

末梢性塩味味覚障害がショウジョウバエの  
摂食量および寿命に与える影響

奥羽大学大学院歯学研究科  
顎口腔外科学専攻

小嶋 忠之

(指導教員：高田 訓)

Effect of Peripherally Induced Salty Taste  
Disorder on Life Span and  
Food Consumption in *Drosophila*

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,  
Ozu University, Graduate School of Dentistry

Tadayuki Kojima

(Director : Satoshi Takada)

## Abstract

Detail of the relationship between taste disorder (dysgeusia) and patient's general condition is still under controversial even though this association is widely accepted. The aim of this study was to determine feeding and breeding (egg-laying) behaviors and life span on the fruit fly (*Drosophila melanogaster*) mutants, dysfunctioning salt taste receptor neurons: *Gr5a-rpr* (a mutant lacking *Gr5a* expressing cells by carrying *Gr5a*-promoter-driven *reaper* gene which encodes cell death protein Reaper) and  $\Delta Xbs6$  (a nullizygous mutant of *Pox neuro* gene rescued by  $\Delta Xbs6$ ) lines, which were respective mutants for partial and almost complete deficient of salt taste function. NaCl intake was time- and dose- dependent manner in control ( $w^{1118}$ ) with the peak reaching at 30 min and 80 mM NaCl, respectively. Although those dependencies were still observed in *Gr5a-rpr* mutant in spite of lower peak level, those were completely diminished in  $\Delta Xbs6$  line. NaCl intake was higher in female than in male and it decreased in the mutants with the descending order of *Gr5a-rpr* and  $\Delta Xbs6$  lines in both sex. Whereas, life-span between  $\Delta Xbs6$  line and the control was not different significantly. On the other hand, selection capability for NaCl based egg-laying site in  $\Delta Xbs6$  line completely diminished first 4 days and even thereafter kept partial inhibition. These results suggested that NaCl taste disorder, which reduced feeding and breeding behaviors, was less effective for the life span of *Drosophila melanogaster*.

Key words : *Drosophila*, taste disorder, NaCl, life span

和文抄録：味覚障害が生体に及ぼす影響は現在でもなお統一見解が得られていない。味覚障害患者ではしばしば全身状態の悪化が見られるが，全身状態変化の要因に味覚障害がどのように関与しているかは不明である。特に，味覚障害に伴う食塩摂取の異常は健康に影響を与えることが懸念される。そこで今回，我々はショウジョウバエを用いて，末梢感覚器機能欠損に由来する塩味味覚障害が摂食行動，寿命，繁殖（産卵）行動に与える影響を精査した。実験に使用したショウジョウバエはコントロールとして野生型である $w^{1118}$ ，一部の塩受容器が機能欠損している*Gr5a-rpr*，大部分の味覚器が機能欠損している*ΔXbs6*を用いた。NaCl溶液の摂食量定量実験ではコントロールで（ $w^{1118}$ ）30分，80mMで摂食量がピークに達した。*Gr5a-rpr*では，コントロール群よりも低濃度でピークに達し，*ΔXbs6*では濃度依存性が消失し，摂食量は顕著に低下していた。オスとメスでは全系統でメスの方が摂食量が多くfemale/male ratioはコントロール，*Gr5a-rpr*，*ΔXbs6*の順に摂食量が減少した。*ΔXbs6*を用いて行った寿命の測定では，有意差は認められなかった。しかし，産卵場所識別能力を調べたところ，羽化後4日のコントロールではSucroseベースよりもNaClベースを好んで産卵したのに対し，*ΔXbs6*ではその選択性が消失していた。本研究結果より，末梢側に起因する塩味味覚障害では摂食量，産卵場所識別能力などに影響を及ぼすが，長期的にはショウジョウバエに与える影響は小さいということが示唆された。

## 緒 言

味覚障害による味覚閾値の変化や摂食量の低下は健康状態の悪化をまねき寿命にも影響を及ぼす事が懸念される<sup>1,2)</sup>。特に塩分摂取量の増加は悪性新生物，心疾患等の疾患発生リスクを増加させることが報告されている<sup>3-6)</sup>。

末梢性塩味味覚障害モデルとして，マウス，ラットなど哺乳類での末梢の塩受容器に発現している遺伝子が特定されつつある。しかし，これらの遺伝子は味細胞以外の部位にも広く発現しており，味細胞特異的なノックアウトも困難なことから，味覚障害そのものの影響を明らかにする上で不利である<sup>7-9)</sup>。ショウジョウバエは齢，発育条件のそろった多量の実験動物を容易に得られ，世代間隔が約2週間と短く，寿命も50日程度と一生を追いやすいなど，モデル動物として優れた特徴を備えている。さらに，1976年にp因子が発見されて以降，遺伝子ノックアウト，ノックインが比較的容易に行えるようになった<sup>10)</sup>。加えて，1993年にUAS/Gal4システムが形質転換法として導入され，部位特異的な遺伝子操作が可能になり，器官形成，寿命，行動に至るまでさまざまな生命現象を容易に操作・解析することが可能になったことが，実験動物としての大きな利点となっている<sup>11)</sup>。これらの特徴を利用し，糖尿病<sup>12,13)</sup>やパーキンソン病<sup>14,15)</sup>など様々な疾病モデルに応用されている。

ハエの味覚や摂食行動は最も詳細な研究が加えられた神経行動学的システムのひとつである<sup>16)</sup>。ショウジョウバエにおいて，味覚ニューロン特異的に発現する転写調節因子<sup>17,18)</sup>や特定の味ニューロンに発現する味受容体とその機能が究明される過程<sup>19-21)</sup>で，特定の味受容体や味ニューロンを機能欠損させた種々の変異体を作成されて

いる。しかし，味覚変異体ショウジョウバエは味覚障害と類似した形質を持つと予想されるにもかかわらず，味覚障害モデルとして味覚障害が全身状態へ与える影響を解析しようとする試みは未だ報告されていない。

そこで，末梢味覚系の機能欠損を持つ変異体ショウジョウバエである *w<sup>cx,UAS-rpr</sup>*<sup>27</sup>; *Gr5a-Gal4,2×UAS-EGFP*（以下：*Gr5a-rpr*）および *w<sup>1118</sup>, p[W6 poxn\_resc]deltaXbs6; poxn[deltaM22-B5]/Cyo*（以下：*ΔXbs6*）を味覚障害モデルとして利用して，味覚障害が全身状態に与える影響を明らかにすることを試みた<sup>17-20</sup>。本研究では，塩味に焦点を絞り，末梢味覚系の機能欠損がどのような味覚障害症状をもたらし，末梢由来の味覚障害が全身状態にどのような影響を与えるのか，さらに，塩味味覚障害による塩分摂取量変化が摂食行動および寿命にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験材料として野生型で味覚器の正常な *w<sup>1118</sup>* と *w<sup>1118</sup>*; *Gr5a-Gal4,2×UAS-EGFP* 系統（*Gr5a-EGFP*），*w\**; *poxn-Gal4,UAS-GFP*（*poxn-GFP*）をコントロール群として用い，味覚器機能欠損系統として *Gr5a-rpr*，*ΔXbs6* の 3 系統のキイロショウジョウバエを用いた。*Gr5a-rpr* 群はトレハロース受容体である *Gr5a* を発現する味覚ニューロンがアポトーシスを起こし，退縮している。*Pox-neuro* 遺伝子（*poxn*）は中枢神経系や味神経等に発現する転写調節因子であり，*poxn-null* ミュータントでは *poxn* 発現細胞が正常に発達できず，味覚だけでなく発生や行動に大きな障害を持つ。しかし，*ΔXbs6* 群では脳の *poxn* 発現ニューロンで *poxn* をレスキューしている

ので機能欠損が味覚器に限定されている。ミュータントにキイロショウジョウバエの継代および実験は奥羽大学動物実験研究施設（室温 25℃，湿度 65%）で行った。本実験に用いたショウジョウバエの *w<sup>1118</sup>* 系統，*Gr5a-rpr* 系統，および *Gr5a-EGFP* 系統は磯野邦夫博士（東北大学），*poxn-GFP* 系統は木村賢一博士（北海道教育大学），*ΔXbs6* 系統は Werner Boll 博士（チューリッヒ大学）より譲渡頂いた。

