

博士論文

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の味細胞特異的発現と  
その機能の解析

東京大学大学院農学生命科学研究科  
応用生命化学専攻  
生物機能開発化学研究室

大池 秀明

指導教員  
東京大学大学院教授

阿部 啓子

## 略語

ABC	avidin-biotin complex
AP	alkaline phosphatase
APS	3-aminopropyltriethoxysilane
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
CK 8	cytokeratin 8
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAG	diacylglycerol
DEPC	diethylpyrocarbonate
DIG	digoxigenin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Ggust	gustducin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IP <sub>3</sub> R3	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3
LOX	lipoxygenase
MFA	meclofenamic acid
NBT	nitroblue tetrazolium chloride
NDGA	nordihydroguaiaretic acid
NGS	normal goat serum
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
cPLA <sub>2</sub>	cytosolic PLA <sub>2</sub>
iPLA <sub>2</sub>	calcium independent PLA <sub>2</sub>
sPLA <sub>2</sub>	secretory PLA <sub>2</sub>
PLC β2	phospholipase C β2
RASSL	Receptor activated solely by a synthetic ligand
RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction
SNAP-25	synaptosomal associated protein 25 kDa
SNARE	SNAP receptor
SNAP	soluble NSF attachment protein
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor (or fusion protein)
SSC	standard saline citrate
TBS	Tris buffered saline
TRP	transient receptor potential

## 目次

	ページ
序章	2
<b>第一章 味蕾に発現する PLA<sub>2</sub>分子種の特定</b>	
序	13
材料と方法	15
結果	20
RT-PCR	
<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	
免疫染色	
考察	26
<b>第二章 PLA<sub>2</sub>-IIA の味蕾における発現解析</b>	
序	30
材料と方法	31
結果	34
細胞内局在	
味細胞との関係	
シナプス形成細胞との関係	
発現開始時期の解析 ～新生児ラット・味蕾初期発生過程～	
発現開始時期の解析 ～成体ラット・味蕾維持過程～	
考察	47
<b>第三章 アラキドン酸と味蕾細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化の解析</b>	
序	52
材料と方法	53
結果	56
アラキドン酸による味蕾細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇	
考察	63
総合討論	68
参考文献	75
要旨	82

## 序章

味覚は五感の一つであり、摂取すべき食物（栄養）と忌避すべき食物（毒）とを判断する際に重要な感覚である。脊椎動物において、味物質は味蕾と呼ばれる組織によって受容され、その情報が味神経を介して中枢へと伝達され、味覚として認識される。

味蕾は、50～100 個程度の細胞が花の蕾型に集まった組織で、哺乳類ではその多くが舌上の有郭・葉状・茸状乳頭と呼ばれる乳頭構造中に存在している（図 0-1A）。電子顕微鏡による観察や、免疫組織学的解析、電気生理学的解析から、味蕾を構成する個々の細胞の形態や性質は様々であることが知られている。例えば、電子顕微鏡による観察から、哺乳類の味蕾細胞は、暗調な I 型細胞、明調な II、III 型細胞、そして、基底部に存在する丸い形態をした IV 型細胞に分類される（Farbman, 1965; Lindemann, 1996; 図 0-1C）。そして、動物種による違いも報告されているが、ウサギやラットでは、III 型細胞のみで味神経とのシナプスが観察されている（Kinnamon et al., 1985, 1988; Clapp et al., 2004）。味物質の情報を中枢へ伝えるためには、この味神経とのシナプスが必須であると考えられるが、シナプスを保有する細胞は味蕾中の 10%程度に過ぎない。また、組織化学的解析から、受容体や味シグナリング分子を発現している細胞も味蕾中の半数以下の細胞であることが示されている。このようなことから、実際に味を受容しているのは味蕾中の一部の細胞集団であり、その他は形態や機能を維持するための支持細胞や前駆細胞であると考えられる。つまり、細胞機能という側面から見た場合、味蕾はヘテロな細胞集団といえる。また、味蕾を構成する細胞は、基底部や周辺に存在していると考えられる上皮系幹細胞に由来しており（Stone et al., 1995）、放射性チミジンの追跡実験により、一つの味蕾細胞の寿命は平均して 10 日程度であることが明らかにされている（Beidler and Smallman, 1965; Farbman, 1980）。これは、1 個の味蕾中で、1 日に 5～10 個程度の細胞が出現し、また、死んでいくことを意味している。このことにより味蕾中には、細胞齢が異なる、おそらく分化段階が異なる細胞が混在しており、時間的側面から捉えても、ヘテロな細胞集団であるといえる。このように、味蕾中には機能と時間という 2 つの異なる因子の入り組んだ多様な細胞が混在している。以下に、この時間や機能に関する分子的知見をまとめる。

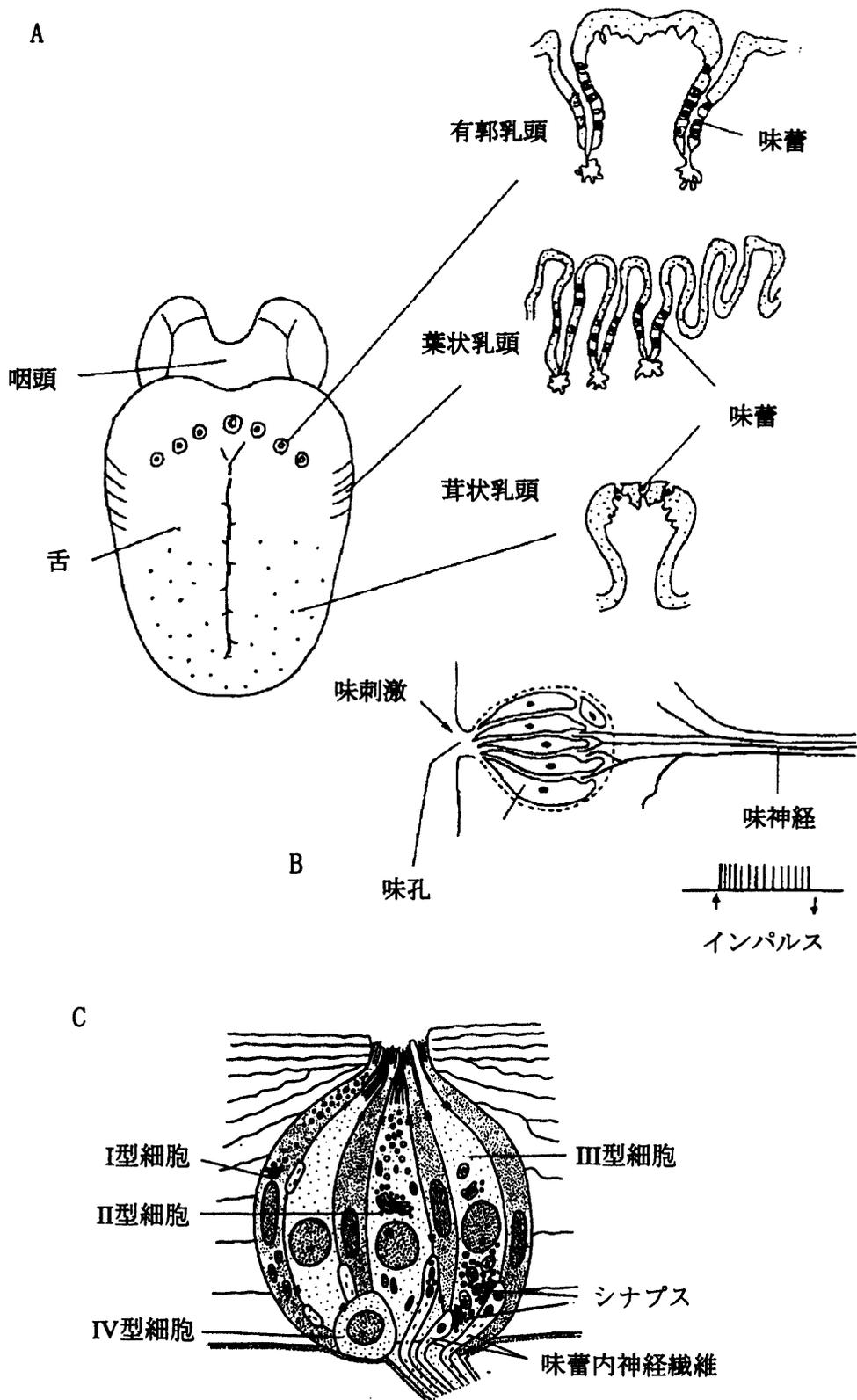


図0-1 舌上における味蕾の存在部位と味蕾の構造

舌の全体図と味蕾を含む各乳頭の断面図 (A) および、味刺激による味神経応答 (B)。

味蕾の断面模式図 (C)。電子顕微鏡観察より、I~IV型細胞に分類される。

(A、B: Yamamoto et al., 1998 より一部改変、C: 組織学 (南山堂) より一部改変)

## 味蕾に発現する分子と時間要因に関する研究

味蕾細胞の分裂後の時間（細胞齢）を解析する実験として、動物個体に注入した BrdU (bromodeoxyuridine) を追跡するという方法がある。BrdU はチミジンのアナログであり、DNA の複製時に基質として取り込まれる。また、味蕾細胞は、上皮系幹細胞から分化し、味蕾細胞となってからは分裂（増殖）しないという知見があることから (Beidler and Smallman, 1965)、味蕾中に存在する BrdU 保有細胞は、BrdU 注入後に幹細胞から分裂し、味蕾細胞へと分化した細胞であることがわかる。この方法により、苦味の細胞内情報伝達に必要な gustducin (ガストデューシン; Ggust) は分裂後 2.5 日目から、味神経の投射やシナプス形成に必要と考えられる BDNF (brain-derived neurotrophic factor) は 3 日目から発現し始めることが明らかになっている (Cho et al., 1998; Yee et al., 2003)。また、細胞骨格であるサイトケラチン 18, 19 に関して、サイトケラチン 19 は分裂後 1 日で発現を開始するのに対し、サイトケラチン 18 は 3 日目以降の細胞にしか発現しないという報告がある (Zhang et al., 1995)。しかしながら、味蕾細胞の機能を支える多くの分子に関する発現の開始時期や、味神経とのシナプス形成時期など細胞機能と時間要因を結び付ける知見は非常に少ないのが現状である。

