

<学術論文>

プロピオン酸, ピルビン酸に対するショウジョウバエ幼虫 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
鈴木 梢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、動物にとって餌の発見など生存のために重要な感覚である。キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)ゲノムには、嗅物質受容体遺伝子として、OR(odorant receptor)遺伝子群と IR(ionotropic receptor)遺伝子群が存在する(Couto et al., 2005; Benton et al., 2009)。成虫での研究により、OR-OR83b 発現嗅細胞と IR 発現嗅細胞が、嗅物質受容の情報の中枢に伝達することが判明している。OR 発現嗅細胞には、それぞれに特異的な OR が1種と、嗅細胞共通の OR83b とが共発現し(Larsson et al., 2004; Kreher et al., 2005; Fishilevich et al., 2005), OR-OR83b 複合体が嗅物質受容により開く陽イオンチャネルとして働く(Sato et al., 2008)。IR 発現嗅細胞には、それぞれに特異的な IR 2~4種が発現し、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報告された(Abuin et al., 2011)。

幼虫は、成虫と同じく発酵した植物体を餌として成長するが、各種嗅物質に対して誘引行動または忌避行動を示す(Ayyub et al., 1990; Fishilevich et al., 2005; Kreher et al., 2008; Benton et al., 2009)。幼虫の嗅覚器は、幼虫体前方背側部に左右1対存在する Dorsal organ(DO)であり、成虫嗅覚器とは発生起源も形態も異なり、変態時に消失する(Stocker, 1994)。DO 中にあるわずか 21 個の嗅細胞が嗅物質を受容し、中枢へ情報を伝達する(Singh & Singh, 1984; Python & Stocker, 2002)。21 個の嗅細胞には、それぞれに特異的な OR が1種と、全嗅細胞に共通する OR83b とが発現している(Larsson et al., 2004; Kreher et al., 2005; Fishilevich et al., 2005)。

幼虫はプロピオン酸、乳酸、ピルビン酸などの酸に対し誘引性の嗅覚行動応答を示す(Ayyub et al., 1990; 坂口ら, 2010)ので、幼虫には酸の嗅覚に関係する受容体が存在するはずである。乳酸とピルビン酸は不明であるが、プロピオン酸を含む酸の嗅覚に関係する受容体について、キイロショウジョウバエ成虫では IR がそ

¹現所属：信州大学教育学部附属幼稚園

の受容体であるとの報告が最近なされた(Benton et al., 2009; Ai et al., 2010)。しかし、幼虫に IR が発現しているかは現在不明である。坂口(2010)は、L 乳酸に対するキイロショウジョウバエ幼虫嗅覚行動応答の OR83b 依存性を検討し、OR83b 遺伝子破壊体では誘引性の嗅覚行動応答がほぼ完全に消失すること、OR83b 遺伝子救助体では、応答が野生型と同等にまで回復することを報告した。この結果は、幼虫では L 乳酸の嗅覚に関係する受容体は OR であることを示唆している。そこで本研究では、成虫で IR が主たる受容体であることが判明しているプロピオン酸、そして乳酸に構造が類似しているピルビン酸に対する幼虫の嗅覚行動応答を、OR 経路嗅覚情報が遮断された OR83b 遺伝子破壊(OR83b-KO)体で調べた。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、幼虫ではプロピオン酸に対する嗅覚行動応答が OR83b に強く依存してい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。成虫を培地の入った飼育瓶に移し、24 時間産卵させた後、成虫を取り除いた。3 日後、孵化し、3 令幼虫前期～中期に成長した幼虫個体を実験に使用した。用いた系統は以下の通りである。括弧内は前から第 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 5' 側プロモータ領域と 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)の幼虫を用いた。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, ピルビン酸は和光純薬工業の特級を用いた。

