

第二章

PLA₂-IIA の味噌における発現解析

序

50～100 個程度の細胞から構成されている味蕾は、序章でも述べたように、機能や時間（分化）といった側面から見て均一ではなく、様々な性質、状態の細胞が混在している。機能的には、味を感じる味細胞と、そうではない支持細胞や幹細胞が存在している（Lindemann, 1996）。特に最近の研究から、甘味や旨味、苦味といった味の違いは、味細胞のレベルで識別されていることが明らかにされ、つまり、味細胞の中にも甘味細胞や苦味細胞というものが存在していることがわかってきている（Zhao et al., 2003）。

第一章で明らかになったように、PLA₂-IIA は味蕾中の一部の細胞にのみ強く発現していることから、機能を考える上で、このタンパク質が、どのような細胞のどのような構造に発現しているかという情報を得ることは非常に重要である。第一章の最後で用いた、ヒト PLA₂-IIA に対する抗体が、ラットの切片においても使用可能であったことから、この抗体を用いて、免疫組織化学的な解析を行うことで、多くの情報が得られると期待された。そこで、本章では、まず、免疫染色法によりそのタンパク質の細胞内局在および発現細胞の性質を解析した。その後、発現細胞の成熟段階（細胞齢）を解析する目的で、味蕾の初期発生過程にある新生児ラットを用いた免疫染色および、成体ラットを用いた BrdU 追跡実験を行い PLA₂-IIA の発現開始時期を解析した。

材料と方法

材料

ウィスター系ラット（オス、約 150-200 g、および妊娠後期のメス）を日本生物材料センターより購入した。

PLA₂-IIA との免疫二重染色

切片の作製および抗体反応は特記しない限り第一章に記述した通りである。使用抗体およびその使用濃度、組み合わせについては表 2-1、2-2 に示した。

<Ggust、PLC β 2>

一次抗体反応溶液に、抗 hPLA₂-IIA 抗体および、抗 Ggust 抗体または抗 PLC β 2 抗体を添加し 4°Cで一晩の抗体反応を行った。二次抗体反応溶液には、Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体および、Alexa546 標識抗マウス IgG を添加した。遮光した室温の湿室中で 1 時間反応させた後、PBS で 10 分間 3 回洗浄し、Gel/Mount とカバーガラスで封入した。

画像は LSM510 共焦点レーザー顕微鏡システム (Zeiss) で撮影した。

<GM130、 β -COP、SNAP-25>

一次抗体反応は、抗 GM130 抗体、または抗 β -COP 抗体、または抗 SNAP-25 抗体で単独に行った。Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体による二次抗体反応まで行った後、再びブロッキングをして、Alexa546 標識抗 hPLA₂-IIA 抗体により 4°Cで一晩の抗体反応を行った。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、Gel/Mount とカバーガラスで封入した。

画像は LSM510 共焦点レーザー顕微鏡システム (Zeiss) または、蛍光顕微鏡 (Olympus BX-51、DP-70 CCD カメラシステム) で撮影した。

新生児ラットを用いた免疫染色

1 匹のメスより生まれた生後 2、4、6、8、10、12、14 日目の新生児ラットを用い、第一章と同様に、抗 hPLA₂-IIA 抗体を用いて、有郭乳頭切片に対する免疫染色を行った。

BrdU 注入ラットの単離味蕾細胞の染色

サンプリングの 1-5 日前、ラットに 50 mg/kg B.W. の BrdU を腹腔注射した。味蕾細

胞の単離操作は、基本的には以前に詳述したものに従った (Kishi et al., 2001)。舌を摘出し、 Ca^{2+} -free リンガー液 (*) に浸した。有郭乳頭直下にリンガー溶液 (*) で希釈したコラゲナーゼ (2 mg/ml) を皮下注射し、室温で 30 分静置した。有郭乳頭を含む上皮を剥離し、コラゲナーゼを含むリンガー溶液に 3 分間浸した。剥離上皮を Ca^{2+} -free リンガー液に移し、室温で 15 分間静置後、4% PFA/0.1 M PB (75 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 , ~pH 7.4) で 4°C で 30 分間固定した。剥離上皮を水ですすいだ後、新たな水中に裏返して沈め、内径約 50 μm のガラスキャピラリーで味蕾を吸い取った。味蕾を含む液をスライドガラス上に吐き出し、60°C で 10 分間乾燥させて味蕾を貼り付けた。味蕾の張り付いたスライドガラスを 4%PFA/PBS に浸し室温で 10 分間再固定した。PBS で洗った後、ゲノム DNA を変性させるため、Target Retrieval Solution (Dako) 中で 40 分間煮沸した。室温で冷却し、水で 10 分間洗浄した後、PBS に浸した。以下の個々の操作は、基本的に第一章に記述したものと同様に行った。室温で 1 時間ブロッキングした後、抗 BrdU 抗体および抗 Ggust 抗体を用い 4°C で一晚、一次抗体反応を行った。PBS で洗浄後 Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体、およびビオチン標識抗マウス IgG 抗体で二次抗体反応を室温で 1 時間行った。ABC-HRP 法により BrdU のシグナルを検出した。再び室温で 1 時間ブロッキングした後、Alexa546 標識抗 hPLA₂-IIA 抗体による抗体反応を行った。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、Gel/Mount とカバーガラスで封入した。

細胞は蛍光顕微鏡下 (Olympus BX-51、DP-70 CCD カメラシステム) で計数後、撮影した。

* リンガー溶液

150 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2 mM HEPES, 7.8 mM D-glucose, 2 mM CaCl_2 , 0.1 mM MgCl_2 , pH 7.4 (NaOH)

Ca^{2+} -free 溶液は CaCl_2 および MgCl_2 を除き、2 mM EDTA を加えた。

表 2-1 免疫染色に使用した抗体情報とその使用濃度

抗体名	免疫動物	使用濃度	メーカー	コード No.
一次抗体				
抗 hPLA ₂ -IIA 抗体	マウス	1/50	Cayman	160500
抗 PLC β 2 抗体	ウサギ	1/1000	Santa Cruz	sc-206
抗 Ggust 抗体	ウサギ	1/1000	Santa Cruz	sc-395
抗 SNAP-25 抗体	マウス	1/500	Chemicon	MAB331
抗 BrdU 抗体	マウス	1/100	Chemicon	MAB4072
抗 GM130 抗体	マウス	1/1000	Abcam	ab1299
抗 β -COP 抗体	マウス	1/1000	Sigma	G6160
二次抗体				
ビオチン標識 抗マウス IgG 抗体	ヤギ	1/1000	Vector Laboratories	BA-9200
Alexa488 標識 抗マウス IgG 抗体	ヤギ	1/1000	Molecular Probes	A-11029
Alexa546 標識 抗マウス IgG 抗体	ヤギ	1/1000	Molecular Probes	A-11030
Alexa488 標識 抗ウサギ IgG 抗体	ヤギ	1/1000	Molecular Probes	A-11034

