

ショウジョウバエ味覚受容機構の網羅的解析

●谷村 禎一¹⁾ ◆松本 顕²⁾

1) 九州大学大学院・理学研究院・生物科学部門 2) 九州大学・高等教育総合開発研究センター

〈研究の目的と進め方〉

味覚は外界に存在する主に液体の化学物質を識別する感覚としてすべての生物にとって重要である。ゲノムプロジェクトの成果によって、ショウジョウバエ、ヒト、マウスにおいて複数の味覚受容体候補遺伝子の存在が報告されている。しかし、一部を除いてそれらが実際に味覚受容体として機能しているかは明らかでなく、対応するリガンドが同定されていない。味細胞における情報伝達トランスダクションの分子機構も解明されていない。さらに、味情報が中枢においてどのように処理されているかも解明も残された課題である。本研究は、ショウジョウバエのGeneChip (Affymetrix)を用いて味細胞で特異的に発現している遺伝子を網羅的に同定し、各候補遺伝子について、既存の突然変異体、Gal4エンハンサートラップ系統、ジーントラップ系統等を利用すると共に、RNAiによって味細胞の機能障害がおこるかを調べるという多様な網羅的アプローチによって味覚受容分子機構を解明する。

〈研究開始時の研究計画〉

GAL4/UAS法を用いて候補遺伝子の遺伝子の発現場所を同定する。通常4個ある味細胞のどの味細胞で発現しているかを調べる。同時に、種々のUAS系統を用いた遺伝的手法によって、発現味細胞死あるいは、遺伝子の機能障害を引き起こす。候補遺伝子の機能を調べるにはこれまでにショウジョウバエで蓄積されてきたさまざまな突然変異体などの資源と共に、現在進行中のプロジェクトによる1) P因子挿入系統とその再転移による欠失突然変異体の分離、2) GAL4エンハンサートラップ系統、3) Gene Trap系統等の資源を利用することができる。味覚受容の異常は、1) 赤青の食用色素を利用した2者選択テスト、2) 色素糖溶液を利用した摂食量テスト、3) 吻伸展反射テストによる糖、水、塩に対する行動応答、4) 唇弁及びフ節の感覚子からの糖、水、塩に対する神経応答の記録で調べる。味覚受容体候補遺伝子(GR)の味覚受容体として機能を明らかにするためにも同様なアプローチで研究を行う。ある感覚子の特定の味細胞が、S, W, L1, L2のどれであるかが特定できれば、その味細胞の軸索の中枢への投射パターンを解析することが可能になる。

〈研究期間の成果〉

1. Gタンパク質の機能的同定

G γ 1はheterotrimeric G-protein GTPaseのガンマサブユニットをコードする。ショウジョウバエのゲノムには、3量体Gタンパク質をコードする遺伝子は16個予測されている。味覚器における発現をRT-PCRを用いて調べたところ、 α 、 β 、 γ サブユニットで各1個が主に発現していた。そこで、G γ 1の味覚受容への関与を調べた。GAL4がG γ 1遺伝子のpromoter下流に挿入した系統(NP1535)を利用した。UAS-GFPを用いてG γ 1遺伝子の発現部位を調べたところ、唇弁およびフ節の味細胞で発現が観察された。味覚感覚子基部には通常4個の味細胞がある。G γ 1

は3つの味細胞では発現が非常に弱く、1つの味細胞で強く発現していた。4個の味細胞は、それぞれ糖、塩(高濃度と低濃度)、水に対して応答する。G γ 1遺伝子が発現している味細胞を同定するために、味細胞の機能障害実験をおこなった。UAS-TNTをNP1535と交配し吻伸展反射調べたところ、糖に対する応答が低下していた。温度依存的に神経伝達を阻害するUAS-shibirets1を用いて調べると、制限温度(30℃)で糖に対する吻伸展応答が低下していた。さらに、G γ 1遺伝子に対する2本鎖RNAを発現するUAS-RNAi系統を用いて、G γ 1遺伝子をノックアウトしたときの味覚神経応答を電気生理学的に解析したところ、糖に対する応答が低下していた。G γ 1遺伝子のnull突然変異体を用いて糖受容細胞の神経応答を調べた。G γ 1遺伝子のnull突然変異型はホモ致死であるので、FLP/FRTシステムを用いて任意のタイミングで体細胞組換えを起こし、G γ 1遺伝子のnull突然変異ホモ接合体の細胞を生じさせた。その味細胞の糖に対する神経応答は完全には消失していなかった。G γ 1遺伝子は糖受容細胞で発現しており、糖受容シグナルトランスダクションに関与していると考えられる。同時にGタンパク質に依存しない受容機構があることが示された。

