



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



## クロオオアリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-12-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: ウェン, ドゥリガ メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.15118/00010330">https://doi.org/10.15118/00010330</a>

氏 名 WEN DURIGE (ウェン ドゥリガ)

学位論文題目 クロオオアリの感覚子に発現する「化学感覚タンパク質」の構造と化学分子結合特性

論文審査委員 主査 教授 戎 修 二  
教授 高野 英 明  
准教授 柴山 義 行

### 論文内容の要旨

アリやミツバチなどの社会性昆虫では、その社会を維持するために個体間の情報交換が重要な働きをしている。その様な情報交換は化学物質を介して行われ、同種間の情報交換を担う化学物質はフェロモンと呼ばれる。クロオオアリ (*Camponotus japonicus*) は体表をおおう種固有のクチクラ炭化水素 (CHC) をフェロモンとして利用し、そのコロニー固有の混合パターンを錘状触角感覚子 (*S. basiconica*) を使用して感知し、巣仲間かどうかを判別し、巣仲間以外を排除する行動をとる。錘状触角感覚子の内部は、感覚神経リンパで満たされ、疎水性の CHC は化学感覚タンパク質 (CSP) に結合して、神経細胞受容体まで輸送されると考えられている。クロオオアリ触角の RNA 解析によって 12 種の CSP が発現していることがわかったが、本研究では、CHC の受容に必須である CjapCSP1 と、それと同様に働きアリの触角に多く発現し、CjapCSP1 と同一細胞で共発現している CjapCSP13 に注目して研究した。まず、CjapCSP1 が CHC を結合し、運搬したのち、どの様にして神経細胞受容体に CHC を「渡す」のかについて調べた。この機構として、カイコガの運搬タンパク質では、pH 変化によってタンパク質の構造が変化し、結合しているフェロモンを解離するという機構が提唱されている。そこで、CjapCSP1 の pH4.0 および 7.0 での円二色性 (CD) および X 線溶液散乱を測定した。その結果、CD 測定から二次構造の違いは見られないが、X 線溶液散乱の結果から、pH7.0 よりも pH4.0 で回転半径 (Rg) が 5.3% (0.74Å 増加) 大きくなることがわかった。次に、CjapCSP1 と CjapCSP13 との関わりについて調べた。各タンパク質に特徴的な配列をもつペプチドを合成し、それを抗原として、特異的な抗血清を作成した。クロオオアリの触角、足、顎からの抽出物と、発現精製した CjapCSP1 と CjapCSP13 を用いたウェスタンブロット法により、抗体の特異性を確かめ、両タンパク質が触角にあることを確かめた。さらに、これらの特異的抗体を用いた蛍光免疫組織化学により、CjapCSP1 と CjapCSP13 が触角にあるが、タンパク質の存在場所が異なることを明らかにした。最後に、クロオオアリ CHC の一種である (z)-9-tricosene や他の 3 種類の化学物質への結合特性を調べた。両タンパク質ともに (z)-9-tricosene に結合したが、CjapCSP13 は CjapCSP1 よりも強く結合し、また他の 3 種類の化学物質に対し異なる結合特性を示した。以上の結果よ

り、CjapCSP1 と CjapCSP13 は触角の同じ細胞で生合成されるが、局在と結合特性の違いにより、CHC 受容・運搬において異なる働きをしていることが示唆された。

## ABSTRACT

Social insects depend on complex communication systems to maintain their societies, in which individuals may exchange information through pheromones. Ants are one such example of social insects. In many species of ants, even if they are conspecific, nestmates are clearly able to distinguish non-nestmates, which they subsequently reject. This is accomplished with cuticular hydrocarbon (CHC) blends on the ant body that are used in social pheromone nestmate recognition. The Japanese carpenter ant *Camponotus japonicus* uses basiconic antennal sensilla (s. basiconica) to sense colony-specific blends of species-specific CHCs, which are hydrophobic. Basiconic antennal sensilla are only observed in females and are filled with sensillar lymph. Chemosensory proteins have been shown to be major proteins that are expressed in ant antenna and are thus expected to transport CHCs to the receptor membranes of olfactory neurons. Twelve CSPs were found from the analysis of RNA expression in *C. japonicus* antennae. In particular, CSP1 in *C. japonicus* (CjapCSP1) was found to be highly expressed and has been shown to bind to 18 *C. japonicus*-specific CHCs. We investigated whether CSP1 represents pH-dependent changes in structure and/or ligand-affinity. In addition, we studied CjapCSP13. Both CjapCSP1 and CjapCSP13 are abundantly expressed in worker ant antennae and are coexpressed in some chemosensilla. To understand the functions of CjapCSP1 and CjapCSP13 based on their structures and their structural changes in the solution, X-ray solution scattering measurements, small angle X-ray scattering (SAXS), and wide angle X-ray scattering (WAXS) were performed. The molecular basis of CSP1 function was evaluated from its structure in solution by CD and X-ray solution scattering measurements at pH 4.0 and 7.0. Although the secondary structure did not vary, the gyration radius (R<sub>g</sub>) was found to be 5.3% larger (0.74 Å increase) at pH 4.0 than at pH 7.0. The dissociation constant (K<sub>d</sub>) of a fluorescent probe, 1-N-phenyl-naphthylamine, for CjapCSP1 was larger at pH 4.0 than at pH 7.0, suggesting that this structural change could trigger ligand dissociation at acidic pH. In contrast to the CSP1, the R<sub>g</sub> of CjapCSP13 was slightly smaller at pH 4.0 than at pH 7.0. Western blotting and immunohistochemistry with specific antiserums revealed that both CjapCSP1 and CjapCSP13 were detected in antenna, but differed in location. The binding

