

<学術論文>

プロピオン酸, 乳酸, ピルビン酸に対するショウジョウバエ成虫嗅覚行動応答の OR83b 依存性

坂口雅彦 信州大学教育学部理数科学教育講座
橋本竜宏¹ 信州大学教育学部理数科学教育専攻

キーワード：昆虫, 感覚, 化学受容, 遺伝子ターゲティング, 走性

1. はじめに

嗅覚は、動物にとって餌・交尾相手・捕食者等の発見に重要な感覚である。キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)はモデル生物であるが、嗅覚研究においても先駆的な知見が得られている(Touhara & Vosshall, 2009)。キイロショウジョウバエ成虫には、OR(odorant receptor)発現嗅細胞と IR(ionotropic receptor)発現嗅細胞が存在し、嗅物質受容の情報を中枢に伝えている(Vosshall & Stocker, 2007; Benton et al., 2009)。各 OR 発現嗅細胞には、62 種の OR のうちの OR 1 種(特異的 OR)と、OR 発現嗅細胞に共通して発現している OR83b が共発現している。特異的 OR と OR83b は複合体を形成し、嗅物質受容により開くイオンチャネルとして働く(Sato et al., 2008)。一方、最近発見された IR は、15 種が触角に発現し、ac3B 嗅細胞を除いて、OR と IR の同一嗅細胞での共発現は見られない(Benton et al., 2009)。ある IR を別の IR が発現する嗅細胞に異所発現させると、嗅物質に対する電気生理学的応答に異所発現 IR の応答特性が加わることから、IR は嗅物質受容体と考えられる(Benton et al., 2009)。さらに最近、各 IR 発現嗅細胞に特異的な IR が、IR 発現嗅細胞に広く発現する IR8a や IR25a と複合体を形成し、嗅物質受容により開くイオンチャネルとして働くと考えられる証拠が報告された(Abuin et al., 2011)。このように嗅覚情報は、OR 嗅細胞経路と IR 嗅細胞経路の 2 経路で中枢に伝達される。

特異的 OR が受容する嗅物質に関してはかなり研究されてきた(Hallem & Carlson, 2006)。一方、特異的 IR が受容する嗅物質に関しては一部が明らかになった段階である(Abuin et al., 2011)。ある嗅物質の嗅覚情報が OR 発現嗅細胞と IR 発現嗅細胞の両経路で中枢に伝達される場合、どちらの経路にどの程度依存して伝達されるか解明することは、情報処理機構を研究する上で重要である。

プロピオン酸($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$)は、キイロショウジョウバエ成虫に強い誘引性嗅

¹現所属：佐久市立浅間中学校

覚行動応答を引き起こすが(Rodrigues & Siddiqi, 1978; Saito et al., 2008), IR 発現嗅細胞である ac3A 及び ac2A 嗅細胞に強い興奮を引き起こす(Yao et al., 2005)。一方, 触角に発現する OR24 種のうち, プロピオン酸に応答する OR は低興奮性(50 発/秒以下)ではあるが複数存在する(Hallem & Carlson, 2006)。従って, プロピオン酸受容の情報は主に IR 経路で伝達されるが OR 経路でも一部伝達されると考えられる。プロピオン酸と化学構造の似ている乳酸($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$)及びピルビン酸(CH_3COCOOH)も, プロピオン酸と同様, キイロショウジョウバエ成虫に誘引性行動応答を引き起こすが, IR 発現嗅細胞で受容されるという報告はまだない。一方, 乳酸, ピルビン酸に応答する OR は低興奮性ではあるが各々複数存在する(Hallem & Carlson, 2006)。そこで, プロピオン酸, 乳酸, ピルビン酸に対する嗅覚行動応答が, どの程度 OR 経路と IR 経路の嗅覚情報に依存しているかを調べるため, OR83b 遺伝子破壊(OR83b-KO)体を用いて OR 経路嗅覚情報を遮断し, IR 経路嗅覚情報のみを残したハエでの嗅覚行動応答を調べた。OR83b 発現を Gal4-UAS 系により救助した OR83b 発現救助体の応答も調べた。その結果, 成虫ではプロピオン酸に対する嗅覚行動応答が主に IR 経路に依存し, 乳酸に対する嗅覚行動応答は主に OR 経路に依存することが明らかになった。

