

博士論文

マウス味蕾における細胞種特異的な遺伝子発現プロファイルの解析

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 平成21年度進学
生物機能開発化学研究室
黒川 あずさ

指導教員 東京大学大学院准教授
三坂 巧

– 目次 –

| | |
|----------------------------------------------------|-----|
| 序章 | 1 |
| 第1章 Skn-1ノックアウトマウスを用いた味蕾細胞種特異的な遺伝子の選別 | |
| 1-1 序 | 15 |
| 1-2 実験材料および方法 | 18 |
| 1-3 結果 | 23 |
| 1-4 考察 | 30 |
| 第2章 TypeⅡ味蕾細胞に発現する神経接続因子の探索 | |
| 2-1 序 | 33 |
| 2-2 実験材料および方法 | 34 |
| 2-3 結果 | 36 |
| 2-4 考察 | 44 |
| 第3章 TypeⅢ味蕾細胞に発現する前シナプス因子の探索と Cplx2ノックアウトマウスの解析 | |
| 3-1 序 | 48 |
| 3-2 実験材料および方法 | 51 |
| 3-3 結果 | 61 |
| 3-4 考察 | 77 |
| 第4章 TypeⅠ味蕾細胞に発現する膜貫通分子の探索 | |
| 4-1 序 | 82 |
| 4-2 実験材料および方法 | 84 |
| 4-3 結果 | 89 |
| 4-4 考察 | 100 |
| 総合討論 | 103 |
| 参考文献 | 112 |
| 論文要旨 | 124 |
| 謝辞 | 128 |

序章

序

味覚の受容・伝達機構については古くから生理学的・解剖学的な解析が行われてきた。1990年代以降、分子レベルでの研究が行われるようになったことにより味覚の研究は大きく進展し、現在までに味覚受容体の発見をはじめとしたさまざまな知見が得られている。しかし、その一方で残された課題も少なくない。以下に味覚情報の受容・伝達に関する知見や課題について概説する。

〈味覚〉

味覚は五感の1つであり、味物質が口腔内上皮層に分布する味蕾中の味細胞に受容されることにより生じる感覚である。口腔内に入った食品を嚥下するかどうかを判断するための感覚として重要である。ヒトの感じる味のうち、甘味、旨味、苦味、酸味そして塩味は一般に 5 基本味と言われる。この 5 基本味は味蕾で受容される味である。受容機構については分子レベルでの解析が進み、味蕾における各味の受容体が同定されている。5 基本味以外の味(辛味、渋味、えぐ味、脂味など)については、辛味・渋味が口腔内に分布するが味蕾に投射しない体性感覚神経でも受容されることが指摘されており(Kadohisa et al., 2004)、他の味は受容機構が解明されていないため、本論文では味(基本味)としては扱っていない。

〈味蕾〉

味蕾は味物質を受容する組織である。それぞれの味蕾は上皮組織由来の 50~100 個程度の細胞から構成され、タマネギ状の構造をしている(図 0-1)。上皮表面には微柔毛が露出しており、この部分で味物質の受容を行っていると考えられている。哺乳類では、味蕾は主として口腔咽頭部の上皮層に分布する。舌上の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭その他、軟口蓋や咽頭、切歯管などの口腔内上皮組織にも存在する。

味蕾細胞は 10~14 日周期でターンオーバーを繰り返している(Beidler and Smallman, 1965; Farbman, 1980)。未分化細胞は味蕾基底部に存在し、それが味蕾中央部へと移行して味覚受容などの機能を有する成熟した細胞になり、いずれ細胞死を迎える(Cho et al., 1998; Hamamichi et al., 2006)。このように、味蕾内には分化・成熟段階の異なる細胞が混在している。また、味蕾には、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味を受容する細胞が存在し、これ以外にも機能未知の細胞がある(詳細は後述)。すなわち、味蕾は機能の面からも異なる細胞の集団である。味蕾細胞がどのように発生し、どのように特定の機能を担うように分化し、どのように細胞死を迎え、細胞死を迎えた味蕾細胞はどのようにして代謝されるかといった味蕾細胞の維持に関する分子機構に関しては、部分的な知見はあるもののその全体像は分かっていない。

〈味蕾細胞種〉

古くから電子顕微鏡観察における電子密度と形態の違いから、味蕾細胞は type I から typeIV に分類されてきた。このうち、typeIV味蕾細胞は味蕾の基底部に存在する球形の細胞であり、特定の機能を持たない未分化な細胞であると考えられている。type I ～Ⅲの味蕾細胞は紡錘形をしており、味受容などの機能を持つ成熟した細胞である(Murray and Murray, 1960)。

近年、分子生物学的な研究が進み、味覚受容体ならびにその下流の細胞内情報伝達関連分子が同定されたことにより、甘味・旨味・苦味・酸味・塩味の 5 基本味がそれぞれ異なる細胞で受容されることが明らかになってきている(詳細は次節で詳述)。そして、形態学的な特徴と味受容の機能とが対応づけられている。

type II 味蕾細胞は甘味・旨味・苦味受容細胞の集合に相当し、G タンパク質共役型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)の味覚受容体を持つ味受容細胞の群である。味蕾全体の約 30 %を占める(Matsumoto et al., 2011)。甘味・旨味・苦味受容細胞はそれぞれ異なる細胞群だが、その下流の細胞内シグナル伝達系として、イノシトールリン脂質代謝系と細胞内カルシウム濃度依存的な ATP 放出機構を共通に持っている。

typeⅢ味蕾細胞は酸味細胞に相当し、味蕾全体の細胞数の約 15 %を占める(Matsumoto et al., 2011)。typeⅢ味蕾細胞と味神経との間にはシナプス接続が観察できる(Murray, 1963)。

Type I 味蕾細胞は type II、typeⅢまたは typeIV以外の味蕾細胞として定義でき、味蕾全体の約半数を占める。茸状乳頭では type I 味蕾細胞に塩味に応答する細胞が含まれているという報告がある(Vandenbeuch et al., 2008)。Type I 味蕾細胞には ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (Entpd2 または NTPDase2) が発現するが(Bartel et al., 2006)、他の分子知見は少ない。type I 味蕾細胞の一部または全てが味を受容する細胞であるかは不明であるが、電位依存性カリウムチャネル *Kcnq1* は type I、type II、typeⅢの全ての味蕾細胞種に発現していること(Ohmoto et al., 2006)、type I 味蕾細胞は特有の膜電位変化を示し、膜電位変化を生じること(Romanov et al., 2006; Romanov et al., 2007)、また、甘味、旨味、苦味、酸味がそれぞれ異なる細胞で受容されることから、type I 味蕾細胞は塩味やその他の味を受容する細胞である可能性が想定されている。機能未知の細胞群の分子知見を取得し、その細胞の生理機能を解明することは味覚研究における課題の 1 つである。

このように、味蕾細胞は大きく 4 つの細胞種に分離しており、それぞれの細胞種が持つ機能やそれに応じた発現遺伝子に特徴があることが分かっている。表 0-1 に味蕾細胞種とその特徴をまとめて表示する。

〈味覚受容と伝達機構〉

これまでに、味覚受容体の発見により、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の 5 つの基本味の味覚受容機構が明らかとなっている。ただし、酸味・塩味に関しては部分的な知見に留まり、全貌は解明されていない。

甘味、旨味、苦味の受容は、G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体(G-protein coupled receptor; GPCR)が担っており、T1R ファミリーと T2R ファミリーの 2 種類が同定されている。T1R ファミリーは *T1R1*、*T1R2*、*T1R3* の 3 つの遺伝子からなる (Hoon et al., 1999; Montmayeur et al., 2001; Max et al., 2001; Nelson et al., 2001)。培養細胞発現系およびノックアウトマウスを用いた解析から、T1R1 と T1R3 のヘテロマーがグルタミン酸などの L-アミノ酸や核酸の旨味物質の受容体として機能すること、T1R2 と T1R3 のヘテロマーが糖や人工甘味料、甘味タンパク質などの甘味物質の受容体として機能することが明らかとなった(Nelson et al., 2001; Li et al., 2002; Nelson et al., 2002; Zhao et al., 2003)。

T2R ファミリーは、哺乳類では約 30 遺伝子から構成されており、培養細胞発現系およびノックアウトマウスを用いた解析から、T2Rs は苦味物質を受容することが明らかとなった(Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000; Mueller et al., 2005)。T2R ファミリーの受容体は 1 つの味細胞に複数種が発現すること、また、下流のシグナル因子である phospholipase C, beta 2 (*Plcb2*) ノックアウトマウスに T2R5 の転写制御領域下で *Plcb2* を発現させたマウスでは、T2R5 のリガンドであるシクロヘキシミドだけでなく、T2R8 のリガンドであるデナトニウムに対する応答が回復することから、T2R ファミリーを発現する味細胞は多種の苦味物質を受容することが示唆されている(Adler et al., 2000; Mueller et al., 2005)。

T1R ファミリーと T2R ファミリーが異なる味細胞に発現すること(Nelson et al., 2001)、*T1R1* と *T1R2* については、ごく一部の細胞において共発現するが、基本的には異なる味細胞に発現することから(Nelson et al., 2001)、甘味、旨味、苦味はそれぞれ異なる味細胞により受容されることが明らかとなった。

甘味、旨味、苦味受容体の下流の細胞内シグナル伝達系には、味覚受容体から 3 量体型 G タンパク質、エフェクター、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇につながる細胞内シグナル伝達系の分子が存在し、イノシトールリン脂質代謝系(PI 系)によりシグナルが伝達されることが明らかになっている。3 量体型 G タンパク質のβサブユニットである gustducin(*Ggust*)は、全ての T2R 発現細胞と T1R3 発現細胞の一部に発現し、*Ggust* ノックアウトマウスは苦味に対する応答を消失するこ

とから、苦味の情報伝達に必須であることが示されている(Wong et al., 1996; Hoon et al., 1999; Adler et al., 2000)。また、phospholipase C, beta 2 (*Plcb2*)、タイプ 3 イノシトール 1,4,5-三リン酸レセプター(*IP₃R3*)、TRP (transient receptor potential) チャネルファミリーの陽イオンチャネルである transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5 (*Trpm5*) の 3 つの遺伝子は全ての T1R 発現細胞と T2R 発現細胞に発現し、それぞれのノックアウトマウスは甘味、旨味、苦味に対する応答が消失することから、この 3 遺伝子は甘味、旨味、苦味の情報伝達に共通の必須因子であることが明らかとなった(Miyoshi et al., 2001; Zhang et al., 2003; Hisatsune et al., 2007)。これらの情報伝達因子によって味細胞は脱分極に至ると考えられる。

甘味、旨味、苦味受容細胞から味神経への情報伝達機構については、味刺激によって起こる Ca^{2+} 濃度上昇依存的に細胞質の ATP が細胞膜上のヘミチャネル pannexin 1 (*Panx1*) を通過して放出されること(Romanov et al., 2007; Romanov et al., 2008)、イオンチャネル型 ATP 受容体である *P2X2* および *P2X3* のダブルノックアウトマウスを用いた実験により、味の情報伝達には *P2X2* および *P2X3* が必要であることから(Finger et al., 2005)、ATP が甘味、旨味、苦味受容細胞と味神経の細胞間伝達に関与している可能性が提示されている。

酸味については TRP (transient receptor potential) チャネルファミリーのメンバーである *Pkd2l1* と *Pkd1l3* が受容体候補分子として報告されている (Ishimaru et al., 2006; Huang et al., 2006)。しかし、遺伝学的な解析では、*Pkd2l1/1l3* の二重ノックアウトマウスで酸刺激に対する味神経応答が消失しないことから(Horio et al., 2011)、酸味受容体が他にも存在すると推測される。*Pkd2l1/Pkd1l3* を発現する細胞は *T1Rs* や *T2Rs* を発現する細胞とは異なること (Ishimaru et al., 2006; Huang et al., 2006)、*Pkd2l1* 発現細胞を消失させたマウスでは、酸味に対する神経応答のみが消失し、甘味、旨味、苦味、塩味に対する応答は変化しないことから(Huang et al., 2006)、酸味は甘味、旨味、苦味、塩味受容細胞とは異なる細胞により受容されることが明らかとなっている。つまり、味蕾において甘味、旨味、苦味、酸味の受容は細胞レベルで分かれていることが明らかとなった。

酸味受容細胞は甘味、旨味、苦味受容細胞とは異なり、シナプス関連分子を発現し、細胞内のシナプス小胞や神経細胞とのシナプス構造が観察されており、甘味、旨味、苦味受容細胞とは情報伝達機構が異なることが示唆されるが(Kataoka et al., 2008)、酸味受容細胞における情報伝達機構や酸味受容細胞から味神経への情報伝達機構についてはほとんど明らかになっていない。また、酸味受容細胞には炭酸脱水素酵素 *Car4* が発現しており、炭酸を検出して細胞周辺の pH 調整を行っていると考えられる(Chandrashekar et al., 2009)。酸味受容細胞を遺伝学的に消

失させたマウスでは、炭酸に対する神経応答もなくなることから、マウスでは炭酸を味として感じていることが示唆されている。

塩味については、アミロライド感受性のナトリウムチャネル epithelial sodium channel(*ENaC*; *Scnn1*)の $\alpha\beta\gamma$ 複合体がマウスで低濃度(～30 mM)の塩味受容を担うと報告されている(Chandrashekar et al. 2010)。以前より、塩味に対する味神経応答にはアミロライド感受性の成分とアミロライド非感受性の成分があることが示されていた。茸状乳頭が存在する舌の前半分を支配する鼓索神経では、塩味に対する応答強度の約 6 割がアミロライド感受性成分である。有郭乳頭が存在する舌の後部 1/3 や軟口蓋を支配する舌咽神経では塩味に対する応答にアミロライドの影響は見られない(Yoshida et al., 2009)。これを裏付けるように、*ENaC*の 3 つのサブユニットが共発現する細胞は茸状乳頭に存在し、有郭乳頭では見られない(Chandrashekar et al. 2010)。

カルシウムイメージング実験や味神経応答解析により、高濃度(300 mM～)の塩味に対する味蕾細胞、味神経のアミロライド非感受性の応答が確認されているが(Yoshida et al., 2009; Chandrashekar et al. 2010)、これを担う塩味受容体はまだ同定されていない。また、*ENaC*以外に塩味の伝達に関与する分子は報告されておらず、脱分極の後、神経への塩味情報の伝達がどのように行われているかも未解明である。

ENaC の 3 つのサブユニットが共発現する細胞は他の4基本味の受容細胞と異なることが免疫組織化学的に示されている。低濃度の塩味に応答する細胞、高濃度の塩味に応答する細胞、その他の味の受容細胞はそれぞれ異なることが、味蕾細胞を用いたカルシウムイメージングから示されている(Chandrashekar et al. 2010)。また、遺伝学的に甘味・旨味受容細胞、苦味受容細胞、酸味受容細胞をそれぞれ消去した動物においても塩味に対する応答は正常に観察される(Huang et al., 2006)。以上から、塩味受容細胞は甘味・旨味・苦味・酸味とは異なる細胞群で受容されと考えられている。

〈味情報のコーディング〉

上述したように、味蕾にはそれぞれ甘味、旨味、苦味、酸味を受容する細胞が存在する。改変 κ -オピオイド受容体 RASSL(Receptor Activated Solely by a Synthetic Ligand)を甘味受容体である T1r2 発現細胞に導入したトランスジェニックマウスは無味の人工リガンド spiradoline を嗜好するようになり(Zhao et al., 2003)、逆に RASSLを苦味受容体である T2r5 発現細胞に導入したトランスジェニックマウスは spiradoline を忌避するようになる(Mueller et al., 2005)。また、甘味受

容体 T1r3、苦味受容体 T2r5、酸味受容体 Pkd121 発現細胞にトキシンを発現させたマウスではこれらの細胞が死滅するため、甘味、苦味、酸味に対する応答のみ消失することが示されている (Huang et al., 2006)。このように、味物質を受容する末梢の味細胞種がその味覚情報を規定していると考えられ、少なくとも甘味、旨味、苦味、酸味については、最も末梢の味細胞の段階でコーディングが行われていると考えられる (Chandrashekar et al., 2006)。

〈味蕾細胞と味神経〉

味蕾で受容された味の情報は味神経を経て中枢へと伝達され、味として認識される。一般に、末梢感覚神経とその標的組織の間には、それぞれ神経栄養因子とその受容体を発現するという関係が成り立っている。味蕾では脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) が発現しており、味神経細胞を含む組織では *BDNF* 受容体である *TrkB* が発現している細胞が多く観察される (Matsumoto et al., 2001)。また、味神経を切断すると、新たな味蕾細胞の供給が止まり、味蕾が消失することから、味蕾のターンオーバーの維持には味神経が必要である (Guth, 1957; Hosley et al., 1987a; Hosley et al., 1987b)。これは味蕾細胞と味神経が味の情報を伝達するだけの一方的な関係ではなく、相互依存的な関係にあることを示唆している。

しかし、味細胞から味神経への情報伝達機構については分かっていない部分が多い。まず、味神経を規定する特徴は形態学的にも分子生物学的にも分かっていない。味蕾で味情報のコーディングがなされていることが示されたが、味神経レベルでのコーディング機構は解明されておらず、特定の味神経は特定の味を伝えるのか、従って味神経にも種類があるのかは不明である。さらに、味蕾が発生する時期に、どのような機構で味神経が味蕾に軸索投射するのか、そして味蕾細胞はターンオーバーを繰り返しており、味を恒常的に認知するためには新しくできた味細胞と味神経が正しい対応関係で接続する必要があるが、どのような機構で味細胞と味神経が連絡するのかは全く分かっていない。このような味蕾と味神経の対応関係に関する解析には、味神経と味蕾の双方における分子知見を得ることが重要である。

味神経を規定する特徴は分子的にも分かっていなかったため、味神経に関する分子知見を得ることは困難であった。特定の味を伝達する神経回路を標識する試みとして、経シナプストレーサーの利用があげられる。経シナプストレーサー分子の一種である小麦胚芽レクチン (wheat germ agglutinin; *WGA*) はシナプス輸送などの小胞輸送を介して細胞間を輸送されるという特性を持つ。*WGA* を特定の細胞にトランスジェンとして発現させることにより、特定の神経回路を可視化するという genetic tracing 技術が確立されており、嗅覚神経回路 (Yoshihara et al., 1999)、視覚

神経回路 (Braz et al., 2002; Hanno et al., 2003)、体性感覚神経回路 (Zylka et al., 2005; Braz and Basbaum, 2009) などの感覚情報の神経回路の選択的可視化が行われている。当研究グループでは WGA を味蕾の一部の細胞で発現させた遺伝子改変マウスを作出している。これまでに甘味・旨味受容体 T1R3、苦味受容体 T2R5、酸味受容体 Pkd2l1 および Pkd1l3 のプロモーター下で WGA を発現する遺伝子改変マウス (それぞれ T1R3-WGA マウス、T2R5-WGA マウス、PKD2L1-WGA マウス、PKD1L3-WGA マウス) が作出されている (Ohmoto et al., 2008, Ohmoto et al., 2010; Yamamoto et al., 2011)。これらを用いて、味神経に関する知見が直接得られるようになり、味覚コーディング機構の解析が進むことが期待される。

〈Skn-1 ノックアウトマウス〉

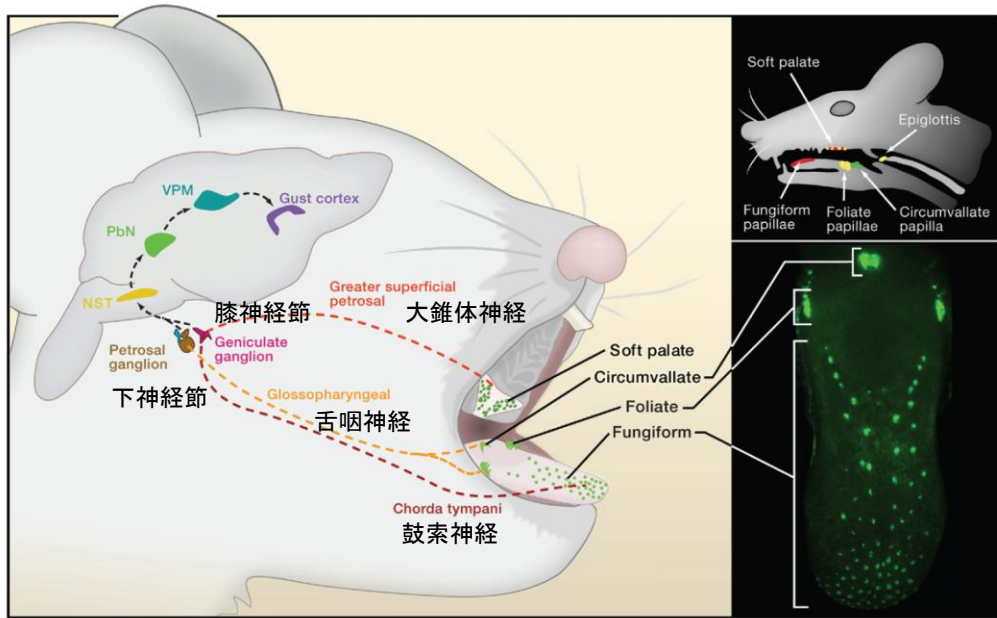
Skn-1 (Pou2f3) は β HLH 構造を持つ転写因子である。Type II 味蕾細胞に特異的に発現することが示されている (図 0-3) (Matsumoto et al., 2011; 平松 修士論文, 2006; 笠原 修士論文, 2007)。当研究室で作成された Skn-1 ノックアウトマウスは甘味・旨味・苦味細胞が消失しており、それらの細胞に相当する数の酸味細胞が増加しているという特徴を持っている (図 0-4)。このことから、甘・旨・苦味細胞 (type II 味蕾細胞) と酸味細胞 (type III 味蕾細胞) は共通の前駆細胞から分化することが示唆された。このマウスにおいては、甘味・旨味・苦味細胞に発現することが既知の味蕾マーカー遺伝子の発現が見られなくなっていることが組織学的に示されている。また、行動試験および味神経応答の記録により、Skn-1 ノックアウトマウスでは甘味・旨味・苦味に対する応答が消失しており、これらの味を感じていないと考えられる (図 0-4)。酸味および塩味に対する応答は正常である。Skn-1 ノックアウトマウスは、味蕾細胞の分化機構の一端を解き明かした最初の例であるが、さらに味盲モデルマウスとして摂食応答解析などに使用することが期待されている。

〈本研究の目的〉

以上に述べたように、味覚受容体の同定をはじめ味覚受容機構の分子的側面が明らかにされてきたものの、不明な点も多く残っている。本研究は、味蕾における未解明の現象に関わる分子を探索しその生理機能を解明することを目的としたものである。第 1 章では、味蕾に発現する遺伝子の探索を行うための分子基盤として DNA マイクロアレイによる遺伝子発現データを利用し、Skn-1 ノックアウトマウスを使用することにより、味蕾細胞種ごとの遺伝子発現プロファイリングを試みた。次に第 2 章から 4 章では、第 1 章で確立した方法論を演繹し、type I, II, III の味蕾細胞における未解明の分子機構を明らかにするために、それぞれの目的に応じて発現解析を行った。第 2

章では、type II 味蕾細胞と味神経の相互作用を行う候補分子を取得し、type II 味蕾細胞はシナプスを持たないが、神経との連絡が行われていることを示唆する結果を述べた。第 3 章では、type III 味蕾細胞に発現する前シナプス分子群を新たに同定し、そのうちの一つであるコンプレキシン II をノックアウトしたマウスにおいて酸味に対する感受性が顕著に低下することを示した。第 4 章では、type I 味蕾細胞に特異的に発現する膜貫通分子を探索し、type I 味蕾細胞の反応性、膜電位特性を浮き彫りにすることを試みた。

A



B

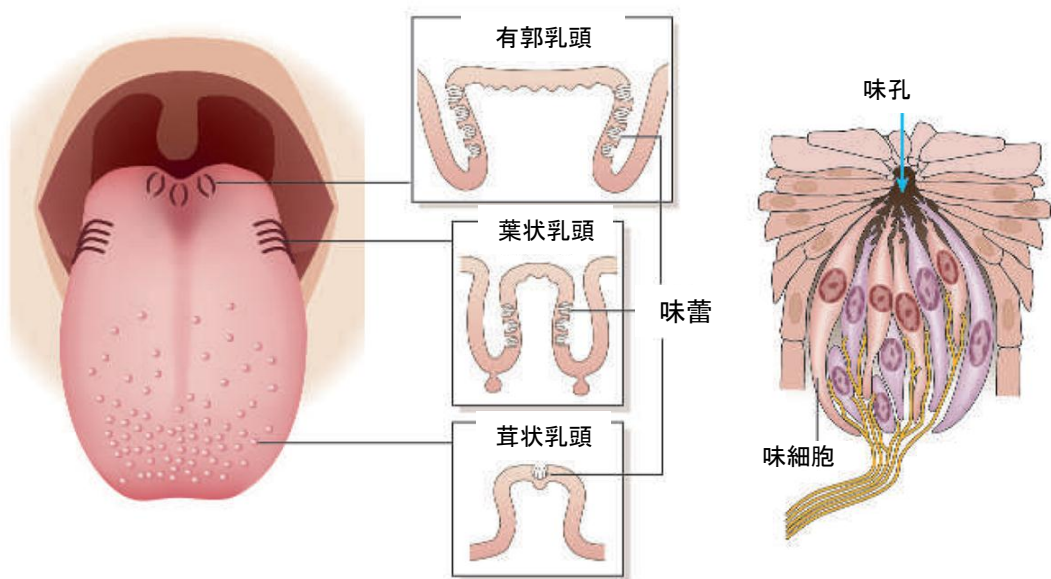


図0-1 味蕾の分布と構造

A 口腔内における味蕾の分布と味覚の伝導路

マウス口腔内上皮層における味蕾の分布を示す。味蕾は、主に舌上皮層の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭および軟口蓋の上皮層に分布している。

図は Yarmolinsky et al., 2009 より引用・改変。

B 味蕾を含む乳頭および味蕾の断面図

味蕾の構造の模式図を示す。味蕾は50-100個の細胞から構成されている。

図は Chandrashekar et al., 2006 より引用・改変。

表0-1 味蕾細胞種の分類

| | Type II | | | Type III | Type I | |
|---------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|----------------------------------------------|-------------|---------------|
| 味質 | 甘味 | 旨味 | 苦味 | 酸味 | 塩味 | その他 |
| 味覚受容体 | <i>T1R2</i> + <i>T1R3</i> | <i>T1R1</i> + <i>T1R3</i> | <i>T2rs</i> | <i>Pkd2l1</i> + <i>Pkd1l3</i> | <i>ENaC</i> | |
| 発現する遺伝子 | <i>Gna14, Ggust</i> | | | <i>Car4</i> <i>SNAP-25</i> <i>AADC</i> | | <i>Entpd2</i> |
| | <i>Plc-b2</i> <i>IP₃R3</i> <i>Trpm5</i> <i>Panx1</i> | | | | | |
| | <i>Kcnq1</i> | | | | | |
| その他の特徴 | | | | シナプスあり | | |

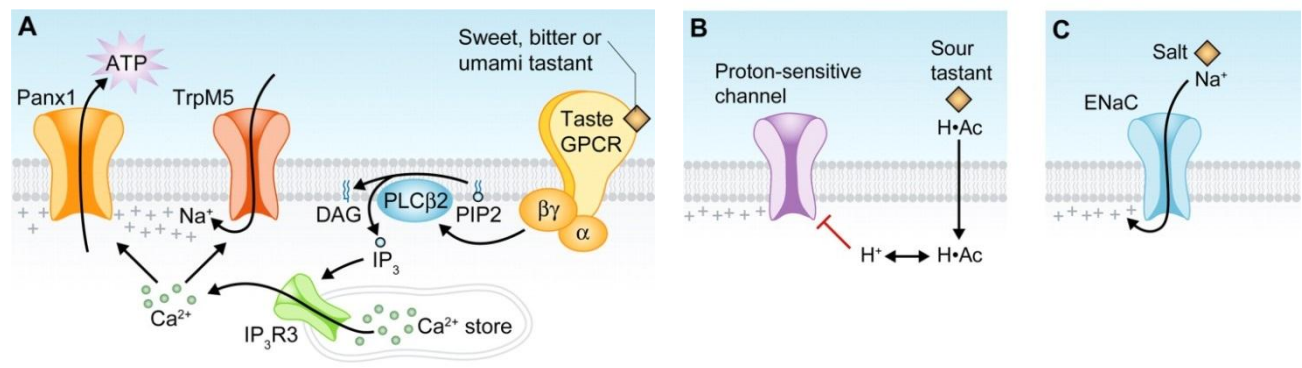
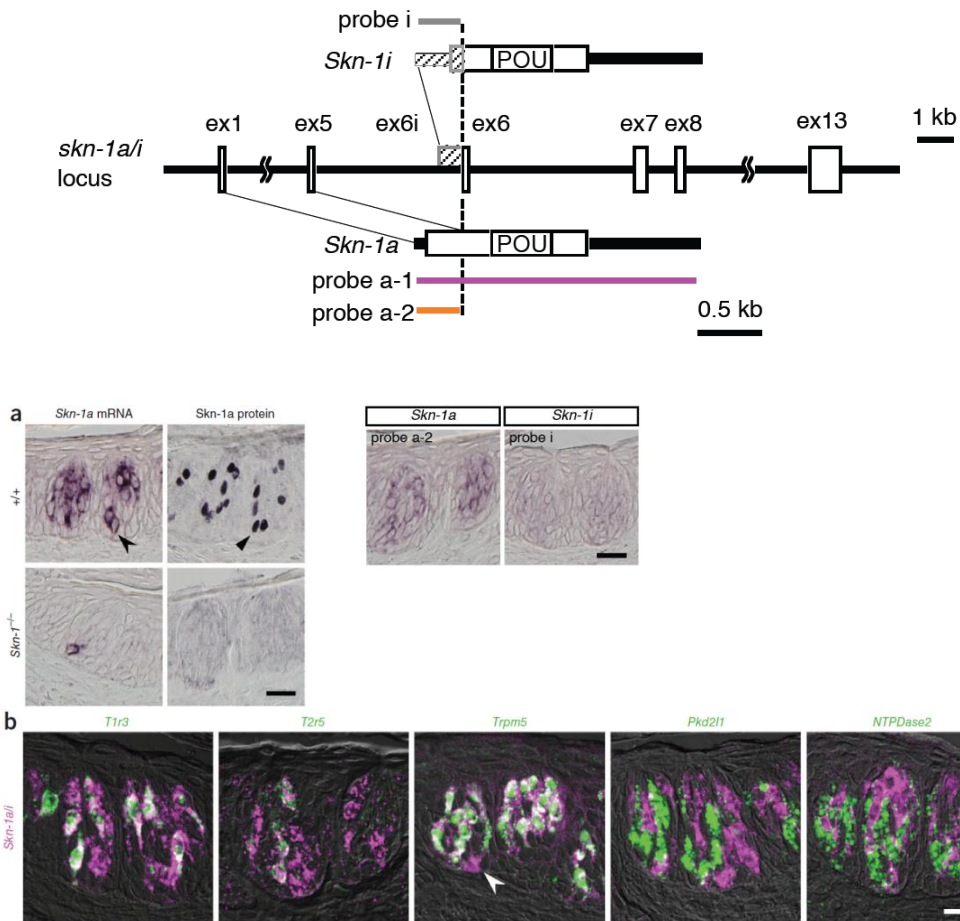


図0-2 5基本味の受容・伝達機構
A Type II 味蕾細胞における味物質の受容・伝達機構
B 酸味受容細胞における味物質の受容機構
C 塩味受容細胞における味物質の受容機構

図はChaudhari N, Roper S. JCB 2010;190:285-296より引用・改変。

A



B

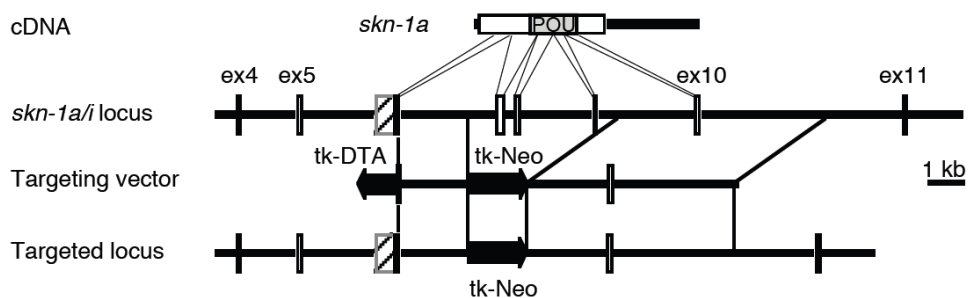


図 0-3 Skn-1ノックアウトマウスの作出

A Skn-1のマウス味蕾での発現

Skn-1の2種のtranscript variantのうち、味蕾ではSkn-1aが特異的に発現している。Skn-1aはType II 味蕾細胞に特異的に発現しており、味覚受容体や味覚シグナリング分子に先立って、発現しており、基底部に近い未分化な細胞でも発現する。

B ターゲティングベクターの構造図

図は、Matsumoto et al., 2011より引用・改変

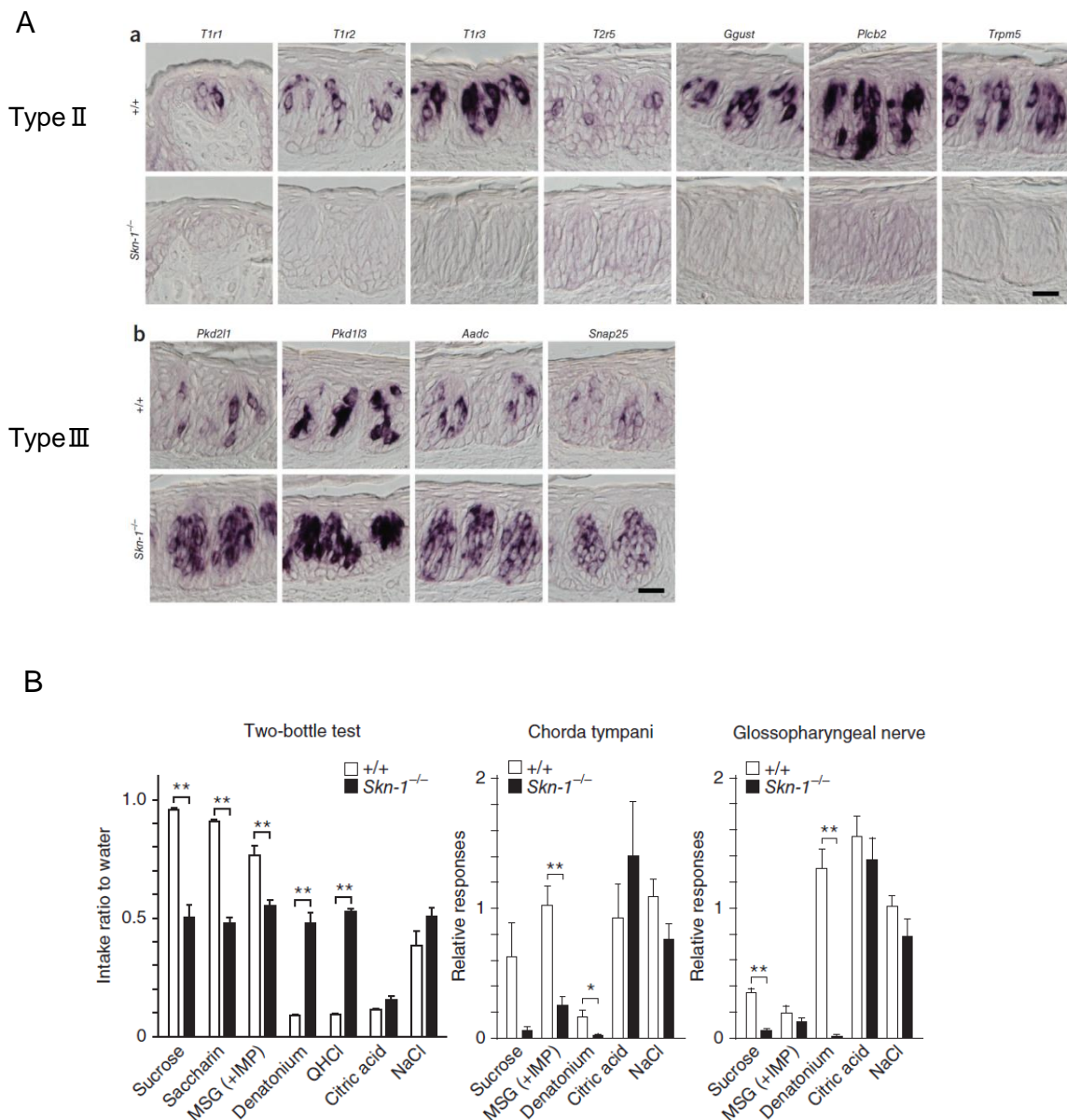


図 0-4 *Skn-1*ノックアウトマウスの表現型

A *Skn-1*ノックアウトマウスにおける味蕾細胞マーカー遺伝子の発現変化

*Skn-1*ノックアウトマウスの味蕾では、type II 味蕾細胞に発現することが既知の遺伝子の発現は見られなくなり、type III 味蕾細胞に発現することが既知の遺伝子の発現は増加する。

B *Skn-1*ノックアウトマウスの嗜好性テストと神経応答

行動試験を行うと、*Skn-1*ノックアウトマウスは甘味・旨味を嗜好しなくなり、苦味を忌避しなくなる。酸味・塩味に対する行動は正常。神経応答では、甘味・旨味・苦味に対する応答が消失している。

図は、Matsumoto et al., 2011より引用・改変。

第 1 章

Skn-1 ノックアウトマウスを用いた味蕾細胞種特異的な遺伝子の選別

1-1 序

近年の分子生物学的な研究から、味覚受容体や味覚情報伝達分子が同定され、5 基本味とされる甘味・旨味・苦味・酸味・塩味が互いに異なる味蕾細胞で受容されることが明らかにされてきた (Chandrashekar et al., 2006; Yarmolinsky et al., 2009; Chandrashekar et al., 2010)。成熟した味蕾細胞は紡錘型をしており、電位依存性カリウムチャネル *Kcnq1* を発現するなど、細胞種に関わらず味蕾細胞全体に共通な機能・特徴がある (Murray 1963; Ohmoto et al., 2006)。その一方で、それぞれの味蕾細胞種は固有の味受容の機能を持ち、その機能を担うシグナル伝達因子の発現、膜電位特性、分化の機構、神経との接続様式などが異なっていると推定されている。各味蕾細胞種の持つ未知の機能やそのメカニズムを解明する上で、特定の味蕾細胞種に発現する遺伝子の知見を得ることは非常に重要であり、最も効率的なアプローチ法の 1 つであると言える。

