

動植物の低分子化合物認識や輸送機構の分子生物学的研究



東京科学大学 永 嶋 鮎 美

はじめに

生物は、様々な刺激を通じて外部環境および内部環境を認識し、適切な応答により体内の恒常性を保っている。筆者らは、外部環境を感知するセンサーの役割を担うタンパク質や、体内における物質輸送を担う輸送体タンパク質に着目して研究を行ってきた。動物が感知する外界の化学物質のうち、匂い物質と呼ばれるものは、分子量約300以下の揮発性有機化合物である。動物は嗅覚によってこれを受容し、適切な応答をする。筆者らは、この応答の最上流、すなわち受容体到達よりも前に匂い物質に作用する因子を明らかにした。また、植物が外界の揮発性化合物をどのように受容しているのかは不明であったため、植物における揮発性化合物受容因子の同定を行った。これらの成果から、筆者は環境応答の「最上流」に関わる因子の重要性や、生体内で局所的に基質濃度が高くなる状況に注意する必要性を認識した。そして、物質輸送を担う輸送体の分子系統解析や活性測定によりその性質を明らかにすることに取り組んでいる。このように、情報処理や物質の流れの上流に位置し、生体の反応を大きく変化させようとする因子に関する研究について解説する。

1. 動植物の低分子化合物認識に関する研究

1-1. マウス嗅粘液中で起こる匂い物質変換反応は匂い知覚に影響を与える

鼻腔内に入った匂い物質は、嗅粘液に溶け込み、嗅覚受容体に結合し、嗅神経細胞を活性化することで匂いとして知覚される。いくつかの嗅覚受容体は、生体と培養細胞系で応答特性に違いがあるが、その理由は不明であった。そこで、嗅粘液中の酵素が匂い物質を変換し、その結果匂い知覚に影響を与えるという仮説を立てた。まず、マウス嗅粘液と匂い溶液を混合し、GC/MS分析によって嗅粘液には匂い物質を代謝する酵素活性があることを見出した。次に、酵素の阻害剤処理前後で、嗅覚一次中枢である嗅球における匂い応答を比較した結果、嗅粘液中の酵素反応は活性化する嗅神経細胞の組み合わせに影響を与えていることが示唆された。最後に、変換を受ける匂い物質に

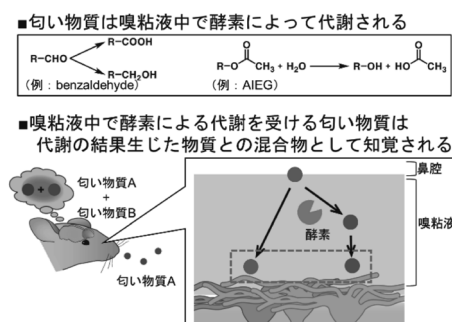


図1. 嗅粘液中の酵素は匂い知覚に影響を与える

対する知覚が阻害剤処理前後で変化するか行動実験により検証した。以上より、匂い物質が嗅粘液中で酵素によって代謝され、この反応が活性化される嗅覚受容体の組み合わせ、および匂い知覚に影響を与えることを明らかにした [1] (図1)。さらに、ヒトにおいても同様の現象が示された [2]。本研究は、匂いの世界の少なくとも一部が嗅粘液というフィルターを通して作られているという新しい概念を提唱するものである。

1-2. 植物における揮発性化合物受容機構の解明

食害を受けた植物が放出する揮発性有機化合物によって周囲の無傷な植物の遺伝子発現が誘導され、抵抗性が上昇するといった植物における化学コミュニケーションの存在が明らかになってきた。しかし、その分子機構は明らかになっていない。そこで、分子の同定とその機能解析を目的とし、タバコ培養細胞および植物体を用いて、ストレス応答によって放出される揮発性化合物のうち (*E*)- β -caryophyllene とその構造類似体の分子構造を認識する受容体様因子を同定した [3] (図2)。

caryophyllene 構造類似体と結合するタンパク質を同定するため、プルダウンアッセイを計画したが、(*E*)- β -caryophyllene には反応性の高い官能基がなく、プローブ作製が困難であった。そこで反応性の高い官能基を導入した (*E*)- β -caryophyllene 誘導体を2種類合成し、これを可能にした。プルダウンアッセイの結果が突破口となり、caryophyllene 化合物群が細胞に入り、TOPLESS と結合することで転写因子複合体の形成を阻害し、転写抑制を解除するというモデルを提唱できた。

