

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700287

研究課題名（和文） 甘味の細胞内情報変換機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of transduction pathway in the sugar-sensitive gustatory receptor neurons

研究代表者

上野 耕平（KOHEI UENO）

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：40332556

研究成果の概要：

甘味は重要なエネルギー源である糖を受容する感覚である。この感覚の最初の入力、味受容細胞の興奮によって引き起こされる。当該研究は味覚研究の材料として有利なショウジョウバエを用いて、糖による味受容細胞の興奮を引き起こすための分子基盤を明らかにすることを目的とし、その結果 cAMP 合成酵素の 1 つが重要であることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 390,000 | 3,690,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ショウジョウバエ、甘味、cAMP、情報変換機構

1. 研究開始当初の背景

糖は動物の主たるエネルギー源であり、ヒトを含めた動物において、甘味を引き起こし摂食行動を誘発する。甘味受容の最初のステップは、味受容細胞の膜上に存在する甘味受容体と糖の結合である。申請者らによって、ショウジョウバエの甘味受容体は七回膜貫通型受容体であることが見出されている（Ueno et al., 2001）。これは、ほ乳類においても同様であり、進化的に甘味受容は保存された機構によって担われていると考えられる。七回膜貫通型受容体は、一般的に G タンパクと呼ばれる三量体タンパクと共役している。三量体のうち、 α サブユニットと呼ばれる分子が受容体によって活性化され、さら

に次の分子を活性化する。

申請者は、ショウジョウバエの甘味受容体は Gs とよばれる α サブユニットと共役することを見出している（Ueno et al., 2006）。Gs は cAMP と呼ばれる分子を ATP から合成する酵素、アデニルサイクラーゼ（以下 AC と略）を活性化することが知られており、甘味応答は cAMP が関与する経路が重要ではないかと考えられている。実際、ほ乳類では AC を活性化することで甘味に対する応答性が増大することが古くから知られているが、実際の AC 分子は同定されていない。一方、AC とは別に、イノシトールリン脂質の 1 つ、イノシトール 3 リン酸が甘味受容に関与するという報告も数多くなされている。

2. 研究の目的

当該研究では Gs によって活性化され、甘味応答に関与する AC 分子の同定を目指す。ショウジョウバエの全ゲノム配列中には 13 個の AC をコードする遺伝子が知られている。これらのうち、どの遺伝子が甘味受容細胞に発現しているのかを解析する。さらに、同定された AC 遺伝子を RNAi 法と酵母の遺伝子発現システム GAL4/UAS システムにより、甘味受容細胞特異的に目的 AC 遺伝子の発現を抑え、これにより甘味応答が変化するか否かを解析することで、甘味応答に関与する AC 遺伝子の同定を行う。最終的には標的 AC 遺伝子の null 変異体を作成し、甘味受容が AC によって生成される cAMP によって 100% 情報伝達されているのか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

甘味受容細胞特異的に発現している AC 遺伝子の同定には、甘味受容細胞のみを細胞死させた遺伝子組換え体と野生型の間で発現量が異なる AC 遺伝子を探索することにより行う。甘味受容体遺伝子の調節配列によって細胞死を引き起こす遺伝子、reaper を発現させることにより、甘味細胞のみを殺し、他の味受容細胞、例えば苦味や塩味受容細胞を残した遺伝子組換え体を作成できる。申請者は既にこのハエを作成している。遺伝子組換え体と野生型の味覚器から RNA を抽出し、定量 RT-PCR を行い、有意に発現量が低下している AC 遺伝子を見出す。

同定された AC 遺伝子が甘味受容において機能的か否かを解析するために、甘味受容細胞特異的に AC 遺伝子の発現を抑制する。ここで、そのための GAL4/UAS システムについて簡単に説明する。GAL4 遺伝子は酵母の遺伝子であるが、ショウジョウバエ細胞中においても機能する遺伝子転写調節因子である。このタンパクは UAS という酵母特異的な DNA 配列に結合し、その下流の遺伝子の転写を強制的に誘導する。UAS 配列はショウジョウバエが本来持っていない配列であるため、GAL4 タンパクの発現を調節することにより、空間的に目的遺伝子発現を誘導することができる。また、一般的に GAL4 配列と UAS 配列はそれぞれ別のハエに導入し、それらを交配した F1 において UAS 下流の RNA 発現を誘導することで、世代を超えた影響も除くことができる。申請者はすでに甘味受容体遺伝子の調節配列を用いて、甘味受容細胞特異的に GAL4 タンパクを作らせることができる遺伝子組換え体を準備している。これに目的 AC 遺伝子発現を抑制する二重鎖 RNA を UAS 配列の下流に持たせた DNA construct を作成し、ショウジョウバエ胚に

