公募研究: 2001~2003年度

ショウジョウバエ味覚器形成と機能分化に関する網羅的遺伝子解析

●中村 真

自然科学研究機構・基礎生物学研究所

〈研究の目的と進め方〉

外界からの刺激を感知する感覚受容器のひとつである 味覚受容器の特徴は、糖、苦味、塩、酸、アミノ酸、と いった各種刺激物質ごとに、独自のシグナル伝達メカニ ズムを持つことである。ショウジョウバエ成虫の味覚受 容器は、末梢感覚器官の一つとして、一層の上皮細胞組 織から誘導される。この上皮組織からの末梢神経細胞の 誕生、さらには神経細胞の運命決定までの過程は、神経 発生学のなかでも非常に研究が進んでおり、これまでに いくつもの重要な生命現象が明らかにされている。

ショウジョウバエの翅前縁部にある味覚受容器は、一本の感覚毛の基部に5種類の感覚神経細胞の細胞体が存在し、それぞれ特異的な機能を担っていると推測されてきた。本研究では、ショウジョウバエの味覚受容器に発現する遺伝子群を、GAL4/UAS-GFPを利用したエンハンサートラップ法により単離し、個々の味細胞を遺伝子発現により識別した上で、糖受容、塩受容などに関わる遺伝子群を網羅的に解析することを最終的な目標とした。なかでも、その前段階として、味覚研究を推進する上でもっとも基礎となる、「味覚受容細胞の完全識別」を達成することを第一段階の目標として掲げた。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 10,000系統のGAL4挿入系統のスクリーニングを行う
- 2) 味覚神経マーカーを利用した、味覚神経細胞の完全識別を実現する
- 3) 個々の変異体およびGAL4/UASを用いた機能解析を行う

〈研究期間の成果〉

1) エンハンサートラップスクリーニング

ショウジョウバエ翅、脚に存在する味覚器に特異的に 発現するエンハンサートラップ個体に注目して、約5.000 系統の新規P因子挿入個体の解析を終了した。5,000系統 中、約1割の個体が、翅もしくは脚の感覚神経組織にレ ポーターの発現を示した。最終的に、コンフォーカル顕 微鏡を用いて個々の神経細胞レベルでのスクリーニング を行い、味覚神経細胞中何個の神経細胞(または補助細 胞)での発現がみられるかを検討した。その結果、味覚 神経クラスター中で、1個の神経細胞でのみ発現が見られ るもの(10系統)、2個の神経細胞(13系統)、3個の神 経細胞(3系統)、4-5個の神経細胞(57系統)、付属細胞 で発現(27系統)、付属細胞と神経細胞で発現(12系統) がそれぞれ得られた。P因子の挿入箇所は上記の系統を 含む167系統に関してInverse-PCRによって検討した。そ の結果、129系統(77%)に関して挿入部位が判明した。こ れらがトラップしている遺伝子の機能別プロファイルを みると、細胞接着に関与すると思われるものが19%、転 写因子など遺伝子発現調節に関与するものが14%と比較 的高い割合で含まれていた。これに対して、神経機能 (12%) やシグナル伝達 (9%) に関与するものの割合は 予想に反してそれほど多くは含まれていなかった。

2) 味覚神経細胞の識別

翅前縁部に存在する味覚神経クラスターに関して、エンハンサートラップを用いた細胞識別を行った。実際には、スクリーニングした中から、5個の神経細胞クラスター中の1個で発現する系統10系統、2個で発現する系統13系統に注目して、発現解析を行った。これらのエンハンサートラップ系統に於けるレポーター遺伝子の発現は、遺伝子量に依存して変化し、GAL4もしくは、UAS-GFPの量を増やすことにより、当初考えていたよりも多数の神経細胞で発現していることが確認された。しかしながら、#15, #39, #47という少数の系統では、複数の神経細胞での発現は認められるものの、その発現レベルの差を利用して5種類の神経細胞を完全に識別することができた。

3) 単離した変異体の解析 (感覚神経特異的細胞接着因子DPRファミリー分子の解析)