表 2-2 二重（三重）染色に使用した抗体の組み合わせ

組み合わせ	一次抗体	二次抗体	二次抗体反応終了後
PLA ₂ -IIA/Ggust	抗 hPLA ₂ -IIA 抗体 抗 Ggust 抗体	Alexa546 標識抗マウス IgG 抗体 Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体	
PLA ₂ -IIA/PLC β 2	抗 hPLA ₂ -IIA 抗体 抗 PLC β 2 抗体	Alexa546 標識抗マウス IgG 抗体 Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体	
PLA ₂ -IIA/GM130	抗 GM130 抗体	Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体	Alexa546 標識抗 hPLA ₂ -IIA 抗体
PLA ₂ -IIA/ β -COP	抗 β -COP 抗体	Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体	Alexa546 標識抗 hPLA ₂ -IIA 抗体
PLA ₂ -IIA/Ggust /BrdU	抗 BrdU 抗体 抗 Ggust 抗体	ビオチン標識抗マウス IgG 抗体 Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体	Alexa546 標識抗 hPLA ₂ -IIA 抗体

結果

PLA₂-IIA の細胞内局在

PLA₂-IIA の免疫染色シグナルは、細胞内の一部、特に核の近傍から細胞の先端に向かって斑点状に観察された。これは、分泌経路の途上であるゴルジ体での発現を反映していると予想されたことから、シスゴルジに存在することが知られている分子 GM130 (golgi marker 130 kDa; Nakamura et al., 1995) との免疫二重染色を行い、PLA₂-IIA の細胞内局在を解析した (図 2-1A)。抗 GM130 抗体と抗 hPLA₂-IIA 抗体は両者ともマウスで作製した抗体であったため、まず、抗 GM130 抗体で染色し、蛍光標識した二次抗体反応まで行った後、別の蛍光物質で標識した抗 hPLA₂-IIA 抗体を反応させて、二重染色を行った。その結果、有郭乳頭切片では、GM130 はほぼ全ての細胞内にシグナルが観察された。味蕾細胞に注目すると、紡錘形の細胞の核から先端部に向かって細長いシグナルが多く観察された。PLA₂-IIA 陽性細胞において、両者のシグナルはよく重なっていた。一つの細胞における両タンパク質の発現をより観察しやすくするため、味蕾細胞を単離して染色を行った (図 2-1B)。切片と同様に、両者のシグナルは、核から先端部にむけ斑点状のシグナルが観察され、PLA₂-IIA のシグナルは GM130 のシグナルとよく重なっていた。また、他のゴルジマーカである β -COP (Pepperkok et al., 1993) と PLA₂-IIA についても二重染色を行ったところ、同様にシグナルが重なっていた (図 2-2)。これらの結果から、PLA₂-IIA は分泌経路上に多く存在し、染色シグナルの多くは、ゴルジ体中に存在することが明らかになった。

PLA₂-IIA 発現細胞と味細胞の関係

続いて、PLA₂-IIA を発現している細胞と味細胞の関係を調べるため、味細胞マーカーである PLC β 2 との免疫二重染色を行った。PLC β 2 のシグナルは味蕾中の 30-40%程度の細胞の細胞質全体に観察された (図 2-3B)。基本的に PLA₂-IIA 陽性細胞は全て PLC β 2 でも陽性であり、PLC β 2 のみに陽性な細胞もあり、つまり PLA₂-IIA は、PLC β 2 を発現している細胞 (味細胞) の一部の細胞のみに発現していることが明らかになった (図 2-3C、D)。味細胞は中でもさらに、甘味・旨味・苦味細胞へと分類可能であり、PLA₂-IIA 陽性細胞が、これらの味種特異的に発現している可能性を考え、次に苦味細胞

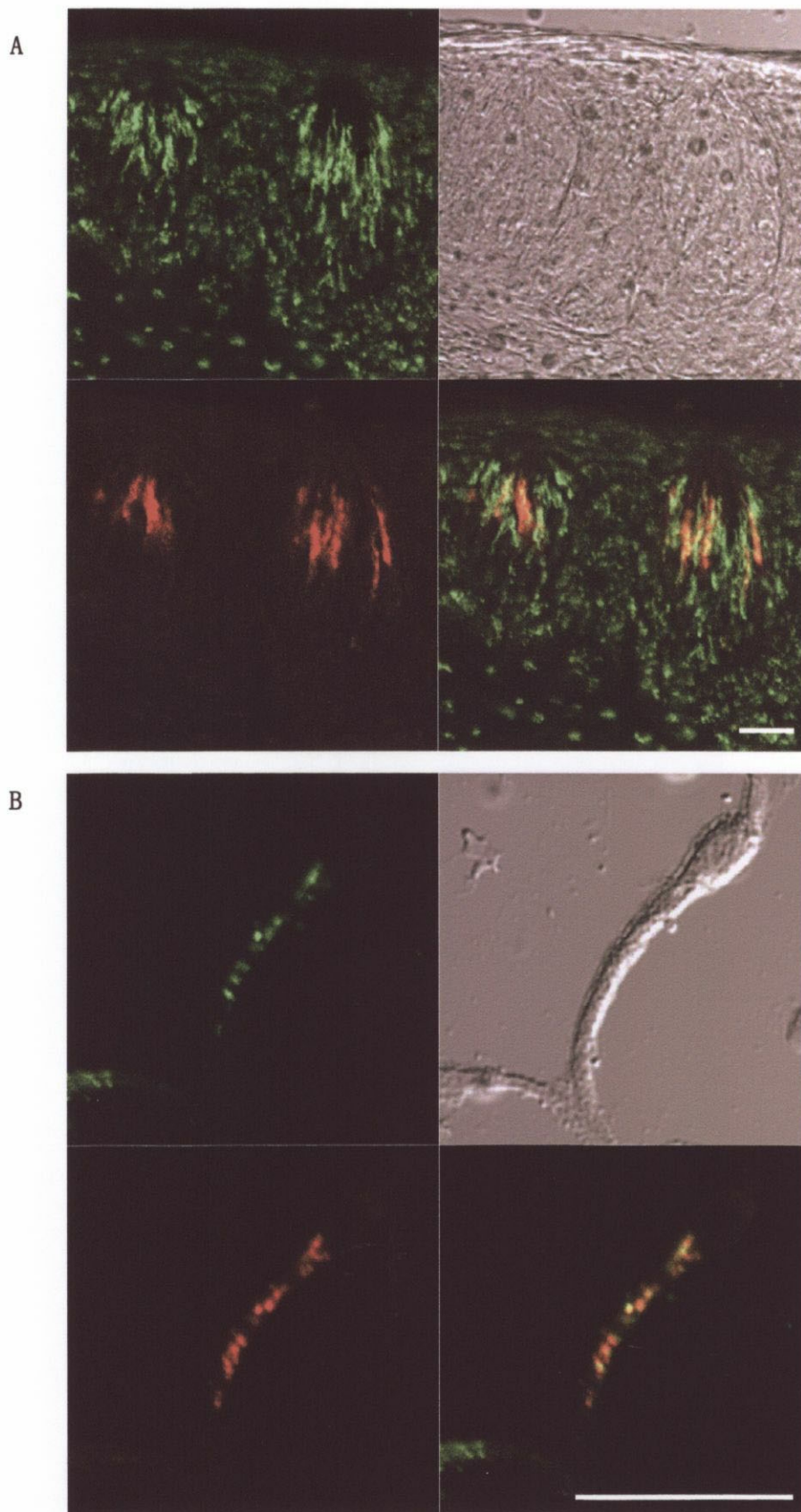


図 2-1 PLA₂-IIA とゴルジマーカーGM130 との免疫二重染色の共焦点画像
 抗 GM130 抗体による緑色の蛍光と、抗 hPLA₂-IIA 抗体による赤色の蛍光。ラット有郭乳
 頭切片 (A) と単離味蕾細胞 (B) における染色像。スケールは 10 μm 。

