

<学術論文>

## シヨウジョウバエ幼虫乳酸嗅覚行動応答の OR83b 依存性

坂口雅彦 信州大学教育学部理数科学教育講座

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。キイロシヨウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)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 等, 1990 ; Fishilevich 等, 2005 ; Kreher 等, 2008 ; Benton 等, 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 と Singh, 1984; Python と Stocker, 2002)。21 個の嗅細胞には、それぞれに特異的な odorant receptor (OR)が 1 種と、全嗅細胞に共通する OR83b とが発現している (Larsson 等, 2004 ; Kreher 等, 2005 ; Fishilevich 等, 2005)。Larsson 等(2004)は、遺伝子ターゲティングにより OR83b 遺伝子を破壊した幼虫では 36 種の嗅物質に対する嗅覚行動応答が消失すること、救助実験において OR83b の発現を回復させるとそのうち 25 種の嗅物質に対する嗅覚行動応答が回復することを示し、嗅覚行動応答が OR83b に依存することを示した。その後、各嗅細胞特異的 OR と OR83b とは複合体を形成すること (Neuhaus 等, 2004) ,この複合体は嗅物質の結合によって直接開く陽イオンチャネルであることが明らかになっている (Sato 等, 2008)。幼虫で発現する OR には、成虫と共通な OR と幼虫にだけ発現する OR があり系統による違いがあるようである (Kreher 等, 2005 ; Fishilevich 等, 2005 ; Kreher 等, 2008)。このように幼虫の嗅細胞数は成虫嗅細胞数 (半側約 1300 個, Hallem と Carlson, 2004) に比べ極端に少ないにもかかわらず、各種嗅物質に対して誘引行動、忌避行動、さらに嗅覚記憶学習能を示すため、研究対象として注目されている。

酵母菌、乳酸菌、プロピオン酸菌、酢酸菌による植物体発酵の最終産物はそれぞれエタノール  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、乳酸  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ 、プロピオン酸  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ 、酢酸  $\text{CH}_3\text{COOH}$  である。乳酸には不斉炭素が 1 つ存在するため、D 体と L 体の 2 種の鏡像異性体が存在する。坂口等 (2009) は乳酸鏡像異性体 2 種それぞれに対するキイロシヨウジョウバエ幼虫の嗅覚行動応答を調べ、その結果、1) L 乳酸も D 乳酸も単独で誘引行動を解発すること、2) L 乳酸と D 乳酸で誘引行動を解発す

る閾値に大きな差があり、L 乳酸に対する閾値が低いこと、3) 気相中の密度を考えれば、L 乳酸はプロピオン酸より高感度に誘引行動を解発すること、4) 同濃度の L 乳酸と D 乳酸の 2 選択実験では、L 乳酸に対して特異的に誘引されることを明らかにした。乳酸は極性を持つ分子であるため、揮発しにくく、乳酸の蒸気圧は、122°C で 14mmHg、1mmHg 下での沸点は 85°C である (日本化学会,1996)。このように揮発しにくい乳酸は、20°C での蒸気圧の記載がないほどであり、その乳酸が高感度に受容され誘引行動を引き起こすことは、ショウジョウバエ幼虫にとって乳酸嗅覚が個体の生存のために非常に重要であることを示している。

幼虫において乳酸は、他の嗅物質と同様に DO 中の嗅細胞において、特異的 OR と OR83b とが形成する陽イオンチャネルで受容されると考えられていた。ところが最近、新たな嗅物質受容体遺伝子として ionotropic receptor (IR) 遺伝子が発見され、成虫で IR は OR 及び Or83b が発現していない細胞で嗅物質を受容すること、すなわち OR-OR83b 複合体を介さない嗅物質受容があることが示された (Benton 等, 2009)。幼虫で IR が発現しているかは現在不明であるが、IR が発現する嗅細胞が幼虫において DO 中の嗅細胞以外にある可能性、DO 中の嗅細胞が特異的 OR 及び OR83b に加え IR も発現し、一部の嗅物質が OR-OR83b 複合体を介さないで受容される可能性も考えられるようになった。そこで本研究では、幼虫の乳酸に対する嗅覚行動応答が OR83b に依存するかを検討するため、遺伝子ターゲティングにより OR83b 遺伝子が破壊された幼虫で乳酸に対する嗅覚行動応答が消失するか、救助実験により DO 中の嗅細胞で正常な OR83b 発現を回復させ、乳酸に対する嗅覚行動応答が回復するかを調べた。その結果、幼虫における乳酸嗅覚行動応答は OR83b 発現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。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) 系統 CS 4 (+; +; +)
- 2) 系統 KO264 (w ; OR83b-Gal4 11.17 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32)
- 3) 系統 KO267 (w ; UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32)
- 4) 系統 KO265 (w ; OR83b-Gal4 11.17 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17)
- 5) 系統 KO268 (w ; UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17)

