

## 第三章

### アラキドン酸と味蕾細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の解析

## 序

味細胞で感じた味は、味神経を介して中枢へと伝えられる。電子顕微鏡による観察から、味蕾中の 10%程度の細胞に、味神経との求心性シナプス様構造が確認されている (Kinnamon et al., 1985, 1987)。そこにはシナプス前膜と考えられる肥厚した細胞膜が存在し、近傍に多数のシナプス小胞様の電子密度の低い小胞や、大型で電子密度の高い有芯小胞が存在している。味情報を伝える神経伝達物質は未だ不明であるが、このシナプスで味細胞から味神経へと情報が伝えられていると考えられる。一般に、神経細胞のシナプス部位における神経伝達物質放出は、脱分極刺激により、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが開き、 $\text{Ca}^{2+}$  が流入することで、エキソサイトーシスが引き起こされることによる。エキソサイトーシスには  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることから、味蕾中のシナプス部位においても、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が必須であると考えられている。これを支持するように、一連のカルシウムシグナリング分子が味細胞特異的に発現していることや (図 0-2 参照)、実際に、味物質により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する味蕾細胞が存在することが知られている (Ogura et al., 2002)。

本章では、序章で述べたように、アラキドン酸は味シグナリングに関わると予想されたことから、味蕾細胞を単離し、カルシウム指示薬である Fura-2 により、アラキドン酸が味蕾細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に与える影響を解析した。

## 材料と方法

### 材料

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

### Ca<sup>2+</sup>イメージング

#### <味蕾細胞の単離>

有郭乳頭上皮を剥離し（第二章方法参照）、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<sup>2+</sup>-free リンガー液に移し、室温で 15 分間置いた。この間にピンセットで、エブナー腺を切り取り、上皮に付着した組織残骸を取り除いた。内径約 50  $\mu$  m のガラスキャピラリーで味蕾を吸い取り、あらかじめ Cell Tak (BD Biosciences) でコーティングした 5 mm 四方のカバーガラス上に吐き出した。このカバーガラスを 5  $\mu$  M Fura-2 AM (Molecular Probes) を含む HEPES バッファー (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, NaOH で pH 7.4 に調整) 1 ml 中に静かに沈め、室温で 20 分間、遮光して静置した。カバーガラスを灌流チャンバー（図 3-1）に移し、HEPES バッファーで灌流し、10 分程度経過した時点で測定を開始した。灌流溶液の流速は毎分 6 ml 程度に調整した。刺激溶液として、50 mM KCl、10 mM 安息香酸デナトニウム (Sigma)、100  $\mu$  M ステアリン酸 (Sigma)、30, 100  $\mu$  M アラキドン酸 (Sigma)、100  $\mu$  M NDGA (nordihydroguaiaretic acid; Sigma)、100  $\mu$  M MFA (meclofenamic acid; Sigma)、5  $\mu$  M イオノマイシン (Sigma) のそれぞれ HEPES バッファーに溶解したものを調製し、これを 30-90 秒間灌流した。倒立蛍光顕微鏡 (Olympus IX-70)、MicroMax CCD カメラ (Princeton Instrument) および解析ソフト MetaFlour (Universal Imaging) を用い、340 nm、380 nm の波長の光により励起した 510 nm の蛍光の画像（露光：0.5 秒）を 4 秒に一度取得し、Ca<sup>2+</sup>濃度変化をイメージングした。

#### <免疫染色>

Ca<sup>2+</sup>イメージング後、味蕾細胞が載ったカバーガラスを、4% PFA/PBS に浸し、4℃で 30-60 分間固定した。水で洗浄してから、60℃で風乾し、細胞を完全に貼り付けた。以降の染色操作は、第二章の単離細胞の免疫染色と同様に、再固定、ブロッッキング、抗体

反応を行った (Target Retrieval Solution 中での煮沸は行っていない)。細胞膜の透過性を高めるため、ブロッッキング溶液、および一次抗体反応溶液に 0.1% Triton X-100 を添加した。一次抗体反応は抗 hPLA<sub>2</sub>-IIA 抗体で 4°C 一晩、二次抗体反応は Alexa546 標識抗マウス IgG 抗体を使用し、室温で 1 時間行った。

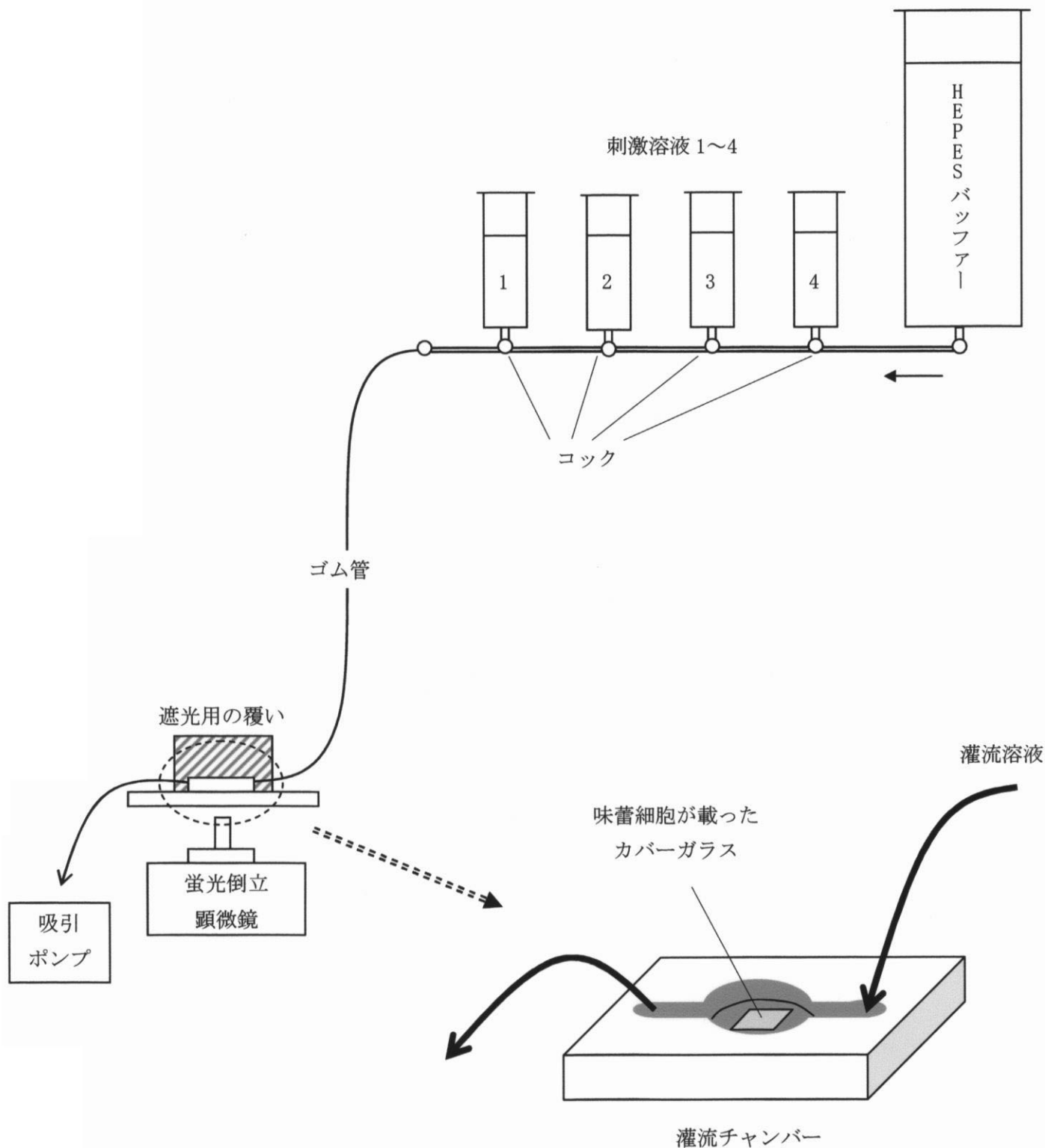


図 3-1  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングに使用した灌流装置

右上の各容器に入った溶液はゴム管を通り、自由落下により灌流チャンバーの右側に流れ込む。それぞれの容器の先端にはコックが取り付けられており、これを開閉することで、各溶液の切り替えができる。チャンバーの中央に、味蕾細胞が載ったカバーガラスを置き、左側から溶液を吸い出してチャンバー内の溶液が灌流されるようにした。チャンバーの底面は光が透過できるように薄いガラスで作製してある。

## 結果

### 単離味蕾細胞を用いた $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

ラット有郭乳頭味蕾細胞を単離し、 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬として広く利用されている Fura-2 を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを試みた。Fura-2 は、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合している場合は 340 nm 付近の光で励起され、未結合の状態だと 380 nm 付近の光で励起され、共に 510 nm 付近の蛍光を発する。すなわち、340 nm と 380 nm で励起したときの蛍光強度の比 (Ratio 340/380) が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に対応した値となる。単離直後は紡錘形を保った細胞が多かったが、イメージングの終了時には、丸い細胞が多く、イメージング中に形態が丸く変化してしまう細胞が多く存在した。既に、ラットの単離味蕾細胞で、カルシウム応答が報告されている高濃度  $\text{K}^+$  (50 mM KCl; Park et al., 2003) および、強い苦味を呈する 10 mM denatonium (Ogura et al., 2002) により刺激を行った。その結果、両者ともに 1 割以下ではあるが複数の細胞で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が観察できた (図 3-2)。高濃度  $\text{K}^+$  による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化は素早く、ピークが鋭かったのに対し、denatonium によるピークはそれに比べると緩やかで小さめであった。両刺激に反応した細胞には、紡錘形の細胞も丸い細胞も含まれていたが、丸い細胞の方が比較的反応性が良かった。

以上の結果から、この実験系により、細胞の形態が丸くなってしまうことはあるが、少なくとも一部の味蕾細胞においては、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度をイメージングすることが可能であると判断できた。

### アラキドン酸による味蕾細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇

続いて、アラキドン酸による、味蕾細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度への影響を調べた。まず対照として、不飽和脂肪酸である 100  $\mu\text{M}$  ステアリン酸で 90 秒間刺激した。ここで、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に変化はなかった (図 3-3B)。続いて、100  $\mu\text{M}$  のアラキドン酸溶液によって刺激したところ、多くの細胞で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇した (図 3-3C)。上昇度の小さいものも含めると、3 割程度の細胞が反応していた。上記の高濃度  $\text{K}^+$  や denatonium と比べて、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の速度は遅く、ピークは小さく緩やかであった (図 3-4B)。また、30  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  のアラキドン酸刺激により、反応の大きさに濃度依存性が見られた。イメージングの最後に、全細胞の反応性を確認するため  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアである ionomycin (2

