

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570065

研究課題名（和文） 摂食行動を解発・制御する甘味ニューロンの機能解析

研究課題名（英文） Functional Study of gustatory sugar sensitive neurons that initiate and control feeding behavior.

研究代表者：磯野 邦夫（ISONO KUNIO）

東北大学・大学院情報科学研究科・准教授

研究者番号：70124550

研究成果の概要：

ショウジョウバエの新規甘味ニューロンとそこに発現する新規甘味受容体を発見した。このニューロンはこれまで知られているタイプの味覚器と異なる味覚器に分布し、電気生理学的な応答特性においても、また糖に対するリガンド特性においても異なり、さらにこれまでの甘味ニューロンとは別の中枢投射特性を示した。このニューロンを選択的に不活化すると摂食における甘味嗜好性に顕著な変化が現れた。つまりショウジョウバエ味覚システムにおいては受容体、ニューロン、行動のどのレベルにおいても区別できる少なくとも2種類の別個の味質があるという予想外の事実が明らかにされた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：味覚・感覚受容体・ショウジョウバエ・甘味・糖・摂食・軸索投射・行動制御

1. 研究開始当初の背景

今世紀に入りほ乳動物ではGタンパク質共役型の甘味、うま味、苦味受容体と細胞内情報伝達の分子機構が相次いで同定された。しかし味覚の神経機構と、脳における認知機構の全貌はまだ本質的な部分が未解明のま

まほぼ10年間が経過しようとしている。味覚研究の進展を妨げている要因として、ほ乳動物では、嗅覚系とは異なり味細胞と味覚神経との間で複雑なシナプスを介するために、味覚情報の伝達と処理の過程が容易に解析できないことが挙げられている。この点では昆虫など無脊椎動物の味覚系は嗅覚系と同

様に、味細胞は感覚ニューロンとして中枢に直接投射するので、大きな利点と考えられる。その上ショウジョウバエでは、多様に進化した味受容体ファミリーの60個の遺伝子がゲノム上で同定されている。これらの受容体は嗅覚受容体の分化する以前に存在した祖先型の化学受容体であり、動物の化学感覚の起源を知る上でも重要な発見である。その中でショウジョウバエの甘味受容体遺伝子 Tre は申請者が80年代に発見した動物で最初の甘味受容体遺伝子であり、ハエゲノム上では Gr5a と命名される遺伝子と同一であることを2001年に申請者が報告して以来、甘味受容体の研究は味覚受容体研究の中で最も大きな中心テーマとなっている。Tre (Gr5a)には相同遺伝子が他に7種類知られ、これらの一部は別の甘味受容体として機能することが知られていた。

2. 研究の目的

本研究は味覚の中で、摂食行動の制御にとって最も重要な入力となる甘味についての新しい知見を得ることを目的とし、これまでに機能的に同定することができなかった相同遺伝子の1つに注目して、これが新しい甘味受容体をコードする遺伝子であるかどうかを検討する。またこの受容体を発現する味ニューロンが、Gr5aニューロンの情報とは独立に別個の甘味情報を担うのかどうかを検討する。多数の研究者により分子機能、細胞機能が解析されてきた Tre についての研究成果と知見をもとに、まずこの甘味受容体候補がどのような分子機能、細胞特性を担うのか、また摂食行動においてどのような機能的役割を担うのかを明らかにすることを旨とし、以下4つを目標とした。

- (1) 甘味ニューロンにおける発現特性、他の甘味受容体との共発現特性を明らかにする。
- (2) 食道下神経節と胸部神経節にある味覚一次中枢における投射特性と、他の味ニューロンの投射特性との比較を行う。
- (3) 甘味受容体のリガンド特性を明らかにする。
- (4) 甘味ニューロンのタイプの違いと摂食や行動制御における機能の違いを解析する。

3. 研究の方法

(1) 甘味受容体の味ニューロンにおける発現特性、受容体間の共発現特性に基づく甘

味受容体と甘味ニューロンの分類: Gr5a とその相同遺伝子については受容体上流域の1-2KbをGal4ベクターにクローニングし、それをP因子ベクターに組み込んだ Gr-promotor-Gal4 コンストラクトを初期胚に注入して導入した組換え体を作成する。Gr64a-fの6個の遺伝子については隣接してプロモーター領域が特定できないので、代わりに各受容体遺伝子の翻訳領域に Gal4 遺伝子配列を置き換えたものを6種類用意する。

