

哺乳類における味覚シグナリングの
分子機構に関する研究

目下部 裕子

博士論文

哺乳類における味覚シグナリングの
分子機構に関する研究

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
日下部裕子

指導教官

東京大学大学院教授 阿部 啓子

目次

発表論文	1
略語	2
序論	3
用語の定義	16
第一章 舌上皮味覚受容組織に発現するGタンパク質共役型レセプター	
第1節 RT-PCRによる舌上皮に発現するレセプター遺伝子ファミリーの クローニング	
1. 緒言	18
2. 実験材料および試薬	19
3. 実験方法	21
4. 結果	25
5. 考察	27
第2節 舌上皮に発現するG蛋白質共役型レセプター cDNA GUST27の クローニング	
1. 緒言	34
2. 実験材料および試薬	34
3. 実験方法	35
4. 結果	36
5. 考察	38
第3節 <i>In situ</i> ハイブリダイゼーションと抗体染色によるGUST27の発現の解析	
1. 緒言	48
2. 実験材料および試薬	48
3. 実験方法	50
4. 結果	53
5. 考察	54
第二章 舌上皮味覚受容組織に発現するGタンパク質 α サブユニット	
1. 緒言	63
2. 実験材料および試薬	65
3. 実験方法	68
4. 結果	76
5. 考察	102
第三章 味蕾に発現する電位依存性カルシウムチャンネル	
1. 緒言	109
2. 実験材料および試薬	110

3. 実験方法	112
4. 結果	113
5. 考察	119
総合討論	127
参考文献	133
要旨	
謝辞	

発表論文

Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S. (1993)

FEBS Lett. 316, 253-256

Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S. (1993)

J. Biol. Chem. 268, 12033-12039

Kusakabe, Y., Abe, K., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S. (1996) *Chem. Senses*

21, 335-340

略語

BSA	ウシ血清アルブミン
cAMP	サイクリックアデノシン3', 5'-リン酸
DAB	3, 3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩
DEPC	ジエチルピロカルボン酸
ELISA	固相酵素免疫検定法
FCS	子牛血清
HRP	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
IP ₃	イノシトール三リン酸
IPTG	イソプロピルチオガラクトシド
NMDA	N-メチル-D-アスパラギン酸
PLC-β	ホスホリパーゼC-β
RT-PCR	逆転写PCR

序 論

（The following text is extremely faint and largely illegible. It appears to be the beginning of an introduction or preface, discussing the scope and purpose of the work. It likely contains information about the author's intent, the structure of the book, and the intended audience. Due to the low contrast and blurriness, the specific words and sentences cannot be accurately transcribed.)

動物が生き長らえるためには体の成長、発育、維持そして活動のために必要なタンパク質、栄養源、エネルギー源となりうる物質を外界から摂取する必要がある。多くの動物にとって生体に必要なこれらの物質が不足すると空腹感が生じ、食物を求める行動が生じる。しかし、食物の存在する自然界には必ずしも生体にとって役に立つ物質ばかりでなく、中には取り込むことにより害になる物質も多く存在する。そこで食物を口から取り入れる際に食すべきものかどうかを感覚を用いて判断する必要が生じる。この判断には色、匂いなど視覚、嗅覚の感覚からのシグナルも総合して行われるが、外界の物質を体内に取り込むための窓口である口腔器官中の感覚である味覚は口腔に取り込まれた物質が摂取すべきかどうかの選択に本質的な役割を演じている。口腔に取り込まれた物質が食すべきものであれば、「おいしい」というシグナルが生じ、食欲が増進し消化が促進される。逆に摂取すべきでないもの場合は「まずい」というシグナルが生じ食欲が減退するばかりでなく時には吐き出すという行為にいたる。この一連の行為は意識的に行われるものではなく、味覚は運動系・自律系の中核と緊密な連絡を持ち、常に両者が一体となって機能することによりホメオスタシス（体内恒常性）を維持する生理機能の一環として重要な役割を演じている事を示している。

味覚の研究は長年の間、多方面から行われてきた。物質側からは、新たな甘味物質の検索や苦味物質をマスクする物質の研究等がなされ、新たな食品の開発に貢献してきた。生体側の研究としては味覚受容器である味蕾を対象とした形態学、生理学、生化学的研究を始め、味蕾から味受容のシグナルを受け取る味神経の生理学的研究、さらに大脳への味覚中核伝導路の研究、味覚刺激による大脳での電気活動の計測など多岐の分野にわたる研究が行われてきた。しかしながらそれぞれの分野における研究は他の分野と繋がるような成果が得られていないのが現状である。また、分子生物学的研究は本研究開始時にはほとんど行われていなかった。

本研究は味蕾を用いて味覚の受容から味神経への伝達までのシグナルリングの分子生物学的解析を目的としている。よって序論では、多岐の分野に渡る味覚の研究のうち、味覚を構成する味の種類とその生物学的意義、味覚受容器の形態学的特徴、味蕾から脳までの神経経路の概略、長年行われてきた生理学・生化学的研究により予想されている味覚シグナリング経路等の知見に限定して概説し、最後に本研究の目的を記す。

1. 味覚を構成する基本味とその生物学的意義

味覚は食物そのものを受容器官に触れさせる純近覚性の化学感覚である。味受容器への刺激は、水溶状態にある化学物質の分子やイオンの接触であって、味物質は食物中の水分や唾液に溶解し、受容される。味の種類に関しては、味物質の呈する

全ての味は甘・苦・塩・酸味といったそれぞれ他の味から独立している4つの味の適当な組み合わせによって作ることができるという味の四面体説がとられ、これら4つの味は基本味という名称で呼ばれてきた。これは色の三原色と類似の考え方であるが実験的な根拠はない。また近年、旨味も従来の4基本味には含まれない味である事が認められ5つめの基本味とされている。また、これら5つの基本味は全て味蕾とそれに続く神経を経た感覚である。辛味・渋味・えぐみ・素材のテクスチャーなども味と密接に関与するが、これらの味はシグナル伝達を行う味蕾を介しての感覚ではなく、舌表面にある神経末端への刺激による感覚と考えられ、生理学・生化学ではほとんど研究の対象とされていない。

基本味を示す物質のうち、甘味物質としては主に蔗糖等の糖類が挙げられるが、アスパルテームのようにペプチドで強烈な甘味を持つ物質をはじめ、アミノ酸、タンパク質、化学合成物質等様々な物質が甘味を呈する。苦味物質はカフェインなどの植物性アルカロイド、テルペン類や疎水性の物質（アミノ酸、ペプチド）が多い。塩味は塩化ナトリウムなどの無機塩類の金属イオンの味（無機塩類の金属イオンでもカリウムイオンは塩味とともに苦味も持つ）、酸味は水素イオンによって生じる味である。旨味はグルタミン酸、イノシン酸、グアニル酸の塩類等によって引き起こされる独特の味である。糖やアミノ酸のように栄養物の存在を示す物質は、一般に甘味あるいは旨味といった快い味を呈する。低濃度の塩は生物にとって不可欠であり、塩の存在は食物に“たべやすさ”(acceptability)を付加する。酸は、自然界では腐敗した食物や未熟の果実に含まれており、忌避物質は疎水性の物質が多い。これらの物質は、酸味、苦味といった不快な味を呈し、摂取しにくくしている。また塩も高濃度になると不快な味になり摂取する量をコントロールしやすくしている。味覚は物質の種類・濃度・温度・摂取量・接触部位などにより様々な強さの感覚となるだけでなく摂取する生体の状態によっても感じ方は異なるが、基本的には栄養物を嗜好し(preference-aversion)、有害物質を忌避することにより我々の身体を維持するために役立っている。

2. 味物質を受容する器官、味蕾

口腔内に取り込まれた物質による刺激を受け取る構造物は味蕾という器官である。哺乳動物の舌の表面には、糸状乳頭、茸状乳頭、有郭乳頭、葉状乳頭の4種の乳頭が存在する(図1)。味蕾は、糸状乳頭以外の乳頭に含まれている。有郭乳頭は舌の奥部に存在しラットでは1つ、ヒトでは8から12個存在する。ラットの場合、有郭乳頭は直径1~1.5mmで周囲を深い乳頭溝によって取り囲まれ、味蕾は乳頭溝側壁上皮内に密集して約450個存在するといわれる(表1)。葉状乳頭は舌の縁の部位に襞状に存在する。葉状乳頭においても味蕾は乳頭溝の側壁上皮内に多数出現して

いる。茸状乳頭は舌の先端を中心に点在しており、1つの乳頭にラットでは1つ、ヒトでも2〜3個しか味蕾を含んでおらず、乳頭背部の重層扁平上皮に存在する。また、味蕾は舌上皮中のみならず口腔内粘膜にもわずかに分布しており、味蕾の総数はラットが約1000個、ウシは約20000個、ヒト（成人）は約4〜5000個にのぼる。年齢により味蕾の分布の位置、総数は変化し、数的にヒトでは20才頃に最も多くの味蕾を持つとされている。

味蕾は重層扁平上皮の中にあるほぼ球形の構造（図2）である。長径約70〜75 μm 、短径約40 μm で、長軸は上皮の表面に対してほぼ垂直にあり、粘膜表面には味孔と呼ばれる小孔があり味物質が味蕾と接触できる場所である。味蕾は上皮細胞由来の細胞集合体であることがStoneらのモザイクマウスを用いた実験により示されている。しかし、味蕾内の半数近くの細胞に神経特異的のエノラーゼの発現が見られるなど神経性の分子も有している（Yoshie *et al.*, 1988）。これは、形態的にも類似性のある他の感覚細胞や分泌型の細胞（例、膵臓の傍小胞細胞）と同様の特徴である。ちなみに、同じ化学感覚の嗅覚受容を司る嗅細胞はそれ自身が神経であり、同じ感覚器官の細胞であってもその由来、性質は異なっている。

味蕾は主として紡錘形の細胞が40個〜70個タマネギのように集合している器官である。紡錘形の細胞の下端は基底膜に接し、そこから細胞は上皮表層に向かって伸長し、味孔を介して直接口腔環境と接する。味孔部にあたる細胞の上端には味毛と呼ばれる微絨毛が存在し、味物質と接触できる部位であることから味毛に味覚レセプターが存在すると考えられている。

味蕾を構成する細胞は、形態学的特徴から4種類（I〜IV型）に分けられる。基底細胞（IV型）以外は、ほぼ味蕾の長径にわたる長さを持つ紡錘形の細胞で、電子密度の濃度、細胞質内の構造からI、II、III型に分類される。このうちIII型の細胞が味を受容して、味神経にそのシグナルを伝達する味細胞であるとされている。理由として、多くの動物のIII型細胞が他のI、II、VI型とは異なり、神経繊維とシナプスを形成していることと、シナプス部位にシグナル伝達物質を含むと思われるシナプス小胞が観察されること（Yoshie *et al.*, 1990, Royer and Kinnamon, 1991）が挙げられる。しかし、マウスにおいてはI、II型にもシナプスが存在するという報告（Delay *et al.*, 1986, Kinnamon *et al.*, 1988）もあり、III型のみが味覚を受容する細胞であるかどうかは明らかではない。また、I、II、III、型を光学顕微鏡レベル以下で見分けることは不可能なので、光学顕微鏡を用いて行う生理学的研究の結果と形態学的特徴を結びつけることが出来ない。

シナプス小胞の存在がIII型を味細胞と特定することの決め手の1つとなっているが、小胞の中に存在しているであろう神経伝達物質の特定は行われていない。現在

のところ、アセチルコリン、カテコールアミン、セロトニン、アミノ酸などがその候補として挙げられている。

3. 味蕾から脳までの神経経路および神経の味蕾に対する役割

1個の味蕾は平均5本の神経線維の支配を受けており、1個の味神経線維は複数個の乳頭内に入り込み広範囲で多様な味を感じることが可能となっている(Beidler, 1969)。味覚シグナルは、いくつかの神経系により大脳に伝えられる(図3)。哺乳動物では葉状乳頭前半部、茸状乳頭に存在する味蕾は鼓索神経に(Millar *et al.*, 1974, Farbman *et al.*, 1978)、有郭乳頭、葉状乳頭の後方部の味蕾は舌咽神経(Fay 1927, Reichert 1934)に、咽頭、喉頭部の味蕾は上咽頭神経に、口蓋の味蕾は大錘体神経に接続している。これらの味覚神経は延髄の孤束核に入って第二次ニューロンに切り替わり、視床に入り第三次ニューロンとなり、最終的に大脳皮質の味覚野に伝えられ、味が知覚される(Schwartz and Weddell, 1938)。

味蕾と接続しているこれらの味神経を切ると味蕾は退化し、最後には消失してしまう(Hosley *et al.*, 1987)ことが知られている。しかし、味蕾の発生には神経が必要でないことも示されている(Barlow *et al.*, 1996, Barlow and Northcutt, 1997)。味蕾は周囲の上皮細胞より短い10日間の周期で新しく入れ替わることが知られていることから、味神経は味蕾のターンオーバーに寄与していると思われる。しかしながら、どのような物質が味神経から味蕾に放出されているかは明らかではない。

4. 味物質の受容機構

図4にその模式図を示す。

[1] 塩味

NaClのNa⁺がナトリウムチャンネルを通過することによって味細胞を脱分極し伝達される(Heck *et al.*, 1984)。このナトリウムチャンネルの開口はアミロライドで阻害されることが明らかになっており(Heck *et al.*, 1984)、ヒトによる官能検査によってもアミロライドで塩味を感じなくなることが確認されている(Schiffman *et al.*, 1983)。分子生物学的研究も最近なされ、舌上皮のcDNAライブラリーから腎臓に存在するアミロライド阻害型ナトリウムチャンネル(Lingueglia *et al.*, 1993)の一部がクローニングされた(Li *et al.*, 1994)。このチャンネルは*in situ* ハイブリダイゼーションおよび抗体染色(Tousson *et al.*, 1989, Simon *et al.*, 1993)により味蕾を中心に舌上皮に発現することが観察されており、塩味に関与すると思われる。

[2] 酸味

味細胞にクエン酸を与えると、Na-チャンネル、K-チャンネル、Ca-チャンネルが閉じる(Kinnamon *et al.*, 1988)ことが明らかになっている。これは水素イオンがチャン

ネルをブロックすることによるものではないかという知見はあるが、証明はされていない。また、鼓索神経繊維の応答、味細胞の水素イオンに対して発生する電流を調べた結果、アミロライドにより阻害される電流も存在している(Gilbertson *et al.*, 1993)ことが知られているが、いずれも生理学的知見に留まっている。

[3] 甘味

甘味に関しては、以下のことが明らかになっている。外崎ら(1988)は、マウスの味細胞にcAMPを注入すると、外向きのK-チャンネルが閉じて脱分極が起こることを見いだした。同様にAvenet(1988)らはカエルの味細胞にパッチクランプ法を適用し、cAMPを与えると、K-チャンネルが閉じることを観察した。このcAMPによる脱分極はcAMP依存性のプロテインキナーゼの阻害剤により抑制されることから、K-チャンネルの不活性化には蛋白質のリン酸化が関与していることが示唆された。また、Striem(1989)らはラットの舌上皮に各種の糖を与えるとcAMPが増加すると報告した。cAMPの上昇は、G蛋白質共役型レセプターに共役するGsタイプのG蛋白質の活性化に伴うアデニル酸シクラーゼの活性化によるものである。すなわち、糖(甘味)はG蛋白質共役型レセプターにより受容されGsタイプのG蛋白質を活性化し、それによりアデニル酸シクラーゼが活性化されcAMPが増加し、K-チャンネルが閉じて脱分極が起こることにより刺激として伝わるというモデルが提唱された。しかしながら、糖の中でも甘味の強いフルクトースや非常に強い甘味を持つペプチドであるアスパルテームを与えても、細胞内のcAMPは増加しないことから、甘味のシグナル伝達経路はこの系のみではないことがこの時点で予想された。

1996年にBernhardtらは人工甘味料guanidinium化合物のSC-45647が味蕾を構成する一部の細胞の細胞内のIP₃(Inositol 1,4,5-triphosphate)およびカルシウム濃度を上昇させることを明らかにした。すなわち、細胞内のIP₃濃度が上昇し、カルシウムストアーの表面に存在するIP₃レセプターを刺激した結果である。また、味細胞内にはIP₃レセプターの存在が確認されている(Hwang *et al.*, 1990)。IP₃濃度の上昇は、G蛋白質共役型レセプターに共役するGqタイプのGタンパク質 α サブユニット(Gaqファミリー)、あるいはGiタイプのGタンパク質 $\beta\gamma$ サブユニットによるホスホリパーゼC β (PLC β)の活性化によるものである。Bernhardtらはまた、サッカリンも細胞内のIP₃濃度を上昇させることを明らかにしている。よってSC-45647、サッカリンといった合成甘味料がGaqファミリー、あるいはGiタイプのGタンパク質 $\beta\gamma$ サブユニットの関与する系を介して伝達されることが予想される。また、味蕾特異的なGタンパク質 α サブユニットgustducin(Gagust、後述する)が蔗糖、および人工甘味料SC-45647のシグナリングに関与することがそのノックアウトマウスから示唆されている。

[4] 苦味

苦味の最も強い物質の1つであるデナトニウムを味細胞に与えると、味細胞中のカルシウムストアからカルシウムが放出され、細胞中のカルシウム濃度が上がることがAkabasら(1988)によって観察されている。また、多数の苦味物質が細胞内のIP₃濃度を上昇させることが明らかになっている(Spielman *et al.*, 1996)。よって、これらの苦味物質もGαqファミリー、あるいはGiタイプのGタンパク質βγサブユニットが関与する系を介して伝達されることが予想される。また、苦味物質を味細胞に添加すると細胞中のホスホジエステラーゼ(PDE)を活性化することも示唆されており(Price, 1973)、GiタイプのGタンパク質αサブユニット(Gαiファミリー)の関与が考えられる。

Gαiファミリーに属し、味蕾特異的なGタンパク質αサブユニットであるGαgustはMcLaughlinらにより1992年にラット舌上皮からクローニングされた。生化学的研究ではGαiファミリーは苦味に関与することのみが示唆されていたので、Gαgustは当初は苦味にのみ関与すると思われた。その後、ノックアウトマウスを用いて基本味に対する感受性を調べた結果、Gαgustは甘味・苦味の両方の情報伝達系に関与していることが示され(Wong *et al.*, 1996)Gαgustのこれらの味覚における役割の解明が待たれる。また、Gαgustと相同性が高く、眼の桿体に特異的なGαタンパク質transducin (Gαt-rod)が味蕾に発現していることが*in situ*ハイブリダイゼーションと抗体染色によって明らかになった(McLaughlin *et al.*, 1994, Ruiz-Avila *et al.*, 1995)。Gαt-rodは苦味物質のデナトニウムによって味蕾上皮中の受容体を介して活性化されること、ならびにその上皮から単離されたPDEを活性化して細胞内の環状型ヌクレオチドの濃度を減少させる方向に働くことが示され(Ruiz-Avila *et al.*, 1995)、苦味に関与する可能性が示されている。

また、味細胞にキニーネを添加すると、電位依存性イオンチャンネルがブロックされ開かなくなることから(Kinnamon *et al.*, 1988)、レセプターやGタンパク質が関与せず直接イオンチャンネルに作用する系が存在することも考えられている。

[5]旨味

ナマズではアミノ酸により活性化されるチャンネルによって旨味が受容されることが示唆されている(Brand *et al.*, 1991, Teeter *et al.*, 1990)。また、セカンドメッセンジャー、cAMP、IP₃を介したシグナル伝達系の存在も示されている(Brand *et al.*, 1991)。哺乳類では、ナマズに見られるようなセカンドメッセンジャー系の存在は示されていないが、脳に存在するようなグルタミンレセプターの関与が予想されている。1996年にChaudhariらは脳に発現している代謝型グルタミン酸レセプターmGluR4が味蕾に存在していることを*in situ*ハイブリダイゼーションにより明らかにした。加えて、ラットに旨味物質のグルタミン酸ナトリウムに対する嫌悪条件付けを行い、種々のグルタミン酸アゴニストに対する行動を調べ、グルタミン酸ナトリウムのレセプタ

ーは代謝型グルタミン酸レセプターであることを示唆したが、依然としてmGluR4が旨味のレセプターであるのか伝達物質としてのグルタミン酸のレセプターであるのかは明かではない。また、哺乳類では生理学・生化学的手法を用いた報告は無く、このことも旨味のシグナリングの研究が進まない要因となっている。

5. 味覚の研究の現在の状況

味覚の研究は長年にわたって多方面から行われてきたが、各々の分野で大きな問題点を抱えたまま現在に至っている。各項目で端々にふれてきたが本項でまとめて記述する。

[1] 基本味について

基本味は、他の味から独立していることと、その味に対して選択的な神経細胞が存在することが条件となっている。しかしながらこの定義は曖昧なものであり暗黙の了解によって成り立って現在に至っている。

[2] 形態学での味蕾細胞の分類について

味蕾細胞の分類には2つの説がある。1つはI~III型細胞が幹細胞と考えられている基底細胞から別個に分化してそれぞれが他型に移行しない独立した細胞型であるという考え方で(Murray *et al.*, 1969)、現在一般的に引用されている。しかし、マウスではI、II型にシナプスが観察されるため、シナプスとシナプス小胞が存在することを指標にしてIII型細胞のみが味細胞であるとする定義には疑問が持たれる。もう一つは味蕾細胞は基本的にI型細胞であり各細胞の差異はそれぞれの細胞の成熟過程を反映したものであるという一元説である(Kinnamon *et al.*, 1985)。どちらの説も生理学的研究とまったく結びつかないため現在のところ決着はついていない。

[3] 生理学的・生化学的研究

生理学的研究の問題点は何かある。1点目は用いる細胞が味を受容する細胞かどうか明かでないことであり、たまたまある味覚物質に反応した細胞を味細胞として用いている点である。光学顕微鏡ではシナプスを介したシグナリングを行える細胞(味細胞)を判別できないことがその原因として挙げられる。2点目は実験が生体そのものでなくコラゲナーゼで分離した細胞を用いて行われる点である。3点目はリガンドを、味を受け取る味孔にのみ添加するのが困難であるだけでなく、リガンドが多種類でしかも濃度が生体内に存在し得ない濃度(例えば蔗糖は0.5Mで反応する)を用いなければならない点にある。

[4] 分子生物学的研究

以前行われていたタンパク質を実験材料として用いた研究による成果は今までほとんど得られていなかった。その理由として味蕾の舌上皮に占める割合が非常に少ないこと、味蕾の培養細胞株は樹立されていないことから実験材料として十分なタン

パク質の量を入手するのが困難な組織であることが挙げられる。遺伝子を用いた方法でも味蕾を多く含む舌上皮からのmRNAを1 μ g得るには100匹のラットが必要であり材料入手の問題は解決されておらず本研究当初はG α ust以外の分子は明らかにされていなかった。

筆者はこの様な状況の下で研究を開始した。

6. 本研究の目的

味覚の研究は、視覚・嗅覚と比較すると遅れをとっている。特に、未だに味細胞が味蕾を構成する細胞の中のどの細胞なのか、各基本味に対してどの細胞が受容を行うのが明かでないことは、味覚物質側からの研究や形態学、生理学・生化学の研究のそれぞれの成果を結びつけることが出来ないことの最大の要因である。味覚シグナリングを担う分子の実体を明らかにしてその存在部位を解析することによって味蕾を構成する細胞個々の生理学・生化学的特徴を予想することは、形態学と生理学・生化学の架け橋となるため非常に重要なことである。本研究開始時点では、味蕾に存在する分子はG α ust以外は明らかになっておらず、分子生物学的研究はほとんど手つかずの状況であった。そこで、ラットの味蕾に存在する味覚シグナリングを担う分子を研究の対象として選び、その種類の特定と構造、機能、発現部位等の解析を分子生物学的手法を用いて行うことにした。味細胞の果たす主な役割は味物質の受容と味神経へのシグナル伝達であるので、目的とする分子は味蕾を介した味覚のシグナル伝達系の引き金となりうる味覚レセプター、その下流に存在するGタンパク質、味神経へのシグナル伝達物質の放出に関与する可能性の高い電位依存性カルシウムチャンネル(Caチャンネル)を選択した。研究対象の動物は、ヒトに近い味覚を持つであろうことと扱いやすく入手しやすい動物であることを考慮して哺乳類のラットを選択した。

具体的には、まず、味蕾に発現し味覚レセプターの候補となりうるGタンパク質共役型レセプターのクローニングを行い、味覚シグナリングの初発を担う可能性のある分子を明らかにした。次に、舌上皮から得たGタンパク質共役型レセプターの下流に存在するGタンパク質を対象として味蕾に存在するGタンパク質 α サブユニットの種類を検索した。最後に、味神経へのシグナル伝達物質の放出に関与することが考えられ、味細胞において、味物質の受容機構の解析と同様に重要であると考えられるCaチャンネルの解析を行った。

Gタンパク質はその種類によりエフェクターおよびセカンドメッセンジャーを推定することができ、その存在が認められる細胞の生理作用を予想できるため、味覚シ

グナリングを行っている細胞を特定しうる。また、Caチャンネルは味覚のシグナル伝達物質の放出に関与していると考えられ、Caチャンネルの発現している細胞はシナプスを有する味細胞である可能性を示唆する。つまり、Gタンパク質、Caチャンネルはともに味蕾細胞から味細胞を区別する際のマーカーになりうると考えられる。そこで、Gタンパク質とCaチャンネルに関しては、味蕾に発現している種類を特定するのみならず、細胞レベルでの分布を調べ、味蕾を構成する細胞を類型化することも目的とした。

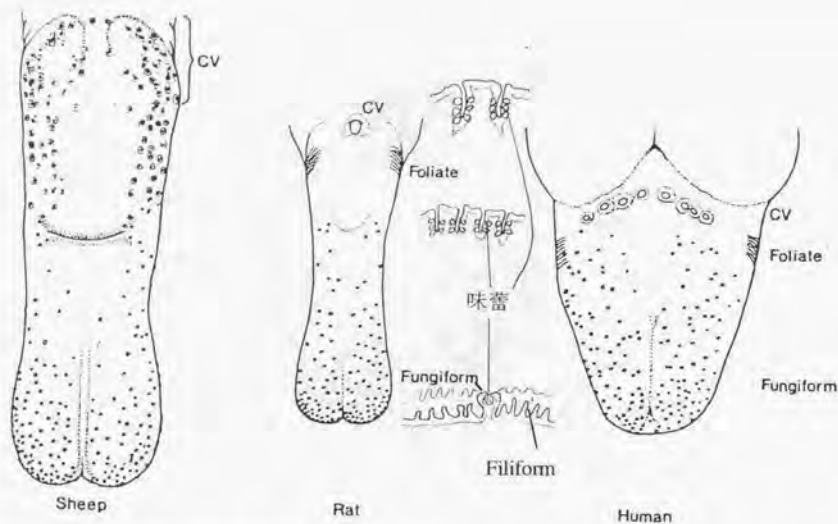
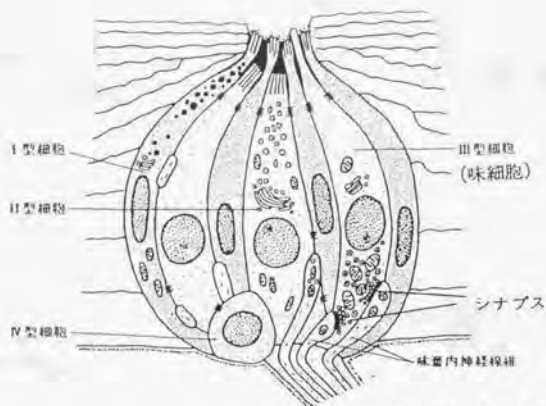


図1 舌の全体図と味蕾を含む乳頭が存在位置

CV：有郭乳頭、Foliate：葉状乳頭、Fungiform：茸状乳頭、Filiform：糸状乳頭

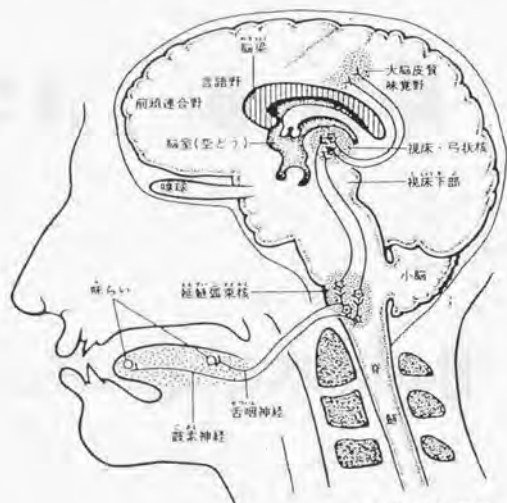
種	茸状乳頭		有郭乳頭		葉状乳頭		味蕾の 総数
	数	%	数	%	数	%	
ラット	185	17	467	42	460	41	1112
ウシ	1707	9	16519	91	乳頭なし	—	18226
サル	1296	16	2896	35	4294	50	8485
ヒト	750	18	2400	48	1300	34	4450

表1 乳頭による味蕾の数の割合 (Mistretta et. al. (1989))



組織学 (南山堂) より引用

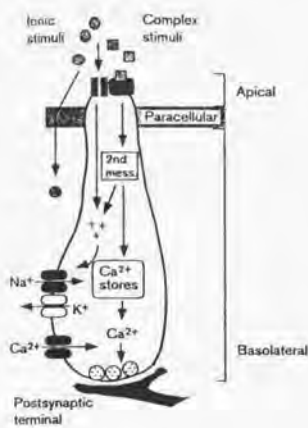
図2 味蕾の細胞構成。III型が味細胞でありシナプスを形成している。



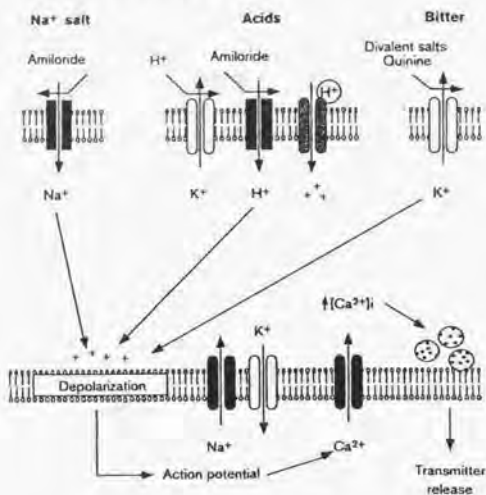
感覚の生理学 (裳華房) より引用

図3 舌から脳までの味情報の流れ

味覚伝達の概要

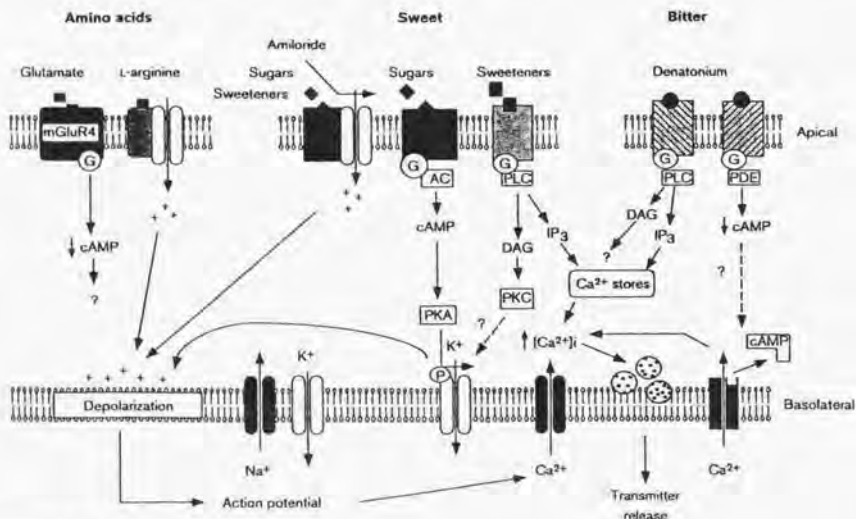


イオンチャンネルを介した系



© 1998 Current Opinion in Neurobiology

レセプターを介した系



© 1998 Current Opinion in Neurobiology

図4 生理学より予想される味覚の情報伝達系
(Kinnamon S. C. and Margolskee R. F. (1996))

本論文中で使用する用語の定義

味蕾細胞・・・味蕾を構成するI~IV型の細胞の内、光学顕微鏡では互いの区別がつかない紡錘形の細胞I、II、III型細胞を味蕾細胞と記載する。

味細胞・・・ある味物質を受容し味神経へシグナル伝達物質を放出する細胞。未だに実体が明らかになっていないため、味蕾細胞の中に味細胞が含まれていることを前提に研究を行うことにする。

第一章

舌上皮味覚受容組織に発現する Gタンパク質共役型レセプター

味覚シグナリングに関与する分子を解析するにあたり、まず味物質の受容体をその対象として選んだ。理由として、味覚シグナリングの初発を担う重要な分子であり、長年にわたりその存在が示唆されながらクローニングされていないことが挙げられる。

味覚と同じ五感の中の視覚と嗅覚については、G蛋白質共役型レセプターを介した情報伝達経路が存在することが、生理学的にも分子生物学的にも明らかになっている。また、味覚のシグナリングにも、序論で述べたように甘味・苦味はG蛋白質共役型レセプターを介して伝達されることが生理学的・生化学的に示唆されている。そこで、味蕾に存在するG蛋白質共役型レセプターに焦点をあて、そのクローニングを試みた。

本章では、まず、嗅覚のレセプターを参考に作成したプライマーと、ラットの舌上皮から得たmRNAを用いてRT-PCRを行い、舌上皮に発現し味覚に関与する可能性のあるG蛋白質共役型レセプターの一部分を得た後、その断片をプローブとして舌上皮cDNAライブラリーよりレセプターcDNA全長をクローニングすることを試みた。次に、得られたクローンに対して *in situ* ハイブリダイゼーション、抗体染色を行って、より詳細な発現部位を特定し味覚レセプターの候補となり得るかどうかの検討を行った。

第1節 RT-PCRによる舌上皮に発現するレセプター遺伝子ファミリーのクローニング

1. 緒言

味覚に関与するレセプターをクローニングするための方法として、同じ化学感覚である嗅覚のレセプターを参考にするのが妥当であろうと考えた。

- (1) 嗅覚のレセプターはG蛋白質共役型である。甘味、苦味物質のレセプターも生理学的見地からG蛋白質共役型と予想されている。
- (2) 嗅上皮は多種多様な匂い物質を受容するために多くの種類のレセプターを遺伝子ファミリーとして持つ。味覚物質も多種存在することより、それを受容するレセプターが遺伝子ファミリーを形成する可能性がある。
- (3) 味覚と嗅覚は同じ化学感覚であり、共に生体に害を及ぼす物質を忌避し益のあるものを摂取するためのセンサーの役割を持つことより、類似した構造が予想される。

よって嗅覚のレセプター(Buck and Axel 1991)のアミノ酸配列を参考にして味覚に関与するレセプターのクローニングを行うことを計画した。

クローニングの方法も嗅覚のレセプターを参考にした。嗅覚レセプターの存在する嗅上皮は一個体に存在する量が非常に少ないため、組織よりレセプター蛋白質を

得ることはできない。また、リガンドの種類が多く予想される上、レセプターとの結合力が低いため、リガンドを指標にしてスクリーニングを行うことは困難である。嗅覚のレセプターはG蛋白質共役型のレセプターに共通の配列（特に視覚を中心にして）を参考にした方法を行っている。つまり、嗅上皮のmRNAとG蛋白質共役型のレセプターに共通の配列を含むプライマーを用いてRT-PCRを行い、その結果得られたPCRクローンをプローブとしてcDNAがクローニングされた。

本節では、嗅覚のレセプターのアミノ酸配列を基に合成したプライマーと、ラットの舌の上皮から得たmRNAを用いてRT-PCRを行い、舌上皮に発現している味覚に関与する可能性のあるG蛋白質共役型レセプターの一部分を得て、その構造を解析することを目的とした。

2. 実験材料および試薬

2-1 実験材料

ラットはウイスター系オス(100~300 g)を日本生物材料から購入した。

2-2 試薬類

2-2-1 各種キット等

TimeSaverTM first strand cDNA Synthesis KitはPharmacia社、Multiprime DNA labelling system、Rapid hybridization buffer はAmersham社、GeneAmp PCR reagent kit、Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing KitはPerkin-Elmer Cetus社より購入した。

2-2-2 クロマトグラフィー担体、メンブレインフィルター

セファデックスG-50はPharmacia社、濾過滅菌フィルターはmillipore社より購入し、ナイロンフィルターはAmersham社のHybondTM-Nを用いた。

2-3 調製溶液類

特に指示したものを除き、試薬類は特級、生化学実験用、またはクロマトグラフィー用試薬を用いて、2次純水で所定の濃度に溶解し、オートクレーブ（+1気圧、120℃、20分）または濾過滅菌（0.22 μmのフィルターを使用）を施してから使用した。

2-3-1 DNA・RNA抽出用試薬

- [i] DNA抽出緩衝液： 8 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)
- 48 mM 塩化ナトリウム
- 40 mM EDTA

33.6 μ M スベルミジン

4 μ M スベルミド

2% ザルコシル

- [ii] 6M グアニジウムチオシアネート； 6 M グアニジウムチオシアネート
5 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)
0.5 % ザルコシル

以上の濃度の溶液を調製し、オートクレーブはせずに保存して、使用する直前に0.713% (v/v) の β -メルカプトエタノールを加えた。(これにより、 β -メルカプトエタノールの濃度は0.1 Mとなる。)

- [iii] 5.7M 塩化セシウム；5.7 M 塩化セシウム
0.1 M EDTA

水酸化ナトリウムでpHを7.5に合わせた。

- [iv] SDS / TE；100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)
5 mM EDTA
1 % SDS

2-3-2 poly(A)⁺RNAの濃縮 (水はDEPCで処理をした)

- [i] 2 \times ローディング緩衝液；40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)
1 M NaCl
1 mM EDTA
0.1% SDS