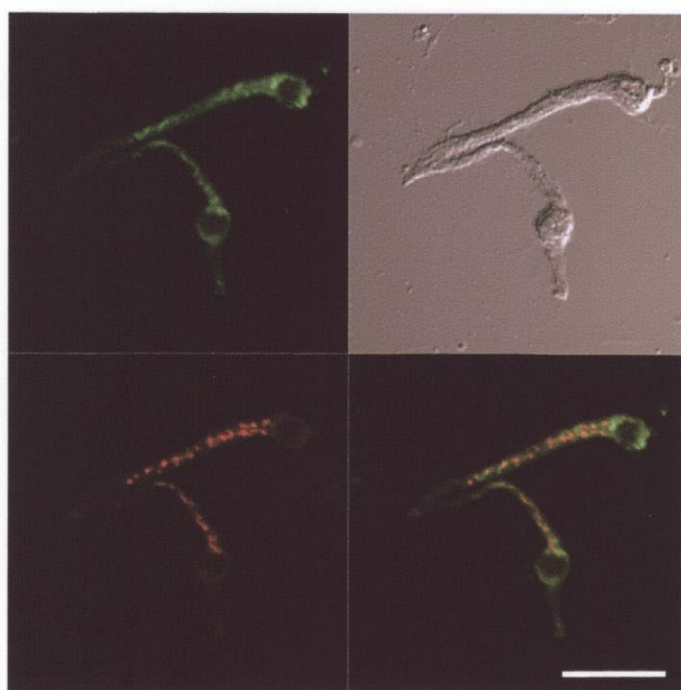


図 2-2 単離味蕾細胞における $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ と $\beta\text{-COP}$ との免疫二重染色の共焦点画像
 ゴルジマーカーの $\beta\text{-COP}$ に対する抗体による緑色の蛍光と、抗 $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ 抗体による赤色の蛍光。スケールは 10 μm 。

マーカーである Ggust と免疫二重染色を行った。その結果、PLA₂-IIA、Ggust とともに陽性な細胞が存在する一方、PLA₂-IIA のみに陽性な細胞、Ggust のみに陽性な細胞も存在する関係であった（図 2-4）。以上の結果から、PLA₂-IIA は、甘味・旨味・苦味といった味種には依存しないが、味細胞の一部に発現していることが明らかになった（図 2-5D 参照）。

PLA₂-IIA 発現細胞とシナプス形成細胞の関係

味細胞で受容した味情報は、味神経を介して中枢へと伝えられており、電子顕微鏡観察から、味蕾中の約 10%の細胞が味神経とシナプスを形成していることが知られている。しかし、味細胞マーカーである PLC β 2 を発現している細胞は味蕾中の約 30-40%にのぼることから、その内の一部の細胞のみがシナプスを形成していると推察される。上記のように、PLA₂-IIA は、味種に依存しないが一部の味細胞のみに発現していることから、シナプス形成と相関している可能性が考えられた。そこで、味蕾中のシナプス形成細胞で特異的に発現することが知られている SNAP-25（synaptosomal associated protein 25 kDa）との発現関係を調べた。抗 SNAP-25 抗体、抗 hPLA₂-IIA 抗体共にマウスで作製されたものであったことから、GM130 との二重染色と同様に、SNAP-25 に対する免疫染色を先に行い、その後、蛍光標識した抗 hPLA₂-IIA 抗体で染色した。SNAP-25 の染色シグナルは、味蕾中の細胞に斑点状で観察されるものと、筋層で繊維状に観察されるものが存在した（図 2-5）。また、わずかに、味蕾の基底側にも繊維状で観察されるものがあつた。おそらく、後者 2 つの繊維状のシグナルは、味蕾およびその周辺に投射している神経繊維を染めているものであると考えられる。味蕾内の斑点状のシグナルは、ほぼ完全に、PLA₂-IIA のシグナルと重なっていたことから、PLA₂-IIA は味蕾中のシナプス形成細胞特異的に発現していることが明らかになった。

PLA₂-IIA の発現開始時期の解析 ～味蕾初期発生過程～

シナプスを形成している細胞が味細胞の一部であったことから、シナプスの形成は味細胞の成熟度と関係があるのではないかと予測された。例えば、味細胞の早い時期、あるいは、遅い時期のみでシナプスを形成しているということを考えた。そこで、これを明らかにするため、味細胞中に PLA₂-IIA が発現してくる時期を解析した。まず、味蕾