次にまずこれら各々の組換え体と Gal4 により蛍光標識されるマーカー UAS-GFP をもつ別の組換え体システムとを交配し、F1 ないしそれ以降の世代で両コンストラクトを同時にもつ個体を用いて、各受容体プロモータにより標識される味ニューロンを確認する。甘味受容体間に発現特性の顕著な違いがあるかどうか、また味ニューロンにより共発現する別の甘味受容体があるのかどうかを確認する。こうして8種類のすべての甘味受容体について発現プロファイルを作成し、特性に従って受容体を分類する。

次にその中で各受容体が少数だけ特異的に発現する味ニューロンと、すべてないし多数の受容体が発現する味細胞とを分類し、それらの特徴を比較する。

受容体の中には、幼虫の頭部や、各体節などに分布する特殊な味ニューロンに発現するものがある。これらの一部は小型で味覚器としての明瞭な特徴を欠いているため見逃されていた新しいタイプの味覚器と、その味ニューロンであると考えられる。これらの味ニューロンの機能については不明なので、課題(4)において解析を行う。

一部の受容体は成虫の嗅ニューロンに発現する。嗅覚系は探索のために進化した化学感覚であり、味情報がこの神経系でどのように処理され、行動の制御に利用されるのかを課題(4)で同様に解析する。嗅覚系と味覚系の新しい相互作用として注目される。

(2) 食道下神経節と胸部神経節にある味覚一次中枢における各甘味ニューロン間の投射部位特性の比較、苦味ニューロンなど非甘味ニューロン間との投射部位の比較: 頭部に分布する味細胞からのびる軸索は味覚の一次中枢である食道下神経節内に終末部をもつ。課題(1)で各カテゴリーに分類された甘味ニューロンにシナプス末端標識マーカーを発現させた形質転換体を(1)と同様の方法で作成し、味ニューロンの軸索末端の投射領域を詳しく解析する。味ニューロンのうちあるものは食道下神経節の限られた領域に投射すること、投射領域は単一ではないことがすでにわかっている。他の間甘味ニューロンでは胸部神経節に終わるものと、終わらないで軸索をさらに伸ばして、脳に投射する

ものも存在する。これらの投射領域の一部が受容体間で共通するのかどうかを詳しく解析する。単一味ニューロンの投射を解析する場合には、味ニューロンの分化する蛹の時期にあわせて、体細胞組み換えを一部のニューロンに引き起こし、標識される少数の甘味ニューロンについて同様の観察を行う。以上の解析はショウジョウバエにおいて、甘味情報が一次中枢のレベルにおいてどのように統合され、あるいは独立に処理されるのかを知るために初めておこなわれる新しい解析である。

(3) 各甘味受容体のリガンド特性：次の課題では甘味受容体とその受容体が発現する甘味ニューロンについての機能的な解析を行う。**Gr5a (Tre)** については、私たちが作成した受容体遺伝子のノックアウトシステムを使い、二糖類トレハロースに特異性の高い受容体であることが確かめられている。しかし、他の受容体については糖リガンド特性は不明である。そこで個々の受容体遺伝子に特異的な転写領域の一部を使い、**UAS-RNAi** コンストラクトを作成して初期胚に導入した形質転換体を作成する。これらを各受容体遺伝子の **promotor-Gal4** 形質転換体と交配により組み合わせ、いくつかの受容体の共発現する味ニューロンのなかで、特定の受容体だけをノックアウトしたショウジョウバエを作成する。味ニューロンの応答の解析には成虫口器の大型の味覚毛を用いる。摂食行動の解析は2糖選択嗜好性実験と各糖についての摂取量測定実験により行う。ショウジョウバエの甘味情報は糖リガンド特性の異なる多数の受容体とともに複数の甘味入力に関与することがこれらの実験により証明される。甘味受容体と甘味細胞が1種類しか存在しない哺乳類との間で味情報の処理機構についての比較考察がはじめて可能となる。

(4) 甘味ニューロン間での摂食の解発と制御における機能の分化：各味ニューロンがどのような味覚情報を担い、どのような機能をもつのかを知るには特定の味ニューロンそのものの機能を選択的に阻害した個体の行動を解析することが有効である。各甘味受容体は体表に分布する甘味ニューロンの発現特異性が異なることを利用して、目標(1)で作成した各受容体遺伝子の発現する味ニューロンにシナプス伝達阻害や細胞死をもたらす外来遺伝子を発現させ、特定の味ニューロンの機能だけを選択的に失った個体を作成する。更に目標(2)で作成した体細胞組換え個体によりその中でさらに少数の甘味ニューロンのみを阻害したモザイク個体を作成して同様の解析を行う。組換えを誘導する時期と長さを調節することで機能する味ニュー