1 \times ローディング緩衝液は2 \times ローディング緩衝液を水で希釈して用いた。

- [ii] 洗浄緩衝液；20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)
0.1 M NaCl
1 mM EDTA
0.1% SDS

- [iii] 溶出緩衝液；10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)
1 mM EDTA
0.05% SDS

2-3-3 核酸トランスファー用試薬

- [i] アルカリ変性液；0.5 M 水酸化ナトリウム
1.5 M 塩化ナトリウム
[ii] 中和液；0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)
1.5 M 塩化ナトリウム
[iii] 20 \times SSC；3 M 塩化ナトリウム

0.3 M クエン酸三ナトリウム

使用時は必要に応じて希釈した。

2-3-4 ノーザンプロット解析用試薬

10×MOPS緩衝液：0.4 M MOPS (モルフォリンプロパンスルホン酸)

0.1 M 酢酸ナトリウム

10 mM EDTA

水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.0に合わせた。

2-3-5 ハイブリダイゼーション用試薬

50×Denhardt's溶液：1 % BSA

1 % ポリビニルピロリドン

1 % フィコール

3. 実験方法

下線を付した試薬は2-3に記した。

3-1 全RNAの抽出 (Guanidiniumチオシアネート/塩化セシウム法)

-80℃で凍結してあった1~3 gの臓器を木槌で粉碎してチューブに移し、5倍量の6M Guanidiniumチオシアネートを加え、直ちに2~3分間ホモジナイズを行って均一にした後、15℃、13,000 x gで20分間遠心した。上清を、前もって2.5 mlの5.7 M塩化セシウムを入れた超遠心チューブに上層し、Beckman社のL-80Ultracentrifugeで36,000 x gで14時間遠心した。上清を除いた後、沈殿を手早く80%エタノールで洗浄し、減圧下乾固した。これを150 μlのTE / SDSと150 μlのフェノール溶液とを同時に加え、激しく攪拌して溶解、フェノール抽出を行い、15℃、13,000 x gで5分間遠心した。水槽をエタノール沈殿し、RNAを沈殿物として遠心(13,000 x g, 0℃, 5分間) することにより集めた。沈殿を乾固し、1 mlの水に溶解した。

3-2 一本鎖cDNAの作製

(1) poly(A)⁺RNAの濃縮 (この実験に用いる水はDEPCで処理をした)

オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースカラムによる方法

オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースカラム (総容量~1 ml) は前もって1 mlの0.1 M水酸化ナトリウム/5 mM EDTA、続いてpHが7付近になるまで水で洗浄し、その後5 mlの1×ローディング緩衝液を用いて平衡化した。抽出した全RNAを含むRNA水溶液0.5 mlを65℃で5分間変性し、0.5 mlの2×ローディング緩衝液を加えて、室温まで冷却させた後、平衡化したカラムにチャージした。素通り画分は再度カラムにチャージした。

次に、3 mlの1×ローディング緩衝液を加えて洗浄した後、さらに2 mlの洗浄緩衝液で洗浄し、最後に3 mlの溶出緩衝液で吸着したRNAを溶出させ、8滴(約200 µl)ずつ分画した。分画した液の一部を用いて260 nmの吸光度を測定して、溶出された分画を集め、2回エタノール沈殿し、最終的に1 mg/mlになるように水に溶解した。

(2) 1本鎖cDNA合成

1~5 µgのpoly(A)⁺RNAをRNase-Free Waterで総量20 µlになるように希釈し65℃で10分間変性し、水中で冷却した。TimeSaver™ first strand cDNA Synthesis KitのFirst-Strand Reaction Mixに1 µlの200 mM DTT溶液を加え、1 µlの0.5 mg/mlオリゴ(dT)₁₂₋₁₈プライマー、または1 µlの0.037 mg/mlのpd(N)₆プライマーを加え、先の変性したpoly(A)⁺-RNAを入れ、軽く混ぜ37℃で1時間反応した。

3-3 DNA合成によるプライマーの作成

Oligo1000 DNA synthesizer(Beckmann 社)で合成し、同社のCLEVAGE and DEPROTECTION KITを用いて精製した。

3-4 PCR法によるDNA断片の増幅

TaKaRa PCR kitを用いて行った。

0.5 mlチューブに以下の試薬およびDNAを混合した。

dNTP Mix (dNTP 各2.5 mM)	4 µl
10×バッファー (100 mM Tris, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	5 µl
テンプレートDNA	0.1~100 ng
センスプライマー	50 pmol
アンチセンスプライマー	50 pmol
水	総量を50 µlになるように加えた
Taq polymerase (5 U/µl)	0.5 µl

以上を混合した後、ミネラルオイルを約1滴上層して、PCR反応装置(パーキンエルマー-ジャパンアプライドバイオシステム DNA Thermal Cycler 480)にセットした。温度設定は96℃1分、45℃4分(1サイクル毎に6秒延長)、72℃2分の条件にして50サイクル繰り返した。

3-5 DNAの標識

(1) 5'末端標識

DNA約50 pmolに2 mlの10×リン酸化緩衝液と5 μ lの $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (約1.85 MBq)とを混合し、総量が18 μ lとなるように水を加えた後、2 μ l (約10 U) のT4ポリヌクレオチドキナーゼを添加し37°Cで30分間反応させた。反応後1 μ lの0.5 M EDTA (pH 8.0)と20 μ lのTEを加え、フェノール・クロロホルム抽出し、10 μ gのキャリアーDNA (大腸菌DNA)を加えてセファデックスG-50ショートカラムクロマトグラフィーを通して標識されたDNAを未反応基質と分けて回収した。

(2) ランダムプライミングによるDNA断片の標識

DNA 0.5 μ gに水を加えて28 μ lにし、95°Cで5分間の加熱処理後、氷水中にて急冷し、室温に戻してからランダムプライマー5 μ l、5×バッファー10 μ l (いずれもAmersham社DNAラベリングキット)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 5 μ l (1.85 MBq)を加え、Klenow fragment 2 μ lを加えて37°Cで30分、または室温で2時間以上反応させた。反応後1 μ lの0.5 M EDTA (pH 8.0)を加え反応を停止させ、0.2%SDS / TEを50 μ l、10 μ gのキャリアーDNA (大腸菌DNA)を加えてセファデックスG-50ショートカラムクロマトグラフィーを通して標識されたDNAを未反応基質と分けて回収した。

3-6 コロニーハイブリダイゼーション

(1) コロニーリフティング

コロニーの生じたプレートにナイロンフィルターを密着させることにより、コロニーのDNAをフィルターに転写した。フィルターをまず、アルカリ変性液で5分間変性して中和液で5分間、2回中和した後、2×SSCで5分間処理した。その後、80°Cで完全に乾燥させて、紫外線をコロニーが付着した面に10分間照射してDNAを固定した。

(2) ハイブリダイゼーション

[i] プレハイブリダイゼーション

Amersham社のRapid hybridization buffer (以下ハイブリダイゼーションバッファーと略す) 1 ml当たりそれぞれ100 μ gのキャリアーDNAとサケ精子DNAを、約2倍量の水とともに沸騰水中で10分間加熱した後、氷水中で急冷した。室温に戻してからハイブリダイゼーションバッファーを加えて予洗液 (3×SSC / 0.1%SDS) 中で洗浄したフィルターとともにポリバッグ中でスクリーニング時と同じ温度により30分以上保温しその後ハイブリダイゼーションに供した。

[ii] ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバッファー1 ml当たりそれぞれ100 μ gのキャリアーDNA

とサケ精子DNAに、約100万cpm / mlとなるようにオリゴヌクレオチドプローブを加え、これに約2倍量の水を加えて沸騰水中で10分間加熱した後、氷水中で急冷した。室温に戻してからハイブリダイゼーションバッファーを加えてよく混合し、プレハイブリダイゼーション後のフィルターとともにポリバッグに入れてハイブリダイゼーションを行った。反応温度は45℃で行い1時間以上反応させた。

〔iii〕洗浄・シグナルの検出

洗浄は6×SSC / 0.1% SDS中45℃で行った。シグナルの検出は-80℃でX線フィルム(フジフィルム社)、または室温でイメージングプレートに露光させて行った。

3-7 塩基配列の決定

Taq DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー・ジャパンバイオシステム社)を用いた方法を行った。プラスミドDNA 1 µgをプロトコールに従い、反応させた。泳動用色素はTaq DyeDeoxy法(パーキンエルマー・ジャパンバイオシステム社)用電気泳動色素を使用し、電気泳動はパーキンエルマー・ジャパンアプライドバイオシステムズのDNAシーケンサー373Aを用いて行った。泳動後、シーケンサーの解析プログラムによって配列を検出解析した。

3-8 全DNAの抽出(高分子染色体DNAの調製)

使用前にラット肝臓を-80℃で凍結してから実験に供した。乾熱済みの乳鉢に先のラットの肝臓を1~2 gを入れ、液体窒素を加えながらよく粉碎し、50 ml容量のプラスチックチューブ(Falcon2070)に液体窒素ごと流し込み、-80℃で窒素を蒸発させ、18.75 mlのDNA抽出緩衝液を加えて穏やかに攪拌した。さらに10 mg / mlプロテイナーゼK溶液180 µlと10% SDSを4.2 mlを加え、60℃で2時間30分間、時々ゆっくりと攪拌しながら保温した後、2等分し、それぞれにフェノール溶液10 mlを加えて室温で3時間程ゆっくりと攪拌し、フェノール抽出を行った。重ねて一晩フェノール抽出を行い、次いで3時間のフェノール・クロロホルム抽出、30分のクロロホルム抽出を行い、1/10量の3 M酢酸ナトリウム緩衝液と-20℃に冷やしておいたエタノールを2.5倍量加えて、析出した高分子DNAをガラス棒に巻つけて回収した。75%エタノールに浸して洗い、減圧乾固後、適量のTE (pH 8.0) に浸して、4℃で一晩静置し、高分子DNAを溶解させた。

3-9 サザン分析

(1) プロットイング(核酸の転写)

制限酵素消化したDNAを0.7% アガロースゲルを用いて電気泳動した後、ゲルを

アルカリ変性液に浸し、室温で30分間ゆっくり振とうしてDNAを変性させ、次にゲルを中和液に移して30分間、2回振とうし、最後に2×SSCに浸して15分間振とうした後ナイロンフィルターにDNAを転写した。その後フィルターを80℃中に30分以上静置し、更にフィルターのDNAを転写した面にトランスイルミネーターで紫外線を照射して、DNAをフィルター上に固定した。

(2) ハイブリダイゼーション

ランダムプライムによりラベルしたDNAをプローブとして用いて50℃または68℃でハイブリダイゼーションを行った。洗浄は緩やかな条件では2×SSC / 0.1%SDS、ストリンジェントな条件では0.1×SSC / 0.1%SDSでハイブリダイゼーションと同様の温度で行った。

他の条件はコロニーハイブリダイゼーションと同様に行った。

3-10 ノーザン分析

(1) プロットイング (核酸の転写)

RNA10 µgに5 µlの10×MOPS緩衝液、8.75 µlのホルムアルデヒド、25 µlのホルムアミドを加え、水で総量を50 µlにし、55℃で15分間変性させ、氷中で冷却し、これをRNA用1%アガロースゲルで、50 V定電圧、1×MOPS緩衝液中で電気泳動した。泳動後、ゲルを3分間水洗してから20×SSCを用いてゲル中のRNAをナイロンフィルターに転写した。20×SSCで約3分間洗浄後、コロニーハイブリダイゼーションの時と同様にナイロンフィルター上にRNAを固定した。

(2) ノーザンハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションの温度を65℃にし、洗浄条件を0.1×SSC / 0.1%SDSとした他はサザンハイブリダイゼーションと同様に行った。

4. 結果

4-1 RT-PCRによる舌上皮のG蛋白質共役型レセプターファミリーのクローニング

舌上皮に存在するG蛋白質共役型レセプターを得るためにRT-PCRを行った。まず同じ化学感覚である嗅覚レセプターのアミノ酸配列を参考にしてプライマーを作成した。嗅覚レセプターの7つの膜貫通ドメインの内2、3、6、7番目のドメインの周辺には嗅覚レセプターファミリーに共通に保存されているアミノ配列が存在する。この配列を基に2、6、7番目のドメインの周辺に当たる位置のオリゴヌクレオチドのプライマーを、IIがセンス、VI、VIIがアンチセンスとなるように合成した(図1-1)。ラットの舌上皮由来のmRNAを1 µg用いてfs-cDNAを合成し、このfs-cDNAを鋳型とし、合成したプライマーを用いて(TM II-TM VI、TM II-TM VII) RT-PCRを行

った。一般にG蛋白質共役型レセプターは互いにホモロジーが低いため、アニーリングの温度は45℃と緩やかな条件で行った。予想される長さのあたり(約700 bp)のRT-PCR産物を切り出してpUC18ベクターにライゲーションし、ミニライブラリーを複製した。嗅覚のレセプターファミリー間だけでなく他のG蛋白質共役型レセプターとも相同性を有する配列を持った3番目の膜貫通ドメインの周辺の塩基配列(TM III)をプローブとして、スクリーニングをして60種類以上のクローンを得た。この内55種のクローンについてその塩基配列を解析し、アミノ酸配列を推定した。これら55種のクローンはG蛋白質共役型レセプターの持っている共通のアミノ酸配列を持ち、最も高い相同性はアミノ酸レベルで97%であり、最も低いものでも47%の相同性があった。この55種のクローンの推定アミノ酸配列を比較し、80%以上の相同性を基準にして分類した。その結果6つの異なったグループに分類でき、今回クローニングした断片全体をPTE (PCR clones from taste epithelium)と命名した(図1-1-2)。グループ間ではPTE45とPTE58の間で71.1%の高い相同性を示したが他は47~55%であった(図1-1-3)。これらのクローンは2、6、7番目の膜貫通ドメインのプライマーを用いてRT-PCRにより得たため、N端やC端を欠き、この部分の特徴を知ることはできなかったが、今回得た部分に関してはG蛋白質共役型レセプターの特徴であるS-S結合の形成可能なCys (Dixon *et al.* 1987, Karnik *et al.*, 1988) (2番目と3番目、4番目と5番目の膜貫通部分の間にあり、共に膜のアピカル側である)、疎水結合をなすであろうLeu (2番目と3番目の膜貫通部分に存在している)が存在し、G蛋白質共役型レセプターの一部であることが判明した。

4-2 ゲノムサザンプロットによるPTEの解析

1で得たレセプターの遺伝子上での位置を解析するためにゲノムサザンプロット解析を行った。ラットの肝臓からゲノムDNAを抽出し、10 µgをそれぞれEcoR I, Hind III, BamH Iで消化して電気泳動を行いサザンプロットし、プローブには6つのグループの代表的なクローンの全長を用い、ストリンジントな条件下(68℃)でハイブリダイゼーションを行った。それぞれハイブリダイズするバンドのパターンが異なっていたので、これらは別々の遺伝子に由来すると考えられた(図1-1-4)。PCR産物のPTE45をプローブとし、ハイブリダイゼーションの温度を50℃にし、洗いも2×SSCと緩やかな条件でゲノムサザンハイブリダイゼーションを行うと多くのバンドとハイブリダイズした(図1-1-4右)。この結果、PTE45と似た構造を持つレセプターが多数存在することが判明した。このことは嗅覚レセプターが様々な匂いを受容するために遺伝子ファミリーを形成していることと一致している。

4-3 ノーザンプロット解析によるPTEの発現の解析

さらに、これらのレセプターの組織特異性を調べるために、ラットの舌、精巣、網膜、脳、肝臓、腎臓、肺、膵臓、小腸、骨格筋、平滑筋のmRNAを用い、PTE45をプローブとしてノーザンブロット解析を行った。ハイブリダイゼーションは65℃で行った。その結果PTE45にハイブリダイズするmRNAは約2 kbの長さを持ち、舌上皮にのみ発現しており(図1-1-5 lane6)、他の組織における発現は認められなかった。また舌全体のmRNAではほとんど検出することができなかった(図1-1-5 lane5)。したがって舌全体に対するPTEの量は非常に少なく、舌上皮に局在していることが明らかとなった。また、PTE45以外のPTEグループの代表的なクローンを等量混合したものをプローブにして同様に解析を行ったところ、やはり舌上皮にのみ発現し、長さも一致することが明らかとなった(図1-1-5 lane12)。

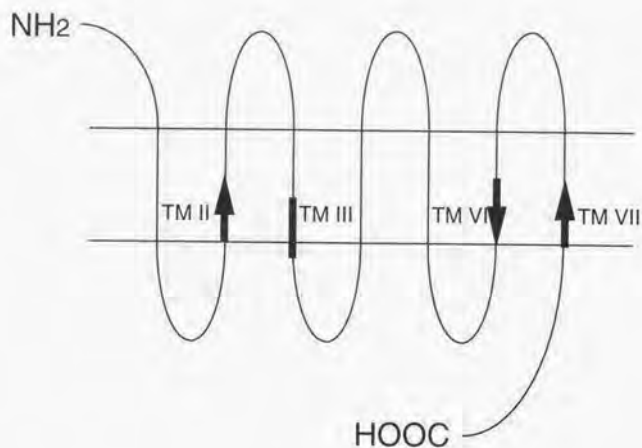
5. 考察

嗅覚レセプターのアミノ酸配列を基に、舌上皮のmRNAを用いたRT-PCRによってG蛋白質共役型レセプターの特徴を持つクローンを約60種類得ることに成功し、PTEと命名した。PTEはそれぞれの相同性より6つのサブグループに分けることができ、サザン、ノーザンブロット解析により、舌上皮に発現するレセプターファミリーが存在することが示唆された。PTEと他のG蛋白質共役型レセプターとの相同性を検索したところ嗅覚レセプターファミリーと最も高く33%~67%であった。しかし、この数字はPTE間での相同性が約80%であるのに比べると明らかに低く、PTEグループは現在までに明らかになっている嗅覚レセプターとは異なるファミリーを形成しているものと思われる。

PTEグループ間の相同性は45と58の間で71.1%の高い相同性を示したが他は47~55%の相同性に留まった。特に相同性の低かった部分は4番目と5番目の膜貫通部位の膜のアピカル側に近い部位と6番目と7番目の膜貫通部位の間の部分(アピカル側の膜外部位)であった。これらの部位は、G蛋白質共役型レセプターである β_2 -アドレナリンレセプターの膜貫通部位の膜のアピカル側に近い部位を変異するとリガンドとの結合力が弱くなることを示した知見(Strader *et al.*, 1987)から、リガンドの結合に関与している場所であると考えられる。事実このことは、既知のG蛋白質共役型レセプター間で、この部分の相同性が非常に低いことから裏付けられる。PTEファミリーは各々よく似ているものの、この部位の相同性は低い。したがってPTEファミリーは、リガンドの種類の多様性に対応するものと考えられる。以上のように、今回得られたPTEクローンはファミリーを形成している点、舌上皮に発現している点から、味受容に関与するレセプターであることが示唆された。

近年、舌上皮からいくつかのG蛋白質共役型レセプターが得られている。Matsuokara(1993)がPTEと同様嗅覚レセプターと相同性の高いレセプターの一部分と神経性ベ

ブチド受容体に相同性の高いレセプターをクローニングした。また、Talら(1995)はG蛋白共役型レセプターの特徴を持つ新規のレセプターを舌上皮から得た。当研究室においても、千葉(1997)がラット舌の有郭乳頭と葉状乳頭より、GUST43、GUST45など6種類のレセプター遺伝子をクローニングした。GUST43はThomasら(1996)が味蕾・嗅上皮・睪丸に発現するレセプターであることを明らかにしたTB334と相同性の高いクローンであり、GUST45はPTE45と相同性の高いクローンであることからTB334およびPTE45それぞれの遺伝子ファミリーが存在することを裏付けた。GUST45とPTE45、TB334とGUST43間以外のレセプターの互いの相同性は12~49%とばらつきがあり、舌上皮にはPTEをはじめバラエティーに富んだレセプターが多種存在すると考えられる。



PCRのために作成したプライマー

TM II 5'-CC(GATC)ATGTA(TC)(TC)T(GATC)TT(TC)(TC)(GATC)TC(GATC)AA-3'
 対応するアミノ酸配列 PMY(FL)FLSN

TM VI 5'-TG(GATC)GA(GATC)CC(AG)CA(GATC)GT(GATC)GA(GA)AA-3'
 対応するアミノ酸配列 FSTC(AG)SH

TM VII 5'-GA(AG)TA(AG)AT(AG)AA(GATC)GG(AG)TT(GATC)A(AG)CAT-3'
 対応するアミノ酸配列 MLNPFYIYS

オリゴヌクレオチドプローブ

TM III 5'-CTGTG(CT)(CC)AT(CT)GCII(GT)GA(CT)(CA)G(CG)TAC-3'
 対応するアミノ酸配列 LC(AV)IA(LVI)DRY

図 1-1-1 合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列

1 2 3 4 5 6 7 8
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 MYLEL SNLSLADISEFTSITL PKMIVDIQINNRAHSYSCGLTOMSEPMLEFCILSILLTPMAYDRVAICHPLEHYQVIMNP
 ITVPRKOLINLQKONKALS YAGCITQLSFVLIFACIMENFLLAMAYDRVAICRPLRYTALMKA
 MYLFFSMLSFVDIYFISITIPKILVAMGSKTKLISYIEGLTQVFFNFVGMDDVLRIMAYDRVAICMPLKYVTIMNP
 MYLFFSMLSRNDICITITIPKMLMNGSHDQSTYLSGLSQVLTANFVSESIESLLAMAYDRVAICHELKYVTIMNH
 MYLFFSMLSFADICLISITIPKMLANEHLNHRKATYEGGIMQIYFFHLFVGLDNFLAMAYDRVAICHPLEHYTSMTP
 LLMCNLCFADICFTSASIPNVLVMICTKNKVITYEGGISQVFFILFQVLDNPLLAMAYDRVAICHPLEHYVTIMNR

III

9 10 11 12 13 14 15 16
 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 FLCGILVFLISLISLVQLHNSVLCIITYFKSVDISHFFDPSLLMLACSDDFJNNIVMYFVCGAISCFIPISGHFFSY
 FLCVMTLLSICISIVDALHGLMILRISFCIFLEIPHYFCEIYQVIKVSCSDPLNNILVYTMSTLGGVFLGHIIFYSY
 RVCTILVLMFWIIMFCISLIHVLLMNEINFSRGTKIPHFCEIAQVLKVSNDHINNFMYLSSLLGVIPMTGLMSY
 YFCVMI L FACSIALHMCLEHLLMVLITFCRTEIIPHFCELAHIIKPTCSNFINILLIYTVSVLFFGVHIVGHILSY
 HLCHSIAVMSITVLSNLSIQSEFLVQLSFCIEVBIIPHFCELSMLVHLACSDDFLSDMANVLAALLGGCCLVGLIYSY
 FLCGLVLSGQVWTTALNSLLOSSMALRISFCIDLKIPHFVCELNQLVLIACNDDFPNDVAVMYFAAVLLGGCFLAHLIYSY

IV

17 18 19 20 21 22 23
 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234
 YKIVSSILLRMFSPGKFKAFSTCGS
 FKIHSILLRMFSSGSRHRAFSTCGS
 SOLVSSLRMSSTVSKYKAFSTCGSHLQVGLFYGSVIGVYFSSVVLSTQRIMVASLNYTVIISPMPNPFYISL
 IYTVSSVLRMSLLGSAKYKAFSTCGSHLSVSLFYCTGFVGHIISSPLTDSPRKTVVASVNYTVIQTQMHGPFYISL
 SKIVSSIQATISSAEGKYKAFSTCVSHLSWSLIFYCTILLGVYLSAVTQNSHSTAATSLMYTVVTPMLNPFYFF
 SKIVSSIRATSSSQKYKAFSTCASHLSWSLIFYSTILLGVYLSSTQNSHSTARASVMSVTPMLNPFYFF

VI

VII

図1-1-3 PTEグループ間の相同性
 4グループ以上に共通な配列は反転して示した。

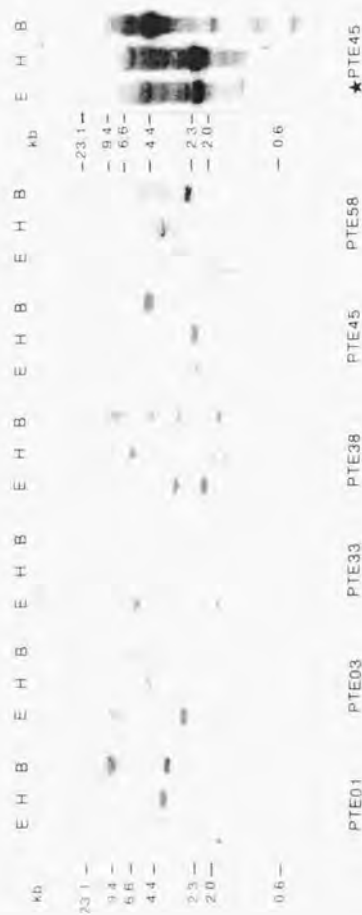


図1-1-4 ゲノムサザンプロットによるPTEの遺伝子上の位置の解析

ラット肝臓由来のゲノムDNA 10 μ gを *Eco*R I (E), *Hind* III (H), *Bam*H I (B)で消化し、PTE01, 03, 33, 38, 45, 58をプローブとして用い、68°Cでハイブリダイゼーションを行った。右側の★PTE45はPTE45をプローブとして用い、50°Cでハイブリダイゼーションを行った。



図 1-1-5 ノーザンブロット解析によるPTE45クローンmRNAの様々な組織における発現の検出

lane 1~11: PTE45をコードしているmRNAの検出

lane 1: 肝臓、lane 2: 腎臓、lane 3: 精巣、lane 4: 脳、lane 5: 舌全体、
lane 6: 舌上皮、lane 7: 網膜、lane 8: 肺、lane 9: 小腸、lane 10: 骨格筋、
lane 11: 平滑筋

各レーンに2 μ gのpolyA⁺RNAを用いPTE45をプローブとして
ハイブリダイゼーションを行った。

lane 12: PTE45以外のPTEをコードしているmRNAの検出

舌上皮の2 μ gのpolyA⁺RNAを用い、PTE01, 03, 33, 38, 58 を等量混合したものを
プローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

左端に28Sと18SのrRNAの位置を示した。

第2節 舌上皮に発現する G蛋白質共役型レセプター cDNA GUST27の クローニング

1. 緒言

第1節では舌上皮に発現し、6つのグループに分類できる約60種のGタンパク質共役型レセプターの遺伝子ファミリー(PTE)をRT-PCRにより見出した。PTEは嗅覚レセプターファミリーと最も相同性が高いが、別の遺伝子ファミリーを構成していると考えられた。しかしながらPTEは2番目の膜貫通部位から7番目の膜貫通部位までのクローンでありN端とC端を欠き、その特徴を知ることができなかった。そこで、本節ではラット舌上皮のcDNAライブラリーからPTEをプローブとしてスクリーニングを行い、PTEファミリーに属しているレセプターのcDNAの全長をクローニングすることを試み、その構造を調べることを目的とした。

2. 実験材料および試薬

2-1 実験材料

ラットは第1節と同様のものを用いた。

2-2 試薬類

2-2-1 各種キット等

TimeSaver™ cDNA Synthesis KitはPharmacia社、*in vitro* パッケージングキット Gigapack II Gold は Stratagene Cloning Systems社より購入した。

他は第1節と同様のものを用いた。

2-3 調製溶液類

cDNAライブラリー作製用試薬

1×ライゲーションバッファー：10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)

10 mM 塩化マグネシウム

1 mM DTT

0.5 mM ATP

0.1 mg/ml BSA

SM溶液：100 mM 塩化ナトリウム

50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)

0.2% 硫酸マグネシウム・7水和物

0.01% ゼラチン

- NZCYM : 1% NZアミン
 0.5% 塩化ナトリウム
 0.5% 酵母抽出物
 0.1% カザミノ酸
 0.2% 硫酸マグネシウム・7水和物

他は第1節と同様のものを用いた。

3.実験方法

下線を付した試薬は2-3に記した。

3-1 cDNAライブラリーの作製

(1) poly(A)⁺RNAの濃縮は第1節と同様に行った。

(2) cDNA合成 (試薬は全てPharmaciaの TimeSaver™ cDNA Synthesis Kitを用いた)

[i] 1本鎖cDNA合成は第1節と同様に行った。

[ii] 2本鎖cDNA合成

キットのSecond-Strand Reaction Mixに第1節と同様に合成した1本鎖cDNAを加え軽く混ぜ12℃に30分間置いた後、22℃で1時間反応させた。その後65℃で10分間加熱し反応を止め、室温に戻した後、フェノール・クロロホルム抽出を行い水層をセファロースCI-4Bショートカラムに通した。

(3) EcoR I / Not Iアダプターの付加

合成した2本鎖cDNAに1~5 μlのEcoR I / Not IアダプターとPEG緩衝液を30 μl、15 mM ATP溶液を1 μl、T4 DNA ligaseを1 μl加え、16℃で1時間反応した。その後65℃で10分間加熱し氷中で冷却した。次に1.5 μlの75 mM ATP溶液を1 μl、T4 Polynucleotide Kinaseを1 μl加え、37℃で30分間反応した後65℃で10分間加熱し、室温まで戻した後、フェノール・クロロホルム抽出を行い水層をセファロースCI-4Bショートカラムに通した。

(4) cDNAの長さによる分画

アダプターを付加した2本鎖cDNAを低融点アガロースゲルで電気泳動し、約0.5 kbp以上を切り出して精製した。約0.3 μgのλgt10ベクターアームDNAを加え1×ライゲーションバッファーに溶解した後エタノール沈殿し、沈殿を8 μlの1×ライゲーションバッファーに溶解した。

(5) λgt10ベクターへの連結

先の0.5 kbp以上のcDNA 1 μl (30 ng)と1 μl (500 ng)のλgt10ベクター、1 mM ATPを

混合して、0.5 μ lのT4DNAリガーゼを加えて一度氷中で冷却し16°Cで一晩連結した。これに、市販のバッケイジングキット (Gigapack II Gold) を用いて、22°Cで2時間反応させ、連結したDNAをバッケイジングし、ファージ粒子を形成させた。バッケイジング反応後、0.5 mlのSM溶液と1~2滴のクロロホルムを加え、軽く振とう混和して、4°Cで保存した。

(6) ファージの力価測定

(i) 指示菌の調製

0.2%のマルトースを含むNZCYM 20 mlに指示菌 (大腸菌LE392) を入れて、37°Cで一晩振とう培養した。4°C、3000 rpmで10分間遠心して集菌し、10 mlの10 mM硫酸マグネシウム水溶液に懸濁した。

(ii) ファージの感染

指示菌100 μ lに、(5)で調製したファージ液0.5 μ l~5 μ lを加え、37°Cで15分間感染させてから、一度溶解して50°Cに保存しておいた0.67%アガロース/NZCYMを2.5 ml加え、直ちにNZプレートに撒き、37°Cで一晩保温してプラークを生じさせた。

(7) cDNAライブラリーの作製

(6)の結果からファージ液1 μ l当りのファージ粒子数を算出し、プレート1枚当りのプラーク数が1万~4万になるようにして、(6)と同様の方法でNZプレート (大) に撒き37°Cで一晩保温してプラークを生じさせた。

3-2 プラークハイブリダイゼーション

基本的に、コロニーハイブリダイゼーションと同様の方法で行った。ハイブリダイゼーションは65°C、洗浄は0.1 \times SSC/0.1%SDSで行った。

4. 結果

4-1 cDNAクローンGUST27の単離

ラットの舌上皮のpoly(A)⁺RNAからcDNAライブラリーを作成し、先の6つにグループ分けしたRT-PCR産物の代表的なもの (PTE01, 03, 33, 38, 45, 58) の全長をほぼ等量になるように混合したものをプローブとして、スクリーニングを行った。その結果、独立した 2.5×10^6 個のプラークから5個のクローンが陽性クローンとして単離された。これらはそれぞれ異なった制限酵素サイトを持っていたので、この5つのクローンは似た配列を持っているが別々のクローンであることが示された。これらのcDNA挿入断片をサブクローニングしてその塩基配列を決定したところ5つのクローンのうち4つは全長を含んでいなかったため、残りの1つの全長を含んでいると考えられるクローン λ G27の全塩基配列を解析した (図1-2-1)。 λ G27は全長1163 bpで、この中にはMet¹からLeu³¹²まで312アミノ酸残基をコードする936 bpのオープンリーデ

ィングフレームを有していた(図1-2-1)。-33 bp~-31 bpの位置にはインフレームの終止コドンが存在した。3'非翻訳領域にはpoly(A) addition signal およびpoly(A)配列は欠けているものの、オープンリーディングフレームには、PTEと高い相同性を示す塩基配列がみられたので、このクローンがコードする蛋白をGUST27と命名した。

GUST27はヒドロパシーから7回膜貫通部分を含んでいることが示された(図1-2-2)。また相同性検索の結果(後述)からも、GUST27は7回膜貫通型であるG蛋白質共役型レセプターであることが判明した。

4-2 GUST27の他のレセプターとの相同性の検索、および全体の構造の推測

GUST27には他のG蛋白質共役型レセプターが共通に持っている特徴が含まれている。それはS-S結合を形成する事が可能な(Dixon *et al.*, 1987, Karnik *et al.*, 1988) Cys⁷⁸, Cys¹⁰⁰ (2番目と3番目、4番目と5番目の膜貫通部分の間にあり、共に膜のアピカル側である(E2, E3))、疎水結合をなす可能性のあるLeu⁶⁷, Leu⁹⁹ (2番目と3番目の膜貫通部分に存在している)、そして折りたたみ構造のターンを形成する(Applebury *et al.*, 1986, Brandl and Deber, 1986) Pro¹¹⁰, Pro²⁸⁸ (3番目と4番目膜貫通部分の間(サイトゾル側)、7番目膜貫通部分にある)であり膜の外・中・内側からG蛋白質共役型レセプターを形成するために存在していると考えられる(図1-2-4)。

先にクローニングしたPTEファミリーとGUST27の相同性を調べるとPTE33と80%の相同性があり、GUST27はPTE33グループに属することが判明した。また、他の様々なG蛋白質共役型レセプターとの相同性を調べたところ、嗅覚レセプターの内OLFF3と56%の高い相同性があり、次いで生殖細胞のレセプターとして知られているHGP07Jと33%の相同性があった。視覚レセプターであるロドプシンや他のレセプターとは膜貫通部分に若干の相同性が認められた(図1-2-3)。

更に詳細に相同性を調べてみた。GUST27とOLFF3およびHGP07J (Parmentier *et al.*, 1992)は特に、2、3、6、7番目の膜貫通部分のアミノ酸配列 Met-Tyr-Phe-Phe-Leu-Ser-Asn-Leu-Ser, Phe-Leu-Leu-Thr-Leu-Met, Phe-Ser-Thr-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Cys-Val-Val, Tyr-Thr-Val-Ile-Ser-Pro、またI2ドメイン(膜の内側の4つのドメインの2番目) Asp-Arg-Tyr-Val-Ala-Ile-Cys, Tyr-Thr-Val-Ile-Met-Asn、E3ドメインPro-His-Phe-Phe-Cysが一致した。またI3ドメインはG蛋白質と結合するサイトがあることで知られているが(Kobilka *et al.*, 1988, Hamm *et al.*, 1988, Strader *et al.*, 1987)、ロドプシン(Nathans and Hogness, 1983)、トロンボキサンレセプター(Hirata *et al.*, 1991)、ムスカリニックレセプター(Shapiro *et al.*, 1988)のI3ドメインが29、28、157アミノ酸と長いのに比べGUST27はOLFF3、HGP07Jと同様19アミノ酸と短く、結合するGタンパク質の種類の推定はできなかった。

4.3 ゲノムサザンプロットの解析によるGUST27に対応する遺伝子の解析

GUST27遺伝子の性質を調べるために、ゲノムサザンを行った。ラットの肝臓からゲノムDNAを抽出し、その内10 µgをそれぞれEcoR I, Hind III, BamH Iで消化してサザンプロットし、GUST27全長をプローブとしてストリンジェントな条件下(68°C)で反応した(図1-2-5)。その結果、プローブとハイブリダイズする約4.0 kbp (EcoR I)、2.5 kbp (Hind III)、6.0 kbp (BamH I)のバンドがみられ、GUST27遺伝子はユニークな遺伝子であることが明らかとなった。50°Cに反応温度を下げると、PTEの時と同様に複数のバンドが確認され、GUST27と相同性の高いレセプター遺伝子が多数存在することが示唆された。

4.4 ノーザンプロット解析によるGUST27の様々な器官での発現の解析

種々の器官におけるGUST27のmRNAの発現を解析するために、ラットの舌、精巢、網膜、脳、肝臓、腎臓、肺、脾臓、小腸、骨格筋、平滑筋のmRNAをそれぞれ2 µgを用いてノーザンプロットを行い、GUST27をプローブとして65°Cで反応を行ったところ、舌上皮からのmRNAとのみ約2 kbのところでハイブリダイズするバンドが確認された(図1-2-6)。他の器官ではバンドは検出されずGUST27の発現が認められなかった。また、舌全体のmRNAでもクロスするバンドは希薄であり検出されなかった。このことより、GUST27は舌全体に発現しているのではなく、舌上皮に局在して発現していることが明らかとなった。

5. 考察

以上よりPTEファミリーに属し舌上皮に発現するcDNAクローンの全長であるGUST27をラット舌上皮のcDNAライブラリーからクローニングすることに成功した。GUST27はこれまでに明らかになっているG蛋白質共役型レセプターの中では構造的に相同性が低く、嗅覚のレセプターと共に系統樹的には離れた位置にある(図1-2-7)。嗅覚レセプター-OLFF3とは56%の相同性があり他のG蛋白質共役型レセプターの中で最もよく似ていたが次の3点で大きく異なっていた(図1-2-8)。

(1)N端の膜外の部位(EI)はOLFF3では28アミノ酸残基ありN-グリコシド型糖鎖結合部位が存在している(Buck and Axel, 1991)がGUST27では10アミノ酸残基と非常に短くN-グリコシド型糖鎖結合部位は存在していなかった。