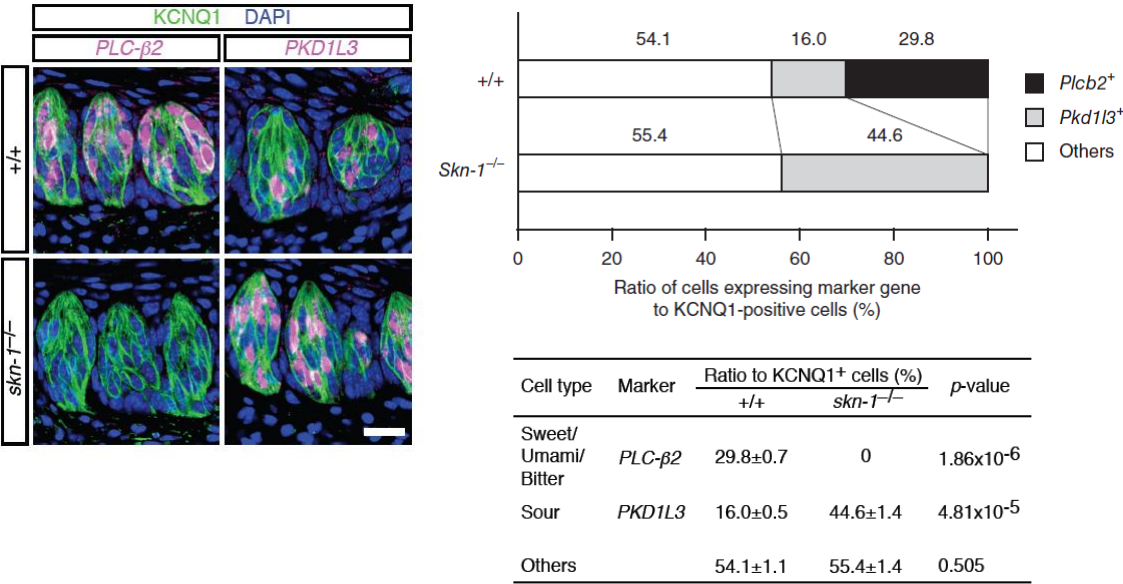
これまでの味覚研究において、味覚受容体やシグナル伝達分子などの味蕾特異的に発現する遺伝子の探索は、主に味蕾が存在する有郭乳頭上皮組織と味蕾が存在しない舌上皮組織との間で、サブトラクション法やディファレンシャルスクリーニング法を用いて行われてきた (Hoon and Ryba, 1997; Asano-Miyoshi et al., 1998)。一方、我々の研究室では、DNA マイクロアレイ解析の手法を用いた方法論を確立してきた。有郭乳頭上皮組織と味蕾が存在しない舌上皮組織、または味蕾とその他の舌上皮組織との比較解析により、舌上皮層において味蕾特異的に発現している遺伝子を効率的に抽出、同定できている (應本 博士論文, 2006; Ohmoto et al., 2006; 笠原 修士論文, 2007; 黒川 修士論文, 2009)。しかし、これらの方法論では、細胞種に関係なく味蕾全体に高い発現を示す遺伝子が抽出されやすいという特徴があった。味蕾の一部の細胞に発現する遺伝子、すなわち、ある特定の細胞種にのみ発現する遺伝子や、ある特定の時期にのみ発現する遺伝子は、相対的に発現量が低くなるために検出されにくく、データ中に埋もれてしまうことが多かった。また、特定の細胞種に発現する遺伝子を同定するためには、味蕾特異的に発現するものを選抜した上で細胞種マーカー分子との二重染色・三重染色を行わなければならない、非常に効率が悪かった。

当研究室で作製された *Skn-1* ノックアウトマウスの味蕾では甘味・旨味・苦味受容細胞が消失し、その数に相当する酸味受容細胞が増加している。味蕾全体の細胞数や type I 味蕾細胞の割合は変わっていない (Matsumoto et al., 2011)。このマウスを用いて DNA マイクロアレイ解析を行うことで、味蕾細胞種ごとに特異的に発現する遺伝子を効率よく同定できるのではないかと考えた。すなわち、これまでの方法論と同様に味蕾に特異的に発現している可能性が高い遺伝子を抽出し、

さらにこれらの遺伝子の中で、野生型に比べて **Skn-1** ノックアウトマウスの味蕾で発現低下しているものが **type II** 味蕾細胞に発現する遺伝子、発現上昇しているものが **type III** 味蕾細胞に発現している遺伝子、発現量に変化がないものが **type I** 味蕾細胞特異的、または味蕾全体に発現している遺伝子となることが予測できる(図 1-1)。

本章では、味蕾細胞特異的に発現する遺伝子を新たに同定することを目指し、野生型および **Skn-1** ノックアウトマウスの有郭乳頭上皮および非乳頭上皮の **DNA** マイクロアレイデータを解析した。当初の予想通り、野生型マウスとノックアウトマウス間のデータの変動が味蕾細胞種によって分離することを示した。また、**DNA** マイクロアレイ解析の結果から細胞種特異的に発現する遺伝子の候補を抽出できることを示した。

A



B

| | |
|----------|-----------------------------------------------------|
| WT >> KO | type II 味蕾細胞（甘味・旨味・苦味受容細胞） |
| WT << KO | type III 味蕾細胞（酸味受容細胞） |
| WT ≐ KO | type I 味蕾細胞（type II・III 以外の細胞、塩味受容細胞を含むと推定） 味蕾全体 |

図1-1 Skn-1ノックアウトマウスの味蕾における細胞種の割合と予測されるDNAマイクロアレイ解析結果

A Skn-1ノックアウトマウスの味蕾における細胞種の割合

Kcnq1で抗体染色される細胞を全味蕾細胞、Plcb2で染色される細胞をtype II 味蕾細胞、Pkd1l3で染色される細胞をtype III 味蕾細胞としてそれぞれの細胞数を測定すると、野生型ではtype II 味蕾細胞が30%程度、type III 味蕾細胞が15%程度なのに対し、Skn-1ノックアウトマウスではtype II 味蕾細胞が0になる代わりに、type III 味蕾細胞が45%程度に増加している。

Matsumoto et al. (2011) より引用・改変

B 予測されるDNAマイクロアレイ解析結果

細胞種の割合の変化を反映し、細胞種ごとにWTとKOの発現変動の仕方が異なるようなDNAマイクロアレイ結果が得られると予想できる。

1-2 実験材料および方法

1-2-1 Skn-1 ノックアウトマウス

Skn-1 ノックアウトマウスは当研究室で作製・自家繁殖したものを用いた(Matsumoto et al., 2011)。ノックアウト個体はメンデルの法則に従った比率で得られた。系統の維持は(-/-)どうしを掛け合わせて行った。

1-2-2 舌上皮組織の摘出、全 RNA の抽出および精製

C57BL/6J 野生型マウス(12-30 週齢、雄; 埼玉実験動物供給所より購入)および Skn-1 ノックアウトマウス(12-30 週齢、雄)を用いた。マウスを頸椎脱臼後、速やかに舌を摘出してリンガー溶液(150 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 3.3 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, 2mM HEPES(pH7.4), 7.8 mM D-glucose)で洗浄し、Ca²⁺-free リンガー溶液(150 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2mM HEPES(pH7.4), 7.8 mM D-glucose, 2 mM EDTA)に浸漬した。リンガー溶液にコラゲナーゼ Type I (SIGMA)を 2 mg/ml となるように溶解した酵素溶液約 50 μ l を有郭乳頭直下に皮下注入し、Ca²⁺-free リンガー溶液中に室温で 10 分間静置した。ピンセットで有郭乳頭の味蕾を含む上皮層を筋層から剥離し、Ca²⁺-free リンガー溶液中でエブナー腺を除去した。有郭乳頭周辺の上皮層を可能なかぎり除去したものを有郭乳頭サンプル(WT-CvP または KO-CvP)とし、この過程で取り除かれた上皮層を有郭乳頭外上皮サンプル(WT-Np)として RNeasy Lateral™ (Ambion)中に保存した。

取得した WT-CvP, KO-CvP, WT-Np から全 RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出し、DNase I 処理および精製を行った。得られた全 RNA の品質はアガロースゲル電気泳動後の SYBR Gold(Invitrogen)による染色像および吸光度により評価した。

1-2-3 DNA マイクロアレイ解析

全 RNA 10 ng に対して、Two-Cycle Target labeling and Control Reagents Kit (Affymetrix)を用いてビオチン化 cRNA を合成した。アルカリ溶液による cRNA の断片化を行い、Expression Analysis Technical Manual(Affymetrix)に従い DNA マイクロアレイ GeneChip (Mouse Genome 430_2.0, Affymetrix)と 45°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄、フィコエリスリン標識および蛍光シグナルの読み取りは、Affymetrix 社の GeneChip System を用いて行った。

1-2-4 DNA マイクロアレイデータ解析

野生型マウス有郭乳頭上皮(WT-CvP)、野生型マウス乳頭外舌上皮(WT-Np)、Skn-1 ノックアウトマウス有郭乳頭上皮(KO-CvP)のそれぞれの群について 5 サンプルの DNA マイクロアレイデータを使用した。得られた DNA マイクロアレイデータは GeneChip Operation Software ver. 1.1 (GCOS1.1, Affymetrix)で解析し、発現量の指標となるシグナル値をテキストファイルとして出力した。その後、GAPDH (Probe ID:1418625_s_at)のシグナル値が 10000 になるように線型的に正規化し、この数値を以降の解析に用いる発現数値とした。この数値をもとに群間の倍数変化 (fold change)を算出、および群間で分散が等しくないと仮定して Welch の t 検定を行った。

プローブセットのアノテーション情報は Affymetrix 社の GeneChip DNA マイクロアレイ解析サポートページ NetAffyx より取得した。

1-2-5 cDNA 断片のクローニング

マウス遺伝子由来の cDNA 断片は、有郭乳頭上皮・脳・精巣・肝臓・脾臓の total RNA を用いて RT-PCR により取得した。クローニングした遺伝子名、accession 番号、プローブ領域、取得に用いたプライマーの配列を表 1-2-1 に示した。増幅した cDNA 断片は pBlueScript SK vector (Stratagene)にクローニングし、自動 DNA シークエンサー 3130 (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を確認した。

1-2-6 マウス味蕾を含む上皮組織切片の作成

上記 Skn-1 ノックアウトマウスもしくは野生型 C57BL/6J マウス(埼玉実験動物供給所より購入または自家繁殖)の 7 週齢以上のオスを用いた。マウスは頸椎脱臼により安楽死させた後、舌から有郭乳頭、茸状乳頭と軟口蓋上皮を摘出し、クリオモルド 1 号(Sakura)中に O.C.T.コンパウンド (Sakura)で包埋し、液体窒素に浮かべたアルミホイル上で凍結した。凍結ブロックは使用時まで -80℃で保存した。凍結ブロックはクライオスタット HM500-OM (Leica)を用いて 7 μm に薄切し、MAS コートスライドガラス(松波硝子工業)に貼りつけた。作成した切片は -80℃で保存した。

1-2-7 *in situ* hybridization (ISH)

ISH で用いたプローブはジゴキシングニンまたはフルオロセインで標識したアンチセンス RNA プローブであり、前者は DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)、後者は Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)を用いて、T3 または T7 RNA polymerase (Stratagene)で *in vitro* transcription を行い、合成した。プローブ長が 1000 塩基を超えるもの

は、sizing 溶液中(42 mM NaHCO₃、63 mM Na₂CO₃、5 mM dithiothreitol(DTT))60℃で断片化を行い、約 500 塩基の長さにして用いた。

マウス味蕾を含む上皮組織の新鮮凍結切片は 4%パラホルムアルデヒド(PFA) / PBS 溶液中室温で 10 分間固定した後、15 分間ずつ 0.1% ジエチルピロカルボナート(DEPC) / PBS で処理し、5×SSC に buffer を置換した。その後、プレハイブリダイゼーション溶液(40 µg/ml salmon sperm DNA、5×SSC、50%ホルムアミド溶液)で 58℃ 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション溶液(5×SSC、50%ホルムアミド溶液、5×Denhardt's solution、500 µg/ml salmon sperm DNA、250 µg/ml yeast tRNA、1 mM DTT、20-200 ng/ml アンチセンス RNA プローブ)を切片上に乗せ、58℃または 65℃で 2 晩行った。ハイブリダイゼーション後、いずれも 58℃あるいは 65℃のまま、5×SSC で 5 分間の洗浄を 2 回、0.2×SSC で 30 分間の洗浄を 2 回行った。さらに室温において 0.2×SSC で 5 分間洗浄した後、TBS に buffer を置換した。ブロッキング溶液(0.5% blocking reagent(Roche Diagnostics) / TBS)で 1 時間ブロッキングを行った。抗体反応とシグナルの検出は以下のように行った。

i) 単一プローブを着色シグナルで検出する場合

アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ジゴキゲンin抗体 Fab 断片 (AP-anti-DIG Ab, Roche Diagnostics)をブロッキング溶液で 1000 倍に希釈し、室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。TBS による 15 分間の洗浄を室温で 3 回行い、アルカリフォスファターゼバッファー(100 mM Tris/HCl(pH 9.5)、50 mM MgCl₂、100 mM NaCl)にバッファーを置換した。アルカリフォスファターゼの発色基質溶液 (167 µg/ml nitro-blue tetrazolium (NBT)、333 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate (BCIP) / アルカリフォスファターゼバッファー)と室温で反応させ発色させた。反応時間は用いたプローブによって異なり、3 時間から 16 時間であった。正立顕微鏡(BX51, Olympus)および冷却 CCD カメラ(DP71, Olympus)を用いて画像を取得した。

ii) 2 種類のプローブを共に蛍光シグナルで検出する場合

500 倍希釈のビオチン結合ヤギ抗フルオレセイン抗体 Fab 断片 (Biotin-anti-Fluorescein Ab, Roche Diagnostics)を含むブロッキング溶液で、室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。TBS による洗浄を 10 分間 3 回行った後、VECTASTAIN ABC Kit (Vector)を用いてシグナルを増幅した。TBS による洗浄を 10 分間 3 回、TBST による洗浄を 10 分間行った後、TSA™Biotin System (PerkinElmer)を用いてビオチン化チラミド生成反応を行った。TBS による洗浄を 10 分間 3 回、TBST による洗浄を 10 分間行った後、30 分間室温において TBS で 500 倍希釈した Streptavidin-Alexa488 (Molecular Probe)をビオチンに結合させた。TBS で洗浄した後、プロ

ッキング溶液に置換し、500 倍希釈のアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ジゴキシンゲン抗体 Fab 断片 (AP-anti-Digoxigenin Ab, Roche Diagnostics) を含むブロッッキング溶液で、室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。TBST で 4 回洗浄した後、HNPP FastRed Detection Set (Roche Diagnostics)を用いて蛍光を発色させた。TBST で洗浄した後、切片を TBS で封入し、共焦点顕微鏡 FV1000(Olympus)で観察、記録した。画像の調整は FLUOVIEW Ver.1.5 Viewer(Olympus)を用いて行った。

表1-2-1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列とプローブ領域

| gene name | accession No. | primer sequence | probe region | probe length (bp) |
|-----------|---------------|-------------------------------------------|--------------|----------------------|
| Kitl | NM_013598 | s 5'- ctgcgttcgagctacccaatg -3' | 70-2162 | 2093 |
| | | as 5'- gtggctatgtttcaagagataacg -3' | | |
| Smoc2 | NM_022315 | s 5'- cctccagcgtcaccatgctgc -3' | 197-2726 | 2530 |
| | | as 5'- ctcgttttagacagcattgacatg -3' | | |
| Car7 | NM_053070.3 | s 5'- cagcagcggcatgaccggccaccactgttg -3' | 70-1434 | 1355 |
| | | as 5'- cagggcctgcccgtggcagcagatgactg -3' | | |
| Gfra2 | NM_008115.2 | s 5'- gtcttggtgccaaagaagcgactctggtc -3' | 174-3448 | 3275 |
| | | as 5'- ctcgcttcctagtagctttattggagcttg -3' | | |
| Fgf13 | NM_010200.2 | s 5'- ctccgacccgagccgcttggacttgacac -3' | 6-2412 | 2407 |
| | | as 5'- gtgcacagggcagaaaactgcctgtacatg -3' | | |
| Insm1 | NM_016889.3 | s 5'- gaggagctgcggacgctctgattggctc -3' | 8-2896 | 2889 |
| | | as 5'- gtaagagctgtcggttgtacaagggccttg -3' | | |

1-3 結果

1-3-1 Skn-1 ノックアウトマウスを用いた DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ解析には、野生型マウスの有郭乳頭を含む上皮層(WT-CvP)、Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭を含む上皮層(KO-CvP)、野生型の有郭乳頭外の上皮層(WT-Np)の3群を用いた(各 $n=5$)。正規化した後に、クラスタリングを行ったところ、予想通り、3群は異なるクラスターに分離した(図 1-3-1)ことから、DNA マイクロアレイ実験の操作が妥当であると判断した。

1-3-2 味蕾特異的に発現する遺伝子群の抽出

本研究で用いた DNA マイクロアレイ Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430_2.0 (Affymetrix)には約4万のプローブセットが搭載されている。従来(Ohmoto et al., 2006; 黒川, 修士論文)と同様の方法を用いて、味蕾に特異的に発現すると予想される遺伝子群を抽出した。WT-CvPでの発現数値がWT-Npに対して有意に大きいプローブセットとして8919個を選別した(Welch's t-test, FDR < 0.1)。この中でWT-CvP / WT-Np 比が2以上のものは5272個、5以上のものは1610個が抽出された。味覚受容体、味覚シグナル伝達因子など味蕾で発現することが報告されている遺伝子のほとんどはこの1610プローブセットの中に含まれていた。Tas1R3 (T1R3)やTas2r108 (T2R8)など味蕾のごく一部(5-10%程度)の細胞に発現する遺伝子についてもWT-CvP / WT-Np 比が2以上の5272プローブセットの中には含まれていた。一部の味蕾特異的に発現する遺伝子の抽出法として妥当であることを確認した。

1-3-3 味蕾に発現することが既知の遺伝子の DNA マイクロアレイデータの解析

DNA マイクロアレイデータ上で味蕾細胞種ごとに異なる挙動を示すかを調べるために、味蕾での発現細胞種および味蕾における機能が論文で報告されており、味蕾でISHのシグナルが強く細胞(種)特異的に観察される遺伝子のうち、使用したGeneChipに搭載されている52プローブセット(35遺伝子)についてのDNA マイクロアレイデータを取得し、それぞれ各群の発現数値の平均、WT-CvP / WT-Np 比、KO-CvP / WT-CvP 比、発現細胞種を付した(表 1-3-1)。この中にはSkn-1(Pou2f3)も含んでいる。

例外はあるが、多くの場合において、WT-CvP / WT-Np 比が5以上となった。

各プローブセットについて、KO-CvPのWT-CvPに対して有意差検定を行うと、Type II 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子のプローブセットのうち、17個/18個がKO-CvPでWT-CvPより有意に発現値が低下した(Welch's t-test, < 0.05)。ただし、この中からSkn-1(Pou2f3)についてのデータは除外してある。Type III 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子のプローブセット15個/15個、

は KO-CvP で WT-CvP より有意に発現値が上昇した (Welch's t-test, $p < 0.05$)。

また、倍数変化を KO-CvP と WT-CvP の間の変動の指標として用いるために、上記で有意差が見られた遺伝子に対して KO-CvP / WT-CvP 比を算出した。Type I 味蕾細胞に発現する遺伝子・全ての細胞に発現する遺伝子・基底部の細胞に発現する遺伝子では 0.8~1.5 となるものが 16/18 個、Type II 味蕾細胞に発現する遺伝子では 0.5 以下となるものが 16/18 個、Type III 味蕾細胞に発現する遺伝子では 2 以上となるものが 14/15 個であった。

1-3-4 細胞種ごとの候補遺伝子の抽出

以上の味蕾細胞種特異的に発現する遺伝子(味蕾マーカー遺伝子)から得られた知見をもとに、

A) 有郭乳頭に特異的に発現する条件範囲

B) 各味蕾細胞種に特異的に発現する条件範囲

C) *in situ* hybridization で細胞種特異的な強いシグナルが確認できる範囲

を仮に推定し、細胞種ごとに新たに味蕾で機能する遺伝子の候補となるものを抽出した。

Type I

A) 味蕾(+有郭乳頭上皮)に特異的に発現しているもの

- ・ WT-CvP で WT-Np よりも有意に発現値が大きいものを抽出

WT-Cvp > WT-Np と仮定した場合の $FDR < 0.1$

- ・ WT-CvP と WT-Np の fold change による抽出

fold change WT-Cvp / WT-Np > 5

B) KO と WT で発現が変わらないもの

- ・ WT-CvP で KO-CvP の間で発現値に有意差が見られないものを抽出

KO-Cvp < WT-Cvp, KO-Cvp > WT-Cvp と仮定した場合のそれぞれで $FDR < 0.1$

- ・ KO-Cvp と WT-Cvp の fold change による抽出

fold change $0.7 < (KO-Cvp / WT-Cvp) < 1.5$

C) 発現値 WT_Cvp > 100

⇒ 395 probe sets うち既報 12 probe sets(9 遺伝子)

Type II

A) 味蕾(+有郭乳頭上皮)に特異的に発現しているもの

- ・ WT-CvP で WT-Np よりも有意に発現値が大きいものを抽出

WT-Cvp > WT-Np と仮定した場合の FDR < 0.1

- ・ WT-Cvp と WT-Np の fold change による抽出

fold change WT-Cvp / WT-Np > 2

B) KO で WT より発現が減少しているもの

- ・ KO-Cvp で WT-Cvp よりも有意に発現値が小さいものを抽出

KO_Cvp < WT_Cvp と仮定した場合の FDR < 0.1

- ・ KO-Cvp と WT-Cvp の fold change による抽出

fold change KO_Cvp / WT_Cvp < 0.5

C) 発現値 WT_Cvp > 50

⇒ 204 probe sets うち既報 19 probe sets (12 遺伝子)

Type III

A) 味蕾(+有郭乳頭上皮)に特異的に発現しているもの

- ・ WT-Cvp で WT-Np よりも有意に発現値が大きいものを抽出

WT-Cvp > WT-Np と仮定した場合の FDR < 0.1

- ・ WT-Cvp と WT-Np の fold change による抽出

fold change WT-Cvp / WT-Np > 5

B) KO で WT より発現が増加しているもの

- ・ KO-Cvp で WT-Cvp よりも有意に発現値が大きいものを抽出

KO_Cvp > WT_Cvp と仮定した場合の FDR < 0.1

- ・ KO-Cvp と WT-Cvp の fold change による抽出

fold change KO_Cvp / WT_Cvp > 2

C) 発現値 WT_Cvp > 50

⇒ 124 probe sets うち既報 17 probe sets (14 遺伝子)

1-3-5 条件設定範囲の妥当性を確認

1-3-4 で設定した各細胞種の条件設定範囲が妥当であるかどうかを確認するために、上記で得られた遺伝子からそれぞれサンプルとして遺伝子を選び、野生型マウスおよび Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭切片を用いて ISH を行い、味蕾細胞種特異的に発現するかを確認した。1-3-4 の条件設定範囲、特に KO-Cvp と WT-Cvp の fold change の cut off 値の妥当性を検証した。ISH に用いる遺伝子は実際に味蕾で発現している可能性が高いことがこれまでの解析から示され

ている、WT-CvP / WT-Np 比が高く(10 以上) WT-CvP における発現値が高い(500 以上)のものから選んだ。

Type I または味蕾全体に発現する候補遺伝子の中からは *Kitl* と *Smoc2* を選んだ。野生型マウスの有郭乳頭切片を用いて ISH を行ったところ、どちらも味蕾のほぼ全体に発現が見られた。Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭切片を用いた ISH でも、野生型と変わらない発現が見られた。*Kitl* は味蕾のほぼ全ての細胞に、*Smoc2* が味蕾全体よりは少ない細胞に見られた。Type I 味蕾細胞に発現することを確認するために、*Entpd2* を type I 味蕾細胞のマーカーとして二重 ISH を行った。*Smoc2* のシグナルは *Entpd2* のシグナルとほぼ重なり、type I 味蕾細胞に発現する遺伝子も設定した基準で抽出できたことを示した。

Type II に特異的に発現する候補遺伝子の中からは、*Gfra2* と *Car7* を抽出した。どちらも、野生型マウスの有郭乳頭切片での ISH では味蕾の一部の細胞に発現が見られたが、Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭切片では有意なシグナルは見られなかった。Type II 味蕾細胞に発現することを確認するために、*Trpm5* を type II 味蕾細胞のマーカーとして二重 ISH を行った。*Car7* のシグナルは *Trpm5* のシグナルとほぼ重なった。*Gfra2* のシグナルは *Trpm5* のシグナルの一部に見られた。どちらも type II に特異的に発現しており、type II 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子を抽出できたことを示した。

Type III に特異的に発現する候補遺伝子の中からは、*Fgf13*、*Insm1* を抽出した。*Fgf13* は野生型マウスの有郭乳頭では非常に発現が弱かったが、Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭でははっきりとした発現が見られた。*Insm1* は野生型マウスの有郭乳頭では一部の細胞に、Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭では半数近くの細胞で発現が見られた。Type III 味蕾細胞に発現することを確認するために、*Pkd1l3* を type II 味蕾細胞のマーカーとして二重 ISH を行った。*Fgf13*、*Insm1* のシグナルは野生型、Skn-1 ノックアウトマウスの両方で *Pkd1l3* のシグナルとほぼ重なった。Type III 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子を抽出できたことを示した。

以上から、それぞれの味蕾細胞種特異的に発現する候補遺伝子が、予想した細胞種に発現しており、適切に抽出されていることを示した。

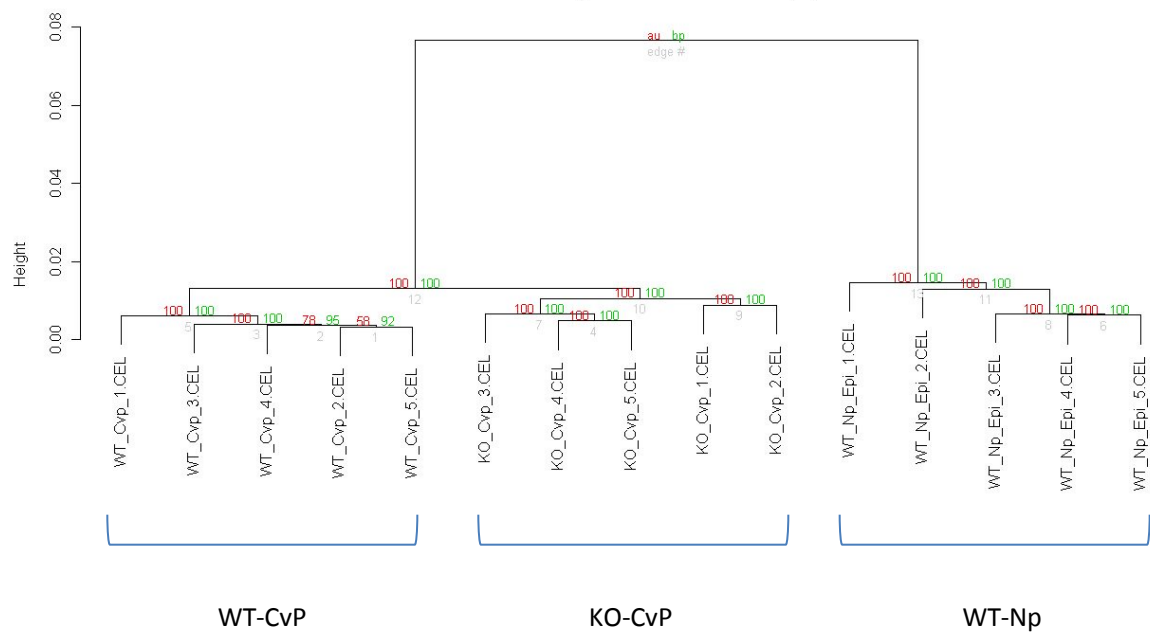


図1-3-1 DNAマイクロアレイ解析 クラスタリング

正規化した際のクラスターへの分離の様子を樹形図で表す。WT-CvP, KO-CvP, WT-Npの3群がそれぞれ別々のクラスターへと分離している。

表1-3-1 味蕾に発現することが既知の遺伝子のDNAマイクロアレイデータ

| Gene Symbol | Gene Title | Cell Type | Probe_ID | WT-CvP Average | WT-Np Average | KO-CvP Average | WT-CvP / WT-Np | KO-CvP / WT-CvP | FDR KO-CvP < WT-CvP | FDR KO-CvP > WT-CvP |
|-------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|--------------|----------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| Trpm5 | transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5 | II | 1443413_s_at | 577.7 | 1.8 | 3.7 | 324.52 | 0.01 | 0.00000 | 1.00000 |
| Gnb3 | guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 3 | II | 1449159_at | 2897.8 | 66.7 | 22.4 | 43.43 | 0.01 | 0.00000 | 1.00000 |
| Tas1r2 | taste receptor, type 1, member 2 | II | 1450313_at | 857.4 | 64.4 | 26.2 | 13.31 | 0.03 | 0.00000 | 1.00000 |
| Gng13 | guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13 | II | 1419414_at | 1170.2 | 13.5 | 41.4 | 86.94 | 0.04 | 0.00000 | 1.00000 |
| Tas2r105 | taste receptor, type 2, member 105 | II | 1422389_at | 220.4 | 13.7 | 9.4 | 16.07 | 0.04 | 0.00000 | 1.00000 |
| Trpm5 | transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5 | II | 1418783_at | 435.0 | 48.1 | 20.3 | 9.04 | 0.05 | 0.00000 | 1.00000 |
| Trpm5 | transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 5 | II | 1449224_at | 302.3 | 40.4 | 15.8 | 7.48 | 0.05 | 0.00000 | 1.00000 |
| Tas1r1 | taste receptor, type 1, member 1 | II | 1420432_at | 87.2 | 9.5 | 9.9 | 9.20 | 0.11 | 0.00000 | 1.00000 |
| Tas1r3 | taste receptor, type 1, member 3 | II | 1420778_at | 67.6 | 37.4 | 12.5 | 1.81 | 0.18 | 0.00393 | 1.00000 |
| Tas2r108 | taste receptor, type 2, member 108 | II | 1420385_at | 71.0 | 35.7 | 19.1 | 1.99 | 0.27 | 0.00000 | 1.00000 |
| Plcb2 | phospholipase C, beta 2 | II | 1452481_at | 157.4 | 63.9 | 43.5 | 2.46 | 0.28 | 0.00000 | 1.00000 |
| Fxyd6 | FXD domain-containing ion transport regulator 6 | II | 1417343_at | 1655.2 | 117.6 | 460.2 | 14.07 | 0.28 | 0.00000 | 1.00000 |
| Tas2r119 | taste receptor, type 2, member 119 | II | 1450585_at | 23.7 | 17.0 | 8.7 | 1.40 | 0.37 | 0.00319 | 0.99800 |
| Gna14 | guanine nucleotide binding protein, alpha 14 | II | 1449848_at | 1211.9 | 49.4 | 484.2 | 24.55 | 0.40 | 0.00000 | 1.00000 |
| Gna14 | guanine nucleotide binding protein, alpha 14 | II | 1447791_s_at | 492.4 | 12.6 | 212.9 | 39.02 | 0.43 | 0.00000 | 1.00000 |
| Gna14 | guanine nucleotide binding protein, alpha 14 | II | 1420385_at | 529.9 | 43.5 | 261.8 | 12.19 | 0.49 | 0.00000 | 1.00000 |
| Gnai2 | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting 2 | II | 1419449_a_at | 993.5 | 228.0 | 640.0 | 4.36 | 0.64 | 0.00066 | 0.99926 |
| Shh | sonic hedgehog | basal | 1436869_at | 1182.5 | 87.1 | 1011.4 | 13.58 | 0.86 | 0.05658 | 0.96612 |
| Kcnq1 | potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1 | all | 1449464_at | 571.6 | 62.5 | 506.6 | 9.15 | 0.89 | 0.18231 | 0.90359 |
| Kcnj1 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1 | I | 1418614_at | 49.2 | 28.2 | 44.0 | 1.75 | 0.89 | 0.44099 | 0.48352 |
| Pou2f3 | POU domain, class 2, transcription factor 3 | II | 1450507_at | 62.8 | 111.7 | 57.1 | 0.56 | 0.91 | 0.14595 | 0.94336 |
| Krt18 | keratin 18 | all | 1448169_at | 5820.3 | 112.8 | 5691.8 | 51.60 | 0.98 | 0.27792 | 0.65258 |
| Gnai2 | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting 2 | II | 1435652_a_at | 2974.6 | 1661.8 | 2956.7 | 1.79 | 0.99 | 0.41208 | 0.69536 |
| Entpd2 | ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 | I | 1418259_a_at | 3128.9 | 343.9 | 3216.1 | 9.10 | 1.03 | 0.61753 | 0.43759 |
| Krt8 | keratin 8 | all | 1435989_x_at | 7455.8 | 97.6 | 7850.1 | 76.41 | 1.05 | 0.77594 | 0.44477 |
| Sox2 | SRY-box containing gene 2 | basal | 1416967_at | 6976.0 | 2844.0 | 7615.7 | 2.45 | 1.09 | 0.95045 | 0.26160 |
| Krt8 | keratin 8 | all | 1423691_x_at | 6894.9 | 100.1 | 7528.9 | 68.91 | 1.09 | 0.77601 | 0.35861 |
| Kcnj1 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1 | I | 1418613_at | 863.6 | 15.0 | 964.1 | 57.73 | 1.12 | 0.63241 | 0.34375 |
| Krt8 | keratin 8 | all | 1420647_a_at | 8105.6 | 155.0 | 9093.8 | 52.30 | 1.12 | 0.86362 | 0.30543 |
| Gad2 | glutamic acid decarboxylase 2 | I | 1421978_at | 54.3 | 29.3 | 61.1 | 1.85 | 1.13 | 0.55769 | 0.53165 |
| Shh | sonic hedgehog | basal | 1427571_at | 9.7 | 9.8 | 11.3 | 0.99 | 1.16 | 0.74558 | 0.59240 |
| Hes6 | hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) | basal | 1436050_x_at | 2141.9 | 155.6 | 2511.7 | 13.76 | 1.17 | 0.93877 | 0.06264 |
| Hes6 | hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) | basal | 1452021_a_at | 660.9 | 31.6 | 777.7 | 20.93 | 1.18 | 0.87360 | 0.07794 |
| Cxcl14 | chemokine (C-X-C motif) ligand 14 | all | 1418456_a_at | 2481.9 | 209.9 | 3047.1 | 11.82 | 1.23 | 0.83748 | 0.20472 |
| Gad2 | glutamic acid decarboxylase 2 | I | 1429589_at | 485.9 | 27.7 | 613.6 | 17.53 | 1.26 | 0.98720 | 0.06415 |
| Scnn1a | sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha | III | 1425088_at | 1050.7 | 2329.1 | 1497.7 | 0.45 | 1.43 | 0.99947 | 0.00195 |
| Cxcl14 | chemokine (C-X-C motif) ligand 14 | all | 1418457_at | 1497.9 | 86.3 | 2466.3 | 17.36 | 1.65 | 1.00000 | 0.00008 |
| Gpr120 | G protein-coupled receptor 120 | I | 1439489_at | 100.6 | 20.0 | 173.2 | 5.02 | 1.72 | 0.99989 | 0.00006 |
| Gad1 | glutamic acid decarboxylase 1 | III | 1416562_at | 27.5 | 21.9 | 64.6 | 1.25 | 2.35 | 1.00000 | 0.00003 |
| Car4 | carbonic anhydrase 4 | III | 1418094_s_at | 171.6 | 11.3 | 408.4 | 15.19 | 2.38 | 1.00000 | 0.00000 |
| Dner | delta/notch-like EGF-related receptor | III | 1423671_at | 1470.5 | 26.9 | 4043.5 | 54.58 | 2.75 | 1.00000 | 0.00000 |
| Ascl1 | achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila) | III | 1437086_at | 514.7 | 12.7 | 1434.6 | 40.40 | 2.79 | 1.00000 | 0.00000 |
| Car4 | carbonic anhydrase 4 | III | 1448949_at | 115.4 | 13.1 | 327.2 | 8.78 | 2.84 | 1.00000 | 0.00000 |
| Gad1 | glutamic acid decarboxylase 1 | III | 1416561_at | 395.9 | 15.2 | 1123.5 | 26.05 | 2.84 | 1.00000 | 0.00000 |
| Dner | delta/notch-like EGF-related receptor | III | 1456379_x_at | 1306.7 | 16.4 | 3751.2 | 79.67 | 2.87 | 1.00000 | 0.00000 |
| Uchl1 | ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (PGP9.5) | III | 1448260_at | 276.4 | 3.3 | 811.8 | 83.77 | 2.94 | 1.00000 | 0.00000 |
| Ddc | dopa decarboxylase | III | 1430591_at | 44.9 | 4.3 | 132.5 | 10.50 | 2.95 | 1.00000 | 0.00000 |
| Pkd2l1 | polycystic kidney disease 2-like 1 | III | 1457105_at | 770.1 | 46.4 | 2476.8 | 16.60 | 3.22 | 1.00000 | 0.00000 |
| Snap25 | synaptosomal-associated protein 25 | III | 1416828_at | 653.0 | 12.9 | 2256.0 | 50.62 | 3.45 | 1.00000 | 0.00000 |
| Ddc | dopa decarboxylase | III | 1426215_at | 1284.2 | 15.9 | 4639.3 | 80.97 | 3.61 | 1.00000 | 0.00000 |
| Nkx2-2 | NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) | III | 1421112_at | 316.7 | 29.6 | 1167.5 | 10.69 | 3.69 | 1.00000 | 0.00000 |
| Ascl1 | achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila) | III | 1450164_at | 141.7 | 6.9 | 626.0 | 20.42 | 4.42 | 1.00000 | 0.00000 |

