

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592376

研究課題名（和文）細胞接着分子による味覚の神経回路形成と摂食行動様式の制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of gustatory circuit and feeding behavior by the neural Ig receptors

研究代表者

近藤 真啓（KONDO MASAHIRO）

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50312294

研究成果の概要（和文）：

*Dscam* は選択的スプライシングにより 38,000 種類を超える異なった神経受容体を生じうる。味細胞で特異的に *Dscam* 発現を抑制すると味覚回路におけるシナプス形成が障害され、一部の個体で摂食量の減少または苦味物質忌避性の低下がみられた。一方、分子多様性を約 40% 減少させた変異体では摂食行動に異常は認められなかった。これらの結果から、*Dscam* は味覚回路形成と摂食行動制御に必要なであるが、最低 22,000 種類の多様性があればよいことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

*Dscam*, which encodes a neural Ig receptor, can generate more than 38,000 isoforms via alternative splicing. *Dscam* knock-down in taste cells induced loss of synapses between taste cells and secondary neurons. These flies showed reduced appetite or a decreased behavioral avoidance to bitter compounds. In contrast, the revertant flies with 22,000 isoforms showed indistinguishable feeding behavior with wildtype. Our results suggest that *Dscam* is essential for synapse formation in gustatory circuits and for the feeding behavior, but the full set of *Dscam* isoforms may not be required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔機能学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：神経回路形成，味嗜好性，細胞接着分子

## 1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエは、多くの哺乳動物と

同様に甘味物質を嗜好し、苦味物質を忌避する行動様式を示す。本研究の開始当時、

1) 甘味および苦味受容体は異なる味細胞で独立に発現していること, 2) 甘味または苦味物質による味覚刺激は脳の異なる領域を活性化させること, 3) 味細胞へ外来性化学受容体を発現させたトランスジェニック動物にそのリガンドを与えると, 甘味受容細胞へ受容体を発現させた場合は摂食するのに対して, 苦味受容細胞へ発現させた場合は忌避することが報告されていた。これらの事実から, 甘味および苦味刺激により誘導される相反性の行動様式は, 各味細胞と中枢との間に形成される特異的な神経回路に依存することが推察されたが, その責任分子は不明であった。

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子をコードするショウジョウバエ *Dscam* は, 4つの可変エキソン部がそれぞれ選択的スプライシングを受けることにより, 単一遺伝子から 38,000 種類を超える異なった受容体 isoform を生じうる。我々は, 1) 機械感覚受容神経細胞で特異的に *Dscam* を欠失させると重篤な軸索伸長異常が生じること, 2) その *Dscam* 欠失神経細胞に一種類の *Dscam* isoform を発現させただけでは適切な軸索投射が再現できないこと, 3) *Dscam* の持つ多様性を異なる組み合わせで野生型の約 60%にまで減少させた 2 系統の復帰突然変異体では, 各々異なるパターンの軸索投射異常を示すことを明らかにし (Chen et al., 2006), *Dscam* の発現とその分子多様性が味覚神経回路の適切な軸索投射パターンの決定と摂食行動にも寄与するのではないかと考え, 本研究を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

*Dscam* が, 甘味および苦味特異的な神経回路の形成 (軸索伸長, 軸索投射パターン,

シナプス形成) および摂食行動 (各味質の嗜好性と摂食量) に関与するか否か, isoform の発現量, 多様性, 特異性に注目して, 解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変動物の準備:

通法 (Gal4/UAS system, imprecise P-element excision) により, 以下の 3 種類の遺伝子改変動物を作製し, 解析に用いた。

- ① 各味細胞で特異的に *Dscam* の発現をノックダウンさせたトランスジェニック動物
- ② 可変エキソンの一部をゲノム上から欠失させ, 発現可能な *Dscam* isoform の数を減少させた復帰突然変異体
- ③ 各味細胞で特定の *Dscam* isoform を過剰発現させたトランスジェニック動物

### (2) 形態学的解析 (味覚回路の可視化):

甘味または苦味受容細胞で特異的に機能する 2 種類の Gal4 ドライバー (Gr5a-Gal4, Gr66a-Gal4) により CD8:GFP または syb:GFP の発現を生体内で誘導し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて味情報を伝える神経細胞の軸索投射様式およびシナプス局在を解析した。

### (3) 行動解析 (二味質弁別試験):

各味質に対する摂食行動を明らかにするため, スクロース (甘味) およびスクロース + カフェインまたはキニーネ (甘味・苦味の混合) 水溶液の希釈系列を異なる色素で着色して準備し, そこへ 24 時間絶食させたハエを放ち 1 時間摂食させたのち, 腹部の着色状況を指標に摂食量および味質嗜好性を判定した。