2. 網羅的電気生理学的解析

遺伝子の発現パターンと機能を結びつけるには、生理学的な知見が必要である。ショウジョウバエの味細胞は脚と唇弁にある感覚子に存在する。1本の味覚感覚子には、それぞれ水(W)、糖(S)、塩(L1、L2)の味質に応答する4つの味細胞が存在する。近年発表された味覚受容体候補遺伝子(Gr)の発現を唇弁で調べると遺伝子によって発現パターンが異なっていた。そこで感覚子によって味覚応答に違いがあるのかを検証するために、唇弁の全ての感覚子から、4種類の糖に対する神経応答を電気生理学的手法によって記録した。ショウジョウバエの唇弁には片側31本の味覚感覚子が存在し、それぞれの場所や長さによってI、s、iタイプの3つに分類される。実験の結果、それぞれのタイプ別に糖に対する神経応答が違うことが確認された。最も長いIタイプの感覚子が最も感度が高く、iタイプの感覚子はIタイプの半分ほどの感度であった。sタイプの感覚子では1種の糖に対してはIタイプと同等に応答するが、他の糖に対しての応答は弱かった。糖に対する感度のパターンと一致して発現しているGrはなかった。すべての唇弁味覚感覚子から異なる味質に対する応答を記録し解析した結果、感覚子のL、S、Iのタイプ別に応答感度が異なる味受容細胞が確認された。Lタイプの感覚子は水(W)、糖(S)、塩(L1、L2)の4個の受容細胞をもち、糖の感度が3種類の中で最も高かった。Sタイプの感覚子もLタイプと同様の4種の味受容細胞を持つが、スクロースを除いて他の糖はLタイプに比べ応答は弱かった。このスクロース感度の違いから、両者で異なる糖受容体が発現している可能性が考えられる。Iタイプの感覚子には2つの味受容細胞しかなく、一方はS細胞とL細胞の両方の機能を併せ持った新しいタイプの味

受容細胞であることがわかった。他方は、L2であった。Iタイプの糖に対する感度はLタイプの半分ほどであった。

さらに、S, IタイプのL2味受容細胞は複数の苦味物質に応答することを新たに見出した。Gr遺伝子の発現パターンと比較したところ、7つのGRが苦味に応答するS, Iタイプの感覚子の1つの味受容細胞で発現していることがわかった。以上の結果は、これらGRが苦味受容にかかわっていることを示唆している。

3. 新規リガンドの同定

ショウジョウバエの味細胞は、水、塩、糖に応答することが知られている。「苦味」物質に対してショウジョウバエが忌避行動を示すことが知られていたが、苦味物質に応答する味細胞の存在は電気生理学的にわかっていなかった。我々は、フ節の特定の味感覚子がキニーネ、ストリキニーネなどの苦味物質に応答することを明らかにした。感覚子によってよく応答する物質は異なっていた。糖に対する応答と異なり、苦味物質に対する応答のインパルスは50ミリ秒ほどの遅れをもって発火する。応答する味細胞は、高濃度の塩に応答するL2細胞であることを解明した。また、苦味物質に応答しない感覚子では、苦味物質は、水、糖に対する応答を抑制する。これらの生理学的な知見は、ショウジョウバエの苦味受容の分子機能を解明するための基礎データとなる。