2. 材料と方法

2.1 キイロショウジョウバエ

すべての実験において, 標準培地で 25°C にて飼育した個体を用いた。羽化して 2 日~1 週間の成虫個体を実験に使用した。無麻酔で吸虫管を用いて♂と♀に分け実験に用いた。用いた系統は以下の通りである。括弧内は左から順に第 1, 第 2, 第 3 染色体の遺伝子型を示す。

- 1) CS3 系統(+; +; +)
- 2) No.265 系統(w; OR83b-Gal4 11.17; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17)
- 3) No.268 系統(w; UAS-OR83b 13.20; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17)

CS3 系統は, 野生型標準系統である Canton-S の各染色体をバランス染色体により同質化した系統である。No.265 及び No.268 系統はロックフェラー大学 Vosshall 博士から分譲して頂いた系統であるが, 第 3 染色体上にある OR83b 遺伝子を遺伝子ターゲティングにより破壊してある(Larsson et al., 2004)。No.265 系統は, 第 2 染色体に OR83b 遺伝子の上流プロモータ領域と Gal4 遺伝子を結合させた transgenic DNA が挿入されており, OR83b を通常発現する細胞である OR 発現嗅細胞で Gal4 タンパクが産生される(Larsson et al., 2004)。No.268 系統は, 第 2 染色体に UAS 配列と正常 OR83b 構造遺伝子を結合させた transgenic DNA が挿入されている。Gal4 タンパクが存在する細胞では, Gal4 タンパクが UAS 配列に結合し, 下流の正常 OR83b 構造遺伝子の転写翻訳が起こるが, No.268 系統には Gal4 タンパク

が存在しないため、これは起こらない。

OR83b 破壊体における嗅覚行動応答を調べるために、OR83b 破壊体(No.265,及び No.268 系統)と control(CS3 系統)の成虫を用いた。OR83b 発現救助体における嗅覚行動応答を調べるために、No.265 系統と No.268 系統を交配し、得られる次世代 w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17 を用いた。この Or83b 発現救助体では、OR 発現嗅細胞で正常な OR83b タンパクの産生が回復することが期待されるが、発現量により部分的な回復となる場合もある (Larsson et al., 2004)。

2.2 化学物質

プロピオン酸, L 乳酸, ピルビン酸は和光純薬工業の特級を用いた。

2.3 成虫嗅覚行動実験と応答率

成虫嗅覚行動実験には Saito et al.(2008)が用いた静置自然揮発法による 2 選択実験を用いた。20 cm 縦×30 cm 横×15 cm 高さの蓋付きプラスチック容器の蓋に縦 6 cm×横 12 cm の穴をあけ、ナイロンの網を取り付けた。プラスチック容器内に、ねじ口試験管(口部内径 10 mm, 内部内径 15 mm, 高さ 75 mm)2 本を立て、片方にコントロールとして蒸留水, もう片方に蒸留水に溶かした嗅物質溶液をそれぞれ 2 ml 入れた。キイロショウジョウバエ成虫の♂100 匹または♀100 匹を容器内に放し、24 時間後にねじ口試験管にトラップされた個体数を数えた。一度トラップされた個体が逃げないように、不揮発性の Triton-X100 を両ねじ口試験管に 0.01% 加えた。ほとんどの個体は水にも誘引されるため、24 時間後にはどちらかのねじ口試験管にトラップされる(Saito et al., 2008)。それぞれのねじ口試験管にトラップされたハエとトラップされなかったハエの数を集計し、Rodrigues & Siddiqi(1978)の用いた応答率(Response Index ; R. I.)を算出した。応答率は(嗅物質側に入った個体数 - コントロール側に入った個体数) / (容器に放った個体総数)で表される。応答率は -1 ~ +1 の間の値をとる。-1 は完全な忌避, +1 は完全な誘引を示す。0 は嗅物質を誘引及び忌避しないか、または感じないということになる。この計算式では、どちらのトラップにも入らなかった個体数(untrapped)も式の分母に含まれることになる。これは、誘引されなかった個体は中立であると捉えたからである。また静置自然揮発法では、2 つのトラップに加えられる蒸留水に誘引性があるため(Saito et al., 2008), 嗅物質溶液側にトラップされた個体の中には、蒸留水に誘引された個体が含まれる可能性がある。その分を差し引くために、応答率算定において嗅物質側にトラップされた個体数を、嗅物質の入っていない瓶(control)にトラップされた個体数で引くのである。

