

発表番号 66

ショウジョウバエ塩味嗜好性を支配する遺伝子の機能解析

上野 耕平 (群馬大学大学院医学系研究科)

黒見 坦 (群馬大学大学院医学系研究科)

ヒトを含めた多くの動物において、NaCl は塩味を引き起こす刺激物質である。塩味は濃度によって異なる行動を引き起こす。すなわち、低濃度では摂食を誘発し、高濃度では逆に抑制する。この濃度による相反する行動はどのような分子機構によって引き起こされるのであろうか。本研究は、特に低濃度NaCl による摂食の誘発性に注目した。ショウジョウバエにおいても、100 mM 前後のNaCl は摂食を誘発する。また、100 mM NaCl と水を選択させるとNaCl に対して高い嗜好性を示す。ところが、この嗜好性はいくつかの実験室系統では見られない。15年度研究助成により、我々はこの系統間における嗜好性の違いを遺伝学的に解析した結果、CG15151 という機能が未知の遺伝子が関与していることを見出した。16年度研究助成により、我々はこの遺伝子の配列を各実験室系統において決定したところ、翻訳領域において計8カ所のSNPsを見出した。さらに、その中で2カ所のSNPs がアミノ酸置換を引き起こすことが明らかとなった。この2カ所のうち、659番目のアスパラギンがセリンに変わった系統では嗜好性が無く、逆にアスパラギンのままである系統は嗜好性が高かった。一方、もう1カ所のアミノ酸置換と嗜好性には相関が見られなかった。このことから、CG15151 遺伝子の659番目のアスパラギンがNaCl 嗜好性に重要なアミノ酸であることが示唆された。続いて、この遺伝子が受容体か否かを解析するために、アミロライドを用いた実験を行った。一般にNaCl の味受容体はアミロライド感受性Na チャネルであることが知られている。しかし、ショウジョウバエのNaCl 嗜好性はアミロライドによって消失することはなかった。このことから、ショウジョウバエのNaCl 嗜好性にはアミロライド感受性Na チャネル以外の分子が関与していることが示唆され、CG15151 がその受容体ではないかと推測される。さらに、我々はCG15151 の発現部位をRT-PCR 法により解析した結果、CG15151 は頭部や味覚器が存在する口および脚で発現が見られた。続いて、味覚器が分布する脚を一部切除したハエではNaCl 嗜好性が著しく減少した。これらの結果から、NaCl 嗜好性は脚の味覚器が非常に重要であることが示唆された。我々は脚に発現するCG15151 がNaCl 嗜好性に関与する受容体なのではないかと推測している。この仮説を検証するためには、より詳細な発現部位解析が必須である。そのための形質転換体を作成した。これによりショウジョウバエのNaCl 嗜好性に対するCG15151 遺伝子の機能がより詳細に検証できると期待される。

3

助成番号 0430

ショウジョウバエ塩味嗜好性を支配する遺伝子の機能解析

上野 耕平 (群馬大学大学院医学系研究科)

黒見 坦 (群馬大学大学院医学系研究科)

< 研究目的 >

塩化ナトリウム (NaCl) はヒトを含めた動物に対し、塩味を引き起こす物質である。無脊椎動物であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) も NaCl に対して応答性を示し、適当な濃度の NaCl に対して嗜好性を示し、高濃度の NaCl に対しては忌避性を引き起こすことが知られている^[1]。申請者は前年度の助成により、ショウジョウバエにおける NaCl に対する嗜好性が実験室系統間によって異なることを明らかにした。さらに、その差異がある1つの遺伝子、CG15151 によって生じている可能性を示唆した。この遺伝子は推定される2次構造が1回膜貫通型であり、これまでに機能が明らかになっているタンパクとの相同性が非常に低い、新規の遺伝子である。

本研究は、この遺伝子がどのようにショウジョウバエの NaCl に対する嗜好性と関連しているのかを明らかにすることを目的とする。そのために、まずショウジョウバエの NaCl 嗜好性がどのような機構によって引き起こされるのかを行動学的に解析し、CG15151 分子とそれらの行動がどのような関連があるのかを考察した。

