

論文審査の結果の要旨

藍原 祥子

申請者氏名

味覚は、摂食時における嗜好、忌避の選択という行動に反映される。これは動物にとって生命維持に関わる基本的な行動であり、そのメカニズムの解明はヒトの機能を理解するうえで重要である。味覚系に対し、近年、マウスやラットなどの哺乳類モデルを用いた分子生物学的な解析が精力的に進められてきたが、味受容機構の初期過程が明らかにされるに留まっている。本論文では、味覚系解析の新しい実験モデルとして、分子遺伝学的基盤が広く認知されつつある小型魚類を提唱し、このモデル魚類を用いた実験系を構築した。詳細には、味覚の嗜好・忌避行動の分子機構を解明することを目標として掲げ、以下の三章から構成されている。

1. 味覚依存的な嗜好・忌避行動の定量評価系の開発

新しい実験系を味覚解析に用いるためには、味物質に対する行動を評価する必要がある。申請者らは、モデル実験動物であるメダカに対して摂食量を利用した味覚依存的な嗜好・忌避の行動解析系を構築した。メダカの若魚は色素が未発達であるため消化管内に入った食物由来の色素を体外からの観察で容易に検出することができる。蛍光色素を含有させた、メダカが好んで摂食行動を示す人工餌を開発し、摂食量の高感度に定量する系を構築した。さらに、味物質としての量と質をさまざまに変えることで、アミノ酸に対する嗜好、および苦味物質デナトニウムに対する忌避行動を検出した。

以上は、水中に生息する魚類において、味覚依存的な行動を適切に定量する系を初めて構築したものである。

2. 味覚シグナル伝達に関わる PLC β 2 遺伝子のプロモーターの取得

味細胞シグナル伝達経路に外来遺伝子を導入するため、まずは魚類の味覚シグナル伝達経路の解析を行い、哺乳類の味覚シグナル伝達に必須な PLC- β 2 分子が存在することを見出した。この遺伝子の上流域を解析するにあたり、ゼブラフィッシュ、フグの 2 魚種およびマウスのゲノム配列を用いて比較解析を行い、遺伝子構造の相同性からプロモーター領域を予想した。メダカ PLC β 2 遺伝子 5' 上流-1.6 kbp から-1 bp の領域を取得し、GFP を連結したレポーターコンストラクトを作成して外来遺伝子を発現させる能力を、トランスジェ

ニックメダカを作出することで検証した。その結果、レポーター遺伝子の発現が PLC- β 2 に重なることが示され、選択した配列が、外来遺伝子を発現させるプロモーター活性を持つことが明らかになった。

3. 味盲トランスジェニックメダカの作出と行動の解析

1章において開発された行動解析系が分子生物学的な解析に用いるためには、実際に味覚のシグナル伝達経路を阻害した個体での行動異常を検出できることが必要である。このため申請者は、2章で取得したプロモーターを用いて味細胞内シグナル伝達経路を阻害したトランスジェニックメダカを作出し、その行動解析を行った。具体的には、PLC- β 2 の活性化を阻害する機能抑制型 G タンパク質を用い、この分子が発現することを確認した。その後、このトランスジェニックメダカに対し味覚嗜好行動アッセイおよび味覚忌避行動アッセイを行った。トランスジェニックメダカの行動を同時に解析した野生型の行動と比較すると、トランスジェニック個体ではアミノ酸入りの餌に対する嗜好性が野生型に比べて弱いことが示された。一方、デナトニウム入りの餌に対する忌避性が、野生型のそれと比較して弱いことが明らかとなった。これらの行動解析より、メダカの摂食行動における嗜好・忌避の行動が味覚に依存し、味覚シグナル伝達の分子レベルでの異常を開発した行動解析で検出できることが明らかとなった。

以上、本研究は、メダカという新しい味覚モデル動物に対し、味覚系解析に必須のツールである行動評価系の構築を行い、さらにその系の分子生物学的な解析の妥当性の検証を行った。これは、新しいモデル動物を提唱し、実用性を確認したという点において学術上、応用上価値が高い内容である。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。