

学位論文審査結果の報告書

氏 名 古谷 章悟

生 年 月 日 (昭和)・平成62年2月26日

本 籍 (国籍) 京都府

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 199号

学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 Studies on regulation of glutamate-gated chloride
channels by gene expression and chemical probes in Bombyx mori

(カイコガ抑制性グルタミン酸受容体の遺伝子発現とケミカルプローブによる制御に関する研究)

審 査 委 員

(主 査) 松田 一彦



(副主査) 板倉 修司



(副主査) 森山 達哉



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

Cys-loop型イオンチャンネルファミリーに属するリガンド作動性塩素チャンネルは、即動性の抑制性神経シナプス伝達で中心的な役割を担っている。本受容体群は、中央のイオンチャンネルを取り囲むように5つのサブユニットが集合した構造をもち、そのオルトステリック部位に神経伝達物質が結合すると塩素チャンネルを開口し、塩素イオンの流入を誘起することで神経細胞の磨膜電位変化を引き起こす。リガンド作動性塩素チャンネルを構成するサブユニットは4回膜貫通構造をもち、N末端とC末端をともにシナプス側に向ける。昆虫の主要なリガンド作用性塩素チャンネルである γ -アミノ酪酸受容体 (GABA_ACl) はヒトと昆虫の神経系で見られるのに対して、グルタミン作動性塩素チャンネル (GluCl) は無脊椎動物の神経系でのみ見られる。そのため、GluClは昆虫選択性に優れた制御剤開発の重要なターゲットである。GluClをコードする遺伝子はゲノムに一つだけしか存在しないにもかかわらず、昆虫は変態、性差および神経系の部位に応じてGluClの性質を調節し、運動および感覚統合を成し遂げているが、その分子メカニズムはほとんど理解されていない。そこで本研究では、ゲノムが解読されたカイコ (*Bombyx mori*) を用いて、選択的スプライシングによりGluClが多様化するメカニズムについて検討し、多様化がどのようにGluClの機能に対して影響するのか検討した。

カイコガ幼虫 (P-50系統) から脳 (キノコ体) および胸部神経節から得たmRNAを鋳型としてRACE法によりGluCl cDNAの5' -および3' -末端を決定した後、全長cDNAをPCRで増幅し、pcDNA3.1 (+) ベクターにクローニングした。得られたcDNAプールから任意のクローンを50選抜し、その塩基配列を決定した結果、脳および中枢では、exon 3での3種の選択的スプライシング (a, bおよびc) とexon 9での部分欠損 (9 partial deletion: 9p Δ) により、exon 3a, exon 3b, exon 3b/exon 9p Δ , exon 3c, exon 3c/exon 9p Δ の4種のバリエーションに加え、exon 3の完全欠損バリエーション (exon 3 Δ) の計5種のバリエーションが発現していることがわかった。さらにBmGluClには、C末端において2つの異なる鎖長をもちタイプが存在することもわかった。それぞれのバリエーションの発現レベルを、cDNAの検出頻度と定量的PCRにより評価したところ、採用した評価法の種類によらず、exon 3については3b型が最も高いレベルで発現し、それを3cが追随し、exon 3aが最も低いレベルで発現することが明らかとなった。またexon 9については、完全長タイプの方が部分欠損タイプよりも高レベルで発現していることも見出した。

本研究で得られたすべてのバリエーションをアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、グルタミン酸に対する応答を2電極膜電位固定法により機能的再構築の有無について検討した。その結果、exon 3欠損タイプとC末端が短いタイプはどちらも機能的に発現しないことが明らかとなった。その他の機能的に発現可能なバリエーションについて、グルタミン酸とイベルメクチンの濃度-応答関係を測定した。その結果、構造の多様性はこれら2種のリガンドの半数効果濃度には影響せず、リガンドが誘起するピーク電流の大きさを、exon 3x > exon 3b > exon 3aの順で変化させることを発見した。その原因を明らかにするため、BmGluClバリエーションを発現させた卵母細胞あるいはHEK293細胞から調製した膜画分に対する³Hイベルメクチンの結合をbinding assayにより評価したところ、exon 3とexon 9の選択的スプライシングにより生じる構造多様性は、膜に機能的に組み込まれた受容体数に影響することが明らかとなった。