味蕾で発現することが既知の遺伝子のDNAマイクロアレイデータを一覧にして示す。

それぞれの遺伝子が発現する細胞種をcell typeの列に色分けして付す。

KO-CvPとWT-CvPの比で昇順に並べ替えてある。

WT-CvPの平均値が50以下、またはWT-CvP / WT-Np比が5以下のものは青字で示してある。

Skn-1(Pou2f3)のデータは参考のため赤字で載せてある。

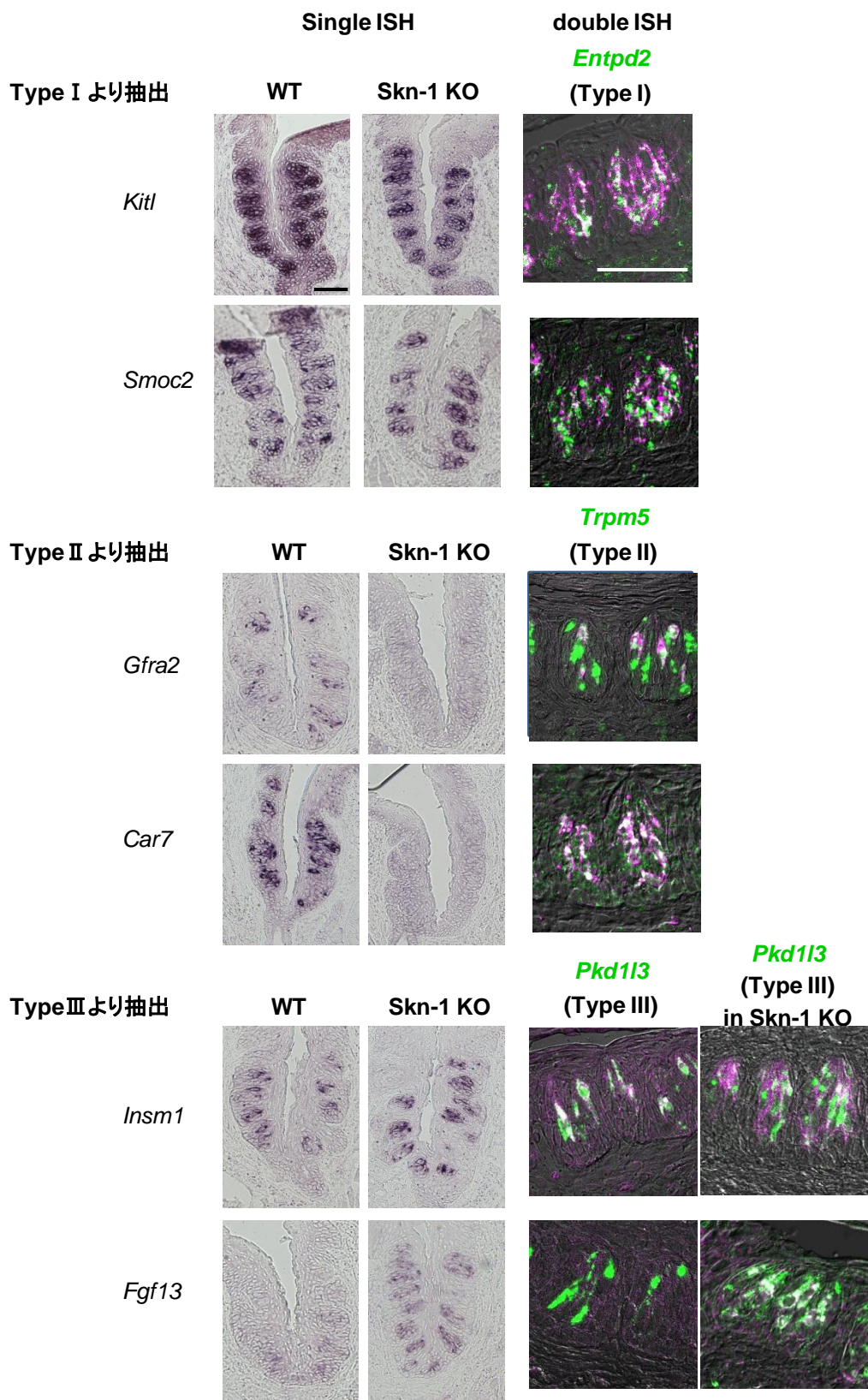


図1-3-2 新たに抽出された遺伝子のISH

本章でtype I 味蕾細胞または味蕾全体、type II 味蕾細胞、type III 味蕾細胞に発現する候補遺伝子として抽出されたもののうち、WT-CvP / WT-Np比で上位に来る新規遺伝子を選んでISHを行った。それぞれについて野生型またはSkn-1ノックアウトマウスの有郭乳頭上での単一ISHおよび、新規遺伝子(マゼンタ)とそれぞれの味蕾細胞種のマーカー遺伝子(緑、type I : *Entpd2*, type II : *Trpm5*, type III : *Pkd1l3*)との二重ISHを示す。スケールバーは25 μ mを示す。

1-4 考察

本章では、味蕾細胞種特異的に発現する新規遺伝子の取得を目指し、有郭乳頭と味蕾を含まない上皮組織の DNA マイクロアレイデータの比較、Skn-1 ノックアウトマウスと野生型マウスの DNA マイクロアレイデータの比較を基に、遺伝子の探索と発現解析を行った。その結果、これらのデータから味蕾に特異的に発現する遺伝子、さらにその発現する味蕾細胞種の推定が可能であることを示した。Skn-1 ノックアウトマウスは味蕾細胞の分化機構を解明するためのモデルであるだけでなく、味覚の分子生物学的な研究にも有用なツールとなり得ることが示された。

1-4-1 DNA マイクロアレイデータ解析における抽出基準の設定

今回の解析では、二群間の有意差検定の後に WT-CvP の発現値ならびに WT-CvP と WT-Np の比および KO-CvP と WT-CvP の比 (fold change) を基準として遺伝子の選別を行っている。新規遺伝子を網羅的に取得してくることが目的であるため、今回の選別基準を広く設定した。したがって、各細胞種について、味蕾で発現することが既知の遺伝子がほぼ全て含まれる一方、抽出した遺伝子が全て味蕾に発現するという基準とはならず、境界付近では味蕾での特異的な発現が見られないものが出てくる可能性は高い。

味蕾のごく一部の細胞に発現する遺伝子 (Tas2r119 など) では発現値が低い傾向が見られた。これらは有郭乳頭の味蕾で発現する細胞が味蕾細胞全体の 5~10 %程度と少ないため、相対的に発現値が低くなったと考えられる。type II 味蕾細胞は味蕾全体の約 30 %を占めるが、この細胞群の中で甘味(・旨味)・苦味細胞に特異的に発現するものが存在する。この場合、味蕾での発現細胞が 10 %ほどにしかない。このような発現細胞数が少ない遺伝子を扱うときは cut off 値を高くすると取りこぼしてしまう可能性があるため、注意が必要と考えられる。本解析では、このことを反映して Type II の WT-CvP と WT-Np の間の fold change 比の cut off 値を 2 に下げた。

同じ遺伝子で複数のプローブセットを持ち、あるプローブセットについては味蕾特異的なことを示すデータが出ており、他のプローブセットでは基準を満たさない場合がある (Shh, Gad1 など、表 1-3-1 参照)。これは GeneChip のプローブ領域の設計上の問題として指摘できる。もし、適切でないプローブ領域のみしか設計されておらず、基準を満たさない結果のみが得られた場合には、その遺伝子を抽出できない可能性がある。どちらにしろ、これは DNA マイクロアレイという方法の限界であり、他の方法と併用することでより正確な結果を得られるだろう。

逆に、KO-CvP / WT-CvP 比が、発現細胞種から予想される値と大きく異なるようなプローブセットは主要な味蕾マーカー分子の中にはほとんど存在しなかった。Skn-1 ノックアウトマウスを用いた DNA マイクロアレイ解析による抽出の系が上手く機能していることの証拠であると考えられる。

今回解析に使用した既知の味蕾マーカー遺伝子の中には見られなかったが、*Skn-1* の上流で機能するような遺伝子は、*KO-CvP* と *WT-CvP* の間の変動としては検出されない可能性が高い。*Skn-1* ノックアウトマウスのように特定の味蕾細胞が欠落した他のモデルマウスにおける知見を利用すれば、新たに遺伝子の同定につながる事が期待される。

1-4-2 味蕾を用いた DNA マイクロアレイ解析の可能性

味蕾特異的な遺伝子を選別する上では、今回のように有郭乳頭上皮とその他の舌上皮との比較ではなく、味蕾と味蕾を含まない有郭乳頭上皮を比較解析する方法を採用すると、より選別的に遺伝子を取得できることがラットを用いた実験から分かっている(黒川、修士論文、2009)。

本実験でも、より詳細な解析ができることを期待して野生型マウス、*Skn-1* ノックアウトマウスの両方から味蕾のみを有郭乳頭上皮から分離したサンプルを用いた DNA マイクロアレイ解析の予備実験も行った。しかし、得られた全 RNA の品質は有郭乳頭上皮全体を使用した場合に比べて劣るものであった。この RNA の品質の低下は、有郭乳頭上皮全体を使用する場合に比べて酵素処理や細胞操作の時間が長いため、細胞へのダメージが大きくなったことが大きな原因であると考えられる。また、マイクロアレイに必要な RNA 量を確保するためには、1 サンプルにつき 5~10 個体のマウスを必要とする。組織の採取から RNA の抽出までの時間が伸びるため、RNA の品質が低下した可能性がある。さらに、手技操作では、味蕾細胞のみを集めることが難しく、他の組織の混入が起こることを防げなかった。味蕾サンプルに上皮特異的に発現する遺伝子が混入し、逆に味蕾摘出後の有郭乳頭上皮サンプルに味蕾細胞が残り、予想通りに分離できていないことが分かった。この技術的な問題に関しては、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションのような方法を用いることで対応できると考えられる(Hevezi et al., 2009; Moyer et al., 2009)。

しかし、今回の有郭乳頭全体を使用した DNA マイクロアレイでも問題なくデータの分離が得られている。サンプルの全 RNA の品質が良い *CvP* のデータを使用する方がデータの信頼性が高いと判断し、解析に用いた。少なくとも type II、type III 味蕾細胞に発現する候補遺伝子はこの方法で問題なく抽出できており、抽出の効率も問題ないことが次章以降の事例で分かった。

第 2 章

Type II 味蕾細胞に発現する神経接続因子の探索

2-1 序

Type II 味蕾細胞は、これまでに最も研究され、知見が蓄積している細胞種である。甘味・旨味・苦味の受容細胞であることが知られており、GPCR 型の味覚受容体(*T1Rs*, *T2Rs*)のいずれかを発現する。その下流のシグナル分子は甘味・旨味・苦味受容細胞で共通であり、G タンパク質サブユニット(*Gna14*, *Gnat3*(*Ggust*), *Gnb3*, *Gng13*)、イノシトールリン酸化系の細胞内シグナル伝達因子(*Plcb2*, *Itpr3*)、電位依存性陽イオンチャネル(*Trpm5*)、ATP 放出チャネル(*Panx1*)などを発現する(Yan et al., 2001; Huang et al., 2007; Shindo et al., 2008; Tizzano et al., 2008)。味覚受容体での味物質の受容から神経伝達物質の放出までの細胞内シグナリングのメカニズムが分かっているのは、この細胞種のみである。

Type II 味蕾細胞の中で残っている未解明な点としては、味蕾から味神経への情報伝達、そして味神経との接続機構である。甘味・苦味の受容細胞が細胞内カルシウム濃度上昇依存的に Pannexin1(*Panx1*)を介して ATP を放出するという報告がある(Huang et al., 2007; Romanov et al., 2007; Romanov et al., 2008)。味神経には ATP 受容体 *P2X2/P2X3*が発現しておりこれらをノックアウトすると 5 基本味に対する応答が全て消失することから(Finger et al., 2005)、ATP が神経伝達物質となって味情報の伝達が成立しているとされている。

ただし、電子顕微鏡像では type II 味蕾細胞と味神経の間にシナプス構造は見られない。Type II 味蕾細胞の一部に SNAP-25 が発現しているという報告もあるが(Oike et al., 2006)、基本的には SNARE タンパク質は発現していないと考えられる(DeFazio et al., 2006)。ここから、type II 味蕾細胞はシナプスを形成していないというのが一般的な見解である。味蕾細胞は互いに近接しており、シナプス構造を作らずに ATP を対応する味神経へと選択的に届ける仕組みは分かっていない。当研究室で作成した、経シナプストレーサー分子の WGA を味蕾の特定の細胞種で発現するトランスジェニックマウスである T1R3-WGA マウスや T2R5-WGA マウスでは T1R3 発現細胞、T2R5 発現細胞から WGA が特定の神経へと輸送されていることから、type II 味蕾細胞から味神経へと、何らかの伝達が行われていると考えられる(Ohmoto et al., 2008; Ohmoto et al., 2010)。

本章では、type II 味蕾細胞において味神経との接続に関与している分子に関する知見を得ることを目指した。type II 味蕾細胞特異的に発現する遺伝子の候補の中から、軸索誘導や細胞接着に関与する遺伝子の検索を行い、神経接続因子の候補を得た。さらに味神経の細胞体が存在する神経節での ISH を行うことにより、味蕾と味神経の間に相互作用がある可能性を示した。

2-2 実験材料および方法

2-2-1 DNA マイクロアレイデータ解析

第1章で取得した、type II 味蕾細胞に特異的発現を示す候補遺伝子の Gene Ontology term を Affymetrix 社の DNA マイクロアレイ解析情報サポートページ NetAffyx より取得した。Biological Process に関する Gene Ontology term の中で神経接続に関与する term のうち、“nervous system development”, “axon guidance”, “cell adhesion”またはその下位の term を検索した。

2-2-2 cDNA 断片のクローニング、上皮組織切片の作成、*in situ* hybridization

第1章と同様に行った。使用した遺伝子の accession 番号とプローブ領域を表 2-2-1 に示す。

2-2-3 マウス神経節の *in situ* hybridization

ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール、東京化成工業)麻酔下、氷上でマウスより顔面神経(第VII脳神経)の膝神経節(geniculate ganglion; GG)および舌咽神経(第IX脳神経)の下神経節(petrosal ganglion; PG)と迷走神経(第X脳神経)の下神経節(nodose ganglion; NG)を摘出し、第1章の味蕾組織の場合と同様に包埋・凍結した。得られたマウス GG および NPG の凍結ブロックはクライオスタットを用いて 8 μ m に薄切した。

表2-2-1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列とプローブ領域

| gene name | accession No. | primer sequence | probe region | probe length (bp) |
|-----------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| Gfra2 | M_008115.2 | s 5'- gtcttggtgccaaagaagcgactctggtc -3' as 5'- ctgccttcctagtagctttattggagcttg -3' | 174-3448 | 3275 |
| Slit2 | NM_178804.3 | s 5'- ctacatgcgttgatggaattaacaactac -3' as 5'- catctactcttactggccattgctacag -3' | 4893-7599 | 2707 |
| Ngfr | NM_033217.3 | s 5'- gtcccaattccgacgcgtgatgttctag -3' as 5'- gtggggtccttctactaattgcagatcgag -3' | 1451-3097 | 1647 |
| D0H4S114 | NM_053078.4 | s 5'- gagtgaacaggagcggggcttttgtctg -3' as 5'- cagagggtggggtagcgagaatgcacaag -3' | 230-2035 | 1806 |
| Nrcam | NM_176930.4 | s 5'- gcaagtggatatcgcgacccaaggctggttc -3' as 5'- gagcatccctcaaccatagtggtcatag -3' | 3879-5728 | 1850 |
| Edil3 | NM_001037987.4 | s 5'- gtgttcaaatatgtaggctactgactg -3' as 5'- ctgttcttaagaagccacatgttcagac -3' | 2059-5160 | 3102 |
| Srpx2 | NM_026838.2 | s 5'- ctggctactctggccacatagccctagtc -3' as 5'- ctacctctctgctgggattccaagtgcac -3' | 480-2822 | 2343 |
| Tek | NM_013690.2 | s 5'- gtatggactcttagccggttagttctc -3' as 5'- ctctaggctgcttctccgcagagcagtc -3' | 340-3715 | 3466 |
| Satb2 | NM_139146.2 | s 5'- ctccaaatcggagcagcatggag -3' as 5'- gagttcacattatctctggtcggtttc -3' | 266-2493 | 2228 |
| Fezf1 | XM_133029.5 | s 5'- ctgcgttattgacacaacactttctattg -3' as 5'- cagaacaaacaccatctctccaccgag -3' | 28-2024 | 1997 |
| Ascl2 | NM_008554.2 | s 5'- gtgggctcttggtcaccgcaaagcttg -3' as 5'- gaatagtacactttgcaacagcagggttc -3' | 8-1560 | 1553 |
| | | | | |
| Slit1 | NM_015748.3 | s 5'- ctctggccttcaaggacttcgttcgtg -3' as 5'- ctgtgcaaggcactttgagagaggcatg -3' | 2922-5206 | 2285 |
| Slit3 | M_011412.3 | s 5'- ctcaagtgaacctcagagatggattcag -3' as 5'- actgtatagtccatatactcagacggtg -3' | 2973-4882 | 1910 |
| Robo1 | NM_019413.2 | s 5'- ctgaagacaaccagagaggcttacgatgct -3' as 5'- gtcaagcctgatacctatgcatgactaaag -3' | 5827-7250 | 1424 |
| Robo2 | NM_028783.2 | s 5'- gacatacaaagatgctctgaggaccatcag -3' as 5'- gagtgcattaagctgtatcacagagcatac -3' | 4537-7628 | 3092 |

2-3 結果

2-3-1 DNA マイクロアレイ解析による神経接続因子の探索

第 1 章で抽出した type II 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子候補である 204 プローブセットに対して、Gene Ontology (GO) term の検索を行った。”Biological Process”に “nervous system development”, “axon guidance”, “cell adhesion” またはそれらの下位に存在する term を含むものはそれぞれ以下になった。

nervous system development:

Gfra2, Fezf1, Ascl2, Slit2, Nrcam, Ngfr

neuron migration:

Fezf1, Satb2, Slit2

axon guidance

Fezf1, Slit2, Ngfr

axon regeneration

D0H4S114

neuron differentiation

D0H4S114

cell adhesion

Calca, Edil3, Srp2, Tek, Nrcam

これらから、味蕾では発現しないが味蕾周辺の神経(ただし味神経ではない)で発現するという報告がある *Calca*(*CGRP*) (Yamasaki et al., 1984; Crescimanno et al., 2004)を除いた。*Ngfr* については味蕾における発現(抗体染色)およびノックアウトマウスを用いた機能解析の報告があるが(Yee et al., 2005; Krimm, 2006)、他の分子と同様に ISH を行った。*Ngfr* と残り 10 遺伝子 *Gfra2, Slit2, D0H4S114, Ascl2, Fezf1, Satb2, Nrcam, Edil3, Srp2, Tek* を type II 味蕾細胞に特異的に発現する神経接続因子の候補とした(表 2-3-1)。

2-3-2 味蕾における in situ hybridization

上記の 11 遺伝子について、野生型マウスの有郭乳頭を用いて *in situ* hybridization を行ったところ、*Ascl2, Tek* を除く 9 遺伝子の味蕾特異的な発現が見られた(図 2-3-1)。

このうち *Gfra2, Slit2, D0H4S114, Edil3, Srp2* は味蕾の一部の細胞に強いシグナルが見られた。*Fezf1, Satb2* は弱いシグナルが味蕾の一部の細胞に見られた。*Nrcam* はごく弱いシグナル

が基底部の細胞に見られた。*Ngfr* は味蕾の多くの細胞にシグナルが見られた。これは *Ngfr* が type II 味蕾細胞および type III 味蕾細胞に発現するという報告と一致する (Yee et al., 2005)。

これらの遺伝子について、type II 味蕾細胞に発現しているかどうかを確かめるために *Skn-1* ノックアウトマウスの有郭乳頭切片を用いて ISH を行った。野生型マウスの味蕾でシグナルが見られた *Gfra2*, *Slit2*, *D0H4S114*, *Edil3*, *Srpx2*, *Fezf1*, *Satb2*, *Nrcam* のシグナルは見られなかった。*Ngfr* のみ発現が弱くなり発現細胞の割合が減少したように見えたが、味蕾内での発現は消失せずシグナルが残った。

味蕾の一部の細胞に強いシグナルが認められたものについては、どれも味蕾細胞の 5-20 %程度の細胞にシグナルが見られ、味蕾全体の約 30 %を占める type II 味蕾細胞よりも狭い範囲の細胞群に属していると推測された。発現する細胞種をさらに詳しく同定するために、二重 ISH を行った(図 2-3-2)。甘味・旨味細胞のマーカーとして *T1R3*、苦味細胞のマーカーとして *Ggust* を用いた。

Gfra2 のシグナルは *T1R3* のシグナルと大部分が重なり、*Ggust* のシグナルとは重ならなかった。

Slit2 のシグナルは *T1R3* のシグナルとは重ならず、*Ggust* のシグナルに内包された。

D0H4S114 のシグナルは *T1R3* のシグナルと重ならず、*Ggust* のシグナルに内包された。

Edil3 のシグナルは *T1R3* のシグナルと重ならず、*Ggust* のシグナルと大部分が重なった。

Srpx2 のシグナルは *T1R3* のシグナルと大部分が重なり、*Ggust* のシグナルと一部が重なった。

ここから、*Gfra2*, *Srpx2* が甘味細胞に、*Slit2*, *D0H4S114*(P311), *Edil3* が苦味細胞に発現することが分かった。

2-3-3 味神経節における ISH

Slit は古くから知られる軸索誘導因子であり、標的細胞側に発現・分泌される。*Slit* の受容体としては Roundabout(*Robo*)が知られている。*Slit2* は *Robo1/2* と相互作用することが知られている。逆に *Robo1/2* は *Slit1/2/3* のどの分子種とも相互作用し得ることが知られている (Ypsilanti et al., 2010)。まず、味蕾に *Slit2* 以外の分子種が発現しているかを ISH により調べた。*Slit1* は味蕾またはその周辺上皮に発現していなかった。*Slit3* は味蕾には発現していなかったが、味蕾周辺の上皮細胞に発現していた(図 2-3-3)。また、味蕾に投射する神経の細胞体が存在する神経節において *Robo1/2* が発現しているかを ISH により調べた。*Robo1* は GG と NPG のどちらにも特異的な発現は見られなかった。*Robo2* は GG において多くの細胞にシグナルが見られた。NPG においては一部の細胞に特異的にシグナルが見られた。

表2-3-1 Type II 味蕾細胞に発現する神経接続因子の候補

| Gene Symbol | Gene Title | Probe_ID | KO-Cvp Average | WT-Cvp Average | WT-Np Average | WT-Cvp / WT-Np | KO-Cvp / WT-Cvp |
|-------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|
| Gfra2 | glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha | 1433716_x_at | 3.8 | 524.1 | 15.0 | 34.8 | 0.007 |
| Srpx2 | sushi-repeat-containing protein, X-linked 2 | 1427919_at | 2.1 | 173.1 | 5.2 | 33.4 | 0.012 |
| Edil3 | EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 | 1433474_at | 5.0 | 375.5 | 10.9 | 34.6 | 0.013 |
| Calca | calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha | 1427355_at | 9.4 | 439.3 | 20.4 | 21.5 | 0.021 |
| Gfra2 | glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha | 1459847_x_at | 5.5 | 123.1 | 9.5 | 13.0 | 0.044 |
| Calca | calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha | 1452004_at | 6.6 | 74.0 | 15.9 | 4.6 | 0.089 |
| Fezf1 | Fez family zinc finger 1 | 1429991_at | 14.8 | 159.9 | 22.7 | 7.1 | 0.093 |
| D0H4S114 | DNA segment, human D4S114 | 1436736_x_at | 267.3 | 1694.3 | 589.3 | 2.9 | 0.158 |
| D0H4S114 | DNA segment, human D4S114 | 1450839_at | 211.9 | 1277.5 | 416.8 | 3.1 | 0.166 |
| Satb2 | special AT-rich sequence binding protein 2 | 1427017_at | 43.5 | 205.1 | 8.0 | 25.6 | 0.212 |
| Ngfr | nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16) | 1454903_at | 47.0 | 212.4 | 46.7 | 4.5 | 0.221 |
| Ascl2 | achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila) | 1432018_at | 69.6 | 226.7 | 91.5 | 2.5 | 0.307 |
| Ascl2 | achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila) | 1460514_s_at | 122.9 | 385.8 | 168.2 | 2.3 | 0.319 |
| Ascl2 | achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila) | 1422396_s_at | 37.3 | 95.7 | 16.5 | 5.8 | 0.390 |
| Tek | endothelial-specific receptor tyrosine kinase | 1418788_at | 67.8 | 164.3 | 16.0 | 10.3 | 0.412 |
| Nrcam | neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule | 1434709_at | 70.8 | 170.0 | 17.2 | 9.9 | 0.416 |
| Slit2 | slit homolog 2 (Drosophila) | 1424659_at | 91.0 | 203.1 | 19.6 | 10.4 | 0.448 |

WT

Skn-1 KO

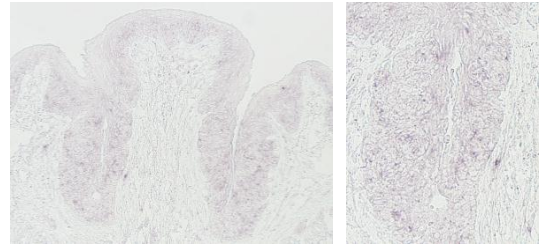
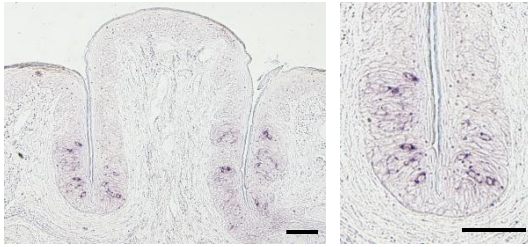
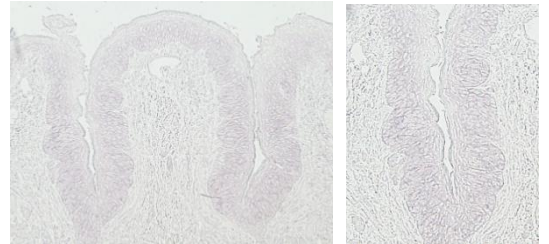
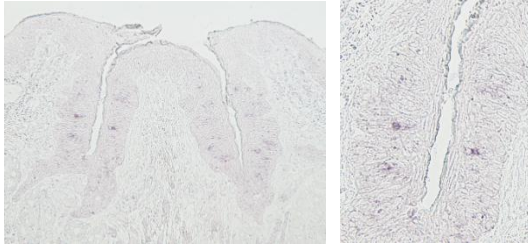
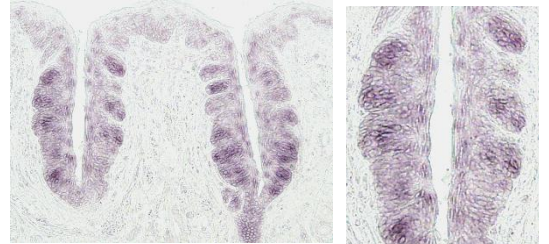
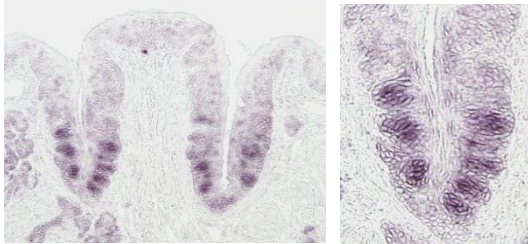
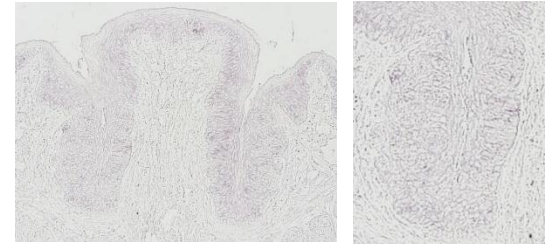
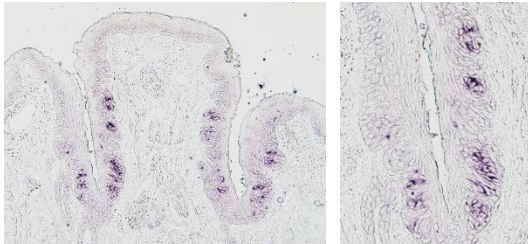
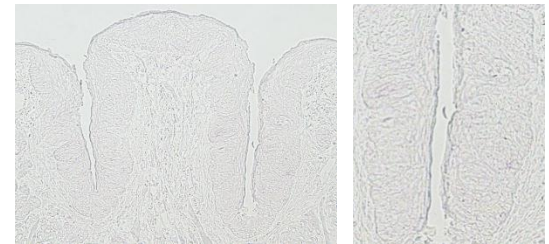
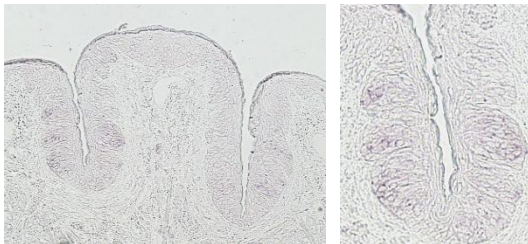
Gfra2*Slit2**Ngfr**D0H4S114**Nrcam*

図2-3-1 Type II 味蕾細胞に発現する神経接続関連遺伝子の *in situ* hybridization

抽出した遺伝子についての野生型マウスおよびSkn-1ノックアウトマウスの有郭乳頭におけるISHの結果を示す。*Gfra2*, *Slit2*, *D0H4S114*のシグナルは野生型マウスの一部の味蕾細胞に特異的に見られる。これらのシグナルはSkn-1ノックアウトマウスでは見られない。

スケールバーは25 μ mを示す。

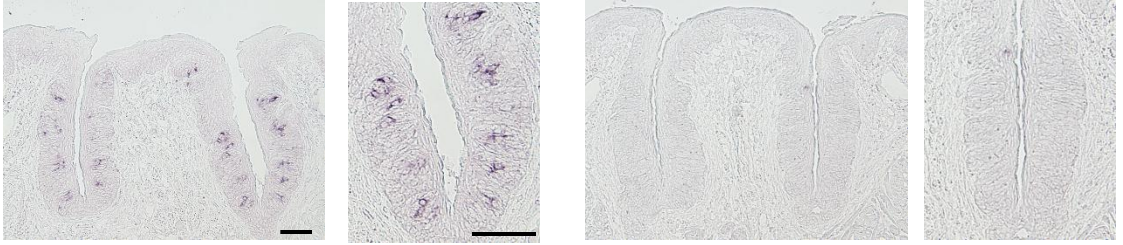
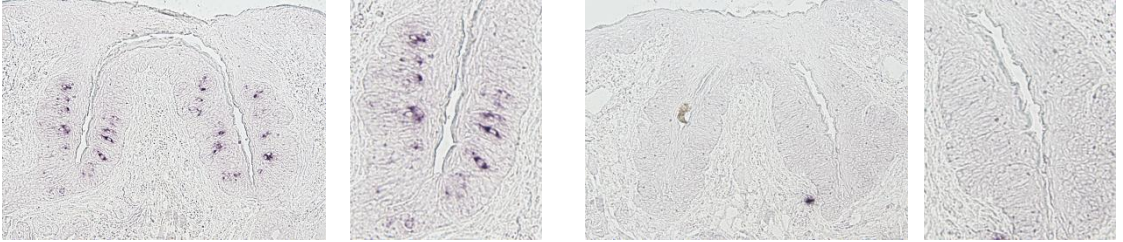
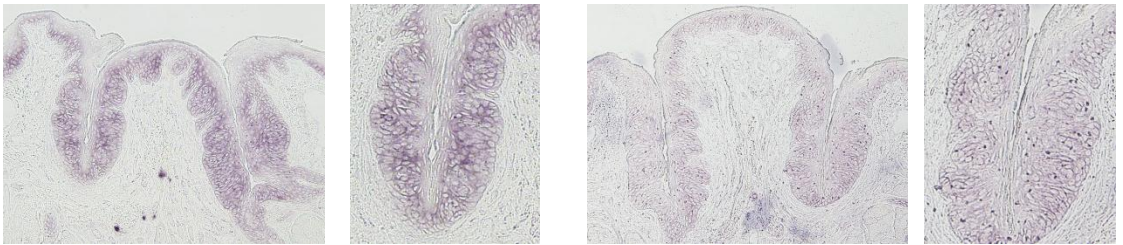
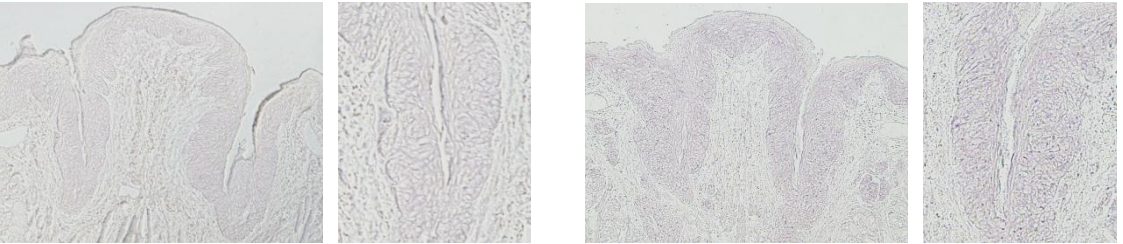
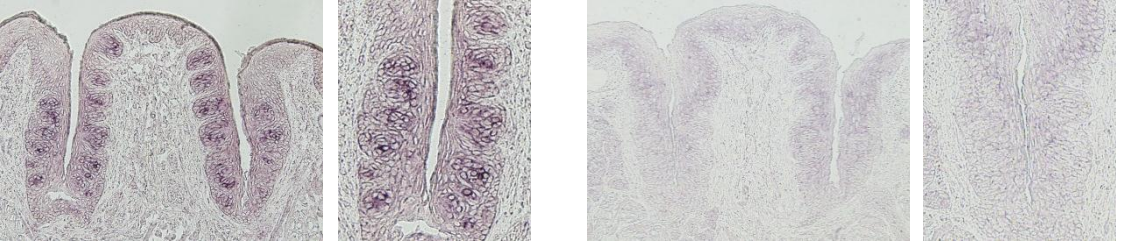
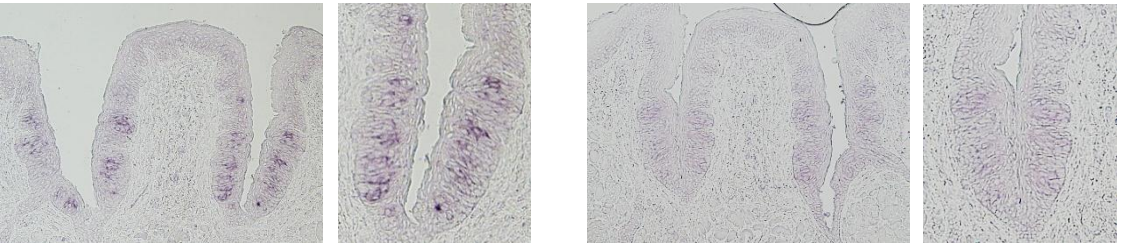
Srpx2*Edil3**Tek**Ascl2**Satb2**Fezf1*

図2-3-1 Type II 味蕾細胞に発現する神経接続関連遺伝子の *in situ* hybridization (続き)

Srpx2, *Edil3*, *Satb2*, *Fezf1*のシグナルは野生型マウスの一部の味蕾細胞に特異的に見られる。これらのシグナルはSkn-1ノックアウトマウスでは見られない。

スケールバーは25 μ mを示す。

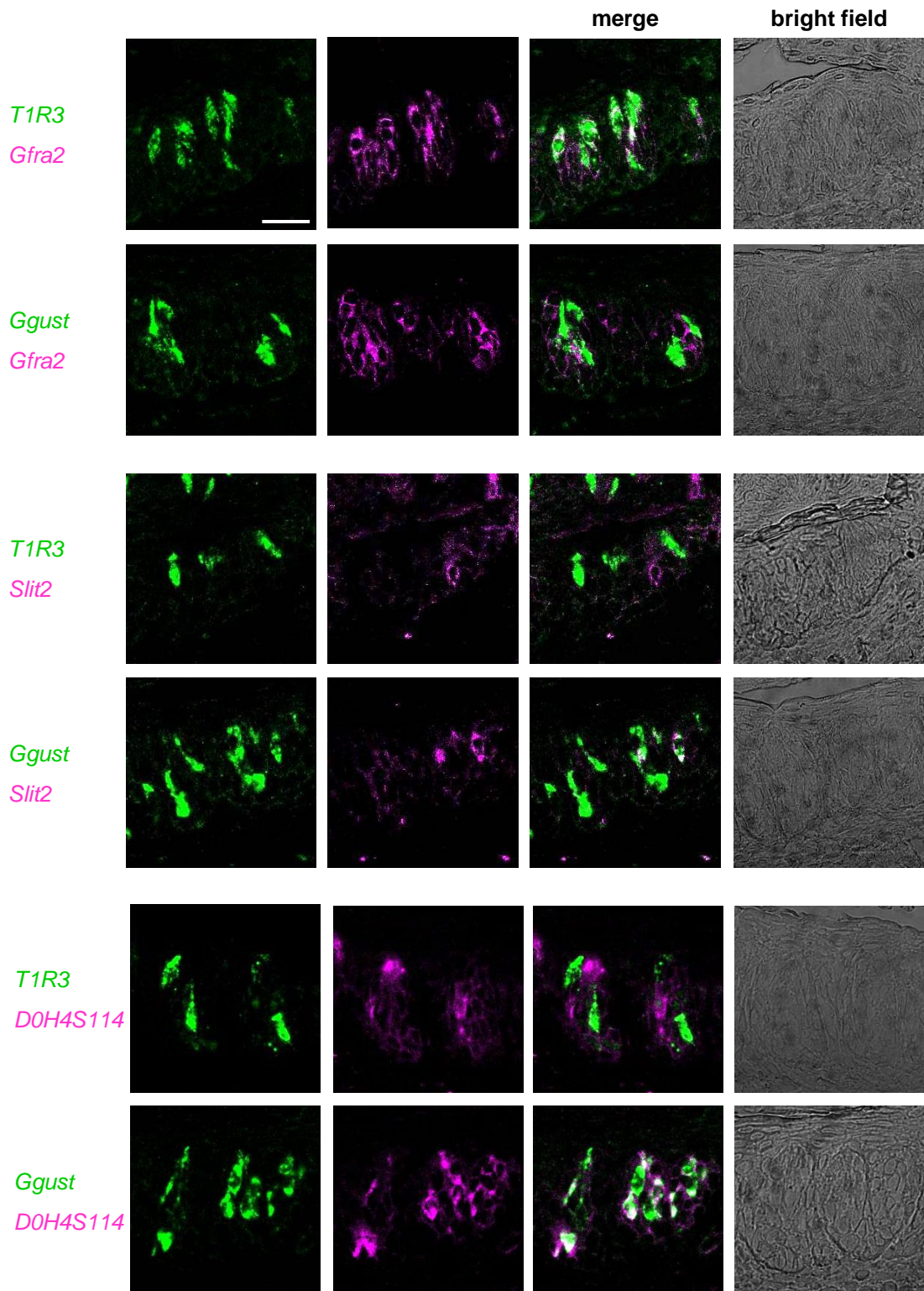


図2-3-2 味蕾に発現する新規神経接続関連遺伝子と味蕾細胞のマーカー分子との発現相関

DNAマイクロアレイ解析から新たに取得した、味蕾特異的に発現する神経接続関連遺伝子 *Gfra2*, *Slit2*, *D0H4S114* (マゼンタ)と、甘味・旨味細胞マーカー *T1R3*(緑)および苦味細胞マーカー *Ggust*(緑)の発現相関をマウス有郭乳頭切片を用いて調べた。右に蛍光シグナルの重ね合わせ像と明視野の像を示す。