唇弁の味細胞の確認は，トリエチルアミン<sup>®</sup>によるガス麻酔後，80% エタノール<sup>®</sup>に浸漬させショウジョウバエ体表のワックスを除去し，ショウジョウバエリンガー液中で唇弁を切除・左右に切断したのち、プレパラートに封入してホールマウント標本を作成した。プレパラートは水銀ランプ（Super high pressure mercury lamp power supply，Nikon，東京）による直立型顕微鏡（Eclipse E600FN，Nikon）を用いて撮影した。正常な味覚器を有する *Gr5a-EGFP* 系統では *Gr5a* 発現細胞が大きく鮮明に確認できるが（図 1a），*Gr5a-rpr-EGFP* 系統では *Gr5a* 発現細胞の顕著な退縮を認めた（図 1b）。また *poxn-GFP* 系統も *poxn* ニューロン発現細胞が鮮明に観察できるが（図 1c），*ΔXbs6 ; poxn-GFP* 系統も，同様に細胞の退縮を顕著に認めた（図 1d）。これら，味覚ニューロンの顕著な欠損を確認した系統を用いて行動実験を行った。

なお，実験は奥羽大学実験動物委員会および組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った（動物実験許可番号：平成 27 年度 2015-26，受付番号：平成 27 年度第 27-4 号）。

## 2. 餌摂食量定量実験

羽化後 7 日の個体を用いて行った。羽化後 1 日目はドライイーストと 300 mM sucrose をキムワイプ紙<sup>®</sup>に浸み込ま

せ与えた。2日目より sucrose のみとし5, 6日目は1 M sucrose と水場を設置し精製水を与えた。実験では Petri Dish 35×10 mm ( Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA ) に餌場として NaCl 溶液に 1% ager noble ( Becton Dickinson ) および 1.25 mg/dl の Brilliant Blue ( Alfa Aesar, Heysham, UK ) を加えた飼料を 0.25 ml 設置した。NaCl 溶液の濃度は 0 mM, 5 mM, 20 mM, 80 mM, 320 mM の5段階に濃度を振りそれぞれ餌摂食量定量実験を行った。20匹のキイロショウジョウバエを入れ暗室下に30分自由に摂食させた。摂食終了後, 二酸化炭素によるガス麻酔をかけ50% エタノール, 100 mM リン酸カリウムバッファー ( pH 7.4 ) をローリテンションチューブ 1.5 ml ( アシスト, 東京 ) に共に入れ Phscotron ( Microtec CO., LTD, 千葉 ) を用いてホモジネートし, 遠心分離器 ( Tomy MX-301, 東京 ) にかけて分光光度計 ( Jasco V-530, 東京 ) で吸光度を測定した ( 図 2 a )。

### 3. 寿命の測定

寿命の測定以降の実験では, 摂食量定量実験の結果でコントロール群との餌摂食量の差が大きい *ΔXbs6* 群のメスをコントロール群のメスと比較した。羽化後1日の個体をオス, メス2匹ずつコニカルチューブ 50ml ( Becton Dickinson ) に入れ, 水場としてキムワイプ紙1枚に精製水を2ml 含ませチューブの先端に圧接した。撥水性印刷4穴スライドガラス ( Matsunami TFO410, 大阪 ) をコニカルチューブに挿入し, 産卵ベース兼餌場とした。4か所の穴のうち, 2番の穴に 300 mM sucrose 溶液に 1% ager noble ( Becton Dickinson ) を加えた sucrose ベース, 3番の穴に 80 mM NaCl 溶液に 1% ager noble ( Becton Dickinson ) を加えた NaCl ベースをそれぞれ設置し, 両端の1番, 4番の穴には何も設置しなかった。それぞれのベースの上にはドライイースト

( Saf dry yeast blue, Lesaffre, Milwaukee, WI, USA ) を 0.5 mg ずつのせた ( 図 2b )。 3 日おきに水場，餌場を交換しその際に餌場の位置を学習が成立しないように入れ替えた。

#### 4 . 産卵場所識別能力アッセイ

寿命の測定と同様の装置および条件で羽化後 2 , 4 , 7 , 8 , 9 , 10 日目に 2 種類の産卵ベースにおける産卵数を調べ Preference index ( 以下 PI ) を算出し有意差検定を行った。  $PI = ( NaCl \text{ ベースでの産卵数} - Sucrose \text{ ベースでの産卵数} ) / ( \text{総産卵数} )$  で算出した。

#### 5 . 統計処理

餌摂食量定量実験での有意差検定は Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction を用いて 3 系統間で比較を行った。危険率が  $p < 0.05$  の場合を有意とした。寿命の測定では Kaplan-Meier 法によるログランク検定を用い，コントロール群と  $\Delta Xbs6$  群との比較を行った。危険率が  $p < 0.05$  の場合を有意とした。産卵場所識別能力アッセイは Mann-Whitney U-test を用いてコントロール群と  $\Delta Xbs6$  群との比較を行った。危険率が  $p < 0.05$  の場合を有意とした。

## 結 果

#### 1 . 餌摂食量定量実験

キイロショウジョウバエの味覚器は口器である唇弁とふ節 ( 脚 ) に存在し，その味覚器を用いて餌場を探索し摂食する。野生型であり味覚器が正常な系統ではすぐに餌場を発見し餌摂食量が最大となる。そこで餌摂食量定量実験の方法で NaCl 摂食量が最大になる 80 mM において摂食量の時間依存性を測定した結果，コントロール群で

15分，*Gr5a-rpr*群では30分でプラトーに達し，以降餌摂食量の増加は認められなかった。*ΔXBs6*群では30分～8時間まで観察したが摂食量は低いままであった（図3）。

次に30分間の摂食時間における，NaCl摂食量に対するNaCl濃度の影響について検討した。コントロール群（メス）におけるNaCl摂食量は80mMで摂食量が最大（0mM時の267%（ $p < 0.01$ ））となり，320mM時では0mM時のレベルにまで顕著に低下した（図4a）。*Gr5a-rpr*群（メス）ではコントロール群よりも低濃度（20mM）で摂食量がピークに達し（0mM時の218%（ $p < 0.01$ ））そのレベルは80mMの時まで維持された。320mMまでNaCl濃度を上昇させるとコントロール群と同様に0mM時のレベルまで摂食量は低下した（図4a）。一方，コントロール群（オス）のNaCl摂食量については，メスと同様に80mMをピーク（0mM時の307%（ $p < 0.01$ ））に320mMで減少（最大時の51.2%（ $p < 0.05$ ））した。また，*Gr5a-rpr*群（オス）でも80mMで最大（0mM時の259%（ $p < 0.01$ ））となり320mMで減少（最大時の36.4%（ $p < 0.01$ ））した。以上の様にコントロール群や*Gr5a-rpr*群では80mMをピークとするNaCl摂食量のNaCl濃度依存性を示したが，*ΔXBs6*群でのNaCl摂食量には有意な変動は見られなかった。

メスのNaCl摂食量をオスの摂食量で除してみると，遺伝変位の有無にかかわらず，メスの方がオスよりも摂食量が多く，その比は80mMで有意に，コントロール群，*Gr5a-rpr*群，*ΔXBs6*群の順で小さくなった（図5）。

## 2. 寿命の測定

観察開始時点から死亡が発生するごとに1例ずつ，死亡時点までの生存率を計算し，縦軸とした。横軸は羽化後の日数で，ログランク検定を行った（図6）。コント

ロール群と $\Delta XBs6$ 群の生存曲線は類似しており，有意差は認められなかった（ $p > 0.05$ ）。

### 3. 産卵場所識別能力アッセイ

図7は羽化後4日目の産卵場所識別能力アッセイの結果である。経時的に検討してみると，4日までの観察では $\Delta XBs6$ 群でのPI値がほとんどゼロを示しており味覚器特有の *poxn* の欠損が産卵場所識別能力を著しく低下させることが示された。また，その後の観察において，コントロール群， $\Delta XBs6$ 群両者でのPI値は経時的増加に増加し7日目以降プラトーに達したが， $\Delta XBs6$ 群におけるプラトーレベルはコントロールの約50%に留まり，産卵場所識別能力の低下は観察日数を増やしても維持された（図8）。