(2)膜貫通部位においてアミノ酸配列に大きな差がみられた。GUST27とOLFF3の4番目と5番目の膜貫通部位のアミノ酸配列を比べると27、35%と低い相同性であった。特に膜貫通部位のアピカル側に近い部位ではそれぞれ27、35%よりも低い相同性であった。G蛋白質共役型レセプターであるβ₂-アドレナリンレセプターの2番目と3

番目の膜貫通部位のアピカル側に近い部位を変異するとリガンドとの結合力が弱くなるという知見(Strader *et al.*, 1987)やNK1/NK3レセプターキメラを用い、5番目と6番目の膜貫通部位のアピカル側の部位がリガンドの結合に関与していることを示した知見(Gether *et al.*, 1993)より、膜貫通アピカル側部位はリガンド結合に関与していると思われる。よって、膜貫通部位のアピカル側の相同性の低いOLFF3とGUST27のリガンドは異なる物質であることが予想できる。また4番目の膜外部位(E4)もOLFF3と18%と非常に低い相同性であった。E4はリガンドと接触可能な部位であるため、この部位の相同性が低いことはGUST27に特異的なリガンドとの結合に関与している可能性がある。

(3) C端の膜内部位(I4)のアミノ酸配列もOLFF3との相同性は21%と低かった。特にC端から30アミノ酸残基では1アミノ酸のみの一致であった。 $\alpha 2/\beta 2$ -アドレナリンレセプターキメラを用いた実験より3番目の膜内部位(I3)にG蛋白質を活性化させる領域の存在が示されていること(Kobilka *et al.*, 1988)、C末端配列のみ異なるプロスタグランジンレセプターの4種類のアイソフォームに共役するG蛋白質の種類がそれぞれ異なること(Negishi *et al.*, 1993)より、I3とI4部位は、細胞内に情報を伝達する次の段階の物質であるG蛋白質との結合に関与することが知られている。したがってGUST27はOLFF3とはシグナル伝達が異なることが示唆された。

以上のように、舌上皮に発現しているGUST27は嗅覚レセプターと似ているものの、GUST27特有な構造を持っていることから、嗅覚レセプターとは異なるリガンドと結合し、シグナル伝達を行うと考えられた。ノーザンブロット解析によりGUST27はPTEファミリーと同様舌上皮にのみ発現することが明らかとなり、味覚に関与するG蛋白質共役型のレセプターであると推定した。これを確かめるために、より詳細な発現部位の解析を次節で行った。

AGGGTCATTTTGTGATATGTCCGGTGGCTATTATTTGGAACTAAACTTAAATTTTCTTTA	-73
ACAGATACAAAAGTCATATGGAAAACAGAGAACCACACAATGAGAACAGAAATTCACATCC	-13
*	
TGGGTCCTCTCAGATGATCCTGAACTGCAACCCATTCTCTGGACTGTTCTGCTCCATGTAT	48
M I L N C N P F S G L F L S M Y	16
CTGGTCACAGTGGCTTGGGAACTTGCTCATCATCCTGGCTGTGAGCTCTAATTCACATCTC	108
L V T V L G N L L I I L A V S S N S H L	36
I	
CACAACCTCATGTATTCTCTCTCCAATCTGTCTTTGTTGACATCTGTTTCATCTCA	168
H N L M Y F F L S N L S F V D I C F I S	56
II	
ACCACAATACCAAAAATGCTAGTGAACATACATTACAGACAAAAGACATCTCCTACATA	228
T T I P K M L V N I H S Q T K D I S Y I	76
GAATGCCCTTTCACAGGTATATTTTTAACTACTTTTGGTGGAAATGGATAATTTTTTACTC	288
E C L S Q V Y F L T T F G G M D N F L L	96
III	
ACTTTAATGGCCTGTGATCGCTATGTAGCCATCTGCCACCCCTCAACTACACTGTAATC	348
T L M A C D R Y V A I C H P L N Y T V I	116
ATGAACCTTCAGCTGTGTGCCCTTCTGATTCGATGTTTTGGTTAATCATGTTCTGTGTCT	408
M N L Q L C A L L I L M F W L I M F C V	136
IV	
TCCCTGATTCAATGTTCTATTGATGAATGAATGAACTTCTCCAGAGGCACAGAAATTC	468
S L I H V L L M N E L N F S R G T E I P	156
CATTTCTCTGTGAACTGGCTCAAGTCTTAAGTAGCCAATTCGACACTCATATCAAT	528
H F F C E L A Q V L K V A N S D T H I N	176
AATGTCTTCATGTATGTGGTGACTTCCCTACTAGGACTGATCCCTATGACAGGAATACTT	588
N V F M Y V V T S L L G L I P M T G I L	196
V	
ATGTCTACTCACAGATTGCTTCATCCTTATTAAGATGTCTTCTCTGTGAGTAAGTAC	648
M S Y S Q I A S S L L K M S S S V S K Y	216
AAGGCCCTTTCCACCTGTGGATCTCACCTCTGTGTGGTCTCTTTATTCTATGGGTCAGCA	708
K A F S T C G S H L C V V S L F Y G S A	236
VI	
ACTATAGTTTACTTCTGCTCTTCTGTCTCCATTCTACACACAAGAAAATGATTGCTTCA	768
T I V Y F C S S V L H S T H K K M I A S	256
TTGATGTACTGTAATCAGCCCATGCTGAACCCCTTTATCTATAGCCTGAGAAACAAG	828
L M Y T V I S P M L N P F I Y S L R N K	276
VII	
GATGTAAGGGTGCCCTTGGAAAACCTTTTCATCCGAGTTGCCCTTGGCCATTGTGGAGC	888
D V K G A L G K L F I R V A S C P L W S	296
AAAGACTTTAGACCTAAATTCATACTAAAACCTGAAAGGCAAAGTTTATAACAAACCTC	948
K D F R P K F I L K P E R Q S L *	312
TCCTGGCTCATTTGTATCATAAAATATATGCCTAATTTACACTATTCTAAAAGTATATAT	1008
AGCTTGTCAATTTGTGTACTTTCTACAAAAAATATTTAATTCCTATGCATATGTTTAA	1068
AATTTGCAATCTTGTATGTC	1090

図 1-2-1 cDNAクローン、GUST27の塩基配列および推定されるアミノ酸配列
 インフレームの終止コドン★を示した。予想される膜貫通部位をアンダーライ
 ンにより示した。

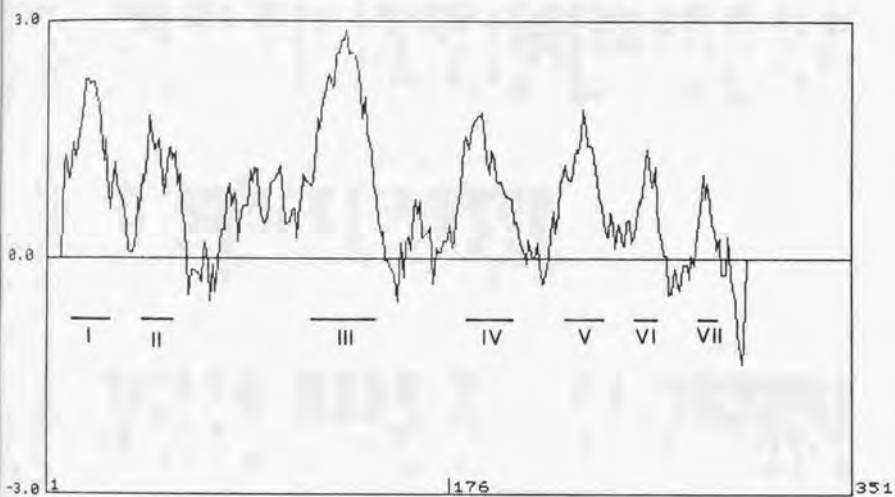


図 1-2-2 GUST27のハイドロパシー

縦軸はKyte and Doolitらの方法より計算した疎水性を示し、

横軸はアミノ酸の位置を示す。

7回の主な疎水性部位はバー(I-VII)で示した。

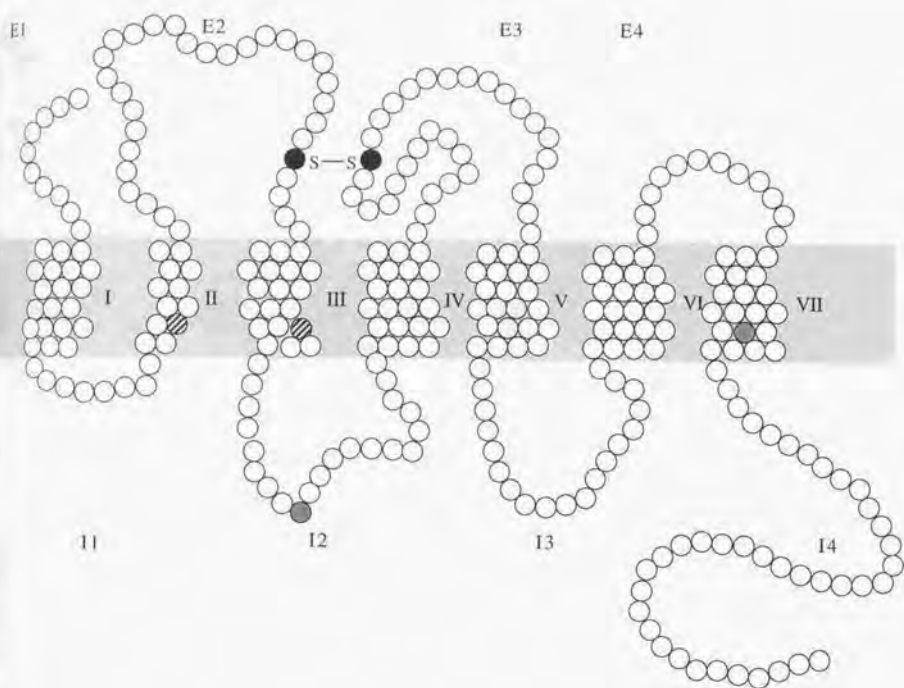


図1-2-4 アミノ酸配列より予測されるGUST27蛋白質の構造模式図

G蛋白質共役型レセプターに共通に保存されている配列

- Cysによるジスルフィド結合
- Proによる折りたたみ構造
- ▨ 疎水結合の可能性のあるLeu

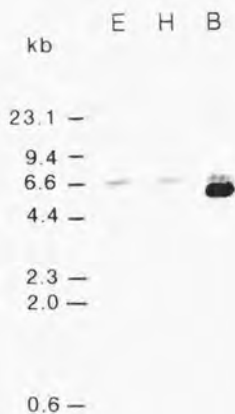


図1-2-5 GUST27に対応する遺伝子の解析
 ラットの肝臓由来のゲノムDNAを制限酵素*EcoR* I (E), *Hind* III (H),
*Bam*H I (B)で消化しGUST27 cDNAをプローブとして用いゲノムサザン解析
 を行った。

Tongue epithelium
 Tongue total
 Testis
 Retina
 Brain
 Liver
 Kidney
 Lung
 Pancreas
 Small intestine
 Skeletal muscle
 Smooth muscle

28S —

18S —

図1-2-6 ノーザンブロットによるGUST27のmRNAの発現の解析
 RNAのサンプリングとして左側から順に舌上皮、舌全体、精巣、網膜、脳、肝臓、
 腎臓、肺、脾臓、小腸、骨格筋、平滑筋（各2 µg）を用いた。
 左端に28Sと18SのrRNAの位置を示した。

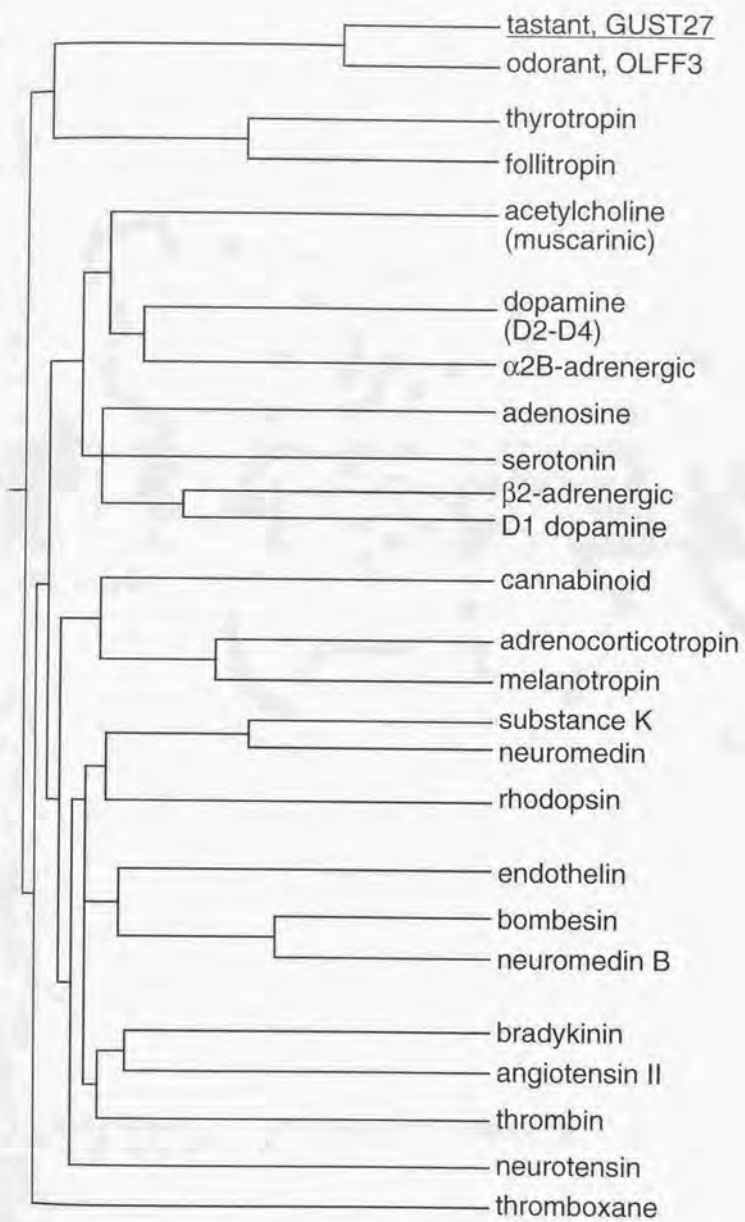


図1-2-7 アミノ酸配列の相同性から模式的に示したGUST27および代表的なG蛋白質共役型レセプターの系統樹

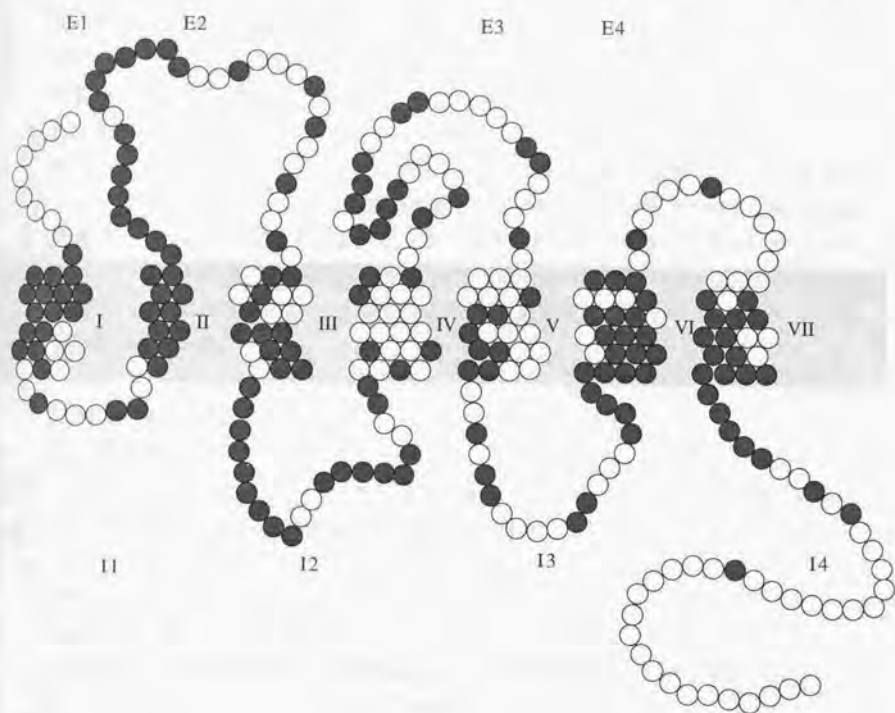


図1-2-8 GUST27と嗅覚レセプターOLFF3のアミノ酸配列の比較
 ● 相同性のある配列

第3節 *In situ* ハイブリダイゼーションと抗体染色による GUST27の発現の解析

1. 緒言

第1、2節により舌の上皮に発現している6つのグループに分類できる60種以上のGタンパク質共役型レセプターの遺伝子ファミリー(PTE)およびcDNAクローンGUST27を明らかにした。PTE、GUST27の両者ともノーザンプロット解析により舌上皮に特異的に発現していることが明らかになった。しかしながら、ノーザンプロット解析に用いた舌上皮由来のmRNAには上皮の下にある筋層由来mRNAも含まれており、GUST27の筋層での発現を検出している可能性も残っているままである。また、ノーザンプロット解析では舌の上皮内の細胞レベルでの発現部位が解析できない。PTEおよびGUST27が味覚レセプターの候補となるにはそれぞれが味物質を受容できる組織に発現している必要がある。そのことを確認するためには組織化学的実験が欠かせない。そこで、本節ではPTEおよびGUST27のmRNAの発現部位を*in situ* ハイブリダイゼーションにより解析し、GUST27に関しては抗体染色も行ってより詳細な発現部位の検討を行った。

2. 実験材料・試薬・器具

2-1 実験材料

ラット (Fisher)、ウサギ (ニュージーランドホワイト種) は日本生物材料から購入した。スライドガラスはMatsunami Glass社より購入した。

2-2 試薬類

2-2-1 キット類

Dig-RNA-Labeling mixtureはBoehringer-Mannheim山之内株式会社より購入した。

2-2-2 *in situ* ハイブリダイゼーション用試薬

Anti-digoxigenin-POD(peroxydase) Fab fragments はBoehringer-Mannheim山之内株式会社から購入した。

2-2-3 抗体染色用試薬

goat antirabbit rhodamine はBiomedical Technologies社より購入した。

2-3 調製溶液類

下線を付した試薬は本項目中に記されている。

(1) 切片作成用試薬

ブアン溶液

ピクリン酸飽和溶液；ホルムアルデヒド；酢酸を15：3：1になるように混合した。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーション用試薬

可能な限りDEPCを最終濃度0.01%になるように加え一晩放置することによりRNaseを失活させ、その後オートクレーブしてDEPCを分解して用いた。DEPCにより性質に変化をきたす試薬はDEPC処理水で調製した。

[i] DEPC処理水

蒸留水にDEPCを最終濃度0.01%になるように加え一晩放置することによりRNaseを失活させ、その後オートクレーブしてDEPCを分解した。

[ii] 0.2 Mリン酸バッファー (1l) : NaH₂PO₄ (2水) 5.93 g
 Na₂HPO₄ (12水) 58 g

[iii] 4%パラホルムアルデヒド

4gのパラホルムアルデヒドを50 mlのH₂Oに少量のNaOHを加え加熱して溶解し、常温に戻した後、0.2 Mリン酸バッファを50 ml加えた。

[iv] トリトン・サポニン溶液 : 0.25% トリトンX 100
 0.25% サポニン

をPBSに溶解した。

[v] グリシン/トリリス溶液 : 0.75% グリシンを0.2 Mトリリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)に溶解した。

[vi] 0.25%無水酢酸溶液 : 0.25%無水酢酸を0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)に溶解した。

[vii] ハイブリダイゼーションバッファー : 5 µg/ml cRNA probe
 5×SSC
 1×Denhardt's溶液
 100 µg/ml heparin
 10 mM DDT
 100 µg/ml tRNA
 10% dextran
 50% formamide

[viii] DAB溶液 (毎時調製)

DAB 20 mgを約75 mlの0.05 Mトリリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)に溶解した。これに蒸留水で5% (6倍希釈)にした過酸化水素水0.1 mlを加えて使用した。

(3) 抗体染色用試薬

グリセリン溶液

10% グリセリン/0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)

他の調製試薬は第1、2章に準じた。

2-4 *in situ* ハイブリダイゼーション用器具の準備

実験にRNAを用いるため、常にRNaseの混入に注意を払う必要がある。そのため *in situ* ハイブリダイゼーション用の器具は乾熱できるものは210℃で2時間乾熱し、乾熱不可能なものはDEPCを最終濃度0.01%を加えた水中に一晩放置することによりRNaseを失活させ、その後オートクレーブしてDEPCを分解して使用した。

3. 実験方法

下線を付した試薬は2-3に記した。

3-1 組織切片の作製

ラット (Fisher オス 5週齢) の心臓から0.01%DEPCを含む生理食塩水を還流し、次いでブアン溶液を還流して固定を行った。その後、舌を摘出し有郭乳頭を含む部分と茸状乳頭を含む先端部分に切断しブアン液で一晩更に固定した。その後、70%エタノールに2時間、80%エタノールに1時間、90%エタノール1時間、95%エタノール1時間、100%エタノール1回目1時間2回目2時間、キシレンに3時間入れ脱水を行い、溶解しているパラフィン中に60度で4時間浸透させた後、室温に戻してパラフィンを固めてブロックを作製した。切片は5 μ mの厚さでマイクロトームを用いて作製し、37度で一晩乾燥させて実験に用いた。

3-2 切片の脱パラフィン

切片をキシレン15分、100%エタノール15分2回、95%エタノール5分、90%エタノール5分、80%エタノール5分、70%エタノールで10分処理した。

3-3 切片の脱水

切片を70%エタノールに10分、80%エタノールに10分、90%エタノール5分、95%エタノール5分、100%エタノール15分2回、キシレンで15分処理した。

3-4 ヘマトキシリンによる核の染色 (DABによる発色の後に行った)

ヘマトキシリン液で2分間染色を行い、流水で十分に洗浄を行った。

3-5 *in situ* ハイブリダイゼーション

(1) ゼラチンコートスライドガラスの作製

スライドガラスは洗剤につけた後、水洗し、100% EtOHに浸し次いで乾熱処理した。60℃湯煎中で0.5%ゼラチン溶液を調製して完全に溶解させた後、最終濃度

0.05%になるようにクロム明礬を加えて40℃に温度を下げた。乾熱したスライドグラスをこのゼラチン溶液で15分コートした後取り出して風乾した。風乾後1%ホルムアルデヒド溶液に10分間入れてから再び風乾した。完全に風乾した後、45℃でさらに一晩乾燥させ湿度の低い場所で保存した。

(2) プロープの作成

cRNA プロープとして用いる配列をpBluescript SK⁺に組み込みアンチセンス、センスのプロープを作成するのに使用した。pBluescriptのT7、T3プロモーターを各々単独に用いてアンチセンス、センスのプロープを作成するために、使用しないプロモーター側の5'末端が突出する適当な制限酵素サイトをその制限酵素で完全に分解し、1%となるようにSDSを加え、0.1 μgになるようにプロテイナーゼKを加え、37℃で1時間反応させ残存リボヌクレアーゼを完全に分解した。2回のフェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行った後、10 μlのDEPC水に溶解し、うち1 μgをDig-RNAラベリングキットを用いて20 μlのスケールでディゴキシゲニンラベルRNA (以下、Dig-RNAと略す) を合成した。37℃、2時間の反応後1 μlの0.5 M EDTAを加えて反応を停止させ、うち1 μlを取り、電気泳動を行ってDig-RNAが合成されていることを確認した。反応液に2 μlの4 M塩化リチウムと10 μgの大腸菌tRNAおよび75 μlのエタノールを加えて合成したDig-RNAを-80℃で沈澱させ、冷却遠心により回収し、20 μlのTE (pH 8.0) に溶解して再度塩化リチウムで沈澱させた。減圧下乾固させたDig-RNAを、最終的に40 μlのDEPC水に溶解して、RNaseインヒビターを0.5 μl加えて使用時まで-20℃で保存した。

(3) ハイブリダイゼーション

切片の脱パラフィンを行いPBSで5分間洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで15分間処理し固定を行った。トリトン・サポニン溶液に15分間処理することにより細胞膜に傷害を与え、グリシン/トリソ溶液で15分間処理し標本に残存するパラホルムアルデヒドを中和した。0.25%無水酢酸溶液に10分間入れた後1 mg/ml Proteinase K / PBSで37度5分間処理し、細胞中の蛋白質を分解することにより、細胞内のmRNAとプロープのcRNAがハイブリダイズしやすい状態にした。4%パラホルムアルデヒドで5分間再固定を行うと共に Proteinase K を失活させグリシン/トリソ溶液で15分間処理し残存するパラホルムアルデヒドを中和した。2×SSC / 50%ホルムアミド液中で1時間放置した後、45℃または50℃で5 μg/mlになるようにcRNA プロープを加えたハイブリダイゼーションバッファーと18時間ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC / 50%ホルムアミド液中で1時間、1×SSC / 50%ホルムアミド液中で1時間、1×SSCで20分間×2回洗浄をハイブリダイゼーションと同じ温度で行った。PBSで5分間洗浄し5% normal goat serum / PBSで20分間ブロッキングを行った後、HRP標識抗ディゴキシゲニン抗体を60分間反応させた。PBSを用いて5分間×3回洗浄した後、

DAB溶液で発色させ適当な時間に発色反応をH₂Oで止めた。核の染色の必要のある場合は行い、脱水後、封入剤を用いて封入し顕微鏡で切片の観察を行った。

3-6 抗ペプチドポリクローナル抗体の作成

(1) 抗原ペプチドの合成

ペプチド抗体に用いたペプチドはペプチド合成機(パーキンエルマー・ジャパンアプライドシステム Model 430A)を用いて合成した。

(2) KLH-MBS-ペプチドコンプレックスの調製

50 mMカリウム／リン酸緩衝液(pH 7.5)1.5 mlに、担体として用いるKLH 0.5 mlと40 μ lのMBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)とを加え、室温で30分間攪拌した。この溶液をPD10カラムにかけ、上記の緩衝液2.5~4.5 mlの間で溶出される分画をKLH-MBSコンプレックスとして回収した。次にパーキンエルマー430Aで合成したペプチドは脱保護試薬で脱保護し、冷ジエチルエーテルで洗浄し、適量の50 mM 2-メルカプトエタノールに溶解し一晩凍結乾燥した。このペプチド約10 mgを4.5 mlの100 mMカリウム／リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、これに上記のKLH-MBSコンプレックス分画500 μ lを加えて4℃で一晩緩やかに攪拌して反応させ、KLH-MBS-ペプチドコンプレックスを生成させ、これを抗原として用いた。

(3) ウサギへの免疫

(2)で作製したKLH-MBS-ペプチドコンプレックス溶液1 mlに、2 mlのコンプリートアジュバントを加え、よく混合して完全に均一にし、これをウサギ(ニュージージーランドホホワイト種)の左右後肢指間に0.3~0.4 mlずつ注射した。2週間後、コンプリートアジュバントの代わりにインコンプリートアジュバントを用いて同様の混合液を作成し、ウサギの背部に注射した。さらに抗体ができるまで2週間ごとに注射をし、耳動脈から少量採血を行いELISA法で抗体が産成されていることを確認した後に頸動脈から全採血を行った。

採取した血液は室温で1時間保温し、続けて4℃で一晩放置し3000 rpm、4℃、10分間遠心した後の上清を血清画分とし、抗体染色に用いた。

3-7 抗体染色

組織切片の脱パラフィンを行いPBSで洗浄し、5% normal goat serum / PBSで20分間ブロッキングを行った後、一次抗体として作成した抗原ペプチドに対する抗血清を20分の1の濃度になるように1%BSA-PBSで希釈し、組織切片と室温で60分間反応させた。その後PBSで3回洗浄し二次抗体である蛍光物質ローダミンで標識したgoat anti rabbit IgGと30分間反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、グリセリン溶液で接着し蛍

光顕微鏡で切片の観察を行った。

4. 結果

4.1 *in situ* ハイブリダイゼーションによるGUST27mRNAの発現部位の解析

GUST27は味覚に関与するレセプターであると考え、実験には味蕾の多く存在する有郭乳頭を含む舌の奥全体の組織と、味蕾が点在して分布している茸状乳頭を含む舌の前部全体の組織を用いた。

GUST27のN端は他のG蛋白質共役型レセプターとのホモロジーが非常に低い。よって、GUST27のN端(図1-3-1a) *EcoR* I-*Hinc* II断片で得られるフラグメントを基にデオキシゲニンラベルcRNAプローブを作成して用いた。PTEファミリーは6つのグループのそれぞれの代表のクローンをプローブとして用いた(図1-3-1b)。

ハイブリダイズした場所はDABによる褐色の沈着物として検出した(図中褐色)。また細胞の位置をはっきりさせるために一部の切片はDABによるcRNAプローブの検出後、ヘマトキシリンで核を青色に染色した。

まずGUST27をプローブとしてハイブリダイゼーションの温度を45℃と比較的緩やかな条件にして舌の前部の茸状乳頭を含む切片を用いた。アンチセンスプローブを用いると、味蕾を含む茸状乳頭の存在する舌の表側の上皮にのみ褐色の発色が見られた(図1-3-2-a-上)。味蕾が存在せず味を感じない舌の裏側には発色しなかった(図1-3-2-a-下)。また、上皮以外の筋層を中心とした組織は発色しなかった。ネガティブコントロールとしてGUST27に対するセンスのプローブを用いると、舌の組織のどこにも発色しなかった(図1-3-2-b)。このことにより、GUST27mRNAは味蕾を含む舌の上皮に発現し、味蕾を含まない上皮、筋層には発現していないことが明らかとなった。次に、ハイブリダイゼーションの温度を50℃に上げることで条件を厳しくして行ったところ、味蕾に強く発色し、他の上皮には弱く発色した(図1-3-2-c)。次に45℃でハイブリダイズし倍率を上げて観察したところ、GUST27mRNAは味蕾全体に発色が見られた(図1-3-2-d)。以上の結果、GUST27mRNAは味蕾に発現すると同時に、味蕾を含んでいる上皮にも発現することが確認された。次に舌の奥の味蕾が多く集まっている有郭乳頭の切片を用いて45℃で同様の実験を行った。アンチセンスなプローブを用いると、舌の前部と同様に味蕾を含む上皮に発色し、それ以外の筋層を中心とする組織には発色しなかった(図1-3-3-a)。またセンスプローブを用いた場合は発色しなかった(図1-3-3-b)。さらに味蕾を観察するために倍率を上げたところ味蕾細胞は上皮細胞に比べ細胞が大きいために発色が薄いように見受けられるが、発色のない筋細胞と比べると細胞の中は明らかに発色していることが観察できた(図1-3-3-c)。

次にPTEファミリーについてもそのmRNA発現を調べた。GUST27と同様に茸状乳頭を含む舌の前部では、45℃で行うと舌の表側の味蕾を含む上皮に発色し(図1-3-4-a)、

温度を50℃に上げることにより条件を厳しくして行くと、特に味蕾に発色した。舌の表側の上皮にも弱い発色がみられた(図1-3-4-b)。舌の裏側の上皮、筋層などそれ以外の組織には発色はみられなかった。味蕾の部分拡大し味蕾の細胞における発色を確認した(図1-3-4-c)。次に、有郭乳頭の切片を用いて温度を50℃に上げ、厳しい条件でハイブリダイゼーションを行ったところ味蕾が多く集まっている部分の味蕾および味蕾を取り囲んでいる上皮にのみ強く発色し、他の味蕾を含んでいない上皮は弱い発色であった(図1-3-4-d)。GUST27の時と同様に筋層を中心とする他の組織には、発色しなかった。図1-3-4-a、b、c、dはPTE01(a)、PTE03(b)、PTE45(c)、PTE58(d)をプローブとして行った場合のデータのみであるが、実際はその他PTE33とPTE38についても同様の実験を行った。その結果、グループによる発色の傾向の差はなかった。

4-2 GUST27の抗体による抗体染色

in situ ハイブリダイゼーションではGUST27のmRNAの組織特異性をおおまかに観察することができた。しかしながら、遺伝子が実際に機能している段階である蛋白質の蓄積を調べるには、蛋白質のレベルで解析を行う必要がある。そのために、抗体染色を行うことにした。

本研究ではGUST27の部分ペプチドを作成し、抗原として用いた。抗原ペプチドの配列は、疎水的なアミノ酸配列でないことと、他のGタンパク質共役型レセプターと相同性の低いことに留意して決定した(図1-3-5)。図に示したように、5番目と6番目の膜貫通部位の間、つまり3回目の膜内部位であるためこの部位をI3と呼んだ。I3は他のG蛋白質共役型レセプターとホモロジーが低く、最も高いOLFF3でも55%であり、GUST27の中では疎水性が低い部位であるのでI3を抗原として用いることにしてI3のペプチドを合成し、ウサギを用いてI3の抗血清を得た。

味蕾を含む切片を容易に得るために、舌の有郭乳頭の切片を用いた。有郭乳頭の5 μ mの厚さの切片と、I3の抗血清を用いて染色を行った。その結果発色は味蕾に特異的に強くみられることが明らかとなった(図1-3-6)。味蕾を含んでいる上皮の部分も発色していたが、*in situ* ハイブリダイゼーションの時と比べると、今回の抗体染色の方が味蕾特異的発色が強く、上皮の発色は弱くなっていた。それ以外の組織には発色は認められなかった。

5. 考察

GUST27mRNAおよびPTEmRNAは*in situ* ハイブリダイゼーションにより茸状乳頭および有郭乳頭の味蕾に発現していることが証明された。さらに抗体染色の結果、GUST27蛋白質の発現も味蕾に認められた。序論で述べたように、味の受容が味蕾で行われること、味—少なくとも甘味・苦味—受容にはG蛋白質共役型レセプターが関

与していること、味蕾にはGai蛋白質であるGagustが発現すること等を考慮すると、GUST27はじめPTEは味覚に関与するレセプターであると考えるのが妥当であると結論した。

しかしながら、GUST27、PTEは味蕾のみでなく舌上皮にも存在が認められた。この点については以下のように考えている。

(1)舌の上皮は味蕾と起源を同じくするものであり味蕾が脱落后に再生する際には味蕾の周辺の上皮細胞が分化する(Beidler and Smallman, 1965)ことから、上皮細胞にも味蕾に関与するmRNAの発現の可能性がある。

(2)上皮細胞の機能に関する知見がほとんどないが、これらの細胞が基本味以外の味(例えば辛味、渋味等)やテクスチャー(温度差等の化学的刺激および固さ柔らかさ等の物理的刺激等)等の広範囲な味の認識に関与する可能性も否定できない。今回得たレセプターがこのような味受容レセプターとして働いていることも想定される。

(3)塩味はアミロライドで阻害されるナトリウムチャンネルの開閉により伝達される(Heck et al., 1984)。最近、Liら(1994)はこのナトリウムチャンネルをクローン化し、それを用いて、*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。その結果、このチャンネルは味蕾のみでなく舌上皮全般に発現していることが明らかになり、この結果は筆者のGUST27およびPTEからの結果と一致する。

すなわち「味覚の伝達」のための装置(分子)は味蕾に存在することは必須であるが、味蕾以外の上皮細胞に存在していてもなんら不都合はないと考えられる。以上より、GUST27およびPTEは味覚レセプターである可能性が高いことが示された。今後のレセプター下流のGタンパク質以降のシステムの決定、より詳細な発現部位の検討、リガンドの検索等の課題に対する結果が待たれる。

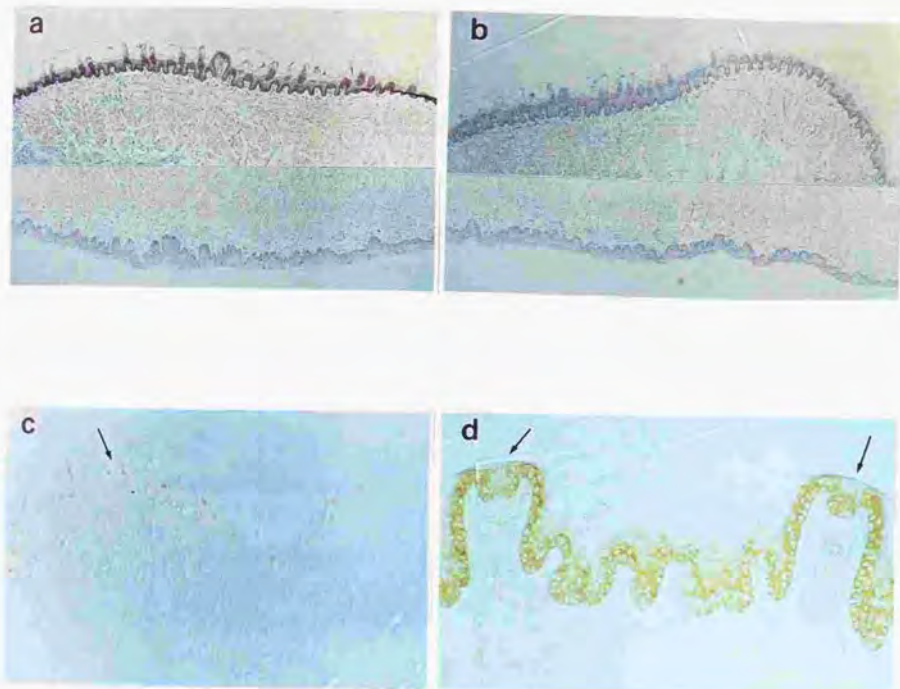


図1-3-2 茸状乳頭の切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる GUST27mRNAの発現部位の解析

プローブ	反応温度	核染色	写真の倍率
a. アンチセンスGUST27	45℃	有	30倍
b. センスGUST27	45℃	有	30倍
c. アンチセンスGUST27	50℃	無	40倍
d. アンチセンスGUST27	45℃	無	160倍