*Gfra2*のシグナルは *T1R3*のシグナルと大部分が重なり、*Ggust*のシグナルとは重ならなかった。

*Slit2*のシグナルは *T1R3*のシグナルとは重ならず、*Ggust*のシグナルに内包された。

*D0H4S114*のシグナルは *T1R3*のシグナルと重ならず、*Ggust*のシグナルに内包された。

スケールバーは25 μ mを示す。

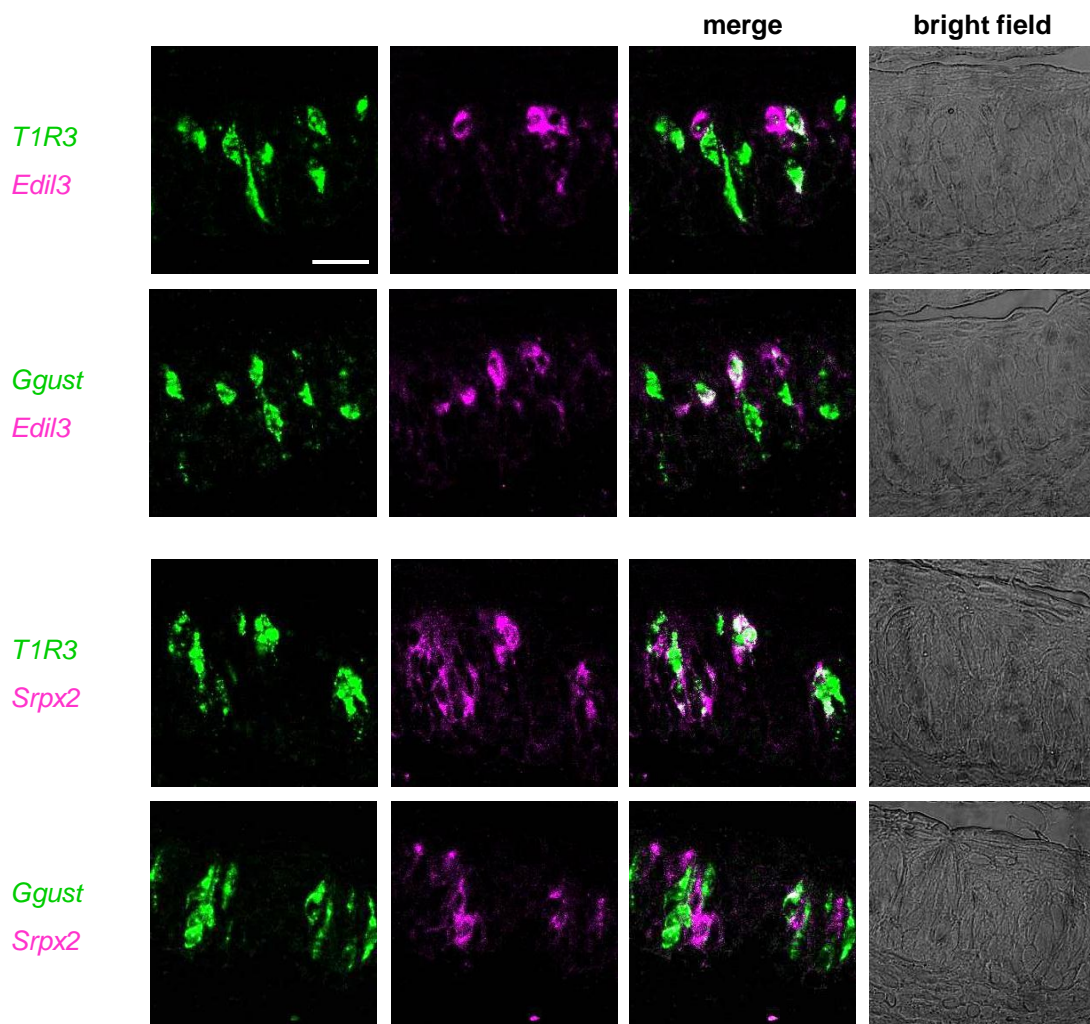


図2-3-2味蕾に発現する新規神経接続関連遺伝子と味蕾細胞のマーカー分子との発現相関（続き）

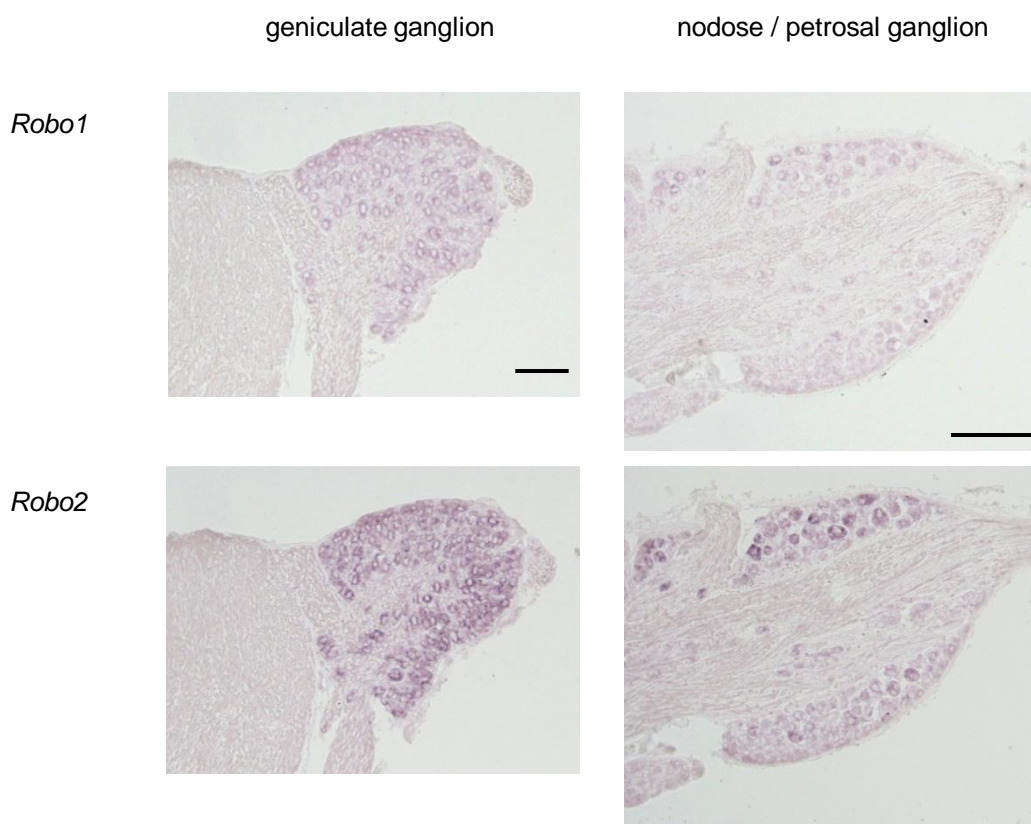
DNAマイクロアレイ解析から新たに取得した、味蕾特異的に発現する神経接続関連遺伝子 *Edil3*, *SrpX2*（マゼンタ）と甘味・旨味細胞マーカー *T1R3*（緑）および苦味細胞マーカー *Ggust*（緑）の発現相関をマウス有郭乳頭切片を用いて調べた。右に蛍光シグナルの重ね合わせ像と明視野の像を示す。

*Edil3*のシグナルは *T1R3*のシグナルと一部が重なり、*Ggust*のシグナルと大部分が重なった。

*SrpX2*のシグナルは *T1R3*のシグナルと大部分が重なり、*Ggust*のシグナルと一部が重なった。

スケールバーは25 μm を示す。

A



B



図2-3-3 神経節におけるRoboの発現および味蕾におけるSlitの発現

A 味神経の細胞体を含む膝神経節および下神経節における*Robo1*, *Robo2*の発現を示す。

*Robo2*は膝神経節の多くの細胞で、また下神経節の一部の細胞で発現が見られた。

スケールバーは100 μm を表す。

B マウス有郭乳頭におけるSlitの発現を示す。*Slit1*の発現は見られず、*Slit2*は味蕾の一部の細胞に、*Slit3*は味蕾を取り囲む上皮細胞に発現していた。

スケールバーは25 μm を表す。

2-4 考察

本章では、Type II 味蕾細胞と味神経との接続に関与する分子を探索した。接続に関する分子、特に神経栄養因子関連の探索はこれまでに多く行われている。しかし、type II 味蕾細胞に着目した解析は行われていなかった。今回の解析により、これまでその存在が報告または予想されていた各種栄養因子のシグナリングに関与するものの他にも、神経接続に関与する可能性のある因子を新たに同定できた。

2-4-1 味蕾に発現することが既知の神経接続因子

これまでに味蕾で発現することが知られている軸索誘導分子や神経接続を行う分子はいくつか存在する。type III 味蕾細胞には脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*)が発現しており、味神経細胞を含む組織では BDNF 受容体である *TrkB*が発現している細胞が多く観察される(Matsumoto et al., 2001; Yee et al., 2003)。神経栄養因子(nerve growth factor; NGF)またはその前駆体は type II 味蕾細胞に存在する。NGF を含む現在知られているニューロトロフィン NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 の全てを受容することができるニューロトロフィン受容体(nerve growth factor receptor; *Ngfr*または p75)が type II 味蕾細胞と type III 味蕾細胞を両方含む味蕾の多くの細胞に存在することが抗体染色により示されている(Yee et al., 2005)。GDNF が type II 味蕾細胞に、その受容体である *Gfra1*が type II・type III 味蕾細胞を含む多くの細胞に発現することも報告されている(Takeda et al., 2004; Takeda et al., 2005)。また、味蕾全体への軸索誘導のためにセマフォリン *Sema3a*、*Sema3F* が発現することも報告されている(Vilbig et al., 2004)。

2-4-2 今回発現を同定した分子についての考察

*Gfra2*は GDNF ファミリーの成長因子の 1 種である neurturin(Nrtn)の受容体である。膝神経節神経細胞の初代培養実験や組織化学実験により、味蕾では GDNF シグナリングの存在が示唆されている(Rochlin et al., 2000; Takeda et al., 2005)。報告されている *Gfra1* の発現に比べ、今回同定した *Gfra2* の発現範囲は甘味細胞のみと狭いものだった。

*Slit2*は古典的な軸索誘導分子である。*Slit*を放出している細胞は基本的に *Robo*を発現している神経を反発する。発生時に正中線に沿って発現し、脊索や嗅神経が正中線に交差して誤った投射をすることを防ぐように軸索誘導を行う(Ypsilanti et al., 2010)。

P311 は神経細胞の形質転換や運動性を誘導する因子である。また、軸索切断後の神経再生に

関与する。ノックアウトマウスを用いた研究から、痛みの認知には関与しないが、情動に関与することが分かっており、感覚の認識とそこから引き起こされる情動の区別という観点から興味深い研究が行われている (Taylor et al., 2008; Sun et al., 2008; Fujitani et al., 2004)。

Fezf1 (Fez family zinc finger-1), *Satb2* (Special AT-rich Sequence-Binding Protein 2) はどちらも神経系に発現することが知られる転写因子である。*Fezf1* は嗅覚において嗅神経の発達に関与することが知られている。主嗅上皮ニューロンに発現し、鋤鼻器のニューロンとの差別化に関与している。*Fezf1* をノックアウトすると嗅神経の正常な成熟・投射が起こらない (Eckler et al., 2011; Shimizu et al., 2009)。*Satb2* はクロマチンリモデリングにより広範囲の遺伝子発現を調節し、特定の神経細胞種への分化を引き起こすことが知られている (Britanova et al., 2008)。

Edil3 (EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3) および *Srpx2* (Sushi repeat-containing protein) は血管形成に関与することが報告されている因子である。伸長過程にある神経軸索も新生血管も周囲組織や基質からの合図に反応して遊走、伸縮するので、ニューロンの発達と血管形成とが比較されており、Slit などの分子が両者で共通の役割を持つ場合が明らかにされてきている。*Srpx2* は分泌因子でユロキナーゼ受容体により受容される。血管内皮細胞の遊走を促す (Miljkovic-Licina et al., 2009)。*Edil3* はインテグリン受容体と相互作用して、血管内皮細胞の接着を促す分子であるだけでなく、Wnt シグナリングを介した神経の発達への影響も知られている (Takai et al., 2010)。

これらの機能は他の組織で知られているものであるが、味蕾で同様の働きをするかについてはさらなる解析が必要である。

2-4-3 味神経との相互作用を解析するためのアプローチ方法

本研究では、味蕾で苦味細胞特異的に発現が見られた *Slit2* の受容体である *Robo* の発現を味神経細胞の細胞体が存在する神経節で調べた。*Slit* と *Robo* の相互作用を提唱することができるだろう。

Slit を発現する細胞は基本的には *Robo* を発現する神経を反発させる。*Slit2* が苦味細胞に発現することに対して、*Robo* がどの味を伝達する神経に発現しているのかは興味深い点である。今回、*Robo* を発現している神経がどの味を伝達する神経なのかは同定できなかった。当研究室で開発した各種の WGA 発現マウスを使用して、神経節における WGA と *Robo* の二重抗体染色をすることにより、味神経において *Robo* が発現する細胞種を明らかにすることができるだろう。または、味神経細胞種マーカーとして取得されている遺伝子との二重 ISH を行うことも考えられる。

また、今回、type II 味蕾細胞に発現することを示した他の分子についても、相互作用する分子の

発現を神経節で調べることにより、味蕾と味神経の新たな相互作用を提唱することができるだろう。

2-4-4 神経接続の時期

神経誘導・接続の機構が最も盛んに起こるのは発生時である。味蕾の発生時における神経栄養因子の軸索投射の様子などについてはよく調べられている(Krimm, 2007; Ito and Nosrat, 2009)。味覚システムの形成期と、成熟してから味蕾がターンオーバーする際の神経再接続では、共通な機構と異なる機構があると考えられる。今回は成熟マウスでの解析のみを行っているが、味蕾発生時にも適用できる結果であるかは興味深い。

また、味蕾細胞の細胞齢にも注目したい。味蕾細胞がターンオーバーする際に、神経との接続が起こるのはある一定の細胞齢のものと考えられる。ブロモデオキシウリジン(BrdU)を取り込ませる実験により神経接続関連因子を発現する細胞齢を特定してこのタイミングを分析することにより、神経との接続と味蕾細胞の成熟がどのように影響し合っているか、味細胞の分化に関する知見を得られるだろう。

第 3 章

TypeⅢ味蕾細胞に発現する前シナプス因子の探索と

Cplx2 ノックアウトマウスの解析

3-1 序

TypeⅢ味蕾細胞では、味神経とのシナプス結合が形態学的に観察でき、SNAP-25 などの前シナプス分子を発現することが知られている。また、マーカー分子として、神経細胞としての特徴を示す PGP-9.5 (protein gene product 9.5 または ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1; Uchl1) や Ncam1 (neuronal cell adhesion molecule 1)、神経伝達物質としてセロトニン、ドーパミンやセロトニンの合成経路で働く AADC (aromatic L-amino acid decarboxylase または dopa decarboxylase; Ddc) や Gad1 (glutamic acid decarboxylase 1) などを発現している (Nelson and Finger, 1993; Kim and Roper, 1995; Yee et al., 2001; Seta et al., 2007)。TypeⅢ味蕾細胞はセロトニンなどの神経伝達物質を介して、シナプス結合した味神経と味情報の伝達を行うと考えられている (Huang et al., 2009)。

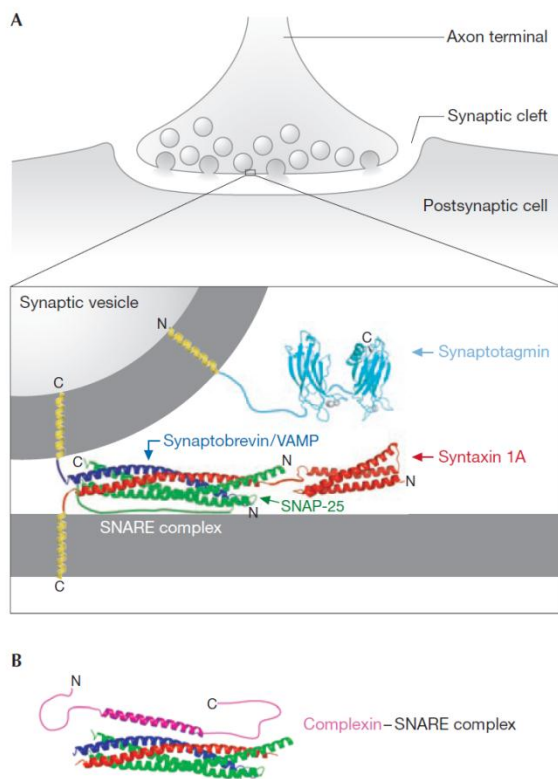
遺伝学的手法によりジフテリア毒素を TypeⅢ味蕾細胞に発現させることで細胞を消失させると酸味に対する味神経応答が認められなくなることから、酸味の受容細胞であることが示されている。酸味の受容体としては *Pkd2l1/Pkd1l3* のヘテロマーが報告されている (Ishimaru et al., 2006; Huang et al., 2006)。しかし、*Pkd2l1/Pkd1l3* の二重ノックアウトマウスでも酸味への神経応答が残存することから、typeⅢ味蕾細胞には他の酸味受容体が存在すると考えられている (Horio et al., 2011)。実際、単離味蕾細胞を用いたカルシウムイメージング実験では、pH が下がった時に応答する ON 応答と pH が下がった状態から洗浄されて pH が中性に戻る時に応答する OFF 応答の 2 種の応答が同じ味蕾細胞で観測される (Kawaguchi et al., 2010)。このうち OFF 応答を担うのが *Pkd2l1/Pkd1l3* ヘテロマーであることが推定されており、ON 応答を行う酸味受容体は同定されていない。

酸味はシナプスを介して伝達されているのか、また、他の酸味の伝達経路は存在するかは証明されていない。上記の ON 応答・OFF 応答もどちらもシナプス依存的に伝達されるかも未解明である。これらについての証拠を得るために、typeⅢ味蕾細胞の前シナプスとしての性質に着目して研究を行った。

前シナプスに局在する分子であるコンプレキシンはシナプス小胞の膜融合を制御し、細胞内カルシウム濃度依存的なシナプスの開口を正常に行う働きを持つ分子である (図 3-1-1)。今回、コンプレキシンの分子種の 1 つであるコンプレキシン II (*Cplx2*) が typeⅢ味蕾細胞に特異的に発現することを見出した。*Cplx2* のノックアウトマウスは生存可能、繁殖可能であり、通常繁殖条件では目立った表現型はないものの、神経回路の可塑性などに異常が認められることが報告されている (Takahashi et al., 1999; Huang et al., 2000)。中枢で主要なコンプレキシンとして機能してい

るのは *Cplx1* であり、*Cplx1* ノックアウトマウスは重度の運動失調、散発的な痙攣、行動異常を示し、生後 2-4 ヶ月で死亡する。繁殖も不可である。致死ではないのは *Cplx2* が補完しているためと考えられる。*Cplx1/Cplx2* の二重ノックアウトマウスは生後数時間で死亡する(Reim et al., 2001)。この *Cplx2* ノックアウトマウスを用いることにより、酸味の情報伝達へのシナプスの寄与を解析できると考えた。

本研究では、まず既知のシナプス分子のうち typeⅢ味蕾細胞に発現する分子種を同定することを試みた。さらに、酸味情報伝達がシナプス依存的であることを証明するために、*Cplx2* ノックアウトマウスを用いた解析を行った。ノックアウトマウスでは行動試験を行ったところ、酸味を忌避する閾値が上昇し、その感受性が低下していることが分かった。さらに口腔内味溶液刺激に対する鼓索神経・舌咽神経の応答から、低濃度の酸味に対する応答がほぼ消失していることが分かった。したがって、酸味の伝達におけるシナプスを介した神経連絡の重要性が示された。



前シナプスにおけるSNAREコンプレックス、シナプトタグミン、コンプレキシンの関係

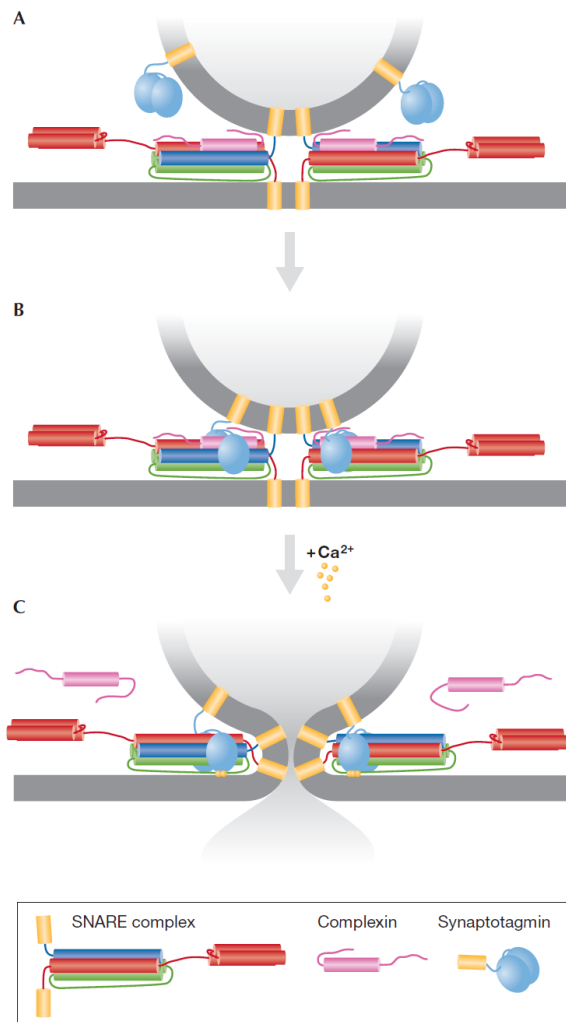


Fig 1 | Structures of proteins required for the fast, Ca^{2+} -stimulated release of neurotransmitters.

(A) The SNARE complex and the C2A and C2B domains of synaptotagmin I are required at sites of synaptic vesicle fusion on the presynaptic plasma membrane.

(B) Complexin bound to the SNARE complex. The transmembrane domains and unstructured regions are modelled in the figure. Amino- and carboxy-terminal ends of each protein are indicated. SNAP-25, synaptosome-associated protein of 25kDa; VAMP, vesicle-associated membrane protein.

Fig 2 | Schematic for the clamp-release model of complexin-synaptotagmin function.

(A) Clamp: SNARE complexes assemble when synaptic vesicles dock at the presynaptic membrane. Complexin clamps SNARE complexes and prevents membrane fusion.

(B) Intermediate state: synaptotagmin recognizes and binds to the complexin-SNARE complex in the absence of Ca^{2+} .

(C) Release: after Ca^{2+} influx (yellow spheres), synaptotagmin binds to both Ca^{2+} and membranes. This conformational change releases complexin, and the shape of the membrane-inserted, Ca^{2+} -synaptotagmin-SNARE complex might buckle the membranes outwards to complete fusion. The clamped state has been proposed to be metastable or 'superprimed', perhaps by hemifusion of the membranes. The molecular details of the interactions between synaptotagmin, complexin and the SNARE complex, and the conformational changes that occur on Ca^{2+} binding have yet to be determined.

3-2 実験材料および方法

3-2-1 前シナプス分子の探索

前シナプスに発現することが報告されている分子を総説 (Carr and Munson, 2007; Jin and Garner., 2008; Kennedy et al., 2011) またはその孫引きにより検索した。報告されている分子または分子ファミリーとして以下を得た。

SNAP (synaptosomal-associated protein)

synaptobrevin (v-SNARE, Vesicle associated membrane protein; Vamp)

syntaxin (t-SNARE)

synaptotagmin

complexin

syntaxin binding protein

synaptotagmin binding protein

synapsin

synaptophysin

presynaptic cytomatrix protein (piccolo, bassoon)

N-ethylmaleimide-sensitive factor

N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein

Rab3 interacting protein (regulating synaptic membrane exocytosis; Rims)

RIMS binding protein

secretogranin

Ca²⁺-dependent secretion activator

vesicle transport through interaction with t-SNAREs

さらに、gene ontology term の “cellular component” に関するものの中で “synapse”, “presynapse” を含むものを検索した。

第 1 章で抽出した typeIII 味蕾細胞に特異的に発現する候補遺伝子 104 遺伝子の中から、上記の遺伝子に当てはまるものを抽出した。

3-2-2 cDNA 断片のクローニング、in situ hybridization (ISH)

第 1 章と同様に行った。使用した遺伝子の accession 番号とプローブ領域を表 3-2-1 に示す。

3-2-3 コンプレキシシ II ノックアウトマウス

コンプレキシシ II ノックアウトマウスは、作製者である高知医科大学 梶秀人教授の同意を得て、熊本大学 生命資源研究・支援センター(CARD)から購入し、自家繁殖して使用した。図 3-2-1 にコンプレキシシ II ノックアウトマウス作製時に使用されたターゲティングベクターの構造図を示す。このマウスは生存・繁殖可能で、ノックアウト個体はメンデル則にそった数が得られる。通常飼育条件下では目立った表現型は見られない。神経回路の可塑性などに異常が認められることが報告されている(Takahashi et al., 1999; Huang et al., 2000; Reim et al; 2001; Gibson et al., 2005; Radyushkin et al., 2010;)。

系統の維持・生産はヘテロどうしを掛け合わせて行った。遺伝子型は抽出した全ゲノム DNA に対する PCR により調べた。野生型(+/+)に比べてホモノックアウト(-/-)では体重が少ない傾向が見られたが、有意差はなかった(データは示さない)。

3-2-4 brief access test 法による嗜好性試験

Brief access test は実験動物に味溶液を短時間のみ提示し、飲み口を舐める回数をカウントすることで、post-ingestive effect を除いた味の認知のみを測定することができる試験である。Cplx2 ノックアウト(-/-)(8 週齢、n=6)およびそれらの野生型の同腹仔(+/+)(8 週齢、n=6)を用いた。甘味、旨味、酸味、苦味、塩味の 5 味質について水と比較したテストを行った。

使用するマウスは 1 匹ずつ個別に飼育した。甘味・旨味(閾値以上になると好んで摂取する味)の試験については、体重の 10 %の重量の固形飼料(ラボ MR ブリーダー、埼玉実験動物供給所)、体重の 20 %の重量の水を与える制限摂食・制限飲水の条件下で行った(Glendinning et al. 2002)。苦味・塩味・酸味(閾値以上になると忌避する味)の試験については、自由摂食下で 23 時間絶水させた後にテストを行った。食餌・飲水の制限による健康状態への影響を可能な限り排除するため、各個体が開始時の体重の 80 %以上を維持していることを確認して測定を行った。

リッキング回数の測定はリックメーターと専用ケージ(ニューロサイエンス株式会社)を用いて行った(図 3-2-2)。各味溶液を提示して、マウスが飲み口を舐め始めてから 5 秒間のリッキング回数の測定を行った。その 5 秒間に飲み口の前にマウスが留まった場合の結果のみを採用した。同一の味質は同一日に低濃度から高濃度へと順に測定した。絶水時の脱イオン水の 5 秒間のリッキング回数(=最高速度でのリッキング数と仮定)に対する味物質溶液のリッキング回数の割合を、リッキング比(licking ratio)と定義した。

(リッキング比) = (味溶液のリッキング回数) / (絶水時の脱イオン水のリッキング回数の平均)

実験の日程、テスト内容、摂食・飲水条件の一覧、測定機器、測定の様子を図 3-2-2 に示す。
味溶液は基本的に味物質を脱イオン水に溶解して調製した後、オートクレーブ滅菌したものを使用した。使用した味質と濃度は以下の通りである。

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| スクロース(関東化学) | 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 (mM) |
| サッカリンナトリウム(和光純薬) | 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 (mM) |
| グルタミン酸ナトリウム(シグマ) | 1, 3, 10, 30, 100, 300 (mM) |
| イノシンーリン酸(ナカライテスク) 0.5 mM(一定)を加えた | |
| 安息香酸デナトニウム(シグマ) | 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 (mM) |
| 塩化ナトリウム(関東化学) | 10, 30, 100, 150, 300, 500, 1000 (mM) |
| クエン酸 (関東化学) | 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 (mM) |
| D/L-酒石酸(関東化学) | 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 (mM) |
| 塩酸(関東化学) | 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 (mM) |

以下は滅菌せずに、オートクレーブ滅菌した脱イオン水で希釈して使用した。

炭酸水(アサヒ飲料) pH 4.4-4.5

酸の溶液については、濃度ごとの pH を表 3-2-2 に示す(以降の二瓶選択法・神経応答においても共通)。

3-2-5 二瓶選択法による嗜好性試験

2 瓶選択法は実験動物に 2 種の溶液を同時に提示し摂取量を比較することにより、味溶液の嗜好・忌避を行動学的に測定する方法である。brief access test よりも通常飼育に近い条件での嗜好性試験が行える。野生型(+ / +)(n=6, ♀)、ノックアウト(- / -)(n=6, ♀)に対して、クエン酸溶液について水と比較したテストを行った。使用するマウスは 1 匹ずつ個別に飼育し、餌は固形飼料(ラボ MR ブリーダー、埼玉実験動物供給所)を自由摂取させた。クエン酸溶液はクエン酸(関東化学)を脱イオン水に溶解して 0.3 mM, 1 mM, 3 mM に調製した後、オートクレーブ滅菌したものを使用した。

1 つの濃度についての試験は 48 時間で 1 セットとして行った。各マウスに 15 ml の飲水瓶を 2 本提示し、一方にはオートクレーブ滅菌した脱イオン水、もう一方には味溶液を入れて 48 時間自由摂取させた。位置による偏りを除くために 24 時間経過した時点で 2 本の飲水瓶の位置を入れ替えた。48 時間後に脱イオン水および味溶液の飲水量をそれぞれ測定し、味溶液の嗜好性(preference ratio)を全飲水量に対する味溶液の割合として求めた。

$$(\text{preference ratio}) = (\text{tastant solution consumed}) / (\text{total liquid consumed})$$

得られた preference ratio の値に対して、(+/+)と(-/-)の間で Student の t 検定を行った。

本実験に先立ち、飲水瓶 2 本から 48 時間で同量を飲むことを確認するために water training の期間を設けた。両方の瓶に脱イオン水を入れ、上記と同様に 48 時間提示した。(+/+)、(-/-)それぞれにおいて preference ratio の平均値が 0.50 ± 0.02 、標準誤差 0.03 以下となることを確認した後、味溶液を用いた嗜好テストを行った。

方法および試験の様子を図 3-2-3 に示す。

3-2-6 鼓索神経・舌咽神経応答の記録

脳での認知処理を介さない味蕾・神経のみで味覚応答が変化しているかを調べるために、口腔内への味溶液刺激に対する鼓索神経、舌咽神経の全神経応答を記録した。Cplx2 ノックアウトマウス(♀ 12 週齢)およびそれらの同腹仔を用いた(各 n=3)。ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール)(50 mg/kg)およびウレタン(500 mg/kg)の腹腔注射により麻酔し、気道にカニューレを挿入して頭部を固定した状態で、マウスの頸部を切開し鼓索神経または舌咽神経を露出させた。神経節の末梢側で神経を切断して白金電極に置いた。不関電極は切開部位の近くに接続した。全神経応答は増幅器 DAM50 (World Precision Instruments) を用いて増幅し、オシロスコープ上でモニターした。得られたシグナルは積分器を介して直前 1 秒間の積分値を算出し、電気生理学実験解析ソフトウェア Clampex 9.1 (Molecular Device)を用いて記録、解析した。

味溶液刺激は 30 秒間行い、続いて 30 秒以上脱イオン水で洗浄した。各味溶液刺激は 3 回ずつ行い、異なる味溶液の間には 100 mM 塩化アンモニウム水溶液による刺激を挟んだ。味溶液刺激 3 回の応答値の平均を算出した後、100 mM 塩化アンモニウム水溶液の応答値をコントロールとして標準化し、相対応答強度を算出した。実験の Time course と応答強度の算出法を図 3-2-4 に示す。味溶液刺の作成方法、pH は brief access test と同様である。

得られた Cplx2 ノックアウトマウスと野生型マウスの相対応答強度について Student's t-test により統計解析を行った。

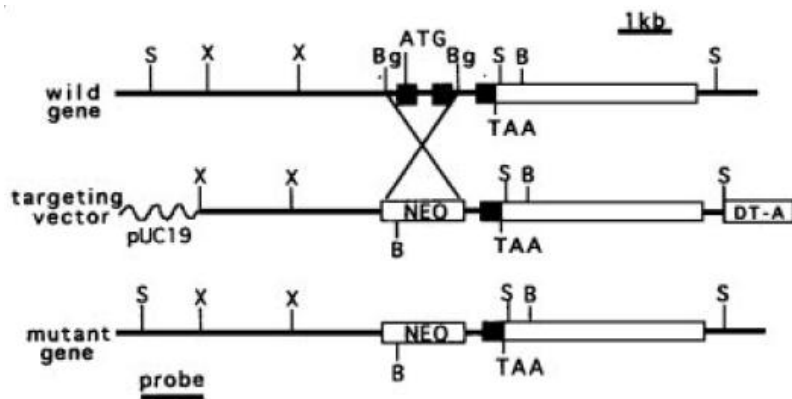
表3-2-1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列とプローブ領域

| gene name | accession No. | primer sequence | probe region | probe length (bp) |
|-----------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| Stxbp1 | NM_001113569 | s 5'- caaagatccacgcacattctcaccacag -3' as 5'- gactcaaatgctgcagtacaggacggtag -3' | 1971-3630 | 1660 |
| Syt7 | NM_018801.3 | s 5'- ctgaaggtgtctaccagagcaagtgtc -3' as 5'- cagggtgagcctgaagctacttacctgac -3' | 4622-6312 | 1691 |
| Cplx2 | NM_009946.2 | s 5'- gtcccactggccccagtttgcttctgcag -3' as 5'- gcatcatacaaaagtgaggagcacggccatg -3' | 2811-4865 | 2055 |
| Rims2 | NM_053271.1 | s 5'- cactgcatgcttgatgtgtgtctacagag -3' as 5'- cagcggctactgcagtgtctttccatgac -3' | 4701-7078 | 2378 |
| Pclo | NM_011995.4 | s 5'- gaagatgtgtcagctcaggcgagggaag -3' as 5'- gtttgggaatgggttataaacatgtac -3' | 15510-17374 | 1865 |
| Cadps | NM_012061.3 | s 5'- gtggtgtgtcagacttaattgtggagcatg -3' as 5'- ccacagaaagaaacagctctatagcagac -3' | 3100-5375 | 2276 |
| Scg5 | NM_009162.3 | s 5'- gacgcaggagctatccagcacgtcagctc -3' as 5'- gtagcagaaagcacaggcattggtatggag -3' | 21-879 | 859 |
| Nsg2 | M_008741.3 | s 5'- ctctacatattggcttgactctgctctgac -3' as 5'- ctatgcagaccaaatgggcaattcccctg -3' | 91-1913 | 1823 |
| | | | | |
| Cplx1 | NM_007756.3 | s 5'- ctgctgttgatcgtccacctggaag -3' as 5'- cactgtttattggctgtgattccctcag -3' | 114-2178 | 2065 |
| Cplx3 | NM_146223.3 | s 5'- gacttagtgctgaagtaggcgtgacgaac -3' as 5'- gttgctgcacatctgtaactctagcacttg -3' | 77-2810 | 2734 |
| Cplx4 | NM_145493.1 | s 5'- cttcgtcccaaatgtgtggctgtggttg -3' as 5'- gacccaatatacacatcgtccctgccccag -3' | 9-1593 | 1495 |
| | | | | |
| SNAP-25 | NM_011428.3 | s 5'- catctttgatgaggcagagctcacgttg -3' as 5'- cacttcacaaccaacagaggagacaggag -3' | 4-2062 | 2059 |
| VAMP2 | NM_009497.3 | s 5'- cactgcctctgccaagtccactgcccgtc -3' as 5'- ctctgggctcaacagccctggagaaggac -3' | 61-1801 | 1741 |
| Syt1 | NM_009306.2 | s 5'- gactaccccagcagaacattccgcttgaac -3' as 5'- gtagatgtgaagatggtcctctcccgtcag -3' | 194-3361 | 3168 |
| Stxa1 | NM_016801.3 | s 5'- gagcatgaaggaccgaaccagagagctc -3' as 5'- ctcacaaaatgggcagctggtgtaccaag -3' | 6-2040 | 2035 |
| Ncam1 | NM_010875.3 | s 5'- cttgaacatgcatgtgtgcagctctcatg -3' as 5'- caaaggtgtaaaacttcataaagtcttgctg -3' | 2525-4859 | 2335 |
| Gad1 | NM_008077.4 | s 5'- gaccagggatcgtgcaagcaaggaagcag -3' as 5'- cttgtgggactggtcagtgatcggaggtc -3' | 29-3150 | 3122 |
| Ddc(AADC) | NM_001190448 | s 5'- caacatggattcccgtgaattccggaggag -3' as 5'- ctctgaaggtgaagaccaaagactgccctg -3' | 138-1948 | 1811 |
| Mash1 | NM_008553.4 | s 5'- gacagtttgcccgcatggagagctc -3' as 5'- catcattaatacattaaccacgtttctg -3' | 557-2234 | 1678 |

表3-2-2 酸味溶液のpH

| | 0.1 | 0.3 | 1 | 3 | 10 | 30 | 100 | 濃度 (mM) |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------|
| クエン酸 | 3.7 | 3.3 | 3.0 | 2.8 | 2.6 | 2.4 | 2.1 | |
| 酒石酸 | 3.8 | 3.4 | 3.1 | 2.8 | 2.5 | 2.3 | 1.9 | |
| 酢酸 | 4.0 | 3.9 | 3.5 | 3.3 | 3.1 | 2.8 | 2.6 | |
| 塩酸 | 3.8 | 3.3 | 2.9 | 2.5 | 2.1 | 1.6 | 1.1 | |

| | 1/30 | 1/10 | 1/3 | 原液 |
|-----------------|------|------|-----|-----|
| CO ₂ | 4.8 | 4.5 | 4.1 | 4.1 |



Structures of the wild-type complexin II gene, the targeting vector pXXNeoDT-A (NEO, neo cassette; DT-A, DT-A cassette), and the mutant gene after homologous recombination were demonstrated. Letters indicate restriction enzyme sites (B, Bam I; Bg, Bgl II; S, Sal I; X, Xba I). Filled boxes represent coding sequences and open boxes noncoding sequences. ATG and TAA indicate the positions of initiation and stop codons, respectively. The probe indicated below the mutant gene was used for ES cell screening by Southern blot.