## 考 察

塩分の過剰摂取は種々の疾病リスクを上昇させ<sup>1,2)</sup>，特にNaCl摂取量は，高血圧症や悪性腫瘍などの疾病発生率と相関があることが報告されている<sup>22,23)</sup>。一方，糖の過剰摂取に伴う生体への影響についてはラット，マウスなどの脊椎動物による研究成果があり，体脂肪の増加をもたらし，*leptin* 分泌量の増大を促し，味細胞の糖感受性が低下することも報告されている<sup>24)</sup>。このような糖の過剰摂取に伴う感受性低下と同様にNaCl摂取量の増加により，塩味閾値が上昇している可能性があり，実験的な解明が必要である。そこで本研究では，末梢塩受容ニューロンに機能障害を持つ遺伝子改変ショウジョウバエを味覚障害モデルとし，末梢における塩味感受性の低下が摂食行動に与える影響を調べた。実験動物に多く用いられているマウス，ラットなどでは，NaCl味覚ニューロンに特異

的な機能欠損を引き起こすことが困難なことから，糖受容ニューロンと一部の塩受容ニューロンに発現している Gr5a 受容体に注目し<sup>25,26)</sup>，Gr5a 発現ニューロンの機能を欠損させた *Gr5a-rpr* 系統を実験に用いた。また，*ΔXBs6* 系統は末梢味覚器が機械感覚毛に変化しており，塩受容ニューロンを含むほぼ全ての味覚受容ニューロンが機能欠損し，味覚脱失に似た状態が期待できる。

*Gr5a* 発現ニューロンが一部アポトーシスを起こしている *Gr5a-rpr* 群では，コントロール群に比べ摂食量の増加速度が遅い傾向が見られた。しかし，コントロールと比べ *Gr5a-rpr* 系統のメスでは NaCl 摂食量に大きな差は見られなかった。female/male ratio にも大きな変化は見られず，塩味識別能力の低下は確認できなかった。一方，大規模に味覚器への障害を発症している系統である *ΔXBs6* 群では摂食開始後 8 時間経過しても摂食量の増加は見られなかった。特に，メスにおける NaCl 摂取量がコントロールに比べて約 1/6 となり，大幅な低下が見られた。NaCl 摂取量の female/male ratio が約 1.5 倍ほどとなり，食塩摂取行動の性的二形性が著しく減衰し，塩味識別能力はほぼ失われていると考えられた。メスは産卵のために NaCl を必要とし，交尾によるフィードフォワード制御による NaCl 摂取量増大が，産卵数増加に寄与すると報告されている<sup>27)</sup>。そのために，塩味味覚感度の低下の NaCl 摂取量への影響はメスにおいて顕著に表れたと考える。

このような塩味感受性の低下に伴う NaCl 摂取量の大幅な低下は健康状態に大きな影響を与えることが予想されたが，*ΔXbs6* 群の寿命とコントロール群の寿命との間に有意差は見られなかった。ショウジョウバエが生存に必要とする NaCl 摂取量はごく微量であり，本実験条件では *ΔXbs6* 群であっても必要な NaCl を摂取できていた可能性が

ある。

産卵場所選択行動におけるコントロールのショウジョウバエは糖を忌避し，その付近に存在する餌場（産卵ベース）に産卵するとの報告がある<sup>28,29)</sup>。今回のコントロール群での結果は矛盾なく同様であった。しかし， $\Delta XBs6$ 群は sucrose ベースと NaCl ベースに対して同程度の産卵を行い産卵場所選択能力が失われていた。これまでに著者は $\Delta XBs6$ 群の sucrose に対する摂食量はコントロール群と同程度であることを報告している<sup>30)</sup>。すなわち，選択行動の異常は sucrose 味覚異常によるものではなく NaCl に対する味覚異常であることを示唆している。さらに，次世代に関しては，産卵場所の識別ができないことにより，卵の孵化率，幼虫の生存率，次世代の嗜好性などに影響する可能性がある。

日本では味覚障害患者の数が増加しており<sup>31,32)</sup>，高齢者はもとより若年層において，塩味の味覚感度低下は他の味質に比べて際立っていることが報告されている<sup>33,34)</sup>。塩味味覚障害が生体に及ぼす影響は統一見解が得られていないが，本研究において NaCl 摂取量と寿命との関連性は見いだされなかった。ヒトにおいて，成人が1日に摂取するナトリウム量の上限は 2.3 g とされ，体重 1 kg 当たりのナトリウム摂取量の上限は 33 mg である<sup>35)</sup>。今回の実験ではショウジョウバエに，100 g 当たり 88 mg のナトリウムが含まれているイーストを与えた。体重約 88  $\mu$ g のメスの $\Delta XBs6$ が2日間かけて 0.5 mg のイーストを摂取した結果より，ショウジョウバエの1日当たりのナトリウム摂取量は体重 1 kg 当たり 25 mg となる。すなわちショウジョウバエがイーストから摂取するナトリウム量は，ヒトで推奨されるナトリウム摂取量とほぼ同程度であった。従って，塩味に対する感度が著しく低下しても，適当量の塩を摂

取できたがためにコントロール群との間に寿命の差が生じなかったと考えられる。*ΔXBs6*系統ではほぼ全ての塩受容ニューロンが機能欠損しており，味覚脱失に似た状態だと考えられるが，ナトリウムを含む栄養価豊の食物を自由に摂取できる条件では，生命維持に支障を来さないであろう。

## 結 論

味覚器機能を遺伝的に欠損させたショウジョウバエを味覚障害モデルとして使用することを初めて試み，以下の結果を得た。

1．摂食量定量実験ではコントロール群に対し，重度の味覚器欠損がある*ΔXBs6*群において大きくNaCl摂食量が低下し，塩味識別能力も失われた。一部の味覚器の欠損した*Gr5a-rpr*群ではNaCl摂取量に大きな変化は見られなかった。

2．寿命の測定の結果ではコントロール群と*ΔXBs6*群の間に有意差は見られなかった。

3．産卵場所識別能力アッセイではコントロール群がNaClに対して選択性を示すが，*ΔXBs6*群ではその識別能力が低下していた。

以上より，末梢性塩味味覚障害では，味覚障害に伴う塩味感受性の変化がNaCl摂取量に影響を及ぼすが，寿命に対する影響は小さいことが示唆された。

## 謝 辞

稿を終わるに臨み，ショウジョウバエを供与頂いた磯野邦夫博士（東北大学），木村賢一博士（北海道教育大学），Werner Boll 博士（チューリッヒ大学）に感謝致します。

本論文の要旨の一部は，第24回 European Chemoreception Research Organization（平成26年9月10日ブルゴーニュ），日本味と匂い学会第47回大会（平成25年9月5日宮城），日本味と匂い学会第48回大会（平成26年10月2日静岡），日本味と匂い学会第49回大会（平成27年9月24日岐阜），第40回公益社団法人日本口腔外科学会北日本支部学術大会（平成26年6月21日秋田），第17回口腔顔面神経機能学会（平成25年3月2日福岡），第54回奥羽大学歯学会（平成24年11月10日郡山），第60回奥羽大学歯学会（平成27年11月14日郡山）において発表した。