なお、この実験のデータ処理は、1 つの条件に対して原則として 8 回の実験を繰り返し実施し、応答率を求めてから平均と標準誤差を求めた。各嗅物質に対する応答率の差に関する統計的検定にはノンパラメトリック検定であるウィルコ

クソンの順位和検定(マンホイットニーの U 検定)を用いた。有意水準には 5%と 1%を用いた(いずれも両側検定)。また、嗅覚行動応答の OR83b 依存性を明確に示すため、OR83b が機能している野生型 CS3 の応答率を 100 (%)とする相対応答率と相対応答低下率で OR83b 破壊体と OR83b 発現救助体の応答を評価した。安定した応答率を示す嗅物質濃度での OR83b 依存性を見るため、Saito et al.(2008)の結果より、プロピオン酸 0.8%, L 乳酸 8%, ピルビン酸 12.5%での応答を調べた。

3. 結果と考察

3.1 プロピオン酸に対する嗅覚行動応答の OR83b 依存性

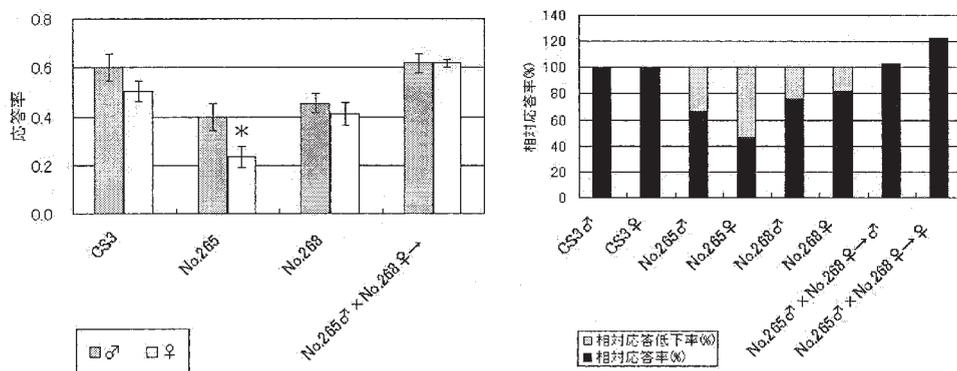


図1 野生型, OR83b 破壊体, OR83b 発現救助体の 0.8%プロピオン酸に対する成虫嗅覚行動応答

左図：野生型(CS3), OR83b 破壊体(No.265, No.268), OR83b 発現救助体(No.265♂ X No.268♀交配の次世代)の応答率の平均値(n=8)と標準誤差。*は同性の野生型応答率と統計的に有意であることを示す(P<0.05)。右図：同性の野生型の応答率を 100 とした時の各個体の相対応答率と相対応答低下率。遺伝子型 No.265: w ; OR83b-Gal4 11.17 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17。No.268: w ; UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17。OR83b 発現救助体: w ; OR83b-Gal4 11.17 / UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17。