## 味シグナリングに関する分子的知見

味は慣習的に、甘味・旨味・苦味・酸味・塩味の 5 基本味に分類される。広義の味には辛味や渋味も含まれるが、これらは味蕾を介さない感覚であることから、ここでは扱わない。

まず酸味と塩味に関してであるが、この 2 つの味は味物質が直接イオンチャンネルに働き、細胞の膜電位を変化させると考えられている (Lindemann, 1996, 2001; Gilbertson and Boughter Jr., 2003)。ASIC (acid sensitive ion channel) や HCN (hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel) といった受容体の候補分子もあるが (Ugawa et al., 1998, 2003; Stevens et al., 2001, Richer et al., 2004b)、いずれの分子も味蕾における機能の解明にまでは至っていない。

甘味・旨味・苦味に関しては、その受容体として G タンパク質共役型 (7 回膜貫通型) 受容体の T1R ファミリーと T2R ファミリーが同定されている (Hoon et al., 1999; Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Montmayeur et al., 2001)。T1R ファミリー

には T1R1、T1R2、T1R3 の 3 種類のサブタイプがあり、T1R1 と T1R3 のヘテロダイマーが旨味 (L-アミノ酸) を受容し、T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーが糖や人口甘味料、D-アミノ酸といった甘味を受容することが報告されている (Nelson et al., 2001, 2002; Li et al., 2002)。T2R ファミリーに属する受容体はヒトゲノムにおいては約 30 種類存在しており、これが苦味受容体と考えられ、そのいくつかは、苦味物質のリガンドが同定されている (Chandrashekar et al., 2000; Conte et al., 2002; Pronin et al., 2004; Kuhn et al., 2004)。

上記 3 種類の基本味 (甘味・旨味・苦味) に対応する受容体の発現細胞は、まれに重なるものの、基本的には独立していることから (Hoon et al., 1999; Adler et al., 2000; 図 0-2)、少なくとも甘味・旨味・苦味という基本味は、味細胞のレベルで識別しており、甘味受容細胞・旨味受容細胞・苦味受容細胞がそれぞれ存在していると考えられる。このことは、人工リガンドを受容するように改変した  $\kappa$ -オピオイド受容体 RASSL を甘味細胞 (T1R2 発現細胞) に発現させると、その人工リガンドである spiradoline を好んで摂取し、苦味細胞 (T2R 発現細胞) に発現させると反対に忌避することから、強く支持される (Zhao et al., 2003)。

受容体以下の細胞内シグナル伝達系に関しても、いくつかの関連分子が明らかにされている。味覚組織特異的 G タンパク質としてクローニングされた Ggust のノックアウトマウスは、苦味に対する神経応答が著しく抑制されることから、Ggust は苦味の伝達に必須であることが示されている (Wong et al., 1996)。また、ホスホリパーゼ C  $\beta$  2 (PLC  $\beta$  2) および、TRP (transient receptor potential) チャンネル M5 型 (TRPM5) のそれぞれのノックアウトマウスは塩味・酸味の応答は正常だが、甘味・旨味・苦味への応答が消失することから、PLC  $\beta$  2 と TRPM5 は、甘味・旨味・苦味に共通した細胞内シグナリング分子であることが示されている (Zhang et al., 2003)。また、組織染色等のアプローチにより、これらの分子を発現する細胞の関係が解析され、苦味の伝達に必要な Ggust を発現している細胞は、苦味受容体である T2R を発現している細胞を内包する関係にあり、PLC  $\beta$  2, TRPM5 を発現している細胞は T1R, T2R を発現する細胞を内包する関係にあることが明らかになっている (Miyoshi et al., 2001; Perez et al., 2002; 図 0-2)。また、PLC の産生物である IP<sub>3</sub> により、細胞内小胞体から Ca<sup>2+</sup> を放出する IP<sub>3</sub> 受容体 3 型 (IP<sub>3</sub>R3) や G タンパク質のアルファサブユニット Gi<sub>2</sub> を発現する細胞