< 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。
- ・ RT-PCR および塩基配列決定：CG15151 遺伝子のタンパク質をコードする領域の塩基配列の決定は以下の方法によりおこなった。麻酔をかけたショウジョウバエから頭部 30 個を採取し、RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) により total RNA を抽出した。続いて、Super Script First Strand Synthesis System (Invitrogen 社) により抽出した RNA から cDNA を合成した。合成された cDNA から PCR 法により、コーディング領域を含む DNA 断片を増幅した。用いた Primer 配列は 5' AACCC ACACA GAAGA GGGAC ATCGT 3' (Forward primer)、5' TGGGC AA ACT TCGTA GCTGA TGAGG 3' (Reverse primer)。塩基配列は得られた PCR 産物を直接鋳型として ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) により決定し、遺伝子解析ソフト Genetyx (ゼネティックス社) によりアミノ酸配列を予測した。

- ・ 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 >

前回の助成研究により、ショウジョウバエの実験室系統において Canton-S、Hikone-R および Swedish-C は NaCl に対して嗜好性を示し、OGS-4、Katsunuma-1619 および Oregon-RC は嗜好性を示さないことが明らかになった。そこで、まず RT-PCR 法により上記の 6 系統の頭部から CG15151 のコーディング領域を含む mRNA の増幅を行った。その結果、Oregon-RC を除く 5 系統から約 2 Kbp の断片が得られた。このことから、Oregon-RC はこの遺伝子の発現が極端に抑えられていることから、塩に対する嗜好性が見られないのではないかと考えられる。残りの OGS-4 および Katsunuma-1619 における塩嗜好性の低下は発現調節領域の違いよりも、コーディング領域における塩基配列の違いによるのではないかと考えられた。5 系統から得られた PCR 産物を鋳型として塩基配列を決定した。その結果、8 カ所において Single Nucleotide Polymorphism、いわゆる SNP が見出された(表 1)。さらに、これらの SNPs においてアミノ酸配列に影響をおよぼすものが 2 カ所見出された(表 1)。この結果から、659 番目のアスパラギンがセリンに変わることで、NaCl に対する嗜好性が変化したのではないかと考えられる。

この遺伝子が NaCl の嗜好性にどのように関連するのであろうか？ 1 つの可能性として、この遺伝子が NaCl に対する受容体そのものであることが考えられる。一般的に、ほ乳類やショウジョウバエの NaCl 受容体はアミロライドによって感受性が抑制されるナトリウムチャンネルファミリーに属していると考えられている^[2, 3]。しかし、CG15151 の予想アミノ酸配列から推定される 2 次構造は 1 回膜貫通型であり、アミロライド感受性ナトリウムチャンネルファミリーには属さないことから、仮に CG15151 が NaCl の受容体であれば、ショウジョウバエの NaCl 嗜好性にアミロライドは影響しないと考えられる。このことを明

らかにするために、アミロライドを添加した NaCl の嗜好性を、NaCl 嗜好性がある Canton-S 系統を用いて測定した。その結果、50 mM NaCl に対する嗜好性がアミロライドによってわずかに抑制されたが、消失はしなかった(図1)。さらに、アミロライドの濃度を増加させ、400 μ M まで上昇させても、Canton-S の嗜好性は消失しなかった(図2)。さらに、アミロライドだけを添加した水溶液と水を選択させると、100~400 μ M のいずれの濃度においてもアミロライドに対して忌避性を示した(図3)。このことから、図1で見られた NaCl 嗜好性のわずかな低下はアミロライドが NaCl 感受性を阻害した結果ではなく、アミロライドに対する忌避性が加算的に現れているのではないかと考えられる。また、このことからショウジョウバエの NaCl 嗜好性を引き起こす濃度の NaCl を検知する受容体はアミロライド感受性ナトリウムチャンネルではなく、別の受容体が関与していることを示唆しており、CG15151 がその受容体そのものの可能性がある。