矢印は味蕾を示している。

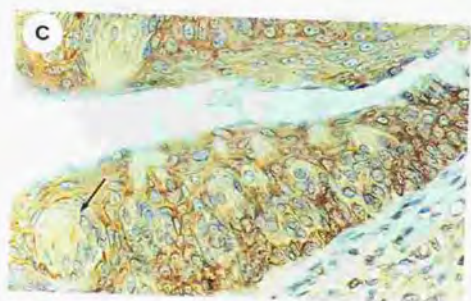
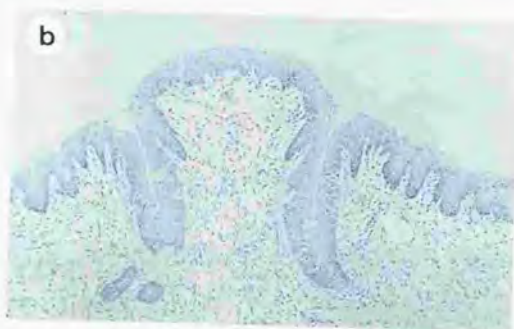
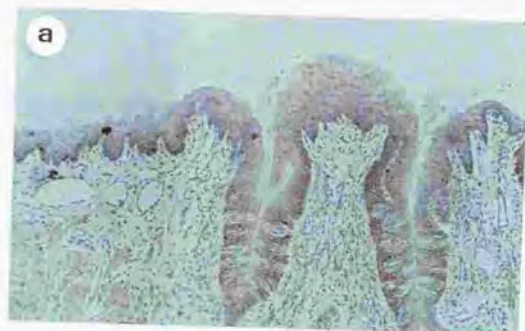


図1-3-3 有郭乳頭の切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる GUST27mRNAの発現部位の解析

プローブ	反応温度	核染色	写真の倍率
a. アンチセンスGUST27	45℃	有	80倍
b. センスGUST27	45℃	有	80倍
c. アンチセンスGUST27	45℃	有	360倍

矢印は味蕾を示している。

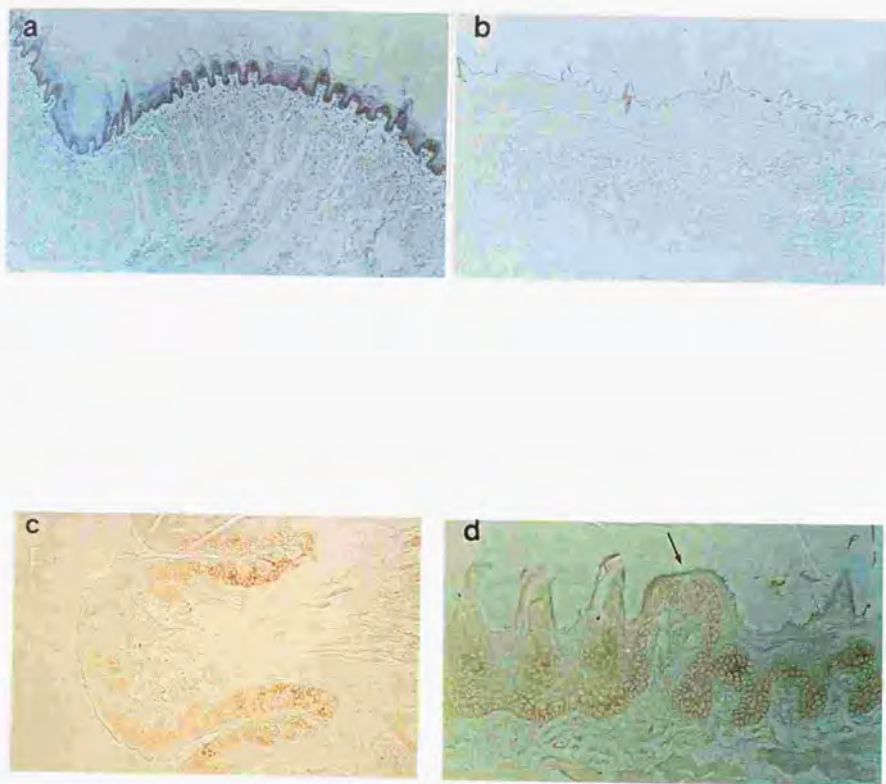
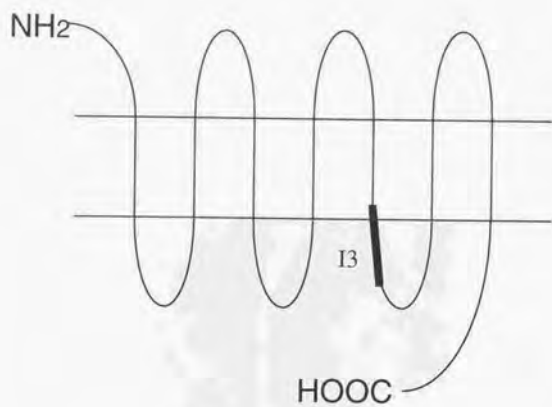


図1-3-4 *in situ* ハイブリダイゼーションによるPTE mRNAの発現部位の解析

用いた組織	プローブ	反応温度	核染色	写真の倍率
a. 茸状乳頭を含む舌表面	アンチセンスPTE01	45℃	有	30倍
b. 茸状乳頭を含む舌表面	アンチセンスPTE03	50℃	無	30倍
c. 有郭乳頭	アンチセンスPTE45	50℃	無	40倍
d. 茸状乳頭	アンチセンスPTE58	45℃	無	160倍

矢印は味蕾を示している。



I3 SYSQIASSL (太線部に位置する)

図1-3-5 GUST27に特異的な抗体を作成するための抗原ペプチドの決定

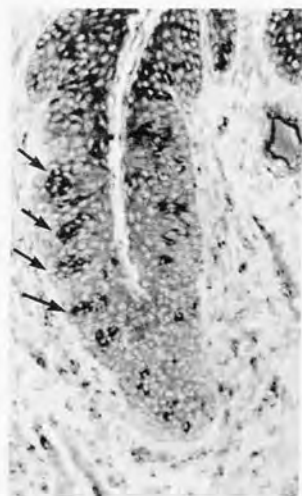


图1-3-6 有郭乳頭切片を用いたI3抗体による抗体染色(250倍)
矢印は味蕾を示している。

第二章

舌上皮味覚受容組織に発現する

Gタンパク質 α サブユニット

1. 緒言

第一章に於いて、筆者はラット舌上皮中に少なくとも60個のGタンパク質共役型レセプターが遺伝子ファミリーを形成して存在することを示した。これらのレセプターにリガンドが結合すると、レセプターに共役する三量体GTP結合タンパク質（以下Gタンパク質と略す）によってシグナルが細胞内に変換される。第一章で得たレセプター、PTEおよびGUST27に共役するGタンパク質の種類は明らかにならなかったが、味覚シグナリング機構を解明する上で、味覚レセプターと共役するGタンパク質を明らかにすることは重要である。なぜならGタンパク質の種類によってエフェクターおよびセカンドメッセンジャーを推定でき、その生理作用を予想することが可能となるからである。そこで、第一章に続く研究として味蕾に発現して味覚レセプターと共役する可能性のあるGタンパク質の解析を試みた。

Gタンパク質は α 、 β 、 γ サブユニットから成り、Gタンパク質共役型レセプターにリガンドが結合すると活性化状態になり α サブユニットと β γ サブユニットに分かれて機能する。Gタンパク質は、アデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内セカンドメッセンジャーcAMPを上昇させるGs (Quan *et al.*, 1991)、アデニル酸シクラーゼを不活性化、またはPDEを活性化して細胞内セカンドメッセンジャーcAMPを減少させるGi (Katada *et al.*, 1984)、PLC- β を活性化し細胞内のセカンドメッセンジャー、IP₃の濃度を上昇させるGq (Smrcka *et al.*, 1991)に大別される。Gタンパク質の主な性質は α サブユニット (G α タンパク質)を反映する 경우가多く、現在までにクローニングされたG α タンパク質は、その機能および相同性からGasファミリー、G α iファミリー、G α qファミリー、未だにその特異的な機能は明らかでないG α 12ファミリーの4つのファミリーに分けられる(Simon *et al.*, 1991) (図2-1)。また、 β γ サブユニットはその機能に関してあまり研究が進んでいなかったが、近年、 β γ サブユニットもシグナル伝達に関与し、エフェクターを調節することが明らかになりつつある。主に知られていることとして、Giの β γ サブユニットがPLC- β を活性化すること(Camps *et al.*, 1992, Katz *et al.*, 1992)や、MAP Kinaseを介した系を活性化すること(Crespo *et al.*, 1994)、Gタンパク質共役型レセプターリン酸化酵素と結合することなどが挙げられる(Pitcher *et al.*, 1992)。

味覚のシグナル伝達系におけるGタンパク質の存在は、生理学、生化学によって示唆されてきた。味細胞に糖の甘味物質を添加すると、細胞内のcAMP量が増加することからGasファミリーの関与が示されている。また、糖以外の甘味物質であるsc-45647、サッカリンや苦味物質を添加すると細胞内IP₃量が増加することや、苦味物質が引き起こすIP₃量の

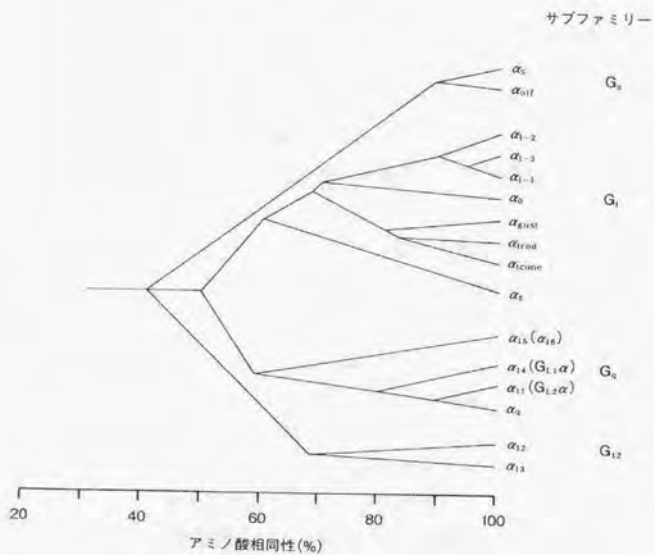


図2-1 現在までに明らかになっているGαタンパク質およびその分類
 (宇井理生編 「GTP結合タンパク質」より引用)

増加をGiの阻害剤である百日咳毒素が阻害することも示されている(Spielman *et al.*, 1994)。よって糖以外の甘味、苦味にはGaqファミリー、あるいはGiの $\beta\gamma$ サブユニットの関与が考えられる。また、苦味が細胞内のPDEを活性化する(Price, 1973)ことよりGiの α サブユニット(Gaiファミリー)も苦味に関することも示唆されてきた。特にGaiファミリーに属し網膜の桿体に発現しているGat-rodは味蕾にも存在し(McLaughlin *et al.*, 1994, Ruiz-Avila *et al.*, 1995)、苦味のレセプターにより活性化された後PDEを活性化する(Ruiz-Avila *et al.*, 1995)ことが近年示唆されている。

分子生物学的研究は、1992年にMcLaughlinらが行った味蕾特異的発現を示すgustducin (Gagust)のクローニングが皮切りとなって始まった。McLaughlinらは同時に味蕾を含む舌上皮にGai2、Gai3、Gai4、Gai12、Gas、が存在することをRT-PCRにより示した。1994年に更にGat-rod、Gat-coneが存在することも示している。Spielmanらも、1994年にウェスタンブロット解析により舌上皮にGai2、Gaoの存在を示唆している。しかしながら、これらの中で味蕾に発現することが確認されているのはGagustとGat-rodのみである。

本章では、研究対象としてGタンパク質の主な機能を担う α サブユニット(G α サブユニット)に焦点をあて、味蕾に発現している種類を検索することを目的とした。また、味蕾細胞の類型化をもう一つの目的とした。序論でも記述したとおり、味蕾はI~IV型の細胞種で構成される40~70個の細胞集団であり、このうちIII型が味を受容する味細胞とされているが、光学顕微鏡レベルでは形態上の区別ができない上、マーカーとなりうる分子も全く特定されていない。また、ある味覚物質に特異的に反応する細胞が存在するのか、もしあるとすれば形態学的、または分子生物学的に特徴があるのかといった課題には全く手がつけられていない。そこで、味蕾細胞におけるG α サブユニットの発現様式および発現部位を解析し味蕾内での役割を考察すると共に、味蕾細胞をG α サブユニットを指標に分類した。

2. 実験材料および試薬

2-1 実験材料

実験動物は第一章と同様の物を用いた。

2-2 試薬類

2-2-1 酵素

コラゲナーゼ Type IIはSigma社より購入した。

2-2-2 抗体

アルカリフォスファターゼ標識抗ティゴキシゲニン抗体はBoehringer-Mannheim社の製品を用いた。抗Gas、抗Gaq、抗Gagust抗体はSanta Cruz社より、抗Gai1/Gai2、抗Gai3抗体はCalbiochem社より、ビオチン標識抗ウサギIgG抗体はImmunotech, S. A.社より購入した。

2-2-3 キット類

ABC KitはVector Laboratory社より、ECLウェスタンブロットティング検出試薬はAmersham社より購入した。

2-2-4 プラスミド

活性型変異Gaq発現用プラスミドpGaqQ209L (Watanabe *et. al.*, 1995)は東京大学医学部、本田善一郎博士より分与して頂いた。

2-2-5 カラム

100bp以下の核酸を除くカラム、CHROMA SPIN-100はクローンテック社より購入した。

2-2-6 組織包埋剤

包埋剤 O.C.T. コンパウンドはMILES社より購入した。

2-3 調製溶液類

下記以外の試薬に関しては第一章と同一のものを用いた。

2-3-1細胞実験用試薬

[i] リンガー溶液:	NaCl	150 mM
	KCl	4.7 mM
	CaCl ₂ ·H ₂ O	3.3 mM
	HEPES	2 mM
	Glucose	7.8 mM
	MgCl ₂	0.1 mM

[ii] -Ca ⁺⁺ EDTA溶液:	NaCl	150 mM
	KCl	4.7 mM
	HEPES	5 mM
	Glucose	7.8 mM
	EDTA	2 mM

[iii] 0.1% BSA/リンガー溶液：リンガー溶液にBSAを0.1%になるように加え、0.22 μm のフィルターにより濾過して用いた。

[iv] DMEM培地：
DMEM粉末 (ニッスイ) 9 g
NaHCO₃ 1.63 g
硫酸ストレプトマイシン 0.1 g
ペニシリンGカリウム $1 \times 10^6 \text{U}$

を900 mlの水に溶解し、0.22 μm フィルターで濾過した。使用時にはFCSを10%加え、1N NaOHを用いてpHを7付近に調整して用いた。

2-3-2 アルカリフォスファターゼ発色用試薬

[i] 発色用バッファー：
Tris-HCl (pH 9.5) 100 mM
NaCl 100 mM
MgCl₂ 5 mM

[ii] ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)は75 mg/mlになるように70%ジメチルホルムアミドに溶解した。

[iii] リン酸プロモクロロインドリル(BCIP)は50 mg/mlになるようにジメチルホルムアミドに溶解した。

発色時には1 mlの発色用バッファー中にNBT 5 μl 、BCIP 5 μl を添加して用いた。

2-3-3 *in situ* ハイブリダイゼーション用試薬

ハイブリダイゼーション溶液：
ホルムアミド 50%
5xSSC
5xデンハルト溶液
サケ精子DNA 500 $\mu\text{g/ml}$
tRNA 250 $\mu\text{g/ml}$
DTT 1 mM
cRNAプローブ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

*in situ*ハイブリダイゼーションに用いる試薬、器具の準備は、基本的には第一章と同様に行った。スライドガラスは2%シラン/アセトンに浸漬して乾熱したものをを用いた。

2-3-4 single-cell RT-PCR用試薬

[i] 5 x First バッファー：
Tris-HCl (pH 8.3) 250 mM
KCl 325 mM
MgCl₂ 15 mM

[ii] 4 x RT バッファー：
40 μM (各) 4d(NTP)
2 μg/ml ランダムプライマー

[iii] 10 x PCR バッファー：
Tris-HCl (pH 8.4) 200 mM
KCl 500 mM
MgCl₂ 15 mM

[iv] PCR バッファー1 (1サンプル当たり)：2 mM (各) 4d NTP 7 μl
10 x PCR バッファー 7 μl
H₂O 50 μl

[v] PCR バッファー2 (1サンプル当たり)：

プライマーの配列および組み合わせは結果の図中に示した。

2 mM (各) 4d NTP 3 μl

10 x PCR バッファー 3 μl

プライマーA (50 pmol/μl) 1 μl

プライマーB (50 pmol/μl) 1 μl

H₂O 22 μl

2-3-4 抗体染色用試薬

クロロナフトール：
4-chloro-1-naphthol 10 mg
EtOH 1 ml
Tris-HCl (pH 7.6) ~50 ml

クロロナフトールをEtOHに溶解し、その後Tris-HCl (pH 7.6)を45 ml加え、室温で30分間攪拌した。濾過した後、pHを7.6に調整し、Tris-HCl (pH 7.6)を用いて50 mlにし、分注して-20℃で保存した。使用時にはH₂O₂を0.03%になるようにして用いた。

3. 実験方法

下線を付した試薬は2-3に記した。

3-1 有郭乳頭と葉状乳頭の上皮の単離

ラットから舌を摘出した後、有郭乳頭と葉状乳頭直下にコラゲナーゼ (2 mg/ml) / リンガー液を注入して室温で30分間処理した。その後、有郭・葉状乳頭の上皮を剥離した。

3-2 味蕾・味蕾細胞の単離

上記の方法で剥離した有郭・葉状乳頭の上皮を、コラゲナーゼ (2 mg/ml) / リンガー液で更に10分間処理した後、 $-Ca^{2+}$ EDTA溶液中で10分間処理し細胞を分離しやすい状態にした。口径100 μ mのガラス管を用いて有郭・葉状乳頭上皮の細胞を吸引することにより分離した。分離した細胞は、0.1% BSA/リンガー溶液中に入れ、シャーレ、ガラス管に細胞が吸着することを防いだ。顕微鏡下で、分離した細胞の中から味蕾のみを口径30~40 μ mのガラス管の中に吸引することにより単離した。また、分離した細胞の中から紡錘形の細胞を味蕾細胞として、同様に口径20~30 μ mのガラス管を用いて吸引することにより単離した。単離した細胞は、新たなリンガー液を入れたシャーレ中に放出して他の細胞の混在が無いことを確認後、single-cell RT-PCR用のエッペンドルフチューブに移した。

3-3 全RNAの抽出

目的の組織 (細胞) を得た後、100 mgあたり1 mlのISOGENを加え、上皮組織はポリトロンホモジナイザーを用いてホモジネーションした。味蕾細胞および培養細胞はISOGENを添加後激しく攪拌した。室温で5分静置した後、0.2 mlのクロロホルムを加え、激しく攪拌し、更に2、3分室温に静置した。その後、12000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで15分遠心し、水層に0.5 mlイソプロパノールを加えて、イソプロパノール沈殿をした。遠心により集めた沈殿を減圧下で乾固した後、50 μ lの水に溶解した。

3-4 PCR

味蕾に発現するG α タンパク質mRNAの種類を検索は、94 $^{\circ}$ C1分、45 $^{\circ}$ C1分、72 $^{\circ}$ C1分の条件で50サイクル行った。*in situ*ハイブリダイゼーションのプロープの作製、rat G α 15発現用プラスミド構築、G α gustおよびG α i3のC端の発現用プラスミド構築の際に行ったPCRの条件は、それぞれの実験方法に記した。他の条件は第一章に準じた。

3-5 COS-1細胞の培養

COS-1細胞は10% FCSを含むDMEM培地中、37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ の条件で培養した。

3-6 rat α 15発現用プラスミドの構築

発現用ベクターpSRDがEcoR IとPst Iのみのクローニングサイトをもつベクターであったため、rat α 15全長を以下の様に組み込んだ(図2-2a)。プライマーG15-1; 5'-CTGGTGGCCCTGTGAGGC-3' (-24~-8)と、EcoR Iサイトを含むG15-2; 5'-AGGTGGAATTCACGCCT-3' (+467~+451)を用い、rat α 15 cDNAを鋳型に、N端側491 bpを増幅した。PCRは94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒の条件で30サイクル行った。平滑化した後EcoR Iで切断し(fragment I)、EcoR IとPst I断片(+458~+1188, fragment II)と共にEcoR Iサイトを平滑化したpSRDに組み込み、pSRD-r α 15として用いた。

3-7 活性型変異rat α 15発現プラスミドの構築

サイトダイレクティッドPCR法(Ho *et. al.*, 1989)を用いた(図2-2b)。rat α 15の212番目のアミノ酸残基GluをLysに変異させるために、cDNA配列の635番目のAをTに置換したプライマーQL15-1、QL15-2を作成し、G15-3とQL15-1、G15-4とQL15-2の組み合わせでPCRを行った。増幅された両方の断片をQL15-1、QL15-2の位置でアニーリングさせ、これを鋳型としてプライマーG15-3とG15-4の組み合わせで再びPCRを行い、EcoR IとPst Iで処理し、変異を含む断片(fragment II')とした。先のfragment Iとfragment II'をpSRDに組み込み活性型変異rat α 15発現プラスミド(pSRD-r α 15Q212L)として用いた。

3-8 発現用プラスミドのトランスフェクション

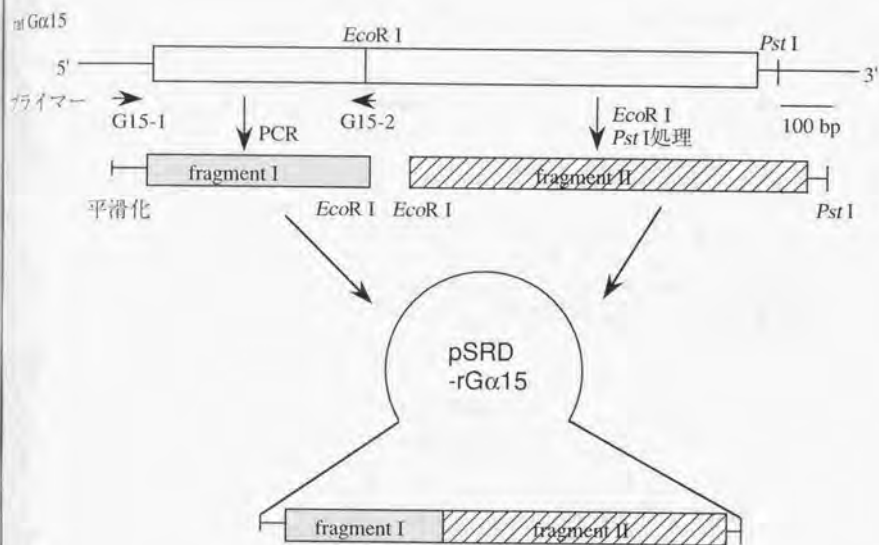
10 cmシャーレ1枚あたり 1.5×10^6 個のCOS-1細胞を37℃、5% CO₂、DMEM(含10% FCS)中で20時間、前培養した。培養液を除去した後PBSを用いて洗浄し、プラスミド(1 μ g/ml)、DEAE-Dextran(250 μ g/ml)、クロロキン(100 μ M)を含むDMEM中で37℃、2時間培養した。培養液を除いた後、10% DMSO/PBSを用いて室温で2分間処理し、PBSで洗浄した後、DMEM(含10% FCS)を10 ml加え、37℃、5% CO₂の条件下で培養した。

3-9 ウェスタンブロット解析

[i] サンプルの調整

(1) COS-1細胞

トランスフェクションの2日後、DMEM(含10% FCS)を除去し、0.5%トリプシン/EDTA処理してシャーレからCOS-1細胞を剥離し、10 mlチューブに移した。室温、800 rpmで5分間遠心することにより細胞を集めてPBSで洗浄し、エッペンドルフチューブに移した。超音波破碎を行った後、15,000 rpm、15分間遠心して、沈殿物を

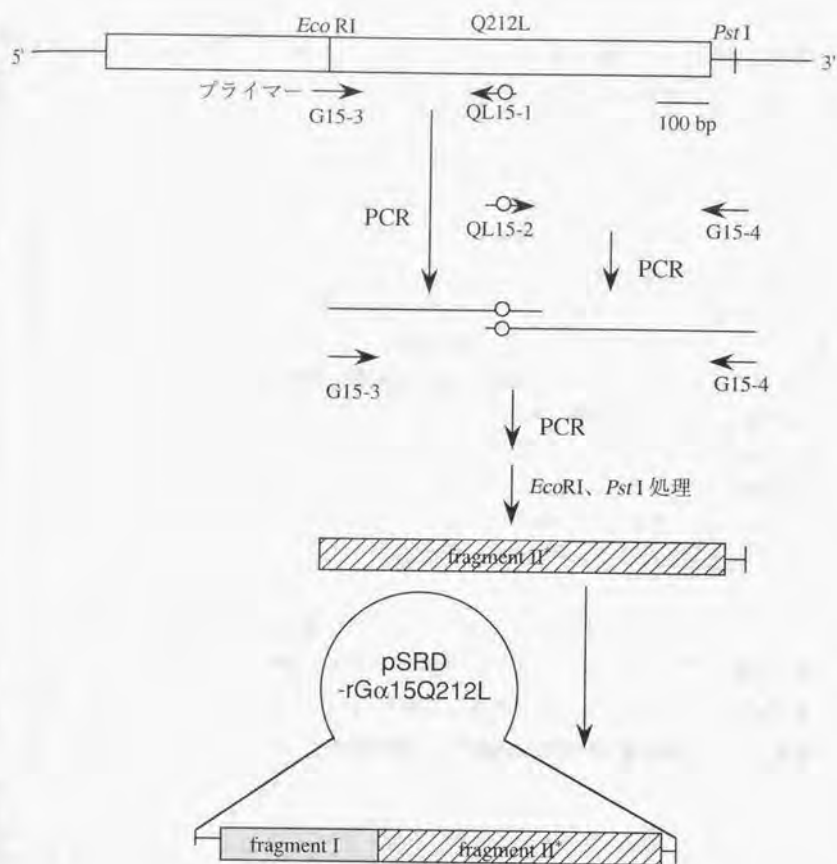


プライマー

G15-1 5'-CTGGTGGCCTGTGAGGC-3' (-24~-8)

G15-2 5'-AGGTGGAATTCACGCCT-3' (+467~+451)

図2-2 rat $G\alpha 15$ および活性型変異rat $G\alpha 15$ 発現用プラスミドの構築
a. rat $G\alpha 15$ 発現用プラスミドの構築。下線部は $EcoR$ Iサイトを示す。



プライマー

G15-3 5'-AGGCGTGAATTCACCT-3' (+451~+467)

G15-4 5'-CCTTGCCTGCAGTTCCGA-3' (+1198~+1181)

QL15-1 5'-TCTGACTTCAGGCCGCCA-3' (+644~+627)

QL15-2 5'-TGGCGGCCTGAAATCAGA-3' (+627~+644)

図2-2 (続き)

b. 活性変異型rat $G\alpha 15$ 発現用プラスミドの構築

rat $G\alpha 15$ の212番目のアミノ酸残基グルタミンをロイシンに変異した。

○は変異した核酸配列を示す。プライマー中の下線部は変異した核酸配列を示す。

fragment IIは、a.と同様のものを用いた。

G α タンパク質を含む膜画分として用いた。

(2) 大腸菌 (YA菌)

集菌した後、TEを用いて洗浄した。その後、200 μ lのTEに懸濁して超音波破碎を行った。10,000 \times gで10分間遠心して沈殿物と上清に分け、最終量の1/25をサンプルとして使用した。

[ii] 電気泳動およびウェスタンブロット解析

両者ともSDS-PAGEサンプルバッファーを加え、5分間煮沸して電気泳動に供した。COS-1細胞に発現させたG α タンパク質は10%、大腸菌に発現させたG α タンパク質C端は15%のアクリルアミドを含むSDS-PAGE用ゲルを用いて電気泳動を行い、PDVF膜に転写した。転写後のPDVF膜は、5%スキムミルク/TBSTを用いて室温で30分処理後、一次抗体を5%スキムミルク/TBSTに加えて4℃で一晩反応させた。一次抗体として、抗rat G α 15血清を400倍、抗G α 1/G α 2、抗G α 3抗体を200倍に希釈して用いた。TBSTを用いて洗浄した後、アルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG抗体を5%スキムミルク/TBSTに加え(1:1000)、37℃で1時間反応させた。再び洗浄した後、NBTとBCIPを用いて発色を行った。化学発光システムを用いた方法は、二次抗体をHRP結合-抗ウサギIgG抗体に換え(1:1000)、シグナルはECLウェスタンブロットインク検出試薬(Amersham)を用いてフィルムに感光させることにより検出した。

3-10 抗体染色用組織切片の作製

ラット (Wister オス 5週齢) から舌を摘出し、O.C.T.コンパウンドに包埋し、液体窒素を用いて凍結した。切片は5 μ mの厚さにクライオスタット (ライカ1900) を用いて作製し、4%ホルマリンで10分間固定した後PBSで5分間3回洗浄して抗体染色に供した。

3-11 蛍光抗体染色

5% normal goat serum / PBSで30分間ブロッキングを行った後、一次抗体として抗rat G α 15血清、コントロール用ウサギ血清を200倍に、抗G α q抗体を200倍に、抗G α s抗体は30倍に1%BSA-PBSを用いて希釈し、組織切片と室温で60分間反応させた。その後PBSで3回洗浄し、蛍光物質FITC標識anti-rabbit IgGと室温で30分間反応させた。PBSで5分間3回洗浄し、50%グリセリン/PBSで接着し蛍光顕微鏡下で切片の観察を行った。rat G α 15抗原ペプチド100 μ g/mlを等量の抗rat G α 15血清 (100倍希釈) 中に加え4℃で一晩反応させ、コントロールの吸収実験に供した。

3-12 酵素抗体染色法 (ABC法)

切片を0.3% H₂O₂/メタノールで30分処理することにより組織内のペルオキシダーゼ活性を失活させた。0.5%ヤギ血清/PBSで処理した後一次抗体を室温で90分間反応させた。二次抗体としてビオチン標識のrabbit-IgG抗体を用いて30分間室温で反応させた後、PBSで3回洗浄した。その後ABCとビオチンを室温で30分間放置して結合させABC内のペルオキシダーゼによるDABの発色を行い、顕微鏡下で発色の位置を検出した。一次抗体は抗G α 1/G α 2、抗G α 3抗体は50倍、抗G α gust抗体は250倍、抗G α s抗体は30倍に希釈して用いた。

3-13 二重染色法

ABC法を2度繰り返して行う方法を探った。まず、1つめの一次抗体を用いてABC法を行い、DABとペルオキシダーゼを反応させ、茶色の沈着物をシグナルとして観察した。次に、2つめの一次抗体を用いて同様にABC法を行い、クロロナフトールを用いた発色法により紫色の沈着物を観察した。

3-14 IP₃量の測定

トランスフェクションの2日後、DMEM (含10% FCS) を除去し0.5%トリプシン/EDTA処理後シャーレからCOS-1細胞を剥離し、10 mlチューブに移した。室温、800 rpmで5分間遠心することにより細胞を集めてPBSで洗浄した後、再び100 μ lのPBSに懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。10%過塩素酸を加え氷上に20分間放置した後、4 $^{\circ}$ C、5000 rpmで15分間遠心し、IP₃が回収された上清に5 μ lの1 M Hepes (pH 7.4)と10 μ lのpH indikatorを加え、10 N KOHでpHを7~8にあわせた。氷上に20分間放置した後、4 $^{\circ}$ C、5000 rpmで15分間遠心を行い、Du Pont社のIP₃ [³H] Radioreceptor Assay Kitのサンプルとなる上清を得た。

このサンプル50 μ lにReceptor Preparation / [³H] IP₃ Tracerを200 μ l加え、よく混合して氷上に1時間放置した。4 $^{\circ}$ C、1000 \times gで10分間遠心して集めた沈殿を25 μ lの0.15 N NaOHに溶解して、室温に10分間放置し、2 mlのクリアゾルを加えて液体シンチレーションカウンターにて測定した。IP₃量はスタンダードIP₃とReceptor Preparation / [³H] IP₃ Tracerを用いて検量線を作成し、定量した。

3-15 *in situ* ハイブリダイゼーションのプロープの作製

プロープの作製のためにG α 2、G α 3、G α s、G α gustに特異的なプライマーを下記の通りに作成し、有郭・葉状乳頭上皮mRNA由来のfs-cDNAを鋳型として用いてPCRを行うことにより各G α タンパク質をコードする断片を得た。

G α gust; 5'-ATGCCGTGACAGATATAATA-3' (+1027~+1047), 5'-TGCTTGTGGCAG-

CCTAATTG-3' (+1510~+1491), *Gas*; 5'-CACCTGAATTCTATGAGCAT-3' (+429~+448), 5'-TTAAGCTTACTAAATTTGGA-3' (+1375~+1356), *Gai2*; 5'-ataagcttGGGGCA-GTGGGCCTGGCAGG-3' (+1068~+1087), 5'-atgaattcGCCTCCAAGCGGCAGAGAGT-3' (+1517~+1498), *Gai3*; 5'-ataagcttGAGGATGGC/ATAGTAAAAGC-3' (+1066~+1085), 5'-tctctagaGTGGAATATTACTCTGACC-3' (+1584~+1565)

PCRは、94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒を50サイクル行った。その後、制限酵素サイトを付加されている*Gai2*、*Gai3*断片は制限酵素で処理し、*Gagust*は平滑化を行った後、pBluescript SK⁻あるいはKS⁻に組み込んだ。*Gas*は*Pst*I、*Hind*IIIで処理して核酸配列の+797~+1373に相当する*Pst*I-*Hind*III断片をpBluescriptに組み込んで使用した。cRNAプローブの作成法は第一章と同様に行った。

3-16 *in situ* ハイブリダイゼーション

クライオスタット (ライカ1900) を用いて厚さ10 μmの凍結切片を作成した。4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて10分間固定した後、PBSで5分間、3回洗浄した。0.1 Mトリエタノールアミンで10分間処理した後、無水酢酸を最終0.25%になるように添加し、更に10分間処理することによりアセチル化を行いプローブの組織に対する非特異的結合を防いだ。その後PBSで5分間3回洗浄し、50%ホルムアミド/5×SSCを用いて72℃で1時間処理し、ハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーションを72℃で18時間行った。ハイブリダイゼーション後の洗浄は5×SSC、5分間、2回と0.2×SSC、30分間、2回を72℃の条件下で行った。0.5% Blocking reagent/TBSTを用いてブロッキングした後、アルカリフォスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体 (400倍に希釈して用いた) を用いて抗原抗体反応を室温で30分間行い、TBSTを用いて洗浄を10分間3回行った。発色はNBTとBCIPを用いて室温、または4℃で2時間から24時間行った。

3-17 *Gα*タンパク質C端の発現プラスミドの構築

Gagust、*Gai3*のC端の発現プラスミドを構築した。発現用に制限酵素サイトを含んだ下記のプライマーを作成した。

Gagust; 5'-aggggaattcAGCCTGCTTCG-3' (+515~+525), 5'-caaaagcttCAATTCCAAC-3' (+1180~+1171) *Gai3*; 5'-agacgaattcCATTCCAAC-3' (+585~+594), 5'-gtagaagcttTACTATGCC-3' (+1165~1156)

ラットの有郭・葉状乳頭上皮由来fs-cDNAを用いてPCRを行った。温度の条件は94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒、50サイクルで、他の条件は第一章と同様に行った。増幅された断片を*Eco*R I、*Hind* IIIで切断し、pUC18ベクター中にライゲーションし、*Gagust*C、*Gai3*Cと命名した。YA菌に導入して、IPTGの誘導による発現を行った。

3-18 大腸菌によるG α タンパク質C端の発現

G α ustC、G α i3Cを導入したYA菌を1 μ g/mlアンピシリンを含むLB中で4時間培養した。その後、最終濃度1 mMになるようにIPTGを加えて発現の誘導を行い更に2時間培養した。

3-19 Single-cell RT-PCR

エッペンドリフチューブ中に5x Firstバッファー 1.25 μ l, 4x RT バッファー 1.5 μ l, DEPC処理水1 μ lをあらかじめ準備して、上記の方法で単離した1つの紡錘形の細胞を含む0.1%BSA/リンガー液(0.5 μ l)を加えた。0.1 MDIT 1 μ l, RNase inhibitor 0.5 μ l, Superscript II 0.5 μ lを添加し、42°C, 60分の条件で逆転写反応を行った。反応後2 μ lずつ分注してそれぞれに4 μ lのH₂Oを加えた。4°C中でPCRバッファー1を64 μ l加えた後、94°Cで3分間処理することにより逆転写酵素を失活させた。その後85°Cにして、プライマー、Taq DNAポリメラーゼを含むPCRバッファー2を30 μ l加え、94°C1分、50°C1分、72°C1分、40サイクルの条件でPCRを行った。カラム (CHROMA SPIN-100) を用いて余剰プライマーを除き、内10 μ lに10 \times PCRバッファーを5 μ l、2.5 mM 4d NTPを5 μ l、プライマーA、Bを各1 μ l、水を27.5 μ l、Taq DNAポリメラーゼを0.5 μ l加えて再度PCRを同条件で40サイクル行った。PCRバッファー2中に含まれるプライマーA、B、および2回目のPCRに用いたプライマーA、Bの配列および組み合わせは結果の図中に示した。

3-20 サザンブロット解析

基本的には第一章と同様の方法で行った。結果中に示したオリゴヌクレオチドを5'末端標識してプローブとして用いた。ハイブリダイゼーションは45°C~50°Cで行い、6 \times SSCを用いて洗浄を行った。

他の実験は第一章に準じた。

4. 結果

4-1. 味蕾に発現するG α タンパク質mRNAの種類を検索

まず、味蕾に発現するG α タンパク質mRNAの種類を検索を行った。味蕾由来のmRNAを得るために、コラゲナーゼを用いてラット有郭乳頭の上皮を剥離し (図2-3)、