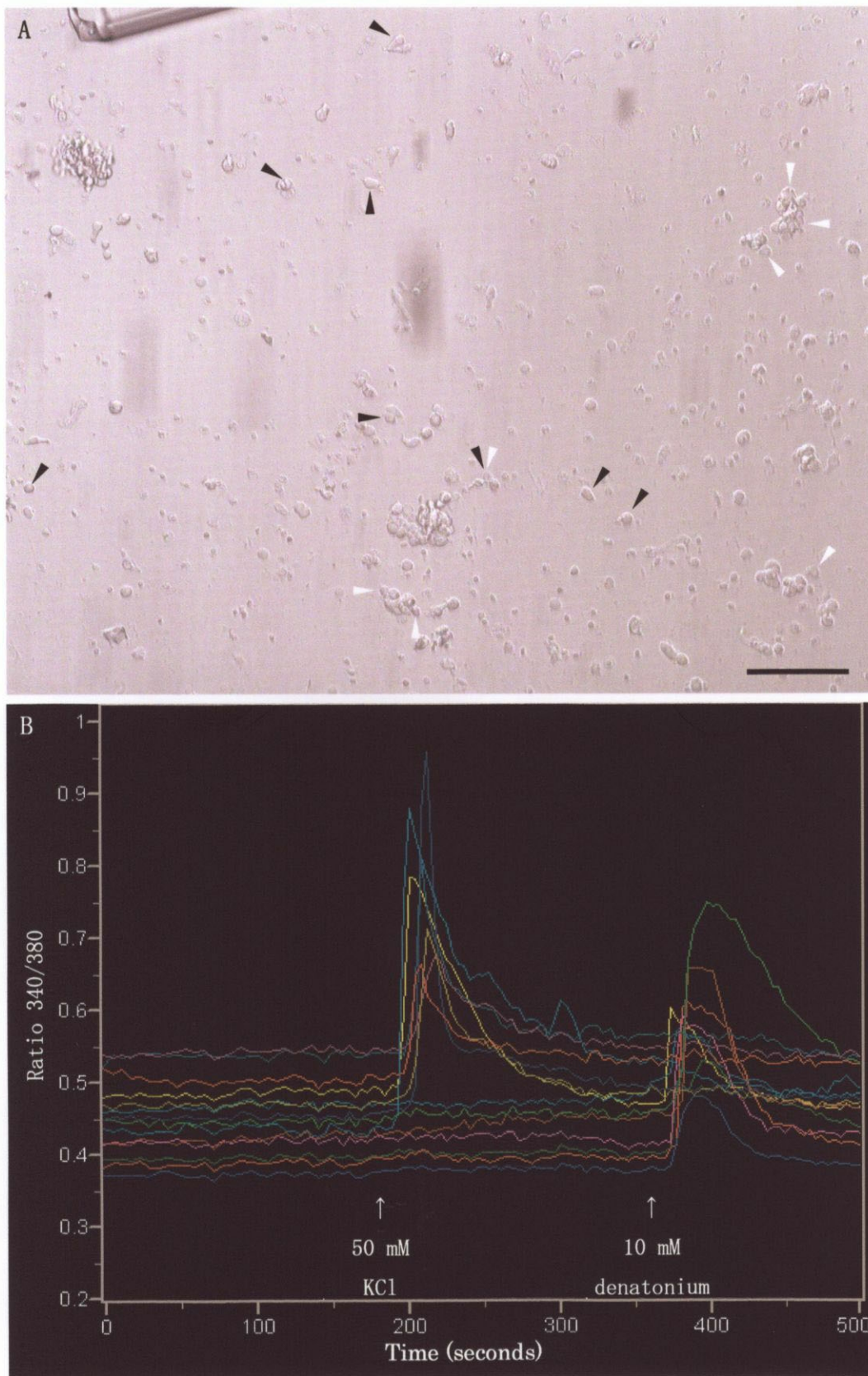


図 3-2 単離味蕾細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング

脱分極を引き起こす高濃度  $\text{K}^+$  (50 mM KCl) と、苦味物質の denatonium (10 mM) で刺激した。刺激に反応した細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化をグラフに示し (B)、その細胞を明視野の画像中に矢尻で示した (A、KCl: 黒矢尻、denatonium: 白矢尻)。グラフの縦軸は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 (Ratio 340/380)、横軸は時間 (秒)。1 つのトレースは 1 つの細胞に対応している。スケールは 50  $\mu\text{m}$ 。

$\mu\text{M}$ )で刺激し、ここで反応しなかった細胞は、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の恒常性や測定に必要な Fura-2 濃度を保てておらず、細胞膜の機能を維持できていないと判断した。PLA<sub>2</sub>-IIA 発現細胞においても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇しているかを調べるため、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング後の細胞を固定し、抗 PLA<sub>2</sub>-IIA 抗体で染色した (図 3-4A)。その結果、PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性細胞においても、カルシウム応答が見られていた (図 3-4B)。ただし、イオノマイシンにも応答を示さない、測定不能の細胞も多かった。続いて、細胞内で産生されるアラキドン酸によっても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇するかを調べるため、アラキドン酸代謝酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX) の阻害剤 NDGA (nordihydroguaiaretic acid; 100  $\mu\text{M}$ ) で刺激した。これは、LOX を阻害することにより、その基質であるアラキドン酸が細胞内に蓄積することが期待された。その結果、多くの細胞で  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇した (図 3-5)。アラキドン酸による刺激よりも反応は大きく  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇のピークも鋭かった。測定後の細胞を抗 hPLA<sub>2</sub>-IIA 抗体で染色したところ、測定可能であった PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性細胞は全て  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇していた (4/4 個)。また、別の LOX 阻害剤である MFA (meclofenamic acid; 100  $\mu\text{M}$ ) によっても同様に、多くの細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が引き起こされた (図 3-6)。反応は緩やかで、アラキドン酸による反応と似ていた。

以上の結果から、生理的な濃度のアラキドン酸によって、PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性細胞を含む一部の味蕾細胞で、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が引き起こされることが明らかになった。



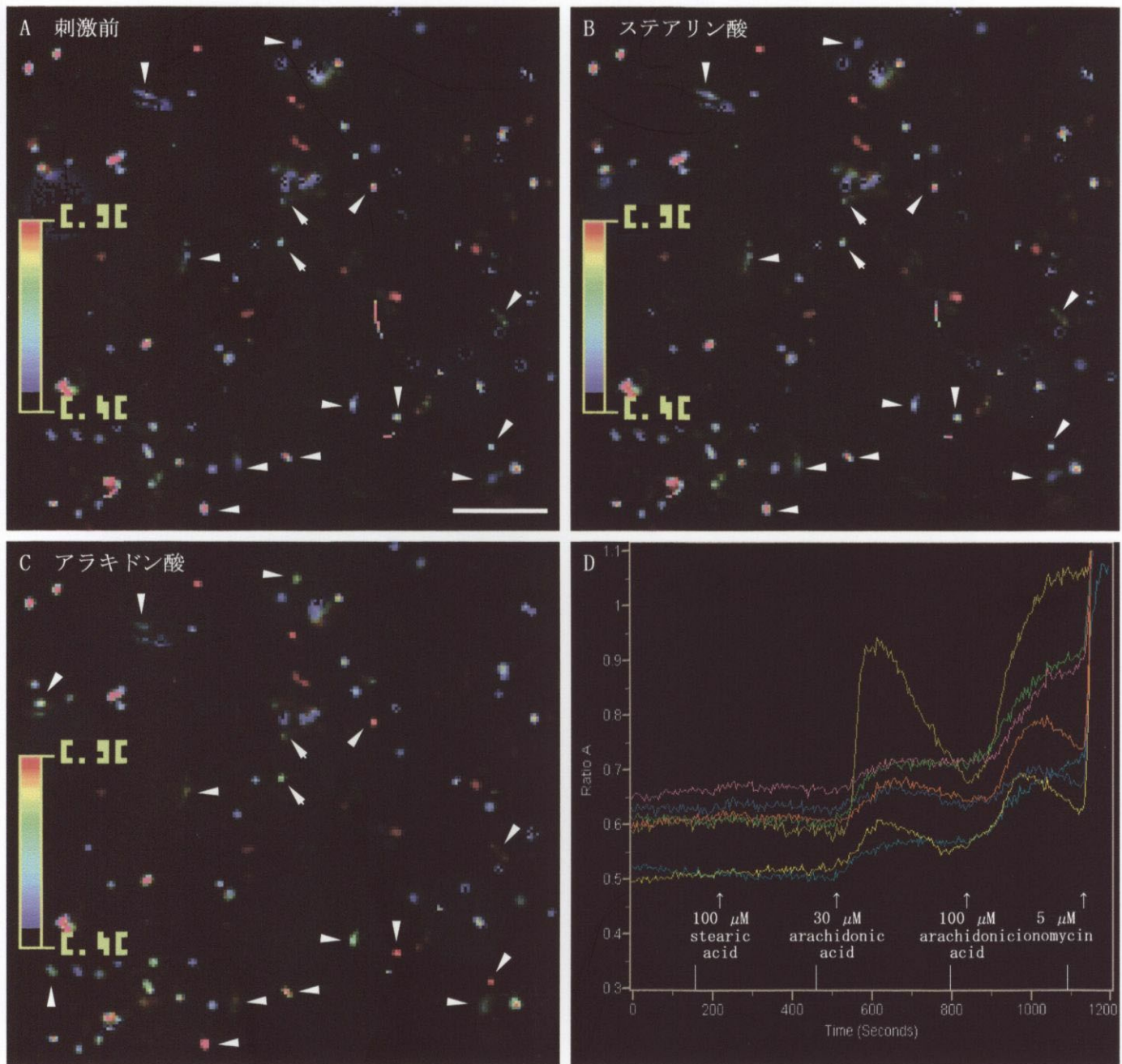


図 3-3 アラキドン酸による味蕾細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇

Ratio 340/380 の値に対応する擬似カラーであらわした画像 (A-C)。刺激前 (A)、および 100  $\mu\text{M}$  ステアリン酸刺激後 (B)、100  $\mu\text{M}$  アラキドン酸刺激後 (C)。ステアリン酸では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は見られなかったが、アラキドン酸では上昇した細胞が多数存在した (矢尻)。そのうちの 7 個の細胞について  $\text{Ca}^{2+}$  変化をグラフに示した (D)。スケールは 50  $\mu\text{m}$ 。