2.3 幼虫嗅覚行動実験と応答率

Aceves-Pina & Quinn (1979)により考案され, Monte et al.(1989)によって改良された幼虫嗅覚行動実験の方法を用い, 応答率を算出し, 行動応答を数値化し評価した。詳細は坂口(2010)にある通りである。プロピオン酸, ピルビン酸は原液 25 μ l を嗅物質側(S 側)に, 蒸留水 25 μ l をコントロール側(C 側)に添加し, 幼虫約 100 匹をアッセイプレートの中央に置き, 蓋をして遮光し放置した。5 分後, アッセイプレートの S 側と C 側にいる幼虫を数えた。S 側にいた個体数を S, C 側にいた個体数を C として以下の式に示すように応答率(Response index: R.I.)を算出した。中央の直径 1cm のサークル内にとどまっている幼虫(little motility)は採集の過程で何らかの傷害を受け, 動けなくなっている可能性があるため個体数から除外した。

$$R.I. = \frac{S - C}{S + C}$$

応答率は理論的に-1~1 の間の値をとる。1 は完全に嗅物質(S 側)に誘引されたこと, -1 は完全に嗅物質(S 側)を忌避したことを示す。0 は嗅物質を知覚したが誘引も忌避も示さなかったか, 嗅物質を感じるができなかったことを示す。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検定法を用いた。有意水準には 1%を用いた(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。

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

プロピオン酸は野生型幼虫に強い誘引性嗅覚行動応答を引き起こす。OR83 破壊体(No.265 と No.268)の応答率は野生型応答率の 3.1%~23.1%しかなく, 野生型に比べ著しく低下した。この低下は統計的に有意であった(有意水準 1%)(図 1)。これらの OR83b 破壊体での応答低下は, OR83b 救助体では野生型の値の 86.2%に回復した。これらの結果は, 幼虫におけるプロピオン酸に対する嗅覚行動応答には, OR 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。

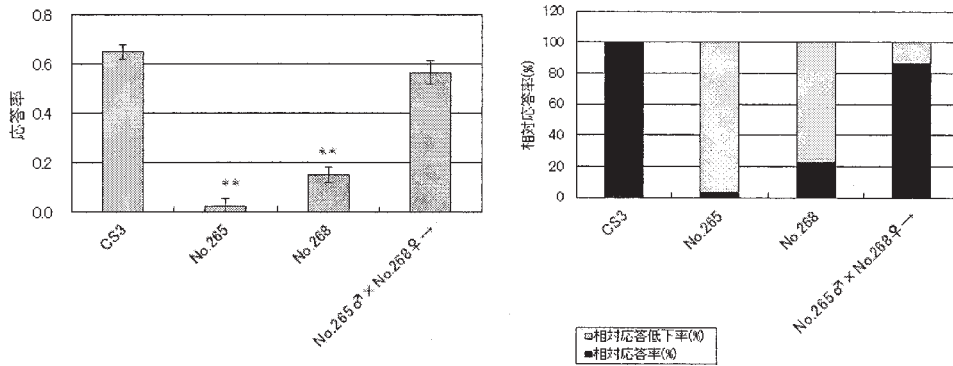


図1 野生型, OR83b 破壊体, OR83b 発現救助体のプロピオン酸に対する幼虫嗅覚行動応答

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：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。

3.2 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、野生型幼虫に強い誘引性嗅覚行動応答を引き起こす。OR83b 破壊体の応答率は、野生型の応答率の 50%~58.3%であり、野生型に比べ約半分に低下した(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。OR83b 救助体では野生型応答率の 68.8%まで回復したが、OR83b 破壊体と有意差はなく、野生型応答率と依然有意差があった(p<0.01)。OR83b 救