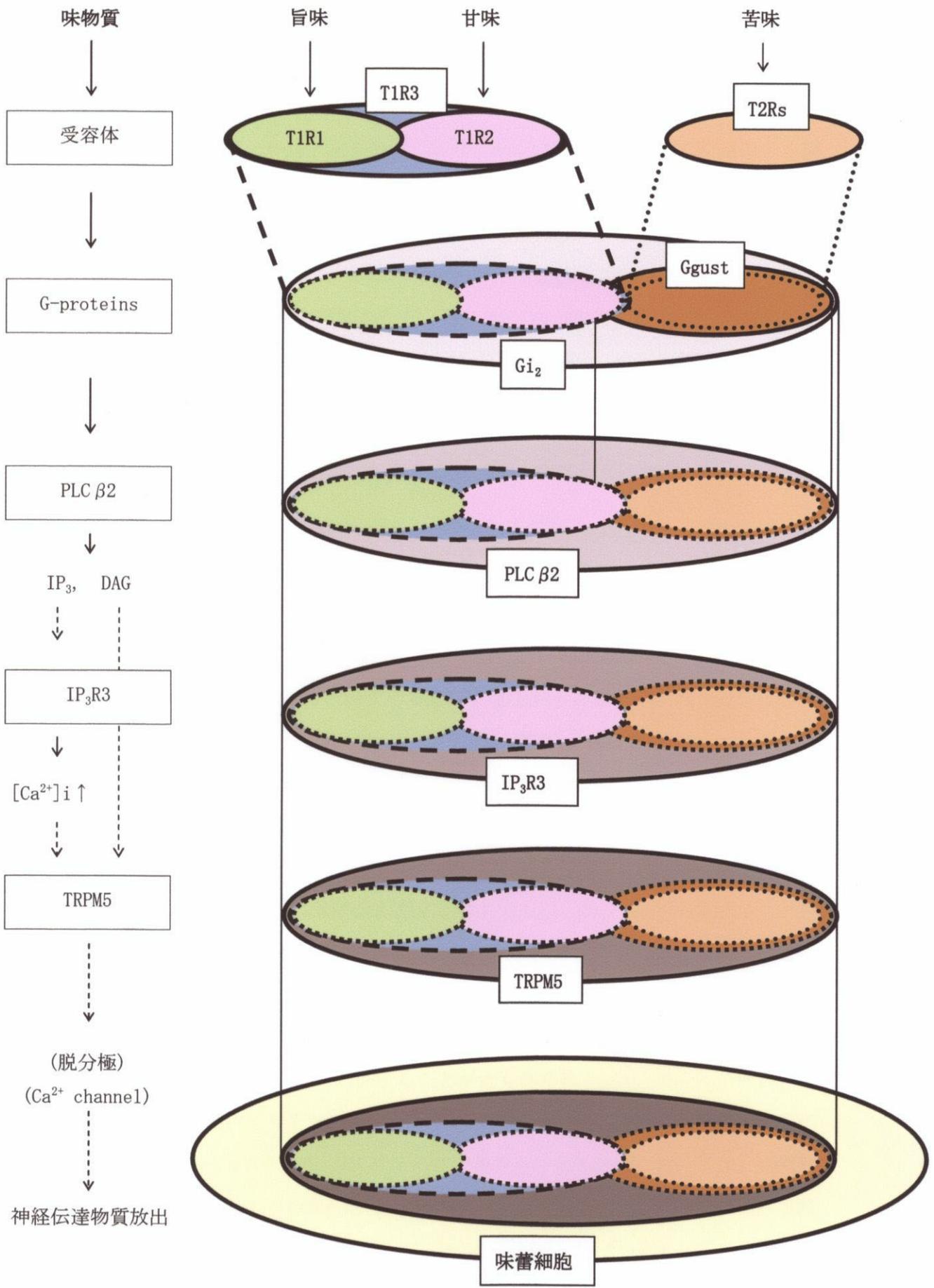


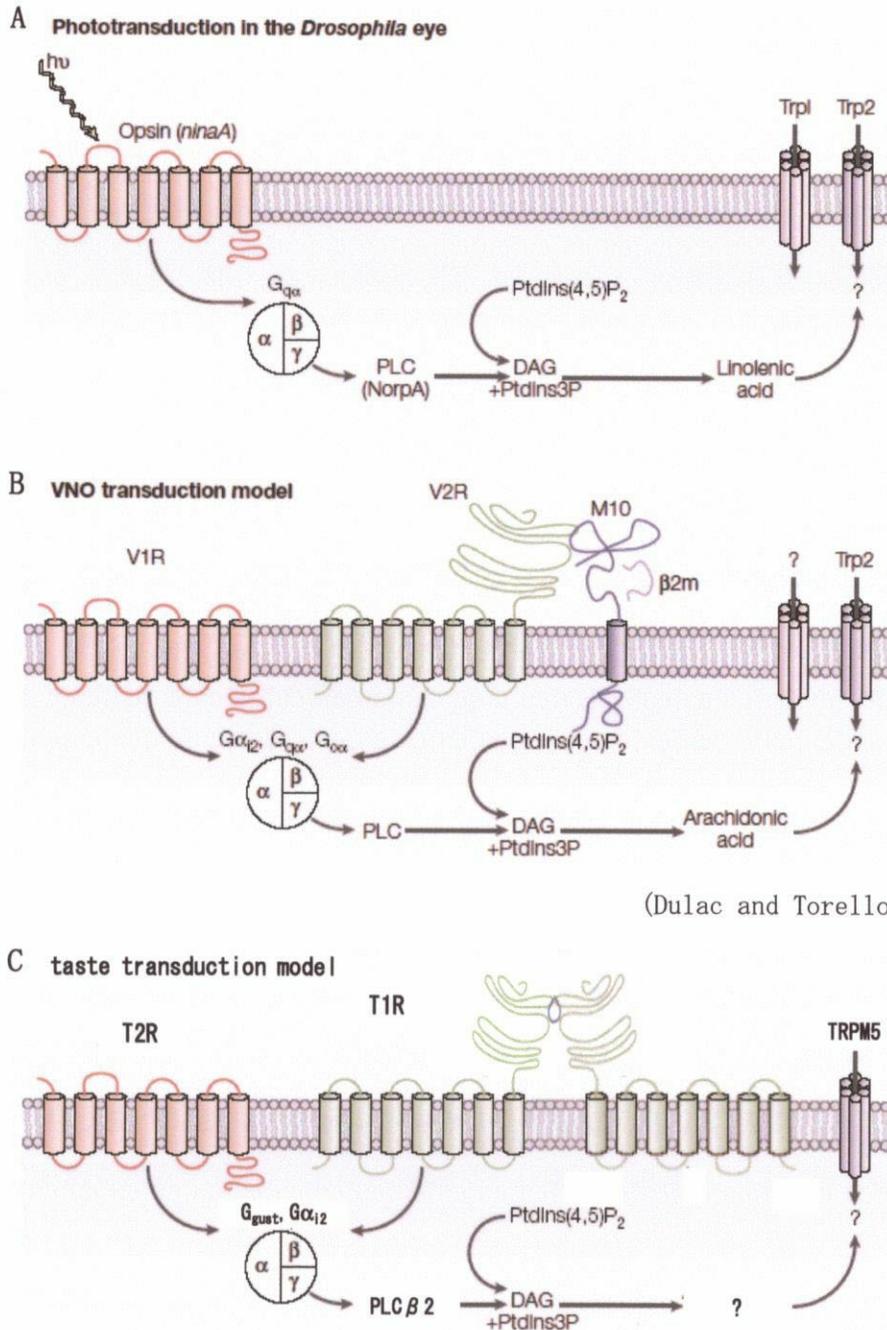
図 0-2 甘味・旨味・苦味の細胞内シグナリング(仮説、左)と関連分子の発現相関(右)

も、PLC $\beta$ 2 を発現する細胞集団とほぼ同じであることや (Kusakabe et al., 2000; Miyoshi et al., 2001)、甘味、苦味刺激により、細胞内小胞体から Ca<sup>2+</sup>を放出する細胞が存在することから (Akabas et al., 1988; Bernhardt et al., 1996)、受容体 (T1R/T2R) →G タンパク質 (Gi<sub>2</sub>/Ggust) →PLC $\beta$ 2 → (IP<sub>3</sub> ↑) →IP<sub>3</sub>R3 → (Ca<sup>2+</sup> ↑) →TRPM5 →脱分極 → (電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネル、Ca<sup>2+</sup> ↑) →神経伝達物質の放出という一連のカルシウムシグナリング経路が想定されている。しかしながら、TRPM5の活性化因子や、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの存在など、議論途上のものも多く、受容した味の情報を味神経に伝えるまでの細胞内情報伝達系には不明な点が残されており、全容が解明されるには至っていない。

### 細胞内情報伝達系とアラキドン酸

味覚と同様に、フェロモン受容を司る鋤鼻感覚、そして視覚 (ショウジョウバエ) の受容細胞においても、PLC を介したイノシトールリン脂質シグナリングが重要な細胞内情報伝達経路となっており、共通の構成因子が存在している (Dulac and Torello, 2003; 図 0-3)。外部からの刺激は外界と接する細胞膜に存在する G タンパク質共役型受容体によって受容され、G タンパク質を介して、PLC が活性化される。直接的なつながりは不明だが、その下流で TRP チャンネル (味覚: TRPM5、鋤鼻感覚: TRPC2、ショウジョウバエ視覚: TRP, TRPL) が活性化され、直接あるいは間接的に、Ca<sup>2+</sup>が流入すると考えられている。この TRP チャンネルの活性化因子として、視覚ではリノレン酸、鋤鼻感覚ではアラキドン酸といった不飽和脂肪酸が想定されている。

このように、細胞内の情報伝達系において不飽和脂肪酸は重要な役割を果たす。その代表格であるアラキドン酸は、自身がセカンドメッセンジャーとしても機能するし、ロイコトリエンやプロスタグランジンの前駆体ともなっている。自身の生理機能としては、様々なイオンチャンネルの活性を制御することがよく知られており (Meves, 1994)、嗅上皮の単離細胞において、K<sup>+</sup>チャンネル、Na<sup>+</sup>チャンネルの活性を制御し、膜電位を変化させる (Seebungkert and Lynch, 2002)。また、鋤鼻器の単離細胞においては、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こし (Spehr et al., 2002)、単離味蕾細胞においては、シス不飽和脂肪酸 (アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸) が遅延整流性 K<sup>+</sup> チャンネルの活性を阻害することが報告されている (Gilbertson et al., 1997)。アラキドン酸の産生はホ



(Dulac and Torello, 2003 より引用)

D

	視覚 ( <i>Drosophila</i> )	鋤鼻感覚	味覚
受容体 (GPCR)	opsin	V1R/V2R	T1R/T2R
G タンパク質	Gq	Gi <sub>2</sub> /Go	Gi <sub>2</sub> ?/Ggust
Effector	PLC (NorpA)	PLC (subtype 不明)	PLC β2
Mediator	Linolenic acid	Arachidonic acid	?
TRP channel	TRP/TRPL	TRPC2	TRPM5

図 0-3 視覚、鋤鼻感覚、味覚の細胞内シグナリングの共通性

ショウジョウバエの視覚 (A) および脊椎動物の鋤鼻感覚 (B) と味覚 (C) のシグナリングモデルおよび主要構成要素を表にまとめた (D)。

A、B は Dulac and Torello, 2003 より引用し、C はそれに倣って作成した。

スホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の活性化あるいは PLC/ジアシルグリセロールリパーゼの活性化が一般的であり、鋤鼻細胞では阻害剤を用いた実験から後者が想定されている。味細胞においては、アラキドン酸と PLA<sub>2</sub> の阻害剤がスナネズミの味神経応答に影響を及ぼすことから (Shiffman et al., 1995)、おそらく PLA<sub>2</sub> が存在し、この酵素が産生するアラキドン酸によって味シグナリングが制御されていることが予想される。

### ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> に関する知見

PLA<sub>2</sub> は脂質二重膜の成分であるグリセロリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解する酵素である (図 0-4)。アラキドン酸などの生理活性作用を持つ不飽和脂肪酸は、通常、この 2 位の部位に結合して貯蔵されていることから、PLA<sub>2</sub> はアラキドン酸代謝系の初発段階を制御する重要な役割を果たしている。その構造と性質から分泌型 (secretory type PLA<sub>2</sub>; sPLA<sub>2</sub>)、細胞質型 (cytosolic type PLA<sub>2</sub>; cPLA<sub>2</sub>)、Ca<sup>2+</sup> 非依存型 (Ca<sup>2+</sup> independent type PLA<sub>2</sub>; iPLA<sub>2</sub>) に大別され、これに、血小板活性化因子 (PAF) を分解する PAF アセチルヒドラーゼを加える場合もある (Kudo and Murakami, 2002; 表 0)。

sPLA<sub>2</sub> は低分子量の PLA<sub>2</sub> で、細胞外分泌のためのシグナル配列を持ち、活性発現に mM 濃度の Ca<sup>2+</sup> を必要とすることから、基本的には細胞外に分泌されてから機能すると考えられている。哺乳類では現在までに 10 種類の分子種 (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XII) が同定されている。IB 型は膵臓でリン脂質の消化に、IIA 型は炎症や神経でのエキソサイトーシスに関与すると言われているが、他の分子種に関しては知見が少なく、個々の酵素の機能的役割分担については不明な点が多い。cPLA<sub>2</sub> は、通常、細胞質に局在し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇 ( $\mu$ M 程度) により膜へ移行しアラキドン酸含有膜リン脂質を選択的に加水分解する。哺乳類では 4 分子種 (IVA~IVD) が報告されている。iPLA<sub>2</sub> は Ca<sup>2+</sup> に対する依存性はなく、構成的に働き、膜の再構築に機能していると考えられており、2 分子種 (VIA, VIB) が報告されている。

アラキドン酸の産生に重要であると考えられている sPLA<sub>2</sub> と cPLA<sub>2</sub> は、Ca<sup>2+</sup> によって活性化されることから、細胞内カルシウムシグナリング経路との関連が予想される。また、ウシの網膜桿体細胞において、光刺激の伝達を担う視覚系特異的 G タンパク質、transducin (トランスデュースン; Gt) の下流で PLA<sub>2</sub> の活性が制御されることが示されている (Jelsema and Axelrod, 1987)。味蕾中にも Gt の発現が確認されていること