系統 CS 4 は、野生型標準系統である Canton-S の各染色体をバランサー染色体により同質化した系統である。系統 KO264,267,265,268 はロックフェラー大学

Voshall 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 等, 2004)。OR83b[1]と OR83b[2]は 2 種の遺伝子ターゲティングを示している。系統 KO264,265 は、第 2 染色体に OR83b 遺伝子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 DO 中の嗅細胞で Gal4 タンパクが産生される(Larsson 等, 2004)。系統 KO267,268 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がある場合は、その細胞で 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、系統 KO267,268 には Gal4 タンパクが存在しないため、これは起こらない。

Or83b 破壊体における乳酸嗅覚行動応答を調べるためには、Or83b 破壊体(系統 KO264,267,265,268)と control(系統 CS4)の幼虫を用いた。Or83b 救助個体における乳酸嗅覚行動応答を調べるためには、系統 KO264 と系統 KO267 を交配し、得られる次世代幼虫 w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32 と、系統 KO265 と系統 KO268 を交配し、得られる次世代幼虫 w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17 を用いた。これらの幼虫では、DO 中の嗅細胞でだけ正常な OR83b タンパクの産生が回復する(Larsson 等, 2004)。

## 2.2 化学物質

今回嗅物質として、L 乳酸(和光純薬工業特級)を用いた。

## 2.3 幼虫嗅覚行動実験と応答率

Aceves-Pina と Quinn (1979)により考案され、Monte 等(1989)によって改良された幼虫嗅覚行動実験の方法を用い(図 1)、応答率を算出し、行動応答を数値化し評価した。溶かした 1.1%寒天溶液 10mlを円型シャーレ(直径 90mm×高さ 10mm)に流し入れ、室温で放置し固化させ、アッセイプレートを作製した。幼

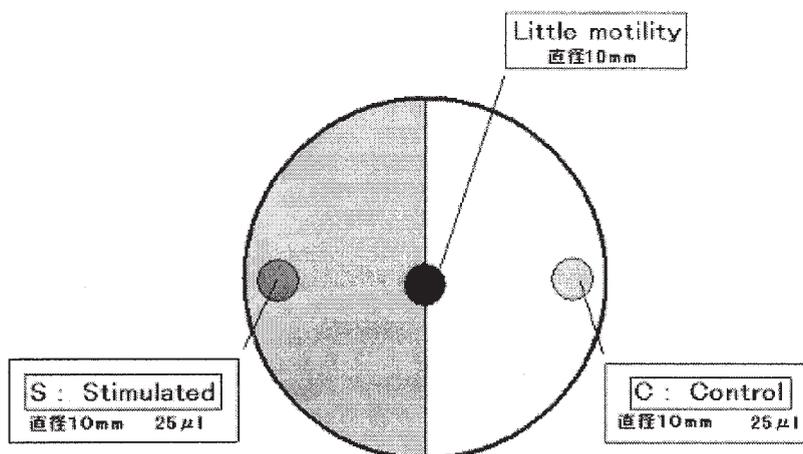


図 1 幼虫嗅覚行動実験のアッセイプレート説明図

虫を培地から取り出すため、飼育瓶に15%スクロース水溶液を加え、筆を使って培地をやさしく攪拌し、浮いてきた幼虫を、先を切りなめしたパスツールピペットでピーカーに移した。幼虫を蒸留水で2~3回洗浄し2.5%寒天プレートに移し、30分~1時間休ませた。アッセイプレートの両側に、直径10mmのろ紙をシャーレの縁から3mmの位置に置き、その片方(S側)に25 $\mu$ lのL乳酸原液を添加した。反対側のろ紙(C側)には同量の蒸留水を添加した。その直後、幼虫50~100匹程度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。

### 3. 結果

#### 3.1 OR83b 破壊個体における幼虫乳酸嗅覚行動応答

野性型及び遺伝子ターゲットングを用いた Or83b 破壊個体の幼虫において、乳酸に対する嗅覚行動応答を調べた(図2)。野性型 CS4 幼虫の乳酸に対する応答率は  $0.63 \pm 0.05$  (平均値  $\pm$  標準誤差,  $n=8$ ; 以後同様の表記とする)であった。これに対して、OR83b 破壊個体幼虫の乳酸に対する応答率は、KO264 が  $0.25 \pm 0.06$  ( $n=8$ ), KO265 が  $0.05 \pm 0.04$  ( $n=8$ ), KO267 が  $-0.01 \pm 0.08$  ( $n=8$ ), KO268 が  $0.09 \pm 0.03$  ( $n=8$ )であり、応答率はそれぞれ野性型の 39.7%, 7.9%, 0%, 14.3%と大幅に低下した。この OR83b 破壊個体幼虫の応答率は、野性型の応答率に対して統計的に有意差を示した(KO264 は  $P=0.002$ , それ以外  $P$  は 0.000 以下)。これらの結果は、乳酸に対する幼虫嗅覚応答は Or83b が破壊されると大幅に低下し、1系統(KO264)では4割応答が残るものの、他系統ではほとんどみられなくなることを示している。