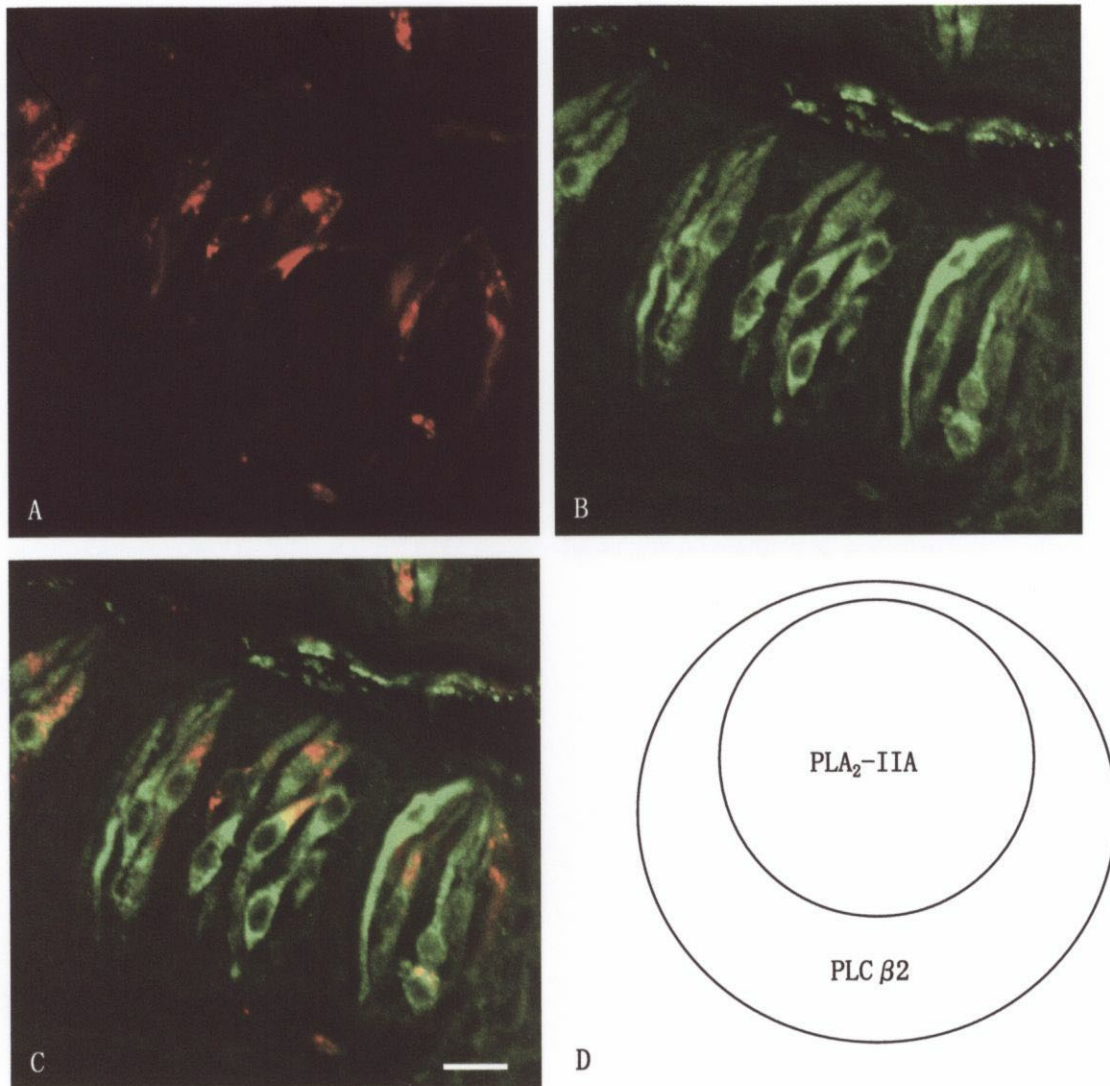


図 2-3 PLA₂-IIA と PLC β2 の免疫二重染色の共焦点画像

ラット有郭乳頭切片における、抗 PLA₂-IIA の赤色の蛍光 (A) と抗 PLC β2 抗体による緑色の蛍光 (B) および、その重ね合わせ (C)。発現関係を模式的に表した (D)。PLA₂-IIA を発現している細胞は PLC β2 も発現していた。スケールは 10 μm。

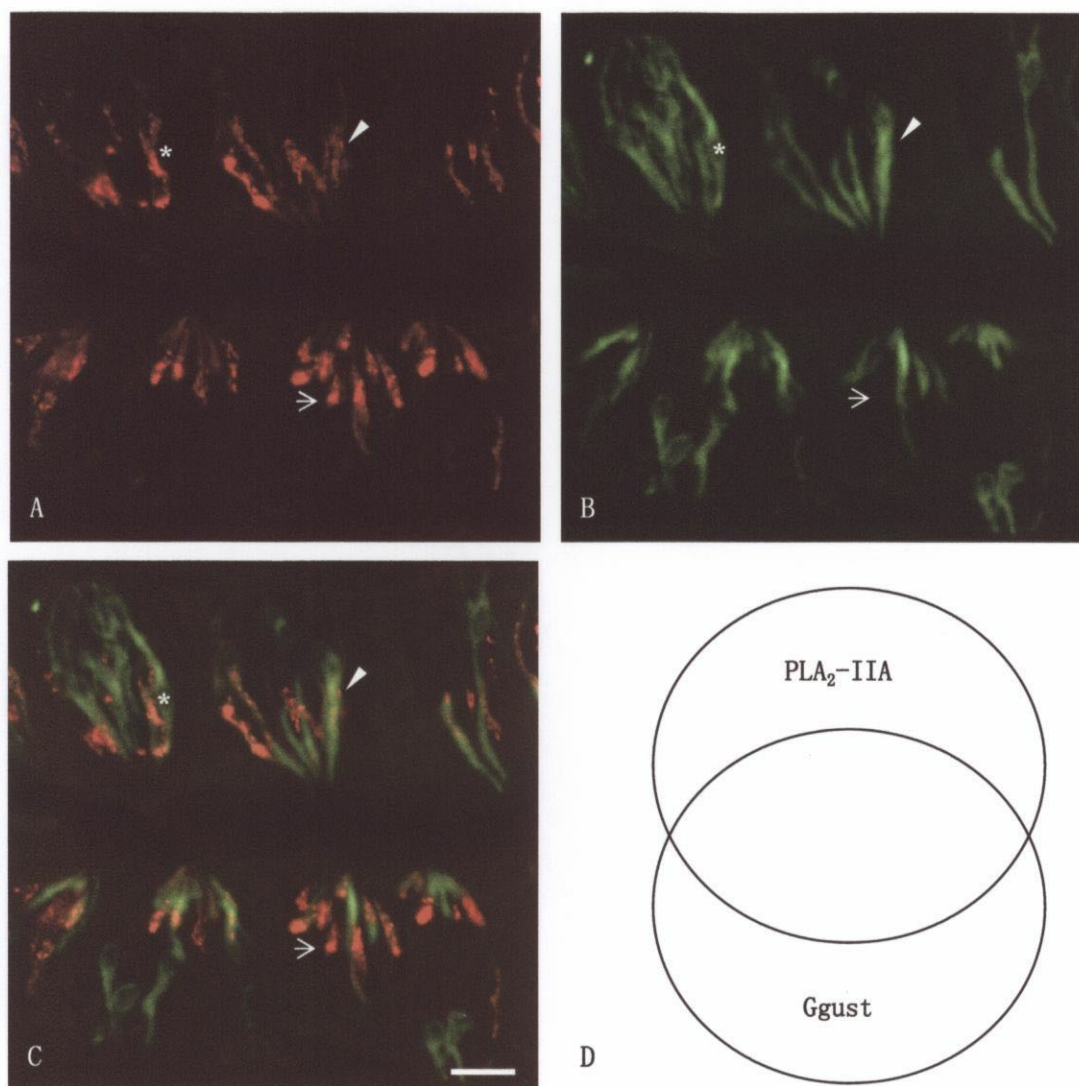


図 2-4 $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ と Ggust の免疫二重染色の共焦点画像

抗 $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ 抗体による赤色の蛍光 (A) と抗 Ggust 抗体による緑色の蛍光 (B) および、両者の重ね合わせ画像 (C)。発現関係を模式的に表した (D)。 $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ のみを発現している細胞 (矢印)、Ggust のみを発現している細胞 (アステリスク)、両方を発現している細胞 (矢尻) が存在している。スケールは 10 μm 。