図3-2-1 complexin II欠損マウスのコンストラクト

コンプレキシシ II (Cplx2) ノックアウトマウスは、作製者の高知医科大学 梶秀人教授より許可を得て熊本大学生命資源研究センター (CARD) より購入した。

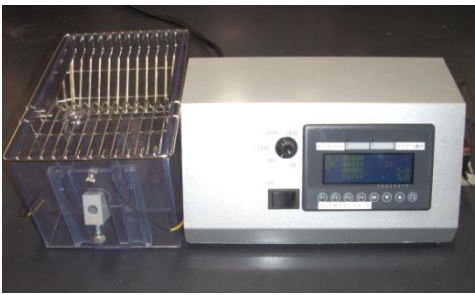
complexin II欠損マウスのコンストラクトを示す。相同組換えによりCplx2遺伝子を破壊している。

図および図の説明は、Takahashi et al.(1999) より引用、改変

A

| 日数 | テスト内容 | 直前23時間の水・食餌 |
|----|-----------------|-------------|
| 0 | rest | |
| 1 | トレーニング | 23時間絶水、自由摂食 |
| 2 | トレーニング, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 3 | NaCl テスト, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 4 | クエン酸テスト, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 5 | デナトニウムテスト | 23時間絶水、自由摂食 |
| 6 | rest | 自由飲水、自由摂食 |
| 7 | トレーニング, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 8 | 酒石酸テスト, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 9 | 塩酸テスト, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 10 | 酢酸テスト, 30分給水 | 23時間絶水、自由摂食 |
| 11 | 炭酸水テスト | 23時間絶水、自由摂食 |
| 12 | rest | 自由飲水、自由摂食 |
| 13 | トレーニング | 制限飲水、制限摂食 |
| 14 | スクロース テスト | 制限飲水、制限摂食 |
| 15 | MSG+IMP テスト | 制限飲水、制限摂食 |
| 16 | サッカリン テスト | 制限飲水、制限摂食 |
| 17 | rest | 自由飲水、自由摂食 |

B



C

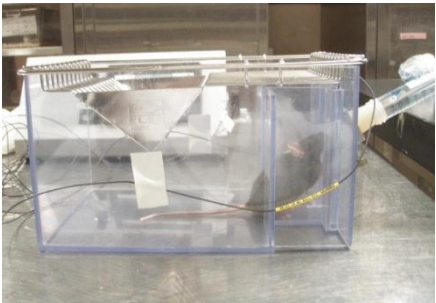
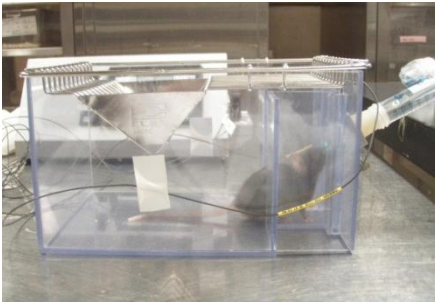
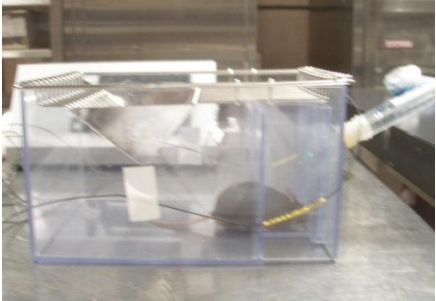


図3-2-2 brief access testによる嗜好性テストの方法

A: brief access testの日程を示す。

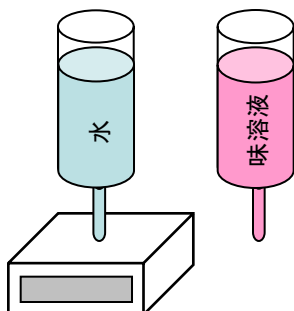
忌避する味については絶水条件で、嗜好する味については制限飲水。制限摂食条件で行った。制限飲水・制限飲水条件では、体重の20%の水と体重の10%のエサを与えた。

B: brief access testに利用したリックメーターと専用ケージ。

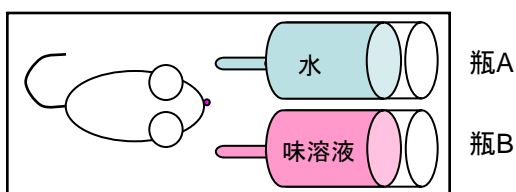
C: brief access testの様子の写真を示す。ケージ右端にある飲み口をマウスが舐めている。マウスが飲み口を舐めることで青色レーザー光が遮断される回数をカウントする。

A

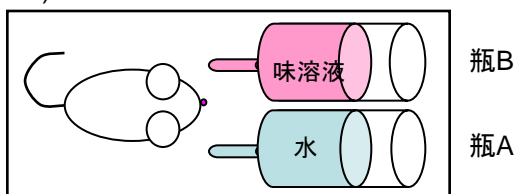
i) 0 hour
重量測定



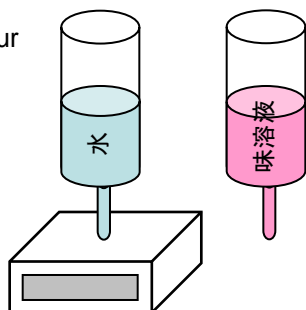
ii) 0-24 hours



iii) 24-48 hours



iv) 48 hour
再測定



B

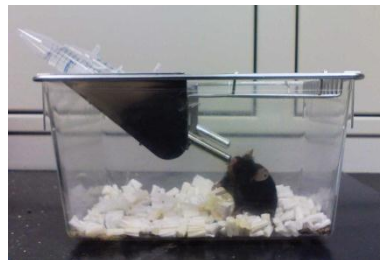


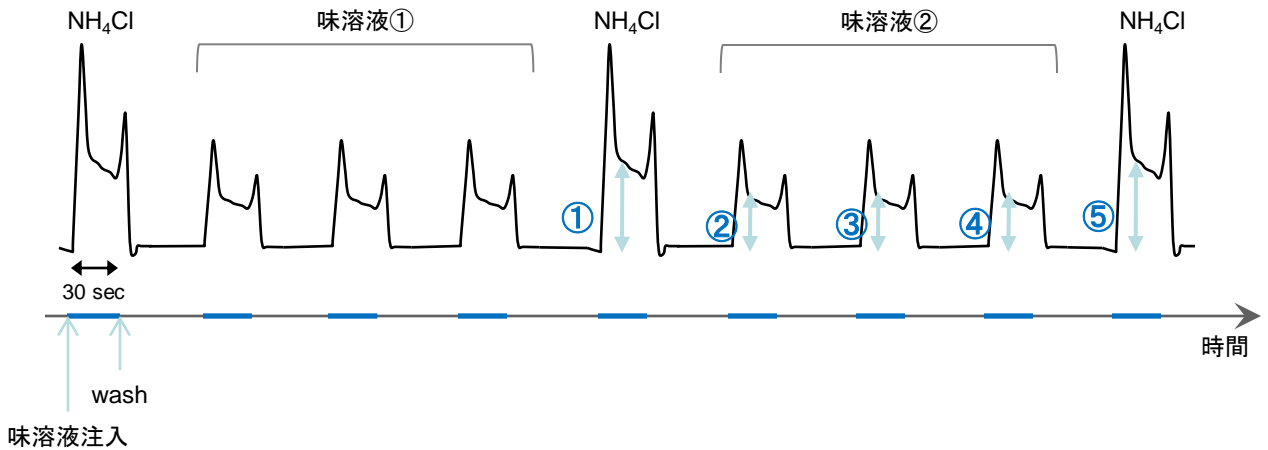
図3-2-3 2瓶選択法による嗜好性テストの方法

A 2瓶選択法の手順を示す。

水と味溶液をマウスに48時間提示し、自由摂取させる。開始から24時間経過後に2本の位置を入れ替え、48時間経過後に水と味溶液の重量を測定する。開始前の重量と比較し、それぞれの飲水量を記録する。

B 2瓶選択テストの様子を写真を示す。

A



$$\text{相対応答強度} = (\text{②} \cdot \text{③} \cdot \text{④の平均値}) / (\text{①} \cdot \text{⑤の平均値})$$

B

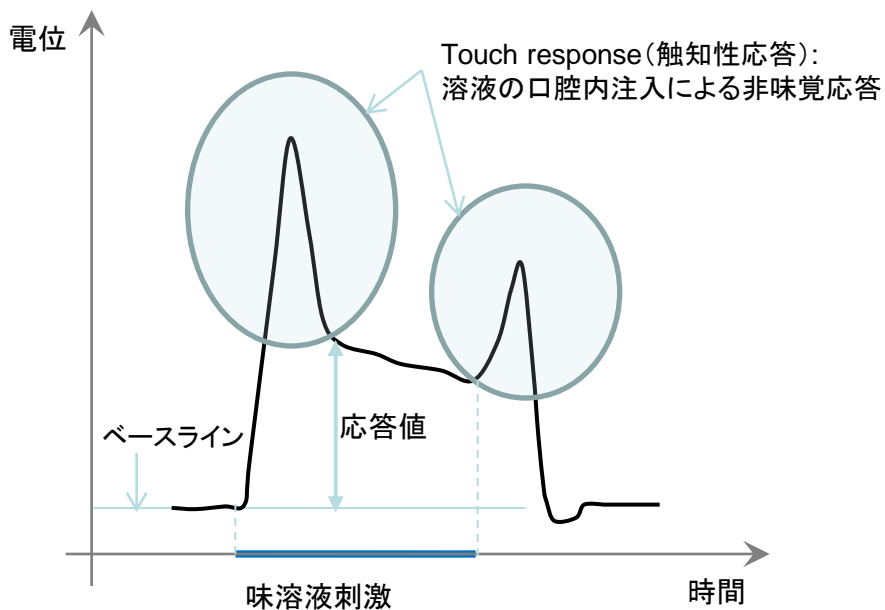


図 3-2-4 神経応答記録の方法

(A) 味溶液刺激のタイムラインの模式図

コントロールの0.1mM NH₄Cl溶液または味溶液による口腔内刺激は30秒間行い、続いて30秒以上洗浄した。味溶液の刺激は3回ずつ行い、異なる味溶液刺激の間にはNH₄Cl溶液を挟んだ。3回の応答値の平均値を前後のNH₄Cl溶液の応答値の平均値で割ったものを相対応答強度として算出した。

(B) 応答値の計算

触知性の非味覚応答を除いた味覚応答を測定するため、味溶液刺激から約10秒後のプラトーに達した時点での値を応答値として記録した。

3-3 結果

3-3-1 TypeⅢ味蕾細胞に発現する遺伝子候補の抽出

第1章で抽出した typeⅢ味蕾細胞に特異的に発現する候補遺伝子 124 プローブセットに対して 前シナプスに発現することが既知の遺伝子名の検索および“cellular component”に関する gene ontology term の検索を行い typeⅢに発現する前シナプス分子の候補を抽出した。この中には既に typeⅢ味蕾細胞での発現が報告されている SNAP25、シナプトタグミン1 (Syt1)などが含まれていた。これらを除いた 8 遺伝子について以降の解析を行った(表 3-3-1, 表 3-3-2)。

3-3-2 マイクロアレイデータから抽出した遺伝子のマウス有郭乳頭における発現解析

3-3-1 において、新たに味蕾で発現している前シナプス分子の候補として挙げられた遺伝子について、野生型マウスの有郭乳頭を用いて ISH を行い、味蕾での発現を確認した。リストから抽出した遺伝子のうち、*Stxbp1*, *Syt7*, *Rims2*, *Cadps*, *Cplx2*, *Scg5*, *Pclo* が味蕾に特異的に発現していた(図 3-3-1)。Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭を用いた ISH ではこれらのシグナルが増加していることから、これらは typeⅢ味蕾細胞に発現していることが示唆された。特に強く発現しており、シナプスの機能への寄与が知られている *Cplx2*について解析を行うことにした。

3-3-3 味蕾におけるコンプレキシソファミリーの発現

味蕾に *Cplx2*以外の分子種のコンプレキシソが発現しないことを調べた(図 3-3-2 A)。コンプレキシソ I ~Ⅳについて、有郭乳頭での ISH を行ったところコンプレキシソⅡ以外の分子の発現は味蕾では見られなかった。*Cplx2*が typeⅢ味蕾細胞に発現することを確認するために、味蕾細胞種マーカーとの二重 ISH を行った。*Cplx2*のシグナルは typeⅠ味蕾細胞マーカーの *Entpd2*および typeⅡ味蕾細胞マーカーの *Trpm5*のシグナルとは重ならなかったが、typeⅢ味蕾細胞マーカーの *Pkd1l3*のシグナルとはよく一致した(図 3-3-2 B)。さらに Skn-1 ノックアウトマウスを用いて同様の発現解析を行った。単一 ISH では *Cplx2*の味蕾でのシグナルは野生型に比べて増加しており、二重 ISH では増加した分も *Pkd1l3*のシグナルと重なることを示した。Skn-1 ノックアウトマウスの有郭乳頭でも *Cplx1*, 3, 4 の発現は見られなかった。以上より、有郭乳頭味蕾に発現するコンプレキシソは *Cplx2*のみであり、*Cplx2*は typeⅢ味蕾細胞に特異的に発現することを明らかにした。

3-3-4 *Cplx2* ノックアウトマウスの味蕾におけるコンプレキシソ、味蕾細胞種マーカー、主要な前シナプス分子の発現

前節までの結果を踏まえ、*Cplx2* の味覚情報の受容・伝達における役割を解明するために *Cplx2* ノックアウトマウスを用いた解析を行うことにした。*Cplx2* ノックアウトマウスについての行動試験、神経応答を行うに先立ち、味蕾において、*Cplx2* 以外の遺伝子の発現に変化がないことを確認するために、ISH を行った。

Cplx2 のシグナルは *Cplx2* ノックアウトマウスの有郭乳頭、茸状乳頭、軟口蓋の全てで見られなかった(図 3-3-3)。*Cplx2* ノックアウトマウスの味蕾において *Cplx2* が発現していないことを確認できた。他のコンプレキシン分子種である *Cplx1*, *Cplx3*, *Cplx4* も野生型と同様に味蕾での発現は見られなかった(図 3-3-3)。すなわち、味蕾において *Cplx2* の欠損を他の分子種が補完している可能性は低い。

また、味蕾に細胞種特異的に発現することが既知の遺伝子である *Entpd2* (type I 味蕾細胞マーカー)、*Kcnq1* (味蕾全体に発現するカリウムチャネル)、*T1R2* (甘味受容体)、*T1R3* (甘味・旨味受容体)、*T2R5* (苦味受容体)、*Ggust* (苦味伝達分子)、*Trpm5* (甘味・旨味・苦味伝達分子)、*Pkd2l1*・*Pkd1l3* (酸味受容体)、*Gad1*・*Ddc* (酸味細胞に発現する神経伝達物質の産生酵素)、*Mash1* (酸味受容細胞の分化に関与する転写因子)の発現にも *Cplx2* ノックアウトマウスと野生型マウスの間で差は見られなかった(図 3-3-4)。

同様に、味蕾に発現することが知られている前シナプス分子のうち主要なものとして、*Vamp2*, *SNAP-25*, *Stx1a*, *Syt1* の発現を ISH で確認したが、これらについても *Cplx2* ノックアウトマウスと野生型マウスの間で大きな差は見られなかった(図 3-3-5)。

3-3-5 行動試験による *Cplx2* ノックアウトマウスの嗜好性変化の評価

Cplx2 ノックアウトマウスの味の受容・認識機構に変化があるかどうかを調べるために、行動学的解析を行った。

brief access test はマウスに味溶液を短時間提示し、溶液を舐める回数を数えることで、その味溶液の嗜好・忌避の度合を判定する実験方法である。まず 5 基本味の溶液として、スクロース(甘味)、サッカリン(甘味、人工甘味料)、L-グルタミン酸ナトリウム(monosodium glutamate; MSG)とイノシンーリン酸(inosine monophosphate; IMP)の混合物(旨味)、NaCl(塩味)、安息香酸デナトニウム(苦味)、クエン酸(酸味)を用いて試験を行った。さらに酸味物質として、酒石酸、塩酸、酢酸(酸味)を、type III 味蕾細胞で炭酸が受容されるという知見を踏まえ(Chandrashekar et al., 2009)、炭酸水に対する試験を行った。

酸味を呈する溶液では野生型マウスに比べ、*Cplx2* ノックアウトマウスは酸味を嫌わない傾向を示した(図 3-3-6)。クエン酸では 3, 10, 30, 100 mM で有意な差が見られた(Student's t-test, $p <$

0.01)。酒石酸では 10, 30, 100 mM で有意な差が見られた(Student's t-test, $p < 0.01$)。塩酸は Cplx2 ノックアウトマウスの方が忌避しない傾向を示したものの、有意な差は見られなかった。酢酸溶液に対しては、二群とも匂いを嗅ぐ行動のみで、測定可能な licking 行動が見られなかったため、結果は示さない。

一方、甘味・旨味・苦味・塩味の溶液ではどの味質・濃度においても野生型マウスと Cplx2 ノックアウトマウスの間で有意差は見られなかった。炭酸水については有意な差は見られなかった。(図 3-3-7, 図 3-3-8)

Cplx2 ノックアウトマウスが酸味を忌避しないことを他の方法でも確認するために、二瓶選択試験を行った。二瓶選択試験は、マウスに味溶液と水を 48 時間提示し、それぞれの瓶の飲水量を比較することにより、水に対する味溶液の嗜好・忌避の度合を判定する行動試験である。食餌制限を設けず、通常飼育に近い条件で長時間かけて行うため、味の認識に加えて、記憶・学習や消化後の情報なども統合された結果としての行動を測定することになる。

マウスの認知閾値付近のクエン酸溶液 (0.3 mM, 1 mM, 3 mM) を用いて試験を行ったが、どの濃度においても、有意差は見られなかった(図 3-3-9)。

以上の 2 種の行動試験から、行動のレベルで Cplx2 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて酸味を忌避せず、酸味の受容・伝達に Cplx2 が関与している可能性を示した。

3-3-6 神経応答

Cplx2 ノックアウトマウスが酸味を忌避しないのは、味蕾、神経、中枢のどのレベルでの異常によるものかを調べるために、味蕾と神経のみを介した味刺激応答を測定する、神経応答の記録を行った。舌前半部の茸状乳頭などに投射している鼓索神経、または舌の後半部の有郭乳頭などに投射している舌咽神経に白金電極をつなぎ、口腔内に 5 基本味の味溶液刺激を与えた時の電位変化を記録した。

鼓索神経・舌咽神経とも、甘味・旨味・苦味・塩味の溶液ではどの味質においても野生型マウスと Cplx2 ノックアウトマウスの間で有意差は見られなかった。酸味の溶液で刺激を行った場合には、30 mM のクエン酸・酒石酸・酢酸・塩酸のどれも応答が著しく小さくなった。炭酸水に対する応答も低下した(図 3-3-10, 3-3-11)。

酸味に対する応答の濃度依存性を調べると、クエン酸・酒石酸・酢酸・塩酸とも 1~30 mM の範囲では Cplx2 ノックアウトマウスの神経応答はほぼ消失していた。塩酸やクエン酸は 100 mM では有意な応答が見られたが、野生型の応答に比べ、著しく小さいものであった(図 3-3-12)。

表3-3-1 TypeⅢ味蕾細胞に発現する前シナプス分子の候補

| Gene Symbol | Gene Title | Probe_ID | KO-Cvp Average | WT-Cvp Average | WT-Np Average | WT-Cvp / WT-Np | KO-Cvp / WT-Cvp |
|-------------|-------------------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|
| Cadps | Ca ²⁺ -dependent secretion activator | 1448955_s_at | 629.2 | 264.9 | 13.3 | 20.0 | 2.37 |
| Cplx2 | complexin 2 | 1436383_at | 327.8 | 113.9 | 25.7 | 4.4 | 2.88 |
| Cplx2 | complexin 2 | 1421477_at | 781.8 | 176.6 | 47.6 | 3.7 | 4.43 |
| Nsg2 | neuron specific gene family member 2 | 1416107_at | 426.1 | 191.8 | 21.3 | 9.0 | 2.22 |
| Pclo | piccolo (presynaptic cytomatrix protein) | 1419392_at | 767.3 | 329.6 | 35.6 | 9.3 | 2.33 |
| Rims2 | regulating synaptic membrane exocytosis 2 | 1436470_at | 165.1 | 82.5 | 8.6 | 9.6 | 2.00 |
| Scg5 | secretogranin V | 1423150_at | 591.5 | 279.9 | 14.1 | 19.8 | 2.11 |
| Stxbp1 | syntaxin binding protein 1 | 1420505_a_at | 484.8 | 229.3 | 42.9 | 5.3 | 2.11 |
| Syt7 | synaptotagmin VII | 1460081_at | 440.9 | 129.1 | 23.5 | 5.5 | 3.42 |

表3-3-2 味蕾細胞に発現することが既知の前シナプス分子

| Gene Symbol | Gene Title | Probe_ID | KO-Cvp Average | WT-Cvp Average | WT-Np Average | WT-Cvp / WT-Np | KO-Cvp / WT-Cvp |
|-------------|---------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------|
| Snap25 | synaptosomal-associated protein 25 | 1416828_at | 2256.0 | 653.0 | 12.9 | 50.6 | 3.45 |
| Syt1 | synaptotagmin I | 1433884_at | 682.2 | 249.3 | 41.0 | 6.1 | 2.74 |
| Stx1a | syntaxin 1A (brain) | 1437390_x_at | 344.0 | 212.8 | 130.7 | 1.6 | 1.62 |
| Vamp2 | vesicle-associated membrane protein 2 | 1420834_at | 617.9 | 526.0 | 717.1 | 0.7 | 1.17 |
| Syp | synaptophysin | 1448280_at | 158.0 | 95.5 | 37.5 | 2.5 | 1.66 |
| Chgb | chromogranin B | 1415885_at | 783.6 | 230.1 | 20.3 | 11.3 | 3.40 |

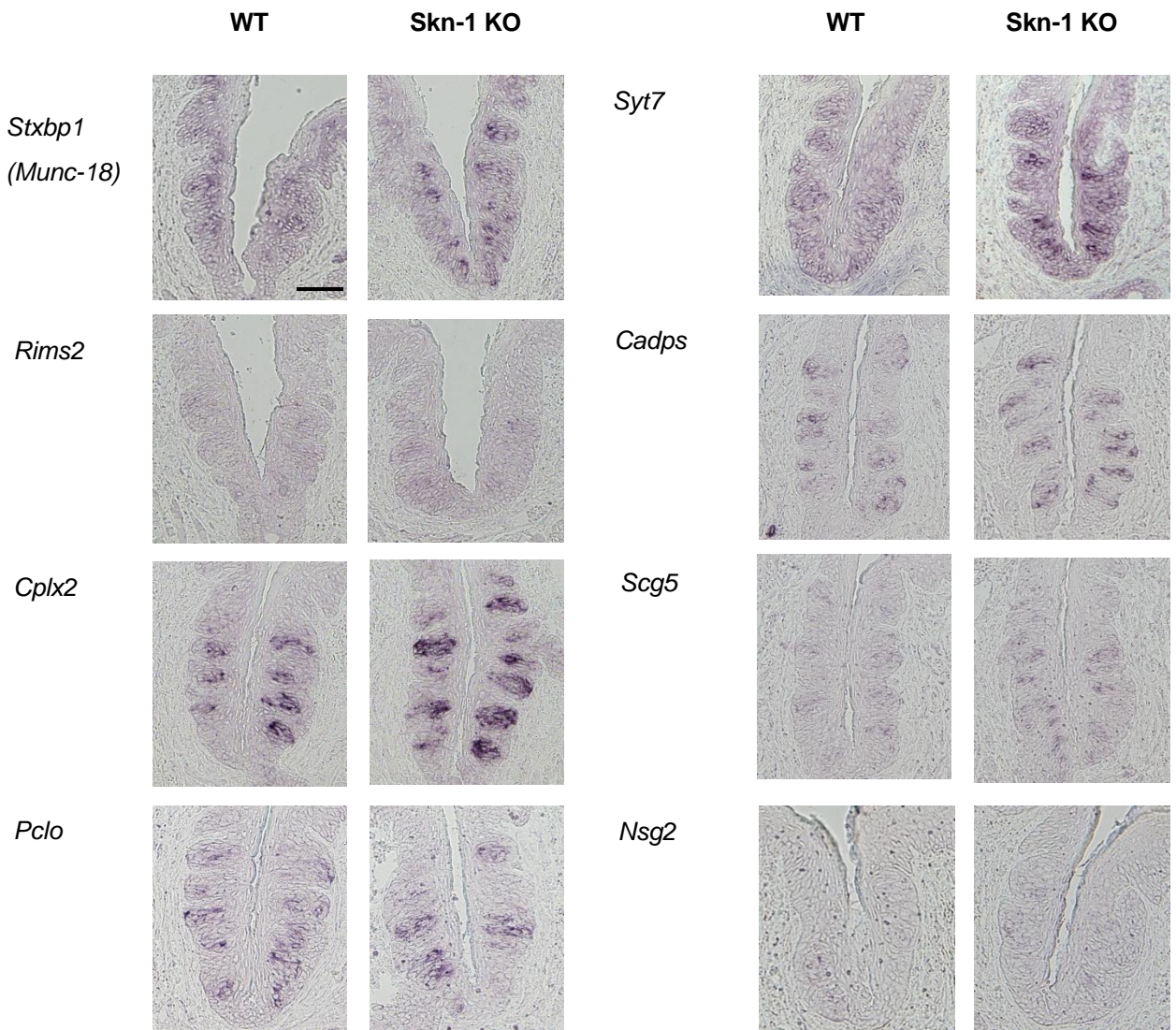


図3-3-1 今回新たに味蕾に特異的に発現することを見出した前シナプス因子のISH

DNAマイクロアレイ結果からtypeⅢ味蕾細胞特異的に発現する遺伝子の候補として抽出されたもののうち、前シナプス分子を検索して得られた8遺伝子の野生型およびSkn-1ノックアウトマウス有郭乳頭におけるISH。*Stxbp1*, *Syt7*, *Cadps2*, *Cplx2*, *Scg5*, *Pclo*の6遺伝子が味蕾の一部の細胞に特異的な発現が見られた。これらの発現細胞数はSkn-1ノックアウトマウスで増加していた。

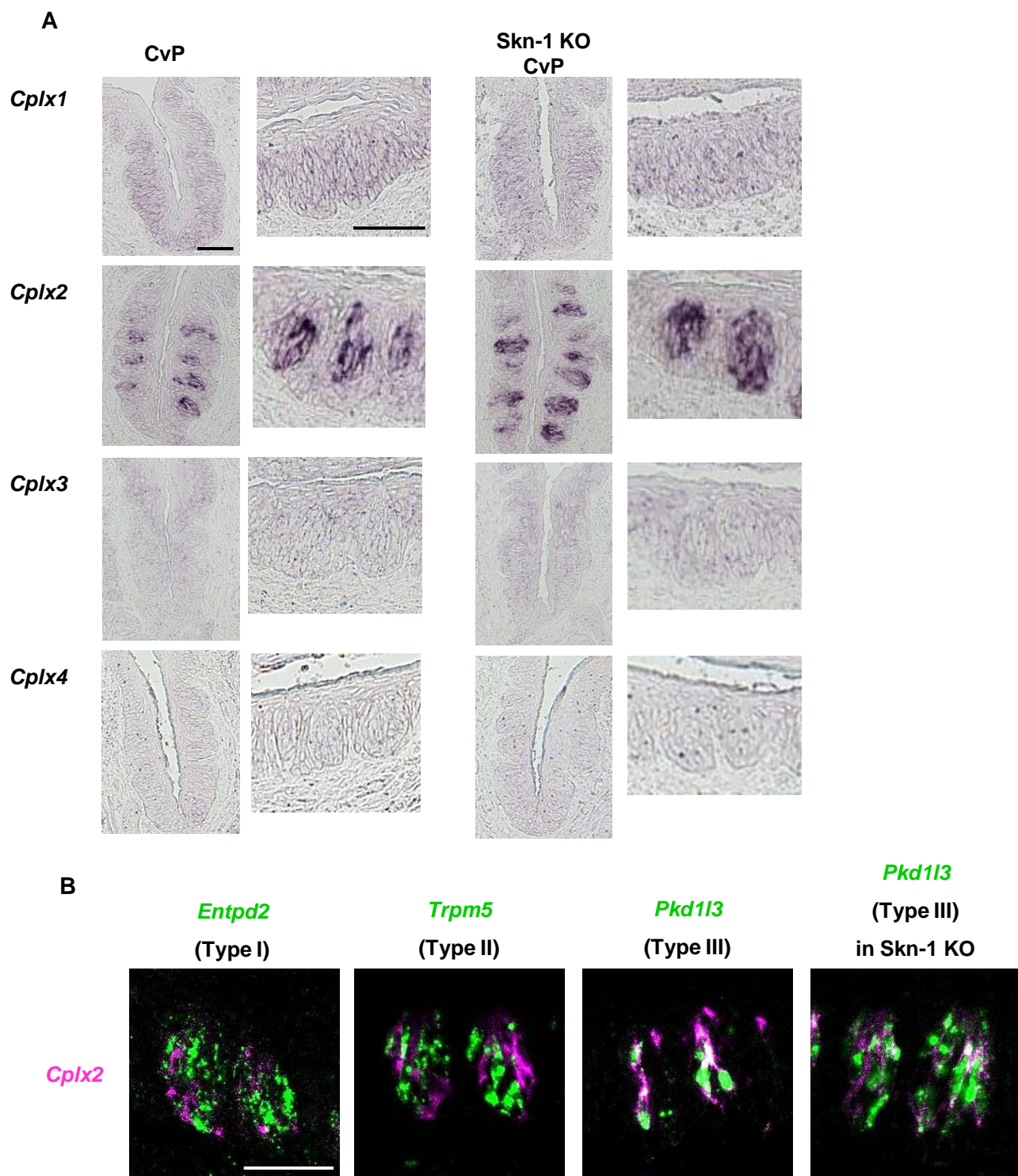


図3-3-2 マウス有郭乳頭味蕾におけるコンプレキシンの発現

A コンプレキシシンファミリーの4遺伝子の味蕾におけるISH

味蕾で発現している分子種は*Cplx2*のみで、*Cplx1*, 3, 4は有郭乳頭での発現が見られない。*Cplx2*はSkn-1ノックアウトマウスの有郭乳頭では発現が増加している。

B *Cplx2*と味蕾細胞種マーカーの二重ISH

Cplx2(マゼンタ)は*Entpd2*, *Trpm5*のシグナルとは重ならず、*Pkd1l3*のシグナルと重なることから、typeⅢ味蕾細胞に発現していると言える。

スケールバーは25 μmを示す。

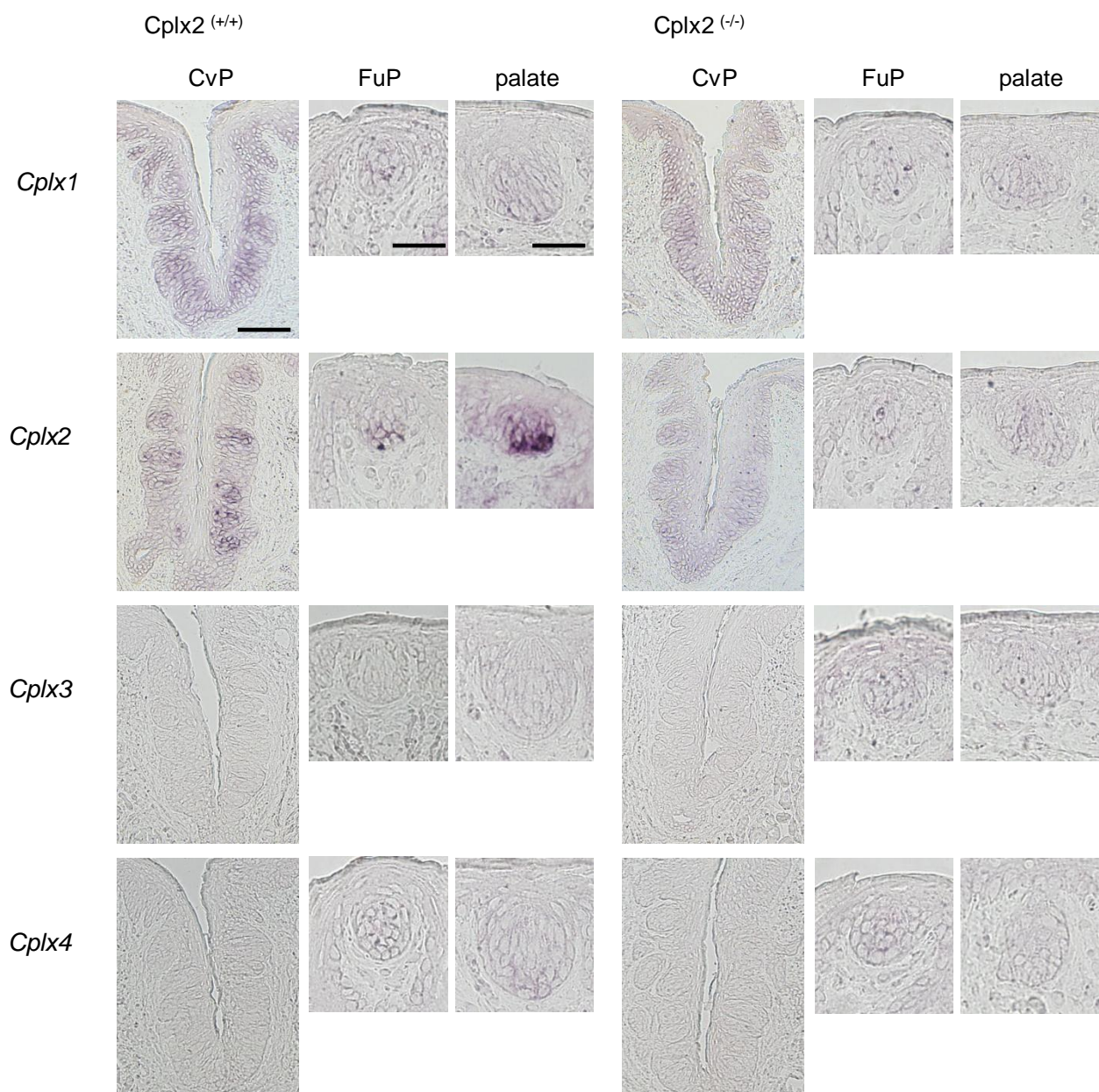


図 3-3-3

野生型マウスおよびCplx2ノックアウトマウスの味蕾におけるコンプレキシンファミリーのISH

野生型では*Cplx2*のみ有郭乳頭・茸状乳頭・軟口蓋の味蕾に発現する。Cplx2ノックアウトマウスでは*Cplx2*が発現していないことが確認できた。その他の分子種のコンプレキシンも発現していない。

スケールバーは25 μ m(有郭乳頭)、10 μ m(茸状乳頭、軟口蓋)を示す。

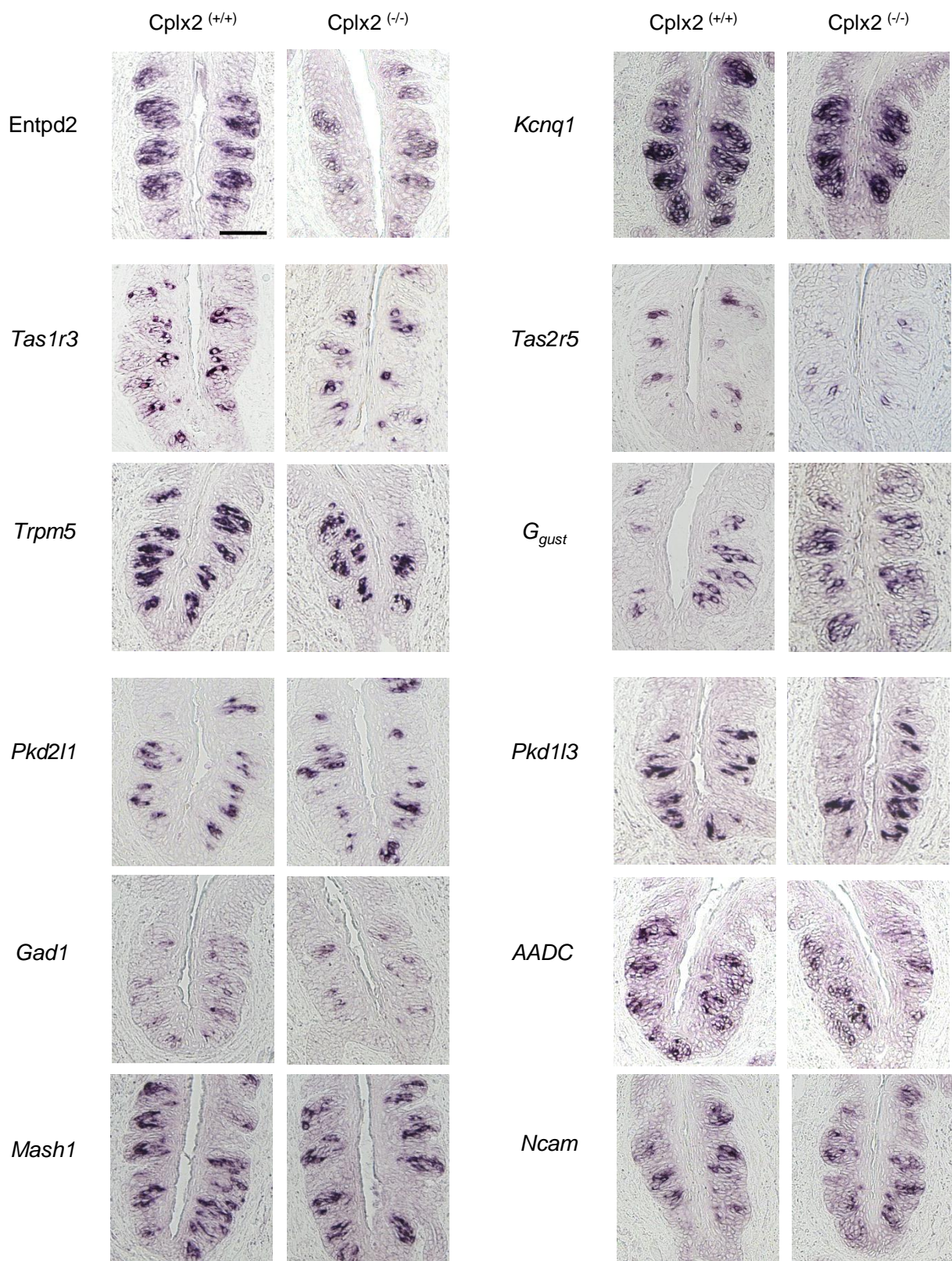


図 3-3-4 コンプレキシン II 欠損マウスの有郭乳頭における各種味蕾マーカー分子のISH
 野生型とCplx2ノックアウトマウスの間で、発現に差は見られない。
 スケールバーは25 μ mを表す。