## 4. 研究成果

- (1) 野生型ハエにおいて, 甘味および苦味

受容細胞はいずれも食道下神経節へ直接軸索を投射していたが、神経節内の異なる部位に終止(シナプスを形成)していた(図 A, B)。

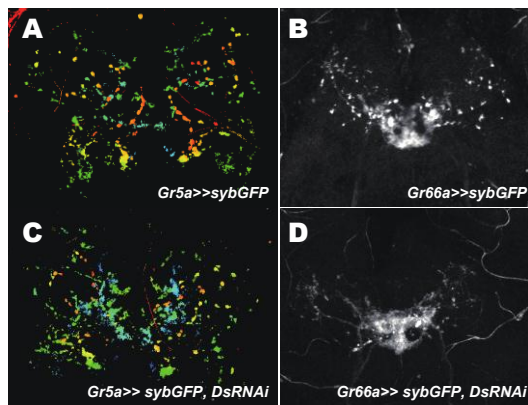


図: 食道下神経節内における甘味および苦味受容細胞の軸索終末の分布様式

(2) 野生型ハエはスクロースに対して強い嗜好性を示し、濃度が 1mM 以上であれば水と弁別できた。一方、苦味物質に対する忌避性の閾値は、キニーネで約 0.1mM、カフェインで約 5mM であり、0.2mM キニーネと 5.5mM カフェインは同程度の忌避性を示した。

(3) 甘味または苦味受容細胞で特異的に Dscam の発現を抑制したトランスジェニック動物において、各味受容細胞は野生型と同様、食道下神経節へと軸索を伸長したが、適切な部位(背腹方向)への投射(シナプス形成)は阻害された(図 C, D)。また、甘味受容細胞で特異的に Dscam の発現を減少させたトランスジェニック動物では、野生型と比較して味嗜好性に有意な変化は認められなかったが、摂食量が減少する傾向を示した。一方、苦味受容細胞で特異的に Dscam の発現を減少させると苦味物質に対する忌避性が低下したが、その程度は用いた Gal4 系統により異なった。また、対照実験として高濃度の塩化ナトリウムに対する忌避性について解析したところ、いずれの系統も塩味に対する忌避性が低下していた。以上の結果は、味受容細胞における Dscam の発現が摂食誘導および苦味物質に対する忌避性に関与していることを示すと

同時に、苦味受容細胞が塩味に対する忌避性にも関与している可能性を示唆している。

(4) Dscam の可変エクソン 4 の一部を欠失させた 2 系統の復帰突然変異体において、甘味物質の摂食量、苦味物質に対する忌避性のいずれも、野生型と有意な差は認められなかった。この結果は、38,000 種類を超える isoform の存在が推定される Dscam において、少なくとも 22,000 種類以上の多様性を維持していれば、生得的な摂食行動には問題がないことを示している。

(5) 味受容細胞に特定の Dscam isoform を異所性に発現させた変異体では、食道下神経節内におけるシナプスの数および局在に多様性が生じた。また、この変異体は、野生型と比べて摂食量が減少する傾向にあった。異所性に発現させる isoform の種類と摂食行動との関連については、現在検討中である。

## 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 4 件)

- ① Nakajima A, Tsuboi Y, Suzuki I, Honda K, Shinoda M, Kondo M, Matsuura S, Shibuta K, Yasuda M, Shimizu N, Iwata K. PKCgamma in Vc and C1/C2 is involved in trigeminal neuropathic pain. *J Dent Res.* 2011; 90:777-781. 査読 有
- ② Miyamoto M, Tsuboi Y, Takamiya K, Haganir RL, Kondo M, Shinoda M, Oi Y, Iwata K. Involvement of GluR2 and GluR3 subunit C-termini in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1-C2 neurons in trigeminal neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 2011; 491:8-12. 査読 有

- ③ Iwata K, Miyachi S, Imanishi M, Tsuboi Y, Kitagawa J, Teramoto K, Hitomi S, Shinoda M, Kondo M, Takada M. Ascending multisynaptic pathways from the trigeminal ganglion to the anterior cingulate cortex. *Exp Neurol*. 2011; 227:69-78. 査読 有
- ④ Kondo M, Iwata K. Regulation of complex brain wiring via diverse Ig receptor arising from a single gene. *J Oral Biosci*. 2010; 52: 378-387. 査読 有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Yasuda M, Shirakawa T, Iwata K, Kondo M. Characterization of individual mechanosensory neurons based on their axonal structures in *Drosophila*, 41<sup>th</sup> Society for Neuroscience Meeting, Nov 12, 2011, Washington DC (USA)
- ② Kondo M, Yasuda Y, Shirakawa T, Iwata K. Identification of individual *Drosophila* sensory neurons based on the structural properties of axon、第 34 回日本神経科学大会、2011年9月16日、パシフィコ横浜、神奈川県
- ③ 近藤真啓、神経回路形成分子における摂食行動の制御機構、第 4 回 三叉神経研究会、2010 年 11 月 28 日、不死王閣、大阪
- ④ 近藤真啓、岩田幸一、免疫グロブリンスーパーファミリー受容体による味覚回路と摂食行動の制御、第 51 回日本歯科基礎医学会サテライトシンポジウム、2009 年 9 月 9 日、朱鷺メッセ、新潟

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 真啓 (KONDO MASAHIRO)  
日本大学・歯学部・講師  
研究者番号：5 0 3 1 2 2 9 4

### (2) 研究分担者

鈴木 郁子 (SUZUKI IKUKO)  
日本大学・歯学部・助手  
研究者番号：6 0 4 5 9 9 0 6

### (3) 連携研究者

なし