

平成23年 2月24日現在

研究種目: 基盤研究(C)
 研究期間: 2006~2009
 課題番号: 18570068
 研究課題名 (和文) 昆虫糖受容細胞における情報変換機構の新展開: 一酸化窒素関与の伝達経路
 研究課題名 (英文) Broader understanding of the transduction mechanisms in insect sugar receptors: A signal transduction pathway involving nitric oxide
 研究代表者
 中村 整 (NAKAMURA TADASHI)
 電気通信大学・電気通信学部・教授
 研究者番号: 50217858

研究成果の概要 (和文): クロキンバエの味細胞にみられる NO 産生と味覚神経の興奮機構との関係や味覚と食欲調節との関係を追求した。糖受容細胞には NO 感受性グアニル酸シクラーゼ (sGC) が含まれ、情報変換に含まれていることが示唆されたが、苦味受容では他の経路が主要であることが明らかになった。一方、忌避物質リモネンと嗜好物質ショ糖の同時経験によりショ糖を嫌悪するようになる現象は、長期記憶の成立によることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文): Relationships between NO-production and the excitation mechanisms in the taste cells and between the taste sensation and appetite regulation were investigated. NO-sensitive guanylyl cyclase (sGC) was detected and suggested to participate in the signal transduction pathways in the sugar cells, while other pathway was detected in the bitterness cells. Meanwhile it was demonstrated that the fly's aversive behavior to sucrose after their feeding sucrose in the limonene fume was due to the formation of long-term memory.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	720,000	4,220,000

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: 昆虫、糖受容細胞、苦味物質受容細胞、情報変換機構、一酸化窒素、環状ヌクレオチド、食欲調節機構、吻伸展反射

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫は、味覚器を周辺環境に接触させることで得た化学物質の情報を直接脳に伝え、摂食や繁殖など種の生存・維持に必須の行動決定に反映させている。我々は、エネルギー源の特定に必須で生命維持のためには非常

に重要な役割をはたしている糖受容細胞の細胞内情報伝達経路を明らかにすべく研究を行ってきた。本研究開始の前に、クロキンバエの糖受容細胞では一酸化窒素 (NO) がセカンドメッセンジャーとして機能していることを発見していたが、NO の主要な機能が

細胞間の情報伝達にあると考えられる中、糖受容細胞の内部で産生され、さらに次段の活性化にいたる、と言うのはそれまでに無い作動様式であった。

(2) クロキンバエの糖への嗜好が、リモネン香のもとで糖を摂取することにより嫌悪に変わることが注目されていた。リモネンは芳香物質であるが、一方で生体膜に損傷を与える有機溶媒であり、苦味物質でもある。そのため、観察された嫌悪学習の実体はリモネンによる糖受容細胞などの傷害や、苦味に対する嫌悪学習の可能性も存在した。

(3) 研究室では分子生物学の実験設備が整いつつありクロキンバエやショウジョウバエの遺伝子を扱うことが可能になりつつあった。

2. 研究の目的

上述のように、NOの関与する糖受容細胞の情報伝達や、感覚毛内での神経間の情報伝達の全容を明らかにすることが重要と考えられた。この課題に取り組むにあたり、小型で細胞数も少ないハエの場合には薬理的解析が第一選択肢であるが、それを進めると同時に分子生物学的手法で糖受容細胞に特異的に発現する遺伝子を同定することによって、より包括的な味覚受容機構を解明することを目的とした。

さらに上述のリモネンが関与する嫌悪学習は比較的簡便に検証できることから、もしその嫌悪学習のカテゴリーが明らかになれば、今後の中樞神経系の動作解明の材料として非常に興味深く、また有効ではないかと考えられる。そこで、この現象を丁寧に解析し、糖応答や苦味応答との関係を検討することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分子生物学的な解析

クロキンバエの近縁種ショウジョウバエで同定されている糖受容体遺伝子 (*Gr5a*) のプロモーター (*p[Gr5a]*) の下流に酵母の転写因子 (*Gal4*) を導入したショウジョウバエと *Gal4* 受容因子 *UAS* の下流に特定の遺伝子を導入したショウジョウバエの交配により特定遺伝子を糖受容細胞に発現させた。この方法で糖受容細胞にアポトーシス遺伝子を発現させ、糖受容細胞欠損変異体の作成を試みた。変異体と正常な系統との間で、発現遺伝子のディファレンシャル・スクリーニングを行って糖受容細胞特異遺伝子の網羅的解析を行うことを目指した。

(2) 電気生理学/薬理的な解析

クロキンバエまたはショウジョウバエの味

覚毛先端に味物質を含む電極液を詰めたガラスピペット電極をかぶせ、味物質による刺激と誘発されるインパルスの記録を行った。インパルスは AD ボードを介してパソコンに記録し、表計算ソフトによって波形の解析を行った。薬剤の細胞内導入は多くの場合 0.03% の界面活性剤デオキシコール酸 (DOC) と一緒に溶かした薬剤溶液との 2 分間インキュベーションによって行い、その後 5 分間放置して膜構造が回復するのを待ってから味応答を記録した。薬剤効果の判定は、味応答インパルス頻度の薬剤投与による抑制の割合を求めることによって行った。また薬剤によっては味刺激液中にまぜる場合もあった。

(3) 行動学的解析

個体が甘味や苦味を感じているかどうかを検証するため、ハエのショ糖に対する食欲を観察した。食欲を数値化するため、クロキンバエの 10 匹を一群として、個々の唇弁またはふ節に一定濃度のショ糖液を触れさせた時、吻伸展反射をする個体数の割合を求めた。ショウジョウバエの場合は、着色したショ糖水を一定時間自由に摂取させた後、取り込まれた色素から摂取量を光度計で測定した。

4. 研究成果

昆虫は、味覚器によって得た周辺環境中の化学物質の情報を摂食や繁殖などの重要な行動決定に反映させている。本研究は、昆虫の糖受容細胞を中心とする味細胞の細胞内情報変換機構や味覚神経系における情報処理機構の解明を目的とした。

(1) 糖受容細胞特異遺伝子の探索

① ショウジョウバエの糖受容細胞に特異的に発現する遺伝子の同定を糖受容細胞欠損変異体と野生型とのディファレンシャル・ディスプレイ法で実現することを狙った。図 1 は *GAL4 / UAS* システムを利用して糖受容体

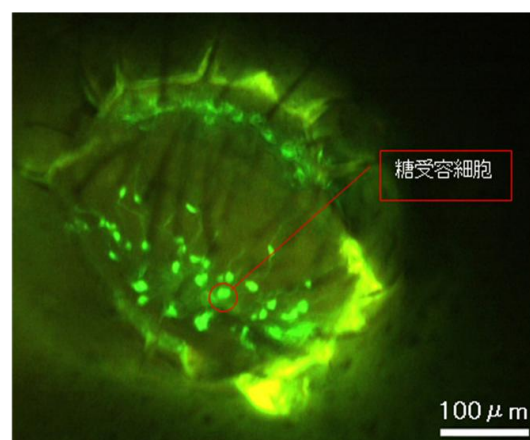


図 1. GFP ラベルした糖受容細胞の蛍光像

Gr5a を発現する細胞に GFP を発現させ糖受容細胞をラベルした蛍光像である。同様に糖受容細胞にアポトーシス遺伝子を誘発させ糖受容細胞欠損体の作成を試みたところ、行動学的及び電気生理学的に糖受容に機能的な障害のあるハエが得られた。そこで、それらの味覚器について遺伝子解析を行ったが、アポトーシスによって糖受容細胞が消失したという確証が得られなかった。これらの機能的な障害を持ったハエについてさらなる解析を続けることも考えられたが、アポトーシスの確証を得ることに時間がかかり過ぎたため、有効な時間配分を考えて今回は一端中断することとした。

② 図 1 に示したように糖受容体は *Gr5a* 発現を GFP ラベルにより同定できる。そこで、この *Gr5a* 発現細胞と他の細胞をそれぞれ単離して単細胞 PCR からスタートしてディファレンシャル・ディスプレイ法の適用を狙った。味細胞の単離は、クロキンバエ味細胞のために開発した細胞単離法を適用した。しかし単細胞 PCR で得られる cDNA の量が非常に少ないためか、ディファレンシャル・ディスプレイ法の適用には成功しなかった。

③ 水溶性グアニル酸環状化酵素 (sGC) の味覚器における発現を検討した。先に薬理的解析により、クロキンバエの糖受容細胞の興奮にともない NO が発生し、糖受容細胞の情報変換経路に関与することが示唆されていたが、cGMP が細胞内情報伝達因子であるとの説と合わせて、NO 感受性である水溶性グアニル酸環状化酵素 (sGC) の糖受容細胞における発現が推定された。そこで、ショウジョウバエのデータベースを元に sGC と顆粒状グアニル酸環状化酵素 (pGC) に共通のプライマーを作製しクロキンバエ唇弁に対し RT-PCR 解析を行ったところ、ショウジョウバエ sGC のホモログ遺伝子の発現を認め、in situ hybridization により味覚毛の神経に局在することが確認された。後述の薬理的解析の結果と合わせると sGC が発現する細胞は糖受容細胞と考えられた。図 2 はこれまでのところで考えられる NO の関与する糖刺激の受容から受容器電位発生までの分子機構の模式図である。

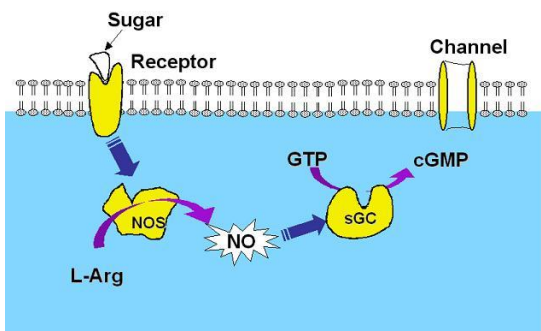
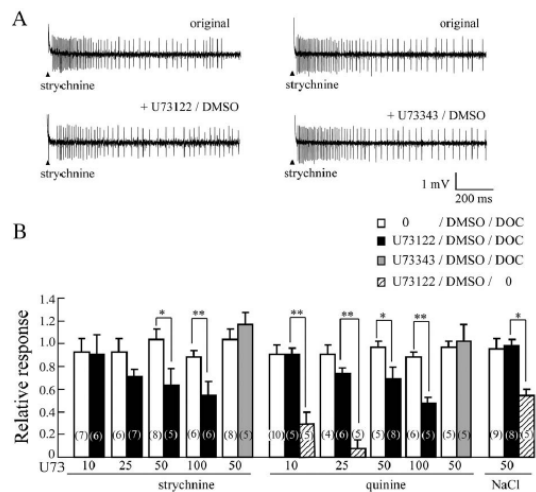


図 2. クロキンバエ糖受容細胞の NO が関与する情報変換機構の模式図

(2) 電気生理学/薬理学による情報変換経路の研究

① クロキンバエの電気生理学的な味応答をふ節の味覚毛から記録すると、苦味物質に対する応答が明瞭に記録できることが分かった。それを利用して、一部の情報変換経路の遮断剤は苦味を呈すること、また苦味物質は糖応答を抑制することを明らかにした。その結果、これまでの薬理学的研究で細胞外投与された薬剤等の結果は再検討の余地が示唆された。また、苦味物質受容細胞と糖受容細胞の間で側抑制的な信号授受の可能性、またその伝達物質として NO が関与する可能性が考えられた。

② ふ節味覚毛を用いて、苦味物質受容細胞の情報変換機構について薬理的解析をおこなったところ、苦味物質受容細胞の情報変換機構は G 蛋白の支配する IP3 系であることが認められた。図 3 は IP3 産生を担う酵素 (PLC) の阻害剤を細胞内投与すると、苦味 (ストリキニーネ) 応答が抑制されることを示した例



である。

図 3. 苦味物質ストリキニーネに対する応答の IP3 産生酵素 (PLC) の阻害剤 U73122 による阻害。

③ 苦味物質による糖応答の抑制について解析を進めたが、糖受容細胞の抑制は苦味物質受容細胞の支配は受けておらず、苦味物質が糖受容細胞に直接働きかけることが認められた。

④ 糖受容細胞の応答は細胞内に投与した sGC 阻害剤によって抑制されることを観察し、糖受容細胞の情報変換に sGC が関与することを確認した。

(3) クロキンバエにおける食欲調節機構の解析

① クロキンバエの糖嗜好性が忌避物質リモンネン香の元におけるショ糖摂取により抑制

されることが知られているが、この現象が、脳における蛋白合成の必要な長期記憶の現象であることを証明した。図4にはショ糖摂取時にリモネン香が背景に与えられたクロキンバエ (●) は一日経ってもショ糖に対する吻伸展反射をほとんど示さず食欲が低下しているが、日数とともに次第に忘却により食欲が回復すること、またショ糖摂取の一時間後にリモネン香を経験したハエ (○) では食欲は高く維持されたままであることが示されている。

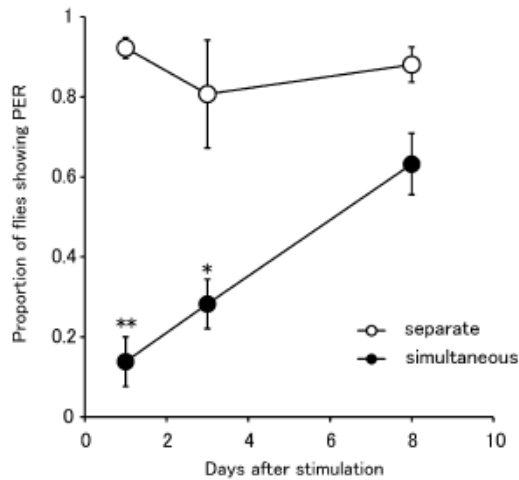


図4. リモネン香とショ糖摂取の同時経験による食欲減退とその回復

また図5には、蛋白質合成阻害シクロヘキシミドの胸部投与によって、食欲減退の抑制がおきることが示されている。

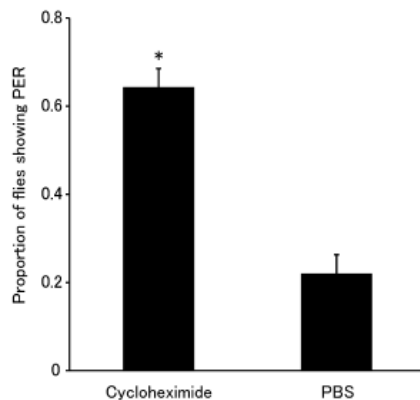


図5. シクロヘキシミドを胸部投与したハエにおけるショ糖摂取とリモネン香を同時経験後の食欲維持

② 上述のように、ショ糖摂取とリモネン香の同時経験による食欲減退が長期記憶によるものと示唆されたため、この記憶を持つハエの一群と持たない一群について、それぞれの頭部を集め、cDNAを調製し、2つの試料の間

でディファレンシャル・ディスプレイ法を行った。その結果、記憶の発生に伴って発現または発現停止をする遺伝子を検出した。それらの塩基配列を求めたところ、データベース上他の遺伝子と全く相同性がない未知遺伝子1個と、他に相同性が認められる未知遺伝子13個、そして既知で機能未知の遺伝子3個、機能既知の遺伝子2個からなっていた。③ 検出された機能既知遺伝子の一つは細胞のATP量のセンサーというべきAMP感受性キナーゼ (AMPK) であった。AMPKは脊椎動物の中樞神経系においてはその個体の食欲制御や記憶に関わる可能性のあることが着目された。そこでAMPKの活性化剤や、阻害剤をクロキンバエの胸部へ投与してその活性の制御を試みたところ、空腹時や摂食直後でも、人為的にシフトされたAMPKの活性に従って食欲が変化することを観察した。これはAMPKが食欲制御や記憶に関わることの、無脊椎動物の中樞における最初の観察と考えられる。その他の検出された遺伝子についてもその機能について今後詳細な検討を加えていこうとしている。

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9件)

- ① Qin Ouyang, Hiroyasu Sato, Yoshihiro Murata, Atsushi Nakamura, Mamiko Ozaki, Tadashi Nakamura, Contribution of the inositol 1, 4, 5 - trisphosphate transduction cascade to the detection of "bitter" compound in blowflies, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 査読有, 153, 2009, 309-316
- ② Atsushi Nakamura, Tomoyuki Suzuki, Daiki Taniguchi, Atsushi Matsuda, Manabu Tobeta, Tadashi Nakamura, Odour of limonene affects feeding behaviour in the blowfly, *Phormia regina*, *Neuroscience Letters*, 査読有, 446, 2008, 36-39
- ③ Yoshihiro Murata, Mamiko Ozaki, Tadashi Nakamura, Primary Culture of Gustatory Receptor Neurons from the Blowfly, *Phormia regina*, *Chemical Senses*, 査読有, 31, 2006, 497-504

[学会発表] (計16件)

- ① 中村整、クロキンバエ中枢神経系における摂食調節機能へのAMPKの関与、第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会、2009、10、23、豊中

- ② 中村整、クロキンバエ *Phormia regina* の苦味受容細胞における情報変換機構の研究、日本動物学会第78回大会、2007、9、20、弘前

〔図書〕(計3件)

- ① Tadashi Nakamura, Mamiko Ozaki, Taylor & Francis Group, Chemosensory regulation of feeding in the blowfly: several studies after 'The Hungry fly' (SEB Experimental Biology Series Vol 63, Insect Taste, Chapter 4), 2009, 77-101
- ② 中村整、尾崎まみこ、倍風館、化学感覚、(シリーズ21世紀の動物科学、9巻、動物の感覚とリズム、第4章) 2009, 81-101

〔その他〕

ホームページ等

<http://kaeru.pc.uec.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 整 (NAKAMURA TADASHI)
電気通信大学・電気通信学部・教授
研究者番号：50217858

(2) 研究分担者

仲村 厚志 (NAKAMURA ATSUSHI)
電気通信大学・電気通信学部・助教
研究者番号：50361829

(3) 連携研究者

尾崎 まみこ (OZAKI MAMIKO)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：00314302

村田 芳博 (MURATA YOSHIHIRO)
高知医科大学・医学部・助教
研究者番号：40377031