表 0 哺乳類の PLA<sub>2</sub> 分子種一覧

Mammalian PLA, enzymes

Families	Enzymes <sup>a</sup>	Other names	Size (kDa)	Ca <sup>2+</sup> requirement	Catalytic site	Human chromosome	Domains
sPLA <sub>2</sub>	IB	Pancreatic PLA <sub>2</sub>	14	mM	His/Asp dyad	12q23-24	
	IIA	Synovial PLA <sub>2</sub>	14	mM	His/Asp dyad	1p34-36	
	IIC		15	mM	His/Asp dyad	1p34-36	
	IID		14	mM	His/Asp dyad	1p34-36	
	IIE		14	mM	His/Asp dyad	1p34-36	
	IIF		16	mM	His/Asp dyad	1p34-36	
	V		14	mM	His/Asp dyad	1p34-36	
	X		14	mM	His/Asp dyad	16p12-13	
	III		55	mM	His/Asp dyad	22q	
	XII		19	mM	His/Asp dyad	4q25	
cPLA <sub>2</sub>	IVA	cPLA <sub>2</sub> α	85	<μM	Ser/Asp dyad	1q25	C2 domain
	IVB	cPLA <sub>2</sub> β	110	<μM	Ser/Asp dyad	15	C2 domain
	IVC	cPLA <sub>2</sub> γ	60	None	Ser/Asp dyad	19	
iPLA <sub>2</sub>	VIA	iPLA <sub>2</sub> β	85-88 <sup>b</sup>	None	Ser/His/Asp triad	22q13	Ankyrin repeat
	VIB	iPLA <sub>2</sub> γ	90	None	Ser/His/Asp triad	7q31	
PAF-AH	VIIA	Plasma PAF-AH	45	None	Ser/His/Asp triad	N.D. <sup>c</sup>	
	VII B	PAF-AH-II	40	None	Ser/His/Asp triad	N.D.	
	VIII A	PAF-AH-I α <sub>1</sub> subunit	30	None	Ser/His/Asp triad	N.D.	
	VIII B	PAF-AH-I α <sub>2</sub> subunit	30	None	Ser/His/Asp triad	11q23	

<sup>a</sup> According to the Dennis's classification.

<sup>b</sup> Sizes of two enzymatically active splice variants.

<sup>c</sup> Not determined.

Kudo and Murakami, 2002 より引用。現在はこれに加えて、cPLA<sub>2</sub> の IVD が報告されている。

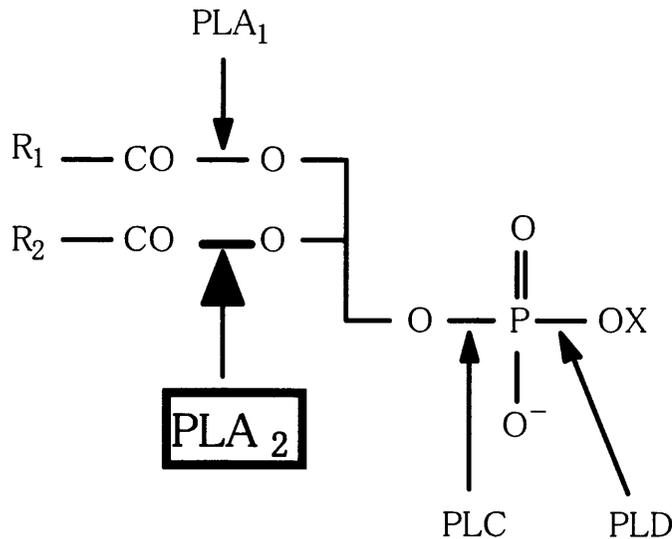


図 0-4 各種ホスホリパーゼがグリセリン脂質を切断する部位

アラキドン酸などの不飽和脂肪酸は、R<sub>2</sub>の部位に多い。

から(Ruiz-Avila et al., 1995)、Gt、PLA<sub>2</sub>を介したシグナリング経路の存在が予想される。さらに、transducin は苦味の細胞内情報伝達系に必須な G タンパク質である gustducin (Ggust) と約 80%と高い相同性を持つことから、苦味細胞においては、Ggust の下流で PLA<sub>2</sub>が機能している可能性が示唆される。

当研究室では、数年前から、味蕾細胞の機能を特徴付ける分子の探索を行っており、ラット有郭乳頭上皮に対するマイクロアレイ解析より、IIA 型 PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>-IIA) が味蕾内で強く特徴的に発現していることを見出している (永松、2004 修士論文)。先に述べたように、味細胞には、PLA<sub>2</sub>を起点としたアラキドン酸シグナリング経路の存在が予想されたことから、本研究は、マイクロアレイ解析で抜け落ちた分子を解析することも含め、味蕾に発現する PLA<sub>2</sub>分子種の検索から開始した。第一章では、RT-PCR 法および *in situ* ハイブリダイゼーション法により網羅的な発現解析を行い、味細胞に発現する分子種の候補として PLA<sub>2</sub>-IIA を特定した。第二章では、機能解明への足がかりとして、PLA<sub>2</sub>-IIA の細胞内局在と、発現細胞の性質、そして発現の開始時期を免疫組織学的に解析し、第三章では、単離味蕾細胞の Ca<sup>2+</sup>イメージングにより、アラキドン酸が味蕾細胞に与える影響を解析した。

## 第一章

### 味噌に発現する PLA<sub>2</sub> 分子種の同定

## 序

哺乳類では、現在までに 16 の PLA<sub>2</sub> 分子種が報告されている (表 0)。以前に当研究室で行った、ラット有郭乳頭上皮 (味蕾を多く含んでいる) を用いたマイクロアレイ解析により、そのうちの 6 分子種 (IB, IIA, IIC, IVA, V, VIA) の発現状況については既にデータを得ている (表 1-1)。その結果、IIA、IVA に関しては、この組織に mRNA が発現していることが明らかになっている。特に、IIA に関しては *in situ* ハイブリダイゼーション法により、味蕾中に発現することを確認している (永松、2004 修士論文)。しかしながら、マイクロアレイに載っていなかった 10 分子種に関するデータはなく、また、味覚組織における PLA<sub>2</sub> の発現を記述した論文も今のところ見当たらない。

そこで、本研究では、味蕾に発現している PLA<sub>2</sub> 分子種を同定することを目的とし、まず、感度が高く、簡便な方法である RT-PCR 法による解析から開始した。対象動物は、上述のマイクロアレイ解析にも使用し、研究室内外でのデータ蓄積が多く、組織の取り扱いも比較的容易なラットに決め、できる限り網羅的に解析を行った。さらに、味蕾細胞のレベルでも発現を確認するため、次段階として *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析を行った。味シグナリングに関与する PLA<sub>2</sub> 分子種は、味細胞特異的に発現していることが期待され、発現解析の結果、IIA のみがこれに当てはまっていた。IIA に特異的な抗体を用い、免疫染色を行い、このタンパク質の味蕾での発現を確認した。

表 1-1 マイクロアレイ解析による有郭乳頭上皮および周辺上皮、嗅上皮、鋤鼻上皮における各種 PLA<sub>2</sub> の mRNA 発現状況

	アクセス番号	有郭乳頭上皮		周辺上皮		嗅上皮		鋤鼻上皮	
cPLA <sub>2</sub> (IVA)	U38376	107.0	P	90.6	P	96.6	P	166.7	P
sPLA <sub>2</sub> (IIA)	X51529	76.8	P	1.7	A	19.6	A	5.9	A
sPLA <sub>2</sub> (IIC)	U07798	22.9	M	37.4	A	41.8	A	33.7	A
iPLA <sub>2</sub> (VIA)	U51898	26.8	A	36.5	A	118.8	P	71.5	A
sPLA <sub>2</sub> (V)	U03763	23.3	A	9.6	A	19.1	A	9.5	A
sPLA <sub>2</sub> (IB)	D00036	9.2	A	15.9	A	23.8	A	6.6	A

各組織における発現量を数値で表している。各数値の右側の欄にあるPはPresent (陽性)、AはAbsent (陰性)、MはMarginal (境界) を意味している。

## 材料と方法

### 材料

ウィスター系ラット（オス、約 150-200 g）を日本生物材料センターより購入した。

### RT-PCR

#### <味覚組織・膵臓 total RNA の抽出/poly(A)<sup>+</sup>RNA の精製>

ラットを麻酔後、頸椎脱臼させ、すぐに舌を摘出した。有郭・葉状乳頭直下にコラゲナーゼ (Type I ; Sigma) を 2 mg/ml 含むリンガー溶液 (150 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 3.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM HEPES, 7.8 mM glucose, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>) を注入し、室温で 30 分間静置した。実体顕微鏡下で、はさみを用いて乳頭周辺上皮を切り、ピンセットを用いて乳頭を含む上皮を剥離した。24 匹より得た有郭・葉状乳頭上皮を ISOGEN (ニッポンジーン) に浸し、はさみで細かく切断した。膵臓は、頸椎脱臼後すぐに摘出し、適当量 (数十 mg) を切り取り、ISOGEN 中で細かく切断した。以下の操作は製品のプロトコールに従い、total RNA を抽出し、Oligotex-dT30<Super> (Roche) を用いて、poly(A)<sup>+</sup>RNA を精製した。

#### <cDNA の合成>

逆転写反応は 20  $\mu$ l スケールで行った。反応溶液の組成は以下の通りである : poly(A)<sup>+</sup>RNA (\*), 5 mM (100 ng) oligo(dT)<sub>12-18</sub> プライマー, 500  $\mu$ M each dNTPs, 10 mM DTT, 1 $\times$ First Strand Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 15 U RNAGuard (Amersham Bioscience), 200 U Super Script II 逆転写酵素 (Invitrogen)。まず、poly(A)<sup>+</sup>RNA、oligo(dT)<sub>12-18</sub> プライマー及び dNTPs を入れ、65°C で 5 分間変性処理を行った後、急冷し、First Strand Buffer, RNAGuard, Super Script II 逆転写酵素を加えてから、cDNA 合成反応を 42°C で 30 分間行った。Super Script II 逆転写酵素を 200 U 追加し、45°C で 30 分間反応させた後、70°C で 15 分間失活させた。

\* 有郭・葉状乳頭上皮は 30  $\mu$ g total RNA より精製した全量、膵臓は 100  $\mu$ g total RNA より精製した全量を使用した。