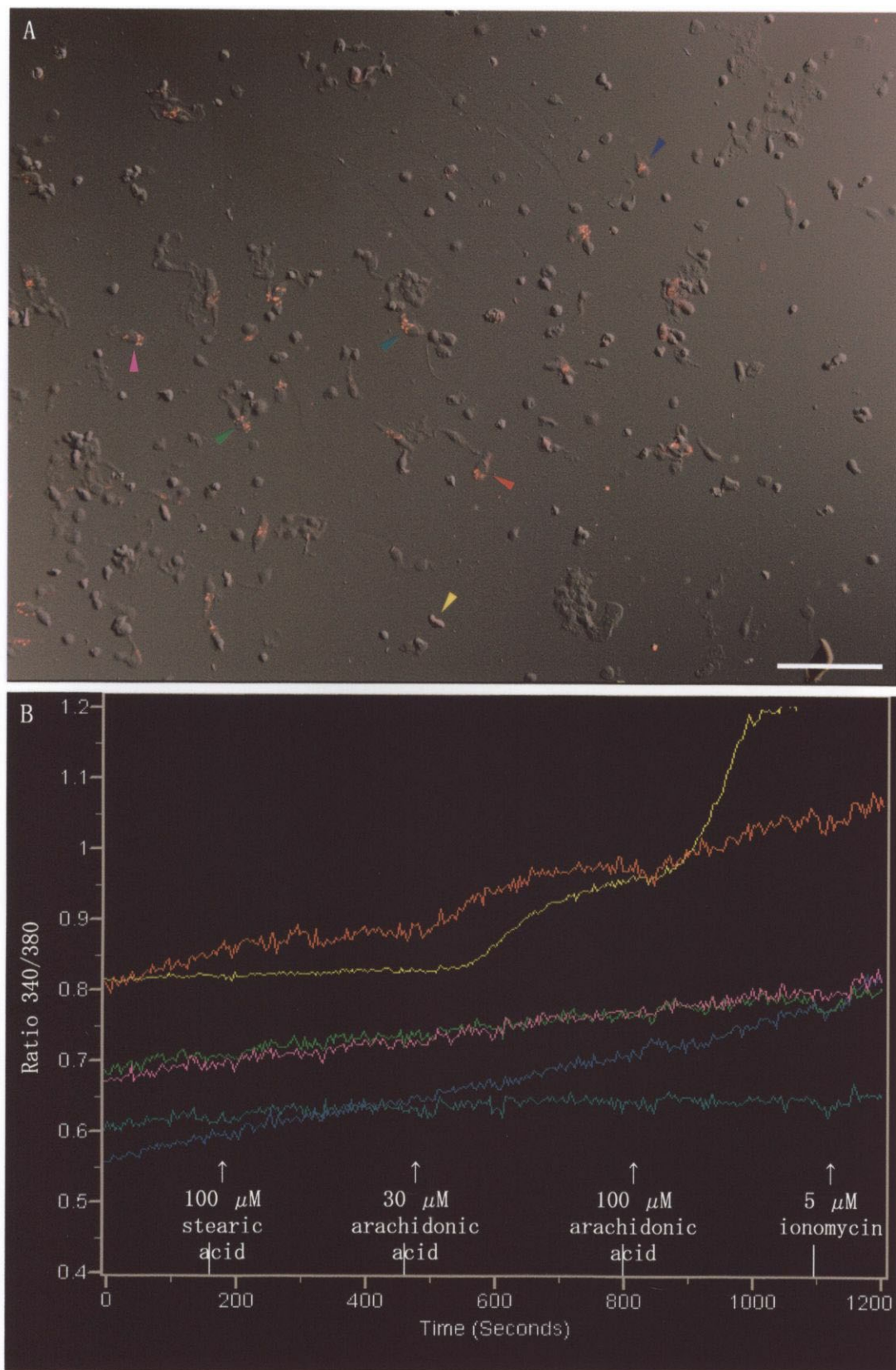


図 3-4 アラキドン酸が PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性味細胞の Ca<sup>2+</sup>濃度に与える影響

Ca<sup>2+</sup>イメージング後に抗 hPLA<sub>2</sub>-IIA 抗体で染色した (A; 赤色蛍光)。ステアリン酸 (100 μM)、アラキドン酸 (30 μM、100 μM)、イオノマイシン (5 μM) で刺激したときの、PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性味細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化 (B)。A の矢尻と B のトレースの色はそれぞれ対応している。赤と水色で示した細胞はアラキドン酸によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇している。残りの細胞はイオノマイシンにも反応性を示さず、細胞機能を保てていない。スケールは 50 μm。



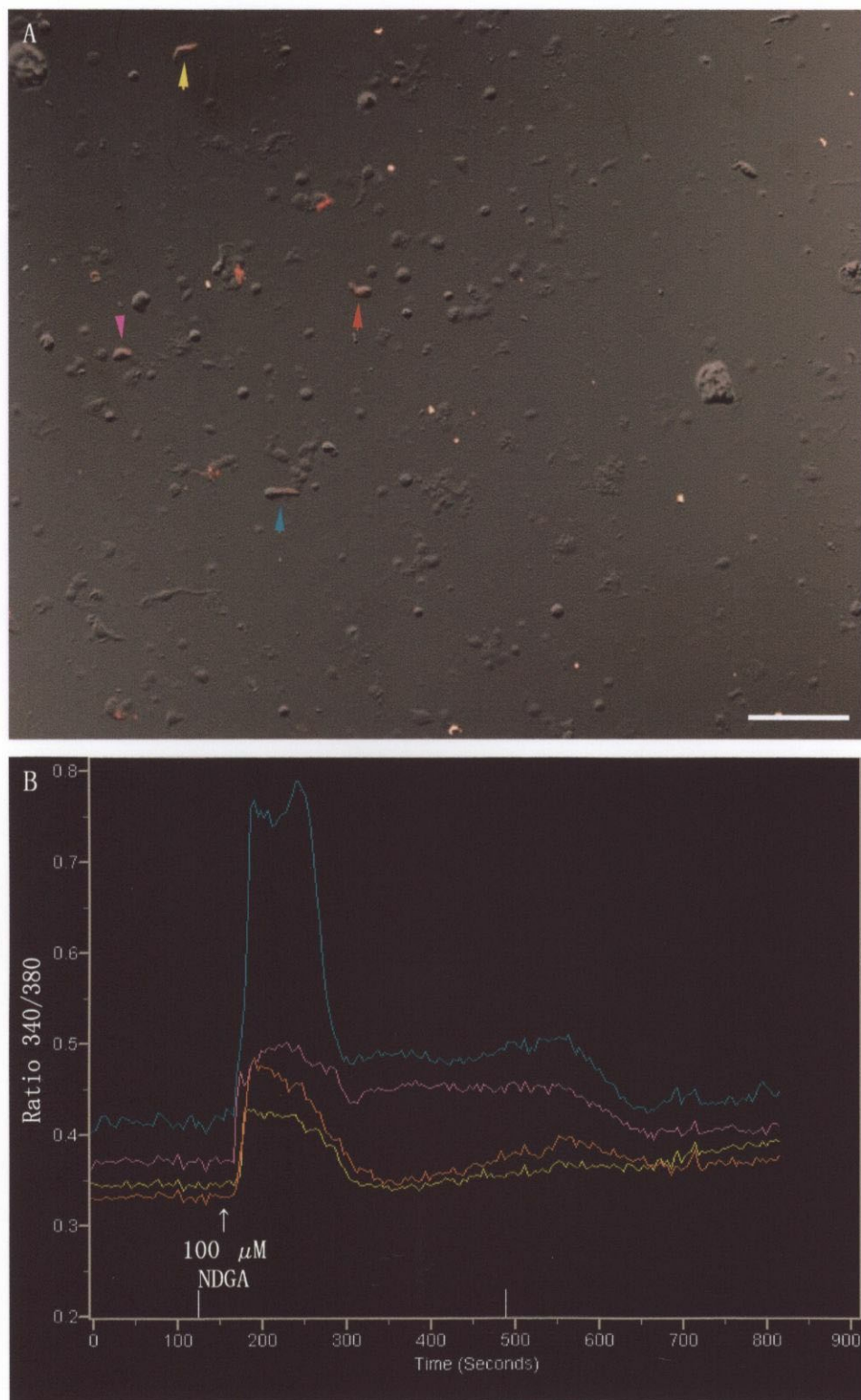


図 3-5 NDGA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇

リポキシゲナーゼの阻害剤である NDGA (nordihydroguaiaretic acid; 100  $\mu\text{M}$ ) により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する味蕾細胞が見られた。測定後の細胞を抗  $\text{PLA}_2$ -IIA 抗体で染色し (A)、陽性細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化をグラフに示した (B)。矢尻の色とグラフのトレースの色は対応している。測定可能であった全ての  $\text{PLA}_2$ -IIA 発現細胞で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は上昇していた。スケールは 50  $\mu\text{m}$ 。

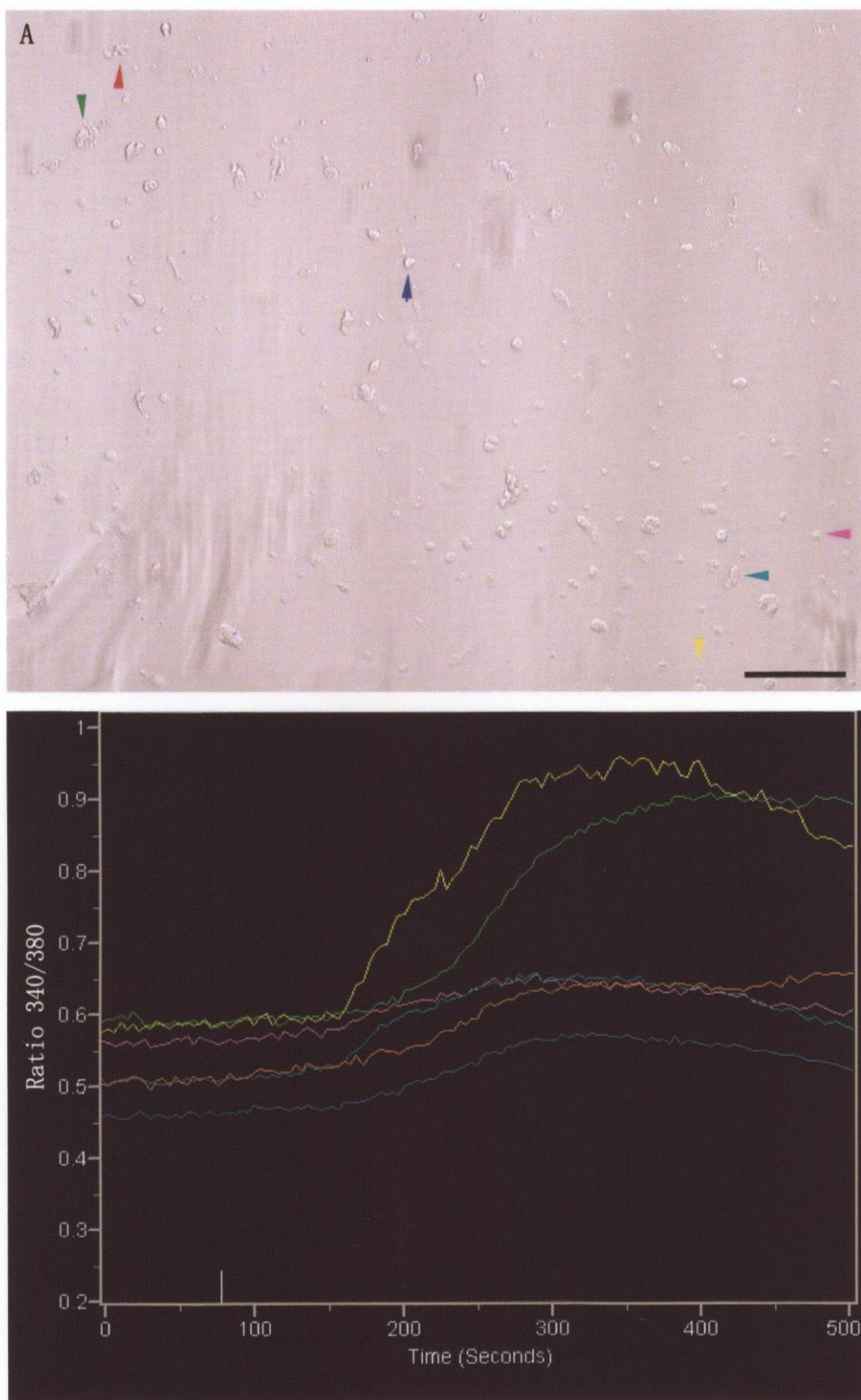


図 3-6 MFA による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇

リポキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼの阻害剤であるMFA (meclofenamic acid;  $100 \mu\text{M}$ )により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇する味蕾細胞が見られた (A)。矢尻で示した細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化をグラフに示した (B)。矢尻の色とグラフのトレースの色は対応している。スケールは  $50 \mu\text{m}$ 。

