

氏名(本籍)	もりた 森田ひろみ (宮城県)
学位の種類	博士(情報科学)
学位記番号	情博第221号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科、専攻	東北大学大学院情報科学研究科(博士課程)システム情報科学専攻
学位論文題目	ショウジョウバエの味受容体突然変異体を用いた甘味受容分子機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 東北大学教授 井樋 慶一 東北大学教授 山本 光璋 東北大学教授 飛田 渉

論文内容要旨

1 緒論

動物の味覚、嗅覚などの化学感覚受容機構についての研究は、近年目覚ましく発展しつつあるものの、未だにリガンド物質を認識する個々の受容体の機能的説明、それらの情報伝達機構、そして脳での情報処理に至る過程の総合的理解には程遠いものがある。

無脊椎動物の甘味受容機構においても然りであったが、ショウジョウバエでひとつの甘味受容体遺伝子をノックアウトすることによりその機能を本研究で初めて解明した。受容体が同定され、その機能が明らかにされたことにより、甘味の情報伝達機構と脳での情報処理機構の研究に大きな手がかりを得たことになるので、今後の発展につながることを期待される。

2 P因子の転移により誘起される欠失突然変異体の作成と分離

ショウジョウバエでは、マウスの遺伝子のノックアウトとは異なる方法であるが、ある特定の遺伝子を標的にして突然変異を誘起することができる。それは動く遺伝子と言われるトランスポゾン(Transposon)の一種、P因子が挿入されたショウジョウバエに遺伝学的操作を加え、酵素(トランスポザゼ)遺伝子によりP因子を活性化して転移させる方法である。染色体上で、ある遺伝子の近傍にあったP因子が転移するとき、近接する本来のゲノムの一部が同時に欠失することがある。欠失したゲノム上にある遺伝子の一部が含まれている場合、その遺伝子の突然変異が得られる。本研究ではこのようにして、受容体遺伝子 *Tre* を欠失し、甘味感覚が異常になったハエを機能的に選別し、系統化することに成功した。これらのハエは特定の糖類に対する甘味感受性において、野生型のハエとは興味深い差異を生ずることが以下の研究結果で明らかにされた。

3 糖摂取量の定量的測定法の確立

本研究で欠失突然変異体の作成に成功した甘味受容体 TRE は、その自然突然変異体においては、甘味感受性に差異をもたらすようなアミノ酸変異を生ずる SNP(single nucleotide polymorphism)を持つ (Ueno et al. *Current Biology* 11, Sep. 18, 2001)。自然突然変異体において野生型のハエとは味感度が異なることは、2種類の糖の選択摂食実験で、野生型のハエは 20 mM トレハロース(二糖類のひとつ)溶液を好んで食べ、また自然突然変異体では 2 mM スクロース(蔗糖)溶液を選ぶことで示された。自然突然変異によって、トレハロースに対する相対的な味感度がスクロースに比べて低下するのである。また TRE の欠失突然変異体では、自然突然変異体よりもさらに顕著にトレハロースに対する相対味感度が低下していることがわかった。

しかし 2 糖選択摂食実験では相対的な味感度はわかるが、1 種類の糖に対する絶対味感度を測定することができなかった。そこで本研究では、糖摂取量を食用色素の吸光スペクトルの強度に置き換えて解析する測定法を確立し、それによって単独の糖に対する絶対味感度を定量的に測定することができた。

絶対摂取量の測定には糖と青色素(brilliant blue FCF)の混合溶液を摂取したショウジョウバエから、青色素をフェノール抽出した後、その吸収曲線の極大値を求めて、摂食量に換算した。この方法により、ハエ 1 匹当たりの糖摂取量(nl/fly)を高い精度(有効数字 2 桁)で測定できることを確認した。

このようにして求めた単独の糖の摂取量においても 2 糖選択摂食実験と同様に、野生型に対し突然変異体では有意に 20 mM トレハロース摂取量が低下していることがわかった。また欠失突然変異体では、自然突然変異体よりさらに顕著に低下が見られた。