ショウジョウバエの味覚器は感覚毛の形態をとっており、その中に受容細胞が配置されている。この感覚毛は口だけでなく、脚のふ節や羽の周辺部にも存在することが知られている。CG15151 の発現部位を調べるために、体の大まかな部位からの RT-PCR を行った。その結果、CG15151 の発現は頭、吻および脚で強く見られ、腹ではわずかに、そして胸では見られなかった。特に、脚において吻と同程度の発現量が見られた点から、脚のふ節を切除した場合に NaCl 嗜好性が変化するのかどうかを調べた。その結果、糖(10 mM sucrose) および酸(25 mM citric acid) に対する嗜好性と 400 mM NaCl に対する忌避性には前脚のふ節の除去は顕著な効果が見られなかったが、50 mM NaCl に対する嗜好性はふ節の除去によって著しく減少した(図5)。このことから、NaCl に対する嗜好性には前脚のふ節に存在する味覚器が非常に重要であることが示された。以上の結果から、ショウジョウバエの NaCl 嗜好性に関与する遺伝子 CG15151 が低濃度の NaCl に対する受容体ではないかと考えられる。

仮に受容体であるならば、CG15151 は味覚器の受容細胞に発現しているはずである。このことを調べるために、一般的には抗体による免疫染色や mRNA の発現を観察する *in situ* hybridization 法による解析が考えられるが、CG15151 が新規の遺伝子であることから有用な抗体がないこと、またショウジョウバエの脚は構造的に染色が困難であることから、CG15151 遺伝子上流プロモーター配列とマーカータンパクを組み合わせた *in vivo* の発現パターン解析を試みるために、ショウジョウバエにおいて有用な GAL4/UAS システムを用いた形質転換体の作成を行った。具体的には CG15151 遺伝子の翻訳配列の直前から上流約 2 Kbp のゲノム配列を Canton-S から PCR 法を用いてクローニングを行い(用いた Primer 配列は 5' GGATC CTGGA TAAGC GCGAT TTACA GGGCC GT 3' (Forward primer)、5' GGATC CCACT CTGCG CGAGC CAAAC GTACA CT 3' (Reverse primer))、次いでその配列を酵母の GAL4 遺伝子とリンクさせたコンストラクトを作成した。これをショウジョウバエの遺伝子導入用ベクターの1つである pCaSpeR2 に再度クローニングを行い、形質転換

ベクターを作成した。ベクターの模式図を図6に示す。このベクターを pTURBO というヘルパーベクターと混合した DNA 溶液を w^{1118} という目の白い系統の受精卵に注入した。形質転換ベクターには目を赤くする遺伝子がマーカとして挿入されているので、そのベクターが受精卵内で生殖細胞に導入されれば、DNA を注入した個体の次世代において目の赤い個体が産まれる。結果としては、約 450 個の受精卵に DNA を注入し、受精卵から成虫になった 27 匹をそれぞれ交配した。そのうち 22 匹は生殖能力があり、最終的に 2 個体から赤い目の個体が産まれたので、それらの個体をそれぞれ系統化した。

< 今後の課題 >

今年度の助成により、CG15151 遺伝子の系統間における SNP の存在が明らかになり、さらに CG15151 遺伝子が新規の NaCl 受容体の可能性が示唆された。今後は、今回の助成により作成された形質変換体を用いた詳細な発現部位の解析により今回の知見を確認することが必要である。また、今年度は真の意味での CG15151 遺伝子の機能を解析するには至らなかった。今後、培養細胞などへの発現させるといった手法を利用し、この遺伝子の機能をより具体的に解明しなくてはならない。

< 参考文献 >

1. Hiroi, M., Meunier, N., Marion-Poll, F., and Tanimura, T. (2004). Two antagonistic gustatory receptor neurons responding to sweet-salty and bitter taste in *Drosophila*. *J Neurobiol* 61, 333-342.
2. Lindemann, B. (1996). Taste reception. *Physiol Rev* 76, 718-766.
3. Liu, L., Leonard, A.S., Motto, D.G., Feller, M.A., Price, M.P., Johnson, W.A., and Welsh, M.J. (2003). Contribution of *Drosophila* DEG/ENaC genes to salt taste. *Neuron* 39, 133-146.