## 利益相反

本論文に関して，開示すべき利益相反は無い。

## 文 献

- 1 ) Sasano, T., Satoh, S., Kaneta, N., Shoji, N., Kawai, M., Uneyama, H. :  
Incidence of taste disorder and umami taste disorder among the Japanese elderly  
and youth. *J. Nutr. Food Sci.* **S10** ; 002 2012
- 2 ) Taste Disorders. NIDCD **09** - 3231A 2009
- 3 ) Takachi, R., Inoue, M., Shimazu, T., Sasazuki, S., Ishihara, J., Sawada, N.,  
Yamaji, T., Iwasaki, M., Iso, H., Tsubono, Y., Tsugane, S. : Consumption of  
sodium and salted foods in relation to cancer and cardiovascular disease. *Am. J.*  
*Clin. Nutr.* **91** ; 456-464 2010
- 4 ) Tatematsu, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M., Shirai, T. :  
Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced. *J.*  
*Natl. Cancer. Inst.* **55** ; 101-106 1975
- 5 ) Tsugane, S., Sasazuki, S., Kobayashi, M., Sasaki, S. : Salt and salted food intake  
and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and  
women. *Br. J. Cancer* **90** ; 128-134 2004
- 6 ) Sjødahl, K., Jia, C., Vatten, L., Nilsen, T., Hveem, K., Lagergren, J. : Salt and  
gastric adenocarcinoma: A population-based cohort study in Norway. *Cancer*  
*Epidemiol Biomarkers Prev.* **17** ; 1997-2001 2008
- 7 ) Kellenberger, S., Schild, L. : Epithelial sodium channel/degenerin family of ion  
channels : A Variety of Functions for a Shared Structure. *Physiological Reviews*  
**82** ; 735-767 2002
- 8 ) Brouard, M., Casado, M., Djelidi, S., Barrandon, Y., Farman, N. : Epithelial  
sodium channel in human epidermal keratinocytes: expression of its subunits  
and relation to sodium transport and differentiation. *J. Cell Sci.* **112** ;  
3343-3352 1999
- 9 ) Mauro, T., Guitard, M., Behne, M., Oda, Y., Crumrine, D., Komuves, L.,  
Rassner, U., Elias, M., Hummler, E. : The ENaC channel is required for  
normal epidermal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **118** ; 589-594  
2002

- 10 ) Ueno, K., Ohta, M., Morita, H., Mikuni, Y., Nakajima, S., Yamamoto, K., Isono, K. : Trehalose sensitivity in *Drosophila* correlates with mutations in and expression of the gustatory receptor gene *Gr5a*. *Curr. Biol.* **18** ; 1451-1455 2001.
- 11 ) Brand, A. H., Perrimon, N. : Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118** ; 401-415 1993.
- 12 ) Murillo-Maldonado, J. M., Sánchez-Chávez, G., Salgado, L. M., Salceda, R., Riesgo-Escovar, J. R. : *Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes* **60** ; 1632-1636 2011.
- 13 ) Trinh, I., Boulianne, G. L. : Modeling obesity and its associated disorders in *Drosophila*. *Physiology* **28** ; 117-124 2013.
- 14 ) Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N., Lu, B. : Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* **466**; 637-641 2010.
- 15 ) Wu, Z., Sawada, T., Shiba, K., Liu, S., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y., Lu, B. : Tricornered/NDR kinase signaling mediates PINK1-directed mitochondrial quality control and tissue maintenance. *Genes Dev.* **27**; 157-162 2013.
- 16 ) Dethier, V. G.: *The hungry fly : a physiological study of the behavior associated with feeding* ; Harvard University Press Cambridge 1976.
- 17 ) Awasaki, T., Kimura , K. : *pox-neuro* is required for development of chemosensory bristles in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* **32** ; 707-721 1997.
- 18 ) Boll, W., Noll, M. : The *Drosophila pox neuro* gene: control of male courtship behavior and fertility as revealed by a complete dissection of all enhancers. *Development* **129** ; 5667-5681 2002.
- 19 ) Chyb, S., Dahanukar, A., Wickens, A., Carlson, J. R. : *Drosophila Gr5a* encodes a taste receptor tuned to trehalose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** ; 14526-14523 2003.
- 20 ) Dahanukar, A., Lei, Y. T., Kwon, J. Y., Carlson, J. R. : Two *Gr* genes underlie

- sugar reception in *Drosophila*. *Neuron* **56** ; 503-516 2007.
- 21 ) Weiss, L. A., Dahanukar, A., Kwon, J. Y., Banerjee, D., Carlson, J. R. : The molecular and cellular basis of bitter taste in *Drosophila*. *Neuron* **69** ; 258-272 2011.
- 22 ) Tomita, H., Ikeda, M., Okuda, Y. : Basis and practice of clinical taste examinations. *Auris Nasus Larynx* **13** ; S1-15 1986.
- 23 ) Ikeda, M., Aiba, T., Ikui, A., Inokuchi, A., Kurono, Y., Sakagami, M., Takeda, N., Tomita, H. : Taste disorders: a survey of the examination methods and treatments used in Japan. *Acta. Otolaryngol.* **11** ; 1203-1210 2005.
- 24 ) Amrein H, Thorne N: Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **15** ; 673-684 2005.
- 25 ) Isono, K., Morita, H., Kohatsu, S., Ueno, K., Matsubayashi, H., Yamamoto, M. : Trehalose sensitivity of the gustatory receptor neurons expressing wild-type, mutant and ectopic Gr5a in *Drosophila*. *Chem. Senses* **30** ; 275-276 2005.
- 26 ) Samuel, J., Walker, V. M., Corrales, C., Carlos, R. : Postmating Circuitry Modulates Salt Taste Processing to Increase Reproductive Output in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **25** ; 2621-2630 2015.
- 27 ) Yang, C. H., He, R., Stern, U. : Behavioral and circuit basis of sucrose rejection by *Drosophila* females in a simple decision-making task. *J. Neurosci.* **35** ; 1396-1410 2015.
- 28 ) Yang, C. H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y., Jan, Y. N. : *Drosophila* egg-laying site selection as a system to study simple decision-making processes. *Science* **319** ; 1679-1683 2008.
- 29 ) 小嶋 忠之 , 古山 昭 , 磯野 邦夫 , 浜田 智弘 , 宗形 芳英 , 高田 訓 : ショウジョウバエを用いた塩味味覚障害モデルの構築 . 日本味と匂い学会誌 **21** ; 267-268 2014
- 30 ) Ohnuki, M., Shinada, K., Ueno, M., Zaitu, T., Wright, F. A., Kawaguchi, Y. : Exploring taste hyposensitivity in Japanese senior high school students. *J. Investig Clin. Dent.* **3** ; 23-29 2011.

- 31 ) Ohnuki M, Ueno M1, Zaitu T, Kawaguchi Y: Taste hyposensitivity in Japanese schoolchildren. *BMC Oral Health* **11** ; 14-36 2014.
- 32 ) Contreras, R. J. : Salt taste and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **31** ; 1088-1097 1978.
- 33 ) Suchecka, W., Hartman, M., Klimacka-Nawrot, E., Stadnicki, A., Błońska-Fajfrowska, B. : Salt taste perception in people above the age of 50. *Wiad.Lek.* **65** ; 84-89 2012.
- 34 ) Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H., Ninomiya, Y. : Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97** ; 11044-11049 2000.
- 35 ) Drake, S. L., Lopetcharat, K., Drake, M. A. : Salty taste in dairy foods: can we reduce the salt? *J. Dairy. Sci.* **94** ; 636-645 2011.