さらにコラゲナーゼとEDTA処理を行うことにより有郭乳頭の細胞を分離した(図2-4a)。顕微鏡下で味蕾(図2-4b)を100個単離してmRNAを得て、fs-cDNAを作成しPCRの鋳型として用いた。プライマーは全てのGαタンパク質mRNAに共通なもの(Berghard and Buck, 1996)を用いた(図2-5)。アンチセンスプライマー-p43、p44はGαqファミリーが増幅されなかったため、Gαqファミリーに共通なプライマー-p51、p52も用いた。作成したプライマーは全ての組み合わせで使用した。PCRによって増幅された断片をサブクローニングして塩基配列を調べたところ、Gαqファミリー、Gαiファミリー、Gαsファミリーに属するクローンがそれぞれ2種類以上得られた。具体的には、GαqファミリーはGαq(Strathmann and Simon, 1990)、Gα15'(4-2参照)の2種類、GαiはGαgust(McLaughlin, *et al.*, 1992)、Gαt-rod(Raport, *et al.*, 1989)、Gαi1、Gαi2、Gαi3(Jones and Reed, 1987)の5種類、GαsファミリーはGαs(Nukada *et al.*, 1986)とオールタナティブスプライシングによりGαolf(Jones and Reed, 1989)と同様の短い構造を持つGαs(s)の2種類であった(図2-5)。味覚に関わるGαタンパク質は生理学的知見より糖の甘味に関与することが予想されるGαsファミリー、糖以外の甘味、もしくは苦味に関与するGαqファミリー、苦味に関与するGαiファミリーであると考えられており、今回得られたクローンは何れも上記3つのファミリーに属し生理学的知見と一致した。

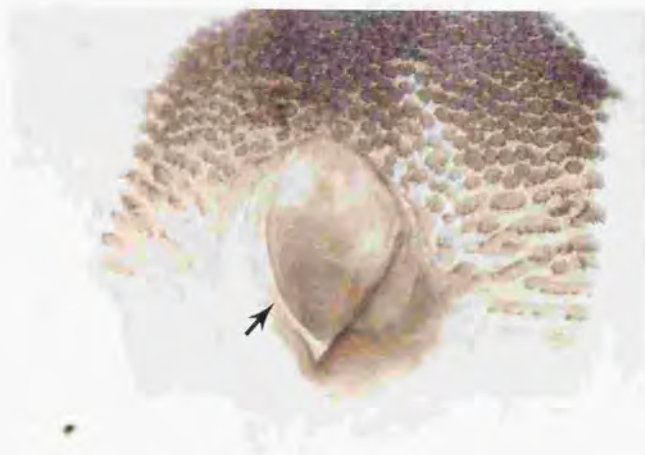
これらのGαタンパク質をコードするクローンの内2つ以上のクローン数が得られた種(図2-5)、すなわちGαgust、Gαi2、Gαi3、Gαq、Gα15'、Gαsを、味蕾中における発現様式および発現部位の解析に用いた。Gα15'はGα15(mouse)(Wilkie *et al.*, 1991)と相関性は高かったものの、新たなGαqファミリーの分子である可能性があったため、その全長のクローニングを含めたGαqファミリーに関する研究をまず行った。次に、アデニル酸シクラーゼの調節に関わるGαs、Gαiファミリーに関して味蕾中における発現様式および発現部位の解析を主に行った。

4-2. ラット舌上皮に発現する Gαq ファミリーとその発現部位

4-2-1 rat Gα15 cDNAのクローニング

ラットの有郭乳頭を含む舌上皮のcDNAライブラリーを作成し、4-1においてRT-PCRにより得たGαq、Gα15'をプローブとして用いてスクリーニングを行ったところ、Gαq、Gα15'それぞれの全長のアミノ酸配列を含む2種類のcDNAを得ることができた。既に明らかになっているGαタンパク質との相関性をアミノ酸レベルで比較したところ、GαqはマウスのGαq(Strathmann and Simon, 1990)と100%配列が一致した。Gα15'はGαqファミリーに属すマウスのGα15(Wilkie *et al.*, 1991)と94.9%の高い相関性があり、ヒト由来のGα16(Amatruda III *et al.*, 1991)とも85.6%の相関性を示した。Gα16は

a



b

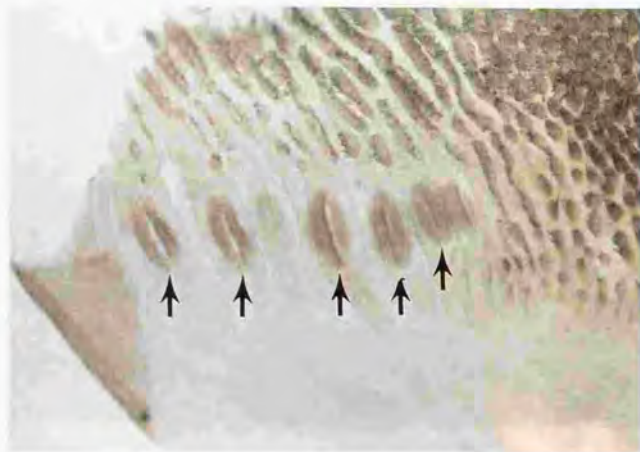
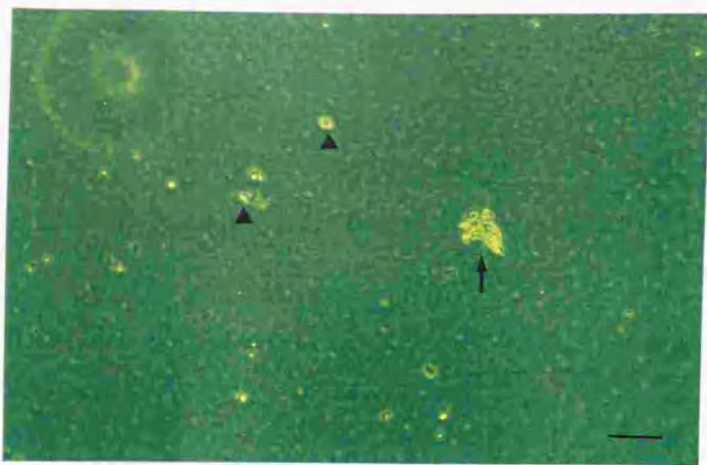


図2-3 舌から剥離した味蕾を多く含む乳頭の上皮

a. 有郭乳頭 b. 葉状乳頭
矢印は味蕾を多く含む乳頭溝を示す。

a



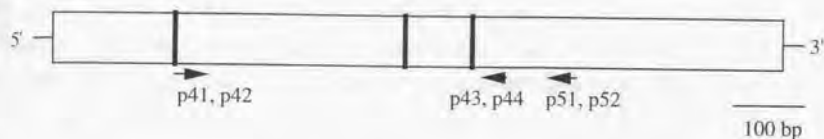
b



図2-4 有郭乳頭上皮細胞からの味蕾の単離

- a. 上皮由来の細胞。矢印は味蕾の一部分を、矢は上皮細胞を示す。
b. キャピラリーを用いて単離する味蕾。紡錘形の細胞から構成されている。
写真中の実線は50 μm の長さを示す。

αタンパク質



合成したプライマーの塩基配列

対応するアミノ酸配列

p41	5'-GGIAA (AG) (AT) (GC) IACITT (TC) (CA) TIAA (AG) CA (AG) ATG-3'	GKSTFLKQM
p42	5'-GGIAA (AG) AG (TC) ACIATIGTIAA (GA) CA (GA) ATG-3'	GKSTIVKQM
p43	5'-(TC) (TC) ITGICCCIIAC (GA) TC (GA) AA (GC) AT-3'	(IM) FDVGG (HQ) (NKSRG)
p44	5'-T (CG) I (TG) (CA) IC (TG) (CT) TGICCCIIAC (GA) TC-3'	DVGGQR (DESAY) (DEH)
p51	5'-AAGA (AG) GGC (CT) TTG (GC) (AT) (CT) TC (CT) TCCAAT-3'	MEESKA (FL) (FL)
p52	5'-TC (TC) TCGA (GA) (GA) CA (TC) TG (AG) TC (GA) TA (CT) TC-3'	EYDQC (LF) E (DE)

Gaiファミリー		Gaqファミリー		Gasファミリー	
Gagust	○ 4	Gaq	○ 2	Gas(s)	1
Gat-cone	1	Ga14	1	Gas	○ 4
Gai1	1	Ga15'	○ 2		
Gai2	○ 5				
Gai3	○ 6				

図2-5 RT-PCRにより味蕾からサブクローニングしたGαタンパク質mRNAの種類及びその数

a. 用いたプライマーの位置、及びその配列。太線はGαタンパク質mRNAに共通なサブライシングの位置を示している。

b. 味蕾からサブクローニングしたGαタンパク質の種類及びその数

○印の付いた種について、味蕾における発現様式および発現部位の解析を行った。

マウス $\text{G}\alpha 15$ に対するヒトのカウンターパートであると言われている。そこで $\text{G}\alpha 15'$ はマウス $\text{G}\alpha 15$ に対するラットのカウンターパートであると判断し、 $\text{G}\alpha 15'$ を $\text{rat G}\alpha 15$ と命名した。 $\text{rat G}\alpha 15$ の塩基配列および推定アミノ酸配列を図2-6に示す。 $\text{rat G}\alpha 15$ の、 $\text{G}\alpha q$ ファミリーに属する他の分子、 $\text{G}\alpha q$ 、 $\text{G}\alpha 11$ 、 $\text{G}\alpha 14$ に対する相同性は53-56%に留まり、他のファミリーに属する $\text{G}\alpha$ タンパク質とは $\text{G}\alpha s$ (Nukada *et. al.*, 1986) と34.9%、 $\text{G}\alpha i 2$ (Jones and Reed, 1987) と42%、 $\text{G}\alpha o 1$ (Strathmann *et. al.*, 1990) と42%、 $\text{G}\alpha t$ -rod (Raport, *et. al.*, 1989) と41%と、更に低い相同性を示した。

4-2-2 ラット舌上皮における $\text{rat G}\alpha 15$ 、 $\text{G}\alpha q$ の発現部位の検討

ラット舌上皮に $\text{rat G}\alpha 15$ と $\text{G}\alpha q$ mRNA が発現することを更に確認するために、ノーザンブロット解析を行った (図2-7)。 $\text{rat G}\alpha 15$ をプローブとして用いた場合、約1.8 kbの位置に強いシグナルを示すバンドが、約3 kbに弱いシグナルを持つバンドが検出された。一方、 $\text{G}\alpha q$ をプローブとして用いると約4.0 kbの位置に1本のバンドが観察された。よって味蕾を含む舌上皮には $\text{G}\alpha q$ ファミリーに属する2種類の $\text{G}\alpha$ タンパク質、 $\text{rat G}\alpha 15$ と $\text{G}\alpha q$ が存在することが確認された。

次に、より詳細な $\text{rat G}\alpha 15$ と $\text{G}\alpha q$ の発現部位を調べるために、舌の組織切片を用いて抗体染色を行った。

まず、 $\text{rat G}\alpha 15$ に対する抗体を作製した。抗原としてC端の10アミノ酸残基H·Ala-Arg-Tyr-Leu-Asp-Glu-Ile-Asn-Leu-Leu·OHを用いて抗血清を作製した。この抗血清が $\text{rat G}\alpha 15$ を特異的に認識することを確認するために $\text{rat G}\alpha 15$ 発現プラスミド pSRD-r $\text{G}\alpha 15$ あるいはベクター pSRDのみを導入したCOS-1細胞の全タンパク質を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、pSRD-r $\text{G}\alpha 15$ を導入したCOS-1細胞に対して $\text{rat G}\alpha 15$ に相当する43 kDaの1本のバンドが認められた (図2-8)。またpSRDのみを導入したものに対してはバンドは確認されなかった。そこでこの抗血清は $\text{rat G}\alpha 15$ を認識すると考え、抗 $\text{rat G}\alpha 15$ 血清として用いることにした。また抗 $\text{G}\alpha q$ 抗体は $\text{G}\alpha q$ に特異的な抗体を購入して使用した。

抗体染色は有郭乳頭の切片を用いて行った。抗 $\text{rat G}\alpha 15$ 血清を用いた場合、強い染色が味蕾の位置に観察された (図2-9a)。この染色は抗原の合成ペプチドを吸収させた抗 $\text{rat G}\alpha 15$ 血清を用いた時や (図2-9c)、コントロールのウサギ血清を用いた際には認められなかった (図2-9d)。また、抗 $\text{G}\alpha q$ 抗体を用いて抗体染色を行った時も同様に味蕾の位置に染色が確認された (図2-9b)。また、抗 $\text{rat G}\alpha 15$ 血清、抗 $\text{G}\alpha q$ 抗体の両者とも、全ての味蕾細胞全体に染色が観察された。

4-2-3 $\text{rat G}\alpha 15$ の PLC- β 活性機能の確認

CTTAT	-226
GAGTATTTCTTCCAGGGTCTGGGTAGTCCCCACCTTTTGAGCAAGTTTCAGCCTGGTTAAGTCCAAGCTGGGGCT	-151
AGCTGGGGCTCCACAGCCGCTGGCCAGGGACACGGGGGCTCTGGAGGGACCTCCACCCCTCACTCCATCCAGA	-76
GAGAAAGAAATCCGGTAGCTGGGGCTGTGCAGGCTGCAGGAGCAATGTCCGCTGGTGGCCTGTGAGGCGCCACC	-1
ATGGCCCGTCCCTGACTTGGGGCTGCTGTCCCTGGTGCCTGACGGAAGAGGAGAAGACTGCCCGCAGAAATCGAC	75
M A R S L T W G C C P W C L T E E E K T A A R I D	25
CAGGAGATCAACAAGATTTTGTGGTACAGAAGAAACAAGAGCGCGGGGAATTGAAACTCCTGCTGTTGGGGCC	150
Q E I N K I L L V Q K R Q E R G E L K L L L L G P	50
GGTGAAGCGGGAAAGCACGTTTCATCAAGCAAATGCGCATCATTCAAGGGGCGGCTACTCTGAGGAGGACCCG	225
G E S G K S T P I K Q N R I E H G A G Y S E E D R	75
AGAGCCTTCCCGTGTCTCTACCCAGAACATCTTCGTCTCCATGCAGGCCATGAGTGAAGCAATGGACAGGCTG	300
R A F R L L V Y Q N I F V S M Q A M S E A M D R L	100
CAGATCCCTTCCAGCAGGGCCGACAGCAAACAGCAGCCAGCCTGGTGATGACCCAGGACCCCTATAAAGTGAGC	375
Q I P F S R P D S K Q H A S L V M T Q D P Y K V S	125
TGGTTCCAGAAAGCCATATGAGTGGCCATGCAGTACCTGTGGCGGGACCGGGCATCCGCGCATGTCAGAGCGG	450
S F E K P Y A V A M Q Y L W R D A G I R A C Y E R	150
AGGCGTGAATCCACCTGTGGACTCCGCGGTGTACTACCTGTCACACCTGGAGCGCATCGCCGAGGACGACTAC	525
R R E F H L L D S A V Y Y L S H L E R I A E D D Y	175
ATCCGCACTGGCCAGGACGTGCTGCCAGTCGCATGCCACCACTGGCATCAATGAGTACTGCTTTTCCGTGCAG	600
I P T A Q D V L R S R M P T T G I N E Y C F S V Q	200
AAAACCAAACTGCCATCGTGGATGTTGGCGGCCAGAGTCAGAACGTAAGAAATGGATCCACTGTTTCGAGAAC	675
K T K L R I V D V G G Q K E R K K W I H C F E N	225
GTGATTGCCTCATCTACCTGGCGTCTCTGAGCGAGTATGACCAGTGTCTGGAGGAGAACGTCAGGAGACCCGT	750
V I A L I Y L A S L S E Y D Q C L E E N S Q E T R	250
ATGAAGGAGAGTCTCGCTCTGTTTAGCAGATCCCTAGAGCTGCCCTGGTTCAAGAGCACCTCGGTCACTCTCTTC	825
M K E S L A L F S T I L E L P W F K S T S V I L F	275
CTCAACAAGACAGACATCTCCGGAGGATAAAATCCACACCTCCACCTCATACTTCCCCAGCTTCCAGGGA	900
L N K T D I L E D K I H T S H L A S Y E P S F Q G	300
CCCCGGGGACGACGAGGGCCGCAAGCGCTTCATCTTGGACATGTACGGCGCGTGTACGCGAGCTGTGCAGAG	975
P E R D A E A A K R F I L D M Y A R V Y A S C A E	325
CCCCACGCGTGGCAGGAAGGGATCCCGCGCGCGCCTCTTGGCACACTTACCTGTGCCACGGACCGCAC	1050
F H D G G R K G S R A R R L F A H F T C A T D T H	350
AGCGTCCGACAGCTGTTCAAGGACGTGCGGGACTCAGTGTGCGCCGCTACCTGGACGAGATCAACCTGTTGTGA	1125
S V R S V F K D V R D S V L A R Y L D E I N L L *	374
CACGGGAAACCGAAGCGGTGGTGGCGAGGACACTGCGCCCTCGTGGCCACTCTCGGAACTGCAGCCAAAGGA	1200
AGTCAAGTCCAAGATCTGCTCCCAGGGGCCCTCCAAGCCAGCCCTCTGTAATTCATCCCTCACTCTCCCTAG	1275
CTGTTAGAGAAAGACCTTTATCCCAAGCGCTCGGAGGCAGAGGGAGGAGTCTCTGTGAGTACCGGGATCCT	1350
GGGCCAAAACCTAAACAACAAAACCGGATAGAAGTGTCCGGGGCTTGTGACTTCCAGGGATCCTGTCCAAGTC	1425
CTCCTGTGGGCTCATGCTGGGTAAGTGAATGTGAAGGAAGGAGTCTACTTGTCTTACCCATTGGTTGA	1500
ACTGAGGTAGACTCCAATTAAGATTGACTTTTGTATAAAAAAAAAAAAA	1550

図2-6 cDNAクローン、rat $\alpha 15$ の塩基配列および推定アミノ酸配列
インフレームの終止コドンを示した。

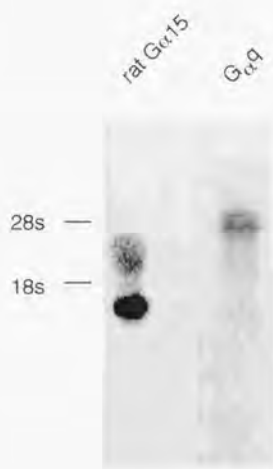


図2-7 ノーザンブロット解析による $G\alpha_q$ 、 $rat\ G\alpha_{15}$ mRNAの舌上皮組織における発現の検出
 各レーンに20 mgの全RNAを用い $G\alpha_q$ 、 $rat\ G\alpha_{15}$ cDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。
 左端に28Sと18SのrRNAの位置を示した。

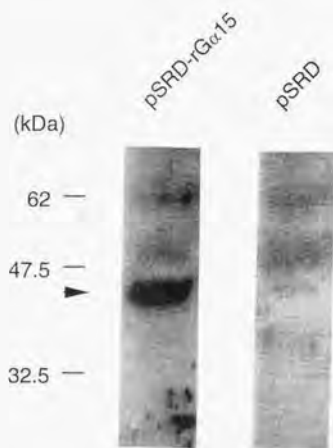


図2-8 ウェスタンブロット解析による抗rat Gα15血清のrat Gα15に対する反応性の確認

各レーンにはpSRD-rGα15、もしくはpSRDを導入したCOS-1細胞の細胞膜画分10 μgを用い、500倍希釈した抗rat Gα15血清と反応させた。発色はECLウェスタンブロットティング試薬を用いてフィルムに感光させた。矢印は、rat Gα15に相当する43 kDaを示す。

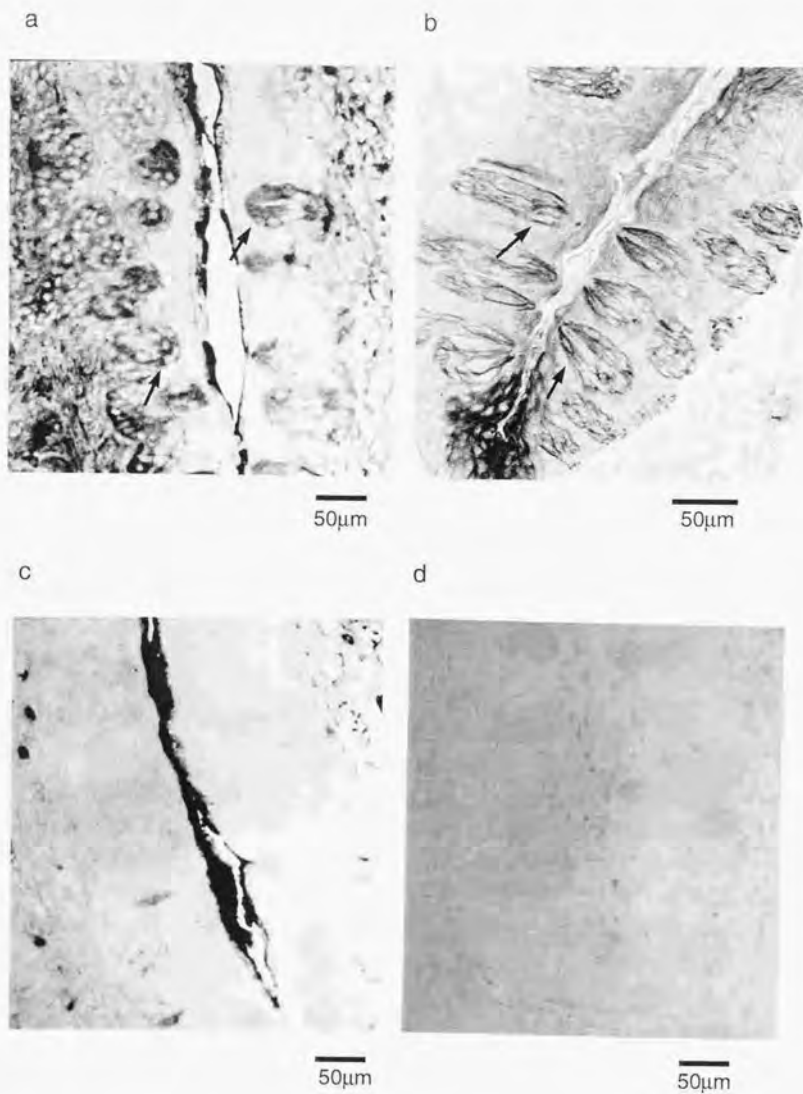


図2-9 有郭乳頭切片を用いた抗体染色

- a. 抗rat Gα15血清
 - b. 抗Gαq抗体
 - c. 抗原ペプチドと予め反応させた抗rat Gα15血清
 - d. ウサギ血清
- 矢印はそれぞれ味蕾を示す。

$\text{G}\alpha 15$ (mouse) が PLC- β を活性化することは、既に確かめられている (Offermanns and Simon, 1995)。rat $\text{G}\alpha 15$ は $\text{G}\alpha 15$ のカウンターパートと考えられるため、おそらくは PLC- β を活性化するものと予想されたが、確認のために PLC- β 活性化能を調べた。そのために、COS-1 細胞に活性型変異 rat $\text{G}\alpha 15$ を発現させ、IP₃ 量を測定する方法を採った。G 蛋白質は一般的に水解ドメイン中のアミノ酸残基 Gln を Leu に変異することにより水解能力を欠き、GTP 結合型状態、すなわち活性化状態になることが知られている (De Vivo *et al.*, 1992)。そこで rat $\text{G}\alpha 15$ の 212 番目のアミノ酸残基 Gln を Leu に変異するために cDNA 配列の 635 番目の A を T に置き換えた活性型変異 rat $\text{G}\alpha 15$ 発現用プラスミド (pSRD-r $\text{G}\alpha 15\text{Q}212\text{L}$) を構築して用いた。また、ポジティブコントロールとして活性変異型 $\text{G}\alpha\text{q}$ の発現プラスミド (p $\text{G}\alpha\text{qQ}209\text{L}$) (Watanabe *et al.*, 1995)、ネガティブコントロールとして発現ベクター (pSRD) を用いた。COS-1 細胞に pSRD-r $\text{G}\alpha 15\text{Q}212\text{L}$ を導入した後 2 日間培養し、細胞内の IP₃ 量を測定した。図 2-10 が示す通り、pSRD-r $\text{G}\alpha 15\text{Q}212\text{L}$ を発現させた細胞内の IP₃ 量はベクターのみを発現させた細胞に比べ約 3 倍であり、有為な差が認められた。p $\text{G}\alpha\text{qQ}209\text{L}$ を発現させた細胞内の IP₃ 量はベクターのみを発現させた細胞の約 4 倍であったが pSRD-r $\text{G}\alpha 15\text{Q}212\text{L}$ と p $\text{G}\alpha\text{qQ}209\text{L}$ に依る有為な差は認められなかった。よって、rat $\text{G}\alpha 15$ は $\text{G}\alpha\text{q}$ と同様に PLC- β 活性化能を持つことが確認された。

4-3. 味蕾に発現する Gas、Gai ファミリーの発現様式と発現部位の解析

4-3-1 *in situ* ハイブリダイゼーションによる Gas、Gai ファミリーの

発現する細胞の検索

Gagust が一部の味蕾細胞に発現することは抗体染色により示唆されている (Boughter Jr. *et al.*, 1997)。しかしながら、Gagust をはじめ他の分子においても mRNA レベルの発現様式は *in situ* ハイブリダイゼーションにより味蕾単位、すなわち細胞集合体の器官単位で示され、細胞 1 つ 1 つを対象にしたものではなかった。そこで Gagust と同様に アデニル酸シクラーゼを調節する Gas、Gai ファミリー mRNA の細胞毎の発現様式を調べた。

まず、ラット舌有郭乳頭の切片を用いて Gas、Gai ファミリーに属す Gagust、Gai2、Gai3、Gas に対する cRNA をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーションを行った (図 2-11)。Gagust のアンチセンス cRNA をプローブとして用いると、発現する細胞はどの味蕾にも見られるが、個々の味蕾の中では 1-4 個の細胞に発色が認められた (図 2-11a、b)。Gas、Gai2 のアンチセンス cRNA をプローブとした場合にはどの味蕾にもほとんどの細胞に発色が見られた (図 2-11c、d、e、f)。いずれもセンスプローブを用いた場合には特異的な発色は見られなかった (図 2-11g、h、i)。また、Gai3 に対して発色を検出することができなかった。そこで、発現パターン異なる Gagust と Gas

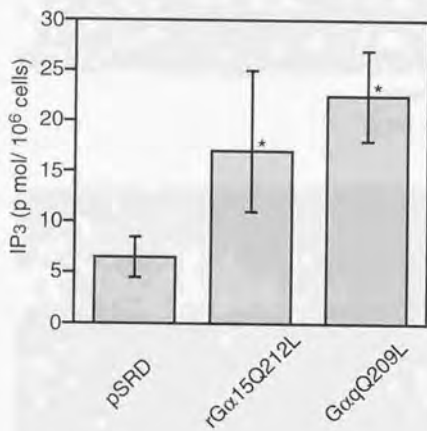
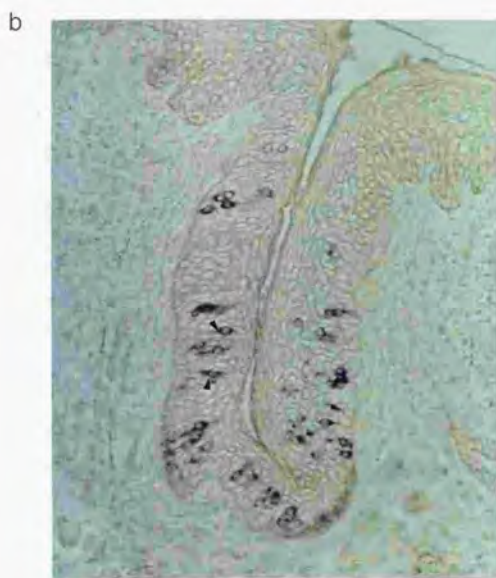


図2-10 活性型変異rat Gα15およびGαqの細胞内IP₃量
 pSRD (ベクターのみ)、pSRD-rGα15Q212L (活性型変異rat Gα15)、pGαqQ212L
 (活性型変異Gαq) を導入したCOS-1細胞10⁶個内のIP₃量を測定した。
 *はpSRDと比較して有為に差があることを示す(n=8)。



100 μ m



50 μ m

図2-11 (1) *in situ*ハイブリダイゼーションによる $G\alpha_{gust}$ mRNAの発現部位の解析
有郭乳頭の切片を用いた。矢印は味蕾を、矢は染色された味蕾細胞を示している。

- a. $G\alpha_{gust}$ 、アンチセンスプローブ
b. $G\alpha_{gust}$ 、アンチセンスプローブ (拡大)

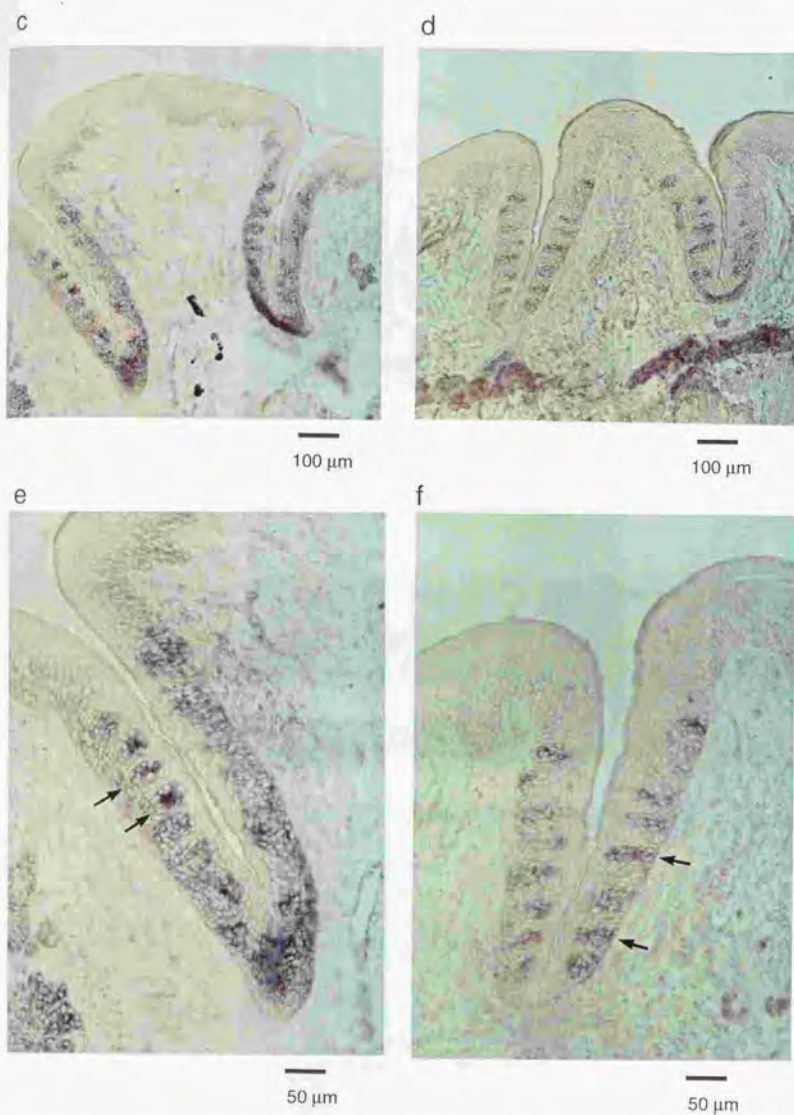


図2-11 (2) *in situ*ハイブリダイゼーションによるGas、Gai2 mRNAの
発現部位の解析

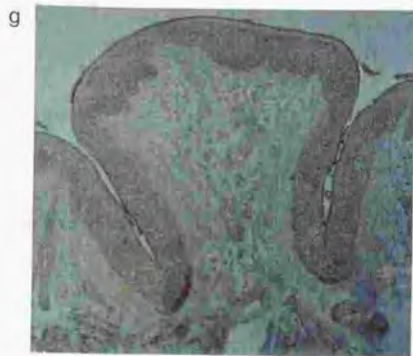
有郭乳頭の切片を用いた。矢印は味蕾を示している。

c. Gas、アンチセンスプローブ

e. Gas、アンチセンスプローブ (拡大)

d. Gai2、アンチセンスプローブ

f. Gai2、アンチセンスプローブ (拡大)



100 μ m

図2-11 (3) *in situ*ハイブリダイゼーションによるGagust、Gas、Gai2 mRNAの
発現部位の解析

g. Gagust、センスプローブ

h. Gas、センスプローブ

i. Gai2、センスプローブ

に焦点を絞り、細胞レベルでの発現様式を調べることにした。

4-3-2 Single-cell RT-PCRによる味蕾細胞単位のGagust、Gasファミリーの発現様式

味蕾細胞を単離し、細胞毎にGagustとGasの発現の有無をRT-PCRにより調べた。まず、味蕾細胞を単離した。味蕾を単離する方法と同様に細胞を分離し、その中から紡錘形の細胞を味蕾細胞として選び、ガラスのキャピラリーで単離した(図2-12a)。単離した細胞は、新たなバッファーの入った他のシャーレに移すことにより、他の細胞のmRNAの混在を防ぐと共に1つの細胞を採取したことを確認し(図2-12b)、その細胞をRT-PCRに供した。まず、逆転写反応液に採取した細胞を添加し、ランダムプライマーを用いて逆転写酵素反応を行った。1つの細胞から得られるmRNAの量は非常に微量であるので、発現を調べる分子をGagust、Gas、コントロール用の β -アクチンに絞り、逆転写後のfs-cDNAを3等分した(図2-13)。また、PCRの反応はnested PCR法を用いた(図2-14)。反応液中には細胞中の核が含まれるためゲノムが鋳型となってPCRによる増幅が起こる可能性があるため、プライマーはイントロンを挟むような位置を選び、mRNA由来の増幅を区別できるようにして図2-14のような組み合わせで行った。PCR後に電気泳動を行い増幅された断片を観察すると共に、図2-14中に示したオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロット解析を行い、目的の分子が増幅された細胞を確認し統計処理を行った。

まず、ある1回の実験で行った16個の細胞に対する結果を図2-15に示す。lane 1~15のようにRT-PCRによって β -アクチンの増幅が見られ1つの細胞由来のmRNAからfs-cDNAが合成されていることが確認されたサンプルを、Gagust、Gas特異的なプライマーを用いたPCRの鋳型として用いた。図2-15より、味蕾細胞にはGagustのみ発現する細胞(lane 4、14)、あるいはGasのみ発現する細胞(lane 3、8、10、12、13)、Gagust、Gasの両方が発現する細胞(lane 1、7)、両者とも発現しない(lane 2、5、6、9、11、15)といった4種類が存在することが明らかとなった(図2-15a)。尚、逆転写を行わないとどの分子の増幅も見られず(lane 16)PCRにより増幅された分子がfs-cDNA由来であることが確認された。同様の方法で、 β -アクチンの存在が確認された106個の細胞の発現パターンを調べたところ、Gagustが発現する細胞が35個、Gasが44個、両方発現する細胞が20個確認できた。よってGagustのみ発現している細胞が15個、Gasのみが発現している細胞が24個、両者とも発現する細胞が20個、両者とも発現しなかった細胞が47個存在していた事になり、やはり上記の4パターンに分類できた(図2-15c)。また、Gagustの発現が確認された細胞数の方がGasよりも少ないという傾向は、*in situ* ハイブリダイゼーションと同様であることが明らかになった。

a

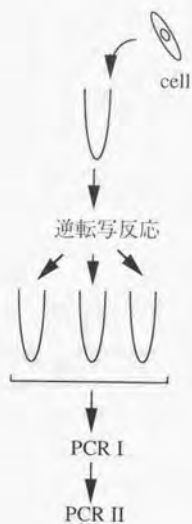


b

50 μm

図2-12 有郭乳頭からの味蕾細胞の単離

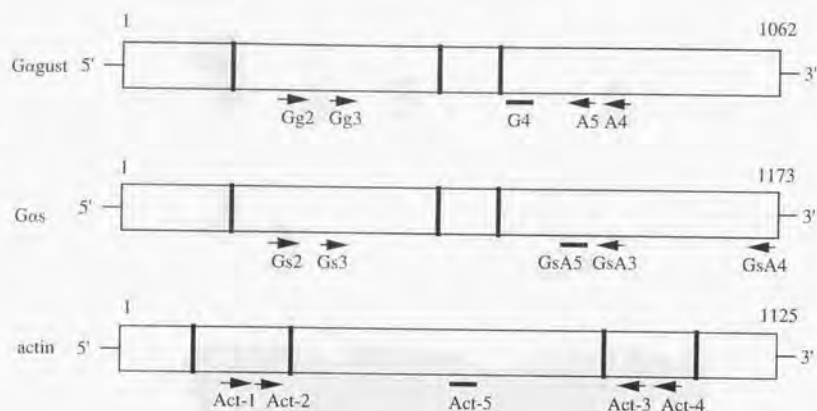
- a. 有郭乳頭由来の細胞から選択した紡錘形の細胞（矢印）。
右のキャピラリーを用いて単離する。上皮細胞を矢で示した。
- b. 単離後、洗浄のために別のシャーレに移した細胞。



PCR時のプライマー及びオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ

	PCR I	PCR II	プローブ
Gagust	Gg2-A4	Gg3-A5	G4
Gcs	Gs2-GsA4	Gs3-GsA3	GsA5
Actin	Act1-Act4	Act2-Act3	