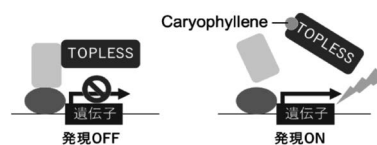


図2. 転写制御因子が揮発性化合物を受容する

2. 動物の低分子化合物輸送機構に関する研究

2-1. Aqp10 タンパク質の尿素・ホウ酸輸送活性の減弱が生じた進化上のタイミングを同定

アクアグリセロポリンは、水および電荷を持たない低分子化合物を通す輸送体であり、生体のグリセロールや尿素輸送において重要な役割を担う。これまでに、ヒト Aqp10 は水、グリセロール、尿素およびホウ酸を輸送するが、トラフグ Aqp10 パラログである Aqp10.2b は尿素およびホウ酸を輸送しないことが示された [4, 5]。しかし、どちらの活性が祖先型であるか、また進化の過程でいつ基質特異性が変化したのかは不明であった。そこで、肉鰭類、条鰭類の古代魚、真骨魚類の Aqp10 の輸送活性を解析した。その結果、水、グリセロール、尿素およびホウ酸を輸送する活性が共通した祖先型の性質であ

ること、また、水、グリセロールのみを輸送する活性が条鰭類のAqp10.2のみに限定された性質であることを明らかにした。これらの結果から、条鰭類Aqp10.2は進化の過程で尿素およびホウ酸の輸送活性を減弱させたことが示唆された [6] (図3)。

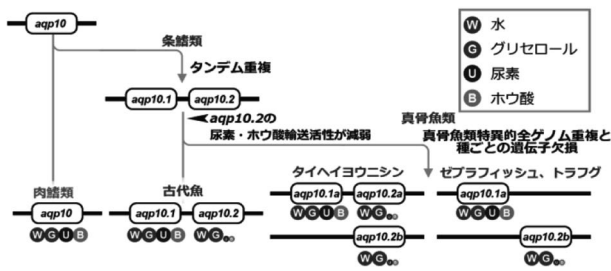


図3. *aqp10* 遺伝子の進化と輸送活性の変化

2-2. 脊椎動物における *slc12a10* 遺伝子の発現と偽遺伝子化および輸送活性の解析

進化の過程で海から淡水環境や陸に進出した脊椎動物は、低塩分環境において体液の塩濃度を保つため、 Na^+ - Cl^- 共輸送体である *Slc12a3* により尿中 NaCl を再吸収する。真骨魚類はさらに *Slc12a10* により、淡水中の塩を能動的に取り込む。*slc12a10* 遺伝子は真骨魚類が四肢動物と分岐した後に獲得したと考えられてきた。四肢動物は *Slc12a10* を持たないのか検証するため、真骨魚類の *slc12a10* 遺伝子と相同な四肢動物の遺伝子座を解析し、*slc12a10* 候補遺伝子を同定した。また、分子系統解析や Dot plot 解析を行い、*slc12a10* 遺伝子は一部の哺乳類、非鳥類型爬虫類、両生類にも存在し、偽遺伝子化や欠失は進化的・地理的に広く分布する様々な系統において独立に生じたことを明らかにした [7]。*slc12a3* 遺伝子と *slc12a10* 遺伝子の配列の類似性が高いことから、BLAST による同源性検索だけで *slc12a10* 候補遺伝子が *slc12a10* 遺伝子であると結論付けず、ゲノム上で遺伝子の並びが保存されているか確認し、さらに分子系統解析を行うことで確認を得た。

輸送活性の確定には複数の報告が重要であるが、*Slc12a10* についてはこれまで1グループからのウナギの例しかなく、筆者らの報告により *Slc12a10* が Na^+ - Cl^- 共輸送体であると確定した [8]。

おわりに

動物の匂い知覚に関する研究は、受容体から行動に至るまでの情報カスケードの解明が進んでいるが、受容体結合以前の反応については未解明であった。また、食害を受けた植物が放出する揮発性有機化合物によって周囲の無傷な植物の遺伝子発現が誘導され、抵抗性が上昇するといった現象が報告されているが、受容メカニズムは不明であった。筆者らの成果により、今後、嗅粘液中の酵素量の多寡に由来する匂い認識の個人差に左右されない香料の合成が可能となる可能性がある。また、香りを利用して抵抗性遺伝子の発現を誘導し、食害や病害に強い植物や有用な二次代謝物の産生を促進させた植物など、付加価値のある植物の作出といった農業への応用も期待できる。