#### <PCR>

PCR 反応は 25  $\mu$ l スケールで行った。上で得られた cDNA 0.1  $\mu$ l、各プライマー 20 pmol

及び *Ex Taq* ポリメラーゼ (Takara) を用い、94°C、2 分の DNA 変性処理後、以下の条件で 40 サイクルの反応を行った：94°C、30 秒；53 °C、30 秒；72°C、2 分（最後のサイクルのみ 72°C は 5 分）。プライマーの配列は表 1-2 に示した。PCR 産物の一部は、*Eco* RV で切断した pBlueScript II SK(-) (Stratagene) に挿入し、ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

### *In situ* ハイブリダイゼーション

#### <プローブの合成>

上で得られた各 cDNA 断片を含むプラスミドをそれぞれ *Bam*HI (IIE, IVA)、*Eco*RI (IIA, IID, III, V, X, XII)、*Xho* I (IB, IIC, IIF, IVB, VIA)（それぞれ cDNA 断片中にサイトはない）によって消化し、線状化した。このプラスミドを鋳型として、ジゴキシゲニン-UTP を含む rNTP 溶液 (Roche) 中で T7 (IIA, IID, IIE, III, IVA, V, X, XII) もしくは T3 (IB, IIC, IIF, IVB, VIA) RNA ポリメラーゼ (Stratagene) を反応させて、ジゴキシゲニン標識したアンチセンス RNA プローブを合成した。

#### <試料の凍結と薄切>

ラットの有郭乳頭を含む部位を適切な大きさにトリミングした後、O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) Compound (Sakura) 中に包埋し、液体窒素上に浮かべたアルミホイルに乗せて凍結し、要時まで-80°Cに保存した。クライオスタットで 10 μm 厚の凍結切片を作製し、APS (3-aminopropyltriethoxysilane) コートしたスライドガラス (マツナミガラス) に貼り付けて-80°Cで保存した。

#### <切片の前処理>

ジエチルピロカーボネート (DEPC) により前処理を行う方法は、Braissant and Wahli による方法 (Braissant and Wahli, 1998) に従った。切片を貼り付けたプレパラートを 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 中で 10 分間固定し、0.1% ジエチルピロカーボネートを含む PBS 中で 15 分間 2 回、5×SSC (20×SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na<sub>3</sub>Citrate-2H<sub>2</sub>O) 中で 15 分間前処理した。これらの操作は全て室温で行った。

#### <ハイブリダイゼーション>

50%ホルムアルデヒド、5×SSC、40 μg/ml サケ精子 DNA からなるプレハイブリダイ

ゼーション液 200  $\mu$ l を切片に載せ、湿室に移し、58°Cで2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。次に、プレハイブリダイゼーション液を、約 50 ng の RNA プローブを含むハイブリダイゼーション液(50%ホルムアミド、5×SSC、5×Denhardt' s液(\*)、500  $\mu$ g/ml サケ精子 DNA、250  $\mu$ g/ml 酵母 tRNA、1 mM DTT) に交換し、パラフィルムで覆い、湿室中で2昼夜 58°Cでハイブリダイゼーションを行った。パラフィルムを外し、5×SSC 中、5 分間 1 回 58°Cで、0.2×SSC 中、30 分間 2 回 58°Cで、0.2×SSC 中、5 分間 1 回室温で洗浄した。

\*Denhardt' s 液 : 0.1% w/v Ficoll 400、0.1% w/v polyvinylpyrrolidone、0.1% w/v ウシ血清アルブミン (BSA)

#### <抗体反応とシグナルの検出、画像の取得>

切片を TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) に、5 分間浸した後、TBS に 0.5% Blocking reagent (Roche) を含むブロッキング液中で、1 時間室温でブロッキングし、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 Fab 断片をブロッキング液で 1000 倍に希釈した溶液中で、1 時間室温で反応させた。反応後、TBS 中、15 分間 3 回室温で洗浄し、AP バッファー (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) に 5 分間浸した。発色反応は、切片に NBT (nitro-blue tetrazorium)、BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoryl phosphate) (ともに Roche) を含む AP バッファーを載せ、遮光した湿室中、室温で 5 時間あるいは 4°Cで一晩行った。AP バッファーで 10 分間洗浄した後、Gel/Mount (Biomeda) とカバーガラスで封入し、DP-70 CCD カメラシステム (Olympus) で画像を取得した。

#### 抗体染色

##### <試料の凍結と薄切>

上記 *in situ*ハイブリダイゼーションと同様の操作を行った。

##### <抗体反応と ABC 法によるシグナルの検出、画像の取得>

切片を貼り付けたスライドガラスを 4% PFA/PBS に浸漬し、室温で 10 分間固定した。PBS で 10 分間ずつ 3 回洗浄した後、切片の周辺にポップペン (大道産業) で堤防を築き、切片の上にブロッキング溶液 (3% 正常ヤギ血清 (NGS、Vector Laboratories)、1% BSA (Sigma)を含む PBS) を載せ、室温で一時間、湿室中 (以下の抗体反応も全て湿室中)

に静置した。ブロッキング溶液を除き、一次抗体溶液（抗 humanPLA<sub>2</sub>-IIA 抗体（Cayman）を 1/50 量、1% NGS、1% BSA を含む PBS）を載せ、4℃で一晩反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、二次抗体溶液（ビオチン化マウス IgG 抗体（Vector Laboratories）を 1/1000 量、1% BSA を含む PBS）を載せ、室温で 1 時間反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄した後、ストレプトアビジンとビオチン化 HRP の複合体溶液（東洋紡）を載せ、室温で 30 分間静置した。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、Metal Enhanced DAB Substrate Kit（PIERCE）を用いてシグナルを発色させた。5 分後にイオン交換水で発色を止め、Gel/Mount とカバーガラスで封入し、DP-70 CCD カメラシステムで画像を取得した。

表 1-2 RT-PCR に使用したプライマーの配列およびその領域

	アクセス番号(NCBI)	コード領域	使用領域		Primer (5' -3' )
PLA <sub>2</sub> -IB	NM_031585	12-452	5-536	S AS	CGCCAAGATGAAACTCCTTC GCTGGTACTTTATTAGAGGGTG
IIA	NM_031598	550-990	548-1123	S AS	GCATGAAGTCTCCTCTGTTG CTCCTTCTGGGTGAAGACAG
IIC	NM_019202	714-1190	685-1224	S AS	CTGGCAGATGAAGGTGAGAC GACTAGAGCAGGTGACAGAG
IID	NM_011109 (mouse) XM_233590 (rat)	80-514	70-622	S AS	TGCTGGAACCATGAGACTTG AGGTCCAAGAGACTAGACAC
IIE	NM_012044 (mouse) XM_238421 (rat)	166-594	94-609	S AS	CCCTGCAGTACAACGACTAC GTCTTGTGAGCGCTGTTGAG
IIF	NM_012045 (mouse)	251-757	341-881	S AS	GCCATCACACAGAAACTC TACCAAGCTCACTACAGGAC
III	NM_015715 (human) XM_223553 (rat)	130-1659	682-1229	S AS	ACCTGTGTGGCTTGGCACT TTGCCATCAGGACAGTTGAG
IVA	NM_133551	173-2431	2247-2776	S AS	GGCTACATGATCTGATGTAC GTGTTGTAACATGGCATGAAC
IVB	NM_145378 (mouse) XM_230485 (rat)	1-951	579-1181	S AS	ACACTTCTTGCTGCATCCAC AGGCATTGCTGTACCTGATC
V	NM_017174	216-629	214-802	S AS	AAATGAAGCGCCTCCTCAC ACATCAGAGTCCCTCTCTAG
VIA	NM_053892	475-2730	2706-3250	S AS	TGTCCAGCTGCTGCTATCTC ACAGTTGAGGTGGCCTTGAG
X	NM_017176	49-504	317-853	S AS	TATACCGATACCCGTGGAAG CCTAGATGTATCGTGGCAATG
XII	AY007381-2 (mouse) AW918074 (rat)	2-499	285-811	S AS	AAGGCAAGAACGACTGTGAC GGTACAGCTACGAAACCAAG
T1R3	NM_130818	1-2577	1571-2118	S AS	ATGACTGTGTGGACTGCAAG CATCAAGTACCAGGCACATAG

ラットの配列が報告されていないものは、マウスもしくはヒトの配列のアクセス番号を載せ、その下にラットのゲノムのアクセス番号を載せた。

## 結果

### RT-PCR

哺乳類で報告されている PLA<sub>2</sub>、16 分子種のうち、ラットでデータベースに登録されている 7 分子種 (IB, IIA, IIC, IVA, V, VIA, X) および、ラットでは登録されていないが、マウスまたはヒトで登録されていて、さらにラットのゲノム情報や EST データベースからコード領域が推測できた 6 分子種 (IID, IIE, IIF, III, IVB, XII) の合計 13 分子種について、それぞれ特異的なプライマーセットを設計した (表 1-2)。各プライマーセットは、ゲノム DNA 由来の増幅反応と区別するため、イントロンを含む領域に設定した。増幅断片の鎖長は 500 bp 程度とし、次の *in situ* ハイブリダイゼーション解析に使用できるようにした。これらのプライマーセットを用い、ラット味覚組織 (有郭・葉状乳頭上皮) 由来 cDNA を鋳型に、40 サイクルの PCR 反応を行ったところ、IB を除く 12 分子種全ての PLA<sub>2</sub> で目的の cDNA 断片が増幅された (図 1-1A-C)。特に、IIA、IIF、V、XII に関しては cDNA 断片が効率よく増幅された。IB に関しては、同じプライマーセットを用い、既に発現が報告されている膵臓組織の cDNA (Ohara et al., 1986) を鋳型に PCR 反応を行ったところ、目的の cDNA 断片が増幅されたことから、味覚組織ではほとんど発現していないことが明らかになった。なお、鋳型に用いた味覚組織 cDNA の陽性コントロールとして、味細胞特異的に発現している味覚受容体、T1R3 に対するプライマーセットを設計し、上記分子と同時に PCR 反応を行い、cDNA 断片の増幅を確認した (図 1-1D)。