## 考察

本章では、単離味蕾細胞を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行い、アラキドン酸によって、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が引き起こされる細胞が存在することを明らかにした。そして、この現象は、 $\text{PLA}_2$ -IIA 陽性細胞、すなわちシナプスを保有する味細胞（第二章参照）においても引き起こされることを示した。

アラキドン酸によって  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が引き起こされた細胞は 3 割程度であり、高濃度  $\text{K}^+$  や denatonium に応答した細胞数よりもかなり多かった。しかし、この応答細胞数の多さが、生体内での事情を反映しているかは不明である。それは、実際に生体内のどの細胞で、どの程度のアラキドン酸が産生されるかということと関係する。アラキドン酸は 1~100  $\mu\text{M}$  程度で様々なイオンチャンネルの活性に直接的、あるいは、間接的に影響を与えることが知られている (Meves, 1994)。本実験では、100  $\mu\text{M}$  という比較的高濃度のアラキドン酸を外部から細胞全体に作用させた結果として細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇しており、アーティファクトの危険性も含んでいる。しかし、鋤鼻神経細胞を用いた Spehr らの実験と同様に (Spehr et al., 2002)、細胞内で産生されるアラキドン酸によって刺激することを目的とした、LOX 阻害剤を用いた実験においても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が見られたことから、実際の味細胞内でアラキドン酸が産生されれば、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が引き起こされることが示唆された。 $\text{PLA}_2$ -IIA 陽性細胞においては、この分子が活性化されれば、アラキドン酸が産生されることから、実際に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇にまで結び付く可能性は高いと考えられる。

本実験でのアラキドン酸の標的分子として、いくつかの候補が挙げられる。まず、単離味蕾細胞を用いた実験から、遅延整流性  $\text{K}^+$  チャンネルがアラキドン酸およびドコサヘキサエン酸によって抑制されることが報告されている (Gilbertson et al., 1997)。また、味蕾での発現が報告されている漏洩型  $\text{K}^+$  チャンネルの TREK や、酸味受容体候補分子である ASIC (acid sensitive ion channel) はアラキドン酸によって活性が制御されることが知られている (Allen and Attwell, 2002)。さらに、TRP チャンネルファミリーの中にも TRPC4、TRPV4、TRPV (*osm-9*) のようにアラキドン酸によって活性が制御される分子種があり (Wu et al., 2002; Clapham, 2003; Kahn-Kirby et al., 2004)、甘・旨・苦味の伝達に必須な TRPM5 もその候補として挙げられる。ただし、現在までに、

アラキドン酸によるこのチャンネル活性の影響を調べた報告はない。味蕾細胞には、その他にも多数のイオンチャンネルが存在していることから、上記の分子以外にも、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルや $\text{Cl}^-$ チャンネルなど、アラキドン酸によって活性が制御される分子が存在すると予想される。

アラキドン酸もしくはLOXの阻害剤であるMFAによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、高濃度 $\text{K}^+$ やdenatoniumと比較して非常に緩やかなものであった。高濃度 $\text{K}^+$ は脱分極を引き起こし、電位依存性の $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルより $\text{Ca}^{2+}$ イオンが流入したと考えられる。また、denatoniumは苦味受容体であるT2Rにより受容され、PLC $\beta$ 2を介した細胞内シグナリング経路の下流で、細胞内小胞体より $\text{Ca}^{2+}$ が放出、それに付随して細胞外から $\text{Ca}^{2+}$ が流入したと考えられる(Ogara et al., 2002)。100  $\mu\text{M}$  アラキドン酸やMFAによって産生されたアラキドン酸は、イオンチャンネルに穏やかに働きかけ、少しずつ $\text{Ca}^{2+}$ が流入した結果、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が見られ、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルなどの、 $\text{Ca}^{2+}$ を一過的で多量に透過させるチャンネルの開口には至らなかったものと思われる。一方、別のLOX阻害剤であるNDGAを作用させたときは、鋭い $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が見られた。これは、LOXの阻害効果がMFAとは異なり、局所的にアラキドン酸濃度が上がり、その近傍に存在した $\text{Ca}^{2+}$ 透過性のチャンネルを開口させた結果かもしれない。NDGAがアラキドン酸を介さない経路により細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を引き起こした可能性を否定することはできないが、単離嗅神経細胞においては細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を引き起こさないという知見があり(Spehr et al., 2002)、NDGAによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は、細胞普遍的ではなく、味蕾細胞特異的な現象であることがわかる。

### 味シグナリングにおけるアラキドン酸の役割仮説

以上の知見と本章の $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの結果を、味シグナリングにあてはめて考えると、以下の経路が想定できる(図3-7)。Gタンパク質あるいは、PLC $\beta$ 2の下流でPLA $_2$ -IIAが活性化されアラキドン酸が産生されると仮定すると、そのアラキドン酸により① $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルもしくは $\text{Ca}^{2+}$ 透過型TRPチャンネルが開口し、 $\text{Ca}^{2+}$ が流入する。② $\text{Ca}^{2+}$ 非透過型TRPチャンネル(TRPM5)やASICなどの $\text{Na}^+$ チャンネルが開口し $\text{Na}^+$ が流入し脱分極を引き起こし、電位依存性の $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介して $\text{Ca}^{2+}$ が流入する。③(漏洩型) $\text{K}^+$ チャンネルが抑制され脱分極を引き起こし、電位依存性の $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介して



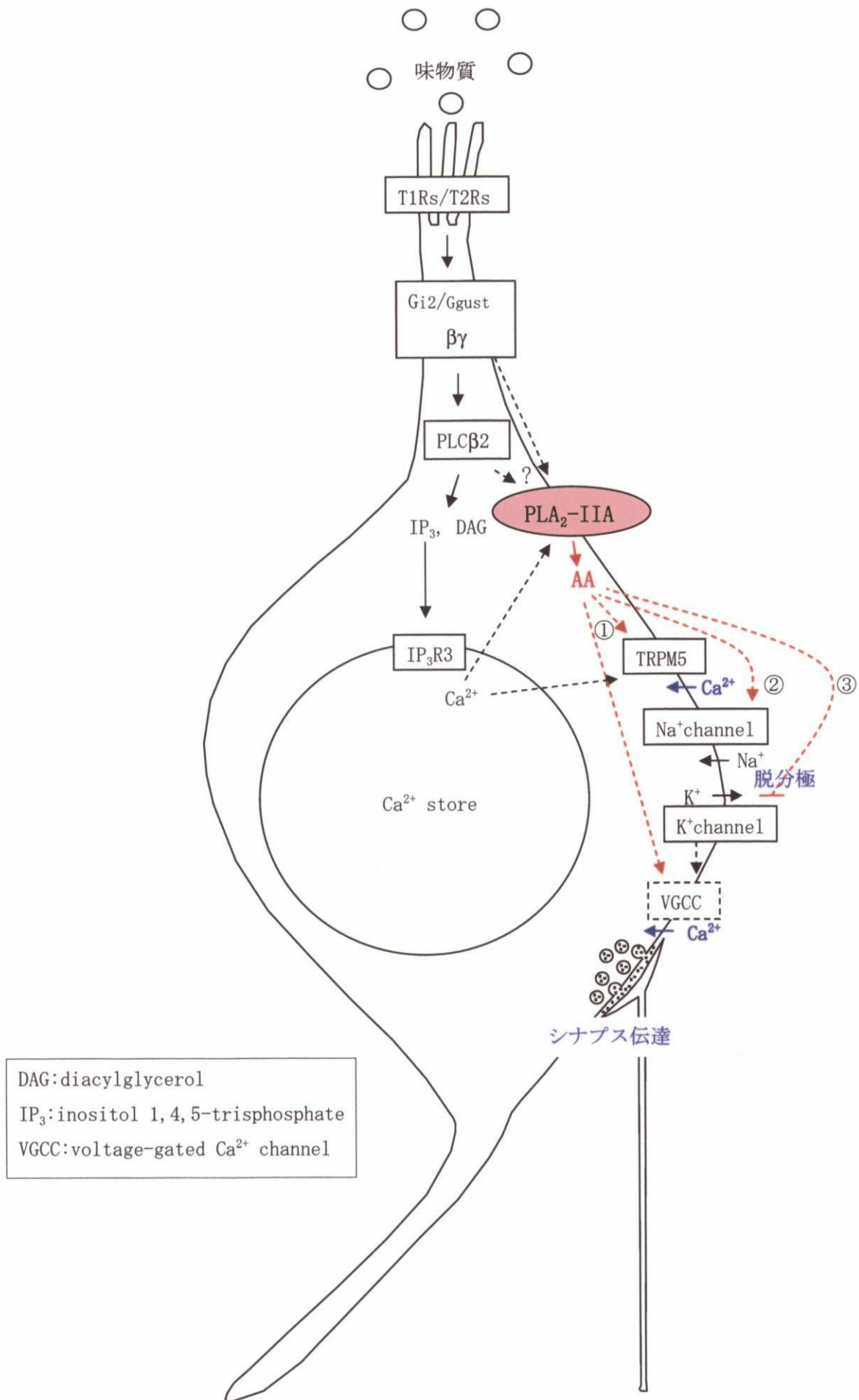


図 3-7 味シグナリングにおける PLA<sub>2</sub>-IIA およびアラキドン酸 (AA) の役割仮説  
 図中の番号は本文中の番号と対応している。

Ca<sup>2+</sup>が流入する。

スナネズミの味神経応答が、アラキドン酸やPLA<sub>2</sub>の阻害剤によって影響を受けることから、PLA<sub>2</sub>が味シグナリングの途中で機能している可能性は高く (Shiffman et al., 1995)、今後、ラットにおいてPLA<sub>2</sub>-IIAが味シグナリングのどの段階に関わっているかを解明することが重要である。第一には、本章のCa<sup>2+</sup>イメージング実験を応用し、味応答に対して、PLA<sub>2</sub>や味シグナリング関連分子の阻害剤が及ぼす影響を解析することで多くの情報が得られると期待される。その後は、培養細胞にPLA<sub>2</sub>-IIAとGgustやPLCβ2などの味シグナリング分子を発現させた再構築シグナリング系を用い、分子同士の相互作用を解析することで、PLA<sub>2</sub>-IIAの活性化因子が同定できるのではないかと考えられる。



## 序章

本研究は、味蕾に PLA<sub>2</sub> を起点とした脂質セカンドメッセンジャーシグナリング経路を想定し、免疫組織学的解析により、PLA<sub>2</sub>-IIA がシナプスを形成している成熟した味細胞で特異的に発現することを見出した。この過程で、味細胞では味シグナリング分子が先行して発現し、成熟が進んでからシナプスを形成するという新たな知見も得た。PLA<sub>2</sub>-IIA の機能については、この酵素の産生物質であるアラキドン酸によって、味細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇することを示し、味細胞カルシウムシグナリングに関わる可能性を提示した。