4 *Tre* 対立遺伝子とその遺伝子量の味感度に及ぼす効果

ショウジョウバエの X 染色体上にあって、自然界におけるトレハロース感度の二型性が存在することから名前がつけられた遺伝子 *Tre* の対立遺伝子は、*Tre*⁺(野生型)と *Tre*⁰¹(自然突然変異)と呼ばれている。この *Tre*⁰¹(自然突然変異)と、本研究で作成した欠失突然変異は、本当に同じ遺伝子 *Tre* の変異によって味感度に変化を生じたのかどうかを検討するために、両者の交配実験を行った。その雑種第 1 代メスにおいては、2 本の X 染色体のうち、1 本は *Tre*⁰¹ 遺伝子を持ち、そしてもう 1 本は正常な *Tre* を欠失したヘテロの個体ができる。このハエでトレハロース摂食実験を行ったが、味感度は回復しなかった。もしこれらの変異が別々の遺伝子に起因するものであれば、双方の野生型の対立遺伝子が互いに補い合って感度が回復するはずであるので、この欠失突然変異は遺伝子 *Tre* に起こった突然変異であることが証明された。

また遺伝学的に操作して、*Tre* の対立遺伝子間の遺伝子量を変化させた実験からは、*Tre*⁰¹(自然突然変異)は *Tre*⁺(野生型)に対し半優性であるが、欠失突然変異は劣性であることがわかった。すなわち、*Tre*⁰¹(自然突然変異)は *Tre*⁺(野生型)と同様に味細胞にメッセンジャー RNA が発現し、受容体タンパク質を作っていると考えられる。欠失突然変異では、正常なメッセンジャー RNA の発現量が著しく低いと考えられる。欠失突然変異のひとつ *Tre*^{ΔEP19} では、その欠失部位と味感度から機能的なメッセンジャー RNA 発現のないヌル系統と考えられるので、以降の解析で主に用いた。

5 トレハロース濃度応答曲線

甘味受容体 TRE の自然突然変異系統、欠失突然変異系統を用いて、広い濃度領域でトレハロース摂取量を測定し、濃度応答曲線を解析した。野生型系統でも突然変異系統でも、濃度の増大に伴い摂取量が増加し、高濃度領域では摂取量が低下した。またメスではオスの 2 倍近い最大摂取量を示した。一方、自然突然変異系統においても欠失突然変異系統においても、野生型系統と比べて広い濃度範囲で摂取量の低下が見られることがわかった。欠失突然変異系統においては自然突然変異系統より、さらに著しい低下が見られた。また野生型である P 因子挿入親系統と欠失突然変異系統との間の水摂取量には有意な差が見られた。

6 受容体 TRE の糖リガンド特異性

遺伝子 *Tre* は、二糖類のトレハロースに顕著な応答性の差異をもたらすことは既に確かめられているが、多種類ある糖に対するリガンド特異性についてはまだ解析されてはいなかった。本研究では 17 種類の糖類を用いて、信頼度の高い定量的測定法により各糖に対する摂取量を求め、絶対味感度を推定した。数種の単糖、およびそれらを組み合わせた二糖、三糖類を用いた。

予想に反して低濃度領域では、調べたすべての糖に対して欠失突然変異系統では有意な摂取量の低下が認められた。自然突然変異系統でも同様の傾向が認められた。低濃度領域における摂取量の差異は、水のみでの摂取量の差異より有意に高かった。したがって受容体 TRE は、従来考えられていたようなトレハロース特異的な受容体ではなく、広い糖リガンド親和性を持つ受容体であることが、本研究で初めて示唆された。

7 受容体 TRE と糖リガンド結合の濃度依存性

トレハロースに対する濃度応答特性を調べたように、スクロース、フラクトース、グルコースについて、糖濃度依存性をさらに詳しく解析した。トレハロースと同様に、欠失突然変異系統もその親の P 因子挿入系統でも、メスはオスに比べ 2 倍程度の摂食量を示した。また高濃度領域では濃度増大とともに摂食量の減少する傾向が見られた。一方、2 系統間で比べるとスクロースとフラクトースにおいては、10 mM 以下の低濃度領域では摂取量に比較的顕著な差が見られることがわかった。しかしトレハロースのときと異なり、10 mM より高濃度側では両系統の差は顕著ではなくなった。一方、グルコースではトレハロースと同様広い濃度領域で大きな差異が見られた。

したがって受容体 TRE は、糖スペクトルの中でトレハロースやグルコースを含む限られた一部の糖類に比較的高い特異性をもつ受容体であると考えられる。またこの甘味受容体の特徴は甘味応答の閾濃度領域の味覚感度を担う、糖リガンドに対し比較的高い結合親和性をもつ受容体であることが示唆された。この受容体特性は食物選択においては、微量の糖成分を検出するために重要な高感度型受容体であることが推定される。