### *In situ* ハイブリダイゼーション

上記 RT-PCR で用いた味覚組織 cDNA には、味蕾周辺の上皮細胞に由来する cDNA も多く含まれていることから、味蕾における発現を確認すること、および細胞レベルでの発現を解析することを目的とし、ラット有郭乳頭切片に対し *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。RT-PCR で得られた各分子種の cDNA を基に RNA プローブを作製し、ラット有郭乳頭切片に対してハイブリダイゼーションを行った。ほとんどの分子種に関しては、若干、周辺上皮よりも味蕾内での発現が強い印象を受けるものもあるが、いずれも上皮層全体が一様に薄く染まり、味蕾内にはっきりとしたシグナルは得られなかった (図

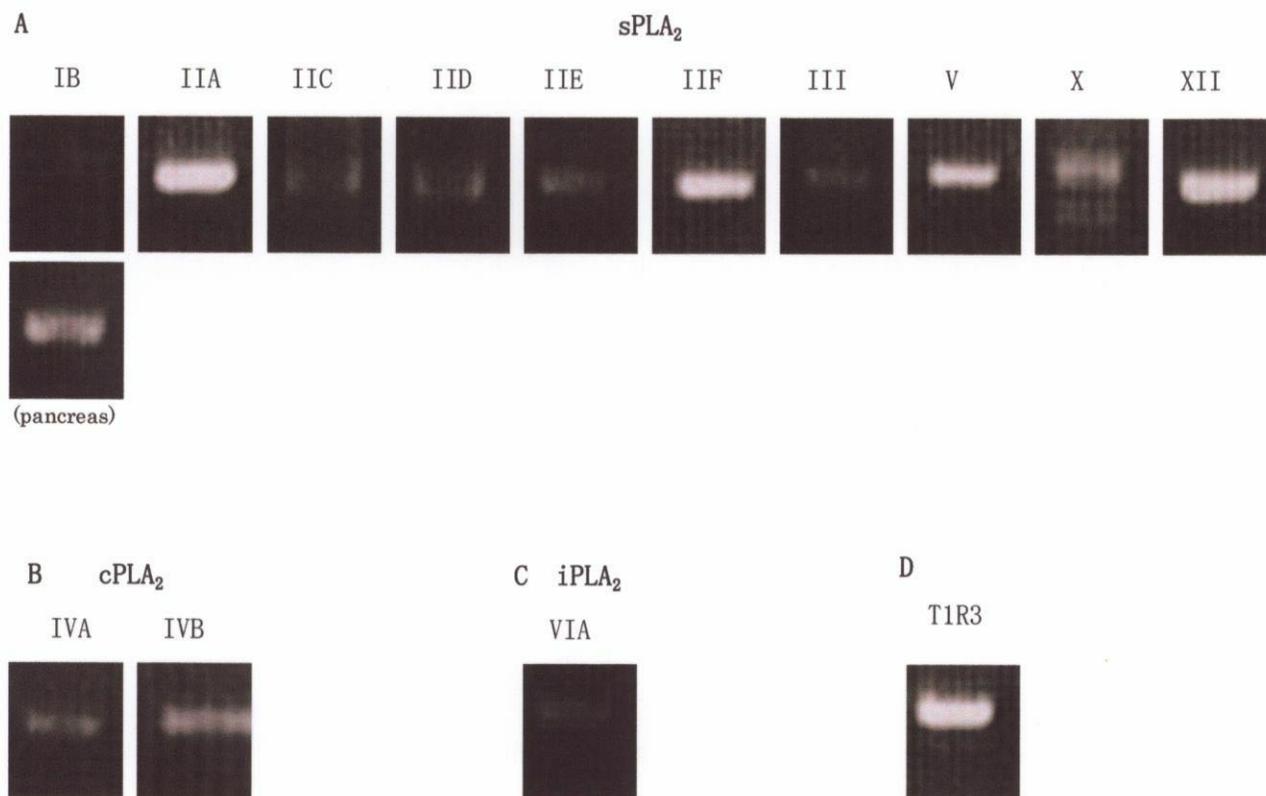


図 1-1 RT-PCR によるラット味覚組織における PLA<sub>2</sub> の発現解析

各分子種ごとに特異的なプライマーセットを用いて、ラット有郭・葉状乳頭上皮由来 cDNA を鋳型に 40 サイクルの RT-PCR を行った。sPLA<sub>2</sub> (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XII) のうち IB を除く全ての分子種で目的の cDNA 断片が増幅された (A ; 上段)。IB は陽性コントロールである膵臓を鋳型にした場合は cDNA 断片が増幅された (A ; 下段)。cPLA<sub>2</sub> (IVA, IVB) および iPLA<sub>2</sub> (VIA) についても目的の cDNA 断片が増幅された (B, C)。陽性コントロールである味覚受容体、T1R3 の結果 (D)。T1R3 は味細胞のみで特異的に発現している分子。

1-2 B、D-N)。それに対し IIA は、味蕾内の一部、おそらく半数以下の細胞に濃いシグナルが観察され、反対に、味蕾内の他の細胞や周辺上皮細胞では、一様な薄い染色もほとんど見られなかった (図 1-2 C)。このことから、IIA 以外の分子種は、発現総量に差はあるとしても、味蕾および周辺上皮全体を通して一様に発現している (あるいは発現していない) のに対し、IIA は味蕾内の一部の細胞のみで mRNA が強く発現していることが明らかになった。

### 免疫染色

味蕾における PLA<sub>2</sub>-IIA タンパク質発現の確認、および、より詳細な発現状況の解析を目的に、ラット有郭乳頭切片に対し免疫染色を行った。抗体は、入手可能であったマウスモノクローナル抗 humanPLA<sub>2</sub>-IIA 抗体を利用した。その結果、*in situ*ハイブリダイゼーションと同様に、味蕾中の 10%程度の細胞で特異的なシグナルが観察された (図 1-3 A、B)。染色シグナルは、核から味孔にかけて、まれに核より基底部側にかけての細胞質中に、斑点状のシグナルが連なるように見受けられた。一次抗体のみを除いた陰性コントロールでは、シグナルは観察されなかった (図 1-3C, D)。

以上の結果から、味蕾中の一部の細胞で PLA<sub>2</sub>-IIA の mRNA およびタンパク質が強く発現していることが明らかになった。

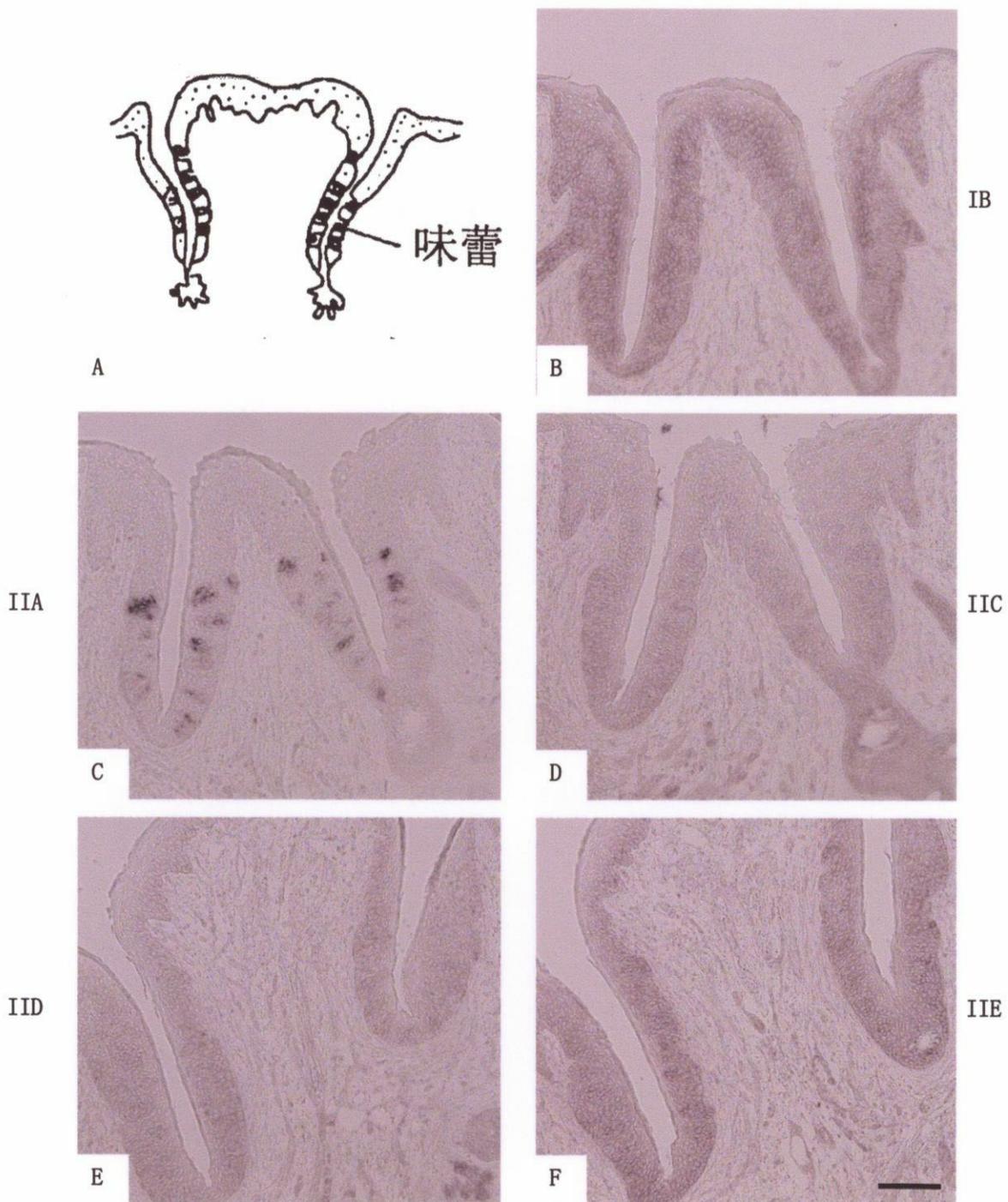
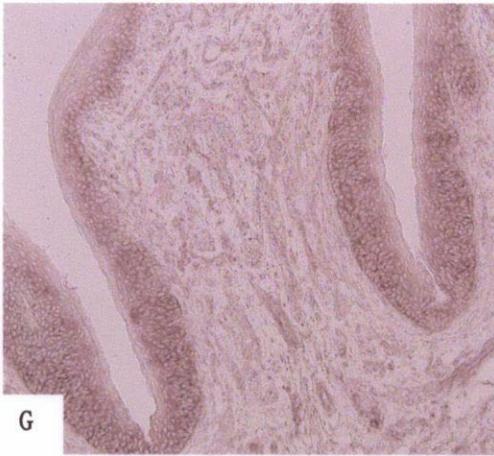