## 図表の説明

図 1 ショウジョウバエの唇弁における味ニューロン

a : *Gr5a-2×EGFP* 系統では *Gr5a* 発現ニューロン（糖，塩の一部，水ニューロン）が観察できる。b : *Gr5a-rpr-2×EGFP* 系統では，*Gr5a* 発現ニューロンは退縮している。c : *poxn-GFP* 系統では *poxn* 発現ニューロン（全ての味ニューロン）が，観察できる。d : *ΔXBs6, poxn-GFP* 系統では *poxn* 発現ニューロンは退縮している。

図 2 実験装置

a : 餌摂食量定量実験に用いたペトリシャーレおよび食物色素を含んだ餌場。摂食したショウジョウバエの体内に食物色素がとりこまれ，ローリテンションチューブ内でバッファーと共にホモジネートした。b : 寿命および産卵行動実験に用いたコニカルチューブ。4 穴のスライドガラスの 1 番 4 番の穴は使用せず 2 番 3 番に餌場兼ベース（2 番，NaCl ; 3 番，Sucrose）を設置し，その上にドライイーストをおいた。

図 3 餌摂食量の時系列

a : 80 mM における NaCl 摂食量のコントロールにおける代表例で，縦軸は摂食量（ $\mu\text{l}$ ），横軸は時間（分）。矢印は測定部位である b : 80 mM における NaCl 摂食量の各群のプラトーに達するまでの時間。コントロール群，*Gr5a-rpr* 群，*ΔXBs6* 群の順で摂食量は最大値に達した ( $n=10$ )。

図 4 NaCl 餌摂食量の濃度依存性（摂食時間は 30 分）

a : メスの NaCl 摂食量は 80 mM で最大となり濃度依存性を認めた。しかし，*ΔXBs6* 群では摂食量が顕著に低下し，

濃度依存性が消失していた。b : オスの NaCl 摂食量はメスの摂食量と同形のグラフとなったが，摂食量は低下している (n=12 \*p<0.05, \*\*p<0.01)。

#### 図 5 NaCl 餌摂食量の female/male ratio

縦軸はメスの摂食量をオスの摂食量で除した値。 $\Delta XBs6$  群では約 1.5 と著しく低下し，*Gr5a-rpr* 群でも 5mM ではコントロール群に比べ有意な低下が見られた (n=12 \*p<0.05, \*\*p<0.01)。

#### 図 6 コントロール群と $\Delta XBs6$ 群の生存曲線

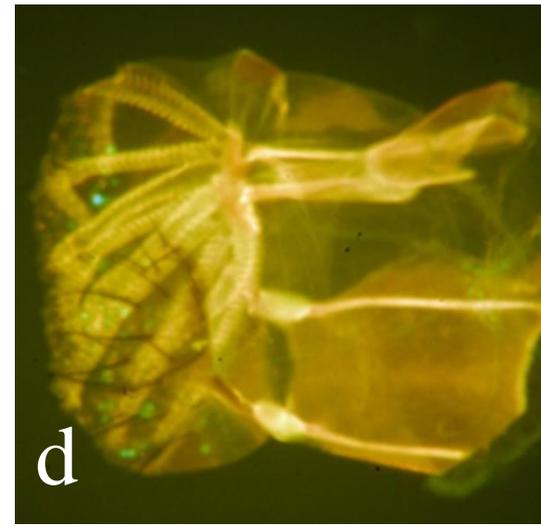
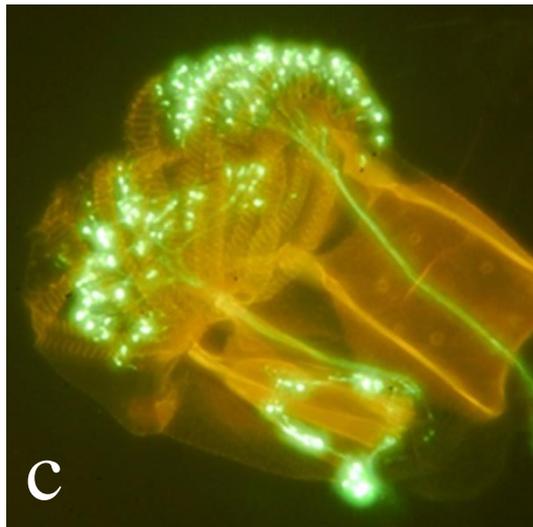
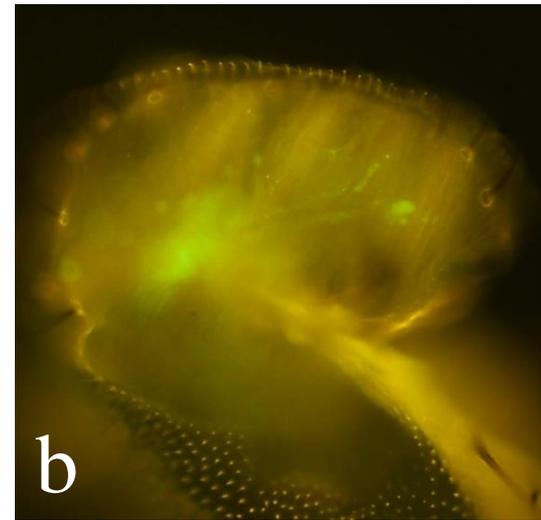
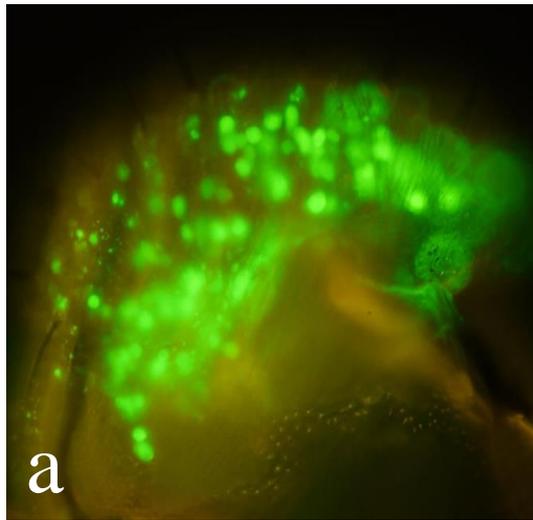
縦軸が生存率で横軸が羽化後の日数でコントロール群と  $\Delta XBs6$  群の間に有意差は認められなかった (n=92 \*p<0.05, \*\*p<0.01)。

#### 図 7 産卵場所識別能力アッセイ

羽化後 4 日目の代表例を示す。a : コントロール群では主として NaCl ベース (2 番穴) に産卵した。b :  $\Delta XBs6$  群では NaCl と Sucrose (3 番穴) の両方に産卵しており，識別能力が低下していた。1 番，4 番はネガティブコントロール (ベースなし)。