Exon 3cバリエントが最も大きなグルタミン酸およびイベルメクチン応答を示す原因を明らかにするため、exon 3aとexon 3bとの間でキメラを構築し、これら2種のキメラに対する応答を測定した。その結果、block IIと命名した領域の4つアミノ酸の違いが、当該応答の大きさを決定していることがわかった。さらに部位特異的実験により調べたところ、程度の差はあれど、これら4種のアミノ酸は全てBmGluClのグルタミン酸およびイベルメクチンに対する応答サイズの決定に関与していることが明らかとなった。BmGluClをモデリングし、4種のアミノ酸の役割について調べたところ、それらは静電的相互作用あるいは水素結合の形成等によりサブユニット間の相互作用を高め、膜に移行する受容体数を促進するはたらきをもつことが初めて明らかとなった。

Okaramine類はオカラ培地で培養した*Penicillium simplicissimum* AK-40株の培養物からカイコガ幼虫に対する殺虫性物質を指標として1989年に発見されたインドールアルカロイドである(図2)。この発見から四半世紀が経過しても作用機構が不明であったため、この問題の解明に取り組んだ。

カイコの脳が初代培養神経細胞を調製し、本細胞で発現するリガンド作動性イオンチャネルに対するokaramine Bの作用機構を電気生理学的手法であるパッチクランプ法で調べた。その結果、okaramine Bはそれ自身で濃度依存的に内向きイオン電流を誘起した。そこで、ニコチン性アセチルコリン受容体阻害剤mecamylamineとリガンド作動性塩素チャネル[GluClと γ -アミノ酪酸受容体 (GABACl)]に対する阻害剤fipronil を処理することでokaramine Bにより誘起されるイオン電流が影響を受けるかどうか調べた結果、okaramine Bにより誘起される電流はfipronilによって選択的に阻害された。さらに、本電流の逆転電位を求めたところ、その値は塩素イオンに対する平衡電位と近い値を示したことから、okaramineはリガンド作動性塩素チャネルに対するアクチベーターとして作用することが示唆された。

上述の研究によって単離されたGluClバリエントのうち、脳と中枢で最も高発現しているexon 3bバリエントと、別途当該組織から遺伝子を単離したRDL GABAClをアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、okaramine Bに対する応答を電気生理学的測定した結果、GluClのみがokaramine Bによって活性化されることを見出した。そこで、5種のokaramine類を用いて、カイコガ脳神経細胞に対するイオン電流誘起活性、GluCl活性化活性および殺虫活性を測定してこれら3種の活性間での相関を調べたところ、お互いに高い正の相関を示したことからokaramineの第一の標的がGluClであることが示唆された。

さらに、okaramine類の選択毒性の有無を明らかにするため、ヒトのGABAClとグリシン受容体に対するokaramine Bの作用を調べたところ、高い濃度で処理してもこれらの受容体に対して何らアクチベーター作用やアンタゴニスト作用を示さないこともわかった。よってokaramine類は極めて高い選択性をもって昆虫GluClを活性化し、殺虫効果を発揮することが初めて明らかとなった。

論文審査結果の要旨

昆虫の神経シナプス伝達機は、脊椎動物の神経伝達機構と同様に、興奮性と抑制性の2つの機構により制御されている。これら2種のいずれにおいて中心的な役目を果たしているのがcys-loop型リガンド作動性イオンチャンネルである。本イオンチャンネルは、4回膜貫通構造を持つサブユニットが集合して形成され、中央にカチオンあるいは塩素イオンを選択的に通すイオンチャンネルを有する。神経伝達物質が隣接するサブユニットのN末端がつくるリガンド結同ドメイン（オルトステリック部位）に結合すると、それに連動して受容体全体の構造が変化して中央のイオンチャンネルが開き、膜電位変化を誘起する。昆虫の興奮性シナプス伝達ではニコチン性アセチルコリン受容体がアセチルコリンの結合に応じて興奮性後膜電位を誘起する。一方、抑制性シナプス伝達では主に γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体 (GABAR) と抑制性グルタミン酸受容体 (GluCl) が主要な役割を果たしている。GABAR遺伝子としてRDL, GRDおよびLCCH3が同定されているのに対して、GluClをコードする遺伝子は単一である。ところがこの単一遺伝子から生じる転写産物は一種類ではない。これはそれぞれの転写産物が特別な使命を受けて抑制性神経伝達を調節していることを示唆しているが、その詳細は不明であった。本研究では、GluClが無脊椎動物にしかない昆虫制御の重要な標的であることをふまえ、ゲノムが解読されているカイコ (*Bombyx mori*) を材料として、この疑問の解明に挑んだ。