図 1-2 *in situ* ハイブリダイゼーションによるラット有郭乳頭における PLA<sub>2</sub> 各分子種の mRNA の発現解析

A. 有郭乳頭における味蕾の位置を模式的に示した。  
 B.-N. ラット有郭乳頭切片に対し PLA<sub>2</sub>-IB (B), IIA (C), IIC (D), IID (E), IIE (F), IIF (G), III (H), V (I), X (J), XII (K), IVA (L), IVB (M), VI (N) の mRNA に対するアンチセンス RNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。IIA のみ、味蕾の一部で強いシグナルが観察された。スケールは 50 μm (F, N)、写真は全て同倍率。

IIF



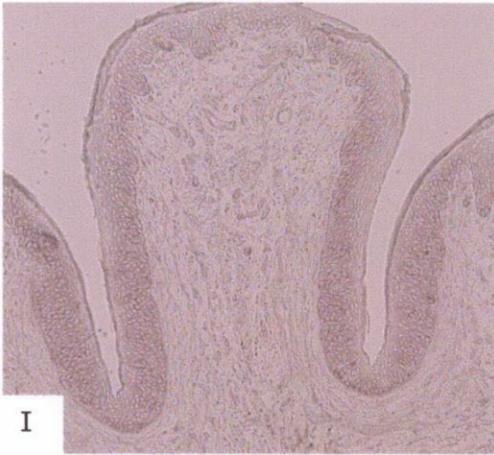
G



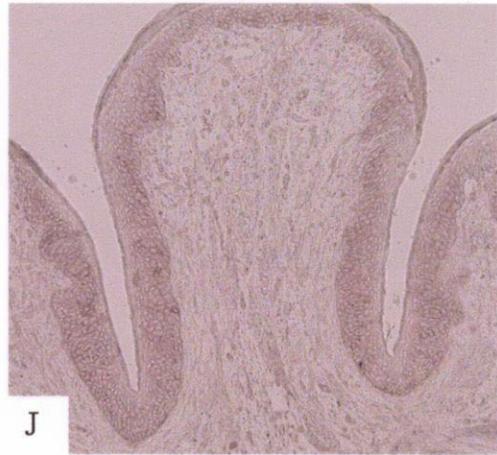
H

III

V



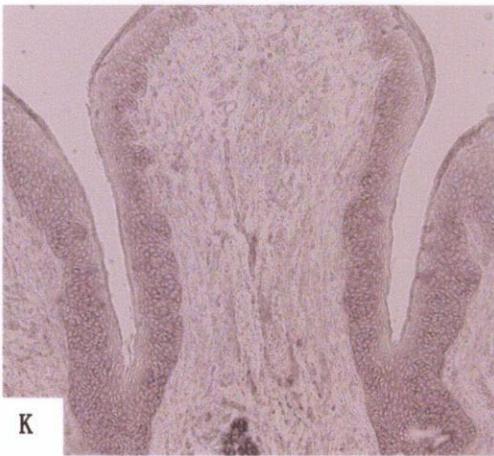
I



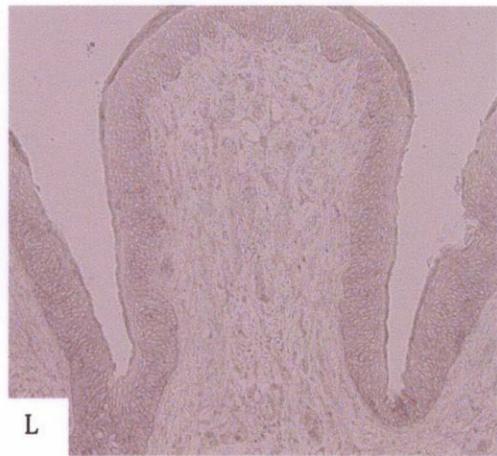
J

X

XII



K



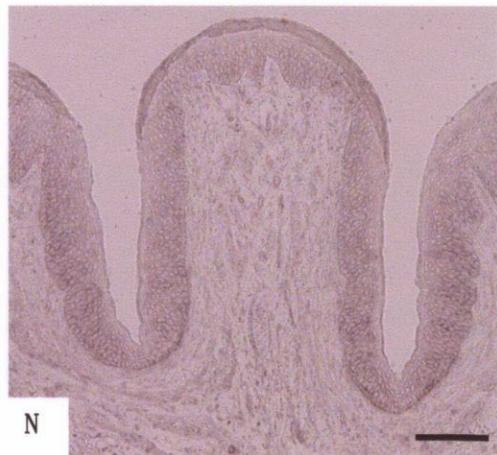
L

IVA

IVB



M



N

VIA

図 1-2 続き

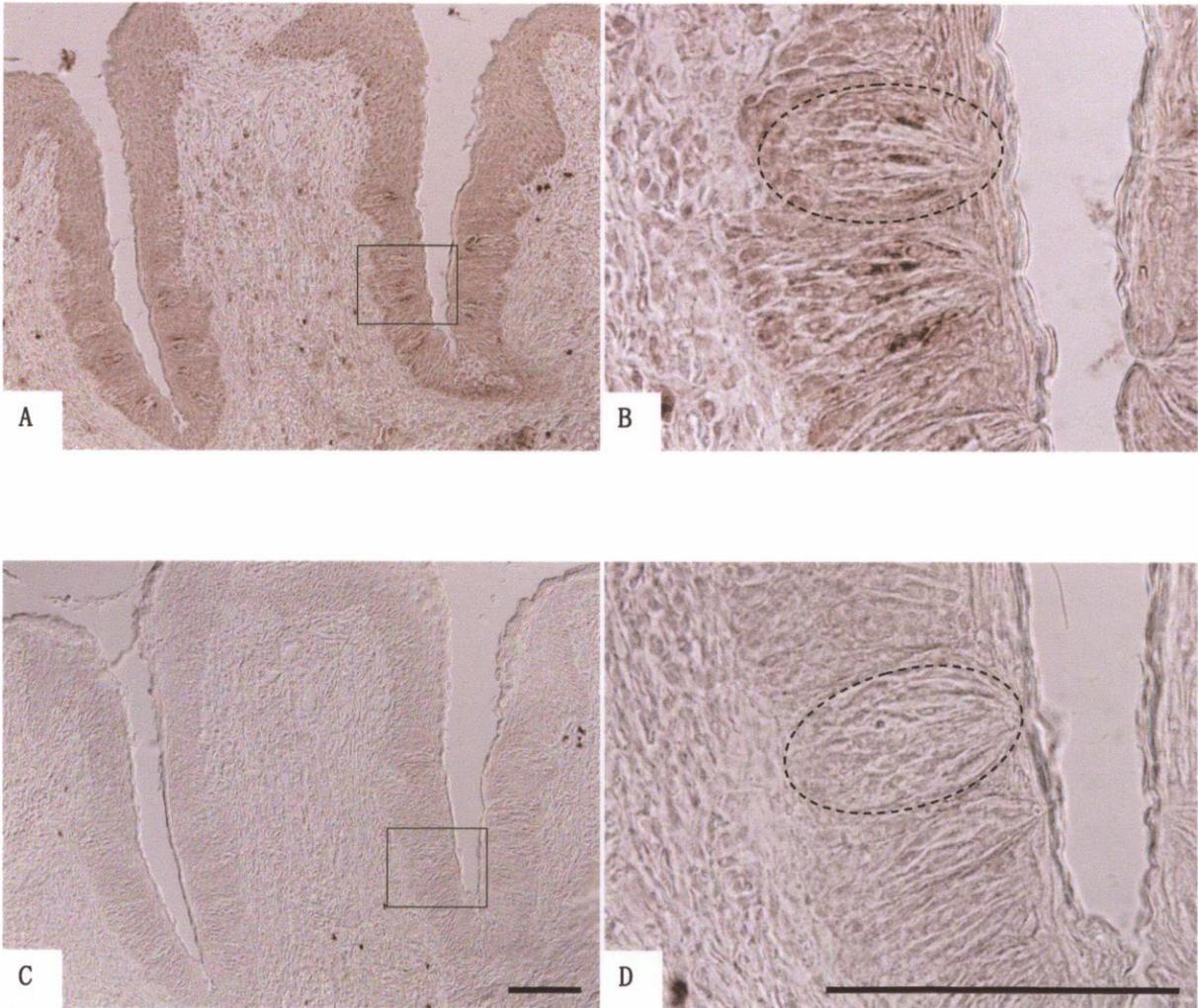


図 1-3 免疫染色によるラット有郭乳頭における PLA<sub>2</sub>-IIA タンパク質の検出

抗 hPLA<sub>2</sub>-IIA 抗体 を用い、ラット有郭乳頭切片に対して免疫染色を行い、DAB により発色させた (A)。四角で囲んだ部位の高倍率写真 (B)。味蕾内の一部の細胞に、斑点状の染色シグナルが観察されている。隣接切片を用い、一次抗体のみを省略して同様の染色操作を行ったもの (C)。四角で囲んだ部位の高倍率写真 (D)。味蕾内に染色シグナルは観察されなかった。味蕾の 1 つを点線で囲って示した (B, D)。スケールは 50  $\mu$ m。