### ノックアウトマウスと他の動物種における PLA<sub>2</sub>-IIA

一般に、ある遺伝子の機能を解析するために、その遺伝子のノックアウト動物を作製することは非常に有効な手段であり、技術的観点から、哺乳類ではマウスが利用しやすい。しかし、PLA<sub>2</sub>-IIA 遺伝子に関しては例外的な状況にある。分泌型 PLA<sub>2</sub> は哺乳類において 10 種類報告されているが、IIA 型はその中でも優位種であり、ヒトやラットにおいては、多くの組織に発現していることが知られている (Kudo and Murakami, 2002)。しかし、マウスの PLA<sub>2</sub>-IIA 遺伝子は系統によって、コード領域の途中に 1 塩基の挿入があり、フレームシフトを起こして、酵素活性を持たないタンパク質しか産生されない。つまり、自然なノックアウトマウスが既に存在している (MacPhee et al., 1995)。さらに、正常な PLA<sub>2</sub>-IIA の遺伝子を持っている系統においても、その発現は、小腸など一部の組織に限られており、他の動物種とは様子が異なっている。実際、正常な遺伝子を有する系統と有しない系統のマウス有郭乳頭切片に対して、*in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色を行ったが、どちらの系統においても、ラットで観察されたような PLA<sub>2</sub>-IIA の味蕾中でのシグナルは検出できなかった (データ省略)。また、マウスは系統による味覚応答の違いがよく研究されているが、これらの相違と正常な PLA<sub>2</sub>-IIA 遺伝子の有無とで一致するような事例がないことから、マウスの味蕾中では、PLA<sub>2</sub>-IIA 遺伝子はほとんど機能していないと考えられる。

一方、スナネズミ、ウサギ、サル、オランウータンの味蕾中では、免疫染色によって、ラットと同様のシグナルが観察された (データ省略)。このことから、哺乳類の味蕾一般には、PLA<sub>2</sub>-IIA が共通に発現・機能しており、マウスの味蕾においては、他の分子によって代替されている、もしくは必要がないと考えられる。このことは、PLA<sub>2</sub> 活性やア

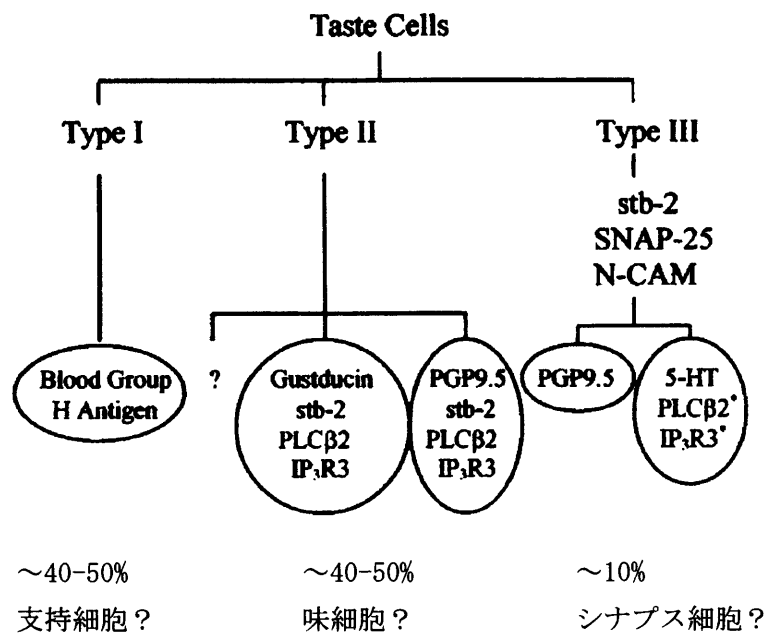
アラキドン酸産生能を解析することで、今後明らかにできるものである。仮に、他の分子が代替しているとする、その類似性から、分泌型 PLA<sub>2</sub> の他の分子種が第一に考えられる。しかし、マウス有郭乳頭切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行ったが、特定の分子種が味蕾内で優位に発現していることは確認できなかった（データ省略）。PLA<sub>2</sub>-IIA の機能が主にアラキドン酸の産生であるとするならば、細胞質型 PLA<sub>2</sub> やジアシルグリセロールリパーゼ（DAG lipase）が機能を代替している可能性も考えられる。特に、DAG lipase に関しては、味覚とシグナリングの共通性の高い、鋤鼻感覚神経においてアラキドン酸産生に関与していると言われており注目される分子である（Spehr et al., 2002）。

### 味細胞の成熟化とシナプス形成

味蕾の細胞は、電子顕微鏡による観察から、I～IV 型細胞に分類される。基本的には I 型細胞（暗細胞）が支持細胞であり、IV 型細胞が幹細胞と考えられている（Lindemann, 1996）。そして、動物種による違いも報告されているが、ラットでは、III 型細胞のみが味神経と求心性のシナプスを形成している（Clapp et al., 2004）。つまり、これが味細胞であると考えられる。しかしながら、免疫染色試料を電子顕微鏡で観察すると、いわゆる味細胞マーカーで識別される細胞集団の大半は II 型細胞で、少数のみしか III 型細胞に分類されないことから（表 4、図 4-1）、味細胞とシナプス細胞は異なるのではないかとの議論が起こっている。しかし、本研究で得られた知見を基に、個々の味蕾細胞に時間軸を導入し、II 型細胞が成熟して III 型細胞になると仮定するとこれらの関係が矛盾なく説明できる。II 型細胞は、PLC  $\beta$ 2 や Ggust といった味覚シグナリング分子は発現しているが、シナプスを有さない、いわゆる未成熟な段階の味細胞であると考えられる。SNAP-25 および PLA<sub>2</sub>-IIA は、この成熟したシナプス形成味細胞（III 型細胞）にのみ発現しており、味覚シグナリング分子もここでは同時に発現している（図 4-2）。上のような議論が起こる背景には、II 型細胞に比べて III 型細胞の数が少ないことが原因の一つであると思われる。これは、III 型細胞である期間が II 型細胞である期間よりも短いか、II 型細胞の一部しか III 型細胞にならないためと考えられる。味蕾中の細胞は短い期間で更新され続けていることから、味神経が伝達する味情報を一定に保つためには、新しい味細胞とのシナプスも随時形成しなければならない。そこで、味シ

表 4 免疫染色と電子顕微鏡観察結果の対応

	Type I	Type II	Type III (IM)	Ref.
SNAP-25	-	+ small subset	(+)	Yang 2000a
Ggust	-	+ subset	N. D.	Yang 2000b
serotonin			+ not all	Yee 2001
PGP9.5		+	+	
IP <sub>3</sub> R3	-	+ large subset	+ small subset	Clapp 2004
Synaptobrevin-2	-	+	+	Yang 2004



(上) 表 4 免疫染色と電子顕微鏡観察結果の対応

(下) 図 4-1 各抗体による免疫反応性と細胞タイプの対応模式図

Yang et al., 2004 より引用

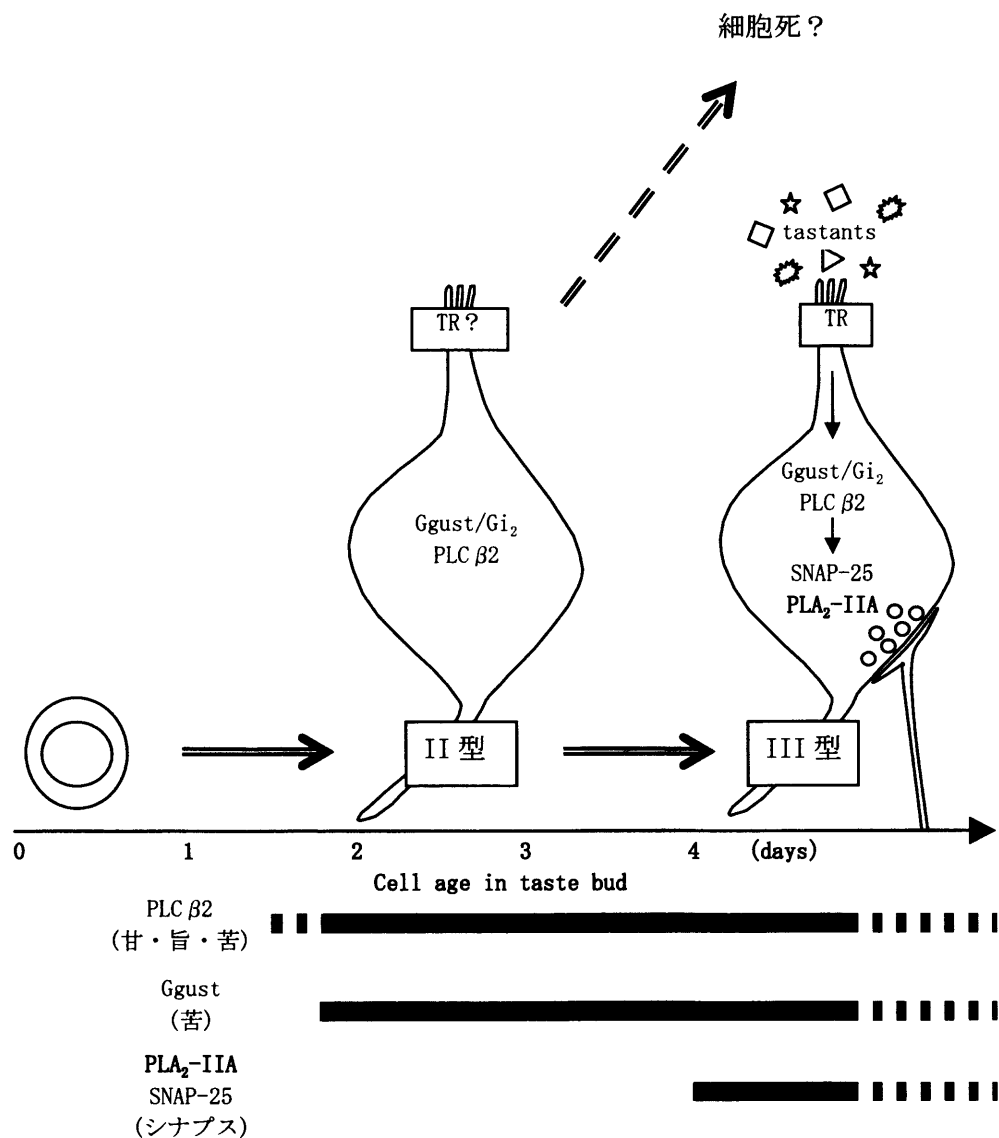


図 4-2 味細胞とシナプス細胞の関係の概念図

本研究で得られた知見を基に、味細胞の成熟に伴う発現分子の関係を時間軸に載せて表し、それと同時に細胞タイプが変化するという仮説を図に示した。

丸い幹細胞（左側）から、シナプスは形成していないが、味シグナリング関連分子（Ggust、Gi<sub>2</sub>、PLC β<sub>2</sub>；Taste Receptor (TR)は不明）を発現している未成熟味細胞（中央）になり、味神経とシナプスを形成し、PLA<sub>2</sub>-IIA や SNAP-25 を発現している成熟した味細胞（右側）と分化していく。過去の免疫染色および電子顕微鏡観察の結果との照らし合わせから、未成熟味細胞が II 型細胞、成熟味細胞が III 型細胞に対応すると仮定できる。一部の II 型細胞は、シナプスを形成することなく細胞死を迎えるのかもしれない（上部点線矢印）。