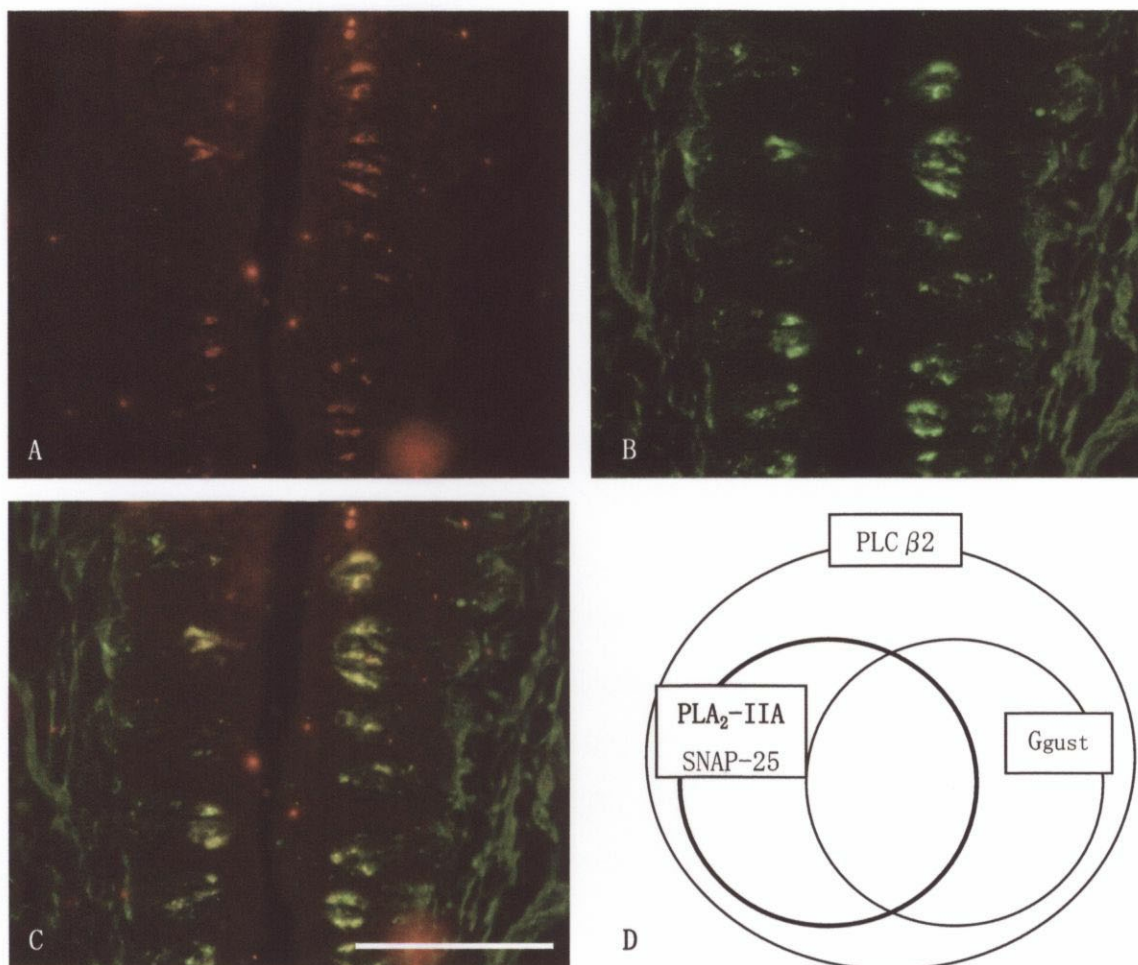


図 2-5 PLA₂-IIA と SNAP-25 の免疫二重染色の蛍光画像

抗 PLA₂-IIA 抗体による赤色の蛍光 (A) と抗 SNAP-25 抗体による緑色の蛍光 (B) および、両者の重ね合わせ画像 (C)。味蕾細胞における PLA₂-IIA、SNAP-25、PLC β2、Ggust の発現関係を模式的に表した (D)。SNAP-25 の蛍光シグナルは味蕾内の細胞と、味蕾周辺に投射している神経線維に観察されている。味蕾内でのシグナルは、PLA₂-IIA のシグナルとほぼ完全に重なっている。スケールは 50 μm。

の初期発生過程である新生児ラット（生後 2、4、6、8、10、12、14 日）を用いて、有郭乳頭切片に対する免疫染色を行い、味蕾が形成される過程のどの時期から、PLA₂-IIA が発現を開始するのか調べた。対照として、味蕾中のほとんどの紡錘形細胞に発現することが知られている細胞骨格分子の CK8（cytokeratin 8）、味細胞の細胞内シグナリング関連分子である Ggust および IP₃R3（Inositol-trisphosphate Receptor subtype 3）、そしてシナプスマーカーである SNAP-25 についても同様の実験を行った。その結果、CK8、Ggust、IP₃R3 は生後 2 日目で既にはっきりとシグナルが観察され、この時期では既に味蕾の形成が始まっており、味細胞シグナリング分子を発現している味細胞様の細胞も存在していることが明らかになった（図 2-6、生後 10、12、14 日のデータは省略した）。一方、PLA₂-IIA と SNAP-25 の味蕾内のシグナルは、生後 6 日目以降にしか確認されず、上記の分子よりも発現の開始時期が遅いことが明らかになった。以上の結果から、新生児ラットの味蕾形成過程では、味細胞様の細胞が先に形成され、それから数日後にシナプスが形成されることが示唆された。

PLA₂-IIA の発現開始時期の解析 ～味蕾細胞維持過程～

成体ラットの味蕾細胞維持過程においても同様に、味細胞形成とシナプス形成の時間依存性を調べるため BrdU（bromodeoxyuridine）追跡実験を行った。この方法は、チミジンアナログである BrdU を動物（細胞）に注入すると、細胞増殖期に DNA 中に取り込まれ、適当な時間後にサンプリングをして BrdU を検出すると、BrdU 陽性細胞は、BrdU 注入後からサンプリングの間までに増殖をしたことがわかるものである。具体的には、ラットの腹腔に BrdU を注入し、1～5 日後の各日に舌を摘出し、有郭乳頭切片を作製して免疫染色を行うことで、BrdU 陽性味蕾細胞はそれぞれ 1～5 日以内に幹細胞から分裂し、分化したことが明らかになる。BrdU 陽性細胞と PLA₂-IIA 陽性細胞の関係を調べることで、PLA₂-IIA が分化して何日目の細胞から発現するのかを解析した。ここで、PLA₂-IIA の免疫染色シグナルは細胞の中でも偏りがあり、切片では BrdU 陽性細胞（シグナルは核に出る）との関係を把握しにくいので、味蕾細胞を単離して染色することで、この問題を解消した。実験対照として、PLA₂-IIA と同程度の頻度の味蕾細胞に存在する Ggust を用い、単離味蕾細胞を両者の抗体で二重染色した（図 2-7）。BrdU のシグナルは核内で観察され、PLA₂-IIA と Ggust のシグナルは一部の細胞集団の細胞質に観察され