表 1 CG15151 遺伝子の SNPs

系統名	NaCl 嗜好性	SNPs	アミノ酸置換
Canton-S	有	G275C, A1903G	D622G
Hikone-R	有	C1115T	
Swedish-C	有	C1115T	
OGS-4	無	A2014G, A2018G, C2132T	N659S
Katsunuma-1619	無	C1820T, G1955A, A2014G, A2018G, C2132T	N659S

Canton-S, Hikone-R および Swedish-C は NaCl に対して嗜好性を示す系統であり、OGS-4 および Katsunuma-1619 は示さない系統である。それぞれの系統に見られた SNP の表記は、例えば G275C であれば 275 番目の G が C に変わっていることを示す。なお、塩基配列番号はコーディング領域の最初のメチオニンをコードする ATG の A を 1 とした。また、本来の配列は GeneBank に登録されているショウジョウバエのゲノム配列とした。アミノ酸置換も同様に、最初のメチオニンを 1 とし、D622G であれば 622 番目の D が G に変わったことを示す。略号は D : アスパラギン酸、G : グリシン、N : アスパラギン、S : セリン。

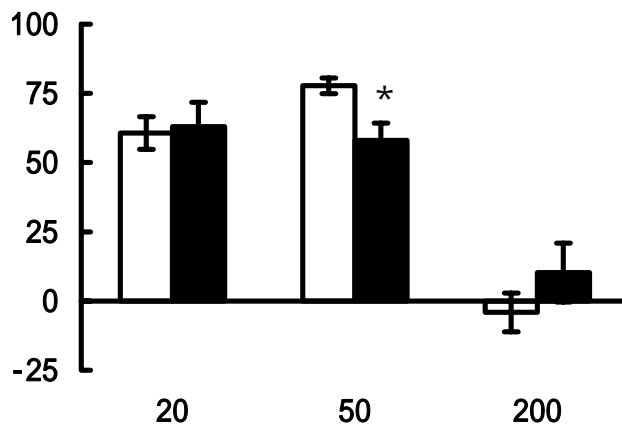


図 1 ショウジョウバエの各 NaCl 濃度に対する嗜好性におけるアミロライドの効果。

縦軸はそれぞれの濃度 (mM) の NaCl と水を選択させた場合の嗜好度をしめし、白いバーは NaCl のみ、黒いバーはさらに 100 μM になるようアミロライドを添加した際の嗜好性を示す。各バーは 8 回の平均値の SE。* は白と黒のバーの間に有為な差があることを表す (P<0.05)。

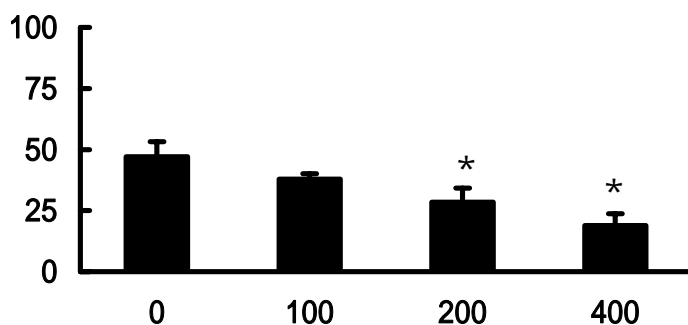


図 2 50 mM NaCl 嗜好性におけるアミロライドの濃度の効果。

縦軸はアミロライドを添加した、50 mM NaCl と水を選択させた場合の NaCl に対する嗜好性を示す。横軸はアミロライドの濃度を μM で示した。各バーは 8 回の平均値の SE。* はアミロライドを添加しなかった場合 (0 μM) の時の嗜好性に対して有為に差があったことを表す ($P < 0.05$)。