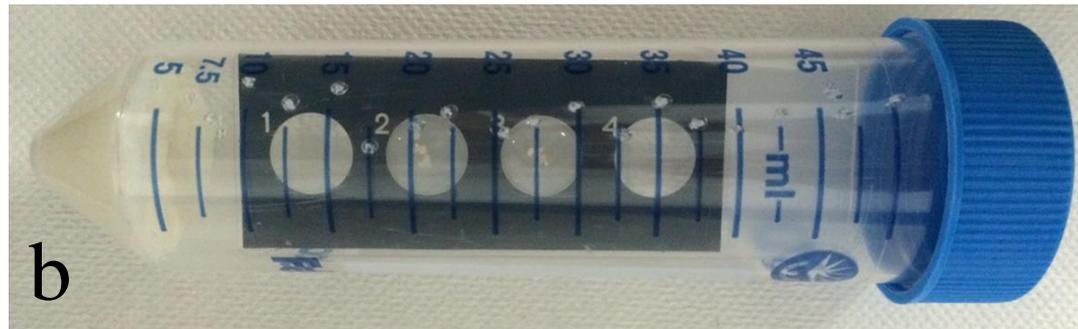
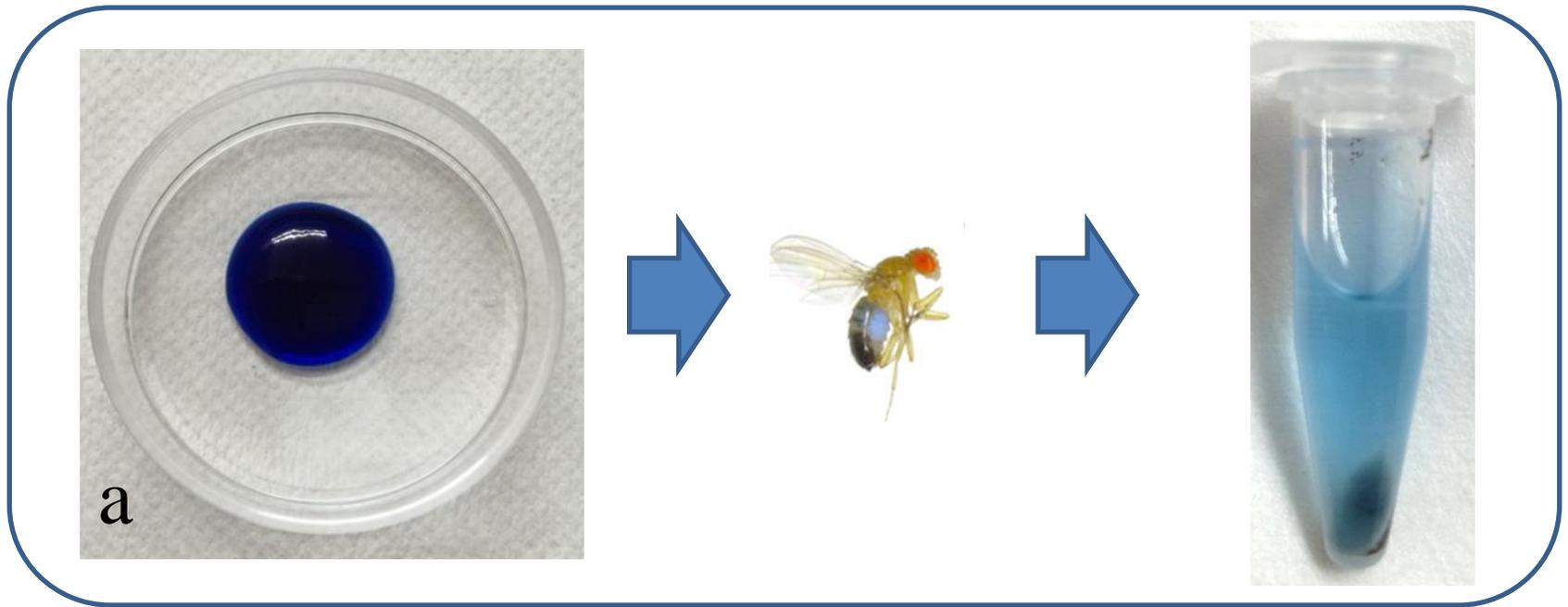
#### 図 8 産卵場所識別能力アッセイの定量解析

縦軸が NaCl に対する Preference index で，横軸が羽化後の日数。PI=0 で餌場選択が全く行われなかったことを示すが， $\Delta XBs6$  群では羽化後 2 日で  $0.05 \pm 0.45$ ，4 日で  $-0.03 \pm 0.27$  と識別能力が顕著に低下していた (n=42 \*p<0.05, \*\*p<0.01)。



**図1 ショウジョウバエの唇弁における味覚ニューロン**

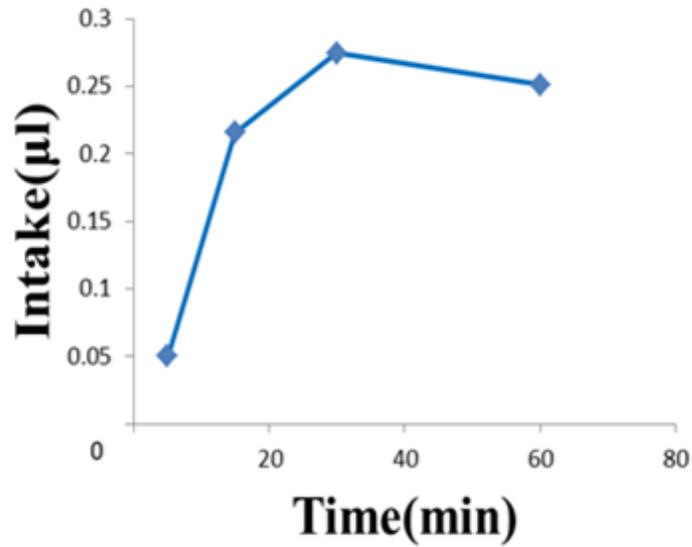
a:*Gr5a-2* × *EGFP* b:*Gr5a-rpr-2* × *EGFP* c:*poxn-GFP* d: $\Delta$ *XBS6*, *poxn-GFP*



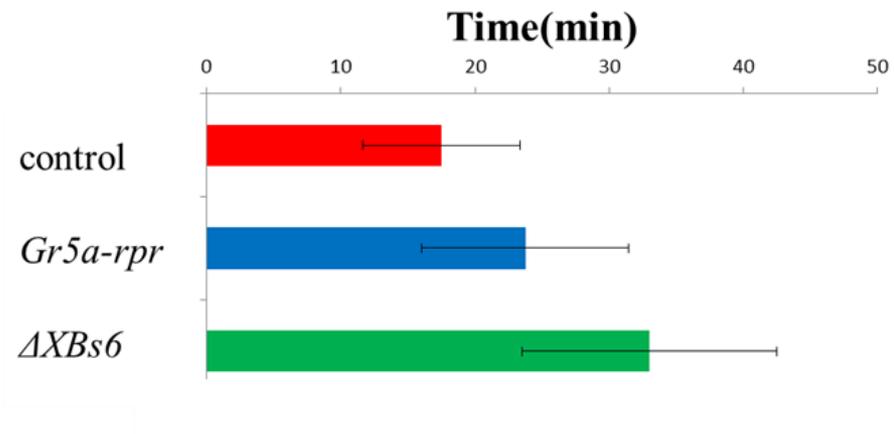
## 図2 実験装置

a: 餌摂食量定量実験 b: 生存率, 産卵場所選択行動アッセイ

a



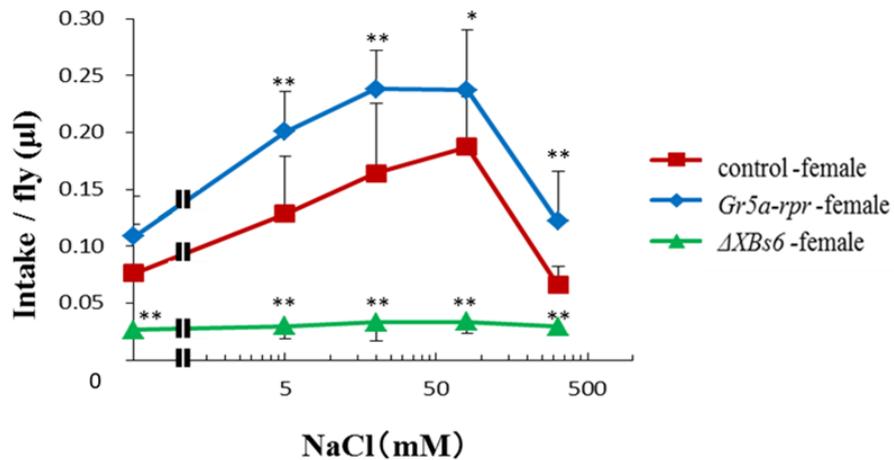
b



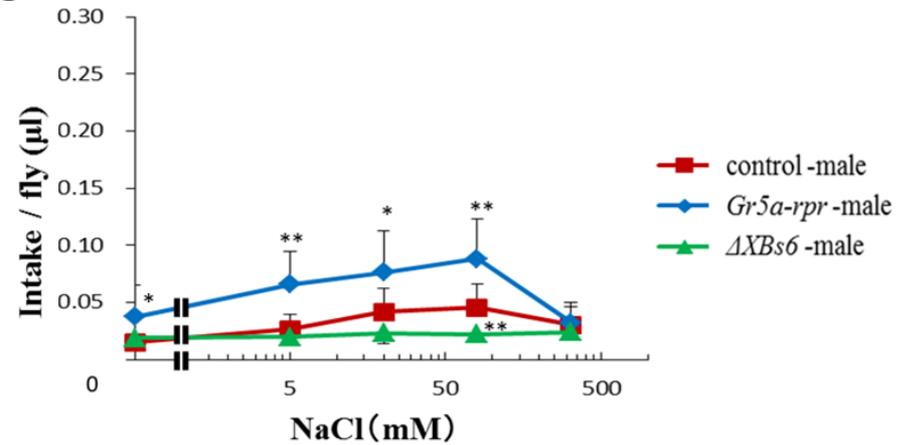
### 図3 餌摂食量の時系列

a: コントロールにおける代表例    b: 各群における時系列

a



b



## 図4 NaCl餌摂食量の濃度依存性

a:メスの摂食量    b:オスの摂食量

Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction    \* :  $p < 0.05$     \*\* :  $p < 0.01$