#### 3.2 OR83b 発現救助個体における幼虫乳酸嗅覚行動応答

救助実験により DO 中の嗅細胞で正常な OR83b 発現を回復させ、乳酸に対する嗅覚行動応答が回復するかを調べた(図3)。救助実験は、Larsson 等(2004)と同様に Or83b-Gal4 と UAS-OR83b により DO 中に OR83b 発現を回復させた個体で行

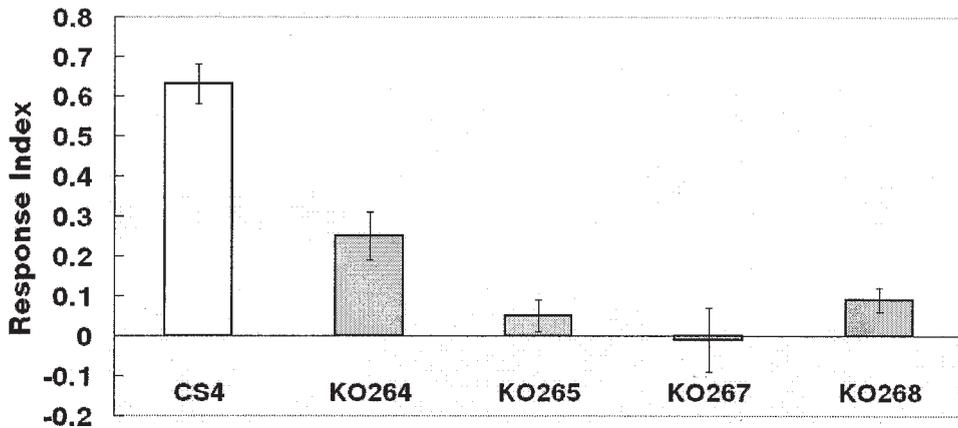


図2 野生型及び OR83b 破壊個体幼虫の乳酸に対する嗅覚行動応答

野生型(CS4)と OR83b 破壊個体(KO264, KO265, KO267, KO268)の応答率 (Response Index) の平均値 (n=8)と標準誤差を示す。KO264: w ; OR83b-Gal4 11.17 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32。KO265: w ; OR83b-Gal4 11.17 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17。KO267: w ; UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32。KO268: w ; UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17。OR83b 破壊個体の応答率は、いずれも野生型の応答率と統計的に有意差を示す(P<0.01)。

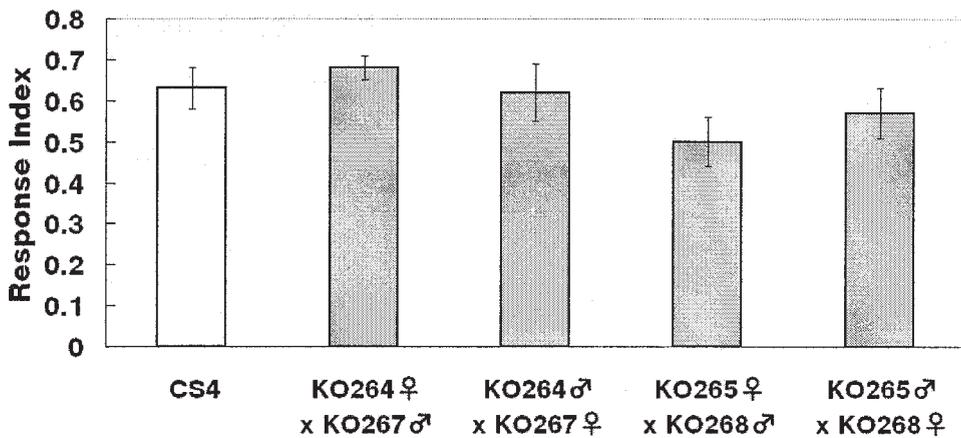


図3 野生型及び OR83b 発現救助個体幼虫の乳酸に対する嗅覚行動応答

応答率 (Response Index) の平均値(n=8)と標準誤差を示す。OR83b 発現救助個体は KO264 と KO267 の交配の次世代 (w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32) と、KO265 と KO268 の交配の次世代 (w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17) を用いた。