プロピオン酸は野生型成虫に強い誘引性嗅覚行動応答を引き起こす。OR83b 破壊体(No.265 と No.268)の応答率は野生型応答率の 46%~81%であり、野生型に比べ低下したが、この低下が統計的に有意であったのは 5%有意水準で No.265 ♀のみであり、有意水準 1%では有意でなかった(図 1)。これらの OR83b 破壊体での応答低下は、OR83b 救助体では野生型と同程度に回復した。これらの結果は、プロピオン酸に対し低い興奮性を示す OR 発現嗅細胞がある(Hallem & Carlson, 2006)ものの、強い興奮性応答を示すのは IR 発現嗅細胞である(Yao et al., 2005)という報告に矛盾しない結果である。従って、プロピオン酸に対する嗅覚行動応答は OR 経路で中枢に伝達される情報も関係するものの、主に IR 経路で伝達される

情報で引き起こされると考えられる。

3.2 L 乳酸に対する嗅覚行動応答の OR83b 依存性

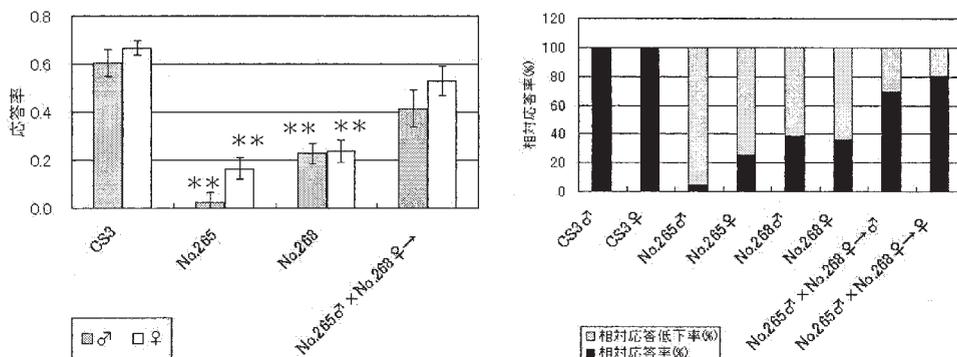


図2 野生型, OR83b 破壊体, OR83b 発現救助体の 8%L 乳酸に対する成虫嗅覚行動応答

左図：野生型(CS3), OR83b 破壊体(No.265, No.268), OR83b 発現救助体(No.265♂ X No.268♀交配の次世代)の応答率の平均値(n=8)と標準誤差。**は同性の野生型応答率と統計的に有意であることを示す(P<0.01)。右図：同性の野生型の応答率を 100 とした時の各個体の相対応答率と相対応答低下率。

L 乳酸は、蒸気圧が非常に低く、揮発性がほとんどない物質であるが(日本化学会, 1996), 野生型成虫に強い誘引性嗅覚行動応答を引き起こす。OR83b 破壊体(No.265 と No.268)の応答率は、プロピオン酸での結果とは対照的に野生型の応答率の 4%~38%であり、野生型に比べ著しく低下した(図 2)。この低下は OR83b 破壊体すべてにおいて有意水準 1%で統計的に有意であった。これらの OR83b 破壊体での応答率は、OR83b 救助体では 69%~80%まで回復した。これらの結果は、プロピオン酸とは異なり、L 乳酸に対する行動応答には OR 経路で中枢に伝達される情報が重要であることを示している。

3.3 ピルビン酸に対する嗅覚行動応答の OR83b 依存性

ピルビン酸も野生型成虫に強い誘引性嗅覚行動応答を引き起こす。OR83b 破壊体(No.265 と No.268)の応答率は、野生型の応答率の 0%~31%であり、L 乳酸での結果と同様に、野生型に比べ著しく低下した(図 3)。この低下は OR83b 破壊体すべてにおいて有意水準 1%で統計的に有意であった。これらの OR83b 破壊体での応答率は、OR83b 救助体では 30%~70%まで回復したが、依然、野生型の応答率とは統計的に有意であった(p<0.01)。これらの結果は、L 乳酸と同様に、ピルビン酸に対する行動応答には、OR 経路で中枢に伝達される情報が重要であることを示している。