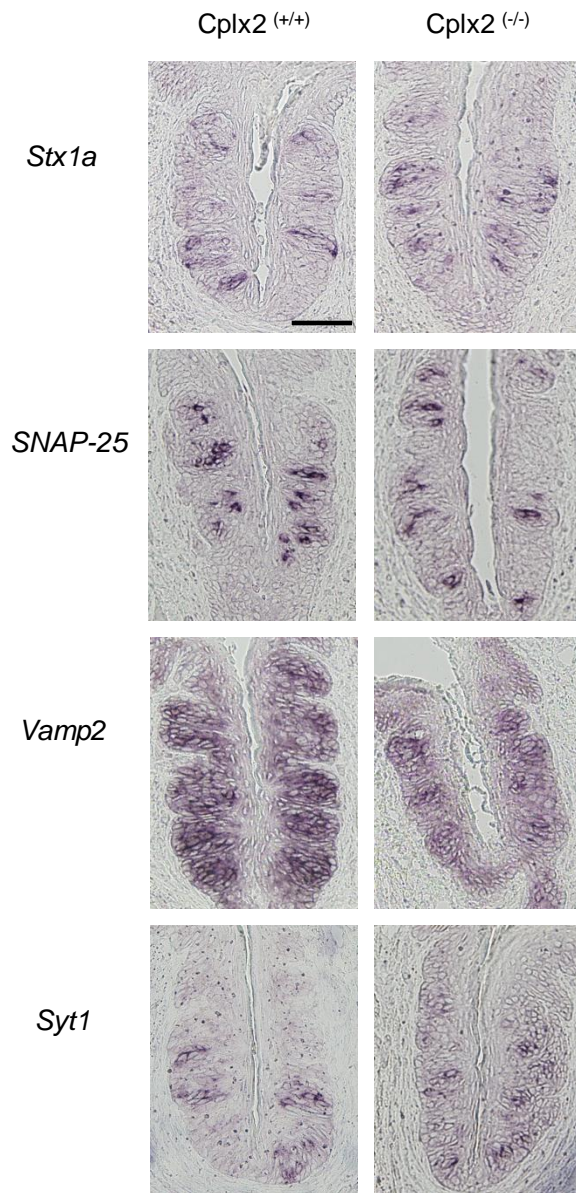


図 3-3-5

コンプレキシンⅡ欠損マウスの有郭乳頭における味蕾に発現する主な前シナプス分子のISH
 野生型とCplx2ノックアウトマウスの間で、発現に差は見られない。
 スケールバーは25 μmを表す。

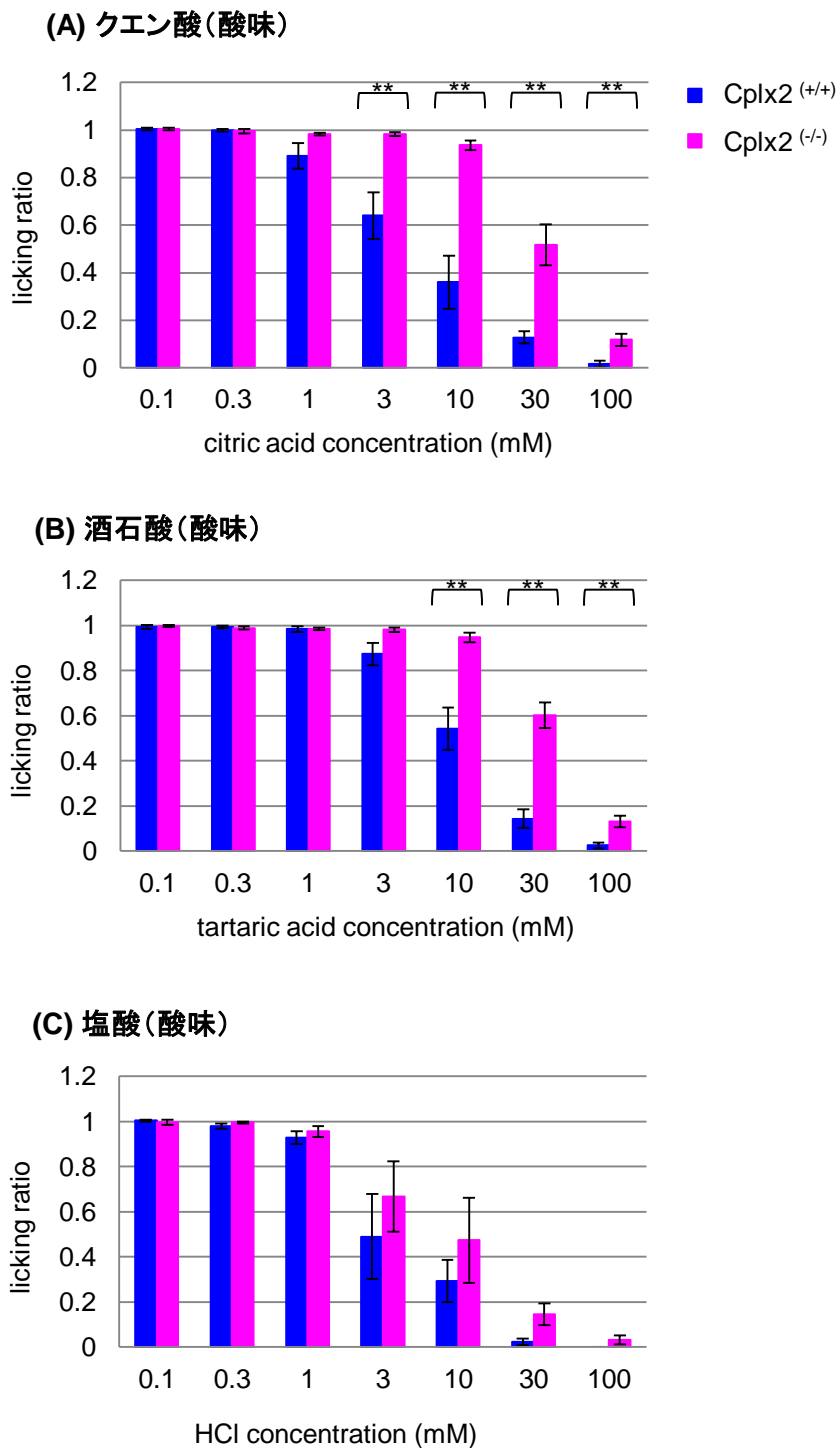


図 3-3-6 コンプレキシン II 欠損マウスの酸味に対する嗜好性と閾値の変化

絶水条件でのbrief access testの結果を示す。

Licking ratio = (味溶液のリッキング回数) / (23時間絶水時の水に対するリッキング回数)

全ての味質、濃度について、Studentのt検定により危険率5%でCplx2(+/+)とCplx2(-/-)の間に有意差があったものを*で、危険率1%で有意差があったものを**で示す。

各群ともn=6。エラーバーは標準誤差を示す。

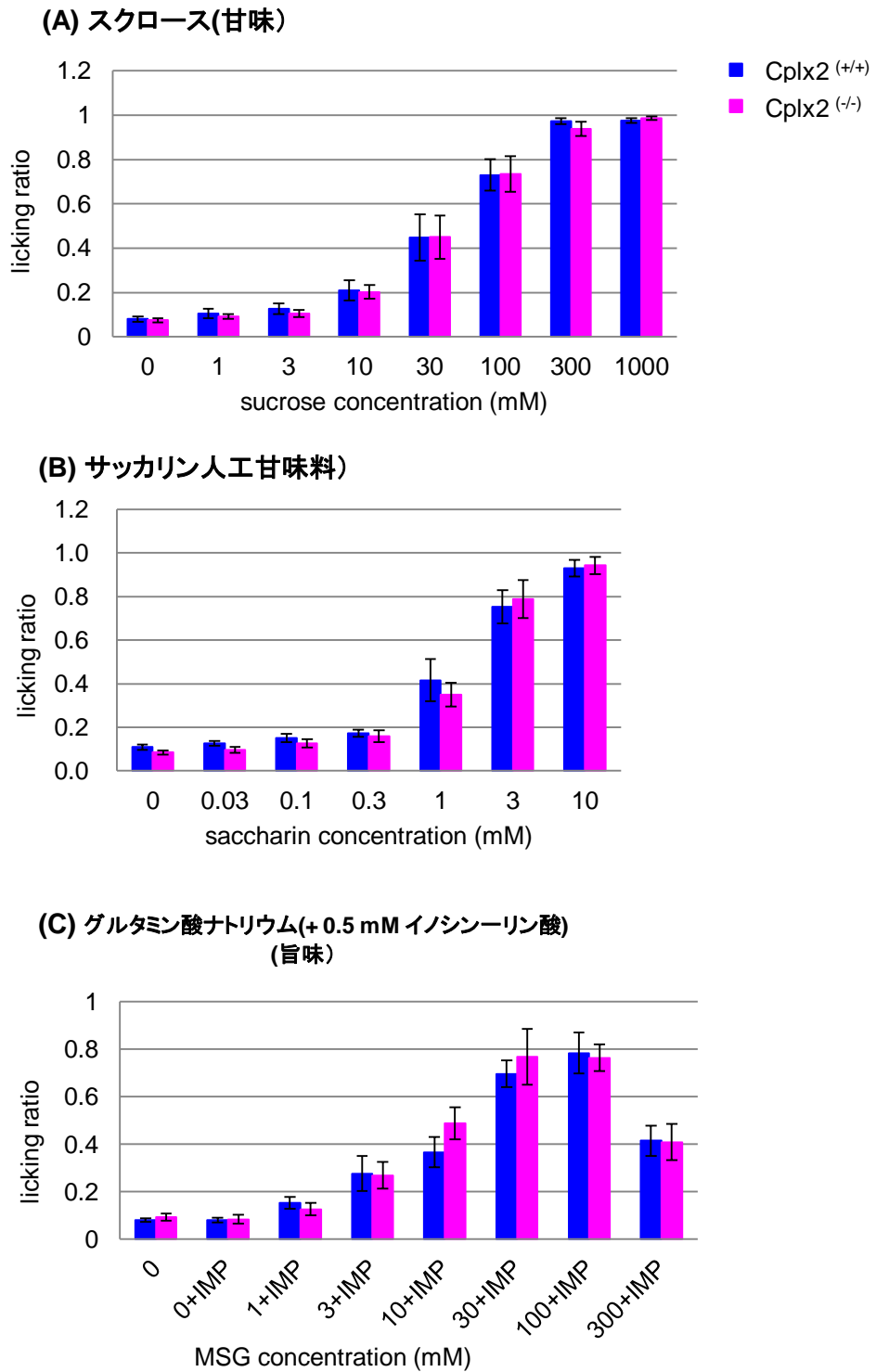


図 3-3-7 コンプレキシン II 欠損マウスの甘味・旨味に対する嗜好性と閾値の変化

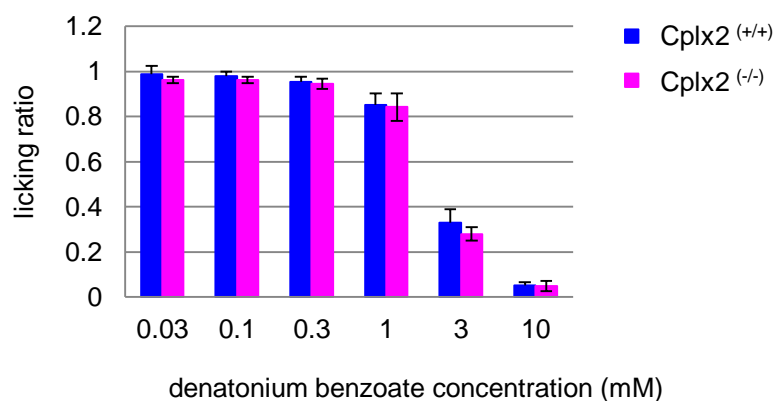
制限摂食・制限飲水条件でのbrief access testの結果を示す。

Licking ratio = (味溶液のリッキング回数) / (23時間絶水時の水に対するリッキング回数)

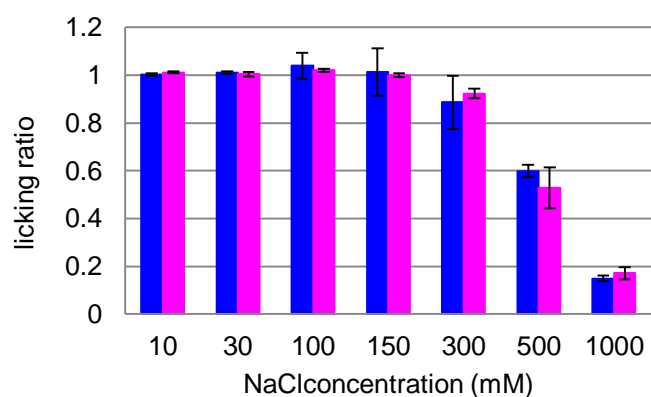
全ての味質、濃度について、Studentのt検定により、危険率5%でCplx2^(+/+)とCplx2^(-/-)の間に有意差がみられたものはなかった。

各群ともn=6。エラーバーは標準誤差を示す。

(A) 安息香酸デナトニウム(苦味)



(B) NaCl (塩味)



(C) 炭酸水

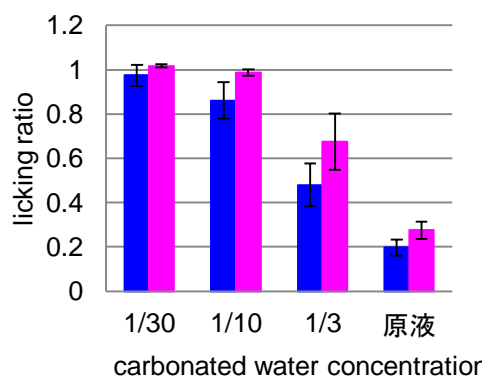


図 3-3-8 コンプレキシシ II 欠損マウスの苦味・塩味・炭酸に対する嗜好性と閾値の変化

絶水条件でのbrief access testの結果を示す。

Licking ratio = (味溶液のリッキング回数) / (23時間絶水時の水に対するリッキング回数)

全ての味質、濃度について、Studentのt検定により、危険率5%でCplx2^(+/+)とCplx2^(-/-)の間に有意差がみられたものはなかった。

各群ともn=6。エラーバーは標準誤差を示す。

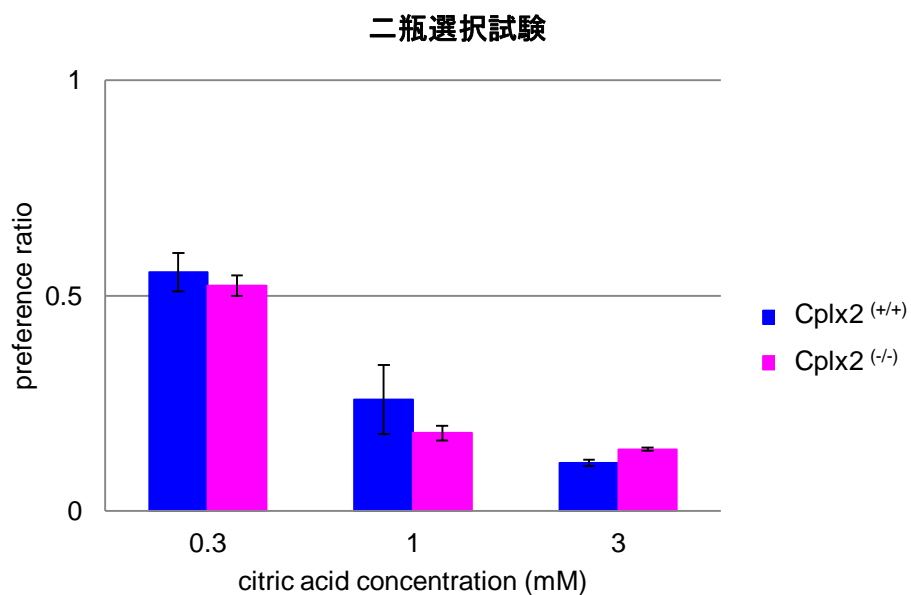


図 3-3-9 コンプレキシシン II 欠損マウスの二瓶選択試験

野生型マウスとCplx2ノックアウトマウスのクエン酸に対する二瓶選択試験の結果を示す。

全ての濃度について、Studentのt検定により危険率5%でCplx2^(+/+)とCplx2^(-/-)の間に有意差がみられたものはなかった。

各群ともn=6。エラーバーは標準誤差を示す。

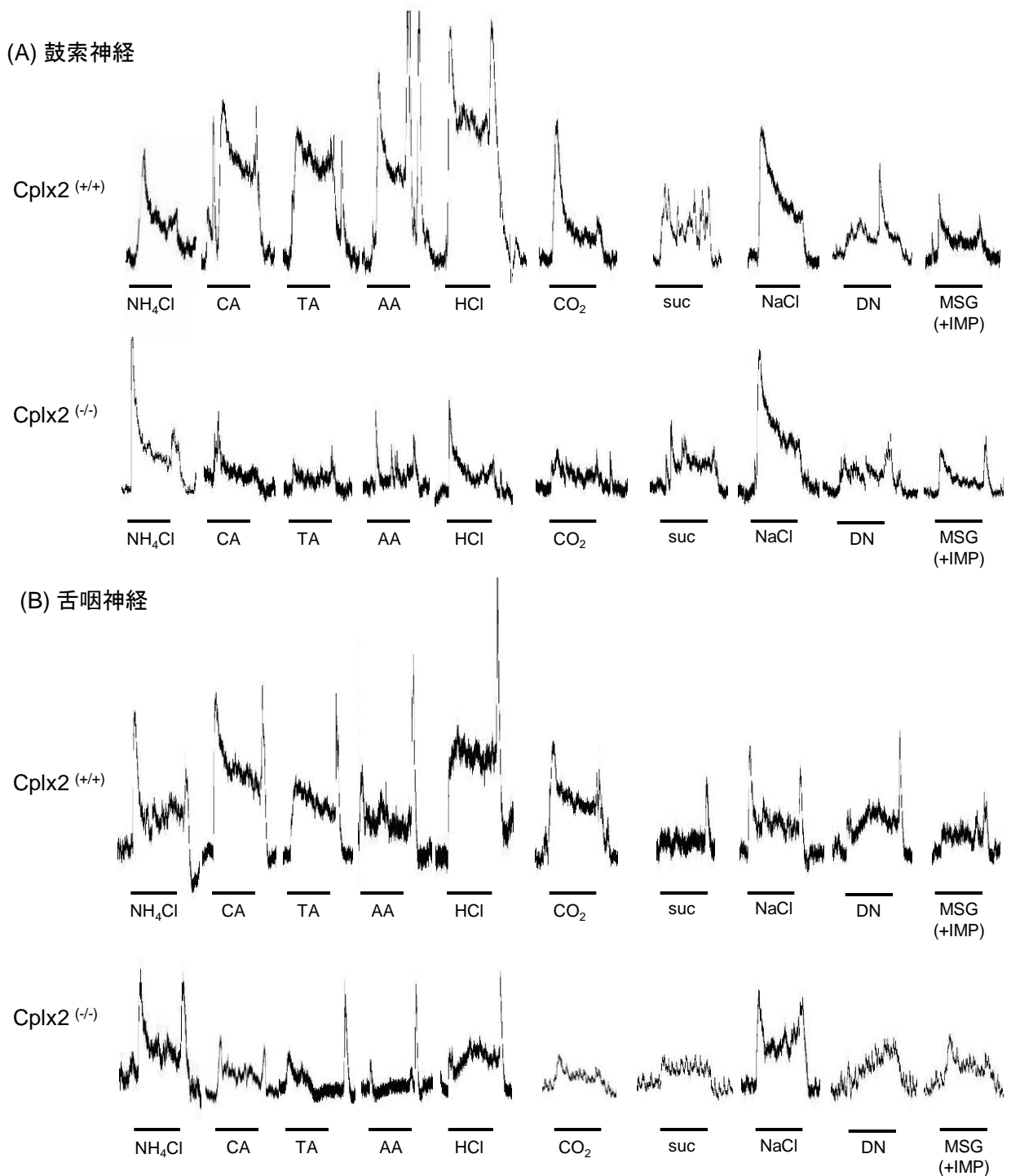


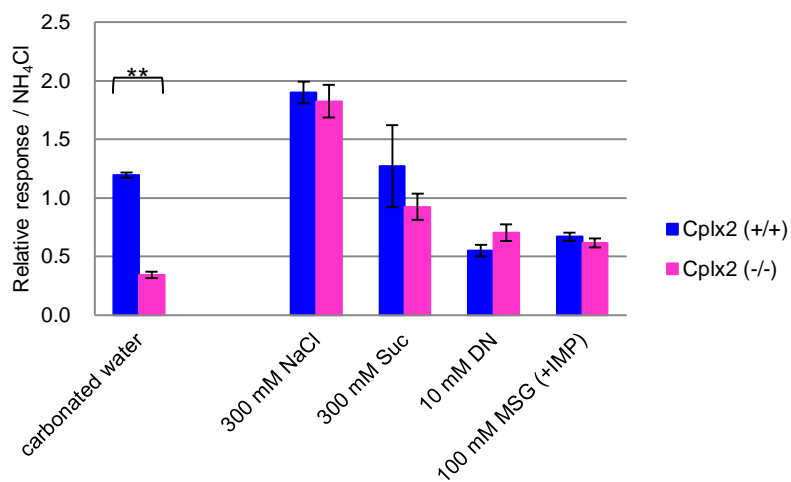
図 3-3-10 神経応答の応答波形

舌への味物質刺激に対する(A) 鼓索神経、(B)舌咽神経の応答の記録。

刺激時間は30秒。刺激のタイミングを波形の下に付した黒線で示す。応答強度はNH₄Clの強度に対して標準化して表示している。

NH₄Cl: 100 mM 塩化アンモニウム、CA: 30 mM クエン酸、TA: 30 mM DL-酒石酸、AA: 30 mM 酢酸、HCl: 30 mM 塩酸、CO₂: 炭酸水、suc: 300 mM スクロース、NaCl: 300 mM 塩化ナトリウム、DN: 10 mM 安息香酸デナトニウム、MSG(+IMP): 100 mM グルタミン酸ナトリウム・0.5 mM イノシン酸混合溶液

鼓索神経



舌咽神経

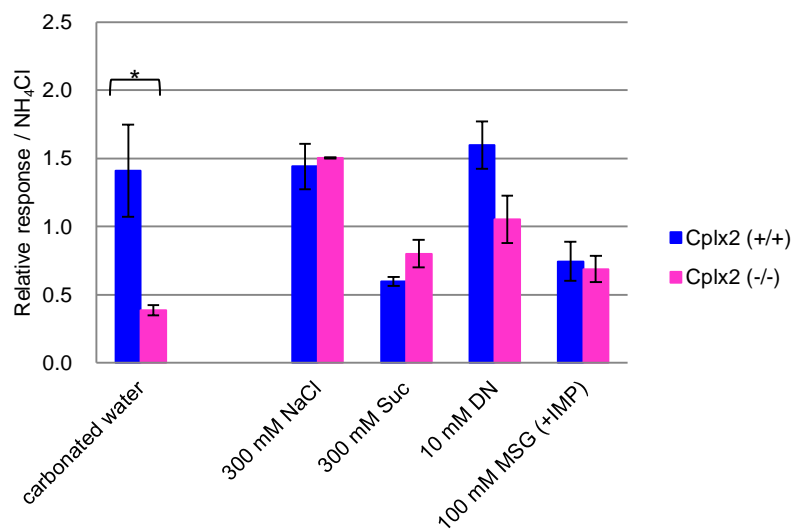
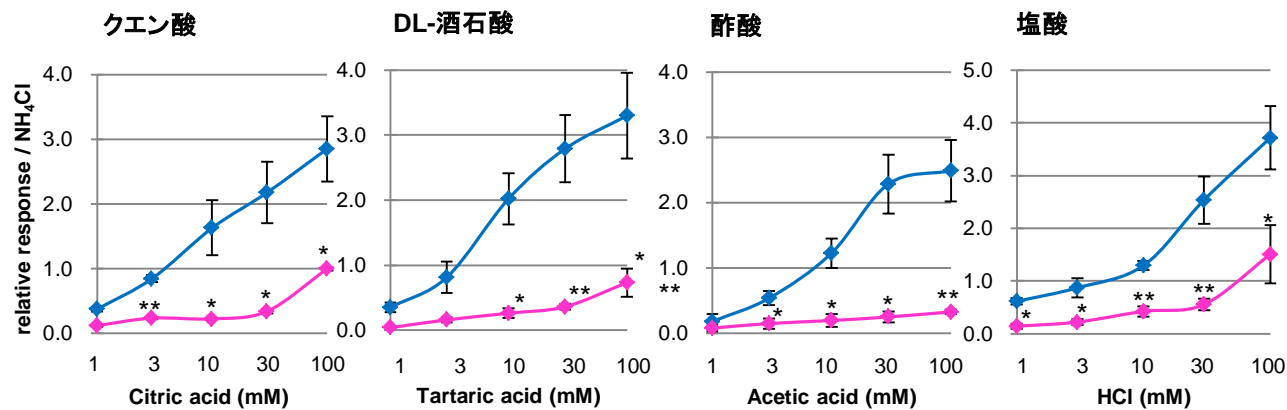


図 3-3-11 酸味以外の味刺激に対する神経応答

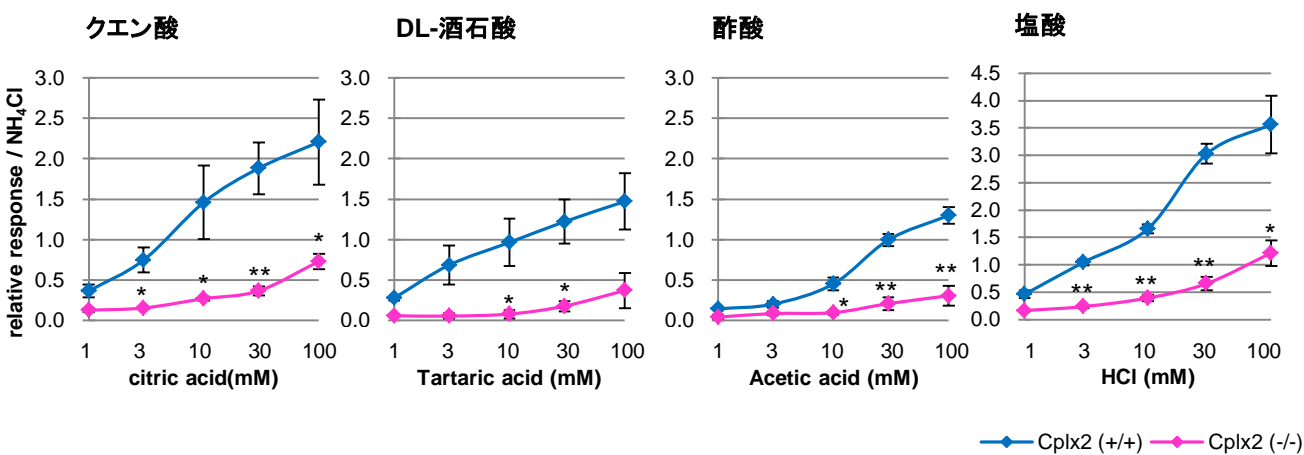
酸味以外の味の溶液に対する神経応答の結果を定量化して示す。野生型マウスに比べ、Cplx2ノックアウトマウスでは炭酸水に対する応答が著しく低下した。他の味質については有意差はみられなかった。

Studentのt検定により、野生型マウスとCplx2ノックアウトマウスの間に、危険率5%で有意差が存在したものを*で、危険率1%で有意差が存在したものを**で示す。

鼓索神経



舌咽神経



—●— $\text{Cplx2}^{+/+}$ —◆— $\text{Cplx2}^{-/-}$

図 3-3-12 酸味刺激に対する神経応答の濃度依存性

酸味溶液の濃度を変化させた際の神経応答の結果を示す。青のポイントおよび線が野生型マウス、マゼンタのポイントおよび線が Cplx2 ノックアウトマウスの結果を示す。 Cplx2 ノックアウトマウスでは10 mM程度までの低濃度の酸に対しては応答がほぼなくなっている。

Studentのt検定により、野生型マウスと Cplx2 ノックアウトマウスの間に、危険率5%で有意差が存在したものを * で、危険率1%で有意差が存在したものを ** で示す。

3-4 考察

本章では、TypeⅢ味蕾細胞に発現する前シナプス分子を探索した。そのうちの1つコンプレキシシンⅡが味蕾細胞に特異的に発現していることを示し、Cplx2 ノックアウトマウスを用いてコンプレキシシンⅡの味覚受容伝達における役割を解析した。

3-4-1 前シナプス分子としての typeⅢ細胞

前シナプス分子としては、シナプス小胞の膜融合に関与する SNARE タンパク質 (Synaptobrevin, SNAP-25, Syntaxin) やシナプトタグミン、コンプレキシシンが主要なものであるが、実際にはそれらに相互作用して機能を調節する分子や、小胞や細胞膜へのエスコート分子が必要である。味蕾に発現する主要な前シナプス分子は *SNAP-25*, *Vamp2*, *Stx1a*, *Syt1* が既に報告されていたが、本章においてこれらと相互作用する *Cplx2* を新たに味蕾細胞に発現する前シナプス分子として同定することができた。DNA マイクロアレイ解析のデータ上では、これら前シナプスに発現する分子は、味蕾に特異的な発現を示す遺伝子候補として判定されたものは WT-CvP に比べ KO-CvP で有意に増加していた。これらの分子は typeⅢ味蕾細胞以外には発現していないことが推定でき、typeⅢ味蕾細胞のみが前シナプス細胞の性質を有することが遺伝子発現の側面からも確認できた。

3-4-2 コンプレキシシンⅡについて

味蕾で発現する主要な前シナプス分子はいくつかが報告されていたが、コンプレキシシンに関する報告はない。前シナプス関連分子の機能については中枢神経系に関する知見がほとんどである。他の SNARE タンパク質やシナプトタグミンを遺伝子のノックアウトにより欠損させると致死または重篤な行動異常を起こすことに比べ (Geppert et al., 1994; Schoch et al., 2001; Washbourne et al., 2002; Fujiwara et al., 2006)、Cplx2 は欠損させても目立った表現型はない (Takahashi et al., 1999; Reim et al., 2001)。中枢神経系ではコンプレキシシンのもう 1 つの分子種である *Cplx1* が主要なコンプレキシシン分子として働いており、*Cplx2* は補助的に機能すると考えられている。*Cplx1* をノックアウトすると重篤な障害が見られるが、*Cplx2* が補完しているために致死とはならないのに対し、*Cplx1/Cplx2* の二重ノックアウトマウスは致死である (Reim et al., 2001)。

幸運なことに、味蕾では typeⅢ味蕾細胞のみに Cplx2 が主要に発現しており、野生型マウスでも Cplx2 ノックアウトマウスでもコンプレキシシンの他の分子種は発現が認められなかった。味蕾からの味情報の伝達におけるシナプスの寄与に関して解析を行うためには Cplx2 ノックアウトマウスは非常に良い対象であると考えられた。味蕾では Cplx1 ではなく Cplx2 が選択的に使われるように

進化したことは興味深い点である。

3-4-3 コンプレキシシンⅡノックアウトマウスの行動試験

brief access test による行動試験では Cplx2 ノックアウトマウスが酸味を忌避しないという結果が得られたことから、コンプレキシシンⅡが酸味の情報伝達に関与している可能性が強く示された。

特に、閾値付近の酸溶液について野生型との差が顕著であり、Cplx2 ノックアウトマウスではこれを忌避しない傾向が見られた。しかし、高濃度では野生型と同様に忌避行動を示すことから、酸味に対する忌避応答が完全にはなくなると言える。この原因は、いくつか考えられる。まず、シナプスによる酸味の受容伝達が部分的である場合が考えられる。しかし、神経応答では低濃度（～30mM）の酸味応答がほとんど消失していることを考えると、これのみが原因である可能性は低い。2 つ目には、味蕾以外に存在する酸に対する何らかのセンサーが働いている可能性が考えられる。例えば、TRP チャンネルの一種である Trpv1 は酸によって活性化されることが知られている（Caterina et al., 1997）。Trpv1 は味蕾には発現していないが、舌上皮層に投射している体性感覚神経の自由終末に発現して温度や辛味（カプサイシン等）の刺激を受容している（Kadohisa et al., 2004）。このような口腔内の酸センサーが働いている可能性は高い。また、嗅覚の関与も考えられる。揮発性の酸の溶液である塩酸や炭酸水では有意差が見られなかったこと、酢酸では匂いを嗅ぐ行動のみでリッキング行動をとらなかったことから、嗅覚による忌避が行われている可能性が高いと考えられる。

もう1つの行動試験である二瓶選択試験では、野生型マウスとCplx2 ノックアウトマウスの間に有意差が認められなかった。これは、上記のような味覚以外の感覚による酸検出機構に加え、消化管の迷走神経からの入力などの摂取後効果が働いたことによるものであろうと考えられる。酸を検出するメカニズムが存在するのは味蕾のみではなく、様々な系が関与することを示唆する結果となった。

3-4-4 コンプレキシシンⅡノックアウトマウスの神経応答

コンプレキシシンⅡは脳にも発現しているため、行動における異常が脳での認識・判断に起因し、味蕾-味神経間のシナプスによるものではない可能性も懸念された。そのため、味神経を含む鼓索神経・舌咽神経の神経応答記録を行って、酸味の忌避異常について味蕾における異常の寄与を明確にしようと試みた。神経応答は味蕾から味神経への伝達までの応答を観測するため、中枢を介さない応答結果の指標となる。その結果、鼓索神経・舌咽神経とも、低濃度の酸に対しては応答がほとんど消失するという結果を得た。従って、Cplx2 ノックアウトマウスの酸の受容・伝達の異常は

中枢に情報が送られる前に味蕾・味神経レベルで起こっていると考えられる。今後、Cplx2 ノックアウトマウスの単離味蕾細胞を用いたカルシウムイメージング実験を行い、味蕾中のカルシウム濃度上昇が酸溶液の刺激に応じて正常に起こることを確認できれば、神経応答で見られる差が味蕾と味神経を接続するシナプスによるものであると同定できるだろう。

高濃度 (30~100 mM) では野生型に比べて著しく小さいとはいえ、酸味溶液刺激に対する応答が見られた。これは、酸味応答なのか、pH が下がったことに対する細胞損傷など味蕾細胞共通の非特異的な応答の可能性もある。単離味蕾細胞を用いたカルシウムイメージング実験では pH 4 を下回るような酸で刺激を行うと、味蕾細胞全体に非特異的な応答が起こることが観察されている (私見)。今回用いた 30~100 mM の酸味溶液の pH は 1~2.5 程度であり、このような非特異的な応答が起こる可能性は十分あり得る。

前シナプスにおけるコンプレキシンの役割は、SNARE タンパク質やシナプトタグミンと相互作用し、細胞内カルシウム濃度依存的にシナプス小胞の膜融合が起こるように制御するというものであり、コンプレキシンが存在しなくても、確率論的にシナプス伝達は起こり得る。Cplx2 ノックアウトマウスでは完全にシナプス輸送が阻害されているわけではなく、単に減衰しているだけであるとも考えられる。この場合、高濃度の酸で刺激を行うと、野生型に比べて確率は低いが生シナプス伝達が起こっており、これにより高濃度の酸には野生型が低濃度の酸に対する場合と同等に検知している可能性がある。いずれにしろ、神経応答記録の実験を通じて、酸味受容伝達の大部分はシナプスを介して行われていることを示唆する結果を得られた。

3-4-5 酸味受容・伝達に異常を持つ他の遺伝子改変マウスとの比較

酸味の受容・伝達異常を引き起こさせた遺伝子改変マウスとしては以下のようなものが報告されている。

Pkd2l1-DTA マウス (Chandrashekar et al., 2006) は type III 味蕾細胞に発現する Pkd2l1 プロモーター下にジフテリア毒素 (diphtheria toxin; DTA) を発現させ、type III 味蕾細胞の細胞死を誘発している。これにより type III 味蕾細胞が消失しているマウスである。神経応答記録を行うと、酸味や炭酸・二酸化炭素に対する応答のみが消失している。Pkd2l1-TeNT マウス (Chandrashekar et al., 2008) は type III 味蕾細胞に発現する Pkd2l1 プロモーター下に破傷風毒素 (tetanus toxin; TeNT) を発現させ、SNARE タンパク質の 1 つ Vamp2 を分解することで、シナプスによる伝達が機能しなくなるマウスである。このマウスでも神経応答記録を行うと、酸味や炭酸・二酸化炭素に対する応答のみが消失している。これら 2 種の遺伝子組み換えマウスについて

の行動試験の結果は報告されていない。

Pkd2l1/Pkd1l3 double KO マウス(Horio et al., 2011)は酸味受容体候補の Pkd2l1 と Pkd1l3 を二重にノックアウトしたマウスである。神経応答はやや減衰するが、応答は残る。行動試験では異常は見られない。

今回行った Cplx2 ノックアウトマウスの神経応答は Pkd2l1-DTA マウスおよび Pkd2l1-TeNT マウスに近い結果であった。つまり、Pkd2l1/1l3 以外に酸味応答の大部分を担う分子が共存し、かつその分子は typeⅢ味蕾細胞に存在するという説を支持するものである。

3-4-6 ON 応答を行う酸味受容体

酸味の主要な応答である ON 応答を担う酸味受容体分子を探索することがこれからの1つの課題として残る。本研究の Skn-1 ノックアウトマウスを用いた DNA マイクロアレイ解析の結果を用いることにより、ON 応答分子の候補が効率よく同定できると考えられる。実際、これまでに膜貫通タンパク質を検索し、味蕾での発現解析を行うことにより、typeⅢ味蕾細胞に特異的に発現するチャネルやトランスポーター遺伝子が同定できている。さらに、培養細胞を用いたヘテロ発現系における酸に対する応答の解析や、阻害剤を用いた細胞実験・マウスの行動試験を行うことにより、新たな酸味受容体の同定につながれると考える。

第 4 章

Type I 味蕾細胞に発現する膜貫通分子の探索

4-1 序

Type I 味蕾細胞は味蕾細胞の約半数を占める細胞集団である(Matsumoto et al., 2011)。しかし、甘味・旨味・苦味受容細胞である type II 味蕾細胞および酸味受容細胞である type III 味蕾細胞については知見が蓄積されてきていることに比べ、type I 味蕾細胞については未解明の事項が多く残っている。