4. エンハンサートラップ法による発現スクリーニング

特定の味細胞の機能を調べ、投射パターンを同定するため、Gal4エンハンサートラップ法、GAL4/UAS系を用いた。これらの手法を用いることで、特定の細胞をラベルし、その細胞で任意の遺伝子を発現させることができる。特定の味細胞でGAL4が発現しているGal4エンハンサートラップシステムをスクリーニングし、唇弁の感覚子に接続する1個の味細胞でGAL4が発現しているNP1017系統を得た。GAL4発現細胞の機能を調べるため、シナプス小胞のリサイクルに重要な遺伝子であるshibireの変異体や神経毒素をコードするTNT、細胞死遺伝子であるreaperをGAL4/UAS系を用いGAL4発現細胞において発現させた。GAL4発現細胞の機能阻害により生じる味覚応答の変化を、吻伸展反射テスト、電気生理学的解析により調べた結果、NP1017系統の唇弁でのGAL4発現細胞は水受容細胞であることがわかった。モザイク法を用いて、GAL4発現細胞でタンパク質合成阻害を引き起こす遺伝子を選択的に発現させたところ、細胞死を誘導することに成功し、その感覚子では水応答が消失していることが電気生理学的に確認できた。同様にモザイク法を用いて、単一あるいは数個の水受容細胞でGFPを発現させ、中枢への投射パターンを観察したところ、唇弁にあるどの味覚感覚子に接続する水受容細胞であっても、食道下神経節の同じ領域に投射していた。水受容細胞とは異なる味細胞でGAL4が発現しているGr32a-Gal4の投射パターンとを比較したところ、両者の投射パターンは異なっていた。これらの結果から、異なる味覚情報が、中枢の異なる領域に伝えられることがわかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

味覚受容に関する研究は、ゲノム情報から候補遺伝子を列挙し、その発現を調べる段階から、個々の遺伝子の生体における機能解析が課題となっている。そのためには、行動、電気生理学レベルの解析と知見が極めて重要になってくる。我々は、網羅的な電気生理学解析を行い、上記の成果を得た。これを元に受容体のリガンドの同定

に発展させることができる。

味細胞からの投射パターンを機能的に同定するため、様々なGal4系統を用いYellow-Cameleonを用いたカルシウムイメージングによって各味細胞からの投射パターン同定を試みる実験を行っていたが、先行する米国の研究者の論文が発表された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

候補遺伝子の中で、機能解析にまで進めることができた遺伝子はそれほど多くなかった。実際に重要な遺伝子は発現量が少ないため検出できなかった可能性があるものの、ゲノム情報に基づいた検索により新規の遺伝子の機能を同定することができた。味覚受容体遺伝子のようにまだその存在が推測されていなかった遺伝子は当初のGeneChipになかったので検出不能であった。味細胞は、感覚子によって応答性が異なるヘテロな集団であることがわかったことは新たな成果であるが、味細胞と受容体との関係を解明するには予想外の困難になった。

〈今後の課題〉

いまだに多くの味覚受容体候補遺伝子の機能がわかっていない。最近、我々の研究室で開発した電気生理学的手法を用いることにより味細胞レベルでの詳細な応答記録が可能になったので、未知の物質に対する応答の検索が今後の課題である。味覚トランスダクションの分子機構については、世界的にも研究が遅れており、今後に残された課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0303291705
Hayashi, S., Ito, K., Sado, S., Taniguchi, M., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M. & Goto, S. GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis* 34, 58-61 (2002).
- 0304251630
Hiroi, M., Marion-Poll, F. & Tanimura, T. Differentiated nerve response to sugars among labellar chemosensilla in *Drosophila*. *Zool. Sci.* 19, 1009-1018 (2002)
- 0404050924
Meunier, N., Marion-Poll, F., Rospars, J-P, and Tanimura, T., Peripheral coding of bitter taste in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 56, 139-152 (2003).
- 0404051113
Ishimoto, H., and Tanimura, T., Molecular neurophysiology of taste in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 10-18 (2004).
- Hiroi, M., Meunier, N., Marion-Poll, F., and Tanimura, T., Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 61, 333-342 (2004).
- Ishimoto, H., Takahashi, K., Ueda, R. and Tanimura, T. G

protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila*. *EMBO J.* 24, 3259-3265 (2005)

7.

Inoshita, T. and Tanimura, T. Cellular identification of water gustatory receptor neurons and their central projection pattern in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1094-1099 (2006)