導入することで遺伝子組換え体を作成する。作成されたハエを、甘味受容細胞特異的に GAL4 タンパクを作ることの出来るハエと交配し、甘味応答を測定する。

AC 遺伝子の null 変異体の作成方法について説明する。ショウジョウバエはゲノムプロジェクトの一環として、全ゲノムの様々な部位に 1 コピーずつ P 因子と呼ばれるトランスポゾンが挿入された系統が膨大に保存されている。甘味受容細胞に発現している AC 遺伝子が同定された後は、その遺伝子のゲノム配列近傍に P 因子が挿入された系統を入手し、さらにその P 因子を遺伝学的に切り出す。この切り出しの際に、ある確率で近傍のゲノムが破壊されることが知られている。この現象を利用し、目的 AC 遺伝子本体が破壊されたハエを PCR 法により単離し、系統化する。得られたハエの甘味応答を測定する。

甘味応答の測定法について説明する。甘味受容細胞は、ハエを含めた昆虫の場合、感覚毛と呼ばれる毛の中に収納されている。毛の先端には穴が空いており、ここから味物質が流入するのであるが、同時ここから細胞外誘導的に細胞の電位変化を記録することができる。すなわち、微量の電解質を混入させた糖溶液をガラス管に詰め、ガラス管を電気生理学的解析用の amplifier に接続する。溶液を毛の先端に触れさせることで、糖刺激によって興奮した甘味受容細胞の応答性が電位変化によって測定することができる。これを Tip-recording 法と呼ぶ。当該研究では主にこの手法により味受容細胞の応答性を測定する。

4. 研究成果

1) 甘味受容細胞に発現する AC 遺伝子の同定

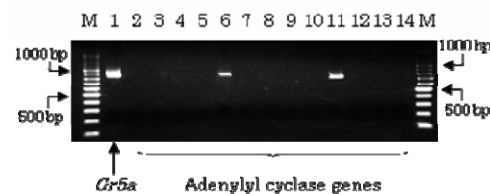


図1 味受容器から抽出した mRNA による 13 個の AC 遺伝子 (レーン 2 から 14) の RT-PCR

図1の結果より、味受容器には2つの AC 遺伝子が発現していることが明らかとなった。これらの2つの遺伝子の発現量を、甘味受容細胞が細胞死を引き起こしている遺伝子組換え体と野生型において定量 RT-PCR により比較したところ、1つの遺伝子、AC78C の発現量が有意に低下していた。このことから、AC78C 遺伝子のコードする AC タンパクが甘味受容に関与していることが示唆された。

2) AC78C の発現抑制実験

前述した RNAi 法と GAL4/UAS システムにより、甘味受容細胞特異的に AC78C 遺伝子の発現を抑制したハエと、その親系統の糖、スクロースに対する味応答性の比較を行った。

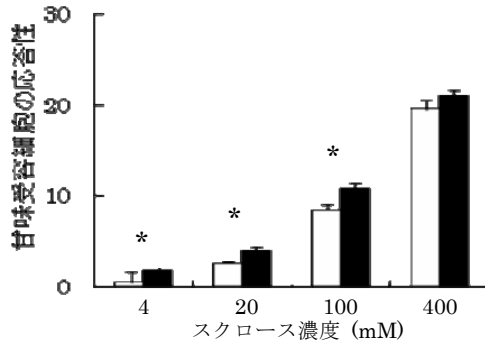


図2 各種スクロースに対する AC78C 遺伝子の発現を抑制された遺伝子組換え体 (□) と親系統 (■) の応答性。4, 20 および 100 mM において有意な低下が認められた。

その結果、図 2 より RNAi 法により AC78C 遺伝子の発現を抑制された遺伝子組換え体における甘味受容細胞の応答性は、特に低濃度域において障害されていることが明らかとなった。