膜輸送体の研究に関しては、Aqp10の活性が変化したタイミングを同定することで、配列や構造の比較を適切に行い、輸送基質選択に影響を与えるアミノ酸を見出せる可能性がある。

アクアグリセロポリンにおける水以外の輸送基質選択性を生み出す分子機構については未だ明らかになっておらず、本成果は他のアクアグリセロポリンの基質選択性に関する理解も大きく前進させる。将来的には新規基質の発見や、薬剤による輸送制御への応用が見込まれる。現在、本成果を活用し、輸送基質選択性を決めるアミノ酸残基の一部を同定して配列から活性を予測する研究に取り組んでいる。

(引用文献)

- 1) Nagashima, A. and Touhara, K., "Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception." *Journal of Neuroscience*, 30, pp16391-16398 (2010)
- 2) Ijichi, C., Wakabayashi, H., Sugiyama, S., Ihara, Y., Nogi, Y., Nagashima, A., Ihara, S., Niimura, Y., Shimizu, Y., Kondo, K., Touhara, K., "Metabolism of Odorant Molecules in Human Nasal/Oral Cavity Affects the Odorant Perception." *Chemical Senses*, XX, pp1-17 (2019)
- 3) Nagashima, A., Higaki, T., Koeduka, T., Ishigami, K., Hosokawa, S., Watanabe, H., Matsui, K., Hasezawa, S. and Touhara, K., "Transcriptional regulators involved in responses to volatile organic compounds in plants." *Journal of Biological Chemistry*, 294, 2256-2266. (2019)
- 4) Kumagai, S., Watanabe, E., Hayashi, N., Kimura, Y., Kamiya, T., Nagashima, A., Ushio, K., Imaizumi, G., Kim, J., Munakata, K., Umezawa, T., Hirose, S., Kasai, K., Fujiwara, T., Romero, M. F., Kato, A., "Boric acid transport activity of marine teleost aquaporins expressed in *Xenopus* oocytes." *Physiological Reports*, 11 (6), 15655 (2023)
- 5) Ushio, K., Watanabe, E., Kamiya, T., Nagashima, A., Furuta, T., Imaizumi, G., Fujiwara, T., Romero, M. F., Kato, A., "Boric acid transport activity of human aquaporins expressed in *Xenopus* oocytes." *Physiological Reports*, 10 (1), e15164 (2022)
- 6) Imaizumi, G., Ushio, K., Nishihara, H., Braasch, I., Watanabe, E., Kumagai, S., Furuta, T., Matsuzaki, K., Romero, M. F., Kato, A., Nagashima, A., "Functional divergence in solute permeability between ray-finned fish-specific paralogs of *aqp10*." *Genome Biology and Evolution*, 16 (1), evad221 (2024)
- 7) Motoshima, T., Nagashima, A., Ota, C., Oka, H., Hosono, K., Braasch, I., Nishihara, H., and Kato, A., " Na^+ / Cl^- cotransporter 2 is not fish-specific and is widely found in amphibians, non-avian reptiles, and select mammals." *Physiological Genomics*, 55 (3), 113-131 (2023)
- 8) Ota, C., Nagashima, A., Kato, A., "Electroneutral Na^+ / Cl^- cotransport activity of zebrafish *Slc12a10.1* expressed in *Xenopus* oocytes." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 327 (2), R152-R163 (2024)

謝辞 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科生物化学研究室および東京科学大学生理工学部加藤研究室で行われました。研究の遂行にあたり、多大なご指導ご鞭撻を頂きました東原和成先生、加藤明先生に心から感謝申し上げます。また、共同研究者の檜垣匠先生、肥塚崇男先生、石神健先生、渡邊秀典先生、松井健二先生、馳澤盛一郎先生、西原秀典先生、古田忠臣先生、Ingo Braasch先生、松崎浩二様、Michael F. Romero先生に心より御礼申し上げます。一緒に研究してくれた学生の皆様にも心より感謝申し上げます。最後に、本賞にご推薦くださいました小林彰子先生ならびに、いつも励ましてくださった東京科学大学の方々に深く感謝申し上げます。