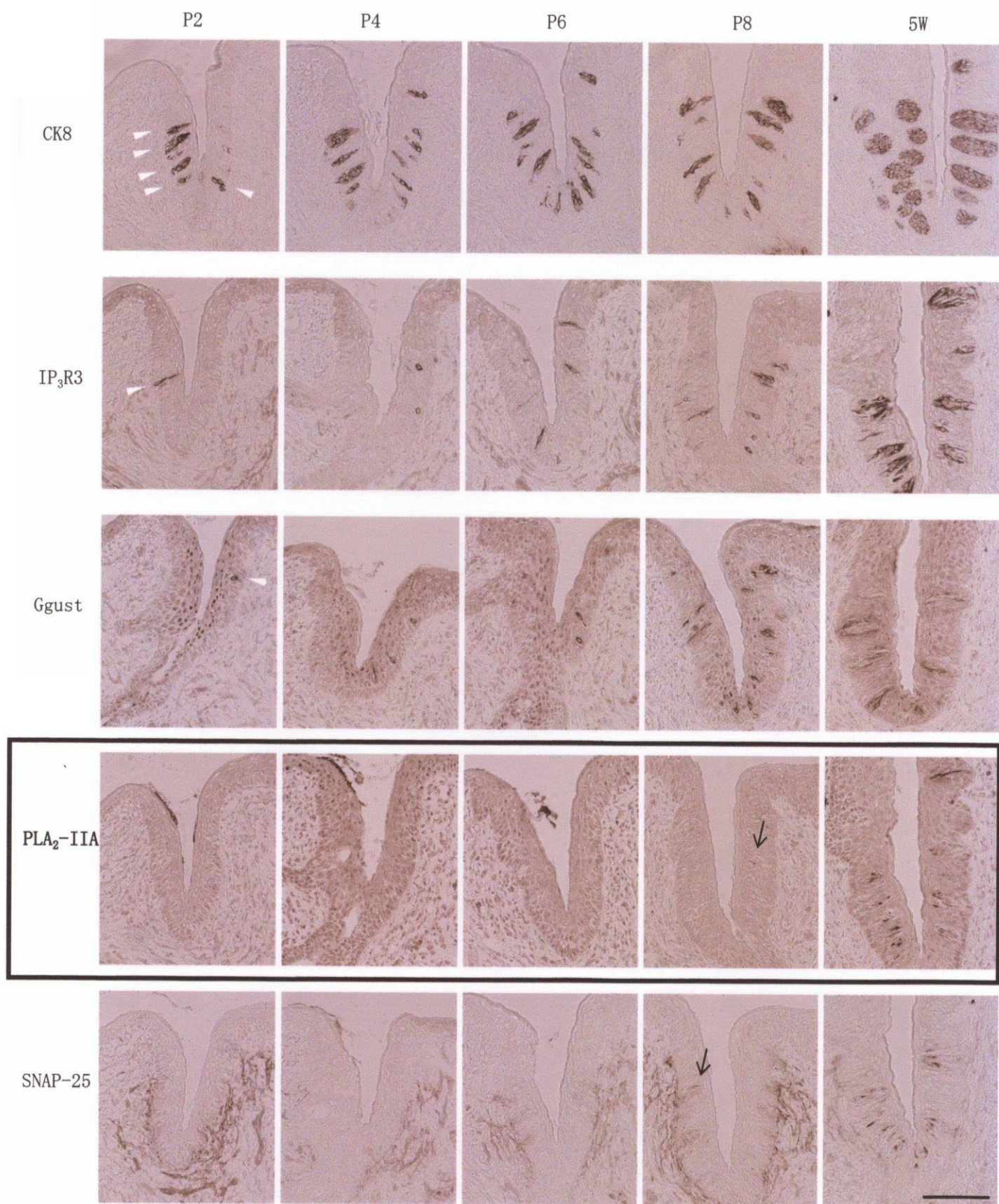


図 2-6 新生児ラット有郭乳頭を用いた免疫染色による発現開始時期の解析

CK8、IP₃R3、Ggust は生後 2 日目 (P2) ですでに味蕾内にシグナルが観察された (白矢尻) のに対し、PLA₂-IIA、SNAP-25 は生後 8 日目 (P8) あたりにならないとシグナルが観察されなかった。SNAP-25 の皮下に観察されるシグナルは神経線維が染まっている。スケールは 50 μ m、写真は全て同倍率。

た。PLA₂-IIA と Ggust 発現細胞は、切片と同様に、お互いに一部が重なり合う関係であった。単離した細胞には、周辺上皮細胞も若干含まれてしまうことから、紡錘形をした細胞のみを計測することで、味蕾細胞のみを抽出した。紡錘形細胞中の BrdU 陽性細胞は、1 日後では 0.2% (2/1256) のみであったが、2 日後は 1.8% (73/4113)、3 日後は 2.6% (167/6307)、4 日後は 4.1% (120/2961)そして 5 日後には 5.2% (142/2741)と日を追うごとに増加していった (表 2-3、図 2-8 ○)。このことから、味蕾細胞は幹細胞から分裂した後、早いものは 1 日以内に紡錘形の細胞へと分化していくことが確かめられた。同様に、PLA₂-IIA 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞を計測したところ、BrdU 注入後 3 日目までは 1 つも観察されず、4 日目で初めて 0.3% (3/992)の細胞がそして 5 日目で 1.3% (12/953)の細胞が観察されたのみであった (表 2-3、図 2-8 □)。一方、紡錘形細胞中の陽性細胞の割合は、PLA₂-IIA (26.9-34.8%) と同程度の Ggust (27.9%-34.2%)では、2 日目から BrdU 陽性細胞が現れ始め (0.2% (3/1236))、5 日目まで増加していた (表 2-3、図 2-8 △)。以上の結果から、Ggust は幹細胞から分裂して、2 日程度経過した味細胞から発現を開始するのに対し、PLA₂-IIA はそれよりも 2 日ほど遅く、4 日程度経過しないと発現を開始しないことが明らかになった。

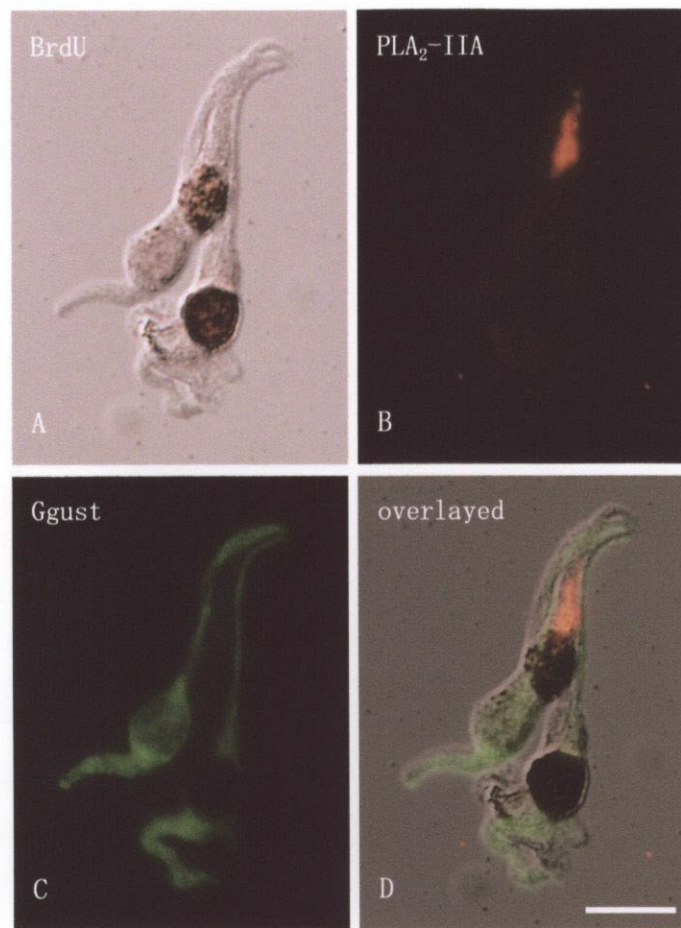


図 2-7 ラット有郭乳頭単離味蓄細胞の免疫染色像の例 (BrdU 注入後 5 日目)

BrdU の DAB 発色シグナルは一部の細胞の核内にはっきりと見られた (A)。PLA₂-IIA の赤色蛍光シグナルは切片と同様に、紡錘形の一部の細胞で、核辺縁から局部に向かう斑点状のシグナルとして検出された (B)。Ggust の緑色蛍光シグナルも切片と同様に、一部の紡錘形細胞の細胞質全体に見られた (C)。D は蛍光画像と明視野画像の重ね合わせで、左の細胞は Ggust のみポジティブ、中央の細胞は PLA₂-IIA と BrdU にポジティブで Ggust ネガティブ、右の細胞は Ggust と BrdU にポジティブなのがある。スケールは 10 μ m。

