

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05369・20K20378

研究課題名(和文)匂い感覚能の個性を生み出す分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism underlying the olfactory individuality

研究代表者

千原 崇裕 (Chihara, Takahiro)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授

研究者番号：00431891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：同じ動物種内であっても個体ごとに嗅覚の敏感さに違いがあることが知られている。本研究では、個体ごとの嗅覚感度を規定するメカニズムを明らかにすることを目指した。ショウジョウバエの行動実験・遺伝子発現解析を行った結果、飢餓レベルによって変動する「sNPFR(sNPF神経ペプチドの受容体)遺伝子」が個体ごとに変動し、嗅覚感度を調節していることを見出した。この事実は、同じ遺伝的背景を持っていても、個体ごとの僅かな飢餓レベル(いつ、どれくらいの量の食餌をとったか)によって、嗅覚感度が大きく変動することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は味覚、嗅覚、満腹レベルがそれぞれ関連しあっていることを経験的に知っている。今回、本研究では、僅かな飢餓レベルによって嗅覚感度が変化することを明らかにした。これに関わる分子として、sNPFRという神経ペプチド受容体の関わりも見出している。今回のショウジョウバエにおける知見は、我々ヒトを含めた哺乳類でも同様の仕組みで「飢餓レベルと嗅覚感度」の間の調節が行われている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：It is known that there are differences in olfactory sensitivity among individuals even within the same animal species. In this study, we aimed to clarify the mechanism that regulates the olfactory sensitivity of each individual. As a result of behavioral experiments and gene expression analysis of *Drosophila*, it was found that the "sNPFR (sNPF neuropeptide receptor) gene" that fluctuates depending on the starvation level fluctuates in each individual and regulates the olfactory sensitivity. This fact suggests that even with the same genetic background, olfactory sensitivity fluctuates greatly depending on the slight starvation level (when and how much food was eaten) in each individual.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅覚 神経 ショウジョウバエ 個性

1. 研究開始当初の背景

人類の匂いに対する興味は尽きない。我々の周りは匂いに溢れており、常に何かしらの匂い刺激に曝されていると言っても過言ではない。そしてその匂いは我々の身体に大きな影響を及ぼす。匂いだけで食欲、性欲など生理現象をコントロールすることも可能である。動物ごとに異なる嗅覚能力をもつことに加えて、同じ動物種内であっても個体ごとに嗅覚の感受性(質と強度)の違いがあることも知られている。では、この嗅覚の感受性はどのように規定されるのだろうか。これまで匂い物質の質的情報については、嗅覚受容体の種類によって規定されることが知られている。そして、最終的に生物が匂いを認知するためには嗅覚受容体の種類だけではなく、ニューロンの数、神経突起の接続精度、シナプス強度などが複合的に影響すると予想される。しかし、嗅覚感受性の規定におけるこれら要因の関与や連携に関しては殆ど理解が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は「ショウジョウバエの嗅覚系神経回路の発生遺伝学的研究」を行ってきた。この研究過程で研究代表者は、嗅覚神経回路を構成するニューロン数や突起形態が一定の範囲で分散している(バラツキがある)ことを見出ししていた。このような独自の知見に基づき、研究代表者は「嗅覚神経回路の構造的・遺伝子発現のバラツキ」が嗅覚感受性の違い(個性)に反映されるのではないかと、との仮説を立てるに至った。本研究ではこの仮説を検証することにより、嗅覚の感受性はどのように規定されるのか、その分子・細胞・遺伝学的基盤を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、分子・細胞・個体レベルの解析が可能なショウジョウバエ嗅覚系神経回路を活用する。ショウジョウバエの遺伝学的手法を用いることで、脳内の任意のニューロン同士のシナプス接続を可視化することが可能である。また、多個体を用いた行動実験も可能であるため、ショウジョウバエを用いることで、分子から個体レベルまでの解析を体系的に行い統合することが可能である。

(1) 嗅嗜好性試験を用いた嗅覚感受性の高い(もしくは低い)ショウジョウバエ系統の選抜

嗅嗜好性試験(ハエが匂い物質を選択する行動)を用いて同一世代・同一遺伝子型のショウジョウバエ集団の中から嗅覚感受性の高い集団と低い集団を選別する。また、それらの集団のみを用いて交配を繰り返すことで、嗅覚感受性の高い系統と低い系統を樹立する。

(2) 匂い感受性の異なる個体の身体検査

嗅覚感受性の高い集団(系統)と低い集団(系統)における遺伝子(特に嗅覚受容体遺伝子)発現状態、嗅覚受容体ニューロン数、シナプスの数と強度、神経突起分枝パターンなどを解析する。ショウジョウバエの嗅覚神経回路では、高度な遺伝学的手法を活用することで脳内一細胞レベルの解像度でこれらの情報を解析することが可能である。

(3) 定量結果の解析と検証

「ニューロン形態、シナプス強度、個体ごとの匂い応答行動」に関するデータを解析する。ここで得られた解析結果は、即座に生体内で検証を行う。ショウジョウバエでは特定のニューロンの数、シナプス伝達効率、ニューロン興奮程度を遺伝学的に操作することが可能であり、時期・組織特異的に遺伝子発現を制御することも可能である。このような遺伝学的手法を用いて、匂い感受性の個性を生み出す分子基盤を明らかにする。