これまでにショウジョウバエのGluClが主にexon 3での選択的スプライシングにより多様化することが報告されており、カイコでも同様であった。しかしカイコの場合、ショウジョウバエとは異なりexon 3でのスプライスバリエーションに加えて、exon 9とC末端の部分欠損も合わせて見出された。これらのうち、exon 9とC末端でのバリエーションに関しては新規な発見である。ここまではcDNAを粘り強くシークエンシングすることで辿りつける内容であるかもしれないが、これから述べるそれぞれバリエーションの機能の差ははっきりすると見逃してしまう恐れがあった。それは、バリエーション間でグルタミン酸の感受性を表す半数効果濃度に差が認められなかったからである。

学位候補者は、膜電位固定法を用いてカイコ脳から見出されたGluClのバリエーションを一つ一つアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、グルタミン酸に対する応答を膜イオン電流として測定し、バリエーション間でグルタミン酸応答の大きさに差があることに気がついた。また学位候補者は、exon 3を欠損あるいはC末端の一部を欠損すると、卵母細胞で機能を有するGluClを形成しないことも見出した。

学位候補者は、グルタミン酸応答が最も大きなバリエーションexon 3cと最も小さなバリエーションexon 3aを選び、これら2種のバリエーション間のキメラを用いて当該応答差をもたらすアミノ酸を4種に絞った。そして当該4種のアミノ酸に関する網羅的な部位特異的変異によりこれらのアミノ酸がすべて応答強度差に寄与することを突き止めた。この結論はグルタミン酸のみならずイベルメクチンをも用いて到達した。非常に面白いことに2種のバリエーションのグルタミン酸とイベルメクチンに対する応答強度の差は膜に移行するGluClの量を反映する。そしてこのことがわずか4アミノ酸によって規定されているという結論は極めて新規性に優れている。本知見は、他のリガンド作動性に当てはまる普遍性があり、極めて高く評価される。また、この結論を導くために行った実験は膨大で、気持ちを途切れさせずに研究を継続したことも評価に値する。

学位候補者は、こうした受容体の基本的な性質にとどまらず、本受容体を化学的に調節する機構についても研究した。糸状菌*Penicillium simplicissimum*はオカラを培地に用いて培養すると殺虫活性を示すインドールアルカロイドokaramine類を生産する。本アルカロイドは今から25年以上前に発見されていたものの、その作用点は不明のまま現在に至っていた。Okaramineはカイコを比較的短時間に麻痺させ、致死に追い込む。その原因が神経に作用したためではないかと予想して、学位候補者はパッチクランプ法を用いてokaramine Bの作用機構について検討した。

Okaramine Bをカイコ脳神経細胞に処理すると内向きイオン電流が誘起された。逆転電位の計測により、本イオン電流は塩素イオンによるものであったことから、okaramine BのターゲットはGABARかGluClのどちらかに絞られた。そこでアフリカツメガエル卵母細胞にRDLとGluClを別々に発現させてokaramine Bの作用を調べたところ、偶然にも並行して研究を進めていたGluClだけを活性化することが見出された。そして5種のokaramine類のGluCl活性化作用は殺虫活性とよく一致したことから、本化合物群の作用点が無脊椎動物にしか存在しないGluClであることが発見から25年の歳月を経てついに明らかになった。またokaramineはGluCl以外のリガンド作動性塩素チャンネルに対しては微弱な作用しか示さないことも判明し、新たな昆虫制御剤のリード化合物になりうることも判明した。これらの一連の業績は非常にレベルが高く、昆虫制御分野において一つの基盤を築き上げたと言える。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成27年2月7日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。