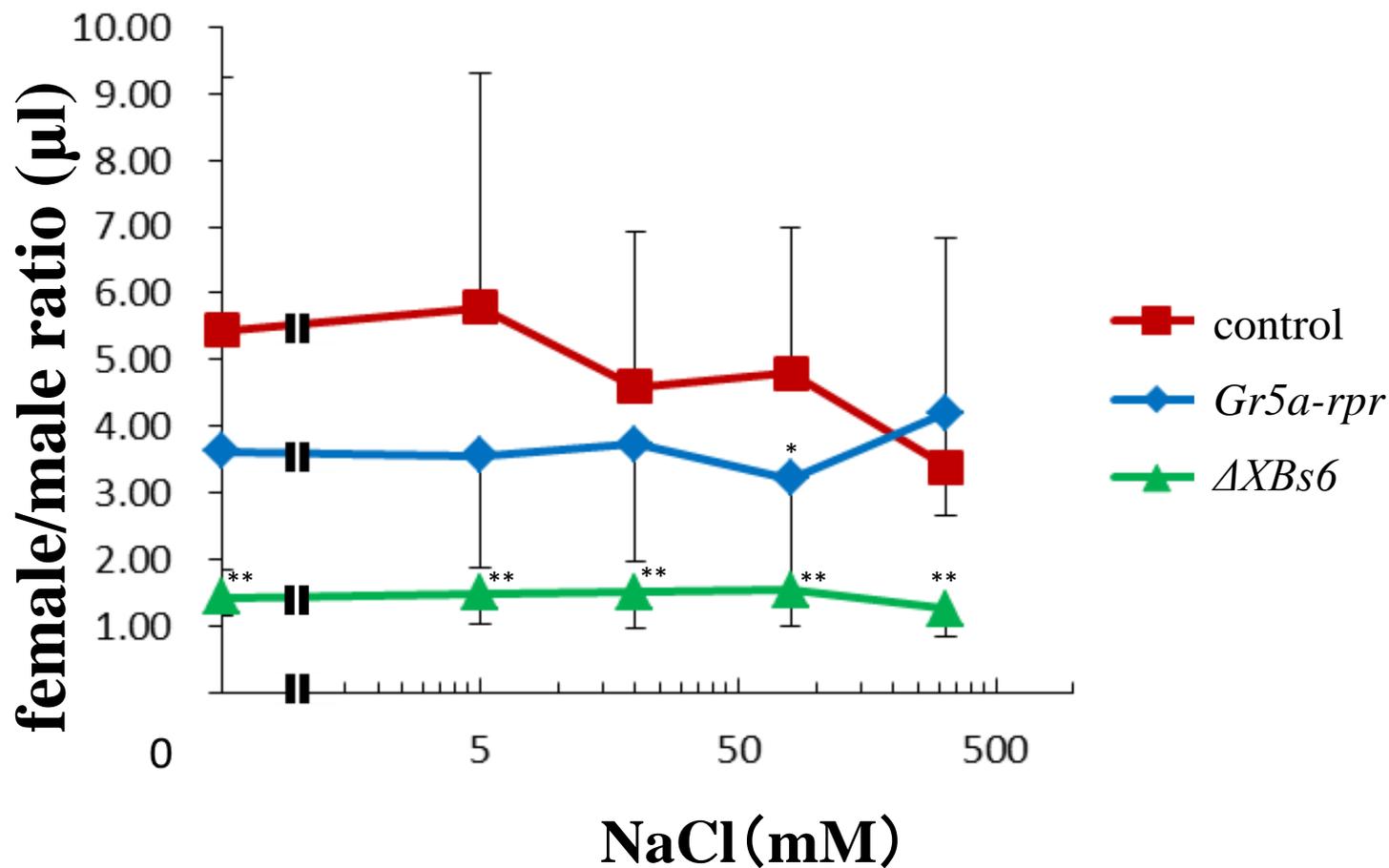


図5 NaCl餌摂食量のfemale/male ratio

Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction \* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$