電子顕微鏡像による分類では、type I 味蕾細胞は電子密度の高い暗細胞として分類される。この細胞種は他の細胞を取り巻き、細胞間隙を埋めるような形態をしている (Murray and Murray, 1960)。味孔に達するような紡錘型で先端に微絨毛を持つ細胞も存在することから、支持細胞か味受容細胞については意見が分かれていた。

これまでの知見から、type I 味蕾細胞は特徴的な膜電位特性を持つ。単離味蕾細胞を用いた電気生理学実験では、漏洩性 K^+ 電流が観察される。また、電位依存性 K^+ 電流と Cl^- 電流を持つことも報告されている (Bigiani, 2001; Romanov et al., 2006; Vandenbeuch et al., 2009)。これらはグリア細胞に近い電位特性であり、支持細胞としての役割を裏付けるものと言われている。ただし、これらの膜電位特性を持つものが type I 細胞の全体を占めるのか不明である。

近年になり、味蕾の機能に関する分子生物学的な解析が盛んになったが、Type I 特異的な発現様式を示す遺伝子の報告は少ない。*GLAST* (Lawton et al., 2000)、*Entpd2* (Bartel et al., 2006)、*Kcnj1* (Dvoryanchikov et al., 2009)、*Oxtr* (Sinclair et al., 2010)、*Gpr120* (Cartoni et al., 2010)、*Gad2* (Blednov et al., 2010) に留まり、その中で ISH で細胞特異的な強いシグナルが得られるのは *Entpd2* のみである。細胞外の神経伝達物質のクリアランスを行う *GLAST*、*Entpd2*、細胞内外のカリウムイオン濃度調整を行う *Kcnj1* などが発現していることから、介在細胞としての役割を示唆される一方、オキシトシン受容体、脂質受容体、神経伝達物質の産生に関与する *Gad2* も発現することから、外部からの刺激応答に関与するという説もある。

甘味・旨味・苦味・酸味の 4 基本味の受容体(候補)と受容細胞種が同定されて、この4種の味がそれぞれ異なる細胞で受容されることが明らかとなった。ここから、残る基本味である塩味はこれらとは異なる細胞種、すなわち type I 味蕾細胞で受容されるだろうという見解が大勢を占めている。これを裏付けるように、マウス茸状乳頭味蕾を用いたカルシウムイメージング実験で、塩味に応答する細胞が甘味・旨味・苦味・酸味細胞以外に観察されるという報告 (Chandrashekar et al., 2010)、type I 味蕾細胞の一部に塩味受容細胞が存在するという報告 (Vandenbeuch et al., 2008) が存在する。

本研究開始後に、塩味受容体としてアミロライド感受性ナトリウムチャネル *ENaC* が同定されている (Chandrashekar et al., 2010)。しかし、*ENaC* のみで塩味受容の全てが説明できるわけでは

はない。マウスにおける塩味のアミロライド感受性の成分は NaCl に対する鼓索神経応答の約 40 %に寄与するだけであり(Yoshida et al., 2009)、鼓索神経応答の約 60 %と舌咽神経応答に寄与するアミロライド非感受性成分については、どの分子により受容されるのかわかっていない。

本章では、まず type I 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子の知見を増やすこと、そして type I 味蕾細胞において塩味の受容伝達や関与する遺伝子を取得することを目指し、DNA マイクロアレイデータを解析した。抽出した遺伝子の舌上皮層における発現分布を組織化学的に解析し、Type I 味蕾細胞に特異的に強く発現する遺伝子を取得した。さらに、これらの遺伝子の味蕾における発現分布を既知の味蕾細胞マーカーと比較して味蕾における発現細胞種を解析した。

得られた遺伝子の中にはカルシウム依存性塩化物イオンチャネルである *Ano1* が含まれていた。さらに *Ano1* タンパク質は味孔付近に特に強く発現しており、口腔で味物質に接する可能性があることが分かった。アノクタミンファミリーの味蕾での発現を調べたところ、*Ano7*が type II 味蕾細胞の全体に、*Ano10* が苦味細胞に発現していた。これらの性質の異なるチャネルを細胞種ごとに使い分けていることから、味蕾細胞の間での反応性の差に寄与していると考えられる。

4-2 実験材料および方法

4-2-1 type I 味蕾細胞に特異的に発現する膜貫通分子の探索

第 1 章で抽出した、type I 味蕾細胞に発現している候補遺伝子の 395 プローブセットについて Affymetrix 社の DNA マイクロアレイ解析サポートページ NetAffyx よりアノテーションを取得した。タンパク質をコードしている遺伝子のプローブセットのうち、アノテーション中に対応するタンパク質の UniProt 番号が掲載されている遺伝子については、タンパク質情報データベース UniProt で検索により、膜貫通部位の有無を特定した。UniProt 番号の掲載がないものについては、アミノ酸配列情報を取得し、オンライン膜貫通部位予測プログラム SOSUI を用いて、膜貫通部位の有無を予測した。上記 2 種の方法で膜貫通部位を持つ遺伝子を抽出した。

4-2-2 cDNA 断片のクローニング、in situ hybridization(ISH)

第 1 章と同様に行った。使用した遺伝子の accession 番号とプローブ領域を表 4-2-1 に示す。

4-2-3 マウス口腔組織固定切片の作成

マウスをペントバルビタールナトリウム溶液 (50 mg/ml) で麻酔し、氷冷した PBS で灌流後、4 % PFA / PBS で灌流固定した。舌・軟口蓋上皮の各組織を摘出し、4 % PFA / PBS 中、4℃で 1 晩追固定した。さらに 30 %スクロース / PBS 中に 4℃で 1 晩以上浸漬し、不凍処理を行った。O.C.T. compound に包埋して凍結ブロックを作成し、-80℃で保存した。凍結ブロックをクライオスタット (CM1900, Leica) を用いて 7 μ m に薄切し、MAS コートガラス (松波硝子工業) に貼り付け、常温で乾燥させた。使用時まで 80℃で保存した。

4-2-4 口腔組織切片の抗体染色

抗 Ano1 抗体免疫染色法は固定切片を用いて行った。切片を PBS で洗浄後、Target Retrieval Solution pH 9.0 (Dako) 中で 80℃、20 分間、抗原賦活化反応を行った。5 % Normal Donkey Serum (NGS) / PBST で 30 分間ブロッキングを行った後、ウサギ抗 Ano1 抗体 (1:1000、LifeSpan Biosciences) を 5 % Normal Goat Serum (NGS) / PBST に加え、4℃で 1 晩反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄後、500 倍希釈したビオチン結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) で 1 時間抗原抗体反応を行った。反応後、PBS で 10 分間 3 回洗浄し、調整しておいた HRP 標識アビジン-ビオチン混合溶液 (ABC elite Kit, Vector Laboratories) で 30 分間反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄し、DAB 発色液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.1 % ジアミノベンジジン四塩酸塩、0.6 % 硫酸ニッケルアンモニウム、0.006 % H₂O₂) で発色させた。PBS で

洗浄後、Fluoromount で封入し顕微鏡で観察、画像を取得した。

4-2-5 単離味蕾細胞スライドの作成

マウスは頸椎脱臼後、速やかに舌を摘出してリンガー溶液(第 1 章を参照)で洗浄し、Ca²⁺-free リンガー溶液(第 1 章を参照)に浸漬した。リンガー溶液にコラゲナーゼ Type I(SIGMA)を 2 mg/mlとなるように溶解した酵素溶液約 50 μ lを有郭乳頭直下に皮下注入し、Ca²⁺-free リンガー溶液中に室温で 10 分間静置した。ピンセットで有郭乳頭の味蕾を含む上皮層を筋層から剥離し、Ca²⁺-free リンガー溶液中でエブナー腺を除去した。剥離した上皮層は 4 % PFA / PBS 中に室温で 30 分間浸漬して固定した。直径約 20 μ m のキャピラリーで味蕾を吸引し、MAS コートガラス上に載せ、風乾した。使用時まで-80°Cで保存した。

4-2-6 単離味蕾細胞を用いた二重抗体染色

サンプルを PBS で洗浄後、Target Retrieval Solution pH 9.0 (Dako)中で 80°C、20 分間、抗原賦活化反応を行った。5 % Normal Donkey Serum (NGS) / PBST で 30 分間ブロッキングを行った後、ウサギ抗 Ano1 抗体(1:500、LifeSpan)、ヤギ抗 Car4 抗体 (1:100, R&D Systems)またはマウス抗 IP₃R3 抗体(1:500, BD Biosciences)を 5 % Normal Donkey Serum (NDS) / PBST に加え、4°Cで 1 晩反応させた。PBS で 10 分間 3 回洗浄後、500 倍希釈した Alexa-488 結合ロバ抗ウサギ IgG 抗体(Invitrogen)、Alexa-555 結合ロバ抗ヤギ IgG 抗体(Invitrogen)または Alexa-555 結合ロバ抗マウス IgG 抗体(Invitrogen)を加えて 1 時間抗原抗体反応を行った。反応後、PBS で 10 分間 3 回洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で核染色を行い、共焦点顕微鏡で観察、画像の取得を行った。

表4-2-1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列とプローブ領域

| gene name | accession No. | primer sequence | probe region | probe length (bp) |
|----------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| Ano1 | NM_178642.4 | s 5'- gaggaccgcagcgtccacatc -3' as 5'- gtagctggggactgggctg -3' | 194-3004 | 2811 |
| Cklsf7 | NM_133978.1 | s 5'- gatgtctcatggatcggggctc -3' as 5'- caccacacagtgcacaaaggcagag -3' | 27-922 | 896 |
| Cmkor1 (Cxcr7) | NM_007722 | s 5'- gtcacttggtcgtctcctcaagac -3' as 5'- caaactgcattgctgggcagttgttg -3' | 86-1900 | 1815 |
| Dsg2 | NM_007883.2 | s 5'- gagaagccagccgcagtcggatctggac -3' as 5'- catggatacacacacaaatgcaaacctc -3' | 3540-5689 | 2150 |
| F2r | NM_010169.3 | s 5'- ctactcagaagaagtaggcgac -3' as 5'- gagggatgaacacaaaacaatgac -3' | 2-3253 | 3252 |
| G6pc3 | NM_175935.3 | s 5'- cagtaccagctacggctccaac -3' as 5'- caagggtttattggggtcttc -3' | 12-1532 | 1521 |
| Glrh | NM_010298.5 | s 5'- gatgaagtttctgttgcaatctc -3' as 5'- gagggtgctgtacaaactatcaac -3' | 137-2954 | 2818 |
| Gpr161 | NM_001081126 | s 5'- ctgcttgccctgtgagactgg -3' as 5'- ctctgaagctttcatctctgttctg -3' | 33-1804 | 1772 |
| Gpr63 | NM_030733.3 | s 5'- ctagttcttaagacgggaggttc -3' as 5'- ctcccacgacacaacatgtcatg -3' | 96-2303 | 2208 |
| Hsd3b7 | NM_133943.2 | s 5'- gaagcctatgtacatctagctg -3' as 5'- cagatacaggttgcatcctag -3' | 21-1792 | 1772 |
| Ifitm3 | NM_025378.2 | s 5'- ctagttcttaagacgggaggttc -3' as 5'- ctcccacgacacaacatgtcatg -3' | 18-599 | 582 |
| Kcne3 | NM_020574.4 | s 5'- ctgagagcactgagcgcac -3' as 5'- caaggtttctcatgttgaagac -3' | 7-995 | 989 |
| Kcnk16 | NM_029006.1 | s 5'- gtggccaagtattgccctgcttc -3' as 5'- gacttctccgagtgcttccttg -3' | 32-2196 | 2165 |
| Mal | NM_010762.4 | s 5'- gagcttggtatgaaggctgcac -3' as 5'- gatgctcactcgtgttgagctg -3' | 78-2650 | 2573 |
| Marveld3 | NM_028584.2 | s 5'- ccatgaaaaatacttcggggcac -3' as 5'- gtgcctgagcactgaggag -3' | 60-1307 | 1248 |
| Mfsd3 | NM_027122.3 | s 5'- gtgtcgggattacagcctgac -3' as 5'- gacagccctaaccaacatccag -3' | 32-1389 | 1358 |
| Ninj1 | NM_013610 | s 5'- caccatggagtcgggactg -3' as 5'- gtcgttctgattagaaaagtgg -3' | 13-1115 | 1103 |
| Nptxr | NM_030689.4 | s 5'- gactttgaaggggcaatccctc -3' as 5'- ctacacatacagagcatctcgtg -3' | 1653-4860 | 3208 |
| Ptch1 | NM_008957.2 | s 5'- ctacctactgatgcttgctatg -3' as 5'- ctctcctcacattccacgtcctg -3' | 1293-4280 | 2988 |
| Rtnn | NM_175542.3 | s 5'- gatcaatcagaatgcagtctggtg -3' as 5'- gtcaggaatagttaagcagttgtac -3' | 4533-6940 | 2388 |
| Sec61a1 | NM_016906.4 | s 5'- catggcgatcaaatttctggaag -3' as 5'- gtgtccacagtgacagtcctc -3' | 108-2986 | 2879 |
| Slc12a2 | NM_009194.3 | s 5'- ctgttctgcaccatggacttctctaag -3' as 5'- ctgtacaaagcagcaaccgcaatgctcag -3' | 3751-6473 | 2723 |
| Slc12a7 | NM_011390.2 | s 5'- cacctgcaacctggacacacctggatg -3' as 5'- catgaaactgatctgaacggccacagttac -3' | 3323-5058 | 1736 |
| Slc25a10 | NM_013770.2 | s 5'- ctggacctgctcaaggtgcatc -3' as 5'- caccagacctacctggatcttg -3' | 226-3878 | 3653 |
| Slc25a14 | NM_011398.1 | s 5'- cacaggattctggactctggcctt -3' as 5'- ctgctgctgtagcctgtctg -3' | 31-1693 | 1663 |

表4-2-1 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列とプローブ領域(続き)

| gene name | accession No. | primer sequence | probe region | probe length (bp) |
|-----------|---------------|-------------------------------------------|--------------|-------------------|
| Slc35a1 | NM_011895.3 | s 5'- ctctctaggccggtgcgtctc -3' | 117-1886 | 1770 |
| | | as 5'- cagctgacagcaaagaaataggaac -3' | | |
| Slc44a4 | NM_023557.3 | s 5'- cactccggagactgagccatggggagaaaag -3' | 4-2172 | 2169 |
| | | as 5'- ctgcatttccaggtcacgatgagtctctc -3' | | |
| Slc45a3 | NM_145977.1 | s 5'- gaagactagtgcctgtcctggtatagagag -3' | 33-3228 | 3196 |
| | | as 5'- gcaatcagcactgaaatccccctcgacgtg -3' | | |
| Slc4a7 | NM_001033270 | s 5'- gtactcagtactgcctagaaaac -3' | 4302-7297 | 2996 |
| | | as 5'- caggatggttcacattatagactc -3' | | |
| Slc9a7 | NM_177353.3 | s 5'- gagtcattggagcctagtac -3' | 76-2443 | 2368 |
| | | as 5'- gacacttcagctttaccatctg -3' | | |
| Steap4 | NM_054098.3 | s 5'- cagatgagtttctctgactactg -3' | 89-2774 | 2686 |
| | | as 5'- caggctagagctaaggattctc -3' | | |
| Tm4sf1 | NM_008536.3 | s 5'- ccatgaacaaagtgcgtgcag -3' | 26-1501 | 1476 |
| | | as 5'- cacatatgcacaatagttagctctg -3' | | |
| Tm4sf13 | NM_019571 | s 5'- ccggaattctctggaactcactgctgg -3' | 694-2624 | 1931 |
| | | as 5'- cgcgctcgacatccaggggttatcacaagc -3' | | |
| Tmc5 | NM_001105252 | s 5'- gagatgcagtcagacgaccaag -3' | 227-2505 | 2279 |
| | | as 5'- gatcaggctatgggatttctcct -3' | | |
| Tmem176a | NM_025326.4 | s 5'- cagacgatgtccacagacatg -3' | 105-1037 | 933 |
| | | as 5'- caagttgctgcctgaggagg -3' | | |
| Tmem176b | NM_023056 | s 5'- ccggaattctctggaagagtctccaag -3' | 69-1549 | 1481 |
| | | as 5'- cgcgctcgacgtggctacatcagaagtagg -3' | | |
| Tmem64 | NM_181401.3 | s 5'- ctgtgattgttgagagcctag -3' | 1289-4649 | 3361 |
| | | as 5'- cacacgagtgatttgggacac -3' | | |
| Tmtc4 | NM_028651.2 | s 5'- ctctgtctccttgagatttctaacgag -3' | 75-3232 | 3158 |
| | | as 5'- cagagctatgacttcttttgaagagagaac -3' | | |
| Trpc1 | NM_011643.2 | s 5'- gaacctctgcctcctgtgggtg -3' | 44-2825 | 2782 |
| | | as 5'- gacagatcttggcgcagttcattg -3' | | |
| Zdhhc12 | NM_025428.2 | s 5'- gacaccggtgagccggacac -3' | 141-1139 | 999 |
| | | as 5'- ctgtacactcgaggtagccag -3' | | |

表4-2-2 RT-PCRに用いたプライマーの塩基配列とプローブ領域

| gene name | accession No. | primer sequence | probe region | probe length (bp) |
|-----------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| Ano1 | NM_178642.4 | s 5'- gaggaccgcagcgtccacatc -3' as 5'- gtagctggggactgggctg -3' | 194-3004 | 2811 |
| Ano2 | NM_153589.2 | s 5'- gaacactctcggcctgaatatgaaac -3' as 5'- cagaacttgcataaaacgggtgtg -3' | 1751-3891 | 2141 |
| Ano3 | NM_001081556.1 | s 5'- catggtccaccactcaggctccattc -3' as 5'- gatacagacagcagcaccagatg -3' | 141-1946 | 1806 |
| Ano4 | NM_178773.4 | s 5'- agagcaaatgaatgtacggatg -3' as 5'- catggcttcatgttggtgactc -3' | 921-4051 | 3131 |
| Ano5 | NM_177694.5 | s 5'- caccatgcctgtcacacagtatgc -3' as 5'- cactactagaaacacacatctgggtg -3' | 4634-7491 | 2858 |
| Ano6 | NM_175344.3 | s 5'- gagacatgcagatgatgactaggaag -3' as 5'- gtgcttctccaggcctaaagctc -3' | 137-2904 | 2768 |
| Ano7 | NM_207031.1 | s 5'- ctggctgtgaactctgaggtctc -3' as 5'- caggatcatggtctccaaaagacac -3' | 109-2889 | 2781 |
| Ano8 | NM_001164679.1 | s 5'-gtgccactccggtcctcatgag -3' as 5'- gagggagagcgcggttcgcag -3' | 130-3450 | 3321 |
| Ano9 | NM_178381.3 | s 5'- cacattgaccgagggaccagccac -3' as 5'- cagaagccaggaggtccatggcttc -3' | 60-2869 | 2810 |
| Ano10 | NM_133979.2 | s 5'- gaggtttgccaaagatgagagtac -3' as 5'-ctcagttgcaaagtgtcaacataacac -3' | 72-2560 | 2489 |

4-3 結果

4-3-1 Type I 味蕾細胞に発現する遺伝子候補の抽出

塩味の受容を含む味物質に対する応答に関与する遺伝子は、細胞膜表面に存在し味孔に接していると考えられる。この研究では、第 1 章で抽出した、type I 味蕾細胞に発現している候補遺伝子の 395 プローブセットの中で膜貫通領域を持つもの 52 プローブセット(44 遺伝子)を抽出した。このうち、味蕾での発現が報告されている *Kenq1*, *Kcnj1*, *Entpd2*, *Oxtr* を除く 40 遺伝子について以降の発現解析を行った(表 4-3-1)。

4-3-2 マイクロアレイデータから抽出した遺伝子のマウス有郭乳頭における発現解析

4-3-1 で抽出された遺伝子の舌上皮層における発現分布を調べるため、40 遺伝子についてマウス有郭乳頭上皮層切片を用いて ISH を行った。味蕾や有郭乳頭上皮層におけるシグナルの分布から、各遺伝子の発現パターンは大きく 4 つに分類できた。

① 味蕾の全体または一部の細胞に特異的に強く発現していた遺伝子

4 遺伝子(*Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1*, *Slc35a1*)が該当した(図 4-3-1)。このうち *Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* は味蕾の 5 割程度の細胞に発現していた。

② シグナルは味蕾特異的だったが、味蕾における発現が弱かった遺伝子

4 遺伝子(*Mal*, *Cxcr7*, *Ninjl*, *Tm4sf13*)が該当した(図 4-3-1)。味蕾でない上皮に発現は見られないが、発現が弱く、発現している細胞がはっきりとは分らない。

③ 味蕾を含む有郭乳頭上皮層に全体的に発現した遺伝子

9 遺伝子が該当した(図 4-3-1)。

④ 有郭乳頭上皮層において有意なシグナルが観察されなかった遺伝子

23 遺伝子が該当した(図 4-3-1)

これまでに味蕾で機能することが分かっている分子のほとんどは①と同程度かそれ以上の強い発現を示すので、このうち、味蕾全体には発現しない 3 遺伝子を以下の解析に使用した。

4-3-3 二重 ISH

味蕾特異的に強いシグナルが観察された 3 遺伝子の発現細胞種を同定するため、マウス有郭乳頭切片において二重 ISH を行った。その際、Type I 味蕾細胞のマーカー遺伝子として *Entpd2* を、それ以外の細胞(type II および type III 味蕾細胞の集合)のマーカーとして *Trpm5* および *Pkd1l3* の混合プローブを用いた。結果を図 4-3-2 に示す。

Ano1 のシグナルは *Entpd2* のシグナルと重なり、*Trpm5* や *Pkd1l3* のシグナルとは重ならなかった。*Sec61a1* のシグナルは *Entpd2* のシグナルと重なり、*Trpm5* および *Pkd1l3* のシグナルとはごく一部で重なった。*Ano1*, *Sec61a1* のシグナルが *Entpd2* のシグナルとほぼ重なることに比べ、*Kcne3* のシグナルは *Entpd2* のシグナルに内包された。*Trpm5*, *Pkd1l3* のシグナルとは重ならなかった。*Kcne3* は type I 味蕾細胞の一部の細胞に発現することが予測された。このことから、*Ano1*, *Sec61*, *Kcne3* が type I 味蕾細胞に発現していることを示した。

4-3-4 *Ano1* の局在

Ano1 は近年同定された 8 回膜貫通型の塩化物イオンチャネルである。気道上皮や感覚細胞に発現し、カルシウム依存性塩化物イオンチャネル (calcium-activated chloride channel; CaCC) として機能していることが示されている (Yang et al., 2008; Ousingsawat et al., 2009.)。同じファミリーの *Ano2* は嗅覚組織で嗅覚の調節に関与すること (Stephan et al., 2009; Billig et al., 2011) が知られている。type I 味蕾細胞の中にも味物質に応答してカルシウム濃度変化を起こすものがある (Chandrashekar et al., 2010)。*Ano1* も味の受容・伝達に関与している可能性があると考えた。

味蕾での機能を考察する上で、タンパク質の局在は重要な問題である。*Ano1* が type I 味蕾細胞に特異的に強く発現していることから、抗体染色を行い、*Ano1* タンパク質の細胞内局在を調べた。*Ano1* のシグナルは味蕾細胞の頂端部の味孔付近に強く見られた。これは気道上皮や腸管上皮でも *Ano1* が apical 側に発現しているという報告と一致する結果である (Yang et al., 2008; Schreiber et al., 2010)。単離味蕾細胞を用いた抗体染色では、*Ano1* のシグナルが type II 味蕾細胞のマーカー *IP₃R3* や Type III 細胞のマーカー *Car4* とは重なっていないことから、タンパク質のレベルでも type I 細胞に存在することを示した。

4-3-5 アノクタミンファミリーの味蕾での発現

アノクタミンファミリーの遺伝子の 1 つ *Ano7* は type II 味蕾細胞に発現することが報告されている (Moyer et al., 2009)。他の分子種が味蕾で発現しているかを調べるために、アノクタミンファミリーに属する 10 種の遺伝子の味蕾での ISH を行った。その結果、*Ano1*, *7*, *10* が有郭乳頭の味蕾細胞に特異的に強い発現をしていた。*Ano2*, *3*, *4*, *5*, *6*, *8*, *9* は発現が弱いか全く発現が見られなかった。*Ano1*, *Ano7* の発現は茸状乳頭や軟口蓋上皮でも同様に味蕾細胞特異的に見られた。*Ano10* は軟口蓋には発現していたが茸状乳頭では発現が見られなかった。これは苦味受容体 *T2Rs* の発現パターンとよく似ている (Chandrashekar et al., 2000)。

発現細胞種を調べるために、味蕾細胞種マーカー遺伝子との二重 ISH を行った。ここでは Type II 味蕾細胞のマーカー遺伝子として *Pkd2l1* を用いた。*Ano1* は前述のように type I 味蕾細胞に特異的に発現していた。*Ano7* のシグナルは *Trpm5* と重なり *Entpd2* や *Pkd2l1* のシグナルとは重ならなかったことから、*Ano7* は type II 味蕾細胞に発現していることを確認した。*Ano10* のシグナルは *Trpm5* のシグナルの一部に見られ、*Entpd2* や *Pkd2l1* のシグナルとは重ならなかった。さらに甘味・旨味細胞のマーカーとして *T1R3*、苦味細胞のマーカーとして *Ggust* と *Ano10* との二重 ISH を行ったところ、*Ano10* のシグナルは *T1R3* のシグナルとは重ならず、*Ggust* のシグナルとはほぼ一致した。ここから、*Ano10* は苦味細胞に特異的に発現するということが分かった。

アノクタミンファミリーの 3 種の遺伝子が、それぞれ異なる味蕾細胞種に特異的に発現しているという結果を得られた。

表4-3-1 Type I 味蕾細胞に発現する膜貫通遺伝子の候補

| Gene Symbol | Gene title | Probe_ID | KO-Cvp Average | WT-Cvp Average | WT-Np Average | WT-Cvp / WT-Np-Epi | KO-Cvp / WT-Cvp |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|----------------|---------------|--------------------|-----------------|
| Ano1 | anoctamin 1, calcium activated chloride channel | 1459713_s_at | 1517.7 | 1377.4 | 133.8 | 10.29 | 1.10 |
| Cklfsf7 | chemokine-like factor super family 7 | 1460253_at | 538.8 | 501.7 | 71.2 | 7.05 | 1.07 |
| Cmkr1 | chemokine orphan receptor 1 | 1417625_s_at | 1325.3 | 1261.3 | 51.5 | 24.47 | 1.05 |
| Dsg2 | desmoglein 2 | 1439476_at | 2088.1 | 1952.8 | 83.0 | 23.52 | 1.07 |
| Dsg2 | desmoglein 2 | 1425619_s_at | 460.4 | 399.5 | 25.9 | 15.40 | 1.15 |
| Dsg2 | desmoglein 2 | 1449740_s_at | 1790.7 | 1506.9 | 110.1 | 13.69 | 1.19 |
| Entpd2 | ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 | 1418259_a_at | 3216.1 | 3128.9 | 343.9 | 9.10 | 1.03 |
| F2r | Proteinase-activated receptor 1 | 1437308_s_at | 6373.7 | 5585.8 | 318.5 | 17.54 | 1.14 |
| G6pc3 | Glucose-6-phosphatase 3 | 1428245_at | 226.1 | 283.8 | 23.3 | 12.19 | 0.80 |
| Glr1b | glycine receptor, beta subunit | 1422504_at | 215.4 | 153.7 | 7.9 | 19.51 | 1.40 |
| Glr1b | glycine receptor, beta subunit | 1459850_x_at | 161.9 | 143.0 | 15.4 | 9.28 | 1.13 |
| Gpr161 | Similar to G-protein coupled receptor (LOC240888), mRNA | 1436459_at | 292.7 | 273.2 | 14.0 | 19.57 | 1.07 |
| Gpr63 | G protein-coupled receptor 63 | 1456798_at | 107.1 | 102.0 | 20.0 | 5.10 | 1.05 |
| Hsd3b7 | hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 | 1416968_a_at | 831.9 | 728.9 | 135.6 | 5.38 | 1.14 |
| Ifitm3 | interferon induced transmembrane protein 3 | 1423754_at | 6303.9 | 5976.5 | 688.0 | 8.69 | 1.05 |
| Kcne3 | potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 3 | 1418499_a_at | 771.3 | 772.3 | 44.7 | 17.28 | 1.00 |
| Kcnj1 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1 | 1418613_at | 964.1 | 863.6 | 15.0 | 57.73 | 1.12 |
| Kcnk16 | potassium channel, subfamily K, member 16 | 1429913_at | 128.4 | 108.3 | 19.3 | 5.61 | 1.19 |
| Kcnq1 | potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1 | 1449464_at | 506.6 | 571.6 | 62.5 | 9.15 | 0.89 |
| Mal | myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein | 1417275_at | 12430.8 | 10256.0 | 243.6 | 42.11 | 1.21 |
| Marveld3 | MARVEL (membrane-associating) domain containing 3 | 1445501_at | 158.0 | 158.1 | 12.9 | 12.26 | 1.00 |
| Mfsd3 | major facilitator superfamily domain containing 3 | 1451433_at | 238.8 | 239.4 | 17.5 | 13.69 | 1.00 |
| Ninj1 | ninjurin 1 (nerve injury-induced protein) | 1441281_s_at | 728.7 | 640.9 | 6.7 | 95.09 | 1.14 |
| Ninj1 | ninjurin 1 (nerve injury-induced protein) | 1448417_at | 451.2 | 425.1 | 18.8 | 22.59 | 1.06 |
| Nptxr | neuronal pentraxin receptor | 1429290_at | 737.8 | 780.6 | 79.2 | 9.85 | 0.95 |
| Nptxr | neuronal pentraxin receptor | 1424407_s_at | 888.2 | 841.1 | 165.4 | 5.08 | 1.06 |
| Oxtr | oxytocin receptor | 1440888_at | 175.5 | 202.1 | 16.9 | 11.99 | 0.87 |
| Ptch1 | patched homolog 1 | 1428853_at | 6205.9 | 5459.0 | 325.2 | 16.78 | 1.14 |
| Rtnn | rotatin | 1436588_at | 150.0 | 150.3 | 8.4 | 17.94 | 1.00 |
| Sec61a1 | Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae) | 1416191_at | 214.5 | 209.3 | 30.1 | 6.96 | 1.02 |
| Slc12a2 | solute carrier family 12, member 2 | 1417623_at | 1179.9 | 1075.5 | 140.4 | 7.66 | 1.10 |
| Slc12a7 | solute carrier family 12, member 7 | 1418257_at | 837.0 | 878.1 | 86.1 | 10.20 | 0.95 |
| Slc25a10 | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 1 | 1416955_at | 107.0 | 116.1 | 4.7 | 24.82 | 0.92 |
| Slc25a14 | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, brain), member 14 | 1417154_at | 202.1 | 207.9 | 14.8 | 14.08 | 0.97 |
| Slc35a1 | solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member 1 | 1417538_at | 609.1 | 562.8 | 59.5 | 9.47 | 1.08 |
| Slc44a4 | solute carrier family 44, member 4 | 1416596_at | 473.1 | 395.4 | 61.4 | 6.44 | 1.20 |
| Slc45a3 | solute carrier family 45, member 3 | 1426663_s_at | 148.6 | 133.7 | 12.1 | 11.01 | 1.11 |
| Slc45a3 | solute carrier family 45, member 3 | 1426664_x_at | 146.6 | 134.2 | 15.4 | 8.69 | 1.09 |
| Slc4a7 | solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7 | 1438673_at | 1535.1 | 1377.7 | 99.4 | 13.87 | 1.11 |
| Slc9a7 | solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 7 | 1437421_at | 341.6 | 289.7 | 31.7 | 9.13 | 1.18 |
| Steap4 | Metalloreductase STEAP4 | 1460197_a_at | 1148.6 | 1192.4 | 45.6 | 26.15 | 0.96 |
| Tm4sf1 | transmembrane 4 superfamily member 1 | 1450958_at | 483.8 | 515.4 | 11.7 | 44.13 | 0.94 |
| Tm4sf13 | transmembrane 4 superfamily member 13 | 1418643_at | 3389.4 | 3151.0 | 66.9 | 47.10 | 1.08 |
| Tm4sf13 | transmembrane 4 superfamily member 13 | 1460239_at | 1074.2 | 1072.2 | 45.9 | 23.35 | 1.00 |
| Tmc5 | transmembrane channel-like gene family 5 | 1452934_at | 154.6 | 151.1 | 8.0 | 18.98 | 1.02 |
| Tmem176a | transmembrane protein 176A | 1423909_at | 1292.1 | 1170.0 | 156.6 | 7.47 | 1.10 |
| Tmem176b | transmembrane protein 176B | 1418004_a_at | 3617.7 | 3553.1 | 352.9 | 10.07 | 1.02 |
| Tmem64 | transmembrane protein 64 | 1433735_a_at | 1162.1 | 931.7 | 43.4 | 21.45 | 1.25 |
| Tmem64 | transmembrane protein 64 | 1454709_at | 1616.9 | 1328.7 | 67.7 | 19.64 | 1.22 |
| Tmtc4 | transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 4 | 1428113_at | 2073.2 | 1777.5 | 349.4 | 5.09 | 1.17 |
| Trpc1 | transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1 | 1421096_at | 255.9 | 207.2 | 4.8 | 42.99 | 1.23 |
| Zdhc12 | zinc finger, DHHC domain containing 12 | 1448857_a_at | 156.8 | 139.3 | 19.3 | 7.21 | 1.13 |

赤字は味蕾で発現することが報告されている遺伝子

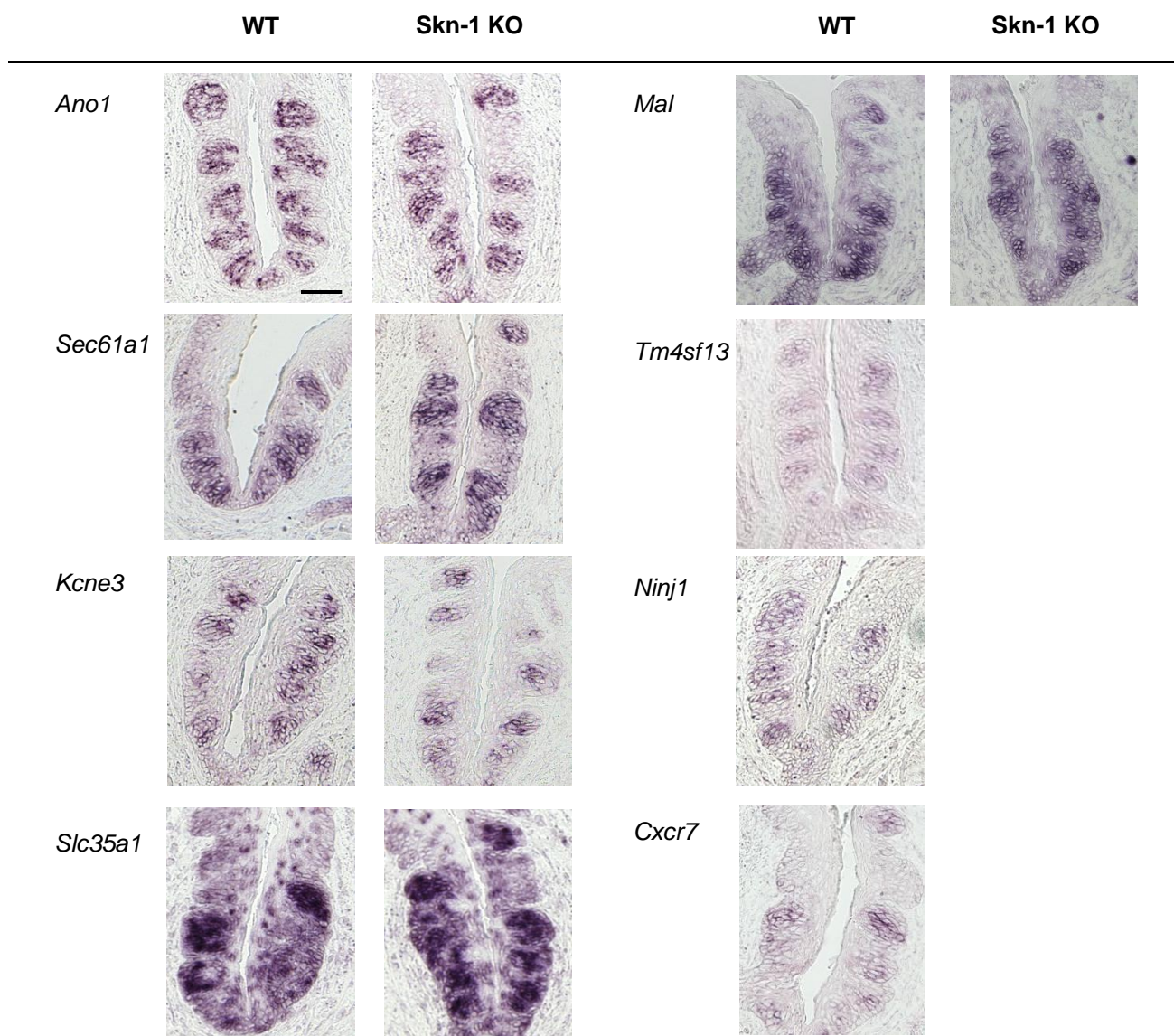


図4-3-1 type I 味蕾細胞に発現する遺伝子候補のin situ hybridization

味蕾細胞特異的な発現が見られたものについての結果を示す。
スケールバーは25 μ mを示す。

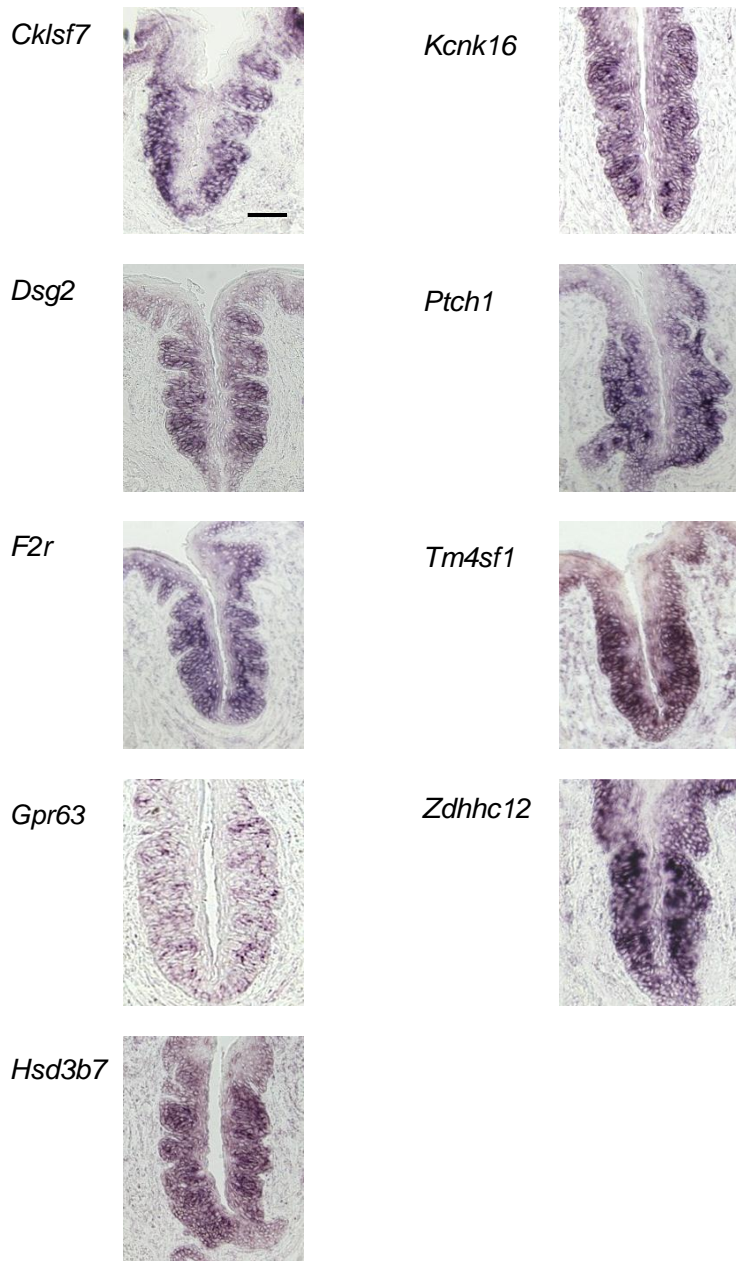


図4-3-1 type I 味蕾細胞に発現する遺伝子候補のin situ hybridization (続き)