characteristics to four kinds of compounds, including the ant CHCs (z)-9-tricosene, were also examined. Although both CjapCSP1 and CjapCSP13 bound to (z)-9tricosene, CjapCSP13 bound more strongly than CjapCSP1 and showed different binding properties. CjapCSP1 and CjapCSP13 are synthesized in the same cell of the antenna, but they function differently in the CHC reception due to differences in their localization and binding characteristics.

## 論文審査結果の要旨

Wen Durige 君の博士論文は、クロオオアリの巣仲間識別のフェロモン信号分子の運搬に関与すると思われる 2 種の化学感覚タンパク質 (CSP) を取り上げ、その諸特性を明らかにしたものである。アリやミツバチなどの社会性昆虫では、その社会を維持するために個体間の情報交換が重要な働きをしている。その様な情報交換は化学物質を介して行われ、同種間の情報交換を担う化学物質はフェロモンと呼ばれる。クロオオアリ (*Camponotus japonicus*) は体表をおおう種固有のクチクラ炭化水素 (CHC) をフェロモンとして利用し、そのコロニー固有の混合パターンを錘状触角感覚子 (*S.basiconica*) を使用して感知し、巣仲間かどうかを判別している。錘状触角感覚子の内部は、感覚神経リンパで満たされ、疎水性の CHC は化学感覚タンパク質 (CSP) に結合して、神経細胞受容体まで輸送されると考えられている。このような疎水性化学物質を介した情報のやり取りは多くの生物にみられ、我々ヒトにおける味覚、嗅覚がわかりやすい例である。このような疎水性化学物質の運搬、貯蔵等に CSP 類似のタンパク質群が関与していることは、脊椎動物、無脊椎動物のみならず、植物においても同様なタンパク質の関与が報告されている。しかし、その疎水性化学物質の受け渡しの機構の詳細は未だ明らかになっていない。

本論文では、CHC の受容に必須である CjapCSP1 と、それと同様に働きアリの触角に多く発現し、CjapCSP1 と同一細胞で共発現している CjapCSP13 に注目して研究している。まず、CjapCSP1 が CHC を結合し、運搬したのち、どの様にして神経細胞受容体に CHC を「渡す」のかについて調べた。この機構として、カイコガの運搬タンパク質では、pH 変化によってタンパク質の構造が変化し、結合しているフェロモンを解離するという機構が提唱されている。そこで、CjapCSP1 の pH 4.0 および 7.0 での円二色性 (CD) および X 線溶液散乱を測定し、CD 測定では二次構造の違いは見られないが、X 線溶液散乱の結果から、pH 7.0 よりも pH 4.0 で回転半径 (Rg) が 5.3 % 大きくなる (0.74 Å 増加する) ことを見出した。また、CjapCSP1 では pH 4.0 の方が蛍光色素の結合が弱くなることも明らかにし、これらの結果から、CjapCSP1 でも細胞内の局所的な pH 変化を利用して、結合した分子を受容体に渡すという脊椎動物の運搬タンパク質等と共通した機構を利用していると推察している。次に、CjapCSP1 と CjapCSP13 との関わりについて調べている。各タンパク質に特異的な抗血清を

作成し、クロオオアリの触角、足、顎、消化管からの抽出タンパク質を用いたウエスタンブロット法により、両タンパク質が触角にあることを確かめた。さらに、これらの特異的抗体を用いた蛍光免疫組織化学により、CjapCSP1 と CjapCSP13 が触角にあるが、タンパク質の存在場所が異なることを明らかにした。最後に、クロオオアリ CHC の一種である (z)-9-tricosene や他の 3 種類の化学物質への結合特性を調べ、両タンパク質ともに (z)-9-tricosene を結合するが、CjapCSP13 は CjapCSP1 よりも強く結合し、また他の 3 種類の化学物質に対し異なる結合特性を示すことを明らかにした。以上の結果より、CjapCSP1 と CjapCSP13 は触角の同じ細胞で生合成されるが、局在と結合特性の違いにより、CHC 受容・運搬において異なる働きをしていると考察している。

以上、本論文の成果は、CSP の構造機能相関について新しい知見を与えたのみならず、これらの疎水性化学分子結合タンパク質の生物工学的応用；化学物質センサー、薬剤運搬キャリアーとしての利用等の応用面にも寄与するものであることより、博士(工学)の学位に値すると判断された。