(4) 今後の個体差研究のための遺伝子発現解析ツールの開発

上記(1), (2), (3)に記した生物の個体差に関する研究を、より簡便に行うための遺伝学的ツールを開発する。本項目では、赤色発光システムである Akaluc/Akalumine システムを活用した非侵襲的な遺伝子発現モニタリングシステムを開発する。

4. 研究成果

嗅嗜好性試験を繰り返すことにより、同じ系統(遺伝学的背景が同じ系統)から、「嗅覚感度の高い集団」と「嗅覚感度の低い集団」を安定的に選別する手法を見出した。具体的には、嗅嗜好性試験、特にビーカー等を用いた「field trap assay」とT-Mazeを用いた「Two-choice assay」を導入し、安定な結果を得るための条件を検討した。実験時間(朝、夕、夜など)、温度、湿度、明暗など、様々な実験条件を検討した結果、ビーカー等を用いた「field trap assay」を「嗅覚感度を測定する方法」として採用し、以下の実験を進めることとした。同時に、少数個体、可能であれば一匹のショウジョウバエにおける遺伝子発現を厳密に解析するための手法の確立を行った。定量PCRなどを用いて、どの程度の微量RNAで再現性の良いデータを得られるか、様々な手法、条件を用いて検討した。その結果、ショウジョウバエ一匹の頭部からのRNAのみで、定量PCRやRNA-seqに用いることのできるmRNAを安定的に抽出することが可能になった。

「嗅覚感度の高い集団」と「嗅覚感度の低い集団」における嗅覚受容体細胞数および関係する嗅覚受容体遺伝子発現量を比較した。その結果、「嗅覚感度の高い集団」と「嗅覚感度の低い集団」の間に違いは検出されなかった。「嗅覚感度の高い集団」と「嗅覚感度の低い集団」の間における遺伝子発現量を解析した結果、sNPFR(sNPFR神経ペプチドの受容体)遺伝子の発現量が顕著に異なることを見出した。sNPFRは個体の飢餓レベルによって変動する遺伝子として知られている。この事実から、「嗅覚感度の高い集団」と「嗅覚感度の低い集団」の差は、飢餓レベルの差から生じている可能性が考えられた。この仮説を検証するために、「嗅覚感度の高い集団」と「嗅覚感度の低い集団」の間での飢餓ストレス耐性を検証した。その結果、「嗅覚感度の高い集団」が早期に死滅する、すなわち「嗅覚感度の高い集団」では飢餓レベルが高いことが明らかになった。これらの事実は、同じ遺伝的背景を持っていても、個体ごとの僅かな飢餓レベル(いつ、どれくらいの量の食餌をとったか)によって、嗅覚感度が大きく変動することを示唆している。現在、上記研究内容に関して国際科学雑誌へ論文を投稿中である。

生物の個体差研究では、実験操作の煩雑さ、実験データのバラツキ・不安定性などの問題がある。例えば、表現型の個体差は、個体ごとに異なる遺伝学的背景(SNPなど)や栄養状態などに大きく影響される。今後、ショウジョウバエ個体ごとの解析を行うためには、各個体を殺さずに簡単に、しかも経時的に個体ごとの生理状態(特に遺伝子発現レベル)を検出することが重要である。よって、簡便かつ非侵襲的にショウジョウバエの遺伝子発現レベルを調べる系統としてAkaluc発現系統を作製した。AkalucとはAkalumineを基質として赤色発光する酵素で、Luciferase/Luciferinの緑色発光に比べて、輝度、組織透過性、共に高いのが特徴である。まず、AkalucおよびAkalucの基質であるAkalumineはショウジョウバエの発生に影響を与えないことを確認した。次に、個体ごとのオートファジーレベルや免疫活性化レベルを知る目的で、Atg8a遺伝子、IBIN遺伝子(細菌感染で大きく発現上昇する非コード長鎖RNA)、それぞれのプロモーター領域にAkaluc遺伝子を繋いだトランスジェニック系統を作出した。その結果、Atg8a-Akaluc系統は、ショウジョウバエの老化に伴ってAkaluc発光が減少すること、更にはIBIN-Akaluc系統は細菌感染に伴い大きく発光が上昇することを確認した。更に様々な遺伝子プロモーターを利用することで、Akaluc発現ショウジョウバエ系統の有用性を示すことに成功した。今後、Akaluc発現系統を用いることで、嗅覚感度に加えて、寿命や感染脆弱性など、様々な生理現象の「個体差」を規定する因子の探索を行っていく予定である。現在、Akaluc発現系統に関して国際科学雑誌へ論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinoda Natsuki, Hanawa Nozomi, Chihara Takahiro, Koto Akiko, Miura Masayuki	4. 巻 116
2. 論文標題 Dronc-independent basal executioner caspase activity sustains Drosophila imaginal tissue growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20539 ~ 20544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1904647116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Toshiya, Sekine Sayaka, Inagaki Sachi, Misaki Kazuyo, Badel Laurent, Moriya Hiroyuki, Sami Mustafa M., Itakura Yuki, Chihara Takahiro, Kazama Hokto, Yonemura Shigenobu, Hayashi Shigeo	4. 巻 29
2. 論文標題 Nanopore Formation in the Cuticle of an Insect Olfactory Sensillum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1512 ~ 1520.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.03.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千原崇裕
2. 発表標題 個体生理状態がショウジョウバエ嗅覚ニューロンの感度や細胞死を規定する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------