8 予測される他の甘味受容体の特性

機能的な TRE 受容体をもたない欠失突然変異体でも、スクロースやフラクトースに対しては 10 mM 以上の高濃度側で野生型と変わらないよい摂食応答が見られたので、TRE 受容体とは別の甘味受容体が味応答に関わっており、またその受容体は比較的高濃度側に作動領域をもつ受容体であることが示唆される。トレハロースとグルコースに対しては、欠失突然変異体は広い濃度領域で応答が低下するが、100 mM 以上の高濃度領域では高い応答性を示した。これらの応答性は、受容体 TRE とは別の、そして糖親和性が比較的低い受容体が 1 個あるいはそれ以上存在すると考えるとよく説明ができる。

TRE 受容体とは別の甘味受容体は何であろうか？その受容体は、TRE とは濃度応答特性は異なるものの類似した糖リガンドを結合する甘味受容体であるので、その遺伝子は *Tre* に相同な受容体遺伝子である可能性が高い。そこでショウジョウバエのデータベースから予測されている 50 余りの味受容体候補遺伝子(Gr)から、その候補を以下のように検討した。

Tre(Gr5A) のアミノ酸配列をもちい、相同性検索プログラム Blast-p により検索を行うと、第 3 染色体上にクラスターを作っている 6 個の遺伝子 *Gr64a*, *Gr64b*, *Gr64c*, *Gr64d*, *Gr64e*, *Gr64f*、また同じく第 3 染色体上にやや離れて存在する遺伝子 *Gr61a* の全部で 7 個の *Tre* に相同な Gr 遺伝子が見つかった。これらを Clustal W 法をもちい分子系統樹を作成することにより、進化上最も近縁の遺伝子が、*Gr64e* と *Gr64f* であることがわかった。これら 2 つの候補がはたして推定される甘味受容体であるのかどうか解明が待たれる。

論文審査の結果の要旨

味覚は生命を維持するための摂食行動において不可欠の感覚であるが、ショウジョウバエの味覚受容体候補遺伝子中、最初に同定されたものが *Tre* である。本論文はトレハロース受容体遺伝子 *Tre* 欠失突然変異体の作成を行い、この変異体を用いて *Tre* 蛋白を媒介とした糖摂取行動を性格づけ、*Tre* 蛋白が甘味受容に果たす役割を明らかにしたもので、全編 6 章からなる。

第 1 章は序論である。

第 2 章では、研究の背景が述べられている。

第 3 章では、研究の材料と方法について記述されている。

第 4 章では、実験の結果が記述されている。1.唾腺 X 染色体上で *Tre* 遺伝子座に近い領域に P 因子挿入を有する系統と転移酵素遺伝子を有する系統との交配により作成された欠失突然変異体の中から、*Tre* の遺伝子構造を破壊する欠失を有する系統が分離された。2.選択摂食実験に用いる青色素(B.B.FCF)および赤色素(acid red 27)の最大吸収極大波長が十分離れていることから、2 種色素の摂取量を別々に定量することが可能であり、ハエの色素摂取絶対量を吸光度により測定する方法を確立した。3.自然突然変異型 *Tre*⁰¹ 対立遺伝子を有する *w cv* と 1.で作成した低感度型突然変異系統の交配により得られた F1 個体はいずれもトレハロース低感度型であり、得られた突然変異系統で確かに *Tre* 突然変異が惹起されたことが確かめられた。4.野生型系統と自然突然変異系統間でトレハロース濃度と摂取量の関係(濃度応答曲線)を比較したところ、低濃度領域では摂取量に差を認め、高濃度ではこの差異が認められなかった。*Tre* 欠失突然変異体と親系統での比較からも同様の傾向(低濃度領域でのみ乖離する)が認められた。5.*Tre* 欠失突然変異体では、スクロース、グルコース、フラクトースをはじめとする殆ど全ての糖類で摂取量低下が認められたことから、*Tre* 蛋白は糖一般の受容体であることが明らかとなった。6.スクロース、グルコース、フラクトース濃度応答曲線から *Tre* 欠失突然変異体ではトレハロース同様、低濃度領域で摂取量に差異を認め、これらの糖に対しても *Tre* 蛋白は高感度型受容体であること、さらに、*Tre* 蛋白とは異なる低感度型受容体の存在が示唆された。以上の 3~6 はいずれも新たな発見であり、高く評価される。

第 5 章では、考察が行われ、結論が述べられている。

第 6 章はデータベース資料である。

以上要するに本論文は、*Tre* 蛋白がトレハロースのみならず糖一般の味覚受容を媒介する高感度型受容体であることを初めて明らかにし、さらに、*Tre* 以外の低感度型受容体の存在を強く示唆しているもので、味覚受容の研究発展と情報生物学の進展に寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として合格と認める。