## 考察

本章では、味蕾に発現している PLA<sub>2</sub> 分子種を同定することを目的とし、まず、13 の分子種について、RT-PCR 法による解析を行った。以前に当研究室で行われたマイクロアレイ解析では、IB、V、VIA が陰性であり、IIA、IVA が陽性、IIC がその中間程度の発現という結果を得ている（表 1-1）。今回行った RT-PCR 法では、IB は陰性、それ以外の分子種について陽性という結果が出た。IB の mRNA に関しては両解析ともに陰性の結果であったことから、有郭乳頭上皮にはほとんど発現していないと考えられる。V、VIA、IIC に関しては、RT-PCR 法では陽性だが、マイクロアレイ解析では、陰性もしくは半陽性の結果が出ている。これは、解析法による感度の違い、もしくは、解析に用いられた遺伝子領域の違いに起因するものと考えられる。残りの 2 分子種（IIA、IVA）については、両解析ともに陽性であることから、有郭乳頭上皮で mRNA が発現していると考えられる。また、マイクロアレイには載っていなかった、IID、IIE、IIF、III、IVB、X、XII については、RT-PCR 法によって発現が確認された。ただし、ここで注意しなければならない点は、マイクロアレイ解析および RT-PCR で使用した mRNA には、味蕾由来のものも含まれているが、周辺上皮細胞由来のものも含まれているということである。つまり、ここで陽性となった 12 分子種の mRNA は、有郭乳頭上皮には発現しているが、味蕾で発現しているかどうかは不明ということである。そこで、味蕾での発現を調べるために、*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析を行った。この解析の結果は、RT-PCR 法による解析結果とは様子が違い、はっきりとしたシグナルが得られたのは IIA に関してのみであった。IIA に関しては、マイクロアレイ法、RT-PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法と全ての解析において陽性の結果であったことから、その mRNA の発現量は多く、しかも味蕾中の一部の細胞に集約されていると解釈できる。IIC、IIE、IIF、X、XII については、若干ではあるが、周辺上皮細胞に比べると味蕾中の方が強く染まっているような印象を受けることから、味蕾中では多めに発現しているのかもしれない。他の分子種に関しては、*in situ* ハイブリダイゼーション法では、はっきりとしたシグナルが得られなかった。しかし、これらの分子種が全て発現していないとは、RT-PCR やマイクロアレイ解析の結果からは考えにくい。おそらくは、mRNA 総量はある程度以上存在しており、RT-PCR やマイクロアレイ解析では陽性になったが、味蕾でも

周辺上皮でも mRNA が一様に発現しており、*in situ* ハイブリダイゼーション法では、IIA のような有意のシグナルとはならなかったと考えられる。また、IB に関しては、おそらく、3 種類の解析法全てで陰性の結果であったことから、一様に発現していないと考えられる。

PLA<sub>2</sub> は膜の再構成という、細胞の基本的活動に重要な酵素であることから、多くの細胞に存在していたことは不思議でない。特に cPLA<sub>2</sub> (IV 型) や iPLA<sub>2</sub> (VI 型) などは、細胞普遍的に発現していることが知られており (Kudo and Murakami, 2002)、上皮細胞においても、また、味蕾細胞においても、細胞維持的な機能を担っていると考えられる。sPLA<sub>2</sub> に関しても細胞普遍的な機能が考えられるが、その分子種の多さから、細胞特異的な機能を果たしている分子種もあると推測される。味シグナリングに関与する PLA<sub>2</sub> 分子種は、味細胞で特異的に発現していることが期待された。味細胞は、味蕾中の一部の細胞集団であり、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、IIA のみが、これを満たしており、味シグナリングに関与する PLA<sub>2</sub> 分子種である可能性が強く考えられた。よって本研究では、この先、IIA に絞って、詳細な解析を進めることにした。

IIA の mRNA が味蕾中の一部の細胞で強く発現していることが明らかになったことから、タンパク質の発現を抗体により確認した。免疫染色は、そのタンパク質を発現している細胞の特定や、タンパク質の動態を解析する上で有用な手段として使える。ヒトの PLA<sub>2</sub>-IIA に対する抗体が入手可能であったことから、これを購入して免疫染色を行った。抗原部位は非公表であり、ラットの PLA<sub>2</sub>-IIA と反応するかは不明であったが、*in situ* ハイブリダイゼーションと同程度の細胞集団で特異的な染色像が得られたことから、ラットの PLA<sub>2</sub>-IIA タンパク質も認識していると考えられた。この抗体が、IIE や IID など他の近親 PLA<sub>2</sub> 分子種を認識している可能性を否定するデータはないが、45%の相同性を持つ V のタンパク質を認識しないことは公表されている (Cayman, #160500; 図 1-4 参照)。

味蕾中の IIA タンパク質のシグナルは、10%程度の細胞に限られており、さらに、細胞内でも、全体に観察されるのではなく、斑点状に観察されたことから、細胞内の特定の微細構造に限定されていると考えられた。このことについては、第二章で解析を行った。

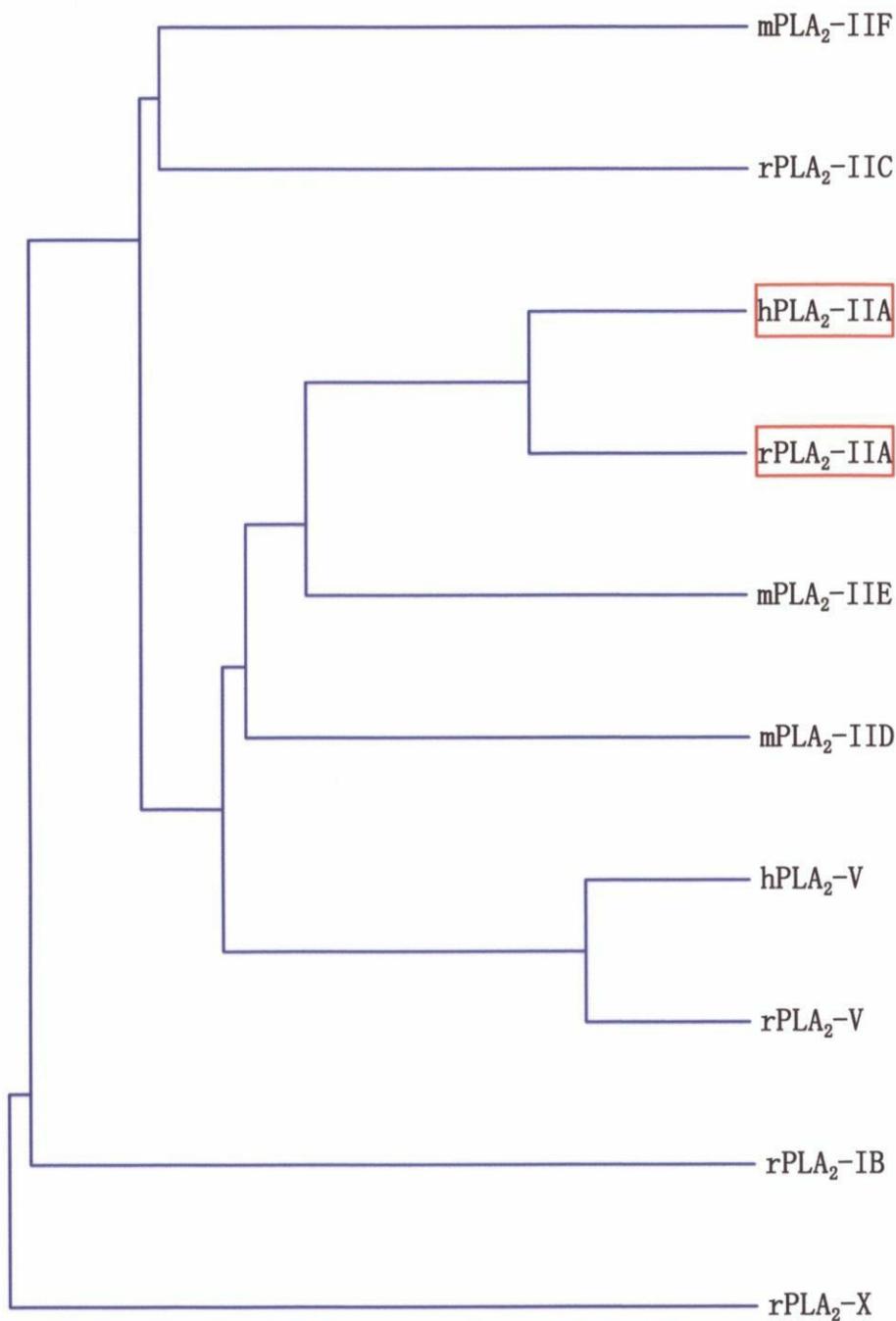


図 1-4 sPLA<sub>2</sub> の分子系統樹

III、XII を除く近親 8 分子種の sPLA<sub>2</sub> を Genetyx ver.7 ソフトウェアを利用し、UPGMA 法により分子系統樹を作成した。III、XII については、これらの分子種とは大きく離れているので省略した。IIA、V に関してはヒト (h) とラット (r) の両方を載せ、その他の分子種に関しては、ラットで報告があるものはラットを、無いものはマウス (m) を載せた。