図2-13 single-cell RT-PCRの実験方法の概略



Ggust	Gg2	5'-TGTC AATCCGAGAAGTAGA-3'	(+285~+303)
	Gg3	5'-ACCAACA AACTGCTTCTCTCC-3'	(+308~+327)
	G4	5'-GACTTGA ACTTCAGAATGTTT-3'	(+577~+697)
	A4	5'-CCTTATCTCTTTTTTAAG-3'	(+952~+933)
	A5	5'-TGCTGAGGTGCACCTTGGTCAC-3'	(+853~+832)
Gas	Gs2	5'-CTGCAAGGAGCAACAGCGATGGT-3'	(+236~+258)
	Gs3	5'-CACCTGAATTCTATGAGCA-3'	(+428~+446)
	GsA3	5'-GAAGTACTTGGCCCGGGTCAC-3'	(+1020~+1000)
	GsA4	5'-GAGCAGCTCGTATTGGCGAAG-3'	(+1182~+1162)
	GsA5	5'-TGGGTCCCTCTCCGGGCTCGGG-3'	(+996~+976)
β -Actin	Act-1	5'-GCACCC TGTGCTGCTCAC-3'	(+300~+317)
	Act-2	5'-GAACCC TAAGCCAACCGTG-3'	(+330~+349)
	Act-3	5'-GGTGGT GCCACCAGACAG-3'	(+909~+892)
	Act-4	5'-TCTCCT TCTGCATCCTGTC-3'	(+947~+928)
	Act-5	5'-TGAAGATCCTGACCGAGCGT-3'	(+569~+588)

図2-14 single cell RT-PCRに用いたオリゴヌクレオチドプライマー
およびプローブの塩基配列

太線は α タンパク質に共通して保存されているスプライシングの位置、およびアクチンのスプライシングの位置を示す

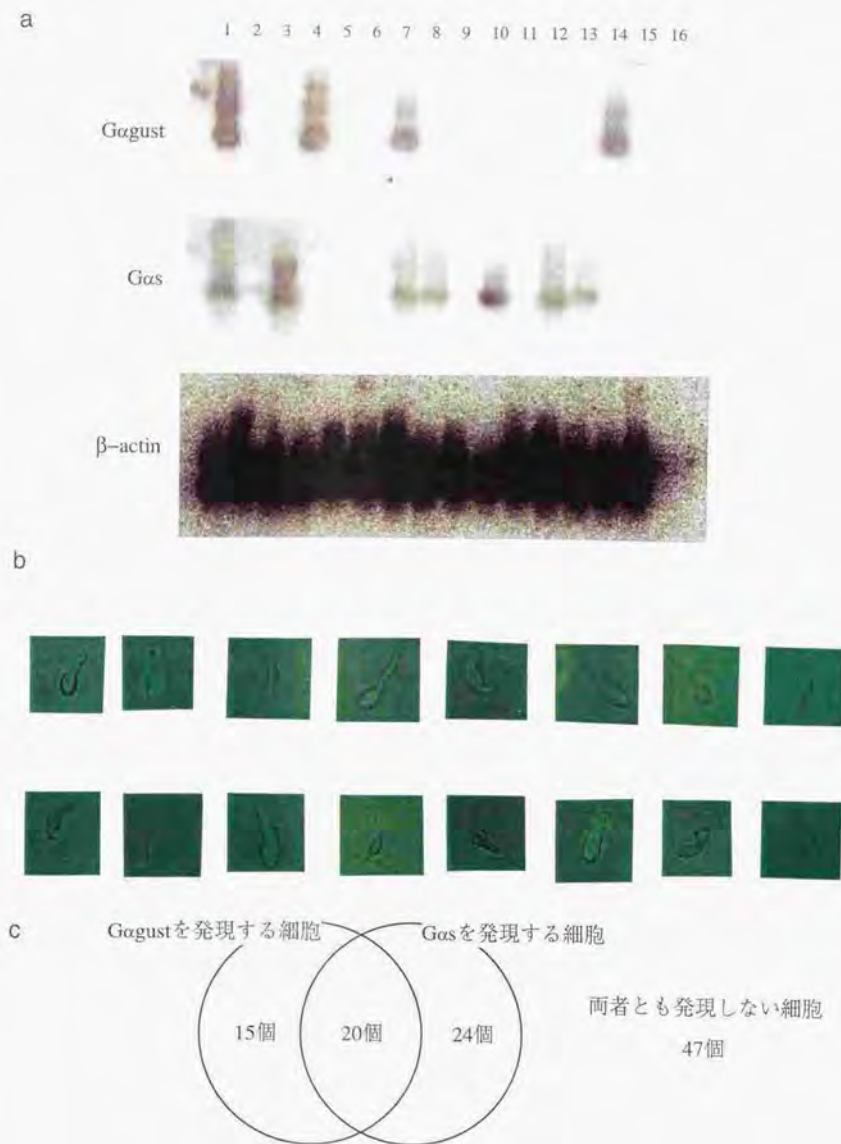


図2-15 味蕾細胞を用いたSingle-cell RT-PCRによる味蕾細胞毎のGagustとGasの発現パターン

- single-cell RT-PCR後Gagust、Gas、 β -actinをプローブとして用いたサザンブロット解析。lane 16は逆転写反応を行わずにPCRを行った。
- ある一回の実験で用いた味蕾細胞
- 106個の味蕾細胞に対する発現パターン

4-3-3 味蕾細胞内におけるGas、Gaiファミリーの発現部位の解析

次に、Gas、Gaiファミリーの細胞内の局在を調べるために、抗体染色を行った。抗体は、Gai1/Gai2、Gai3、Gas、Gagustに対するペプチド抗体を購入して用いた。それぞれの抗原を調べたところ(図2-16a)、Gas、Gagustは、各々に特異的な配列を抗原としていたが、抗Gai1/Gai2、抗Gai3はGaiファミリー間で相同性の高いC端のアミノ酸配列に対する抗体であった。抗Gai1/Gai2はGai3を認識しないこと、抗Gai3がGai1/Gai2を認識しないことは既に明かであったが、抗Gai1/Gai2および抗Gai3がGagustを認識するか否かは確認されていなかった。そこで、GagustとGai3のC端側を含む部分(GagustC、Gai3C)を大腸菌で発現させ、抗Gai1/Gai2あるいは抗Gai3抗体を用いてウェスタンブロット解析を行うことにより抗Gai1/Gai2、抗Gai3抗体のGagustに対する反応性を調べた(図2-16b)。その結果、抗Gai1/Gai2はGagustC発現タンパク質を認識するがGai3C発現タンパク質は認識しないこと、また抗Gai3はGagustC発現タンパク質を認識しないことが明らかになった。よって抗Gai1/Gai2抗体はGai1、Gai2、Gagustを認識し、抗Gai3抗体はGai3のみ認識することが明らかになった。ところで、味蕾内ではGai1発現量が少ないであろう事が4-1または図2-1から示唆されている。よって、抗Gai1/Gai2抗体はGai2、Gagustを認識するものとして扱った。Gai2は、抗Gagust、抗Gai1/Gai2抗体を用いて二重染色を行い抗Gai1/Gai2抗体は認識するが抗Gagustは認識しないタンパク質として区別した。

抗体染色の結果、Gas、Gaiファミリーの細胞内の発現部位のパターンは、細胞全体に存在する分子種と味孔に局在する分子種に分かれた。まず、抗Gagust抗体を用いると細胞全体に染色が見られた。また、*in situ* ハイブリダイゼーションと同様、限られた味蕾細胞に染色された(図2-17a、b)。抗Gai1/Gai2抗体を用いると細胞全体の染色はGagustと同様に限られた味蕾細胞に染色が見られ(図2-17c、d矢印)、残りの細胞は味孔側のみ発色が見られた(図2-17c、d矢)。この染色はGai2、Gagustに対するものなので、抗Gagust、抗Gai1/Gai2抗体を用いた二重染色を行った。その結果、抗Gai1/Gai2抗体により細胞全体に染色される細胞は全て抗Gagustによっても染色され、抗Gai1/Gai2抗体のみの染色は味孔側に限られることが明かとなった(図2-18a)。二次抗体を逆にしても同様の結果が得られ(図2-18b)、味孔を中心にGai2が発現していることが示唆された。抗Gai3抗体を用いた染色では切片中に味孔を含まない味蕾には染色が見られず(図2-19c矢印)味孔のみに強い発色が見られた(図2-19a、c矢)。抗Gas抗体による染色は、有郭乳頭全体では染色はわかりにくい(図2-20a)、拡大すると味孔を含まない味蕾には染色が見られず(図2-20b矢印)味孔に特異的な染色が見られることが明らかになり(図2-20b矢)、蛍光抗体染色(図2-20c矢)により更に確認された。Gaq、rat Gai15の発現部位(4-2-2参照)を総合すると、Gas、Gai、Gagustファミリーの細胞内の発現部位のパターンは、細胞全体に存在する分子種Gagust、Gaq、

a

Gagust	IDYVNPRSEDQQLLSMAN	(93-112)
Gas	KEALETIVAAMSNLVPPVEL	(100-119)
Gai1, Gai2	KNNLKDCGLF	(345-354)
Gai3	KNNLKECGLY	(345-354)

b

(1) 抗Gai1/Gai2抗体

(2) 抗Gai3抗体



図2-16 抗Gai1/Gai2 および抗Gai3抗体のGagustに対する反応性の確認

a. 抗体染色に用いた抗原

b. GagustC, Gai3C を発現させたYA菌のタンパク質と抗Gai1/Gai2抗体(1),

抗Gai3抗体(2)を用いたウェスタンブロット解析

矢印はGagustC, Gai3C発現蛋白に相当する位置を示す

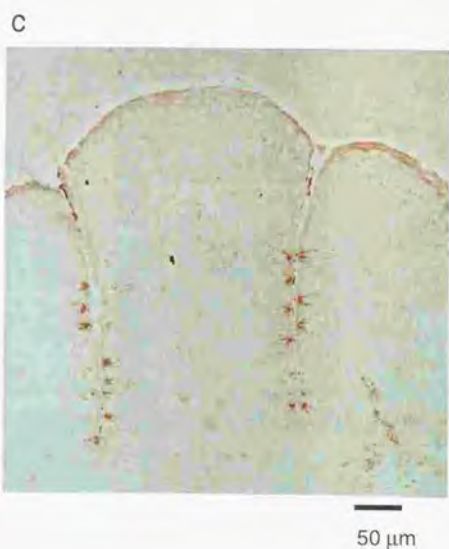
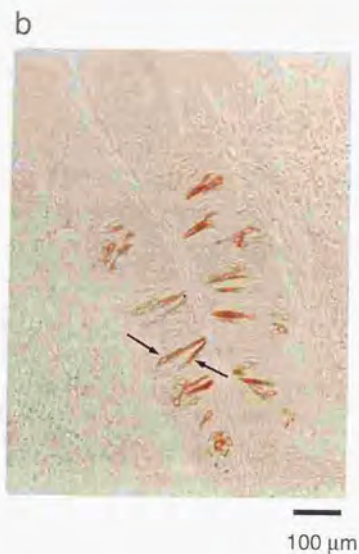


図2-17 Gαs、Gαiファミリーの味蕾細胞内の局在1
(有郭乳頭切片を用いた抗体染色)

- a. 抗Gαgust抗体
b. 抗Gαgust抗体 (拡大)
c. 抗Gαi1/Gαi2抗体
d. 抗Gαi1/Gαi2抗体 (拡大)

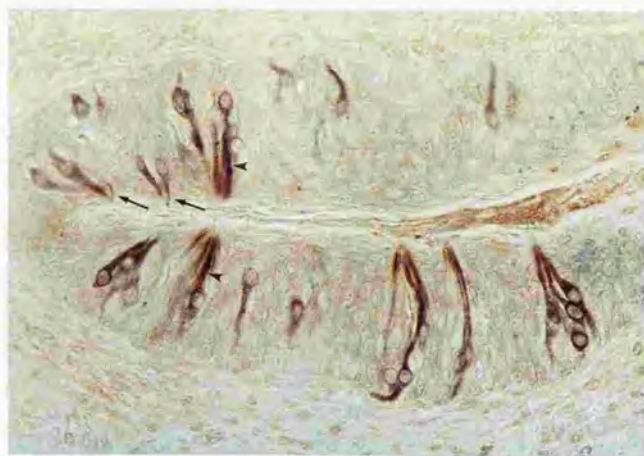
矢印は全体的に染色されている細胞を、矢は味孔を示す。

a



50 μm

b



50 μm

図2-18 *Gag*、*Gai*ファミリーの味蕾細胞内の局在2

a. 抗*Gagust*抗体と抗*Gai1/Gai2*抗体を用いた二重染色

(DABによる茶色が抗*Gagust*抗体を用いた染色、クロロナフトールによる紫色が抗*Gai1/Gai2*抗体を用いた染色)

b. 抗*Gagust*抗体と抗*Gai1/Gai2*抗体を用いた二重染色 (発色基質がcの逆)

(茶色が抗*Gai1/Gai2*抗体を用いた染色、紫色が抗*Gagust*抗体を用いた染色)

抗*Gai1/Gai2*抗体のみにより染色された部位 (a, 紫, b, 茶) を矢印で示し、抗*Gagust*抗体と抗*Gai1/Gai2*抗体の両方により染色された部位 (紫+茶色) を矢で示す。

a



100 μ m

b



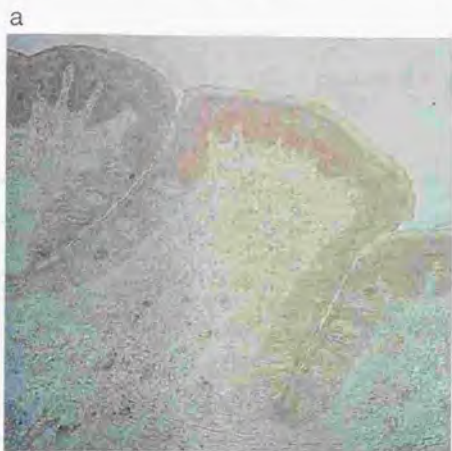
50 μ m

図2-19 *Gas*、*Gai*ファミリーの味蕾細胞内の局在3
(有郭乳頭切片を用いた抗体染色)

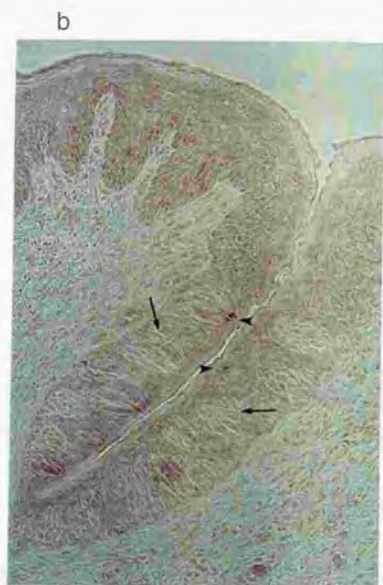
a. 抗*Gai3*抗体

b. 抗*Gai3*抗体 (拡大)

矢は味孔を矢印は味孔が切片に含まれていない味蕾を示す。



100 μ m



50 μ m



50 μ m

図2-20 Gas、Gaiファミリーの味蕾細胞内の局在4
(有郭乳頭切片を用いた抗体染色)

a. 抗Gas抗体

b. 抗Gas抗体 (拡大)

c. 抗Gas抗体 (FITC標識)

矢は味孔を、矢印は味孔が含まれない味蕾を示す。

rat Ga15と味孔に局在する分子種Gai2、Gai3、Gasに分類できた(図2-22-1、2参照)。

5. 考察

本章では、味蕾にGaタンパク質、Gas、Gai、Gaqファミリーが発現していることを明らかにし、更に細胞レベルでの発現様式及びその局在を解析した。

1. Gaタンパク質mRNAの発現様式(図2-21)

*in situ*ハイブリダイゼーションの結果より、限定された味細胞に発現するGagustと、ほとんどの細胞に発現するGas、Gai2の2つの発現様式が見られた(図2-21-1)。味蕾は直径50 μm の球形であり切片作製時に切り口によって分断されるため、組織切片を用いて行った*in situ*ハイブリダイゼーションでは1つの味蕾中のGagustを発現する細胞数を明らかにすることはできなかった。しかしながら、ある分子のmRNAの発現の有無が味蕾細胞レベルで確認されたことは今回が初めてであり、Gagustは味蕾細胞を分類する際の初の分子的なマーカーとなりうるということが明らかとなった。

Gas、Gai2はGagustと比較すると明らかに多くの細胞に発現が認められた。1つの味蕾中の発現を観察すると発色の強さは細胞により幾分異なるように思われるが、Gagustほど発現する細胞数が限定されていないため明確に分類することは出来なかった。また、今回行った*in situ*ハイブリダイゼーションでは、抗体で検出可能なGai3を確認することはできなかった。おそらく現在行っている*in situ*ハイブリダイゼーション法の検出限界以下のmRNA発現量なのではないかと考えられる。

先に述べたように、本研究で用いた*in situ*ハイブリダイゼーション法ではGasあるいはGai2のように味蕾中で発現する細胞数が多い場合には、味蕾全体に発現しているように観察され細胞毎の発現の有無を確認することは困難であった。また、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いてGagust mRNAの発現様式と他の分子の発現様式を同時に明らかにするためには、標識の異なる2種のプローブを用いる二重染色法が必要となるが、舌組織では二重染色法を用いた*in situ*ハイブリダイゼーションを成功させた例はない。本章で行ったsingle-cell RT-PCRは、完全に単独の細胞についてその中に存在する3種類までの分子の発現の有無を確認できるため、*in situ*ハイブリダイゼーション法では明確に出来ない複数の分子の発現様式の比較を可能とした。味蕾細胞でのsingle-cell RT-PCRは初の試みであった。

*In situ*ハイブリダイゼーションではGasを発現している味蕾細胞の数は少なくともGagustを発現している細胞の3倍はあることが観察された。しかし、single-cell RT-PCRではGasを発現している細胞はGagustの約1.3倍に留まり、*in situ*ハイブリダイゼーションの結果とは傾向が一致するにとどまった。理由として、味蕾細胞を形態的特徴のみで選んでいることから選択した細胞には人の目を通した偏りが生じる可能

1. *in situ*ハイブリダイゼーションより観察された発現パターン



2. single-cell RT-PCRより分類された味蕾細胞の種類



Gagustのみ
発現する細胞



Gasのみ
発現する細胞



Gas, Gagust両者を
発現する細胞



両者とも発現
していない細胞

3. 1と2より予想される味蕾内のGas, Gagustの発現パターン



図2-21 mRNAレベルで明らかになったGaタンパク質の発現パターン
(Gas, Gagustを中心に)

性があること、一個の細胞を用いるため微妙な条件の差で細胞からmRNAが得られない、酵素反応が行われないことなどが挙げられる。しかし、この方法を用いると、少なくともGagustのみが発現している細胞、Gasのみが発現している細胞、両者が発現している細胞の3種類に味蕾細胞を分類でき、single-cell RT-PCR法が分子生物学的手法を用いた味蕾細胞の分類への足がかりとなることを示した。また、*in situ*ハイブリダイゼーションの結果とsingle-cell RT-PCR法の結果を総合すると、分類された3種類の細胞が1つの味蕾内に存在することが予想される(図2-21-3)。

Single-cell RT-PCRで発現様式を調べたGagustはGaiファミリーに属し、細胞内cAMP濃度を減少させる働きを持ち(Katada *et. al.*, 1984)、Gasは逆に細胞内cAMP濃度を上昇させる性質を持つ(Quan *et. al.*, 1991)。本章で行ったsingle-cell RT-PCRの結果を細胞内セカンドメッセンジャーcAMPの濃度変化のみに焦点を当てて考察すると、味蕾細胞には細胞内cAMP濃度を上昇させる性質を持つものと、減少させるものと、上昇・減少の両方の機能を兼ね備えたものが存在することになり、1つの機能を焦点にしたときでさえ3種類に分類できることが示された。今後、味覚に関与していることが示唆されているもう一つのセカンドメッセンジャーIP₃に関係するGaqについてもsingle-cell RT-PCRを行うなら、味蕾細胞は更に多種類に分類されるかもしれない。この予想は味覚の情報伝達カスケードの多様性とそれを司る味蕾細胞の組み合わせといった複雑さを反映していると考えられる。

2. Gaタンパク質の細胞内の局在(図2-22)

mRNAレベルの発現様式は、味蕾細胞の分類には有効であるが、細胞内におけるGaタンパク質の役割を考察するには抗体染色によりその局在を明らかにすることが必要である。Gaタンパク質の局在は抗体染色の結果より、味孔に局在するもの(Gas、Gai2、Gai3)と細胞全体に存在するもの(Gagust、Gaq、rat Ga15)の2種類に分けられた(図2-22-2)。細胞全体に発現しているGaタンパク質が味孔にも発現していると考え、味孔には今回検討した全てのGaタンパク質が集中して発現して(図2-22-3)、そこに局在する多数のGタンパク質共役型レセプターと共役することが予想された。更に、味孔は味蕾の構造の中で外界と接触する部位であることから、ここに存在するレセプターは味覚レセプターとして味物質と結合する可能性が高い。また、第一章で報告したレセプターを始め舌上皮からクローニングされた多種類のGタンパク質共役型レセプターが味孔に発現して味覚シグナリングを行う可能性もある。

今回の抗体染色により、ほぼ全ての細胞がGaqファミリーを含むことが明らかになった。また、single-cell RT-PCRの結果より1つの細胞内にGasとGaiファミリーを同時に有する細胞が存在することが示されている。したがって1つの細胞内にGai、Gas、Gaqの3種のファミリーを有している細胞が存在していることになり、ここで

1. 味蕾内の発現パターン

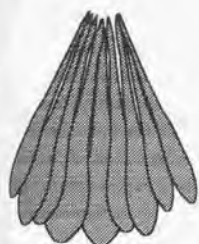
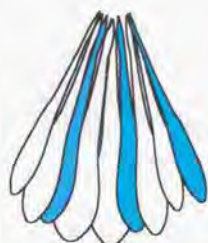


Fig. rat $G\alpha 15$ の発現パターン
全ての味蕾細胞全体に
発現が観察される



$G\alpha g u s t$ の発現パターン
限定された細胞全体に
発現が観察される



$G\alpha s$, $G\alpha i 2$, $G\alpha i 3$ の
発現パターン
味孔にのみ発色が見られる

2. 1つの細胞内の $G\alpha$ タンパク質の局在



$G\alpha q$, rat $G\alpha 15$ 及び $G\alpha g u s t$
細胞全体に染色される



$G\alpha s$, $G\alpha i 2$, $G\alpha i 3$
味孔にのみ染色される

3. その結果予想される味蕾内の $G\alpha$ タンパク質の発現パターンとシグナル伝達

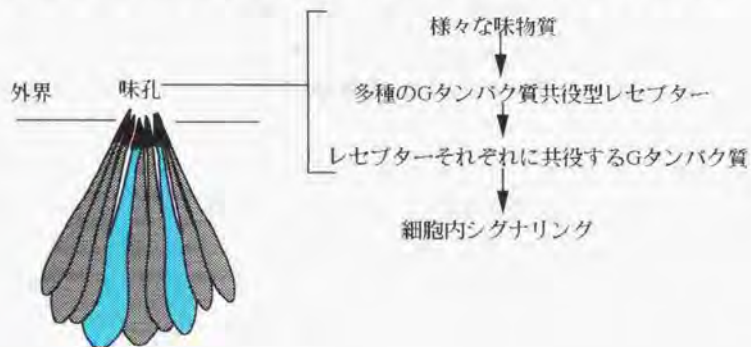


図22 $G\alpha$ タンパク質の細胞内における局在の概略図と
その結果予想される発現パターンおよびシグナル伝達

は複数のシグナル伝達機構が部分的にあるいは同時に起こりうる。

基底部側には味孔での発現の種類には及ばないものの、1つの細胞内に数種類Gαタンパク質が存在することが明らかになった。味細胞中に存在する味覚以外のシグナル伝達系は明らかになっていないが、基底部側にも何らかのシグナル伝達系が存在することが予想される。

3. 味蕾に存在するGαタンパク質の役割

本章で得たGαタンパク質が味覚に関与するとすれば、各ファミリーによって以下のような役割を持つことが考えられる。

Gaiファミリーに属しているGα_{gust}は、そのノックアウトマウスが砂糖、糖以外の甘味物質sc-45647の感受性をほぼ完全に失うことと、多くの苦味物質の感受性を一部抑えることが報告されている(Wong *et al.*, 1996)ことから、これらの味物質のシグナル伝達に関与していることが示唆されている。sc-45647 (Bernhardt *et al.*, 1996)と大半の苦味物質はPLCβを活性化させる伝達系を経る(Spielman *et al.*, 1996)ことが示されており、Gα_{gust}に結合するβγサブユニットが関与する可能性も高い。しかし、

Gα_{gust}のノックアウトマウスはPLC-βを活性化する甘味物質サッカリンに感受性を残し、苦味物質の感受性は一部の抑制に留まっている。よってGα_{gust}が関与しない甘味・および苦味のシグナル伝達はGiのGai2、Gai3を含めたGaiファミリーとβγサブユニット、および以下にその推定される役割を記述するGαqファミリーが関与する可能性がある。

また、Gaiファミリーの阻害剤である百日咳毒素で処理した味蕾に苦味物質サッカリンオクタアセテートを添加すると、それによる細胞内IP₃濃度の上昇が抑えられることから(Spielman *et al.*, 1994)、今回得られたGai2、Gai3を含めたGaiファミリーに結合するβγサブユニットが苦味物質のシグナリングに関与しうることが示唆される。

Gαqファミリーは、rat Gα15、Gαqの2種のみがクローニングされた。両者ともPLCβを活性化し細胞内IP₃濃度を上昇させるので、糖以外の甘味、あるいは苦味に関与すると思われる。両者の中ではrat Gα15の性質が目される。Gαq、Gα11、Gα14間の相同性が80~88%であるのに対し、rat Gα15、Gα15(マウスGα15)、Gα16(ヒトとGα15)とGαq、Gα11、Gα14間の相同性は54~57%と低い。よってrat Gα15はGα15やGα16と共にGαqファミリーの中ではユニークな立場にあることが予想される。注目すべき特徴は、Gα15はGαqファミリーと共役するGタンパク質共役型レセプターと結合できるのみならず、GaiファミリーやGasファミリーと共役するレセプターとも

結合してPLC- β を活性化することが出来る点である (Offermanns and Simon, 1995)。また、G α_q がほぼ全ての組織に発現しているのに対し、G α_{15} , G α_{16} は造血に関与する細胞に豊富に発現する特徴を有することが報告されている (Wilkie *et al.*, 1991)。

rat G α_{15} は舌上皮からクローニングされ、G α_{15} が造血に関与しない細胞にも発現することが明らかになった。rat G α_{15} はGタンパク質共役型レセプターに対する選択性が低いため、味孔に存在する多数のGタンパク質共役型レセプターの多くと結合してPLC- β を介した苦味のシグナリングを行う可能性が高い。また、G α_i ファミリーやG α_s ファミリーと共役するレセプターを共有する可能性もある。

G α_s はスプライシングの違いによる2種類が得られたが、大きさの違いによる性質の相違は明かではない。生化学的研究から糖の甘味は細胞内cAMP濃度を上昇させる (Striem *et al.*, 1989) ことよりG α_s が糖の甘味に関与すると思われる。また、G α_{gust} のノックアウトマウスは砂糖に対する感受性を失う (Wong *et al.*, 1996) ことから、G α_s のみが糖の甘味のシグナル伝達系に関与しているのではなくG α_{gust} も関与していると考えられる。

以上のようなG α タンパク質の役割が考えられるが、これらの系が同一の細胞に存在したときにどのようなシグナリングを行い、複雑な味覚シグナル伝達系を構築しているかを解明することは今後の大きな課題である。

第三章

味蕾に発現する電位依存性カルシウムチャンネル

1. 緒言

味物質を受容した味細胞の情報は、味神経とのシナプス部位に神経伝達物質を放出することにより伝達される。

細胞から細胞へシグナルが伝達される際には、細胞内に神経伝達物質、ホルモン、サイトカインなどのシグナル物質が産生された後、細胞外に分泌され標的細胞にそのシグナルを伝える。細胞内から細胞外への物質の放出には細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が必要であり、それは細胞外からの Ca^{2+} の流入、あるいは細胞内 Ca^{2+} ストアーからの Ca^{2+} の放出により引き起こされる。前者はイオンチャンネルが、後者はセカンドメッセンジャー IP_3 濃度の上昇が関与する。イオンチャンネルのうち、 Ca^{2+} を通すものは電位依存性カルシウムチャンネルをはじめ、環状型ヌクレオチド活性化型チャンネル (Frings, *et al.*, 1995)、NMDA受容体 (MacDermott *et al.*, 1986)等が存在する。中でも、細胞に発生した何らかのシグナルの結果、膜電位が変化して細胞外から Ca^{2+} が流入することが多く、膜電位に依存したCaチャンネルを介する系が多数存在することが考えられる。

味蕾細胞から味神経に神経伝達物質が放出される際にも一過性の Ca^{2+} の濃度の上昇が必要である。甘味物質および苦味物質がGタンパク質共役型レセプターに結合してGタンパク質Gq、PLC β を活性化し、その結果細胞内セカンドメッセンジャー IP_3 濃度の上昇が起こり Ca^{2+} ストアーから細胞内へ Ca^{2+} が放出されることが示唆されている (Bernhardt *et al.*, 1996, Akabas *et al.*, 1988)。他の味覚物質に対する細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇は、何らかのイオンチャンネルからの Ca^{2+} の流入に依るのではないかと考えられる。味蕾細胞は、電氣的刺激を与えると活動電位が生じることが知られているだけでなく (Roper 1983, Avenet and Lindemann, 1987)、酸味 (Kinnamon and Roper, 1988)、塩味 (Avenet and Lindemann, 1987)、サッカリンの甘味 (Béhé *et al.*, 1990)によっても活動電位が生じることが観察されてきた。活動電位が生じることとはつまり膜電位変化が起こることなので、その際には電位依存性Caチャンネルが開口し膜外から Ca^{2+} が流入すると考えられる。更に、生理学的には味蕾細胞中に電位依存性CaチャンネルのL、T型 (後述) の存在が示唆されている (Béhé *et al.*, 1990)。よって酸味、塩味、サッカリンは電位依存性Caチャンネルからの Ca^{2+} の流入を引き起こし、最終的に味蕾細胞から味神経へ伝達物質を放出させるに至ると思われる。また、蔗糖を味蕾細胞に添加すると細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見られ、しかも細胞外から流入した結果であることも示されている (Bernhardt *et al.*, 1996)。しかしながら、分子生物学的には味蕾内の電位依存性Caチャンネルの存在は明かではなかった。

電位依存性Caチャンネル (以後Caチャンネルと略す) は、生理学的性質 (チャンネルの開閉時間と活性化閾値電位) により大きくT、L、N、P(Q)、Rの5種類の型に分けられる (図3-1a) (Birbaumer, *et al.*, 1994)。T、L型は様々な組織に存在し、N、

P(Q)、R型は神経性であり、N型は脳・神経系全般を中心に、P(Q)型はブルキンエ細胞を中心とした脳に、R型は海馬を中心に存在することが知られている(Birnbaumer, et. al., 1994)。分子生物学的にはT型を除くL、N、P(Q)、R型が明らかになっており(Birnbaumer, et. al., 1994)、特に骨格筋L型の構造が最も詳細に調べられている。現在までに、Caチャンネルはサブユニット構造を形成し、一般には α_1 、 α_2 、 β 、 δ サブユニットから構成され、骨格筋型のみそれらに γ サブユニットを加えた構造をとることが明かとなっている。そのうち α_1 サブユニットが電位センサーおよびチャンネルポアを含み、生理学的性質を反映することが知られている(Catterall, 1995)。

α_1 サブユニットはNa⁺チャンネルの α サブユニットと同じ基本構造を有している(図3-1b)。すなわち、細胞膜を貫通するセグメントを6本ずつ持つ構造が4回繰り返された構造をしており、4つのドメインが集合して中心にイオンの通るチャンネルを形成していると考えられる。また、各ドメインに存在するS4セグメントは細胞膜の膜電位変化を感知する電位センサーであり(Catterall, 1995)、S5とS6セグメントの間にポア形成部位およびイオン選択性フィルターが存在している。現在までにラットからは少なくとも5種類の α_1 サブユニットの遺伝子が見出されており、それぞれP(Q)型、N型、R型、2種のL型(Birnbaumer, et. al., 1994)であることが明らかになっている(図3-1a)。

第一、二章では味覚の受容に関与する分子の解析を行ったが、本章では味細胞にとって受容と同等に重要であり、味神経へのシグナル伝達物質の放出に必要な細胞外からのカルシウムイオンの流入に着目した。具体的には、味蕾細胞に存在するCaチャンネル α_1 サブユニットの種類およびその発現部位を明らかにすることを目的とした。

2. 実験材料および試薬

2-1 実験材料

実験動物は第一、二章と同様の物を用いた。

2-2 試薬類

2-2-1 カラム

エポキシ活性化セファロース6BカラムはPharmacia Biotech社より購入した。

2-2-2 抗体

rbB(N)に対する抗体としてAnti- α_1B をAlamone labs社から購入して用いた。

2-2-3 抗原ペプチド

a. 電位依存性Caチャンネル α_1 サブユニットの種類

機能的略称	ラットcDNAクローン	存在	阻害剤
P(Q)型	rbA	脳、神経（プルキンエ細胞）、 内分泌細胞	ω -アガトキシン
N型	rbB	脳、神経、内分泌細胞	ω -コノトキシン
L型	rbC	様々な組織	ジヒドロピリジン
	rbD	神経、内分泌細胞	
R型	rbE	脳（海馬）	Ni^{2+}
T型	クローニングされていない	様々な組織	Ni^{2+}

b. 電位依存性Caチャンネル α_1 サブユニットの構造的特徴

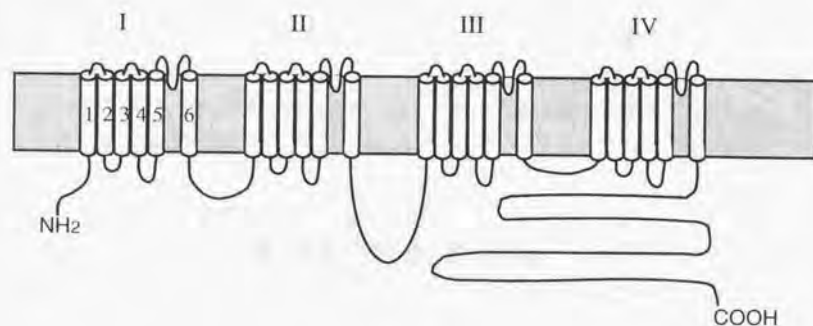


図3-1 電位依存性Caチャンネル α_1 サブユニットの種類およびその構造的特徴

- a. 電位依存性Caチャンネル α_1 サブユニットの種類、組織特異性、阻害剤、およびラットで明らかにされているクローンの一覧表
- b. 電位依存性Caチャンネル α_1 サブユニットの構造的特徴
 1~6は各セグメントを示し、I~IVは6つのセグメントが集合したドメインを示している。S5とS6の間はポアを形成する部位を有している。

抗原ペプチドは有限会社バイオリンクに合成を委託した。

2-3 調製溶液類

○ペプチド抗体精製用試薬

- (i) カップリング緩衝液: 50 mM炭酸ナトリウム-重炭酸ナトリウム(pH 8.5)
- (ii) ブロッキング緩衝液: 0.1 mMモノエタノールアミン
50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)
- (iii) 洗浄緩衝液: 1 M塩化ナトリウム
1%トリトンX-100
20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)
- (iv) 溶出緩衝液: グリシン-塩酸緩衝液(pH 2.5)

他は第一、二章と同様のものを用いた。

3. 実験方法

下線部の試薬は2-3に記載した。

3-1 PCR

Caチャンネルを得るために作製したプライマー、および発現の確認に用いたプライマーは結果中に記載した。鋳型として有郭・葉状乳頭上皮由来mRNAから作成したfs-cDNAを用いた。PCRは、94℃30秒、45℃30秒、72℃30秒を50サイクル行った。他の条件は第一章と同様に行った。

3-2 サザンブロット解析

基本的には第一章と同様の方法で行った。結果中に示したオリゴヌクレオチドを5'末端標識してプローブとして用いた。ハイブリダイゼーションは45℃で行い、6×SSCを用いて洗浄を行った。

3-3 抗ペプチドポリクローナル抗体の作成

(1) 抗原ペプチドの合成

抗原ペプチドとしてrbA(P(Q))に対してはH·Glu-Ser-Ala-Arg-Asp-Pro-Asp-Ala-Arg-Arg-Ala-Trp·OH (853-864)を、rbC(L)に対してはH·Ser-Pro-Pro-Thr-Thr-Lys-Ile-Asn-Met-Asp-Asp-Leu-Gln-Pro·OH (815-828)を合成して用いた。

(2) 抗原ペプチドの合成から抗血清の獲得までは第一章と同様に行った。

(3) 抗体の精製

水で膨潤した1 gのエポキシ活性化セファロース6Bカラムに水に溶解した1 mgの抗

原ペプチド、7 mlのカップリング緩衝液を加え37℃で一晩振とうした。カップリング緩衝液でカラムを洗浄し、ブロッキング緩衝液を10 ml程度加え45℃で4時間振とうした。その後、水、TBSでカラムを洗浄し4 mlの抗血清を加え4℃で一晩抗原ペプチドと抗体を結合させた。カラムをTBS、洗浄緩衝液、TBS、0.15 M NaCl液で洗浄した後、溶出緩衝液で抗体を溶出させ回収した。

3-4 ウェスタンブロット解析

第二章と同様の方法で10匹の有郭・葉状乳頭上皮を剥離した。ポリトロンを用いて1 mM PMSFを含むPBS中でホモジナイズした後、更に超音波破碎を行った。600 rpm、1分の遠心を行い、核と角質化した組織を除いた上清を得た。更に10,000 ×g 10分の遠心を行い、沈殿物をカルシウムチャンネルを含むであろう膜画分として用いた。電気泳動には6%のアクリルアミドを含むゲルを用い、サンプルバッファーに溶解させた膜画分の内、20分の1 (0.5四分) を各レーンに用いた。ウェスタンブロット解析の方法は基本的に第二章と同様に行い、一次抗体は抗rbA(P(Q))は100倍、抗rbC(L)は200倍に希釈して用いた。シグナルの検出はECLウェスタンブロット検出試薬 (Amersham社)を用いてフィルムに感光させることにより行った。

