能しうるのは、または複合体としてイオンチャネルを構成するかは明らかでない。

6. おわりに

線虫から高等脊椎動物に至るまで、多くの化学感覚受容体はGPCRに属する巨大な7回膜貫通型ファミリーを構成しており、Gタンパク質シグナル伝達経路はすべての動物における化学感覚における共通の分子基盤であると考えられてきた。ゲノムデータベースの整備により、昆虫のゲノム中からも7回膜貫通タンパク質に属する嗅覚受容体と味覚受容体の遺伝子ファミリーが見つかったことで、昆虫の化学感覚におけるGタンパク質シグナル伝達経路の役割が長年研究されてきた。しかし現在に至るまで、これらの化学感覚受容体がGタンパク質サブユニットを活性化する直接の証拠は得られていない。一方でこれらの受容体とGPCRでは、7回膜貫通構造以外の共通点が見つからず、さらにGタンパク質非依存的にリガンド活性型イオンチャ

ネルとして機能することが報告された。また新たな嗅覚受容体として IR が発見され、昆虫における化学感覚の分子基盤として、リガンド活性型イオンチャネルが本質的な役割を担うことが明らかにされつつある。昆虫は、陸上動物の中でもっとも多様な進化を遂げた動物であり、メタボリックな経路を用いず、シンプルな受容体複合体だけでシグナル伝達を実現するイオントロピックな受容体が、適応的に有利に働いたのではないだろうか。