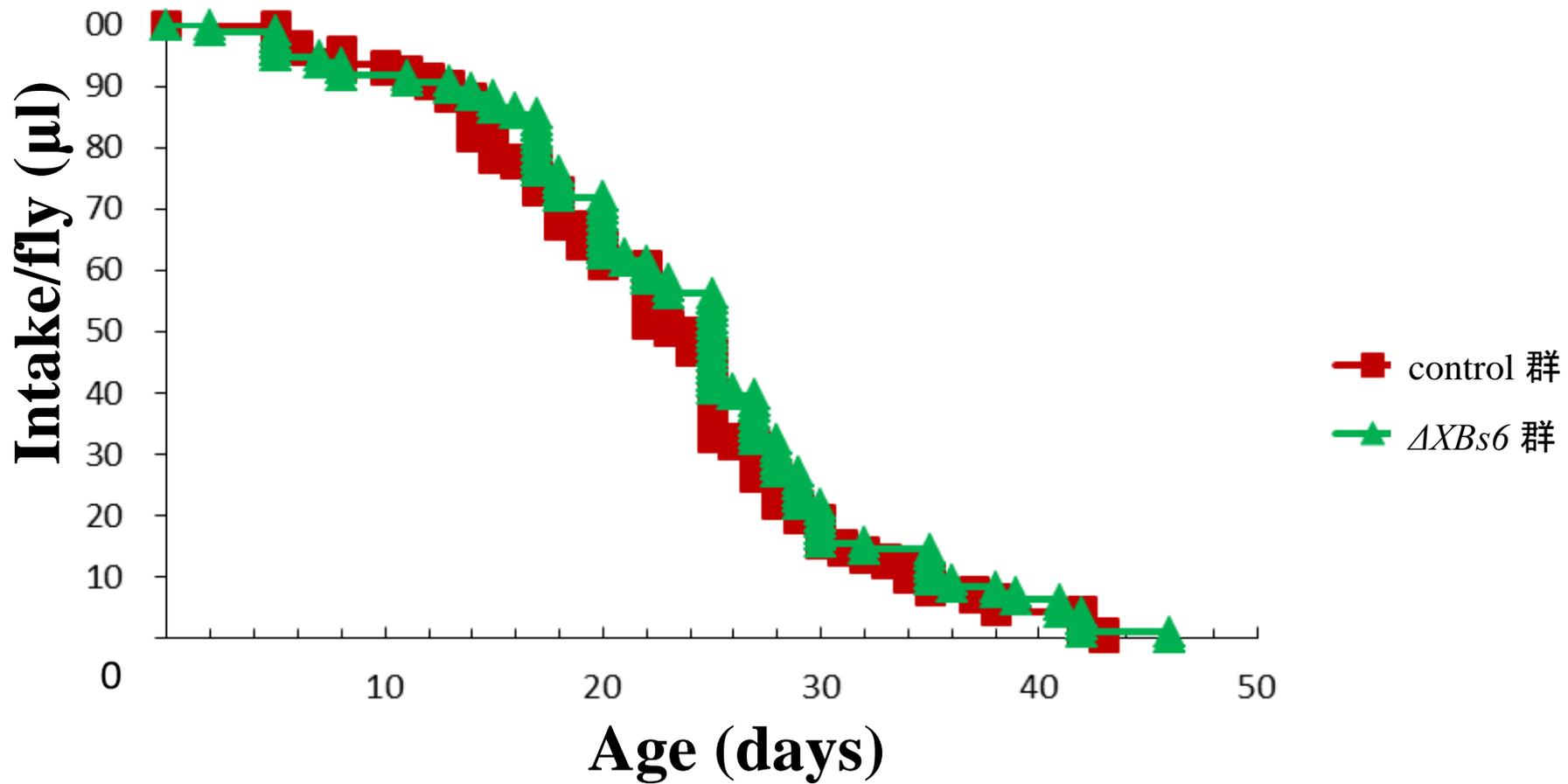


図6 コントロールとΔXBs6の生存曲線

Logrank test No significant

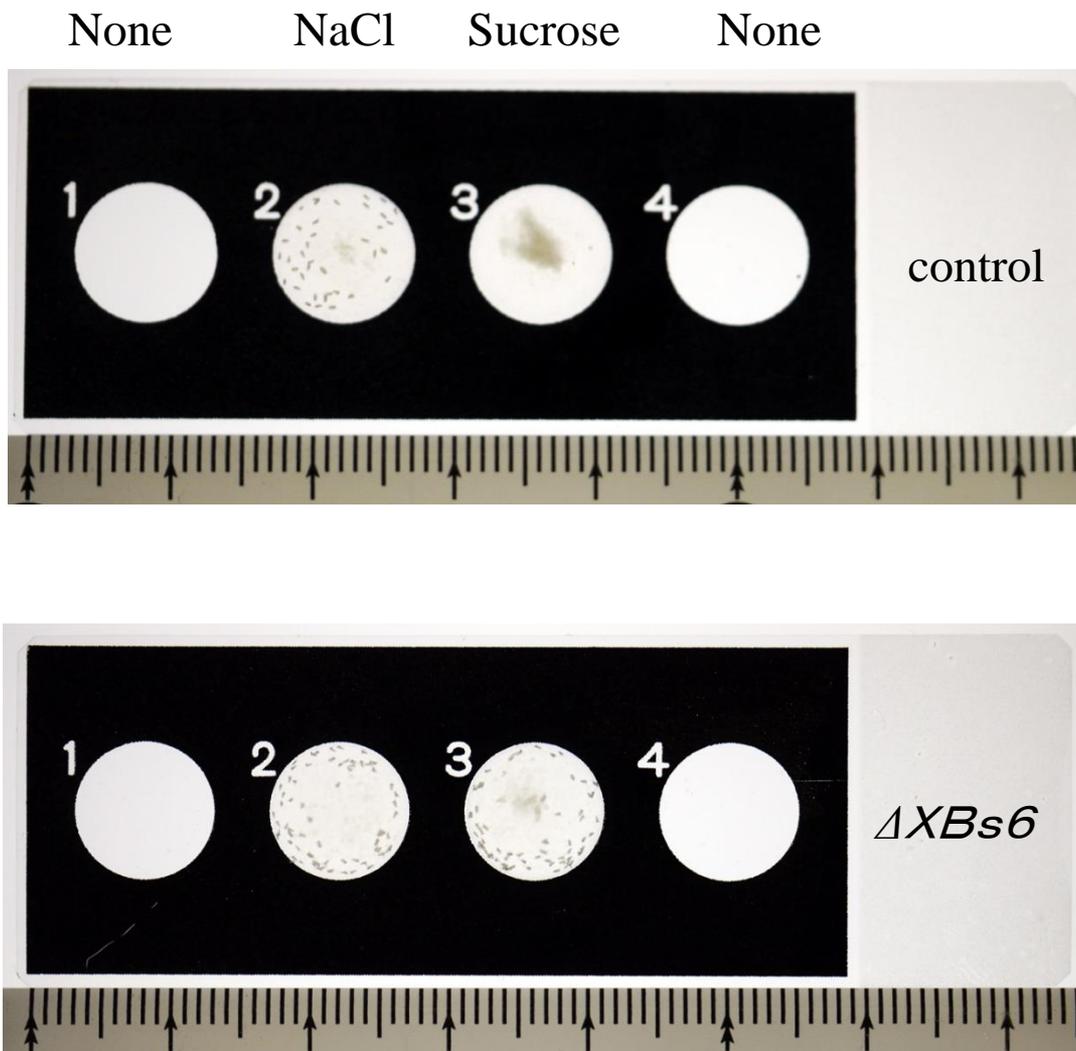


図7 産卵場所識別能力アッセイ

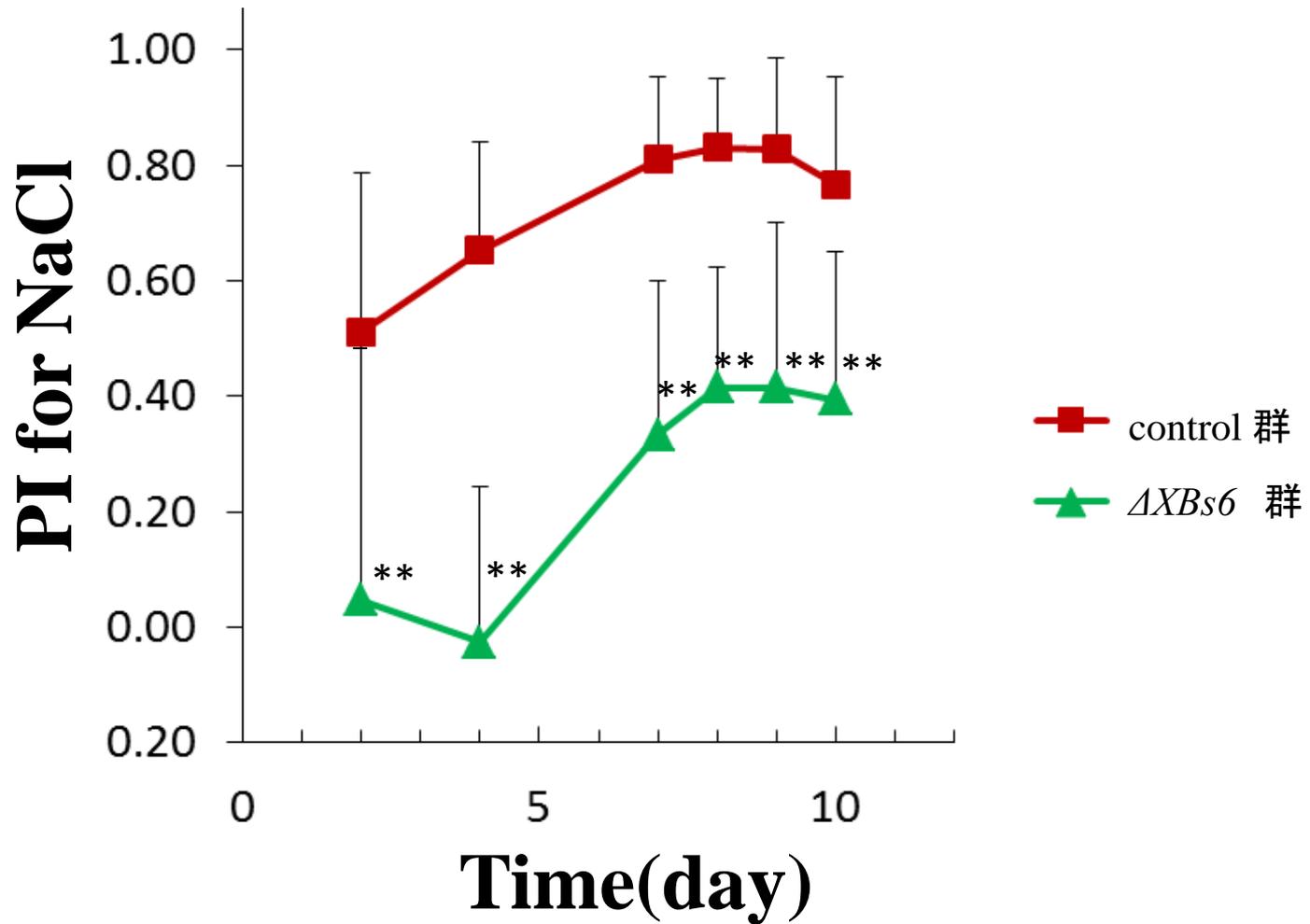


図8 産卵場所識別能力アッセイの定量解析

Mann-Whitney U-test \* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$