グナリング分子を完全に備え、受容する味も決定されている新たな味細胞（II 型細胞）が準備万端で待機していることの重要性は大きい。仮に、シナプスを形成できずに、死んでゆく一見無駄な細胞が多数あったとしても、それは、味情報を保つための安全策であり、有効な戦略なのかもしれない。また、各細胞の寿命は数日～3 週間程度と細胞によってかなり違うことは、シナプスを形成した細胞は、より長い細胞寿命を持ち、そうでない細胞は早く死ぬといったことから説明できるのかもしれない。本実験では、BrdU の追跡実験を 5 日間しか行っていないが、より長い期間行うことで、細胞タイプと寿命についての新たな知見を得られる可能性もある。

### 味蕾のシナプス部位における PLA<sub>2</sub>-IIA の生理機能

第二章で示したように、PLA<sub>2</sub>-IIA はシナプスを形成している成熟味細胞で特異的に発現しており、シナプス周辺での役割が考えられた。また、第三章より、PLA<sub>2</sub>-IIA がアラキドン酸を介して細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることが示唆された。これら 2 つの機能は排他的なものではなく、むしろ両者の機能を同時に果たしていることも充分にありえる。エキソサイトーシスには Ca<sup>2+</sup>と細胞膜の流動性が重要である。PLA<sub>2</sub>-IIA はこれら両者を同時にまかなうことができる分子の一つである。PLA<sub>2</sub>-IIA を活性化する因子は、基本的には Ca<sup>2+</sup>と言われているが、細胞外の酸性糖鎖などに結合して待機しており、細胞内のホスホリパーゼによって脂質二重膜の内側に切り込みが入ったところを外から切り込んでいくという知見がある（Kudo and Murakami, 2002）。味覚シグナリングの下流で PLC β2 あるいは、cPLA<sub>2</sub> など他のホスホリパーゼによって脂質二重膜に切り込みが入り、膜の物理的性質が変化したところで、細胞外から PLA<sub>2</sub>-IIA が切り込んでいくのかもしれない。これは、培養細胞に PLA<sub>2</sub>-IIA および PLC β2 などのシグナル分子を発現させ、シグナリングをまわすことによって PLA<sub>2</sub>-IIA が活性化されるかをアラキドン酸の産生によって解析するといった手法で解析できると考えている。

PLA<sub>2</sub>-IIA が活性化されると、細胞膜を切断し、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸とリゾリン脂質を産生する。これらは、細胞膜の流動性を高め、シナプス小胞と細胞膜の融合が起こりやすい環境を作り出す。それと同時に、不飽和脂肪酸（アラキドン酸）は周囲のチャンネルに働きかけ、直接的あるいは間接的に Ca<sup>2+</sup>流入を促す。これらの作用によりシナプス前膜周辺に待機していた小胞はエキソサイトーシスを起こし、神経伝達物

質が放出されると考えられる（図 4-3）。実際に PLA<sub>2</sub>-IIA が味シグナリングの下流で機能しているかは、今後の検討課題である。PLA<sub>2</sub>の阻害剤や抗体が、味シグナリングに与える影響を味細胞 Ca<sup>2+</sup>イメージングにより解析することや、エキソサイトーシスやシナプス小胞のリサイクリングに与える影響を膜結合型の蛍光色素を用いて評価することが可能である。また、アラキドン酸の標的となる分子については、培養細胞に候補となる遺伝子を発現させ、電気生理的にその関係を明らかにすることが有効である。そして、何よりも、RNAi などの手法を用い、味細胞において PLA<sub>2</sub>-IIA の遺伝子ノックダウン動物を作製・解析することで多数の情報を得ることができると考えている。

味シグナリングの分子の実態は、ここ数年で急速に明らかにされつつあり、近いうちに主要経路が完全に解明されると思われる。その後はゲノミクスやプロテオミクスといった網羅的な分子解析により、味細胞に発現する分子が網羅的に示され、シグナリングの主要経路を根幹として、タンパク質間の相互作用や転写調節といった分子間の枝で細部まで繋がっていくと思われる。本研究は、その走りである DNA マイクロアレイ解析により明らかになった分子を糸口に、抜け落ちた穴を埋め、機能解析へと研究を進めて行った。本研究によって明らかになった知見が、味シグナリグ全容解明への土台となり、可憐な花が咲き誇ることを期待している。

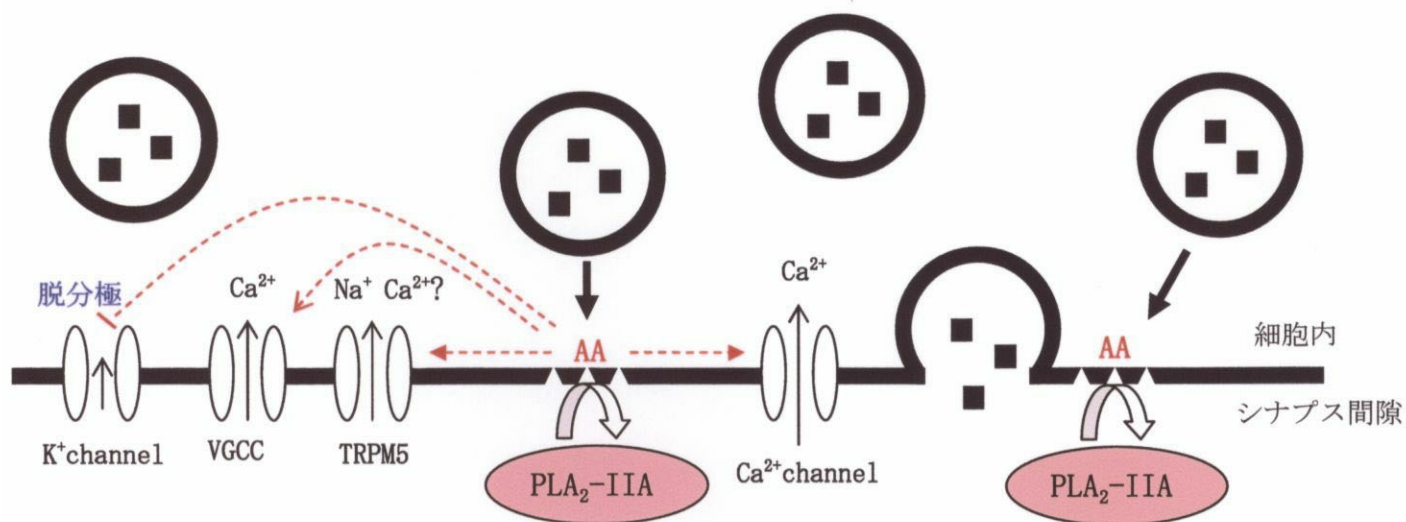


図 4-3 味細胞のシナプス部位における  $\text{PLA}_2\text{-IIA}$  の予想される機能

$\text{PLA}_2\text{-IIA}$  が細胞外から脂質二重膜を切断しアラキドン酸（不飽和脂肪酸）が遊離される。この時点で物理的にも細胞膜の物理的性質が変化し、流動性が上がる。アラキドン酸は、直接的に（ $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルや TRPM5 チャンネルなどを活性化させる）、あるいは間接的に（PKC などの分子を介する）、 $\text{Ca}^{2+}$ の流入を促進する。その結果、神経伝達物質を含む小胞のエクソサイトーシスが促進される。

AA: アラキドン酸 (arachidonic acid)

VGCC: 電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル (voltage-gated calcium channel)



## 参考文献

- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* **100**, 693-702.
- Akabas, M. H., Dodd, J., and Al-Awqati, Q. (1988) A bitter substance induces a rise in intracellular calcium in a subpopulation of rat taste cells. *Science* **242**, 1047-1050.
- Allen, N. J., and Attwell, D. (2002) Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. *J Physiol* **543**, 521-529.
- Asano-Miyoshi, M., Kusakabe, Y., Abe, K., and Emori, Y. (1998) Identification of taste-tissue-specific cDNA clones from a subtraction cDNA library of rat circumvallate and foliate papillae. *J Biochem (Tokyo)* **124**, 927-933.
- Beidler, L. M., and Smallman, R. L. (1965) Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol* **27**, 263-272.
- Bernhardt, S. J., Naim, M., Zehavi, U., and Lindemann, B. (1996) Changes in IP<sub>3</sub> and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J Physiol* **490** ( Pt 2), 325-336.
- Braissant, O., and Wahli, W. (1998) A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNA on tissue sections. *Biochemica* **1**, 10-16.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* **100**, 703-711.
- Cho, Y. K., Farbman, A. I., and Smith, D. V. (1998) The timing of alpha-gustducin expression during cell renewal in rat vallate taste buds. *Chem Senses* **23**, 735-742.
- Clapham, D. E. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524.
- Clapp, T. R., Yang, R., Stoick, C. L., Kinnamon, S. C., and Kinnamon, J. C. (2004) Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J Comp Neurol* **468**, 311-321.
- Conte, C., Ebeling, M., Marcuz, A., Nef, P., and Andres-Barquin, P. J. (2002)

- Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res* **98**, 45-53.
- Dulac, C., and Torello, A. T. (2003) Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **4**, 551-562.
- Farbman, A. I. (1965) Fine Structure of the Taste Bud. *J Ultrastruct Res* **12**, 328-350.
- Farbman, A. I. (1969) Fine structure of degenerating tast buds after denervation. *J Embryol Exp Morphol* **22**, 55-68.
- Farbman, A. I. (1980) Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet* **13**, 349-357.
- Frank, M. (1973) An analysis of hamster afferent taste nerve response functions. *J Gen Physiol* **61**, 588-618.
- Gilbertson, T. A., and Boughter, J. D., Jr. (2003) Taste transduction: appetizing times in gustation. *Neuroreport* **14**, 905-911.
- Gilbertson, T. A., Fontenot, D. T., Liu, L., Zhang, H., and Monroe, W. T. (1997) Fatty acid modulation of K<sup>+</sup> channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am J Physiol* **272**, C1203-C1210.
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* **96**, 541-551.
- Hosley, M. A., Hughes, S. E., and Oakley, B. (1987) Neural induction of taste buds. *J Comp Neurol* **260**, 224-232.
- Jelsema, C. L., and Axelrod, J. (1987) Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 3623-3627.
- Kahn-Kirby, A. H., Dantzer, J. L., Apicella, A. J., Schafer, W. R., Browse, J., Bargmann, C. I., and Watts, J. L. (2004) Specific polyunsaturated fatty acids drive TRPV-dependent sensory signaling in vivo. *Cell* **119**, 889-900.
- Kinnamon, J. C., Taylor, B. J., Delay, R. J., and Roper, S. D. (1985) Ultrastructure of mouse vallate taste buds. I. Taste cells and their associated synapses. *J Comp Neurol* **235**, 48-60.
- Kishi, M., Emori, Y., Tsukamoto, Y., and Abe, K. (2001) Primary culture of rat

- taste bud cells that retain molecular markers for taste buds and permit functional expression of foreign genes. *Neuroscience* **106**, 217-225.
- Kudo, I., Matsuzawa, A., Imai, K., Murakami, M., and Inoue, K. (1996) Function of type II phospholipase A2 in dopamine secretion by rat neuronal PC12 cells. *J Lipid Mediat Cell Signal* **14**, 25-31.
- Kudo, I., and Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 3-58.
- Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., Lewtschenko, T., Slack, J. P., Ward, C. D., and Meyerhof, W. (2004) Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci* **24**, 10260-10265.
- Kurihara, H., Nakano, T., Takasu, N., and Arita, H. (1991) Intracellular localization of group II phospholipase A2 in rat vascular smooth muscle cells and its possible relationship to eicosanoid formation. *Biochim Biophys Acta* **1082**, 285-292.
- Kusakabe, Y., Yamaguchi, E., Tanemura, K., Kameyama, K., Chiba, N., Arai, S., Emori, Y., and Abe, K. (1998) Identification of two alpha-subunit species of GTP-binding proteins, Galpha15 and Galphaq, expressed in rat taste buds. *Biochim Biophys Acta* **1403**, 265-272.
- Kusakabe, Y., Yasuoka, A., Asano-Miyoshi, M., Iwabuchi, K., Matsumoto, I., Arai, S., Emori, Y., and Abe, K. (2000) Comprehensive study on G protein alpha-subunits in taste bud cells, with special reference to the occurrence of Galpha12 as a major Galpha species. *Chem Senses* **25**, 525-531.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4692-4696.
- Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiol Rev* **76**, 718-766.
- Lindemann, B. (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* **413**, 219-225.
- MacPhee, M., Chepenik, K. P., Liddell, R. A., Nelson, K. K., Siracusa, L. D., and Buchberg, A. M. (1995) The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia. *Cell* **81**, 957-966.
- Matsunami, H., Montmayeur, J. P., and Buck, L. B. (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* **404**, 601-604.