3-5 小脳の標本作製

ラットから小脳を摘出し、5 mm以下の組織片を作成し、ブアン溶液に一晩静置して固定した。パラフィンに包埋するまでの過程は第一章と同様に行った。

3-6 抗体染色

ABC法、および蛍光法を用いた。舌の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭の切片は共に凍結切片を用いた。小脳はパラフィン切片を用い、はじめに脱パラフィンを行った。凍結切片、パラフィン切片は共に5 μmの厚さの切片を用いた。他の行程は舌、脳ともに第二章と同様に行った。抗体は、抗rbA(P(Q))を50倍、抗rbB(N)を200倍、抗rbC(L)を100倍に希釈して用いた。

他の方法は第一、二章に準じた。

4. 結果

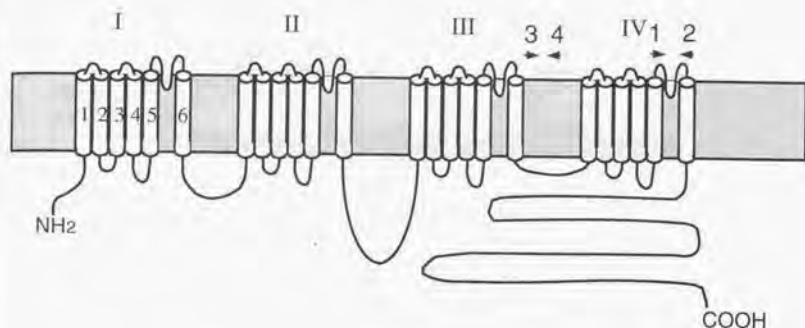
4-1 RT-PCRによるラット有郭・葉状乳頭に存在するCaチャンネル α_1 サブユニット mRNAの種類同定

ラット有郭・葉状乳頭に存在するCaチャンネル α 1サブユニット（以降、単にCaチャンネルと略す）mRNAの種類を調べるためにRT-PCRを行った。今までに明らかにされている4つの型（P(Q)型、N型、L型、R型）のCaチャンネルの構造の内、相同性の高いボア領域をその間に含む第4ドメインのS5とS6セグメントのアミノ酸配列（Pellegrini-Giampietro, *et. al.*, 1992）を基にしてプライマー1、2を合成した（図3-2a）。鋳型としてラット有郭・葉状乳頭上皮由来のfs-cDNAを用いてPCRを行ったところ、予想された位置にバンドが確認された。そのバンドをサブクローニングして核酸配列をしらべたところ、2種類のCaチャンネルをコードするクローンが得られた。既知のCaチャンネルとの相同性を検索したところ、ラット脳から既にクローニングされている神経性P(Q)型のrbA（Starr, *et. al.*, 1991）とN型のrbB（Dubel, *et. al.*, 1992）と完全に一致することが明らかになった（図3-2b）。以後rbAをrbA(P(Q))、rbBをrbB(N)、と記す。使用したプライマーの位置はイントロンを挟んでいないため、得られたrbA(P(Q))、rbB(N)は遺伝子由来である可能性がある。そこでラット有郭・葉状乳頭上皮由来のmRNAに対して逆転写酵素反応を行ったものを行わないものを鋳型とし、rbA(P(Q))、rbB(N)それぞれに特異的なプライマー（図3-3a）を用いてPCRを行い、オリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンプロット解析を行った（図3-3b）。逆転写酵素反応を行うと予想された位置にバンドが確認されたが、行わない場合にはバンドは検出されず、今回得たrbA(P(Q))、rbB(N)は有郭・葉状乳頭由来であることが確認された。

以上のように、有郭・葉状乳頭上皮には現在までその存在が示されていない神経性のP(Q)型のrbA(P(Q))、N型のrbB(N)が発現していることが明らかになった。しかしながら、生理学的にその存在が示唆されているL型はクローニングされなかった。そこで、新たにL型に共通するアミノ酸配列を基にプライマーを作成して（図3-2a）RT-PCRを行い、得られた断片をサブクローニングした。その結果、やはりラット脳からクローニングされたL型のrbC（Snutch, *et. al.*, 1991）と完全に一致する断片のみが得られた（図3-2b）（以後、rbC(L)と記す）。rbC(L)は遺伝子構造が明らかなので、rbC(L)の有郭・葉状乳頭上皮における発現を確認するためにイントロンを挟んだ位置のプライマーを作成し（図3-4a）、再びRT-PCRを行った。尚、この位置はオルタナティブスプライシングによりrbC-I(L)、rbC-II(L)が生じることが知られている（Snutch, *et. al.*, 1991）（図3-4a）。そこでrbC-I(L)、rbC-II(L)それぞれに特異的なオリゴヌクレオチドをプローブとしてRT-PCR産物をサザンプロット解析に供した。その結果、両者とも予想された位置にバンドが検出され、有郭・葉状乳頭上皮にはrbC-I(L)、rbC-II(L)が存在することが明らかとなった（図3-4b）。

4-2 抗体染色によるCaチャンネルの発現部位の解析

a. 作成したプライマー



作成したプライマーの塩基配列

対応するアミノ酸配列

1. ATGCT (CG) TTCTTCATCTA (TC) GC	MLFFIYA
2. GGGTC (AG) TA (TC) TC (TA) G (AC) CCA (TG)	(IV) W (SA) EYDP
3. GA (AG) TA (CT) AAGAACTGTGAGCTG	EYKNCEL
4. GGG (CT) TT (AG) AA (AGT) GC (AGT) ATGA (CG) (TC) TT	K (VL) IAFKP

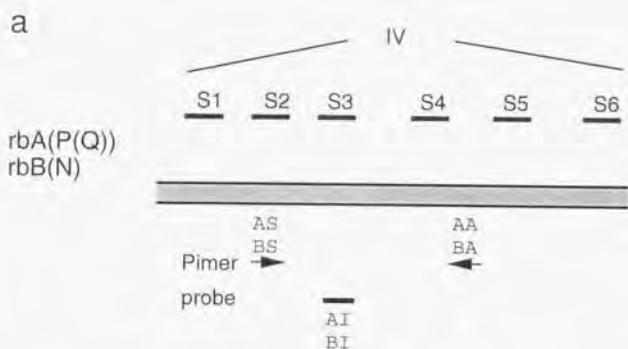
b. プライマーの組み合わせと得られたクローン

プライマー	型	クローン
1, 2	P(Q)	rbA
1, 2	N	rbB
3, 4	L	rbC

図3-2 舌有郭・葉状乳頭上皮中に存在するCaチャンネルmRNAの種類

a. RT-PCRに用いたプライマーの位置、及びその配列。矢印は用いたプライマーの位置を示している。

b. PCRに用いたプライマーの組み合わせとその結果得られたクローン。



作成したプライマーおよびプローブの核酸配列

AS 5'-ACCATCATGGCCATGATCGCT-3' (+4564 ~ +4584)
 AA 5'-GGCATAGATGAAGAAGAGCA-3' (+4973 ~ +4954)
 AI 5'-ATCACAGACATCCTCGT-3' (+4777 ~ +4793)
 BS 5'-TTCATTATGGCCATGATAGCC-3' (+4432 ~ +4452)
 BA 5'-GGCGTAGATGAAGAACAGCA-3' (+4842 ~ +4822)
 BI 5'-TACGATGCCCTTATGAGTAC-3' (+4483 ~ +4503)

b

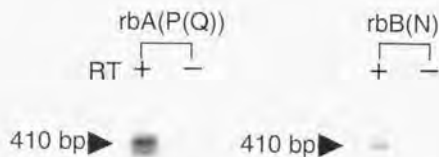
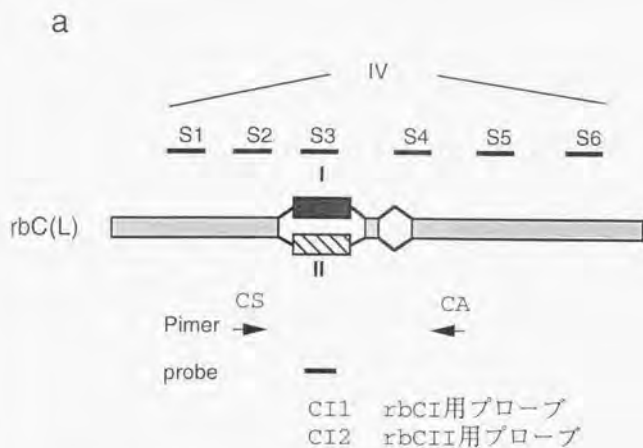


図3-3 RT-PCRによる有郭・葉状乳頭上皮中のrbA(P(Q))、rbB(N)の発現の確認
 a. PCRに用いたプライマーの配列。IVはドメインを、S1~S6はセグメントを示す。
 矢印はプライマーに用いた位置を、太線はプローブに用いた位置を示す。
 b. 逆転写酵素の有無による発現の確認。RT+、-は逆転写酵素の有無を示す。
 PCR後、サザンブロット解析をaに示したプローブAI、BIを用いて行った。



作成したプライマーおよびプローブの核酸配列

CS	5' -TACGGCCAGAGCTGCCTCTTC-3'	(+3721 ~+3741)
CA	5' -TGCATAGATAAAGAACAGCA-3'	(+4124 ~+4105)
C11	5' -TTCTCAGTGAAACTAAT-3'	(+3896 ~+3912)
C12	5' -CAATCACCGAGGTACAC-3'	(+3896 ~+3912)



図3-4 RT-PCRによる有郭・葉状乳頭上皮中のrbC-I(L)、rbC-II(L)の発現の確認

a. PCRに用いたプライマーの配列。IVはドメインを、S1~S6はセグメントを示す。

矢印はプライマーに用いた位置を、太線はプローブに用いた位置を示す。

b. サザンブロット解析によるrbC-I、rbC-IIの発現の確認。I、IIはrbC-I、rbC-IIを示す。

a.に記したプローブを用いた。

次に、今回得たCaチャンネル(rbA(P(Q)), rbB(N), rbC(L))の舌上皮(有郭・葉状・茸状乳頭)における発現部位を調べるために抗体染色を行った。rbB(N)に対する抗体は購入した物を用い、rbA(P(Q)), rbC(L)に関しては抗rbB抗体を参考にしてCaチャンネル間で相同性の低い部位であるドメインIIとIIIの間の15アミノ酸残基を基に合成ペプチド(図3-5)を抗原として抗体を作成した(図3-5)。先に示したとおり、rbC(L)はオルタナティブスプライシングによるIとIIが存在するが、全体的に非常に相同性が高く、また特に注目すべき組織特性が両者ともないため(Snutch, *et. al.*, 1991)、rbC(L)に対する抗体はrbCI(L)、rbCII(L)とも認識するものを用いた。ラット有郭乳頭上皮を用いてウェスタンブロット解析を行い、作製した抗体がそれぞれのCaチャンネルに特異的であることを確認することにした(図3-5)。rbC(L)に対する抗体は約210 kDのタンパク質のみを認識し、rbC(L)の大きさとほぼ一致した。しかしながら、rbA(P(Q))に関してはバンドは確認されなかった。この原因として、ラット有郭乳頭上皮内のrbA(P(Q))の存在量が非常に少ないことが挙げられる。そこで、他の組織でその局在が明らかになっているものをコントロールとして抗体染色を行うことにした。小脳におけるrbA(P(Q)), rbB(N), rbC(L)の発現部位は抗体染色により既に明らかになっている(Sakusai *et. al.*, 1996, Westenbroek *et. al.*, 1992, Hell *et. al.*, 1993)ので、まず小脳をポジティブコントロールとして抗体染色を行った。その結果、既存の報告と同様、抗rbA(P(Q))抗体に対しては小脳のプルキンエ細胞に特異的に(図3-6a)、抗rbB(N)抗体はプルキンエ細胞の内側に存在する顆粒細胞に(図3-6b)、抗rbC(L)抗体はプルキンエ細胞を含む神経細胞に特異的な染色が見られ(図3-6c)、それぞれのチャンネルを認識する抗体として用いることが可能であると判断した。そこで、味蕾を含む有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭の切片を用いて抗体染色を行った。

rbA(P(Q))に対する抗体を用いて有郭乳頭の切片を染色した場合、味孔に強い染色が見られた(図3-7a)。切片に含まれている味蕾の内、味孔を含まないものにはこの染色は見られず、味孔特異的な染色であることが明らかになった(図3-7c)。味孔以外(基底部側)では、味蕾中の数個の細胞のみに局所的な染色が見られた(矢印)。これらの染色は抗原のペプチドで予め抗体を吸収させると観察されなくなった(図3-7b)。また、葉状乳頭の切片を用いて染色しても同様の傾向が見られ(図3-7d)、舌の先端を中心に点在する茸状乳頭を用いて染色を行った場合にも味孔部分に染色が見られた(図3-7e)。

rbB(N)に対する抗体を用いて有郭乳頭の切片を染色するとやはり味孔側に特異的な染色が見られた(図3-8a)。味孔側の染色は、全ての味蕾細胞に見られたが、細胞全体に染色されるものは数個に限られ、rbA(P(Q))と似た傾向が見られた(図3-8b)。葉状乳頭の切片を用いて染色を行うとやはり有郭乳頭と同様の傾向が見られたが(図3-8c)、茸状乳頭に関しては特定の細胞の全体にのみ染色が見られ(図3-8d)味孔部

分には染色は見られなかった(図3-8e)。

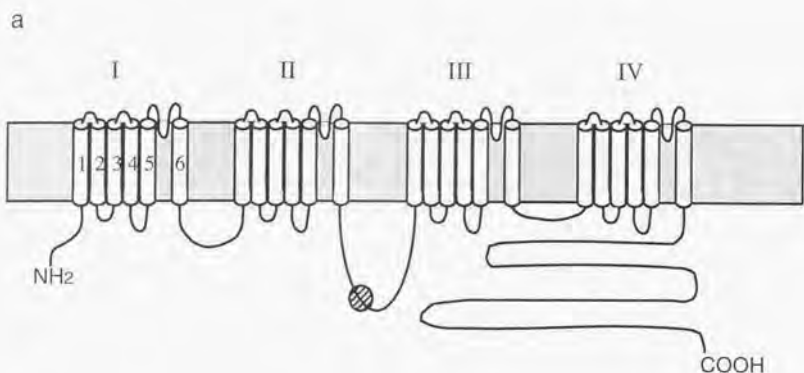
rbC(L)に対する抗体を用いて有郭乳頭の切片を染色すると味孔に染色が見られた(図3-9a)。しかしながらrbA(P(Q))、rbB(N)とは異なり基底細胞側の染色は見られなかった。また、筋層との境界側の上皮細胞にも点在して存在することが明らかになった(図3-9a)。これらの染色は吸収実験により観察されなくなるため(図3-9b)、rbC(L)特異的染色であると判断された。また、葉状乳頭切片を用いてもrbA(P(Q))、rbB(N)と同様に有郭乳頭と同じ位置すなわち味孔に染色が見られた(図3-9c)。しかしながら茸状乳頭での特異的な染色は観察されなかった(図3-9d)。

よって有郭・葉状乳頭の味蕾細胞には味孔にrbA(P(Q))、rbB(N)、rbC(L)が局在すること、限定された細胞の基底側部にrbA(P(Q))、rbB(N)が存在することが明らかになった。また、茸状乳頭におけるrbA(P(Q))、rbB(N)、rbC(L)の局在は、有郭・葉状乳頭とは異なる可能性が高いことが明らかになった。

5. 考察

本章において、ラット有郭・葉状乳頭からCaチャンネルの一部を3種類クローニングした。これらはラット脳から既にクローニングされているCaチャンネル、rbA(P(Q))、rbB(N)、rbC(L)であった。rbC(L)の属すL型は、生理学的にもその存在が示唆されており(Béhé *et al.*, 1990)、また今回抗体染色により味蕾のみならず舌の上皮にも点在することが明らかになった。そのため、有郭乳頭上皮を用いたウェスタンブロット解析では味蕾のみに発現するrbA(P(Q))を検出できなかったのに対しrbC(L)の検出は可能となったと思われる。

本章では、更に、味蕾に存在することが示唆されていない神経性のrbA(P(Q))とrbB(N)が存在することが明らかになった。味蕾は上皮細胞由来であることが示唆されているが、味蕾細胞中には神経特異的エノラーゼ(NSE)を有する(Yoshie *et al.*, 1988)神経的な性質を持つ細胞が存在することが明らかになっており、他の神経性の分子の存在も十分に考えられる。また、rbA(P(Q))は心臓にも発現していることがノーザンブロット解析からも明らかになっており(Starr, *et al.*, 1991)、今回の結果はrbA(P(Q))とrbB(N)が神経細胞のみに発現する分子でないことをさらに裏付けた。神経細胞内では、rbA(P(Q))、rbB(N)はシナプス前膜に存在し(Robitaille *et al.*, 1990, Westenbroek *et al.*, 1995)神経伝達物質の放出の制御に関与する(Hirning *et al.*, 1988, Wheeler, *et al.*, 1994, Luebke *et al.*, 1993, Takahashi and Moriyama, 1993)ことが明らかになっている。味細胞と味神経のシナプスは味蕾中のIII型細胞の基底側部に存在し、味細胞に存在するシナプス小胞中のシグナル伝達物質が味神経に放出されると考えられ、シナプス前膜は味細胞側に当たる。rbA(P(Q))、rbB(N)がIII型細胞に発現するか否かは明かではないが、rbA(P(Q))、rbB(N)は限られた細胞の基底側部に存在する



b

rbA(P(Q))	ESARDPDARRAW (853-864)
rbB(N)	RHHRHRDRDKTSASTPA (851-867)
rbC(L)	SPPTTKINMDDLQP (815-828)

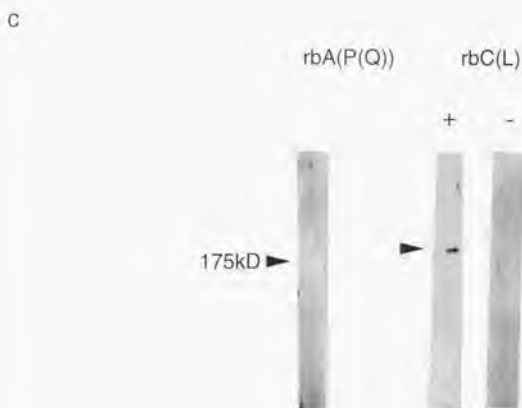


図3-5 有郭・葉状乳頭上皮を用いたウェスタンブロット解析

- a. 抗原として選んだ部位 (IIドメインとIIIドメインの間) を⊙で示した。
 b. 抗原に用いたペプチドのアミノ酸配列。それぞれに相当するCaチャンネル中のアミノ酸残基の番号を右に記した。
 c. ウェスタンブロット解析。有郭・葉状乳頭上皮を各レーンに0.5匹分用いた。+は抗rbC抗体を200倍にして用い、-は予め抗体と抗原ペプチドを反応させてから用いた。+のレーンの矢はrbC(L)と思われるバンドを示す。

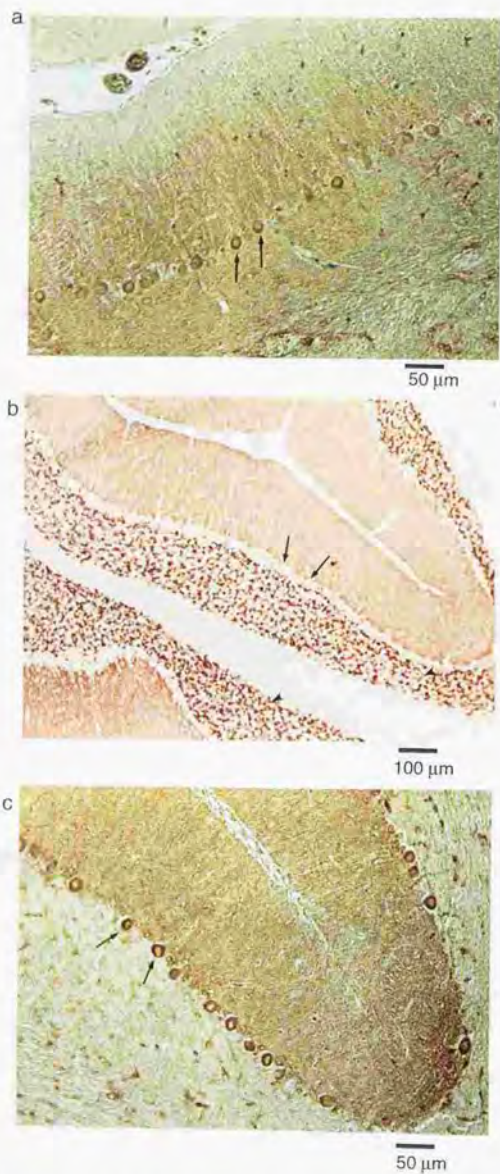


図3-6 小脳切片と抗Caチャンネル抗体を用いた抗体染色

a. 抗rbA(P(Q))抗体を用いた染色。矢印はプルキンエ細胞を示す。

b. 抗rbB(N)抗体を用いた染色。矢印はプルキンエ細胞を、矢は顆粒細胞層を示す。

c. 抗rbC(L)抗体を用いた染色。矢印はプルキンエ細胞を示す。

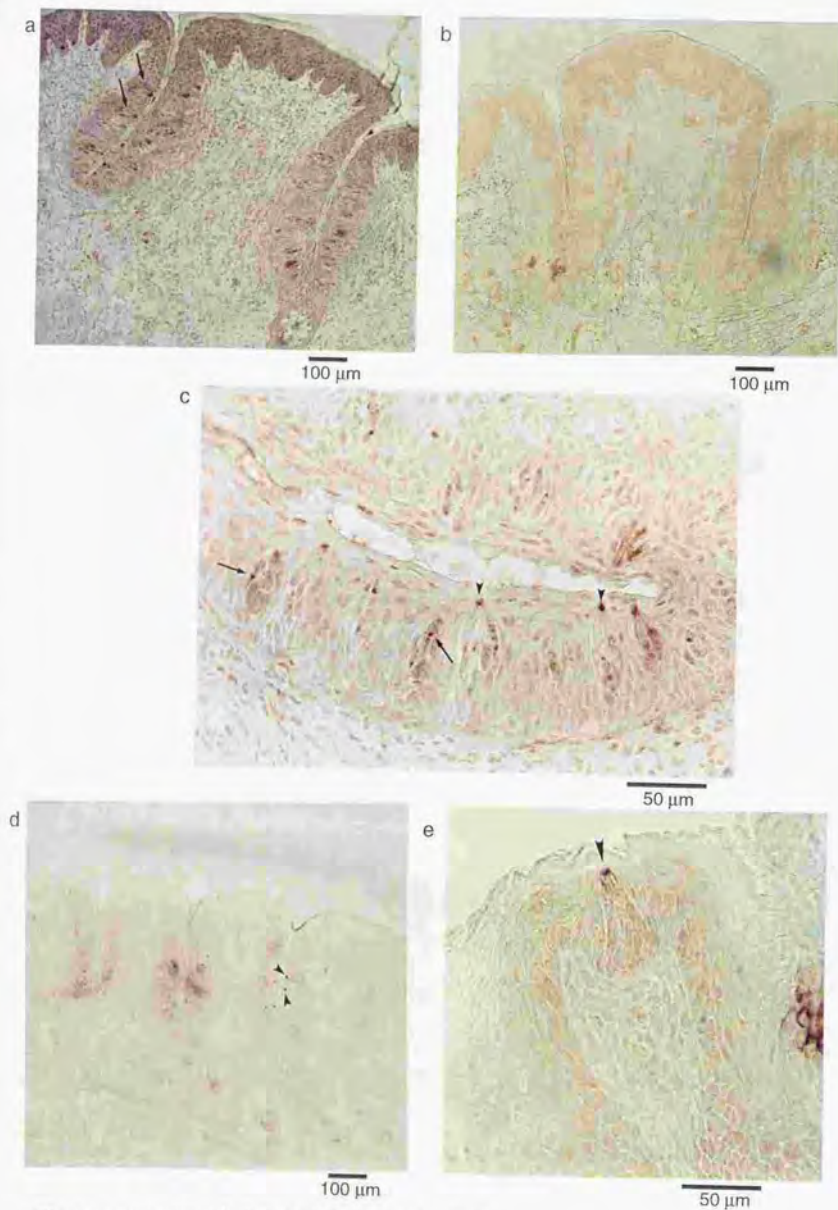


図3-7 rbA(P(Q))の各乳頭の味蕾内における局在

- a. 有郭乳頭における局在。矢は味蕾の位置を示す。
- b. 抗原ペプチドによる吸収を行った抗rbA(P(Q))抗体による染色。
- c. 味蕾内の局在。矢は味孔を示し、矢印は基部側の発現部位を示す。
- d. 葉状乳頭における局在。矢は味孔を含む味蕾を示す。
- e. 茸状乳頭における局在。矢は味孔を示す。

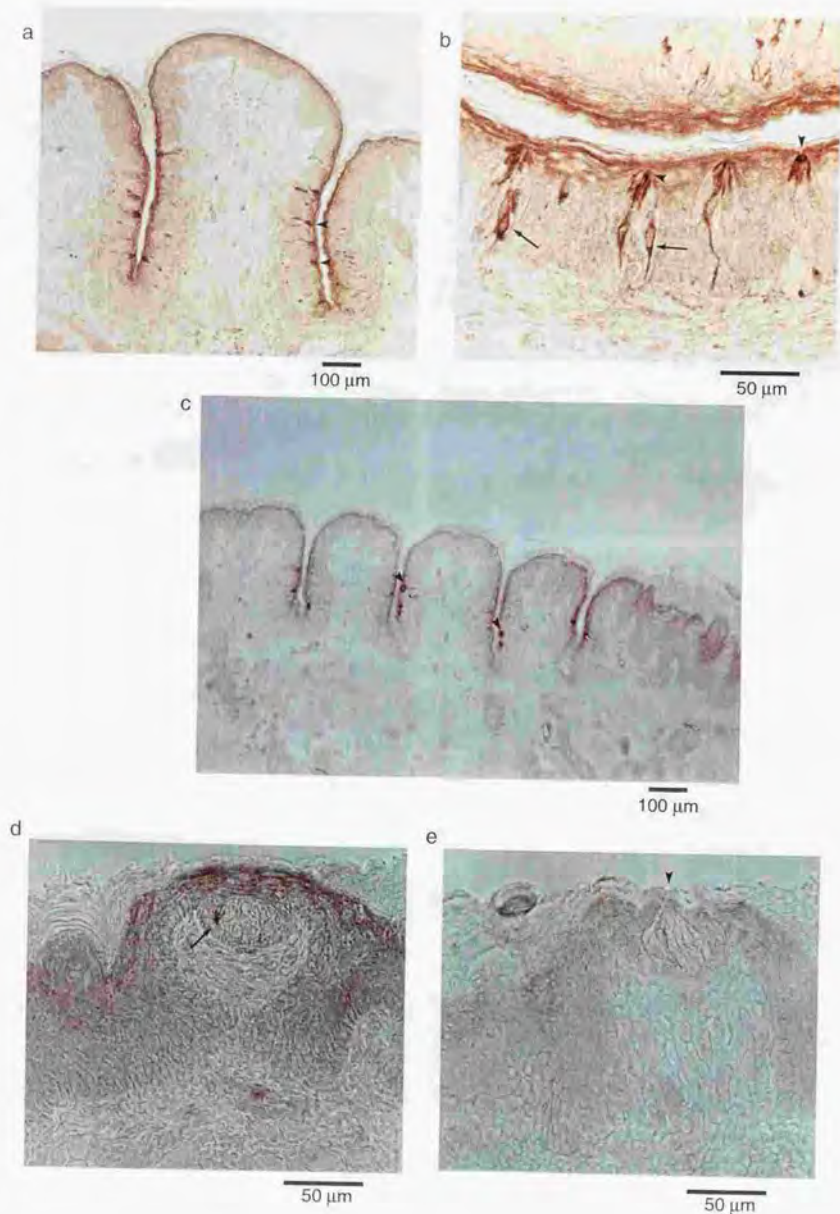


図3-8 rbB(N)の各乳頭の味蕾内における局在

- a. 有郭乳頭における局在。矢印は味蕾の位置を示す。
 b. 味蕾内の局在。矢は味孔を示し、矢印は基部側の発現部位を示す。
 c. 葉状乳頭における局在。矢は味孔を含む味蕾を示す。
 d. e. 茸状乳頭における局在。矢印は染色の観察された味蕾細胞を示し、矢は味孔を示す。

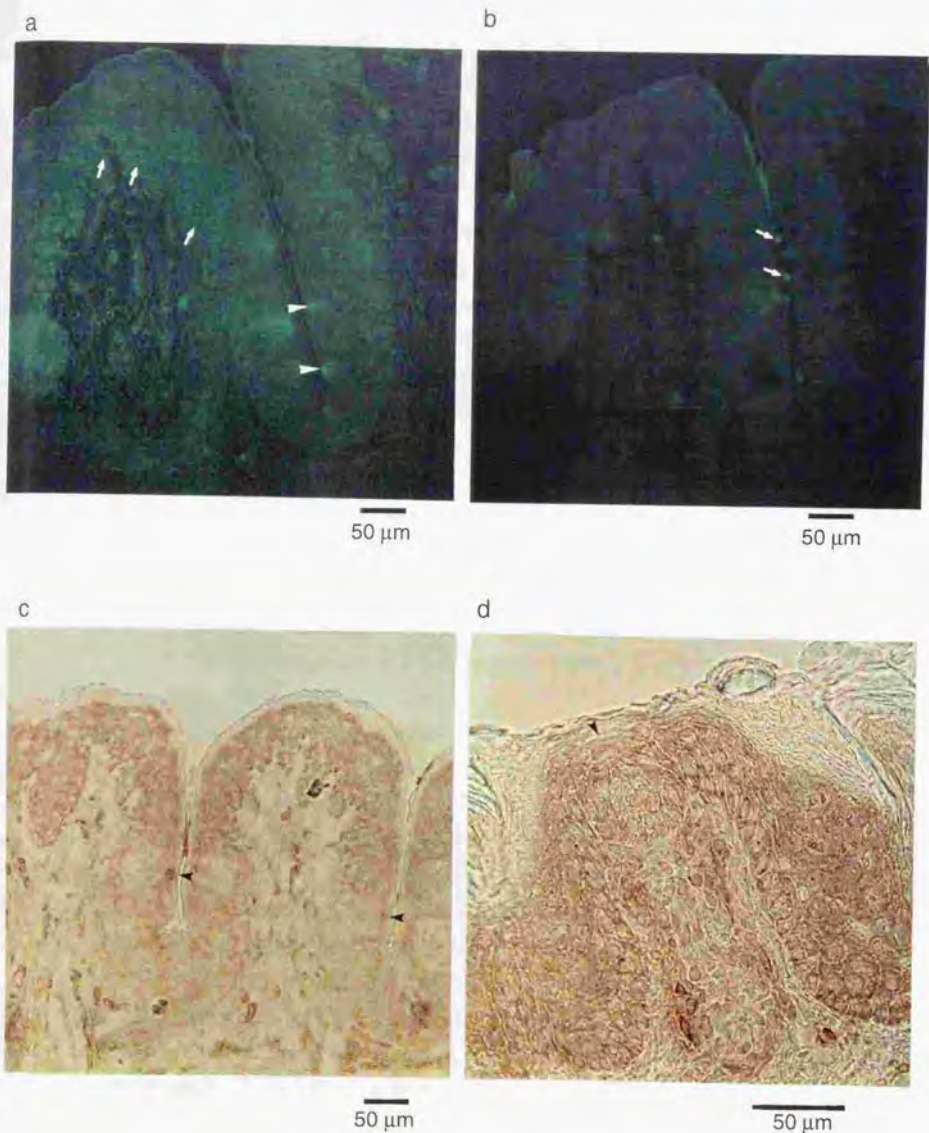


図3-9 rbC(L)の各乳頭の味蕾内における局在

a. 有郭乳頭における局在。FITC標識された二次抗体を用いた。矢は味孔を示し、矢印は上皮細胞の発現部位を示す。

b. 抗原ペプチドによる吸収を行った抗rbC(L)抗体による染色。FITC標識された二次抗体を用いた。矢印は乳頭溝の非特異的染色であり、味孔に対する染色ではない。

c. 葉状乳頭における局在。矢は味孔を示す。

d. 茸状乳頭における局在。矢は味孔を示す。

ことから、味神経への情報伝達物質の放出に関与する可能性がある。

また、味覚物質と接触することの可能な味孔側には、rbA(P(Q)), rbB(N), rbC(L)が共に存在することが示された。味孔にその存在が集中する傾向はGタンパク質、GasファミリーのGas、GaiファミリーのGai2、Gai3でも観察されている(第二章)。Gタンパク質はCaチャンネルの制御を行う性質も有している。それは、GsによりL型が開くことと(Yatani *et al.*, 1988)、Giの $\beta\gamma$ サブユニットがP(Q)型、N型を開き難くすること(Ikeda, 1996, Herlitze *et al.*, 1996)であり、味孔に局在するGタンパク質およびCaチャンネルの種類と一致している。味孔におけるこれらCaチャンネルの役割についての知見は皆無であるが、Gタンパク質共役型レセプターにより活性化したGタンパク質がCaチャンネルを制御することにより、細胞に何らかのシグナルを発生させているのかもしれない。味孔に存在するCaチャンネルは外界と接していると考えられるため、舌の表面を阻害剤で処理することにより味孔のCaチャンネルの働きを阻害することが可能である。本章で得られたCaチャンネルは、L型がジヒドロピリジン(Hess *et al.*, 1984)、N型が ω -コノトキシン GVIA (Crus *et al.*, 1987)、P(Q)型が ω -アガトキシン(Mintz *et al.*, 1992)または ω -コノトキシン MVIIC (Hillyard *et al.*, 1992)により阻害されることが知られている。現在、Caチャンネル阻害剤存在下で味覚物質を舌に添加してそれに対する神経応答を測定し、阻害剤非存在下の応答と比較することにより味孔に存在するCaチャンネルの役割を検討中であるが、今のところ目立った変化は見られていない。

本章では、有郭・葉状・茸状乳頭の切片を用いて抗体染色を行い、それぞれの乳頭によるCaチャンネルの局在の差を観察した。有郭乳頭と葉状乳頭の局在は同傾向を示したが、茸状乳頭の局在は一部異なっていた。茸状乳頭に含まれる味蕾は1つのみで、しかも舌前部に点在して存在するので味孔を含めた切片を得ることは困難であったため、有郭・葉状乳頭と茸状乳頭の局在が異なることを断言するには至っていない。しかし、有郭乳頭と葉状乳頭の奥部が舌咽神経に接続し(Pearson, 1947)、葉状乳頭の前部と茸状乳頭が鼓索神経に接続する(Millar *et al.*, 1974, Farbman *et al.*, 1978)ことや、有郭乳頭と葉状乳頭が乳頭溝側壁上皮内に味蕾を多数含んでいるのに対し、茸状乳頭は舌の表面に当たる乳頭背部の重層扁平上皮に単独で存在するなどの特徴を有していることを考慮に入れると、有郭乳頭と葉状乳頭の味蕾細胞の性質と茸状乳頭の細胞の性質は異なる可能性もある。

現在まで、生理・生化学的にもCaチャンネルと味覚に関する知見はほとんど得られていないばかりかrbA(P(Q)), rbB(N)に関してはその存在も明かではなかった。しかし、生理学的研究で示されている味蕾細胞のL型チャンネルによると思われる電気的なコンダクタンスは、その阻害剤のD600により76%阻害され(Béhé *et al.*, 1990)、阻害されないコンダクタンスも残存している。また、N型、P(Q)型に対する阻害剤を用

いたコンダクタンスの変化は調べられておらず、今後の生理学的研究によってN型、P(Q)型の存在が示されることが期待される。また、先に述べた阻害剤を用いた神経応答実験により味蕾におけるCaチャンネルの役割を明らかにするとともに、免疫電顕を用いてシナプスとCaチャンネルの位置関係を示すなど更に詳細な局在を検討することも今後の課題である。

総合討論

1. はじめに

本研究により、哺乳類の味覚シグナリングを担う分子を明らかにした。第一章で明らかにしたGタンパク質共役型レセプターは味覚シグナリングの正に入り口である味覚レセプターの候補となり、第二章で解析したG α タンパク質はそのレセプターに共役する可能性がある。一方、第三章で得られたCaチャンネルは味蕾細胞におけるシグナリングの出口、すなわち味蕾細胞から味神経への伝達物質の放出に関わる可能性の高い分子であり、本研究では味蕾細胞の働きの中で最も重要である味覚物質の受容と味神経への伝達に関与する分子を得ることができたと言えよう。

本考察では、本研究と最近発表された知見を交え、哺乳類の味覚シグナリングに関して論じてみたい。また、本研究ではG α タンパク質の発現様式を*in situ* ハイブリダイゼーション、single-cell RT-PCR、抗体染色法を用いて明らかにし、分子生物学的な視点から味蕾細胞を分類した。この研究は1つの細胞を標的としてその細胞内の味覚シグナリングを明らかにすることを目的とする新たな研究の方向性を見出した。実験を行う際に浮かび上がった問題点を踏まえ、今後の研究の方向についても検討してみたい。