今回のスクリーニングでも明らかとなったが、感覚神 経細胞には多様な膜タンパク質、受容体、接着因子が特 異的に発現しており、その発現プロファイルと機能分化 の関係は非常に興味深い。今後、これら遺伝子の味受容 細胞に於ける役割をひとつひとつ解析していくことが重 要である。現在、我々はdefective proboscis extension response (dpr)変異体にフォーカスして研究を進めてい る。dpr遺伝子は、Ig-domainを2個もつ膜タンパク質を コードしている。ショウジョウバエの味覚器を、グルコ ースなど糖溶液で刺激すると吻伸展反射を誘起すること ができる。吻伸展反射は溶液中に高濃度の塩を存在させ ると抑制されることから、塩に対する感受性の測定にも 利用することができる。dpr欠損変異体では、塩に対する 感受性が顕著に低下しており、高濃度の塩存在下でもシ ョ糖刺激に対して吻伸展応答を示す(論文1)。これらの 結果はDPRが塩受容プロセスのどこかで必須な役割を果 たしていることを示唆している。DPRタンパク質は、そ の構造上の特徴から、受容体もしくは接着因子として機 能していることが推測されている。DPRの機能をさらに 明らかにする目的で、抗DPR抗体を作製して、味覚神経 細胞に於ける局在を調べた。その結果、 DPRは味覚受 容部位に局在するのではなく、神経細胞表面に広く分布 していることが分かった。次に、DPRファミリータンパ ク質が接着因子として機能するかどうか調べる目的で、 培養細胞を用いた機能解析を行った。その結果、DPR-1, DPR-2. DPR-3は何れもホモフィリックな接着活性を持つ ことが明らかとなった。DPRタンパク質はおそらく、塩 受容細胞の神経ネットワーク形成に重要な役割を果たし ているものと考えられるが、今後さらに詳細な解析を続 ける必要がある。また、dpr変異体は、ショウジョウバエ の塩受容メカニズムを解析するうえでも、有用なツール

〈国内外での成果の位置づけ〉

となることが期待される。

味覚器関連でのエンハンサートラップスクリーニング という観点では、我々の成果は、国内外を通じて最も規 模の大きなスクリーニングである。これまでのスクリー ニングで明らかになった点、問題点を踏まえ、さらに改 良したスクリーニングによりこの分野の研究を推進させ たいと考えている。また、今回の研究を通じて発見した DPRタンパク質は、構造上類似のタンパク質がゲノム上 に20種類存在することを我々は初めて明らかにした。こ れらのIg-domainタンパク質はこれまでに解析されてきた Ig-domainタンパク質とは明らかに異なる構造上の特徴を 持っている。我々の研究に続いて、C. Vogel (MRC)らは DPR類似のIg-domainタンパクをゲノムデータから網羅的 に抽出し、ショウジョウバエと線虫での比較解析を行っ ている(Development 2003)。彼らは、DPRファミリー遺 伝子が、我々が報告した20種類を含めて、合計23種類存 在することを明らかにした。また、線虫に於いても多様 なDPRファミリー分子が存在することを明らかにした。 本研究は、DPRファミリー分子研究のきっかけを与えた ことになる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初予定していた、10、000系統のスクリーニングは達成できなかった。その一つの理由は、これ以上のスクリーニングを行ったとしても、おそらく味覚器に特異的なエンハンサートラップ系統は単離できないと判断したことにある。今回、単離、解析したエンハンサートラップ系統のほぼすべては、レポーターを味覚神経細胞以外でも発現させている。特に、全ての系統に於いて、レポーターの発現が中枢神経系でも確認された。また、味覚神経細胞クラスターに限って解析しても、レポーターの発現は遺伝子量に依存して変化した。これらの結果は、GAL4/UASを用いた細胞特異的除去実験が、現時点では難しいことを示した。

〈今後の課題〉

我々は、少数の神経細胞での特異的かつ安定なGAL4発現を実現する目的で、現在用いているエンハンサートラップベクターの改変を行っている。神経細胞での遺伝子発現制御の一つの機構として、転写後調節が重要な役割を担っていることが最近明らかとなっている。これらの機構には特異的なRNA結合タンパク質の関与が報告されている。我々は、GAL4エンハンサートラップベクターの3、領域に各種神経特異的遺伝子の3、-UTRを結合したベクターを開発中である。今後、それらのトランスジェニック系統を用いた発現解析を進める予定である。

もう一つの課題は、GAL4/UASを用いた細胞除去実験である。これまで、GAL4/UASによって、特定の細胞にrpr, hidなどの細胞死実行因子を発現させて、細胞除去を行う方法が試されている。しかしながら、これらの方法での細胞除去は、少なくとも我々が解析した結果、予想したよりも効率が悪く、細胞死までの時間も長期に渡る。我々は、カスペースの活性化以外の方法による効率的な細胞除去の方法を現在構築中である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1.0602101135

Nakamura, M., Baldwin, D., Hannaford, S., Palka, J., and Montell, C., Defective proboscis extension response (DPR), a member of the Ig superfamily required for the gustatory response to salt, J Neurosci22(9), 3463-3472 (2002)