表 2-3 BrdU 注入ラット単離味蕾細胞の PLA₂-IIA, Ggust, BrdU 陽性細胞数

BrdU Days ¹	SS cells ²	BrdU ⁺ cells * (BrdU ⁺ /SS[%])	PLA ₂ ⁺ cells ³ (PLA ₂ ⁺ /SS[%])	Ggust ⁺ cells ⁴ (Ggust ⁺ /SS[%])	BrdU ⁺ PLA ₂ ⁺ * (BrdU ⁺ /PLA ₂ ⁺ [%])	BrdU ⁺ Ggust ⁺ * (BrdU ⁺ /Ggust ⁺ [%])
1	1256	2 (0.2%)	434 (34.6%)	430 (34.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2	4113	73 (1.8%)	1258 (30.6%)	1236 (30.1%)	0 (0.0%)	3 (0.2%)
3	6307	167 (2.6%)	1696 (26.9%)	1811 (28.7%)	0 (0.0%)	20 (1.1%)
4	2961	120 (4.1%)	992 (33.5%)	825 (27.9%)	3 (0.3%)	20 (2.4%)
5	2741	142 (5.2%)	953 (34.8%)	881 (32.1%)	12 (1.3%)	33 (3.7%)

BrdU 注入後 1-5 日目まで、各日 2 匹のラットより有郭乳頭味蕾を単離し、抗 BrdU 抗体、抗 PLA₂-IIA 抗体、抗 gusteducin 抗体により免疫染色を行い、各抗体で染色された細胞数および、紡錘形の細胞数を測定した。

¹ BrdU days : BrdU 注入後の日数 [days]

² SS cells : 紡錘形の細胞数 [cells]

³ PLA₂⁺ cells : PLA₂-IIA 免疫反応陽性細胞数 [cells]

⁴ Ggust⁺ cells : Ggust 免疫反応陽性細胞数 [cells]

アステリスクをつけた欄を図 2-8 のグラフに示した

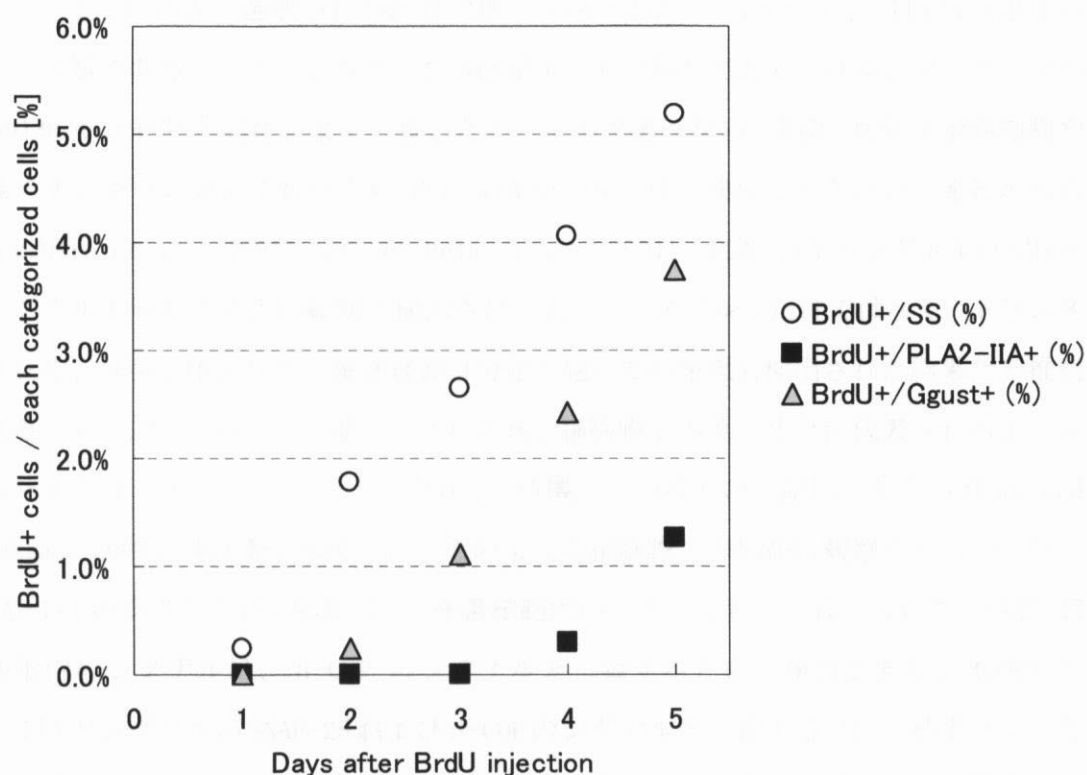


図 2-8 細胞種ごとの BrdU 免疫反応陽性細胞の割合と BrdU 注入後の日数の関係

紡錘形細胞 (○)、Ggust 免疫反応陽性細胞 (▲)、PLA₂-IIA 免疫反応陽性細胞 (■) の内、BrdU 免疫反応陽性細胞の割合。表 2-1 のアステリスクをつけた欄の数値をグラフ上に示した。紡錘形細胞では、BrdU 陽性細胞が 1 日目より出現し、5 日目まで増加している。PLA₂-IIA 陽性細胞では、3 日目までは BrdU 陽性細胞が現れず、4 日目で初めて観察されたのに対し、Ggust 陽性細胞では、2 日目から BrdU 陽性細胞が現れ、5 日目まで増加している。このことから、Ggust は味蕾細胞に分化してから 2 日程度より発現し始めるのに対し、PLA₂-IIA は 4 日目以降の成熟した細胞でないと発現を開始しないことが明らかになった。

考察

PLA₂-IIA の細胞内局在と機能について

一般に分泌タンパク質は、小胞体上のリボソームで合成されてからゴルジ体へと輸送され、ここで行き先の選別が行われ目的地へと送り出されている。PLA₂-IIA は分泌性のタンパク質であることから、当然、この経路上にも存在しており、ゴルジマーカである GM130 や β -COP と局在がよく一致したことに不思議はない。実際、血管平滑筋細胞や腎臓メサングウム細胞においても、PLA₂-IIA がゴルジ体で検出されたという報告がある (Kurihara et al., 1991; van der Helm et al., 2001)。PLA₂-IIA のシグナルは GM130 のシグナルよりもやや広い範囲で検出されており、シスゴルジだけではなく、トランスゴルジや、ゴルジ体から先の輸送経路 (分泌小胞) での発現も検出された結果だと推察される。また、PLA₂-IIA は一端分泌された後、細胞膜上のカベオラに代表されるような脂質マイクロドメイン (ラフト) に存在し、待機しているという記述もあるが (Kudo and Murakami, 2002)、本実験の染色では、そのような細胞膜での局在は観察されなかった。