2. 味蕾由来のmRNAを獲得するに当たって

本研究で用いた味蕾を含む舌上皮層はその下層にあたる筋層と緊密に結合しており、上皮のみを剥離するにはコラゲナーゼを用いることが必須である。研究を開始した当時は、コラゲナーゼによって舌上皮を剥離する方法を修得していなかった事に加え、酵素処理の間にmRNAが分解するのではないかという懸念も持っており、ハサミを用いて筋層をできるだけ除くようにして舌上皮を得ていた。この材料を用いたcDNAクローニングではいつも筋層からの分子の混在を念頭に置く必要があった。また、筋層の混入により味蕾由来のmRNAの占める割合が低くなることも気にかかる点であった。幸いにもコラゲナーゼによるmRNAの分解はほとんどなかったため、筆者はコラゲナーゼを用いて味蕾の多く含まれている有郭乳頭・葉状乳頭上皮を剥離して、筋層が含まれず味蕾が多く含まれている組織由来のmRNAを獲得することを試みた。さらに、味蕾は複数種の細胞の集団であるので1つの味蕾細胞を材料とすることに挑戦しsingle-cell RT-PCRを行うに至った。味蕾は総数が約1000個と非常に少ない上、口腔内に点在している。しかも味を受容しない細胞を含めた複数種の細胞集団であり、これらのことが味覚の研究を困難にしている。よって、味蕾及び味蕾細胞自体からmRNAを得て個々の細胞の有する分子を得られるようになった事は本研究における大きな成果であった。

3. Gタンパク質共役型レセプター

筆者は舌上皮由来mRNAより合成したfs-cDNAを鋳型に用いてPCRを行い、互いに40%以上の相同性を有する60種のGタンパク質共役型レセプターの断片(PTE)を得て、その断片を基にレセプター全長をコードするcDNAクローンGUST27のクローニングに成功した。PTEおよびGUST27を発表後、舌上皮からは様々なGタンパク質共役型レセプターcDNAおよびRT-PCRクローンが他グループおよび当研究室からも明らかになった。他グループからはMatsuokaらがウシの舌上皮から明らかにした嗅覚レセプターファミリーと相同性のあるTASファミリーおよび神経性ペプチドレセプターと相同性のあるレセプター、Talらが明らかにした既知のレセプターとは相同性の低い新規のレセプター、Thomasらが明らかにした味蕾、嗅上皮、睪丸に同時に発現するレセプターが発表された。当研究室の千葉は味蕾を多く含む舌有郭・葉状乳頭上皮から6種類のレセプターを明らかにした。それらの中には筆者が得たPTE45に98%の相同性がありPTEファミリーに属すGUST45、Thomasらが明らかにしたTB334に86%の相同性のあるGUST43等が含まれ、筆者やThomasらが明らかにしたレセプターが有郭・葉状乳頭に存在することを裏付けた。以上より、舌上皮には我々が得たよりも多い種類のレセプターが存在していることが示唆される。しかし、以上のレセプターの中で味覚受容器官である味蕾に発現することが示唆されているクローンは筆者と千葉が明らかにしたPTEファミリーとGUST27、GUST22、GUST43、GUST45のみであり、他のレセプターは舌上皮における発現部位は明かではなくその役割は全く予想できない。そればかりでなく、味蕾に発現することを明らかにしてもそのことが直に味覚レセプターであることの証明にはなり得ない。なぜなら、味蕾細胞には味物質以外に対するレセプターの存在も考えられるからである。例えば、味蕾内には神経とのシナプスも存在しており、神経伝達物質のレセプターの存在も考えられる。また、味蕾細胞は非常にターンオーバーが早い組織であることから、細胞増殖および神経成長因子等のレセプターの存在も否めない。よって、PTEおよびGUST27が味覚レセプターであることを決定することは困難であった。しかし、「甘味」「苦味」のように大筋で一くりにされる味も、その味を呈する物質は例えば甘味では糖からタンパク質まで非常に多様性があり、それを受容するレセプターは多種からなるファミリーを形成することが必須であること、同じ化学感覚である嗅覚レセプターと近縁であることが予想されながらリガンド結合部位の相同性が低く異なる種類のリガンドに対するレセプターであると思われる点からPTEおよびGUST27は味覚レセプターの候補として挙げられると判断した。

GUST27が味覚レセプターであることの証明への試みは千葉がバキュロウイルス系を用いてGUST27を発現させた昆虫細胞sf21に味覚物質を添加して細胞内セカンドメッセンジャーIP₃濃度を測定することにより行った。その結果、GUST27を発現した細胞に対して細胞内IP₃を上昇させる傾向が見られたが今のところ有為な差は得られ

ていない。共発現させるGタンパク質の種類、リガンドの選択など多岐の条件設定が必要であることがこの実験を困難にしていると思われる。本研究でレセプターを得る際に参考にしたラットの嗅上皮特異的なレセプターは匂い物質を受容する嗅細胞の繊毛部分に局在し、おそらく嗅覚レセプターであろうとされている。その上レセプターと共役するかどうかは明かでないがレセプターと同位置に局在するGタンパク質、エフェクターであるアデニル酸シクラーゼ、環状型ヌクレオチド活性化型チャンネルなど一連のシグナリングに関する分子が得られている。にもかかわらず、それらが嗅覚レセプターである証明はレセプターを昆虫細胞に発現させた細胞が匂い物質によって細胞内セカンドメッセンジャーIP₃濃度を上昇させる事を示した一例(Raming *et al.*, 1993)以外は示されていない。このことは再構成によるリガンドアクセス系が困難であることを示している。また、GUST27にとって昆虫細胞を用いた再構成系が適しているか否かは明かでなく、導入したGUST27がリガンドを受容できる状態にあるかどうかも分からない。他の方法としてはCOS細胞や293細胞に発現せりガンドアクセスする系や、アフリカツメガエルの卵母細胞にレセプターを発現させる系などが存在し、現在、既に研究を開始しており結果が待たれる。

4. G α タンパク質

第二章において、味蕾に発現しているG α タンパク質の種類を明らかにし、その内の代表的なものに関してmRNAの発現様式、タンパク質の局在を解析した。本研究でG α タンパク質を研究対象としてその発現様式を調べた理由は、多様性のあるレセプターと比較するとG α タンパク質は種類が限定されており、しかも味覚シグナリングに關与する可能性が高いので分子生物学的方法で味蕾細胞を分類するには格好の分子であると考えたからである。また、第一章で60種類以上のレセプターを得ているのでそれに共役しうるG α タンパク質の候補を挙げる目的もあった。

まず味蕾からfs-cDNAを作製してPCRを行い味蕾に発現するG α タンパク質の種類を明らかにした。他のグループも舌上皮に発現しているG α タンパク質を明らかにしているが味蕾からのみのmRNAからのfs-cDNAを用いたのは今回がはじめてである。しかし、1日に一匹のラットから味蕾細胞を数千から1万個採るのが精一杯でありmRNAの量の要求されるような実験には向いておらず、今回のように標的をG α タンパク質のみに絞る場合には有効であると思われる。

味蕾に発現しているG α タンパク質の種類を明らかにした後、まず、mRNAの発現様式を細胞レベルで明らかにした。*in situ*ハイブリダイゼーションとsingle-cell RT-PCRの結果を総合すると1つの味蕾中の細胞がcAMP濃度変化を指標にして4種類に分類されることが明らかになり、味蕾細胞が分子生物学的手法で分類しうることを初めて示した。ここでの注目すべき成果は、今までシグナル伝達系に關与する分子

を味蕾レベルすなわち細胞集合体レベルで明らかにしてきたのに対し、今回は1つの細胞内のシグナリングに関与する分子を扱える点である。今回行ったsingle-cell RT-PCRによりG α タンパク質は1つの細胞に1種類存在しているのではなく複数種が様々な組み合わせで存在し、分子生物学的に味蕾細胞を分類すると、形態学的分類の4種類とは全く異なる多種類に分類されることが示された。これは、味蕾細胞によって組み合わせの異なる複数のシグナル伝達系が存在することを示唆している。味覚シグナリングが複雑であることが主な理由であろうが、前述したように味蕾細胞内には味覚以外にも様々なシグナル伝達系が存在することが予想されるので、今後、味覚に関与する分子のみを味蕾細胞内から得るには生理学的手法を併用する必要がある。例えば、甘味物質を細胞に添加し、パッチクランプ法や蛍光カルシウム指示薬を用いた生理学的手法を用いて反応が観察される味蕾細胞を得て、細胞特異的な分子を調べることにより甘味シグナル伝達系に関与する分子を得ることができよう。このような方法で1つの細胞内の味覚シグナル伝達系に関与する分子を明らかにしていく際にはsingle-cell RT-PCR法は不可欠であり、今回初めて行ったsingle-cell RT-PCRはその突破口を開く実験となり得た。

mRNAの発現様式に続いてタンパク質の局在を調べると味孔のみの局在と細胞全体の存在の2種に分かれた。mRNAによる分類は今回はG α ustとG α sに関してのみ行い、G α i2、G α i3、G α q、rat G α 15の発現様式は明らかにしなかったため、mRNAに関する実験の結果とタンパク質局在の結果を総合した分類を行うことはできなかった。今後取り組むべき課題であろう。また、タンパク質のより詳細な局在は免疫電顕法を用いて明らかになり、その結果は形態学と分子生物学を総合した味蕾細胞の分類を導き出すであろう。

本研究ではG α タンパク質のみに焦点を当てたが、実際にはGタンパク質は共役しているレセプターにより活性化されると α 、 $\beta\gamma$ サブユニットに分かれて機能する。特に、PLC- β を活性化しないG α ustが細胞内IP $_3$ 濃度の上昇を引き起こす甘味や苦味のシグナリングに関与することがノックアウトマウスにより示唆されており、G α ustに結合している $\beta\gamma$ サブユニットがPLC- β を活性化していると思われる。味蕾に存在する γ サブユニットの種類については当研究室の千葉が明らかにしているが、細胞レベルでの発現様式は示されておらず、今後 γ サブユニットに関してもsingle-cell RT-PCRにより、その発現様式を調べてG α タンパク質との組み合わせを明らかにしていきたい。

5. Caチャンネル

第三章において、味蕾に発現するCaチャンネルの種類を調べ、その局在を観察し

た。その結果、思いがけず今までその存在が示唆されていなかった神経性のCaチャンネルが味蕾に発現していることが明らかになった。また、Ca²⁺の味覚シグナルにおける役割は味神経への伝達物質の放出のみ示唆され、その局在はシナプスの存在する基底側側のみであると予想していたが抗体染色の結果、味孔にも局在することが明らかになった。このように、本研究は生理学的研究に新しい観点を示すものとなった。特に味孔の局在が生体にとってどのような役割を果たすかは全く予想のつかないことである。味覚シグナリング以外に目を向けると形態学的知見より、味蕾を構成する紡錘形の細胞(I~III型)のうちI型細胞は細胞頂部において分泌顆粒の放出像が観察されており、味孔に局在するCaチャンネルはI型細胞頂部の分泌に関与している可能性はあるが、光学顕微鏡を用いた今回の抗体染色では分泌顆粒との関係は解析できなかった。また、基底側側のCaチャンネルの存在は味神経への伝達物質の放出に関与すると思われる。形態学的にはIII型細胞がシナプスを持つのでCaチャンネルの局在との相関は早急に行うべき課題である。

以上より、味孔の局在も基底側側の存在も、今後免疫電顕法によりI~IIIのどの細胞に観察されるか、細胞内のより詳細な局在を観察する必要がある。特に、基底側側の発現がIII型のみならばCaチャンネルはIII型のマーカーになり得る。また、抗体染色を二重染色法を用いて行ってGαタンパク質とCaチャンネルの発現様式の相関を調べるなど、二つの分子の局在の比較を行うことによってもCaチャンネルの役割を示すことができると考えられる。

味覚シグナリングを分子生物学的に解明する試みは世界的にも我々とほぼ同時に行われ始め、その研究はまだ緒についたばかりである。本研究の目的は、生化学的・生理学的に味覚シグナリングに関与することが示唆されている分子をクローニングすることであったが、それだけに留まらず今回の成果は分子生物学的研究が形態学、生化学、生理学の架け橋となることを示し、それらの研究に新しい観点を示したと確信している。更に、様々な味物質のシグナリングを明らかにすることによって従来の曖昧な基本味の定義に対して新たな味物質の分類法を提言できるであろう。また、味覚シグナル系を再構成してリガンドアッセイ系を確立することにより、新しい味覚物質の開発、味覚修飾物質のメカニズムの解明などが遂行され、食品開発に新たな局面を導き出すことができると考えている。

参考文献

- Akabas, M. H., Dodd, J., and Al-Awqati, Q. (1988) *Science* **242**, 1047-1050
- Amatruda III, T. T., Steele, D. A., Slepak, V. A., Simon M. I. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5587-5591
- Applebury, M. L., and Hargrave, P. A. (1986) *Vision Res.* **26**, 1881-1895
- Avenet, P., and Lindemann, B. (1987) *J. Membr. Biol.* **95**, 265-269
- Avenet, P., Hofman, F., and Lindemann, B. (1988) *Nature* **331**, 351-354
- Barlow, L. A., Chien, C., and Northcutt, R. G. (1996) *Development* **122**, 1103-1111
- Barlow, L. A., and Northcutt, R. G. (1997) *Development* **124**, 949-957
- Bébé, P., DeSimone, J. A., Avenet, P. and Lindemann, B. (1990) *J. Gen. Physiol.* **96**, 1061-1084
- Beidler, L. M., and Smallman, R. L. (1965) *J. Cell Biol.* **27**, 263-272
- Berghard, A., Buck, L. B. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 909-918
- Bernhardt, S. J., Naim, M. Zehavi, U., and Lindemann, B. (1996) *J. Physiol. (Lond.)* **490**, 325-336
- Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., and Tsien, R. W. (1994) *Neuron* **13**, 505-506
- Boughter Jr., J. D., Pumplin, D. W., Yu, C., Christy R. C. and Smith, D. V. (1997) *J. Neurosci.* **17**, 2852-2858
- Brand, J. G., Teeter, J. H., Kumazawa, T., Huque, T., and Barley, D. L. (1991) *Physiol. Behav.* **49**, 899-904
- Brandl, C. J., and Deber, C. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 917-921
- Buck, L., and Axel, R. (1991) *Cell* **65**, 175-187
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P. J., and Gierschik, P. (1992) *Nature* **360**, 684-686
- Catterall, W. A. (1995) *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 493-531
- Chaudhari, N., Yang, H., Lamp, C., Delay, E., Cartford, C., Than, T., and Roper, S. (1996) *J. Neurosci.* **16**, 3817-3826
- Crespo, P., Xu, N., Simonds, W. F., and Gutkind, J. S. (1994) *Nature* **369**, 418-420
- Cruz, L. J., Johnson, D. S., and Olivera, B. M. (1987) *Biochem.* **26**, 820-824
- Delay, R. J., Kinnamon, J. C., and Roper, S. D. (1986) *J. Comp. Neurol.* **253**, 242-252
- De Vivo, M., Chen, J., Codina, J., and Iyengar, R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 18263-18266
- Dixon, R. A. F., Sigal, I. S., Candelore, M. R., Register, R. B., Scattergood, W., Rands, E., and Strader, C. D. (1987) *EMBO J.* **6**, 3269-3275
- Dubel, S. J., Starr, T. V. B., Hell, J., Ahljianian, M. K., Enygart, J. J., Catterall, W. A., and

- Snutch, T. P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5058-5062
- Farbman A. I., and Hellekant, G. (1978) *Am. J. Anat.* **153**, 509-521
- Fay, T. (1927) *J. Neurol. Psychopath* **8**, 110-123
- Frings, S., Seifert, R., Godde, M., Kaupp, U. B. (1995) *Neuron* **15**, 169-179
- Gether, U., Johansen, T. E., Snider, R. M., Lowe III, J. A., Nakanishi, S., and Schwartz, T. W. (1993) *Nature* **362**, 345-348
- Gilbertson, T. A., Roper, S. D., and Kinnamon, S. C. (1993) *Neuron* **10**, 931-942
- Hamm, H. E., Deretic, D., Arendt, A., Hargrave, P. A., Koenig, B., and Hofmann, K. P. (1988) *Science* **241**, 832-835
- Heck, G. L., Mierson, S., and DeSimone, J. A. (1984) *Science* **223**, 403-405
- Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Warner, C., Ahlijanian, M. K., Prystay, W., Gilbert, M. M., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. (1993) *J. Cell Biol.* **123**, 949-962
- Herlitze, S., Garcia, D. E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1996) *Nature* **380**, 258-262
- Hess, P., Lansman, J. B., and Tsien, R. W. (1984) *Nature* **311**, 538-544
- Hillyard, D. R., Monje, V. D., Mintz, I. M., Bean, B. P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Imperial, J. S., and Olivera, B. M. (1992) *Neuron* **9**, 69-77
- Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, K., Kageyama, R., Nakanishi, S., and Narumiya, S. (1991) *Nature* **349**, 617-620
- Hirning, L. D., Fox, A. P., McCleskey, E. W., Olivera, B. M., Thayer, S. A., Miller, R. J., and Tsien R. W. (1988) *Science* **239**, 57-61
- Ho, S. N., Hunt, H.D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease L. R. (1989) *Gene* **77**, 51-59
- Hosley, M. A., Hughes, S. E., and Oakley, B. (1987) *J. Comp. Neurol.* **260**, 224-232
- Hwang, P. M., Verma, A., Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7395-7399
- Ikeda, S. R. (1996) *Nature* **380**, 255-258
- Jones, D. T., and Reed, R. R. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14241-14249
- Jones, D. T., and Reed, R. R. (1989) *Science* **244**, 790-795
- Katada, T., Bokoch, G. M., Northup, J. K., Ui, M., and Gilman, A. G. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 3568-3577.
- Katz, A., Wu, D., and Simon, M. I. (1992) *Nature* **360**, 686-689
- Kinnamon, J. C., Taylor, B. J., Delay, R. J., and Roper, S. D. (1985) *J. Comp. Neurol.* **235**, 48-60
- Kinnamon, J. C., Sherman, T. A. and Roper, S. D. (1988) *J. Comp. Neurol.* **270**, 1-10

(1988)

- Kinnamon, S. C., Dionne, V. E., and Beam, K. G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7023-7027
- Kinnamon, S. C., and Roper, S. D. (1988) *J. Gen. Physiol.* **91**, 351-371
- Kinnamon S. C., and Margolskee R. F. (1996) *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 506-13
- Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K., Regan, J. W., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1988) *Science* **240**, 1310-1316
- Li, X., Blackshaw, S., and Snyder, S. H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1814-1818
- Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. and Barbry, P. (1993) *FEBS Lett.* **318**, 95-99
- Luebke, J. I., Dunlap, K., and Turner, T. J. (1993) *Neuron* **11**, 895-902
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J., and Barker, J. L. (1986) *Nature* **321**, 519-522
- Matsuoka, I., Mori, T., Aoki, J., Sato, T., and Kurihara, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 504-511
- McLaughlin, S. K., Mckinnon, P. J., and Margolskee, R. F. (1992) *Nature* **357**, 563-569
- McLaughlin, S. K., Mckinnon, P. J., Spickofsky, N., Danho, W. and Margolskee, R. F. (1994) *Physiol. Behav.* **56**, 1157-1164
- Millar, I. J. Jr. (1974) *J. Comp. Neurol.* **158**, 155-166
- Mintz, I. M., Venema, V. J., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Bean, B. P., and Adams, M. E. (1992) *Nature* **355**, 827-829
- Mistretta, C. M. (1989) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **561**, 277-290
- Murray, R. G., Murray, A., and Fujimoto, S. (1969) *J. Ultrastruct. Res.* **27**, 444-461
- Nathans, J., and Hogness, D. S. (1983) *Cell* **34**, 807-814
- Negishi, M., Sugimoto, Y., Irie, A., Narumiya, S., and Ichikawa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 9517-9521
- Nukada, T., Tanabe, T., Takahashi, H., Noda, M., Hirose, T., Inayama, S., and Numa, S. (1986) *FEBS Lett.* **195**, 220-223
- Offermanns, S., and Simon, M. I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15175-15180
- Parmentier, M., Libert, F., Schurmans, S., Schiffmann, S., Lefort, A., Eggerickx, D., Ledent, C., Moilereau, C., Gerard, C., Perret, J., Grootegood, A., and Vassart, G. (1992) *Nature* **355**, 453-455
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Zukin, R. S., Bennett, M. V., Cho, S., Pulsinelli, W. A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10499-10503
- Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L. Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1992) *Science* **257**, 1264-1267

- Price, S. (1973) *Nature* **241**, 54-55
- Quan, F., Thomas, L., Forte, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1898-1902
- Raming, K., Krieger, J., Strotmann, J., Boekhoff, I., Kubick, S., Baumstark, C., and Breer, H. (1993) *Nature* **361**, 353-356
- Raport, C. J., Dere, B., and Hurley, J. B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 7122-7128
- Reichert, F. L. (1934) *Arch. Neural. Psychiatr. (Chic.)* **32**, 1030-1037
- Robitaille, R., Adler, E. M., and Charlton, M. P. (1990) *Neuron* **5**, 773-779
- Roper, S. (1983) *Science* **220**, 1311-1312
- Royer, S. M., and Kinnamon, J. C. (1991) *J. Comp. Neurol.* **306**, 49-72
- Ruiz-Avila, L., McLaughlin, S. K., Wildman, D., McKinnon, P. J., Robichon, A., Spickofsky, N., and Margolskee, R. F. (1995) *Nature* **376**, 80-85
- Sakurai, T., Westenbroek, R. E., Rettig, J., Hell, J., and Catterall, W. A. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 511-528
- Schiffman, S. S., and Lockhead, E., and Maes, F. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6136-6140
- Schwartz, H. G., and Weddell, G. (1938) *Brain* **61**, 99-115
- Shapiro, R. A., Scherer, N. M., Habecker, B. A., Subers, E. M., and Nathanson, N. M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18397-18403
- Simon, M. I., Strathmann, M. P. and Gautam, N. (1991) *Science* **252**, 802-808.
- Simon, S. A., Holland, V. F., Benos, D. J., and Zamphighi, G. A. (1993) *Microsc. Res. Technique* **26**, 196-208
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., Sternweis, P. C. (1991) *Science* **251**, 804-807
- Snutch, T. P., Tomlinson, W. J., Leonard, J. P., and Gilbert, M. M. (1991) *Neuron* **7**, 45-57
- Spielman, A. I., Huque, T., Nagai, H., Whitney, G., and Brand, J. G. (1994) *Physiol. Behav.* **56**, 1149-1155
- Spielman, A. I., Nagai, H., Sunavala, G., Dasso, M., Breer, H., Boekhoff, I., Huque, T., Whitney, G., and Brand, J. G. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, C926-C931
- Starr, T. V. B., Prystay, W., and Snutch, T. P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5621-5625
- Stone, L. M., Finger, T. E., Tam, P. P. L., and Tan, S-S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1916-1920
- Strader, C. D., Dixon, R. A. F., Cheung, A. H., Candelore, M. R., Blake, A. D., and Sigal I. S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16439-16443
- Strathmann, M., Wilkie, T. M., and Simon, M. I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6477-6481
- Strathmann, M., and Simon, M. I. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9113-9117

- Striem, B. J., Pace, U., Zehavi, U., Naim, M., and Lancet, D. (1989) *Biochem. J.* **260**, 121-126
- Takahashi, T., and Moriyama, A. (1993) *Nature* **366**, 156-158
- Tal, M., Ammar, D. A., Karpuj, M., Krizhanovsky, V., and Naim, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 752-759
- Teeter, J. H., Brand, J. G., and Kumazawa, T. (1990) *Biophys. J.* **58**, 253-259
- Thomas, M. B., Haines, S. L., and Akeson, R. A. (1996) *Gene* **178**, 1-5
- Tonosaki, K., and Funakoshi, M. (1988) *Nature* **331**, 354-356
- Tousson, A., Alley, C. D., Sorscher, E. J., Brinkley, B. R. and Benos D. J. (1989) *J. Cell Sci.* **93**, (Pt 2) 349-362
- Watanabe, T., Waga, I., Honda, Z., Kurokawa, K., and Shimizu, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8984-8990
- Westenbroek, R. E., Hell, J. W., Warner, C., Dubel, S. J., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. (1992) *Neuron* **9**, 1099-1115
- Westenbroek, R. E., Sakurai, T., Elliott, E. M., Hell, J. W., Stratt, T. V., Snutch, T. P., and Catterall, W. A. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 6403-6418
- Wheeler, D. B., Randall, A., and Tsien, R. W. (1994) *Science* **264**, 107-111
- Wilkie, T. M., Scherle, P. A., Strathmann, M. P., Slepak, V. Z., Simon, M. I. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10049-10053
- Wong, G. T., Gannon, K. S., and Margolskee, R. F. (1996) *Nature* **381**, 796-800
- Yatani, A., Imoto, Y., Codina, J., Hamilton, S. L., Brown, A. M., and Birnbaumer, L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9887-9895
- Yoshie, S., Wakasugi, C., Teraki, Y., Iwanaga, T., and Fujita, T. (1988) *Arch. Histol. Cytol* **51**, 379-384
- Yoshie, S., Wakasugi, C., Teraki, Y., and Fujita, T. (1990) *Arch. Histol. Cytol.* **53**, 103-119
- 伊藤 隆 (1989) 組織学 (南山堂)
- 宇井理生 (1994) GTP結合蛋白質 (メディカルビュー社)
- 高木雅行 (1992) 感覚の生理学 (裳華房)
- 千葉 昇 (1997) 修士論文

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成7年度博士課程入学
氏名 日下部 裕子
指導教官名 阿部 啓子

論文題目 哺乳類における味覚シグナリングの分子機構に関する研究

味覚は、口腔内に取り込まれた味物質を摂取すべきか忌避すべきかの判断を司る感覚である。味物質が舌上皮に存在する味蕾の味細胞に受容されることによって発生する味覚は、味細胞のシグナリング機構を経て味神経に伝わり、脳へ達する。すなわち、味細胞の果たす主な役割は、味物質の受容と味神経へのシグナル伝達である。

味覚の研究は、両生類・哺乳類について生理学的・生化学的に、長年にわたり数多くなされてきたが分子生物学的研究はほとんど行われていなかった。そこで本研究は、味蕾に存在する味覚レセプター、共役するGタンパク質、そしてカルシウムチャンネルを特定し、その構造、機能、及び発現部位を解析することを目的として行った。

1、舌上皮味覚受容組織に発現するG蛋白質共役型レセプター

はじめに、味物質を受容する分子の解明に当たり、視覚・嗅覚のレセプターがG蛋白質共役7回膜貫通型であることを念頭に置いて研究に着手した。すなわち、味覚のシグナル伝達の過程で甘味は細胞内のcAMPの濃度を上昇させ、苦味は細胞内のIP₃の濃度を上昇させることが生理学的・生化学的研究によって明らかにされていることから、味覚も視覚・嗅覚と同様のG蛋白質共役型レセプターを介した系であろうという仮説の基に研究を行った。まず、嗅覚レセプターの構造を参考にし、その中で特に相同性の高い2番目と7番目の膜貫通部位のアミノ酸配列に相当する塩基配列を基にしたプライマーと、ラット舌上皮由来のmRNAから作製したcDNAの鋳型を用いてPCRを行い、G蛋白質共役型レセプターの断片を60種以上得た。これらをアミノ酸配列の相同性に基いて分類すると6つのグループとなった。また、ゲノムサザン分析より、別々の遺伝子に由来することが

示唆された。

次に、RT-PCRクローンをプローブとして舌上皮のcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、7回膜貫通ドメインを持つG蛋白質共役型レセプターであるGUST27を得た。GUST27は60のRT-PCRクローンの1つPTE33と最もよく似ており、相同性は80%であった。また、嗅覚レセプターであるOLFF3との相同性は56%と高かったが、視覚レセプターであるロドプシンとの相同性は16%であった。

GUST27の組織特異的発現を調べるために様々な組織由来のmRNAを用いてノーザンブロット解析を行ったところ、舌上皮にのみハイブリダイズする約2kbのバンドが見られた。*in situ* ハイブリダイゼーションを行ってGUST27mRNAの発現部位を調べたところ、味蕾を含む舌上皮に発現することが明らかになった。また、GUST27特異的な抗体を作製して染色を行ったところ、主に味蕾の部分に発色が見られた。以上よりGUST27は味蕾を中心とした場所に発現する味覚レセプターである可能性が強く示唆された。

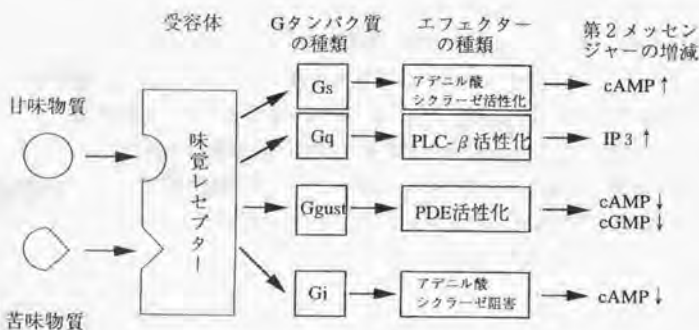
2 味蕾に発現するGタンパク質 α サブユニットの種類とその発現部位

味覚シグナリング機構を解明する上で、味蕾に発現する味覚レセプターと共役するGタンパク質を明らかにすることは重要である。一般に、Gタンパク質の種類によってエフェクターおよびセカンドメッセンジャーを推定し、その生理作用を予想することが可能となる。味蕾はI~IV型の細胞種で構成される40~70個の細胞集団であり、このうちIII型が味を受容する味細胞とされているが、I、II、III型は全て紡錘形であり、形態上の区別が光学顕微鏡レベルではできない。また、マーカーとなりうる分子も全く特定されていない。そこで、Gタンパク質の主な性質を担う α サブユニット (G α タンパク質) に焦点をあて、味蕾に発現している種類、および細胞レベルでの分布を調べることにより味蕾を構成する細胞の類型化を試みた。以後、味蕾を構成するI、II、III型細胞を味蕾細胞と記載する。

まず、味蕾に発現しているG α タンパク質mRNAの種類を調べた。既知の全てのG α タンパク質に共通なアミノ酸配列に相当するプライマーと、舌の有郭乳頭から得た約100個の味蕾由来cDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、味蕾にはGaiファミリーに属するGai1、Gai2、Gai3、gustducin、Gasファミリーに属するGas、Gaqファミリーに属するGaq、Ga15のmRNAが発現していることが明らかになった。Ga15は今まで造血細胞に特異的であることが知られていたが、今回初めて味蕾に発現することを見出したものでもある。また、Gasはスプライシングの違いによる2種類のmRNAの存在が確認された。図のように、現在までに甘味物質が細胞内のcAMP濃度を上昇させることと、苦味物質が細胞内IP₃濃度の上昇、あるいはホスホジエステラーゼ(PDE)の活性化を誘導することが明らかになっていることから、味覚にはGai、Gas、Gaqファミリーの関与が示唆されており、今回の結果と一致した。

続いて、これらのG α タンパク質mRNAの発現を調べるために*in situ*ハイブリダイゼーション

オンを行った。その結果、gustducinの発現する細胞は全ての味蕾に認められたが、1つの味蕾内には数個に限られることが明らかになり、gustducinの有無を指標にした味蕾細胞の分類が可能になった。一方、Gas、Gai2はどの味蕾にも、gustducinと比較して明らかに多くの細胞に発現していた。そこで発現パターンの異なるgustducinとGasを対象としたsingle-cell RT-PCRより、各々のmRNAを発現している細胞の割合を調べた。Single-cellは舌上皮をコラゲナーゼ処理後、遊離した細胞のうち紡錘形のを単離することにより選択した。その結果、細胞106個の内、35個にgustducinが、44個にGasが、20個に両者の発現が認められた。Gasとgustducinは味覚のシグナル伝達に関与するセカンドメッセンジャーであるcAMP量を正反対に調整する役割を持つ。従って、セカンドメッセンジャーの1つに限定して考えても、それを増加、減少、増減といった応答の異なる細胞が味蕾に存在することを示し、味覚の複雑さを表している。



次に、味蕾由来のGαタンパク質の細胞内での局在を、抗体を用いて染色した。その結果、Gαタンパク質の発現は2パターンを示した。すなわち、Gai1、Gai2、Gai3、Gasは味孔に局在し、gustducin、Gαq、Gα15は細胞内全体に存在した。味孔は味物質と生体との接点であることから、味孔に存在が認められる複数種のGαタンパク質は、そこに発現している可能性のある味覚レセプターと共役しようと考えられる。しかも、これらのGαタンパク質及びレセプターが多種であることは、シグナル伝達スキームに多様な組み合わせがあることを示唆する。実際に、gustducinが蔗糖やデナトニウムの苦味のシグナリングに関与することが、ノックアウトマウスを用いた実験により既に報告されている。しかし、gustducinノックアウトマウスはサッカリンの甘味の感受性を有し、苦味に対する感受性を大部分残していることも明らかになっている。よってgustducinを介さない甘味と苦味に対しては他のGαタンパク質が関与すると思われる。特に、Gα15はGaiファミリーやGasファミリーに結合するレセプターにも共役するユニークな性質を持っていることが報告されており、Gα15は味蕾に存在している様々なGタンパク質共役型レセプターと結合して細胞内のIP₃濃度を上昇させる可能性が示唆された。

3 味蕾に発現する電位依存性カルシウムチャンネル

味を受容した味細胞はシナプスで神経伝達物質を放出して味神経にシグナルを伝達する。神経伝達物質の放出にはシナプス部位のカルシウムイオン濃度の上昇が必要であるとされ、電位依存性カルシウムチャンネルを介して細胞外からカルシウムイオンを取り込んだ結果引き起こされることが多い。味蕾には様々な組織に発現するL、T型のカルシウムチャンネルが存在することが生理学的に示唆されているが、分子生物学的には明かではなかった。そこで味蕾に発現しているカルシウムチャンネルの種類およびその発現部位を解析することにした。

まず、ラット有郭・葉状乳頭上皮由来のmRNAを用いてRT-PCRを行ったところ、予想されたL型のみならず、今までその存在が示唆されていない神経特異的なP(Q)型、N型も存在することが明らかとなった。

次に、それぞれの抗体を用いて抗体染色を行い有郭乳頭における発現部位を調べた。その結果、L、N、P(Q)型全てのカルシウムチャンネルが味孔に局在していることが示された。味孔でのカルシウムイオンの働きを示唆する知見は皆無であるが、味受容あるいはシグナル伝達に何らかの関わりを持つ可能性がある。また、神経性のN、P(Q)型は味蕾中の数個の細胞の基底側部に局所的な発現が見られた。一般に、N、P(Q)型は神経のシナプス前膜に存在し、シグナル伝達物質の放出に関与することが知られており、味蕾細胞の基底側部に存在するシナプス部位もシナプス前膜に相当することから、味蕾に存在するN、P(Q)型は味蕾細胞から味神経へのシグナル伝達物質の放出にも関与していると考えられた。この成果はシグナル伝達物質そのものを特定する研究に貢献するはずである。

4 まとめ

本研究において、味蕾を含む上皮に発現するレセプターをクローニングし、それらが味覚レセプターであることを強く示唆する結果を得た。続いて味蕾に存在するG α タンパク質及びカルシウムチャンネルの種類、発現パターンを解析した。その結果、gustducinとカルシウムチャンネル、N、P(Q)型がそれぞれ限られた細胞に発現していることが初めて明らかになった。味蕾細胞は形態学的解析によって4種類に分類されてきたが、今後、gustducinとカルシウムチャンネルの発現を免疫電顕で明らかにすることにより、味蕾細胞の分類ならびに役割を分子レベルで定義しうる可能性を示した。また、本研究では細胞レベルでのRT-PCRを確立した。この成果は、1つの味物質に対して特徴的な電気シグナルを発生する味蕾細胞に特異的な分子の解明に繋がるのみならず、細胞の分子生物学的研究一般に善く貢献すると考えられる。

発表論文

1. Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S. (1993) *FEBS Lett.*, 316, 253-256.
2. Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 12033-12039.
3. Kusakabe, Y., Abe, K., Tanemura, K., Emori, Y. and Arai, S. (1996) *Chem. Senses*, 21, 335-340.
4. Kusakabe, Y., Arai, S. and Abe, K. (1997) *Chem. Senses*, 22, 228.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇切な御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 阿部啓子教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に関して、貴重な御助言、および御指導を賜りました、東京大学大学院理学系研究科 榎森康文助教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、御助言を頂くと共に、日々励まして頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 松本一朗助手に厚く御礼申し上げます。

本研究全般に関して御助言を頂き、御協力頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科 安岡顕人氏に深く感謝いたします。

組織学の研究全般に関して御指導、御協力を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 種村健太郎博士に厚く御礼申し上げます。

組織学の研究を始めるにあたって御指導を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 岩瀨京子博士に深く感謝いたします。

味蕾細胞の扱い方を御指導して頂きました、東京医科大学歯科大学歯学部 杉本久美子講師に厚く御礼申し上げます。

大量のラットを提供して頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科 野口忠教授をはじめ東京大学大学院農学生命科学研究科 栄養化学研究室の皆様へ深く感謝いたします。

プラスミドを御提供して頂きました東京大学医学部 本田善一郎博士に深く感謝いたします。

Caチャンネルの抗体染色に関して御助言を頂きました神戸大学医学部 桜井孝博士に感謝の意を表します。

生理学的研究に御協力頂きました、日本女子大学家政学部 山田妙子教授に深く感謝いたします。

抗体作製に御協力頂きました東京大学医学部 福田恵子先生に深く感謝の意を表します。

本研究を通して共同研究者として御協力頂きました、山口栄里氏（現昭和産業株式会社）、千葉昇氏（現株式会社花王）、東京大学農学部、大井雅裕氏に深く感謝いたします。

本研究全般に御協力頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科職員、佐野香氏に御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、貴重なご意見を賜ると共に、御協力いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科 清水誠教授、東京大学大学院農学生命科学研究科 渡辺寛人助手をはじめ、東京大学大学院農学生命科学研究科 食糧化学研究室の皆様へ厚く御礼申し上げます。

本研究を通して、御助言および御助力頂き、研究生活の支えとなって下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室の皆様へ深く感謝いたします。

生物機能開発化学研究室助教授に就任される以前より、細胞を分与して頂き、またペプチド合成にも御協力頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科 反町洋之助教授に深く感謝致します。

最後に、味覚の世界を紹介して頂き、本研究全般に関して御指導を賜りました、元東京大学大学院農学生命科学研究科教授、現東京農業大学教授 荒井綜一博士に心より御礼申し上げます。

平成10年1月9日

日下部 裕子





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C Y M

© Kodak, 2007 TM Kodak