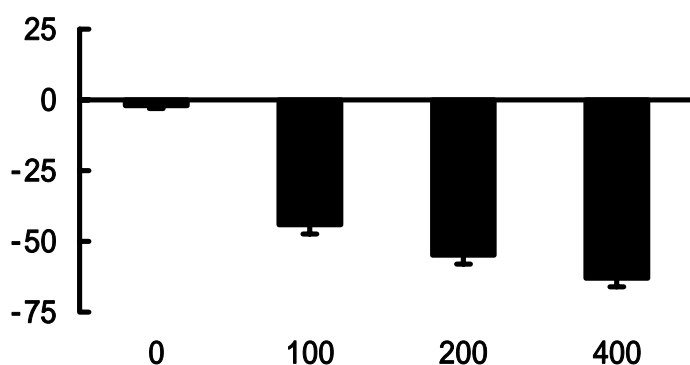


図 3 ショウジョウバエのアミロライドに対する忌避性。

横軸はアミロライドの濃度を μM で表し、縦軸はそれぞれの濃度のアミロライドと水を与えた際のアミロライドに対する嗜好性を示す。100, 200 および 400 μM のいずれにおいても嗜好性は 0 のときと比べて有為に低下した。各バーは 8 回の平均値の SE。

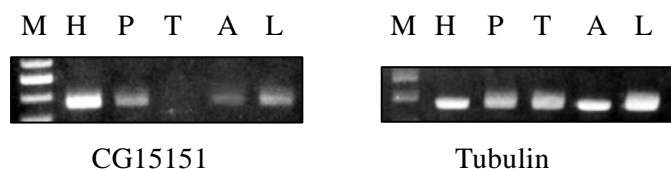


図 4 ショウジョウバエの体の各部位から抽出した RNA による RT-PCR。

左のパネルが CG15151 の RT-PCR の結果を、右がコントロールとしての tubulin の RT-PCR。略号は M: サイズマーカー、H: 頭、P: 吻、T: 胸、A: 腹、L: 脚 全て RNA 量を同じにして RT-PCR を行った。

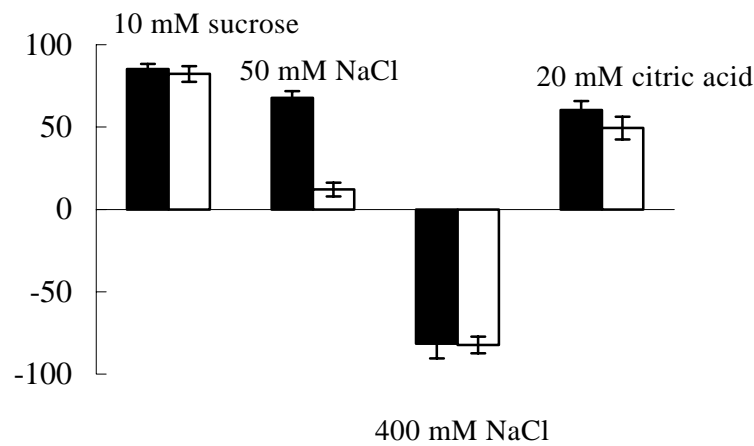


図 5 NaCl 嗜好性に対するふ節の除去の効果。

縦軸はそれぞれの溶液と水を選択させた際の溶液に対する嗜好性。黒いバーは正常なハエの、白いバーは前脚のふ節を除去したハエの嗜好性を示す。各バーは 8 回の平均値の SE。