- Matsuzawa, A., Murakami, M., Atsumi, G., Imai, K., Prados, P., Inoue, K., and Kudo, I. (1996) Release of secretory phospholipase A2 from rat neuronal cells and its possible function in the regulation of catecholamine secretion. *Biochem J* **318** ( Pt 2), 701-709.
- Meves, H. (1994) Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog Neurobiol* **43**, 175-186.
- Miyoshi, M. A., Abe, K., and Emori, Y. (2001) IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chem Senses* **26**, 259-265.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., and Axel, R. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-686.
- Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H., and Buck, L. B. (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci* **4**, 492-498.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E., and Warren, G. (1995) Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**, 1715-1726.
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* **416**, 199-202.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**, 381-390.
- Ogura, T., Margolskee, R. F., and Kinnamon, S. C. (2002) Taste receptor cell responses to the bitter stimulus denatonium involve Ca<sup>2+</sup> influx via store-operated channels. *J Neurophysiol* **87**, 3152-3155.
- Ohara, O., Tamaki, M., Nakamura, E., Tsuruta, Y., Fujii, Y., Shin, M., Teraoka, H., and Okamoto, M. (1986) Dog and rat pancreatic phospholipases A2: complete amino acid sequences deduced from complementary DNAs. *J Biochem (Tokyo)* **99**, 733-739.
- Park, K., Brown, P. D., Kim, Y. B., and Kim, J. S. (2003) Capsaicin modulates K<sup>+</sup> currents from dissociated rat taste receptor cells. *Brain Res* **962**, 135-143.
- Pepperkok, R., Scheel, J., Horstmann, H., Hauri, H. P., Griffiths, G., and Kreis,

- T. E. (1993) Beta-COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo. *Cell* **74**, 71-82.
- Perez, C. A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J. A., Preuss, A. K., Zhang, H., Max, M., and Margolskee, R. F. (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* **5**, 1169-1176.
- Pronin, A. N., Tang, H., Connor, J., and Keung, W. (2004) Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem Senses* **29**, 583-593.
- Pumplin, D. W., and Getschman, E. (2000) Synaptic proteins in rat taste bud cells: appearance in the Golgi apparatus and relationship to alpha-gustducin and the Lewis(b) and A antigens. *J Comp Neurol* **427**, 171-184.
- Richter, T. A., Dvoryanchikov, G. A., Chaudhari, N., and Roper, S. D. (2004a) Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J Neurophysiol* **92**, 1928-1936.
- Richter, T. A., Dvoryanchikov, G. A., Roper, S. D., and Chaudhari, N. (2004b) Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J Neurosci* **24**, 4088-4091.
- Ruiz-Avila, L., McLaughlin, S. K., Wildman, D., McKinnon, P. J., Robichon, A., Spickofsky, N., and Margolskee, R. F. (1995) Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature* **376**, 80-85.
- Schiffman, S. S., Suggs, M. S., Losee, M. L., Gatlin, L. A., Stagner, W. C., and Bell, R. M. (1995) Effect of lipid-derived second messengers on electrophysiological taste responses in the gerbil. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 49-58.
- Seebungkert, B., and Lynch, J. W. (2002) Effects of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels in rat olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci* **16**, 2085-2094.
- Spehr, M., Hatt, H., and Wetzal, C. H. (2002) Arachidonic acid plays a role in rat vomeronasal signal transduction. *J Neurosci* **22**, 8429-8437.
- Stevens, D. R., Seifert, R., Bufe, B., Muller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U. B., and Lindemann, B. (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* **413**,

631-635.

- Stone, L. M., Finger, T. E., Tam, P. P., and Tan, S. S. (1995) Taste receptor cells arise from local epithelium, not neurogenic ectoderm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1916-1920.
- Takeda, M., and Hoshino, T. (1975) Fine structure of taste buds in the rat. *Arch Histol Jpn* **37**, 395-413.
- Ugawa, S., Minami, Y., Guo, W., Saishin, Y., Takatsuji, K., Yamamoto, T., Tohyama, M., and Shimada, S. (1998) Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature* **395**, 555-556.
- Ugawa, S., Yamamoto, T., Ueda, T., Ishida, Y., Inagaki, A., Nishigaki, M., and Shimada, S. (2003) Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci* **23**, 3616-3622.
- van der Helm, H. A., Buijtenhuijs, P., and van den Bosch, H. (2001) Group IIA and group V secretory phospholipase A(2): quantitative analysis of expression and secretion and determination of the localization and routing in rat mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* **1530**, 86-96.
- Wei, S., Ong, W. Y., Thwin, M. M., Fong, C. W., Farooqui, A. A., Gopalakrishnakone, P., and Hong, W. (2003) Group IIA secretory phospholipase A2 stimulates exocytosis and neurotransmitter release in pheochromocytoma-12 cells and cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **121**, 891-898.
- Wong, G. T., Gannon, K. S., and Margolskee, R. F. (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* **381**, 796-800.
- Wu, X., Babnigg, G., Zagranichnaya, T., and Villereal, M. L. (2002) The role of endogenous human Trp4 in regulating carbachol-induced calcium oscillations in HEK-293 cells. *J Biol Chem* **277**, 13597-13608.
- Yamamoto, T., Nagai, T., Shimura, T., and Yasoshima, Y. (1998) Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol* **76**, 325-348.
- Yang, R., Crowley, H. H., Rock, M. E., and Kinnamon, J. C. (2000a) Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* **424**, 205-215.
- Yang, R., Stoick, C. L., and Kinnamon, J. C. (2004) Synaptobrevin-2-like

- immunoreactivity is associated with vesicles at synapses in rat circumvallate taste buds. *J Comp Neurol* **471**, 59-71.
- Yang, R., Tabata, S., Crowley, H. H., Margolskee, R. F., and Kinnamon, J. C. (2000b) Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J Comp Neurol* **425**, 139-151.
- Yee, C. L., Jones, K. R., and Finger, T. E. (2003) Brain-derived neurotrophic factor is present in adult mouse taste cells with synapses. *J Comp Neurol* **459**, 15-24.
- Yee, C. L., Yang, R., Bottger, B., Finger, T. E., and Kinnamon, J. C. (2001) "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol* **440**, 97-108.
- Zhang, C., Cotter, M., Lawton, A., Oakley, B., Wong, L., and Zeng, Q. (1995) Keratin 18 is associated with a subset of older taste cells in the rat. *Differentiation* **59**, 155-162.
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S., and Ryba, N. J. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**, 293-301.
- Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J., and Zuker, C. S. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**, 255-266.
- 伊藤 隆 (1989) 組織学 南山堂

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏 名 大池 秀明

指導教員名 阿部 啓子

論文題目 ホスホリパーゼ  $A_2$  の味細胞特異的発現とその機能の解析

脊椎動物の味覚受容組織である味蕾は 40-120 個程度の細胞によって構成されている。その細胞のいくつかが実際に味を感じる「味細胞」であり、味神経へと情報を伝達している。近年、苦味や甘味の受容体および、下流の細胞内情報伝達分子のいくつかが同定され、味細胞における味受容機構の解明が急速に進んでいる。しかしながら、受容した味物質の情報をどのように味神経に伝えるのかなど、味細胞内シグナリング経路の途中には不明な点も多く、全容が理解されるには至っていない。

細胞内の情報伝達系において脂質メディエーターは非常に重要な役割を果たす。嗅覚系化学感覚器官である嗅上皮や鋤鼻器の単離細胞において、アラキドン酸はイオンチャネルの活性制御や細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を引き起こす。また、単離味蕾細胞においても、シス不飽和脂肪酸が遅延整流性  $K^+$  チャネルの活性を阻害することが報告されている。さらに、アラキドン酸やその産生酵素であるホスホリパーゼ  $A_2$  ( $PLA_2$ ) 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、アラキドン酸等の不飽和脂肪酸が味覚シグナリングの制御に関与している可能性が示唆された。

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、その過程で  $PLA_2$  の IIA 型 ( $PLA_2$ -IIA) が味蕾内で強く特異的に発現していることを見出している。そこで、味蕾中に  $PLA_2$  を起点とし、アラキドン酸を中心とした脂質セカンドメッセンジャーシグナリング系が存在すると想定し、本研究を開始した。



## 1. 味蕾に発現する PLA<sub>2</sub> 分子種の特定

PLA<sub>2</sub> は哺乳類で 20 種類程度の分子種が報告されている。そこでまず、味蕾で発現している PLA<sub>2</sub> の分子種を特定するため、ラットで報告のある 13 分子種について、ラット有郭・葉状乳頭上皮由来 cDNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、IB 型を除く全ての分子種で cDNA 断片の増幅が確認された。続いて、より詳細な発現状況を、有郭乳頭切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析したところ、IIA 型のみが味蕾の一部の細胞に有意なシグナルを示した。また、味蕾におけるこのタンパク質の発現を、免疫染色によって確認した。

## 2. PLA<sub>2</sub>-IIA の味蕾における発現解析

PLA<sub>2</sub>-IIA の免疫染色シグナルは味蕾中の一部の細胞に斑点状で観察されるという特異性があることから、この分子を発現している細胞の特性や細胞内での局在を明らかにすることで、機能を解明する足がかりとなると考え、より詳細な免疫組織学的解析を実施した。

PLA<sub>2</sub>-IIA は分泌性のタンパク質であり、味蕾細胞内での斑点状の染色シグナルは、分泌経路の途上に位置するゴルジ体での局在を反映していると推測された。そこで、ゴルジ体マーカーである GM130 および  $\beta$ -COP と免疫二重染色を行ったところ、これらのシグナルとよく重なり、分泌経路上に多く存在していることが明らかとなった。