3) AC78C の変異体作成とその変異体における甘味応答性。

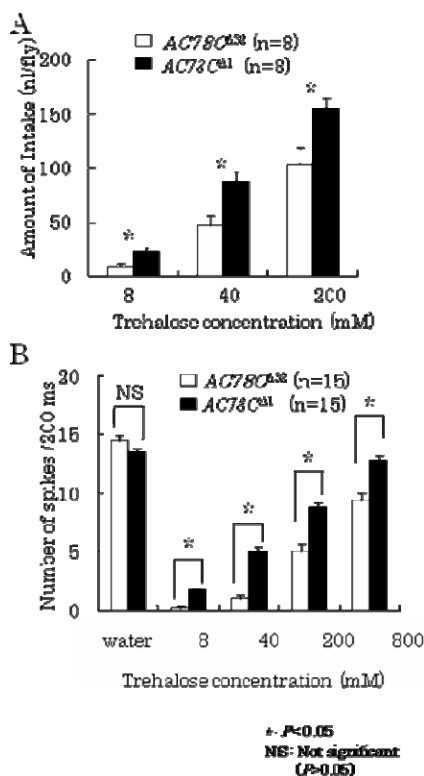


図3 AC78C 変異体の糖応答性。(A) 変異体 (□) と

野生型 (■) のトレハロースに対する摂食量変化。縦軸は1匹あたりのハエが摂取した糖溶液の量を示している。

(B) 同様に変異体 (□) と野生型 (■) の各種トレハロースに対する甘味受容細胞の応答性比較。縦軸は刺激開始から 200ms における甘味受容細胞の活動電位発生頻度を示す。なお、water と書かれているバーはそれぞれの系統における水受容細胞の水に対する応答性を示しており、internal control である。

AC78C 遺伝子の 5' から少し離れた領域に P 因子が挿入されている系統を入手した。遺伝学的な手法により、P 因子を除去した結果、50 系統の中から 1 系統が AC78C 遺伝子の第 1 エキソンが失われていることが明らかとなった。このハエと野生型のハエのスクロースに対する応答性を測定した。その結果、RNAi 法による AC78C 遺伝子抑制の実験結果と同様の結果を得た。

申請者らのこれまでの研究からスクロースとトレハロースは異なる受容体によって受容されていることが明らかとなっている。AC78C はスクロースのみならずトレハロースにおいても関与しているのか否かを明らかにすべく、トレハロースに対する応答性を行動実験 (摂食量比較) と電気生理学的な甘味受容細胞の応答性により比較した (図 3)。その結果、行動実験においても、電気生理学的な手法においても広い濃度域で AC78C の null 変異体の応答性は抑制が見られた。しかし、応答性が完全に消失することはなかった。このことは cAMP 以外の経路も関与することを示唆している。以上の結果から、ショウジョウバエの甘味は、特に低い濃度においては cAMP を介した情報変換機構が、高濃度においては様々な情報変換機構を組み合わせることにより細胞を興奮させていることが示唆された。cAMP などの小分子による情報変換機構は反応性は遅いものの、情報を大きく増幅することができる。ヒトには感じることでできない非常に低濃度の糖 (数 mM レベル) を感知するためにこのような情報変換機構をハエは採用しているのかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kohei Ueno & Yoshiaki Kidokoro "Adenylyl cyclase encoded by AC78C participates in sugar perception in *Drosophila melanogaster*" European Journal of Neuroscience, vol.28 1956-1966 (2008) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kohei Ueno, Yoshiaki Kidokoro
“Identification of the adenylyl cyclase
that mediates sugar perception in
Drosophila” 48th Annual Drosophila
Research Conference 2007 年 3 月
Philadelphia, USA
- ② 上野耕平 城所良明 「アデニリルサイ
クラーゼAC78Cの甘味受容における関
与」第30回日本神経科学大会 2007年
9月 横浜
- ③ 上野耕平 「ショウジョウバエの甘味受
容情報伝達機構」成茂記念動物科学シン
ポジウム 第78回日本動物学会大会
2007年9月 弘前

[図書] (計 1 件)

上野耕平「味を感じる分子メカニズム」(2008)
NTS 出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 耕平 (KOHEI UENO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科
学総合研究所・研究員

研究者番号：40332556

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者