PLA₂-IIA のシグナルは、SNAP-25 の味蕾細胞内のシグナルとも一致していた。SNAP-25 の味蕾内のシグナルは、 β -COP のシグナルと一致するという報告があり、本研究の PLA₂-IIA のシグナルが SNAP-25 および β -COP のシグナルと一致するという結果とよく合っている (Pumplin et al., 2000)。ゴルジ体では、輸送小胞の分泌・融合が盛んに行われており、小胞の融合に必要な SNARE タンパク質の存在も知られていることから、SNAP-25 はゴルジ体で機能していることが考えられる。ただし、味蕾内で SNAP-25 を発現している細胞は、味神経とシナプスを形成している細胞に限られていることから、全ての細胞で存在しているゴルジ体で機能しているというよりはむしろ、神経細胞で報告されているように、シナプス小胞の分泌 (細胞膜との融合) に働いている可能性が高い。PLA₂-IIA に関しても、脂質二重膜を切断する酵素であることから、膜を切断することで局所的に膜の性質を変化させ、小胞の分泌や融合を促進するといった機能を果たしている可能性がある。実際、海馬神経細胞や、PC12 細胞において PLA₂-IIA を作用させると神経伝達物質が放出されることが明らかになっている (Kudo et al., 1996; Matsuzawa et al., 1996, Wei et al., 2003)。これまでに、ゴルジ体で PLA₂-IIA が機能しているという報告はなく、活性化に mM 程度の Ca^{2+} を必要とすることから考えると、シナプス

部でのエキソサイトシスに関与しているという可能性が高い。

シナプスの形成について

味細胞マーカーである PLC β 2 発現細胞および、苦味細胞マーカーである Ggust 発現細胞との免疫二重染色の結果から、PLA₂-IIA は味種には依存しないが、味細胞の一部の細胞のみに発現していることが明らかになった。そして、SNAP-25 を発現する細胞と一致し、それがシナプス形成細胞であることが明らかになった (図 2-5D)。また、時間的要因を考慮すると、PLA₂-IIA は味細胞の中でも成熟した細胞のみに発現することを見出し、このことから、シナプスも味細胞の成熟に伴って形成されることが示唆された。

PLA₂-IIA が味蕾で発現を開始する時期を、本研究では 2 通りの方法で解析した。1 つは、味蕾の初期形成過程、もう 1 つは味蕾細胞の更新過程である。味蕾細胞更新過程における解析では、今までなされたことのない単離味蕾細胞を用いた方法を行ったが、Cho らによる切片を用いた解析の、Ggust は 2.5 日目より発現するという結果と近いことから (Cho et al., 1998)、単離による問題はなく、PLA₂-IIA のように、切片では染色シグナルが見にくい分子に関しては有効な方法と言える。本研究から、初期形成、更新過程とどちらの場合も、味シグナリング分子である Ggust の方が先行して発現を開始し、数日遅れてから PLA₂-IIA が発現を開始するという同様の結果を得た。このことから味細胞は、初期形成過程においても、更新過程においても、ある程度成熟が進んで初めて、シナプスを形成することが示唆された。その他の味シグナリング分子である PLC β 2 や TRPM5、IP₃R3 は常に Ggust を内包するような細胞集団に発現していることから、Ggust と同時期かそれ以前に発現を開始することは自明であり、シナプス形成以前にこれらの味シグナリング構成因子が揃っているという新たな知見が得られた (図 2-9)。残るは、味受容体であり、今後の発現解析に興味を持たれる。

味覚神経である、舌咽神経あるいは鼓索神経を切断すると、その支配下にある味蕾が消失し、神経の回復に伴い味蕾が再生することが知られている (Farbman, 1969; Hosley et al., 1987)。このことから、味蕾細胞の形成には味覚神経の投射が必須であることがわかる。本研究より味細胞・味神経間のシナプスは、Ggust など、味シグナリング分子が発現した後で形成されると考えられることから、味覚神経から上皮系幹細胞への作用は、直接的にも間接的にも、味細胞・味神経間のシナプスを介さない方法によること

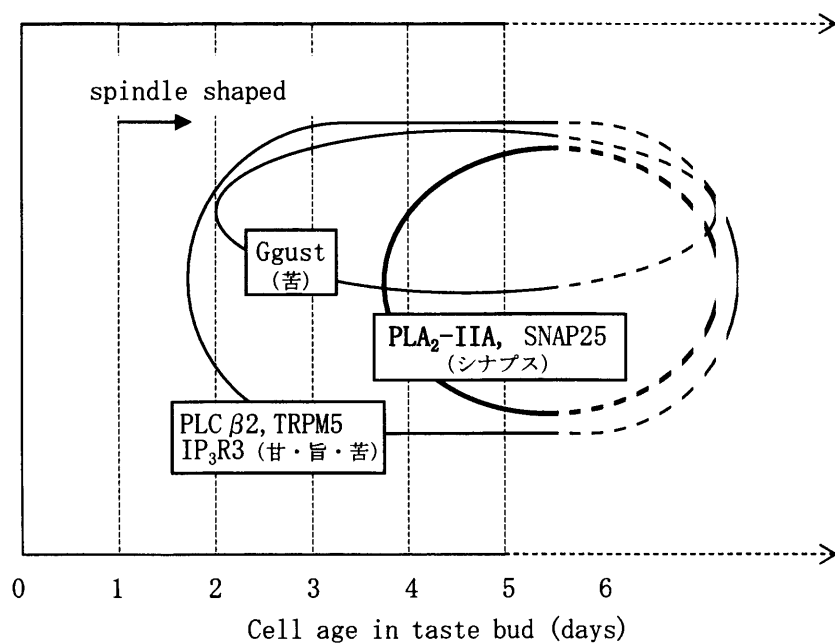


図2-9 BrdU取り込み後の時間軸上における $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ および味シグナリング関連分子の発現関係

BrdU 注射後 1 日付近から、紡錘形の細胞が出現し始め、2 日目付近から、苦味の情報伝達に関わる Ggust が発現を開始する。甘・旨・苦味シグナル全般に必須な PLC β 2、TRPM5 およびそれと同細胞に発現する IP₃R3 は、Ggust よりも広い細胞集団に存在することから（図 0-2 参照）、これと同時か先行して発現を開始すると考えられる。Ggust より約 2 日遅れて、 $\text{PLA}_2\text{-IIA}$ および SNAP-25 が発現を開始する。この細胞集団がシナプス形成細胞と相関する（太線）。6 日目以降は今後の解析により、その詳細が明らかにされると期待される（点線）。

が伺える。つまり、味覚神経より分泌される浸透性の因子が、上皮系幹細胞に直接働きかけることによって、味蕾細胞の形成を誘導すると考えられる。また、苦味シグナリングに関わる Ggust がシナプス形成以前に発現していることから、味細胞の運命が決定されてから、味神経を呼び込み、シナプスを形成するものと推察される。味神経も味細胞と同様に、味種による特異性があると考えられていることから (Frank, 1973; Zhao et al., 2003)、味種の混乱を招かないために、苦味細胞が苦味神経を呼び込むといった味種依存的な神経の呼び込み機構が存在しているのかもしれない。嗅神経細胞の嗅球（二次神経）への投射には嗅覚受容体に関与していることから (Mombaerts et al., 1996)、味覚においても味受容体に関与した味神経の呼び込み機構が存在する可能性も考えられる。味細胞と味神経の対応関係については、ほとんど解明されていないことから、今後の研究が注目される。