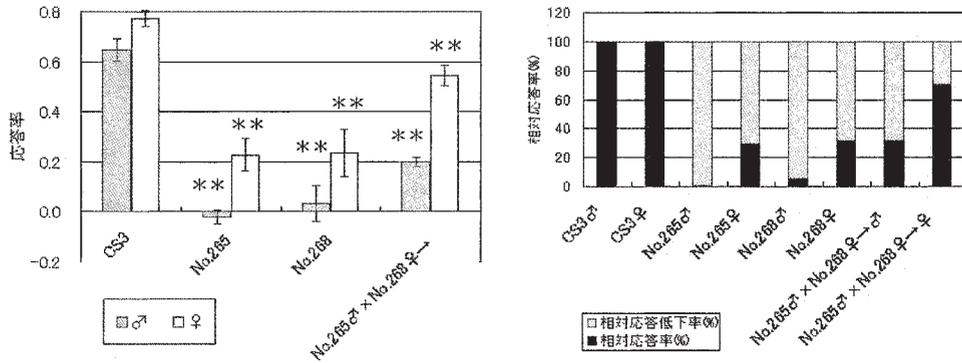


図3 野生型, OR83b 破壊体, OR83b 発現救助体の 12.5%ピルビン酸に対する成虫嗅覚行動応答
 左図: 野生型(CS3), OR83b 破壊体(No.265, No.268), OR83b 発現救助体(No.265♂ X No.268♀交配の次世代)の応答率の平均値(n=8)と標準誤差。**は同性の野生型応答率と統計的に有意であることを示す(P<0.01)。右図: 同性の野生型の応答率を 100 とした時の各個体の相対応答率と相対応答低下率。

4. まとめ

プロピオン酸($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), L 乳酸($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$), ピルビン酸(CH_3COCOOH)は, わずかな化学構造の違いしかない。これらの類似した嗅物質の受容によって引き起こされる誘引性行動応答は, プロピオン酸では主に IR 経路に依存し, OR 経路の寄与はわずかであった。これに対し, L 乳酸とピルビン酸では, OR 経路の情報が重要であることが判明した。L 乳酸とピルビン酸に対する行動応答を引き起こすのに, OR 経路の情報だけで十分であるのか, OR 経路と IR 経路の両方の情報が必要であるかの解明には, 今後, IR 経路の情報を特異的に遮断できる方法の開発が必要であろう。

謝辞

本研究を行うに当たって, Or83b 破壊体はロックフェラー大学 Vosshall 博士から分譲して頂いた。ここに感謝いたします。

引用文献

- Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S., and Benton, R. (2011) Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron*, 13, 69(1), 44-60.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., and Vosshall, L. B. (2009) Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136,

149-162.

Hallem, E. A., and Carlson, J. R. (2006) Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, 125, 143-160.

Larsson, M. C., Domingos, A. I., Jones, W. D., Chiappe, M. E., Amrein, H., and Vosshall, L. B. (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*. 43, 703-714.

日本化学会 (1996) 化学便覧基礎編 II 第4版, 丸善

Rodrigues, V., and Siddiqi, O. (1978) Genetic analysis of chemosensory pathway. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 87B, 147-160.

Saito, Y., Aoki, Y., Karaki, R., and Sakaguchi, M. (2008) Olfactory-mediated Behavioral Responses to Lactic Acid Enantiomers in Adult *Drosophila melanogaster*. 信州大学教育学部紀要, 121, 103-114.

Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L. B., and Touhara, K. (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature*, 452, 1002-1006.

Touhara, K., and Vosshall, L. B. (2009) Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.*, 71, 307-332.

Vosshall, L. B. and Stocker, R. F. (2007) Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 505-533.

Yao, C. A., Ignell, R., and Carlson, J. R. (2005) Chemosensory coding by neurons in the coeloconic sensilla of the *Drosophila* antenna. *J. Neurosci.*, 25, 8359-8367.

(2011年10月11日 受付)

(2012年1月20日 受理)