文 献

- 1) Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S., & Benton, R.: *Neuron*, 69, 44-60 (2011)
- 2) Ai, M., Min, S., Grosjean, Y., Leblanc, C., Bell, R., Benton, R., & Suh, G. S.: *Nature*, 468, 638-640 (2010)
- 3) Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W., & Vosshall, L. B.: *PLoS Biol.*, 4, e20 (2006)
- 4) Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B.: *Cell*, 136, 149-162, (2009)
- 5) Billig, G. M., Pál, B., Fidzinski, P., & Jentsch, T. J.: *Nat. Neurosci.*, 14, 763-769 (2011)
- 6) Breer, H., Boekhoff, I., & Tareilus, E.: *Nature*, 345, 65-68 (1990)
- 7) Buck, L. & Axel, R.: *Cell*, 65, 175-187 (1991)
- 8) Carey, A. F., Wang, G., Su, C. Y., Zwiebel, L. J., & Carlson, J. R.: *Nature*, 464, 66-71 (2010)
- 9) Chyb, S., Dahanukar, A., Wickens, A., & Carlson, J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 14526-14530 (2003)
- 10) Clyne, P. J., Warr, C. G., Freeman, M. R., Lessing, D., Kim, J., & Carlson, J. R.: *Neuron*, 22, 327-338 (1999)
- 11) Clyne, P. J., Warr, C. G., & Carlson, J. R.: *Science*, 287, 1830-1834 (2001)
- 12) Croset, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T. J., & Benton R.: *PLoS Genet.*, 6, e1001064 (2010)
- 13) Fischler, W., Kong, P., Marella, S., & Scott, K.: *Nature*, 448, 1054-1057 (2007)
- 14) Gao, Q. & Chess, A.: *Genomics*, 60, 31-39. (1999)
- 15) Hallem, E. A., Ho, M. G., & Carlson, J. R.: *Cell*, 117, 965-979 (2004)
- 16) Hallem, E. A. & Carlson, J. R.: *Cell*, 125, 143-160 (2006)
- 17) Jiao, Y., Moon, S. J., Wang, X., Ren, Q., & Montell C.: *Curr. Biol.*, 18, 1797-1801 (2008)
- 18) Jones, P. L., Pask, G. M., Rinker, D. C., & Zwiebel, L. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 8821-8825 (2011)
- 19) Jones, W. D., Cayirlioglu, P., Kadow, I. G., & Vosshall, L. B.: *Nature*, 445, 86-90 (2007)
- 20) Kain, P., Chakraborty, T. S., Sundaram, S., Siddiqi, O., Rodrigues, V., & Hasan, G.: *J. Neurosci.*, 28, 4747-4755 (2009)
- 21) Kwon, J. Y., Dahanukar, A., Weiss, L. A., & Carlson, J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, 3574-3578 (2007)
- 22) Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., & Vosshall, L. B.: *Neuron*, 43, 703-714 (2004)
- 23) Lee, Y., Moon, S. J., & Montell, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.*, 106, 4495-4500 (2009)
- 24) Lundin, C., Käll, L., Kreher, S. A., Kapp, K., Sonnhhammer, E. L., Carlson, J. R., Heijne, G., & Nilsson, I.: *FEBS Lett.*, 581, 5601-5604 (2007)
- 25) McLaughlin, S. K., McKinnon P. J., & Margolskee R. F.: *Nature*, 357, 563-569 (1992)
- 26) Miyamoto, T. & Amrein, H.: *Nat. Neurosci.*, 11, 874-876 (2008)
- 27) Mombaerts, P.: *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 263-278 (2004)
- 28) Murakami, M. & Kijima, H.: *J. Gen. Physiol.*, 115, 455-466 (2000)
- 29) Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., & Touhara, K.: *Science*, 307, 1638-1642 (2005)
- 30) Nakagawa, T. & Vosshall, L. B.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, 19, 284-292 (2009)
- 31) Neuhaus, E. M., Gisselmann, G., Zhang, W., Dooley, R., Strörkuhl, K., & Hatt, H.: *Nat. Neurosci.*, 8, 15-17 (2005)
- 32) Nichols, A. S., Chen, S., & Luetje, C. W.: *Chem. Senses*, 36, 781-790 (2011)
- 33) Pask, G. M., Jones, P. L., Rützler, M., Rinker, D. C., & Zwiebel, L. J.: *PLoS One*, 6, e28774 (2011)
- 34) Peñalva-Arana, D. C., Lynch, M., & Robertson, H. M.: *BMC Evol. Biol.*, 9, 79 (2009)
- 35) Riesgo-Escovar, J., Raha, D., & Carlson, J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 2864-2868 (1995)
- 36) Sakurai, T., Nakagawa, T., Mitsuno, H., Mori, H., Endo, Y., Tanoue, S., Yasukochi, Y., Touhara, K., & Nishioka, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 16653-16658 (2004)
- 37) Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., & Touhara, K.: *Nature*, 452, 1002-1006 (2008)
- 38) Sato, K. & Suzuki, N.: *J. Exp. Biol.*, 203, 253-262 (2000)
- 39) Sato, K., Tanaka, K., & Touhara, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 11680-11685 (2011)
- 40) Smart, R., Kiely, A., Beale, M., Vargas, E., Carraher, C., Kralicek, A. V., Christie, D. L., Chen, C., Newcomb, R. D., & Warr, C. G.: *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38, 770-780 (2008)
- 41) Talluri, S., Bhatt, A., & Smith, D. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 11475-11479 (1995)
- 42) Vosshall, L. B., Amrein, H., Morozov, P. S., Rzhetsky, A., & Axel, R.: *Cell*, 96, 725-736 (1999)
- 43) Vosshall, L. B. & Stocker, R. F.: *Ann. Rev. Neurosci.*, 30, 505-533 (2007)
- 44) Wetzel, C. H., Behrendt, H. J., Gisselmann, G., Störkuhl, K. F., Hovemann, B., & Hatt, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 9377-9380 (2001)
- 45) Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M. C., Heller, R., Heinemann, S. H., & Hansson, B. S.: *Nature*, 452, 1007-1011 (2008)
- 46) Xiang, Y., Yuan, Q., Vogt, N., Looger, L. L., Jan, L. Y., & Jan Y. N.: *Nature*, 468, 921-926 (2010)
- 47) Yao, C. A. & Carlson, J. R.: *J. Neurosci.*, 30, 4562-4572 (2010)
- 48) Zhang, H. J., Anderson, A. R., Trowell, S. C., Luo, A. R., Xiang, Z. H., & Xia, Q. Y.: *PLoS One*, 8, e24111 (2011)
- 49) Ziegelberger, G., van den Berg, M. J., Kaissling, K. E.,

Klumpp, S., & Schultz J. E.: J. Neurosci., 10, 1217-1225 (1990)

Abstract

Ionotropic chemosensory receptors expressed in insect olfactory and gustatory systems

Koji SATO

ERATO Takeuchi Biohybrid Innovation Project, JST, Komaba Open Laboratory (KOL) Room M202, 4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8505, Japan

Chemosensory system recognizes more than 100,000 chemical compounds in the environment. Animals have evolved the diverse chemoreceptor gene families, which allow the recognition of infinitely many chemicals. In verte-

brates, most of chemoreceptors belong to the family of G-protein coupled receptors possessing seven-transmembrane domains. Thus, binding of ligand and receptors results in activation of G-protein signaling pathways and downstream ion channels. Although insect olfactory and gustatory receptors have been reported as the member of G-protein coupled receptors, recent progress in the functional expression of insect chemoreceptors revealed the conformation of ligand-gated ion channel by olfactory and gustatory receptors. The activity of these ion channels is independent of known G-protein signaling pathways. Genome analysis of fruit flies also has revealed the diverse ionotropic glutamate receptor-related gene families function as the chemoreceptor. In this review, I discuss some of the molecular mechanism underlying the insect chemosensory systems, with a particular focus on the function of chemosensory receptor-channels.

Key words: insect, olfaction, gustation, ion channel