次に、PLA<sub>2</sub>-IIA を発現する細胞の特性について調べた。味蕾中には、実際に味を受容する味細胞のほかにも、支持細胞や前駆細胞など機能の異なるいくつかの細胞種が存在していることが知られている。さらに、味細胞も味種ごとに異なる受容細胞が存在することが明らかになりつつあり、少なくとも、甘・旨味受容細胞と、苦味受容細胞に分類することが可能である。まず、PLA<sub>2</sub>-IIA を発現す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ホスホリパーゼ C  $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2) と免疫二重染色を行った。この結果 PLA<sub>2</sub>-IIA は PLC $\beta$ 2 発現細胞 (味細胞) の一部の細胞集団に発現していることが明らかになった。続いて、この発現が味種依存的であるかを調べるため、味細胞の中でも苦味細胞特異的に発現している G タンパク質、gustducin との関係を調べた。両者の発現は一部の細胞では重なり合ったが、互いに独立した関係であった。以上の結果より PLA<sub>2</sub>-IIA は甘・旨・苦味という特定の味種には依存せずに、味細胞の一部に発現することが明らかになった。

味細胞で受容した味の情報は、味神経を介して中枢へと伝達されており、電子顕微鏡による観察から、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。しかしこれは、味細胞マーカーである PLC $\beta$ 2 の発現細胞と比べてかなり少ないことから、味細胞の一部のみしか味神経とシナプスを形成していないと考えられた。そこで、味神経の一部のみに発現する PLA<sub>2</sub>-IIA とシナプス形成細胞との関係を調べるため、味蕾中のシナプス形成細胞で特異的に発現している SNAP-25 との免疫二重染色を行った。その結果、PLA<sub>2</sub>-IIA と SNAP-25 のシグナルはよく一致した。以上の結果から、味細胞の一部のみがシナプスを形成しており、その細胞にのみ PLA<sub>2</sub>-IIA が発現していると判明した。

味蕾細胞は上皮から分化し、10 日前後で新しい細胞へと入れ替っていくことから、味蕾中には、分化してからの時間が異なる細胞が混在している。PLA<sub>2</sub>-IIA の発現およびシナプス形成細胞が味細胞の一部に限られているということは、これらが味細胞の分化段階に依存している可能性が考えられた。そこで、発現の開始時期を解析するため、まず、味蕾の初期形成過程である新生児ラットの有郭乳頭切片の免疫染色を行った。味蕾細胞に豊富な細胞骨格である cytokeratin 8 や、味細胞内のシグナル伝達分子である gustducin や IP<sub>3</sub>R3 は生後 2 日目より染色シグナルが検出されたのに対し、PLA<sub>2</sub>-IIA やシナプスマーカーである SNAP-25 は生後 6 日目あたりまでシグナルが確認できず、これらの分子はある程度成熟した味細胞でないと発現しないことが示唆された。続いて、成体ラット味蕾細胞においても発現開始時期を解析するため、BrdU 追跡実験を行った。その結果、味蕾細胞に PLA<sub>2</sub>-IIA が発現し始めたのは、gustducin の発現よりも 2 日ほど遅い、4 日目以降であり、より成熟化した味細胞に特異的であることが明らかとなった。

以上のことから、味細胞では gustducin などの味覚シグナリング分子が先行して発現し、2 日ほど成熟が進んだところでシナプスが形成され、PLA<sub>2</sub>-IIA や SNAP-25 が発現し、機能していると推察された (図)。

PLA<sub>2</sub>-IIA は、海馬神経細胞や PC12 細胞においてエキソサイトーシスを促進させることにより神経伝達物質の放出に関与していることが報告されている。味細胞における発現は、シナプスを形成している細胞に限られていることから、同様の機能を果たしている可能性もある。

### 3. アラキドン酸と味蕾細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化の解析

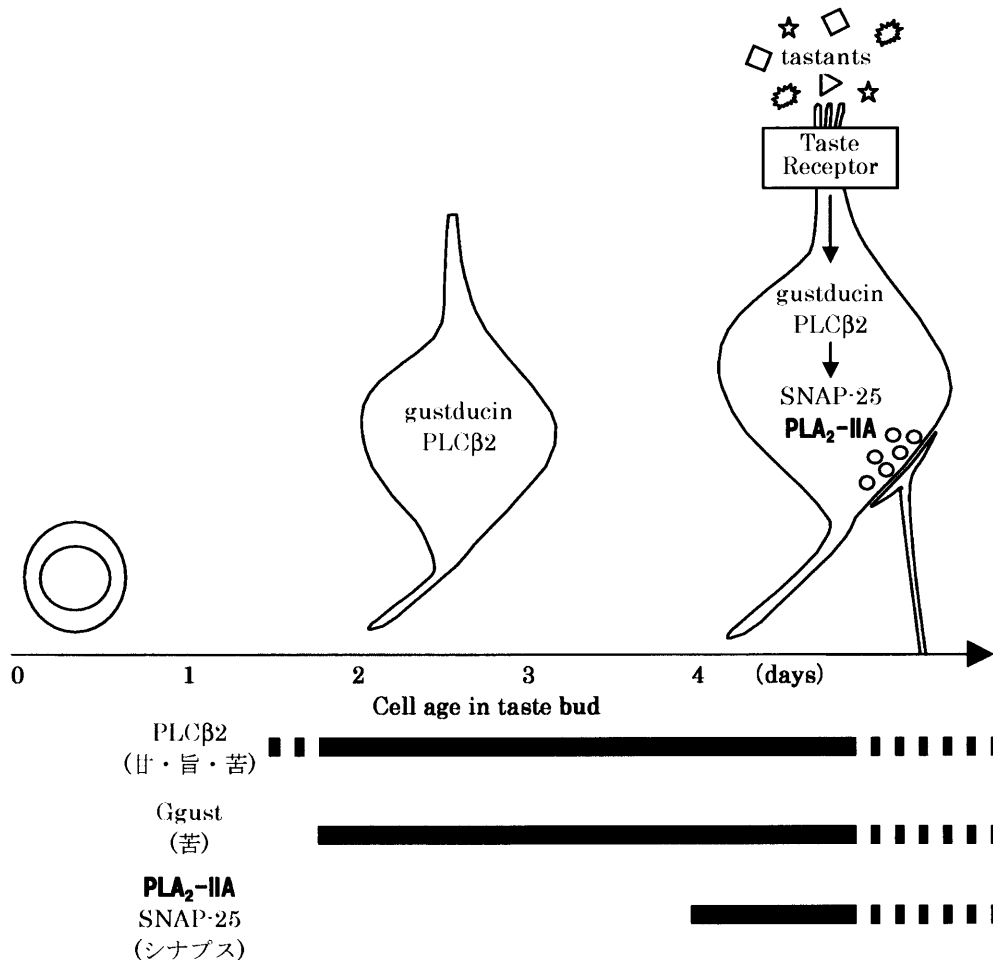
PLA<sub>2</sub> の代謝産物であるアラキドン酸は、鋤鼻神経細胞において細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすことや、味神経応答に影響を及ぼすことから、味細胞においても、アラキドン酸が細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすかは興味深い。また、味細胞内での Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は神経伝達物質を放出する重要な過程と考えられることから、単離味蕾細胞を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージングを行い、アラキドン酸が与える影響を解析した。

ラット有郭乳頭味蕾細胞を単離し、Ca<sup>2+</sup>指示薬である Fura-2 により、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度をイメージングした。その結果、100 μM のアラキドン酸刺激により、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を起こす細胞が多く存在した。イメージング後の細胞を固定し、免疫染色を行ったところ、PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性細胞もこれに含まれていた。次に、細胞内で産生されるアラキドン酸によっても Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が引き起こされるかを調べるため、アラキドン酸代謝酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX) を NDGA で阻害したところ、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇した。これは、LOX を阻害したことにより細胞内にアラキドン酸が蓄積し、それにより Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇したと解釈できる。アラキドン酸は様々なイオンチャネルの活性を制御することから、味蕾細胞においても、Ca<sup>2+</sup>透過性のチャネルや、脱分極を引き起こすチャネルの活性に影響を与えた結果、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が引き起こされたものと考えられる。以上の結果から、PLA<sub>2</sub>-IIA がア

アラキドン酸の産生を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させる可能性が示唆された。今後は、味物質による味細胞のカルシウム応答が  $\text{PLA}_2$ -IIA 阻害剤やアラキドン酸によって制御されるか否かを検討したい。

本研究は、味蕾中に  $\text{PLA}_2$  を起点とした脂質セカンドメッセンジャーシグナリング経路を想定し、免疫組織学的解析により、 $\text{PLA}_2$ -IIA がシナプスを形成している成熟した味細胞で特異的に発現することを見出した。この過程で、味細胞では味シグナリング分子が先行して発現し、成熟が進んでからシナプスを形成するという新たな知見も得た。 $\text{PLA}_2$ -IIA の機能については、この酵素の産生物質であるアラキドン酸によって、味細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することを示し、味細胞カルシウムシグナリングに関わる可能性を提示した。

今後、味蕾内での  $\text{PLA}_2$ -IIA の活性化因子やアラキドン酸の作用機構を明らかにし、実際に味シグナリングや、他の現象にどのように関わっているのかを評価する必要がある。具体的には、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより、阻害剤の影響を解析することや、培養細胞系を用いて  $\text{PLA}_2$ -IIA の活性化因子やアラキドン酸の標的分子を明らかにし、さらには味蕾特異的に  $\text{PLA}_2$ -IIA 遺伝子を制御した動物を作出し、解析することが有効であると考えられる。本研究で得られた知見が、未だ明かされていない味シグナリングの、全容解明の基礎になると期待している。



## 謝辞

第一に、東京大学大学院農学生命科学研究科 阿部啓子教授に感謝の意を表します。  
ここに記述するまでもなく、本研究および研究室生活に関する全ての面において大変お世話になりました。今後の研究により、御礼させていただきます。

第二に、東京大学大学院農学生命科学研究科 松本一朗助教授に御礼申し上げます。  
適切な指導および助言に支えられました。

そして、東京都臨床医学総合研究所 反町洋之室長、(株)ミツカン 岸幹也博士ならびに研究室の諸先輩方には、これまで数多くのご指導を賜りましたこと、感謝申し上げます。教務補佐員の近藤香さんには、技術的な助力をいただきましたこと、感謝申し上げます。

本論文中には掲載できませんでしたが、多くの先生方に実験のご協力をいただきましたこと、御礼述べさせていただきます。東京大学大学院農学生命科学研究科 西澤直子教授、長坂征治博士には、電子顕微鏡の試料作製および観察をお願いいたしました。名古屋市立大学大学院医学研究科 島田昌一教授、植田高史博士ならびに、京都大学大学院農学研究科 森友彦教授、林由佳子講師、成川真隆さんには、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング実験を教えていただきました。京都大学大学院工学研究科 森泰生教授、若森実助教授、そして日本女子大学 山田妙子元教授には、電気生理実験をお願いいたしました。ありがとうございました。

また、生物機能開発化学研究室 永井俊匡君を始めとする後輩の皆様には、研究室生活の様々な部分を支えていただきました。ありがとう。

最後に、生活を支え、学業に専念することを可能にしてくれた両親、家族に感謝を伝えます。

2005 年 新春 大池 秀明

*Osiko Hideaki*