ロンの割合を制御できる。この実験は単一ないし少数の味ニューロンからの甘味入力が個体の摂食行動を制御する仕組みが初めて解析できる系として重要である。同一甘味受容体が発現するが、異なる味覚器に分布する味ニューロン間、異なる甘味受容体が発現する味ニューロン間などで、電気生理学的に得られる応答特性と、吻進展反射や摂食における糖嗜好性、摂食量、その他の行動学的な特性との比較を行い、これらの味情報が行動の制御入力としてどのように協調して機能するのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 新規甘味ニューロンの発見：**Tre(Gr5a)** と相同性のある甘味受容体候補の1つは、脚の先端部にあるふ節に分布し、この受容体を発現する味ニューロンには **Tre** が共発現する味ニューロンと、**Tre** を発現しないものの2種類があることを発見した。これら2種の味ニューロンはそれぞれ別個の味覚器に分布し、1つの味覚器の中に両者が混在することはなかった。また両者の軸索投射を調べたところ、共発現タイプが胸部神経節に末端部があるのに対し、もう一方は食道下神経節に軸索を伸ばすことがわかった。つまり、脚部には形態的な特性と受容体発現特性の異なる少なくとも2つの甘味ニューロンが分布することがわかった。それぞれの味ニューロンを不活化して脚部への糖刺激で吻伸展反射を調べると、**Tre** 共発現タイプだけを不活化する場合でも、また両タイプを同時に不活化する場合でも、甘味応答の低下が起こるが、後者の場合は不活化がより顕著に起こることを見いだした。つまり、どちらのタイプも甘味応答に関与することがわかった。電気生理学的に応答性を比較すると、両者ともに糖感受性を示したが、前者が口吻の味ニューロンと同様に **Tre** 受容体の発現による高いトレハロース感度をもつことが確かめられた。

(2) 新規甘味受容体の発見：**Tre** を発現しない方の甘味ニューロンは、単糖類と二糖類などに電気生理学的応答性を示すが、中でも果糖に対して比較的高い応答性を示した。行動実験において二糖摂食選択率においても、不活化により果糖に対する選択率が顕著に低下することを確かめた。つまり、新規受容体は果糖に対して高い親和性をもつ受容体であることが強く示唆された。

(3) 脳における甘味情報の符号化：ほ乳動物では、甘味は **T1R2/T1R3** と呼ばれるヘテロダイマー受容体の発現する味細胞が唯

1種類あり、したがって脳における甘味情報は、基本味の1つの味質として処理されることがわかっている。しかし、ショウジョウバエの脚の味覚器では、受容体、味ニューロン、投射、行動のどのレベルにおいても、甘味は少なくとも2種類ある別個の味覚情報として処理されていることが以上の実験から明らかにされた。また受容体の共発現プロファイルは味覚情報の処理において、最も重要な要素であることが本研究の成果から示唆された。

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)

Motosaka, K., Koganezawa, M., Narikawa, S., Furuyama, A., Shinozaki, K., Isono, K. and Shimada, I.: Cyclic AMP-dependent memory mutants are defective in the food choice behavior of *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. A*, 193, 279-283 (2007)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Saeki, S., Morita, H., Shinozaki, K., Isono, K.: Divergent gustatory sensitivity to sugars among *Drosophila silulans* strains. 19th Congress of European Chemoreception Research Organization (Portoroz, 3-7 September, 2008)
- ② Kohatsu, S. and Isono, K.: Specific behavioral contribution among divergent sweet-sensitive neurons in *Drosophila*. The 8th congress of the International Society for Neuroethology (Vancouver, 22-27 July, 2007)

[図書] (計 2 件)

- ① 磯野邦夫 (共著): 「化学物質をとらえる＝昆虫における味と匂いの感覚」(印刷中)
- ② 磯野邦夫 (共著): 「動物の感覚とリズム」(培風館、pp. 55-80. 2007年)

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 磯野 邦夫 (ISONO KUNIO)・東北大学・大学院情報科学研究科・准教授。 研究者番号: 70124550

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし