

発表番号 56 (0329)

ショウジョウバエ突然変異を用いた塩味受容機構の解析

助成研究者：上野 耕平（群馬大学医学部）

従属栄養生物である動物は、常に外界から栄養物である「餌」を摂取しなくてはならない。味覚はこの行動と密接に関連する感覚であり、この感覚機構を理解することはヒトを含めた動物全般を理解する上で非常に重要である。

ヒトの味覚は、大きく5つに区分される、すなわち甘味、苦味、塩味、酸味および旨味である。中でも塩味は他の味覚と異なり、濃度によって摂食を誘発したり、逆に阻害したりする。この濃度による行動の差異がどのような機構により引き起こされるのであろうか。ラットやマウスでは以前から、実験室系統において、多くの系統が嗜好性を示す濃度の塩に対して嗜好性を示さない系統が存在することが知られている。しかし、この系統間の差異が遺伝的な差異によるものなのかは不明である。

ショウジョウバエは古くから遺伝学の方法として用いられ、遺伝的な解析法が多く存在する。また、ショウジョウバエを含むハエ類は味覚の研究材料としても良く用いられてきており、行動学的・電気生理学的な解析法も多く知られている。本研究では、ショウジョウバエを用いて、この塩味嗜好性を解析することを試みた。塩の嗜好性を測定する手法としては、食用色素を用いた two-choice test を採用し、水も餌も与えずに放置したハエの水と塩水を選択させて、どちらを摂取するかを定量的に測定した。まず、ショウジョウバエにも多くの動物同様に塩嗜好性が存在するの否か、さらにラットやマウスに見られる系統間における塩嗜好性の差異が存在するの否かを調べた。その結果、ショウジョウバエも適当な濃度の塩(12.5 ~ 100 mM NaCl) に対して嗜好性を示すことと、系統によってはその嗜好性を示さないものが存在することが明らかになった。さらに、遺伝学的な解析により、その嗜好性の差異が遺伝的差異によることを示し、その遺伝的差異は1つの遺伝子における差異であることを示唆する結果を得た。以上の結果から、ショウジョウバエにおける塩嗜好性は1つの遺伝子の型によって変化することが示唆され、さらにその遺伝子が塩嗜好性を支配している遺伝子であることが示唆された。一方、全ての系統は、高濃度の塩 (~ 500 mM) に対しては忌避行動を示した。このことから、塩に対する嗜好性と忌避性は異なる遺伝子によって引き起こされることが示唆された。

ショウジョウバエ突然変異を用いた塩味受容機構の解析

上野 耕平 (群馬大学医学部)

< 研究目的 >

ヒトや動物の味覚は一般に、甘味、苦味、塩味、酸味および旨味に区分される。動物は甘味や旨味によって摂取行動が誘発され、苦味や酸味に対しては忌避的な行動をとる。これらに対し、塩は濃度によって異なる行動を引き起こす。すなわち、低濃度の塩は摂取行動を誘発し、高濃度の塩は忌避的な行動を誘発する。この双極性の行動がどのような知覚機構によって引き起こされるのかを明らかにすることは動物の塩味受容機構を明らかにするだけでなく、嗜好性や忌避性といった高次の行動を理解する上で非常に重要である。1つの手がかりとして、ラットの実験系統の中に塩味に対する嗜好性を示さない系統がいることが知られている¹。しかし、その系統間の差異がどのような遺伝的差異によって生じているのかということは不明である。

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は遺伝学の実験材料として古くから使われているだけではなく、味覚の研究にも重要な役割を果たしてきた。その理由として有用な行動実験が多くあるということと²、電気生理学的に味受容細胞の応答性を測定することができるということがあげられる³。本研究は塩味、特に嗜好性を引き起こす塩味の受容機構を明らかにするために、ショウジョウバエを用いて遺伝学的な解析によりその機構に関与する遺伝子を同定することを目的とした。

< 研究方法 >

- ・ ハエの飼育：ショウジョウバエは基本的なコーンミール培地で、室温 25 度、湿度 60% の環境下で飼育した。また、明暗条件は 12 時間の LD サイクルとした。
- ・ 嗜好性テスト：ショウジョウバエの塩に対する嗜好性を測定するために、本研究では二者択一テストをおこなった。60 穴のマイクロテストプレートに適当な濃度の塩水と水を寒天を加えて市松模様になるように入れた。この際に塩水には青色の、水には赤色の食用色素を加えた。羽化後 1~3 日齢のハエを 9 時間餌も水も与えずに放置した。それらのハエ数十匹をマイクロテストプレート内に入れ、暗所で 1 時間摂食させた。摂食後、冷凍庫にマイクロテストプレートを入れてハエを殺した。その後、実体顕微鏡下でハエを観察すると、腹部の色によりどちらの溶液を摂取したのかがわかるため、ハエを腹部の色によって選別しそれぞれのハエの数を数えた。なお、両方の色素を摂

取したハエは腹部が紫色になった。それぞれのハエの数から以下の式により、塩水に対する嗜好性、Preference Index (PI)を求めた。

$$\text{Preference Index} = 100 \times \frac{\text{青色のハエの数} - \text{赤色のハエの数}}{\text{青色のハエの数} + \text{赤色のハエの数} + \text{紫色のハエの数}}$$

< 研究結果と考察 >

ショウジョウバエの各種実験系統の 50 mM NaCl に対する嗜好性を測定した結果、その PI は系統間で大きく異なることが明らかとなった (Fig.1)。続いて、嗜好性を示した Canton-S、Hikone-R および Oregon-R と嗜好性を示さなかった OGS-4 と Katsunuma1619 の塩に対する嗜好性を、塩の濃度を変化させた場合にどうなるのかを解析した。塩の濃度を 3.125 mM から 200 mM まで変化させた際の 5 系統の嗜好性変化を Fig.2 に示した。その結果、Canton-S と Hikone-R はともに、25 mM から嗜好性を示し、その嗜好性は 100 mM まで持続した。それに対し、OGS-4 と Katsunuma1619 はいずれの濃度に対しても嗜好性を示さず、また、200 mM の塩に対しては忌避した。Oregon-R は Canton-S、Hikone-R と同様に 25 mM の塩に対して嗜好性を示したが、その嗜好性は 100 mM まで持続せず、また 200 mM の塩に対しては OGS-4 などと同様に忌避した。以上の結果から、OGS-4 や Katsunuma1619 は塩に対する嗜好性をほぼ完全に示さない系統であることと、塩に対する嗜好性を示す系統間でも、その程度に違いが見られることが示された。また、いずれの系統においてもオスとメスの間で有為な嗜好性の差異は認められなかったことから、塩の嗜好性には性差が無いことが明らかとなった。

ショウジョウバエで見られた系統間における塩の嗜好性が、遺伝的な差異によるものであるか否かを明らかにするため、以下の実験をおこなった。Canton-S と OGS-4 のオスとメスをそれぞれ交配し、得られた F1 の 50 mM NaCl に対する嗜好性を測定した。その結果、Canton-S と OGS-4 のヘテロ F1 は Canton-S のホモ F1 よりは嗜好性が低く、かつ OGS-4 のホモ F1 よりも高かった (Fig.3)。また、ヘテロ F1 のオスとメスの間に有為な差は見られなかった。このことから Canton-S と OGS-4 の塩嗜好性は遺伝学的な差異によるとすれば、それは性染色体である X 染色体上には無いことが示唆された。続いて、常染色体上のいずれに塩嗜好性を支配する遺伝子があるのかを解析するために、第 2 染色体が Canton-S 由来で、第 3 染色体が OGS-4 由来のハエと逆に第 2 染色体が OGS-4 由来で第 3 染色体が Canton-S 由来のハエを作成した。それぞれのハエの 50 mM NaCl に対する嗜好性を測定した。その結果、第 2 染色体の由来と塩に対する嗜好性が密接に関連していることが明らかとなった (Fig.4)。以上の結果から、Canton-S と OGS-4 の系統間で見られた塩嗜好性は遺伝的な差異によるものであると考えられ、その遺伝的差異は第 2 染色体上の何らかの遺伝子による差異であることが示唆された。

第 2 染色体上のどこに目的の遺伝子があるのかを調べるために、可視マーカと染色体組

み換えを利用したマッピングを行った。*al dp b pr c px sp*という7つの劣性可視マーカ変異を持つ塩味嗜好性を示さない系統とCanton-Sを交配し、得られたF1のメスを再度*al dp b pr c px sp*系統と交配して得られたF2の塩味嗜好性を調べた。Fig.5にそれぞれの表現型の塩味嗜好性を示した。その結果、塩味嗜好性の有無は *pr* マーカと密接に関連していることが示された。従って、目的遺伝子は第2染色体上の *pr* 遺伝子の近傍であることが示唆された。続いて、*pr* 遺伝子近傍のさらに詳細なマッピングを行うため、染色体欠失系統を用いた。ショウジョウバエの突然変異系統の中には、染色体の一部を欠失した系統が数多く存在する。これらとCanton-Sを交配させ、もし欠失領域に目的遺伝子があれば、その欠失系統とCanton-SのヘテロはCanton-Sのホモに比べて塩味嗜好性が減少すると考えられる。ショウジョウバエの系統保存センター(Bloomington Stock Center)から6系統の染色体欠失変異体を分譲してもらい、Canton-Sとのヘテロを作成してそれらの塩味嗜好性を測定した。その結果、Df(2L)TW137とのヘテロの塩嗜好性が有為にCanton-Sホモよりも低下した。Df(2L)TW137の染色体欠失領域は唾腺染色体上で36C2から37B10に相当する。従って、目的の遺伝子はこの領域内にあることが示唆された。Df(2L)TW137の欠損領域以外に、塩味を支配する遺伝子があり、その型がOGS-4などのように嗜好性を示さない型である可能性も考えられるが、Df(2L)TW137はDf(2L)TW161と同じ親系統から作られているため⁴、その可能性は極めて低いと思われる。

続いて、36C2から37B10の領域内に、P-elementとよばれるtransposonが挿入された系統を系統保存センターから得て、それぞれの系統の塩嗜好性を調べた。その結果、KG05889とKG03741という系統が、親系統である *y;* *ry* に比べて嗜好性が有為に低下していることが明らかとなった(Fig.7)。このことから、KG05889とKG03741におけるP-elementの挿入により、なんらかの遺伝子発現が阻害されていると考えられる。系統保存センターのP-element挿入系統は、その挿入部位のゲノムDNA配列が明らかにされている。そのデータベースより、KG05889とKG03741のP-elementはCG15151という機能が明らかにされていない遺伝子に挿入されていた。以上の結果より、ショウジョウバエの塩嗜好性はCG15151という遺伝子によって支配されていると考えられる。

塩に対して嗜好性を示す系統であるCanton-SやHikone-Rも、塩の濃度が上昇するにつれて嗜好性は低下し、最終的には塩に対して忌避するようになる。その濃度は400 mM付近である。OGS-4やKatsunuma1619も同様に忌避する。従って、塩に対する嗜好性を支配する遺伝子は、忌避においてはあまり関係がないように考えられる。従って、塩に対する行動は濃度によって異なる遺伝子もしくは遺伝子群が作用すると考えられる。

< 今後の課題 >

今回の研究により、ショウジョウバエの塩嗜好性を支配する遺伝子が初めて同定された。このことは同時に、動物において塩の嗜好性が1つの遺伝子によって支配されていること

を示す初めての報告である。

味覚の sensitivity が系統間や野生集団内において多型があることは良く知られており、またそれらの多型は味覚の分子機構を明らかにする上で非常に重要な役割を果たしてきた⁵⁻⁸。そして多くの場合がその多型は受容体遺伝子の変異によるものである。従って、今回見出した CG15151 も塩の受容に寄与している可能性がある。実際に、CG15151 の予想されるアミノ酸配列では、膜貫通部位があるため、受容膜上に発現しているのかもしれない。今後、この遺伝子の産物がどのような細胞に発現し、細胞内のどのような部位に発現しているのかを解析することが必要である。

<参考文献>

1. Midkiff, E.E., Fitts, D.A., Simpson, J.B. & Bernstein, I.L. Absence of sodium chloride preference in Fischer-344 rats. *Am J Physiol* **249**, R438-42 (1985).
2. Devaud, J.M. Experimental studies of adult *Drosophila* chemosensory behaviour. *Behav Processes* **64**, 177-196 (2003).
3. Fujisiro, N., Kijima, H. & Morita, H. Impulse frequency and action potential amplitude in labellar chemosensory neurones of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.* **30**, 317-325 (1984).
4. Wright, T.R., Hodgetts, R.B. & Sherald, A.F. The genetics of dopa decarboxylase in *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and characterization of deficiencies that delete the dopa-decarboxylase-dosage-sensitive region and the alpha-methyl-dopa-hypersensitive locus. *Genetics* **84**, 267-85 (1976).
5. Fuller, J.L. Single-locus control of saccharin preference in mice. *J Hered* **65**, 33-36 (1974).
6. Tanimura, T., Isono, K., Takamura, T. & Shimada, I. Genetic dimorphism in taste sensitivity to trehalose in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **147**, 433-437 (1982).
7. Nelson, G. et al. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381-90 (2001).
8. Chandrashekar, J. et al. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **100**, 703-11 (2000).

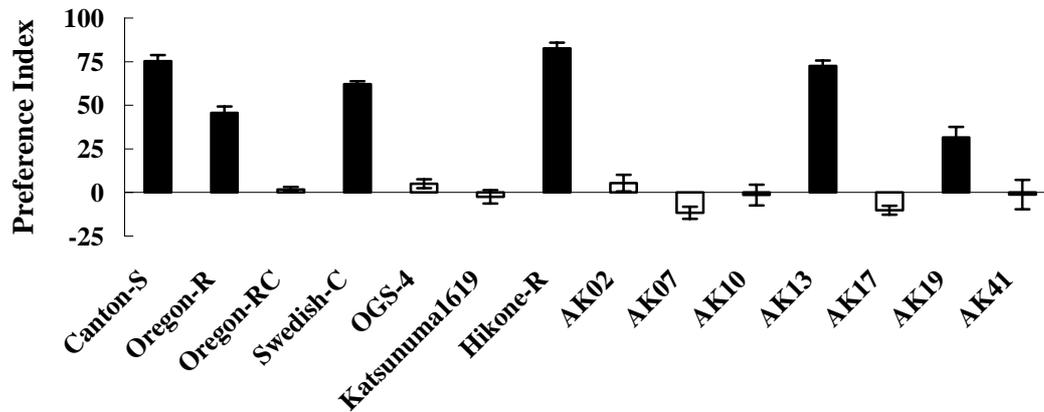


Fig.1 ショウジョウバエの各種実験系統間における塩味嗜好性の差異。
縦軸は 50 mM NaCl と水を選択させた際の、50 mM NaCl に対する PI。有為に嗜好性を示した系統を黒の、示さなかった系統を白のバーで表した。各バーは 8 回の平均値の SE。

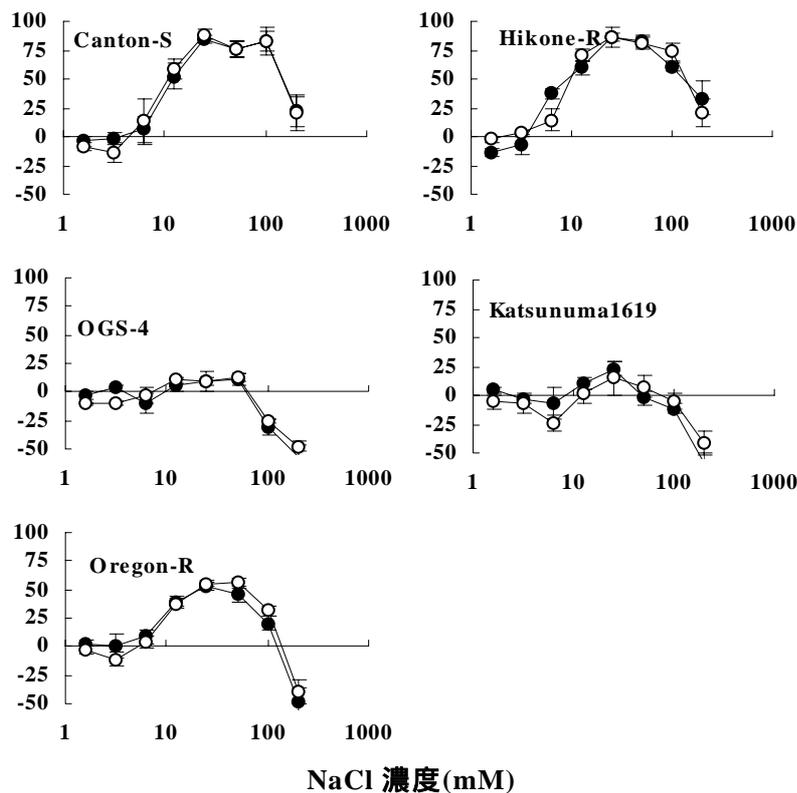


Fig.2 様々な濃度の塩に対するショウジョウバエの各種実験系統の塩味嗜好性。
縦軸は各濃度の NaCl と水を選択させた際の、NaCl に対する PI、横軸は NaCl 濃度を log で表した。黒丸はオスの、白丸はメスのそれぞれ 8 回の平均値と SE。

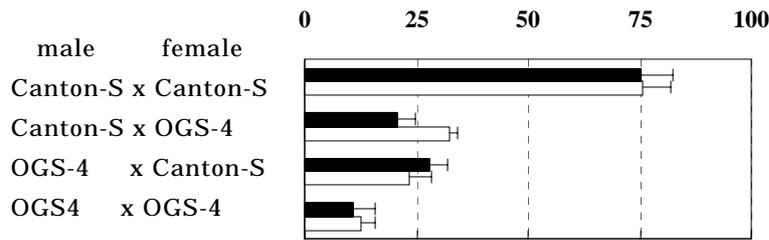


Fig. 3 Canton-S と OGS-4 の F1 における塩嗜好性
横軸は 50 mM NaCl に対する PI、各バーはそれぞれ 8 回の平均と SE を表す。黒のバーはオスを白のバーはメスの PI である。

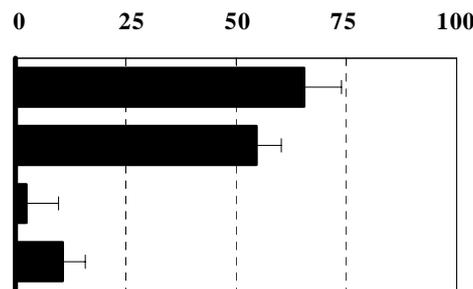


Fig. 4 常染色体をそれぞれ Canton-S、OGS-4 由来のものに置き換えた八工の塩嗜好性
上から、第 2、第 3 染色体共に Canton-S 由来の八工、第 2 が Canton-S、第 3 染色体が OGS-4 由来の八工、第 2 が OGS-4、第 3 が Canton-S 由来の八工、一番下が第 2、第 3 共に OGS-4 由来の八工。横軸は 50 mM NaCl に対する PI、各バーはそれぞれ 8 回の平均と SE を表す。

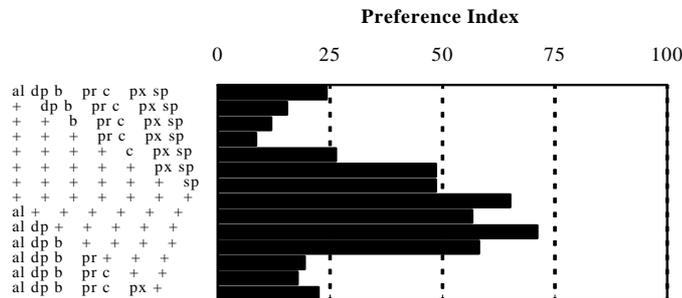


Fig. 5 第 2 染色体上のマッピング
グラフ左の表記は F2 の表現型を表す。グラフ横軸はそれぞれの表現型の 50 mM NaCl に対する PI。

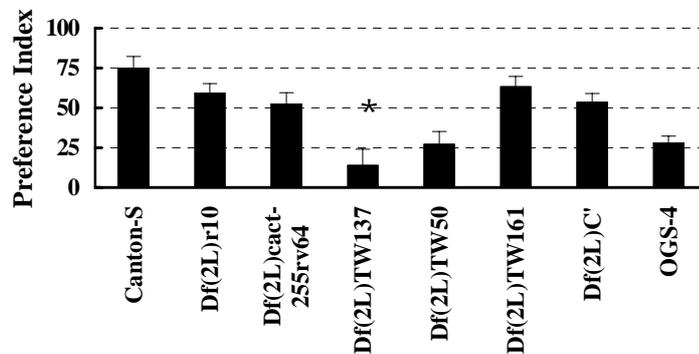


Fig. 6 *pr* 遺伝子近傍の染色体欠失変異体を用いたマッピング
縦軸は 50 mM NaCl に対する 8 回の PI の平均と SE。横軸は Canton-S と交配した系統名。

Canton-S のところは Canton-S ホモを表す。また Df(2L)r10 とあるところはそのハエと Canton-S との F1 表す。* は Canton-S と比べて有為に PI が低下している系統を表す。

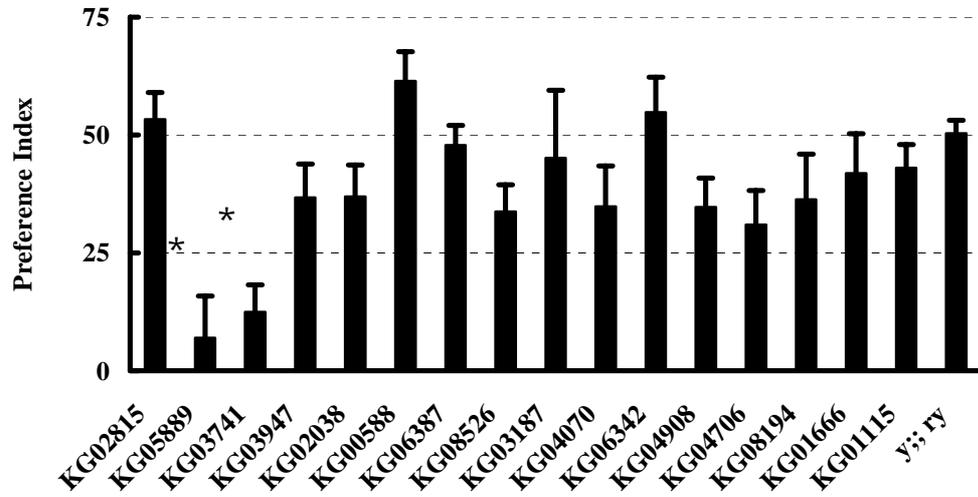


Fig. 7 Df(2L)TW137 の欠損領域に P-element が挿入されている系統間の塩嗜好性。縦軸は 50 mM NaCl に対する PI を表す。横軸は各 P-element 挿入系統とその親系統である y::ry。* は y::ry に対して有為に PI が低いことを表す。

Polymorphism in a gustatory gene that regulates salt preference in *Drosophila melanogaster*

Kohei UENO (Gunma University, School of Medicine)

Summary

The tastes are classified into sweet, bitter, salty, and sour in animals. The sodium chloride (NaCl) is a major tastant that induces salty taste. In rats, it is well known that there is the difference of preference for NaCl between strains. Although many inbred rats strains typically ingest significantly more the isotonic NaCl solution than water, Fischer-344 rats avoid the NaCl solution in preference for water. However, It is not clear whether the difference in the taste reactivity to NaCl is caused by genetic difference.

In this study, we intended to analyze the NaCl preference mechanisms using *Drosophila melanogaster*. Preference for the 50mM NaCl solution over water was examined in 14 wild-type strains of *Drosophila* by the two-choice feeding test. We found that six strains showed high-preference for NaCl, eight strains no-preference. Flies in the high-preference group preferred to ingest solutions with the concentration between 10 and 50 mM and avoided solutions with higher concentrations, whereas those in the no-preference group did not prefer salt solutions at any concentrations and avoided solution with concentrations 100 mM or higher.

We examined whether the difference in the preference for NaCl is due to genetic difference or not. The results suggested that the difference was due to the single gene on the second chromosome. Furthermore, we found the gene that controls the NaCl preference locating between 36C2 and 37B10 by the precisely genetic analysis. When we obtained 16 lines by which each P-element is inserted between 36C2 and 37B10 and examined the salt preference of the lines and theirs parental strain, we found that the salt preference of two lines, KG05889 and KG03741, were lower than other P-element inserted lines and parental line. The insertion of the P-element in KG05889 and KG03741 disrupted the expression of CG15151. We conclude that CG15151 is essential for salt preference of *Drosophila*.