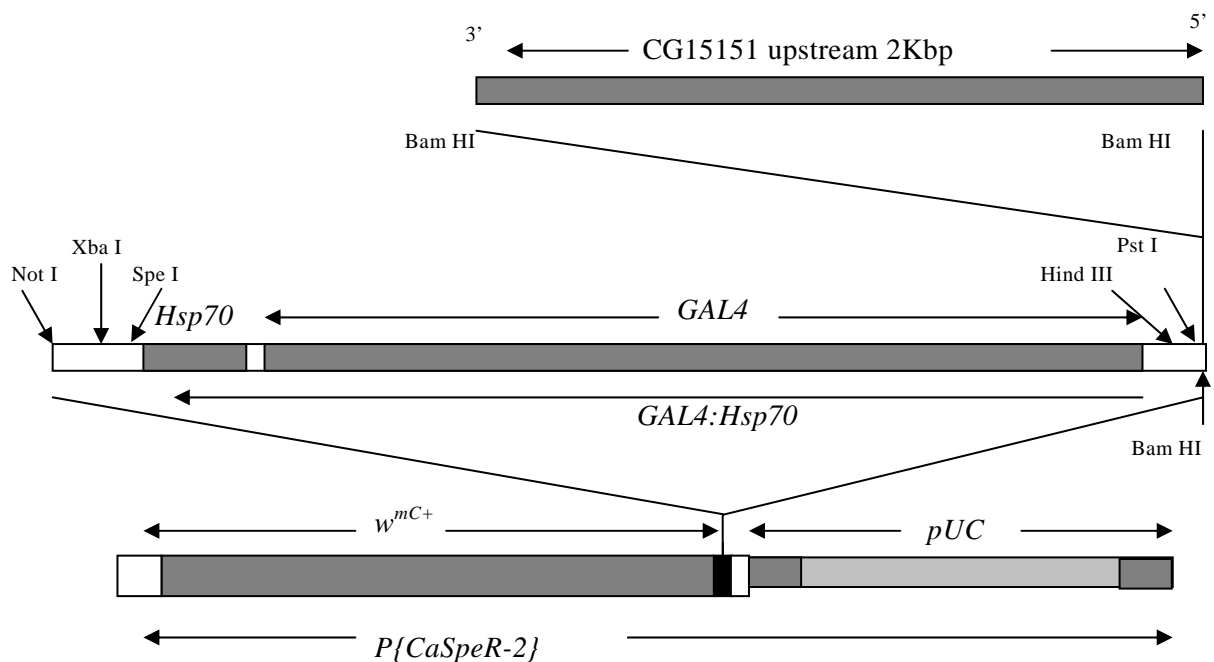


図 6 *CG15151_GAL4* 形質転換用ベクターの模式図。

P{CaSpeR-2} の Not I および Bam HI 制限酵素サイトを利用して *GAL4* 遺伝子の下流に *Hsp70* のターミネーターをリンクさせた配列を挿入し、*GAL4* 遺伝子の上流の Bam HI 制限酵素サイトに *CG15151* の上流 2 Kbp に Bam HI 制限酵素認識配列を連結させた配列を挿入した。

The *Drosophila* novel gene, CG15151, is required for salt preference

Kohei UENO (Gunma University, School of Medicine)

Hiroshi KUROMI (Gunma University, School of Medicine)

Summary

The sodium chloride (NaCl) is a major substance that induces salty taste in various animals. Many animals prefer to low concentration of NaCl and avoid against high concentration of NaCl. Previously, we found that some strains do not show preference for any concentration of NaCl in *Drosophila melanogaster*. Furthermore, we showed that the difference of the NaCl preference among strains were due to a single gene, namely CG15151.

In this study, to examine which differences in CG15151 gene caused the difference of the NaCl preference, we determined the sequence of coding region in CG15151 of various strains (Canton-S, Hikone-R, Swedish-C, OGS-4, Katsunuma-1619 and Oregon-RC). In previous study, Cantons-S, Hikone-R and Swedish-C showed preference for NaCl, while OGS-4, Katsunuma-1619 and Oregon-RC did not show preference. RT-PCR analysis showed that all strains except Oregon-RC express CG15151. By sequencing these RT-PCR products, 695th amino acid residue is substituted serine for asparagine in OGS-4 and Katsunuma-1619. These results confirmed that CG15151 is required for NaCl preference and the 695th amino acid residue, Asparagine, is important.

In behavioral tests, the NaCl preference in *Drosophila* was not eliminated by amiloride, which is antagonist of vertebrate and *Drosophila* NaCl receptor in taste receptor neurons. This result suggests that *Drosophila* Na⁺ receptor, which induces NaCl preference, is not amiloride sensitive Na⁺ channel. And we speculated that CG15151 acts as Na⁺ receptor in *Drosophila*. We also found that CG15151 gene was expressed in labella and legs by RT-PCR analysis. Both organs have taste receptors and are thought as taste organs. We examined which organ is more important for NaCl preference. The NaCl preference in Canton-S flies removed forelegs surgically was eliminated, whereas the sensitivity to sugar, sour and high concentration NaCl was remained in the flies. This result indicates that the NaCl preference requires forelegs and suggests that the taste receptor neurons in forelegs are responsible for the sensitivity to low concentration NaCl.

Finally, to examine whether taste receptor neurons express CG15151 or not, we generated transgenic flies carrying the construct containing upstream sequence of CG15151 and GAL4. Using this transgenic fly, further analysis is required.