った。KO264 ♀と KO267 ♂を交配し、得られた次世代幼虫 (w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[1] Null mutant 56.2 T32) の応答率は、 $0.68 \pm 0.07$  (n=8)で

あり,野性型 CS4 の 107.9%に回復した。KO264♂と KO267♀を交配し,得られた次世代幼虫(遺伝子型は上記と同じ)の応答率は $0.62 \pm 0.07$  (n=8)であり,野性型 CS4 の 98.4%に回復した。KO265♀と KO268♂を交配し,得られた次世代幼虫(w ; OR83b-Gal4 11.17/ UAS-OR83b 13.20 ; OR83b[2] Null mutant 56.3 T17)の応答率は $0.50 \pm 0.06$  (n=8)であり,野性型 CS4 の 79.4%に回復した。KO265♂と KO268♀を交配し,得られた次世代幼虫(遺伝子型は上記と同じ)の応答率は $0.57 \pm 0.06$  (n=8)であり,野性型 CS4 の 90.5%に回復した。上記4種の救助個体の応答率は野性型 CS4 の応答率と統計的な有意差はなかった(それぞれ  $P=0.382$ ,  $P=0.645$ ,  $P=0.195$ ,  $P=0.328$ )。これらの結果は, Or83b 発現を幼虫 DO 中の嗅細胞で回復させると,乳酸に対する嗅覚応答が野性型と同程度に回復することを示している。

#### 4. 考察

Benton 等(2009)による IR 嗅物質受容体の発見は,文字通り「嗅物質受容体」と名付けられていた OR 以外にも嗅物質受容体が存在することを明らかにし,各嗅物質が OR-OR83b 複合体を介して受容されるのか, IR を介して受容されるのか再検討する必要がでてきた。ある嗅物質が OR-OR83b 複合体を介してのみ受容される場合は, OR83b が破壊された個体では,その嗅物質に対する嗅覚応答が野性型に比べほぼ完全に消失すると考えられる。逆に,ある嗅物質が IR を介してのみ受容される場合は, OR83b が破壊された個体でも,その嗅物質に対する嗅覚応答は野性型に比べ変化しないと考えられる。ある嗅物質が OR-OR83b 複合体と IR の両者を介して受容される場合は, OR83b が破壊された個体では,その嗅物質に対する嗅覚応答は野性型に比べ低下するものの完全には消失しないと考えられる。乳酸に対する幼虫の嗅覚応答は KO264 を除く OR83b 破壊体でほぼ完全に消失した。これらの結果は,乳酸に対する幼虫の嗅覚応答はほとんどが OR-OR83b 複合体を介して受容されることを強く示唆している。KO264 では,応答率が野性型に比べ 60.3%低下したが,野性型の 39.7%に相当する応答率が依然見られた。この原因は不明である。この系統では,染色体上に乳酸の受容に関係する IR が存在し, OR-OR83b 複合体と IR の両者を介して乳酸が受容される可能性も考えられ,今後検討が必要である。

OR83b 発現救助実験には Or83b-Gal4 と UAS-OR83b による DO での OR83b 発現回復法を用いた(Larsson 等, 2004)。OR83b の発現回復が十分でない場合,応答率が野性型と同等にまで回復しない場合も考えられるが(Larsson 等, 2004),本研究では野性型とほぼ同等の回復が見られた。これらの結果も,乳酸に対する幼虫の嗅覚応答のほとんどが OR-OR83b 複合体を介して受容されることを強く示唆している。

以上の結果は,乳酸が幼虫では OR-OR83b 複合体を介してほとんど受容される

ことを強く示唆している。幼虫 DO の 21 個の嗅細胞には 21 種の特異的 OR が発現している (Larsson 等, 2004 ; Kreher 等, 2005 ; Fishilevich 等, 2005)。このうち、どの OR が乳酸を受容するのか現在のところ不明であり、今後の研究により、明らかにする必要がある。

## 謝辞

本研究を行うに当たって、Or83b 破壊系統はロックフェラー大学 Voshall 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

- Aceves-Pina, E. O., and Quinn, W. G. (1979) Learning in normal and mutant *Drosophila* larvae. *Science*, 206, 93-96.
- 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.
- 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.
- Hallem., E. A., and Carlson, J. R. (2004) The odor coding system of *Drosophila*. *Trends Genet.*, 20, 453-459.
- 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.

Neuhaus, E. M., Gisselmann, G., Zhang, W., Dooley, R., Stoertkuhl, K. and Hatt, H. (2004) Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.*, 8, 15-17.

日本化学会 (1996) 化学便覧基礎編II 第4版, 丸善

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, 荒井大輔, 武田宏美 (2009) 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, 印刷中

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.

(2009年12月17日 受付)

(2010年3月23日 受理)