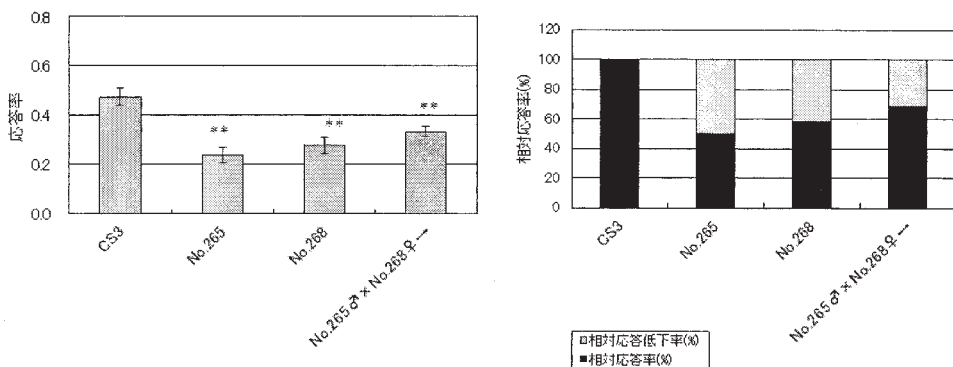


図2 野生型, OR83b 破壊体, OR83b 発現救助体のピルビン酸に対する幼虫嗅覚行動応答

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：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。

助体で有意な回復が見られなかったことの原因は、OR83b の発現回復が十分でなかった可能性があるが(Larsson et al., 2004), OR83b 破壊体で野生型の約半分の応答が残ったことの原因は不明である。ピルビン酸の嗅覚に IR のような OR 以外の受容体が関与している可能性もある。いずれにしてもこれらの結果は、ピルビン酸に対する幼虫嗅覚行動応答にも、応答の半分については OR で中枢に伝達される情報が必要であることを示している。

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($\text{CH}_3\text{COCO}\text{OH}$)は、わずかな化学構造の違いしかない。坂口(2010)の L 乳酸での結果と今回の結果を総合的に考えると、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幼虫の誘引性嗅覚行動応答は、いずれも OR 経路に強く依存していることを示唆している。幼虫に IR 受容体の発現があるかどうかは依然不明であるが、成虫では発現せず、幼虫でだけ発現する OR がこれらの酸の嗅覚に関係する受容体である可能性が高いと考えられる。

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.
- Aceves-Pina, E. O., and Quinn, W. G. (1979) Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. *Science*, 206, 93-96.
- Ai, M., Min, S., Grooosssjean, Y., Leblanc, C., Bell, R., Benton, R., and Suh, G. S. B. (2011) Acid sensing by the *Drosophila* olfactory system. *Nature*, 468, 691-695.
- Ayyub, C., Paranjape, J., Rodrigues, V., and Siddiqi, O. (1990) Genetics of olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.*, 6, 243-262.
- 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.
- Couto, A., Alenius, M., and Dickson, B. J. (2005) Molecular, anatomical, and functional

- organization of the *Drosophila* olfactory system. *Curr. Biol.*, 15, 1535-1547.
- Fishilevich, E., Domingos, A. I., Asahina, K., Naef, F., Vosshall, L. B., and Louis, M. (2005) Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 15, 2086-2096.
- Kreher, S. A., Kwon, J. Y., and Carlson, J. R. (2005) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva. *Neuron*. 46, 445-456.
- Kreher, S. A., Mathew, D., Kim, J., and Carlson, J. R. (2008) Translation of sensory input into behavioral output via an olfactory system. *Neuron*, 59, 110-124.
- 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.
- Monte, P., Woodard, C., Ayer, R., Lilly, M., Sun, H., and Carlson, J. (1989) Characterization of the larval olfactory response in *Drosophila* and its genetic basis. *Behav. Genet.*, 19, 267-283.
- Python, F., and Stocker, R. F. (2002) Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J. Comp. Neurol.*, 445, 374-387.
- 坂口雅彦 (2010) ショウジョウバエ幼虫乳酸嗅覚行動応答の OR83b 依存性, 信州大学教育学部研究論集, 3, 93-100.
- 坂口雅彦, 荒井大輔, 武田宏美 (2010) 乳酸鏡像異性体に対するショウジョウバエ幼虫嗅覚行動, 信州大学教育学部研究論集, 2, 45-57.
- 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.
- Singh, R. N., and Singh, K. (1984) Fine structure of the sensory organs of *Drosophila melanogaster* Meigen larva (Diptera: Drosophilidae). *Int J. Insect Morphol. Embryol.*, 13, 255-273.
- Stocker, R. F. (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res.*, 275, 3-26.

(2011年10月11日 受付)

(2012年1月20日 受理)