有郭乳頭上皮全体に発現がみられたものについての結果を示す。
スケールバーは25 μ mを示す

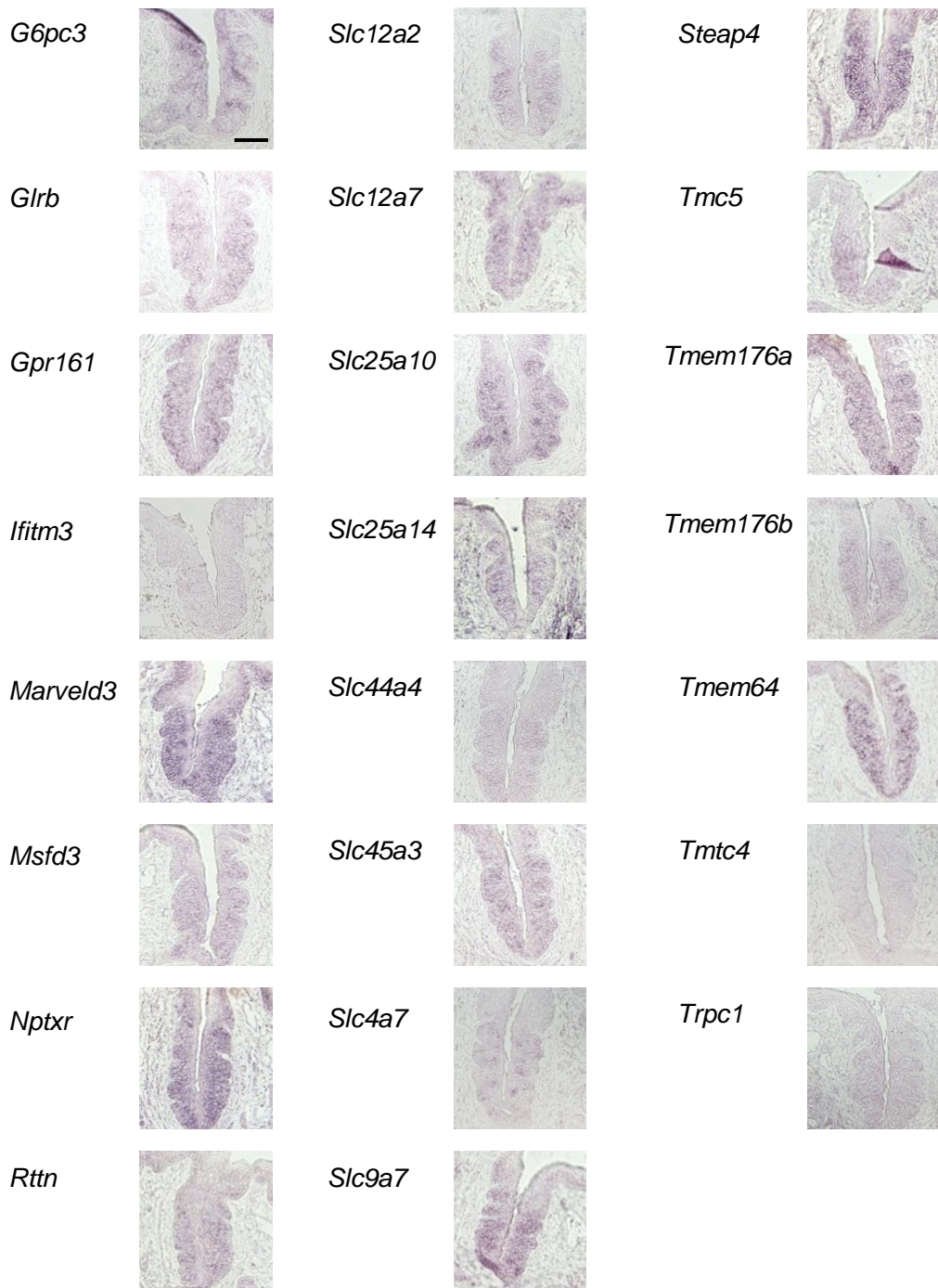


図4-3-1 type I 味蕾細胞に発現する遺伝子候補のin situ hybridization (続き)

有郭乳頭周辺で有意なシグナルが見られなかったものの結果を示す。
スケールバーは25 μ mを示す。

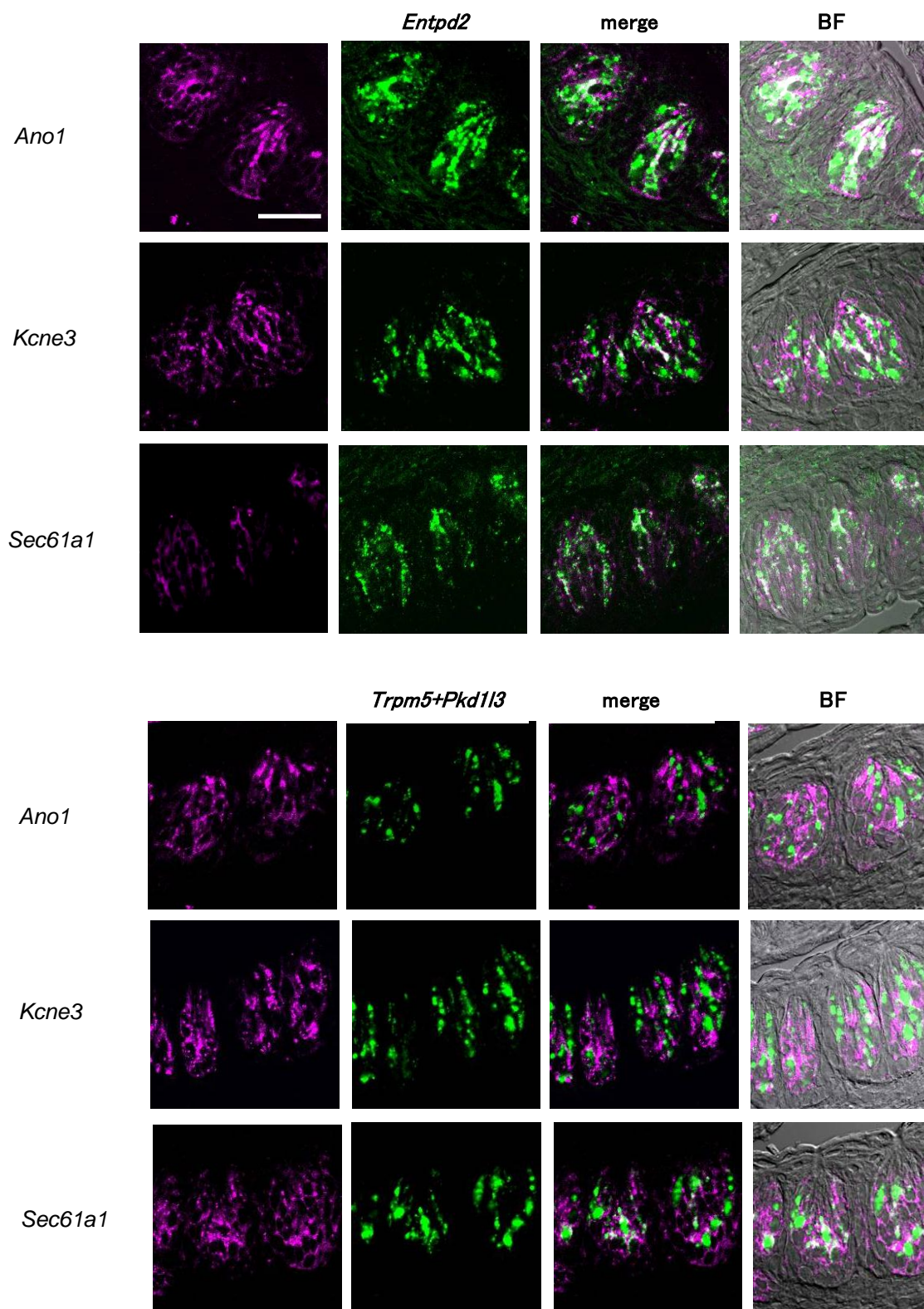


図4-3-2 type I 味蕾細胞に発現する遺伝子の二重*in situ* hybridization

Type I 味蕾細胞に発現すると予想された遺伝子 *Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* (マゼンタ) と味蕾細胞種マーカー (緑) の二重ISH。Type I 味蕾細胞のマーカーとして *Entpd2*、type II 味蕾細胞およびtype III 味蕾細胞のマーカーとして *Trpm5* と *Pkd1l3* の混合プローブを使用した。 *Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* の大部分のシグナルは *Entpd2* のシグナルと重なった。スケールバーは25 μm を示す。

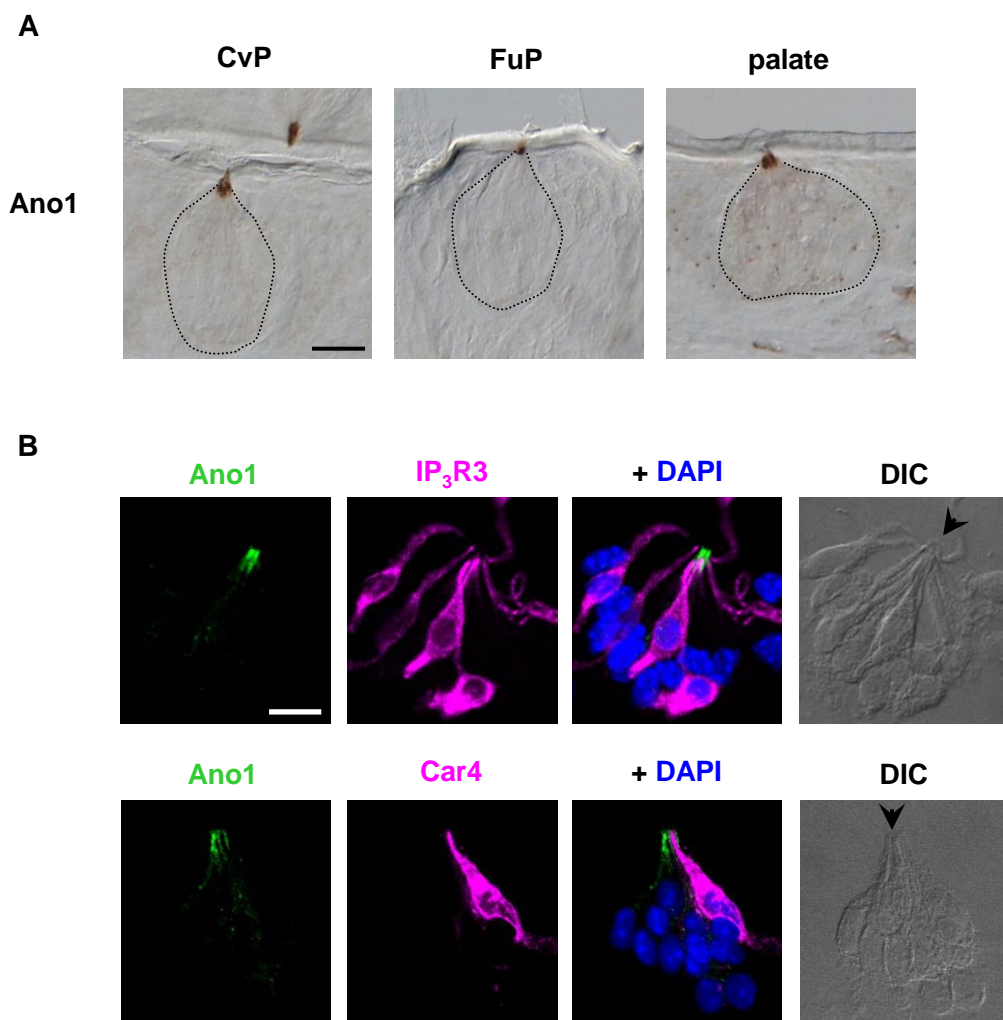


図4-3-3 味蕾におけるAno1の抗体染色

A: 有郭乳頭、茸状乳頭、軟口蓋の味蕾でのAno1の単一抗体染色。味孔付近に強いシグナルが見られる。点線は味蕾の輪郭を表す。

B: 有郭乳頭から単離した味蕾細胞を用いたAno1と味蕾細胞種マーカーの二重抗体染色。Type II 味蕾細胞のマーカーとしてIP₃R3を、type III 味蕾細胞のマーカーとしてCar4を使用した。Ano1のシグナル(緑)はIP₃R3またはCar4のシグナル(マゼンタ)とほとんど重ならない。DAPI(青)による核染色と明視野の像を右に示す。明視野像中の矢じりは味孔の位置を示す。スケールバーは25 μmを表す。

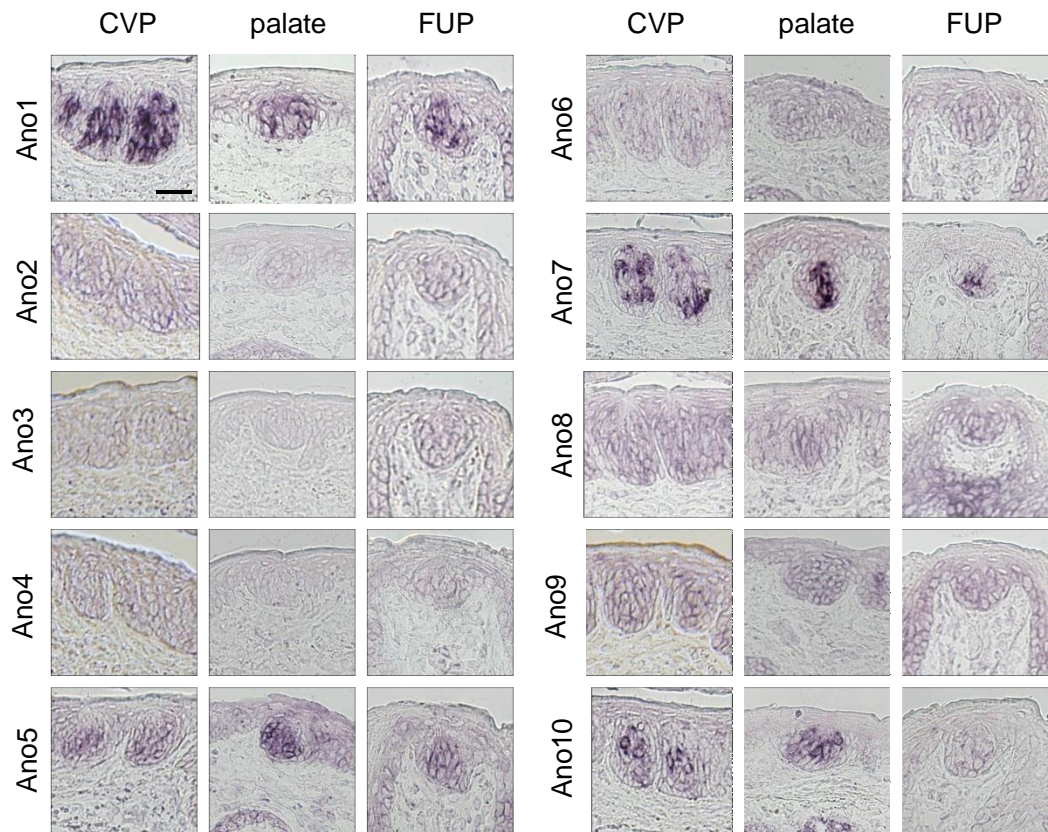


図4-3-4 味蕾におけるアノクタミンファミリーの発現

アノクタミンファミリーの10種類の遺伝子について、有郭乳頭、軟口蓋、茸状乳頭でISHを行った。Ano1, Ano7, Ano10が味蕾細胞の一部に特異的に強く発現していた。

スケールバーは25 μ mを示す。

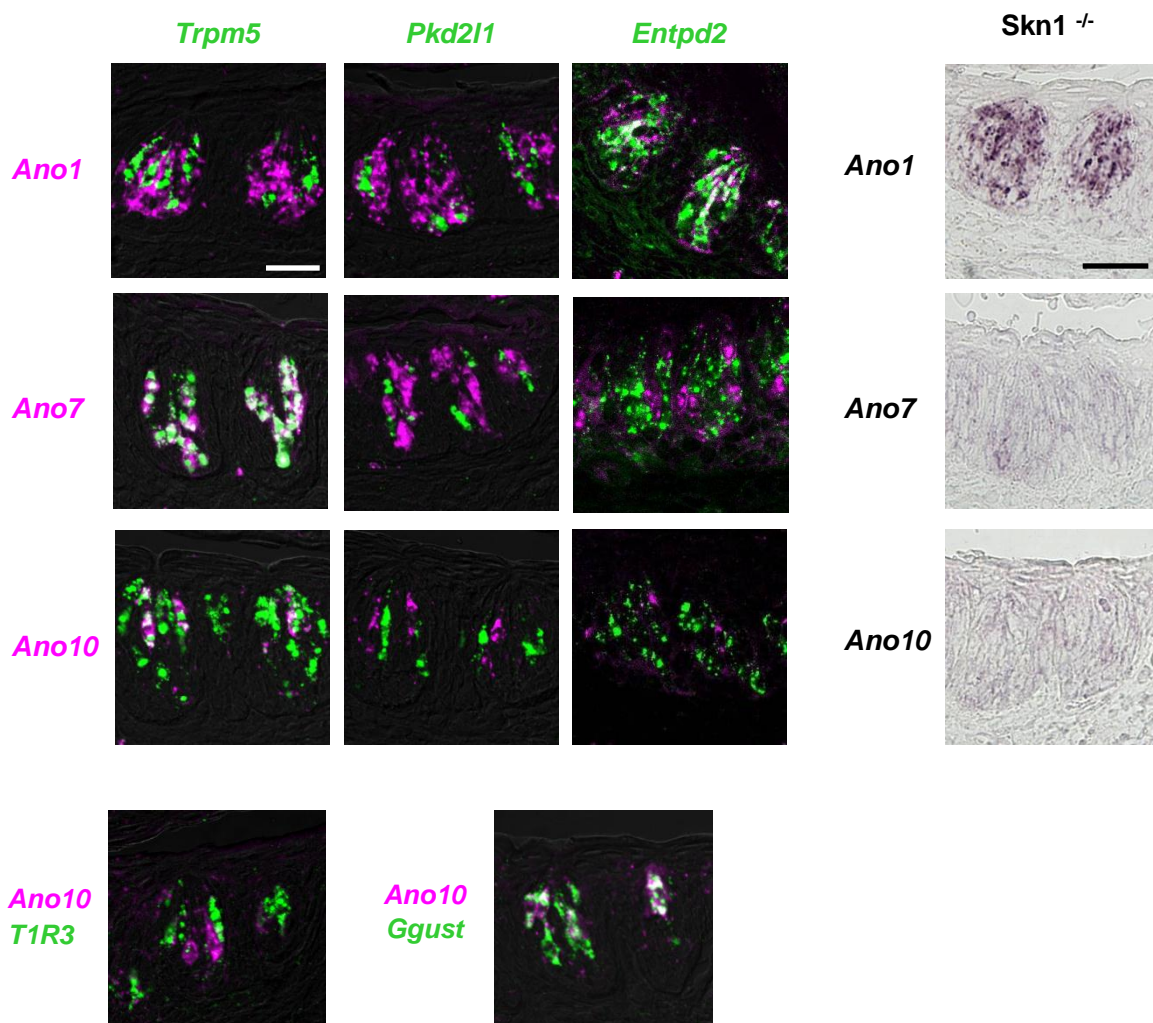


図4-3-5 *Ano1*, *Ano7*, *Ano10*の発現する味蕾細胞種の同定

マウス有郭乳頭において*Ano1*, *Ano7*, *Ano10*の発現する細胞種を二重ISHにより特定した。アノクタミン遺伝子(マゼンタ)と味蕾細胞種マーカー遺伝子(緑)の重ね合わせを示す。type I マーカーとして*Entpd2*、type II マーカーとして*Trpm5*、type III マーカーとして*Pkd2l1*を用いた。また*Ano10*については発現細胞種をより詳しく同定するために、甘味・旨味細胞のマーカー*T1R3*、苦味細胞のマーカー*Ggust*とも二重ISHを行った。*Skn-1*ノックアウトマウスの味蕾では*Ano1*の発現は野生型と変わらず、*Ano7*、*Ano10*の発現は消失することから、*Ano1*はtype I 味蕾細胞に、*Ano7*と*Ano10*はtype II 味蕾細胞に発現することが裏付けられた。

スケールバーは25 μm を示す。

4-4 考察

この章では分子知見の少ない type I 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子の探索を行った。特に、呈味物質の受容体やその後のシグナリング経路に関与する可能性が高い、膜貫通部位を持つ遺伝子に着目して、候補遺伝子の抽出と発現解析を行った。新たに *Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* が type I 味蕾細胞に発現することを示し、新たなマーカー遺伝子として利用可能であることを示した。

また、塩味を含む味の受容・伝達に関与する遺伝子の候補として *Ano1* を抽出し、その類縁のアノクタミンファミリーの遺伝子に注目した解析を行った。*Ano1*, *Ano7*, *Ano10* の 3 遺伝子が味蕾特異的にそれぞれ異なる細胞種に発現し、細胞種ごとに特徴的な応答特性をつくっていることが示唆された。

4-4-1 Type I 味蕾細胞に発現する遺伝子候補の抽出

本章で type I 味蕾細胞に発現する遺伝子の候補として取得した遺伝子の中から、実際に ISH を行った時に味蕾特異的な発現が確かめられたものは 40 遺伝子中 8 遺伝子と少ない。さらに、二重 ISH で細胞種を特定できる程度にはっきりとシグナルが観察される分子は少なかった。従来の味蕾マーカー遺伝子と同程度に発現するものとしては新たに 3 遺伝子、*Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* を見出した。これは、第 2 章の type II、第 3 章の type III の場合に比べてかなり率が悪い。

本研究における遺伝子の選別において、type I 味蕾細胞の場合は、WT-CvP と KO-CvP の比較を行う際に、「有意差がないもの」として選別を行っている。一般に、統計解析で「差がない」ということを統計的に扱うことはできず、「変化していないもの」を抽出するのは難しいことが一因であったと考えられる。また、type II、III の場合は発現変動しているというファクターが 1 種の味蕾特異的な遺伝子のフィルターとなり、味蕾特異的な遺伝子が取れやすかったと考えられる。

これらの点を改善するためには、有郭乳頭全体ではなく、単離味蕾細胞と味蕾を除去後の有郭乳頭を用いた DNA マイクロアレイ結果を比較し、味蕾特異的に発現する遺伝子をより厳密に選別する、という方法が考えられる。本研究で用いた基準と異なるものによる抽出についても考慮すべきである。

4-4-2 新たに type I 味蕾細胞に発現することを明らかにした遺伝子群

Ano1, *Kcne3* が type I 味蕾細胞に特異的に発現していることを示した。

Ano1 は近年同定されたアノクタミンファミリーの分子で、カルシウム依存性塩化物イオンチャネルとして機能することが報告されている。単離味蕾細胞を用いた電気生理学の実験により、味蕾細胞

におけるカルシウム依存性の塩化物イオンチャネル (calcium activated chloride channel; CaCC) の存在が示唆されている(Herness et al. 1999)。それを担うチャネルの分子実体やカルシウム依存性の塩化物イオン電流を発生させる味蕾細胞種は不明であった。Ano1 はこの CaCC の実態であるかもしれない。CaCC が味覚の受容・伝達を担っているかどうかは不明である。しかし CaCC が発現しているということは、type I 味蕾細胞の機能として、細胞内カルシウム濃度の変化を伴うメカニズムが想定できる。単離した味蕾において NaCl 刺激によるカルシウム応答が認められており、type I 味蕾細胞でもカルシウム応答が起こるとする本研究と合致する。

本研究で新たに type I 味蕾細胞に発現する遺伝子として同定された *Kcne3* は電位依存性カリウムチャネル (Isk-related) の β サブユニット (調節サブユニット) である。ポア領域を持つ α サブユニットと相互作用して、チャネルの開閉を調節する。*Kcne3* は電位センサー部位に作用してチャネルを常時開状態にし、電位依存性チャネルから漏洩チャネルに近い性質に変化させることが知られている (Schroeder et al., 2000)。 α サブユニットとしては *Kcnq1* が味蕾全体で発現している (Ohmoto et al., 2006)、これとヘテロマーを形成していることが予想できる。味蕾細胞を用いた電気生理学的実験では、type I 味蕾細胞は他の細胞種と異なり、漏洩性のカリウム電流を持つことが報告されており (Bigiani et al., 2001; Romanov et al., 2006; Vandenbeuch et al., 2009)、本研究ではこれと一致する知見が得られた。*Kcne3* は type I 特異的な膜電位特性を作っていると考えられる。一方、カリウムの漏洩チャネルが存在する細胞では活動電位の発生は起きないと考えられる。*Kcne3* を発現する細胞群はグリア細胞のように周囲の細胞を絶縁してベースラインを安定化させる役割をもっているのだろうか。この場合、type I 味蕾細胞が支持細胞または介在細胞であり味受容細胞ではないという説を支持する内容となる。二重 ISH では、*Kcne3* のシグナルは *Entpd2* のシグナルに内包されていた。type I 味蕾細胞の一部はこのような活動電位を発生しない細胞群であるかもしれない。Type I 味蕾細胞を分類する新たなマーカー分子としての有用性も考えられる。

4-4-3 Ano1 の局在から推測される機能

これまでに Ano1 タンパク質の抗体染色などにより細胞内局在が示された例では、多くの場合頂端側に存在すると報告されている (Yang et al., 2008; Schreiber et al., 2010)。気道上皮組織や腸管上皮組織では、水や電解質を気道または管腔へと排出し、粘膜のクリアランスや細胞の体積調節を行っていることが推定されている (Rock et al., 2009; Almaca et al., 2009)。味蕾における *Ano1* もこれらと同様に、口腔内の味孔付近に存在する味物質を洗い流して味蕾付近の化学的・物理的環境を維持し味物質に対する応答の感度を保っている可能性がある。また、味蕾細胞の頂

端部に局在することは味物質に接触し得るということであり、受容体として働いている可能性もある。

これまで *Ano1* の機能が示されてきたのは GPCR の下流において cAMP やイノシトールリン酸シグナリングを介するカルシウム濃度上昇が知られている組織である。Type I 味蕾細胞は *Plcb2* および *IP₃R3* によるカルシウム濃度の上昇機構を持たない細胞群であり、*Ano1* の開口に必要な細胞内カルシウム濃度上昇を担うメカニズムはどのようなものかは疑問として残る。これに関しては、単離味細胞を用いたカルシウムイメージング実験で、酸味や塩味に応答する、type II 味蕾細胞以外の細胞でも味刺激によりカルシウム濃度の上昇が起こることが示唆されている(Chandrashekar et al., 2010)。Type I 味蕾細胞では陽イオンチャネルを介するなどの方法で細胞内カルシウム濃度の上昇機構が存在する可能性がある。

Ano1 の味蕾における機能解析を行うにはいくつか課題が存在する。*Ano1* のノックアウトマウスは気道の発生異常のために生後 10 日程度で死ぬ(Rock et al., 2008)。この時期には乳頭や味蕾が発達していないため、通常の解析は行えない。機能解析を行うには、味蕾特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域を用いて、部位特異的なノックアウトマウスを作出する必要があるだろう。また、*Ano1* のカルシウム依存性塩化物イオンチャネルとしての機能が同定されたのが 2008 年とごく最近であり、*Ano1* に特異的な阻害剤はみつかっていない。他の塩化物イオンチャネルと共通な阻害剤は存在するものの、味蕾には他の塩化物イオンチャネルの発現も報告されているため、解析に用いることが難しい。

4-4-4 アノクタミンファミリーの細胞種特異的発現

さらに、本研究ではアノクタミンファミリーの 3 遺伝子がそれぞれ異なる細胞種に特異的に発現することを示した。すなわち、有郭乳頭では *Ano1* が type I 味蕾細胞に、*Ano7* が type II 味蕾細胞全体に、*Ano10* が type II 味蕾細胞の一部である苦味細胞に特異的に発現していた。これらは同じファミリーに属しているが、チャネルとしての性質が異なる(Schreiber et al., 2010)。味蕾細胞ではこれらのアノクタミンファミリーをどのように使い分けているかは興味深い点である。

総合討論

総合討論

本研究は、味蕾細胞に発現する遺伝子を細胞種ごとにプロファイリングし、味蕾で機能する遺伝子を新たに同定することを目的としたものである。当研究室で行われてきた DNA マイクロアレイ解析による味蕾特異的に発現する遺伝子の抽出法を土台にして、味蕾では細胞種ごとに機能が異なるという近年の研究を踏まえ、味蕾細胞種ごとに発現する遺伝子を効率よく抽出・同定することを目指した。また、その方法論を用いて得た味蕾細胞種ごとのプロファイルを利用して、味蕾細胞の機能を分子的に説明することを試みた。

まず、第 1 章の研究で、**Skn-1** ノックアウトマウスを用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、味蕾細胞種特異的に発現する遺伝子を効率的に抽出できることを示した。味蕾細胞種の割合が変化している遺伝子改変マウスを用いることにより、味蕾細胞種に注目した解析を従来に比べて飛躍的に効率化することに成功した。第 2 章の研究で、**type II** 味蕾細胞についての解析を行い、味蕾細胞と味神経の相互作用についての分子知見を得ることを試みて、シナプスを形成しないが、神経との連絡が行われていることを示唆する結果を得た。第 3 章の研究で、**type III** 味蕾細胞の前シナプス細胞としての性質に注目した解析を行った。**type III** 味蕾細胞に特異的に発現する前シナプス分子であるコンプレキシン II のノックアウトマウスの解析を行い、**type III** 味蕾細胞から味神経への酸味情報の伝達におけるシナプスの重要性を示すことができた。第 4 章では、分子知見の少ない **type I** 味蕾細胞において、新たなマーカー分子となり得るものを取得することができたことを述べた。また、膜貫通分子を探索し、**type I** 味蕾細胞の反応性や膜電位特性について考察する材料となる分子知見も加えた。

本研究では、**type II** 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子を 10 遺伝子、**type III** 味蕾細胞に発現する遺伝子を 8 遺伝子、**type I** 味蕾細胞に特異的に発現する遺伝子を 5 遺伝子、計 23 遺伝子を新たに取得することができている。これまで、味蕾に特異的に発現することが報告されている遺伝子が 100 遺伝子ほどであることに比べると、加えることができた知見は大きい。これだけ多くの味蕾特異的な遺伝子を細胞種に関する情報も加えてシステマティックに抽出し、同定する方法はこれまでに存在しなかった。

本研究で行った解析は、今後の味覚研究の発展に大いに貢献するものであると考え、以下に本研究の将来展望を述べる。

味覚研究における遺伝子発現解析の将来

これまでに本研究室では DNA マイクロアレイ解析を利用して味蕾に特異的に発現する遺伝子の探索を行ってきた。この方法論は従来のサブトラクション法やコロニーハイブリダイゼーション法

に比べ、多数の遺伝子に対する一覽性やサンプル間のデータ比較の容易さにおいて圧倒的に有利である。しかし、味蕾と味蕾を含まない上皮組織との比較では、味蕾全体に多く発現する遺伝子が抽出されやすく、一部の細胞のみに発現する遺伝子は抽出が困難であった。また、この従来法では DNA マイクロアレイのデータからだけでは、抽出した遺伝子が、type I ～ III のどの細胞種に発現しているかを特定することはできなかった。目的の細胞種で発現する遺伝子を取得するためには、味蕾特異的な発現をするものの抽出を行った上で、さらに二重染色・二重染色を行って初めて同定できるという 2 段階を踏まねばならず、多くの遺伝子に対してこの方法を用いるのは現実的ではなかった。味蕾細胞における味細胞種の機能分担が明らかになってきた現在、ある遺伝子がどの味細胞種に発現しているかという問題は極めて重要であり、細胞種特異的な解析が可能な方法への改善が必要とされていた。

本研究では、味蕾の細胞種の割合が変化する遺伝子改変マウスである *Skn-1* ノックアウトマウスを使用して、DNA マイクロアレイ解析を行った。野生型マウスと *Skn-1* ノックアウトマウスの間での発現値を比較すると、type II 味蕾細胞が消失し、type III 味蕾細胞が増加するという表現型を反映した結果が明確に得られた。ここから、DNA マイクロアレイ解析で得られる数値を指標として、各味蕾細胞種に特異的に発現する遺伝子の候補を抽出することが可能であることを示した。DNA マイクロアレイ解析のみで味蕾細胞種特異的に発現する候補遺伝子が選別できるようになるという大幅な効率化を達成できた。

味覚やその他の感覚の研究においては、種々の遺伝子改変マウスが作出されている。当初は機能解析を行う目的で作製されたものでも (*Skn-1* ノックアウトマウスも、もともとは味蕾細胞の分化機構を研究するために作製された)、DNA マイクロアレイ解析を行うことにより、発現解析に利用可能である遺伝子改変マウスが多数存在している。主に味覚に関係するものを次に挙げる。

- ・ 特定の味蕾細胞種を消失させたマウス

ジフテリア毒素 (DTA) を味蕾細胞種特異的に発現する遺伝子のプロモーター下で発現させると、細胞死が誘導され、その細胞種が消失する。*T1R3* (甘味・旨味細胞)、*T2R5* (苦味細胞)、*Pkd2l1* (酸味細胞) のプロモーター下で DTA を発現させたマウスが報告されている (Huang et al., 2006; Chandrashekar et al., 2009)。細胞が消失している場合は感度良く検出できる可能性が高いことが *Skn-1* ノックアウトマウスの事例から分かっており、良い結果を残せる可能性が高い。

- ・ 特定の味蕾細胞種を蛍光標識したマウス

GFP などの蛍光標識物質を味蕾細胞種特異的に発現する遺伝子のプロモーター下で発現させる。*T1R3* (甘味・旨味細胞)、*Plcb2*、*TRPM5* (type II 味蕾細胞)、*Ggust* (有郭乳頭では苦味細胞)

胞)、*Gad1*(typeⅢ味蕾細胞)などの発現細胞を蛍光標識したトランスジェニックマウスが報告されている(Kim et al., 2006; Clapp et al., 2006; Ogura et al., 2002; kawaguchi et al., 2010)。これらから味蕾を吸引またはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションなどにより味蕾細胞を単離し、セルソーターを用いて蛍光標識された細胞のみを集めて発現解析に用いるという方法が考えられる。

方法論としては上記より煩雑だが、味蕾細胞レベルで解析できるため、より感度は上がると考えられる。良い品質の全 RNA を得られるプロトコルが確立できれば、強力なツールとなり得るだろう。

・ type I 味蕾細胞の発現解析に役立つマウス

今回、残された課題として挙げられるものの中に、type I 味蕾細胞に発現する遺伝子を選別する際の感度が type II・Ⅲに比べて劣るということがある。これは、統計解析を用いて選別を行っているため、「変化しない」ものを抽出するのは理論上できないことが大きな要因であると推測できる。また、抽出基準の中で味蕾全体と type I を分離できていない。これらの問題点は、type I 味蕾細胞の数や割合を特異的に変動させたマウスを作出して味蕾の遺伝子発現を解析することで解決できるだろう。例えば、type I 特異的に発現する遺伝子 *Entpd2*, *Ano1* などのプロモーターの下流に DTA を発現させて type I 味蕾細胞を消失させたマウスなどが考えられる。また、type II・type Ⅲ味蕾細胞を消失させたマウスを作出することも考えられる。例えば、*Skn-1* ノックアウトマウスと *Pkd2l1*-DTA マウスをかけあわせると type I 味蕾細胞だけが残ったマウスが得られると予想できる。

以上のように、DNA マイクロアレイ解析は大変有用であることが示されているが、弱点も存在する。全遺伝子の網羅的な解析ではなく、GeneChip 上に搭載されていない遺伝子は比較対象にできないということである。マウスの遺伝子数は約 30,000 遺伝子と言われている。今回用いた GeneChip “Mouse Genome 340 2.0”に搭載されているのは約 39,000 個の転写産物、うち約 34,000 が既知遺伝子由来のプローブセットであるとされているが(Affymetrix 社ホームページ http://www.affymetrix.com/jp/products_services/arrays/specific/mouse430_2.affx)、搭載されている遺伝子に偏りがあり、酸味受容体候補である *Pkd1l3*、味蕾細胞マーカーとして知られる *Ggust*, *IP3R3* などは載っていない。すなわち、探索対象とならずに見逃している遺伝子が存在する可能性を否定できない。それを克服するためには、次世代シーケンサーを用いた大規模シーケンセスにより発現プロファイリングを行う試みがある。DNA マイクロアレイ解析と併用すれば、より確かな結果を得られるだろう。

Type I 味蕾細胞の生理機能の解析

味蕾において、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味受容細胞と機能が分担されているが、それら既知味覚受容細胞以外の味蕾細胞の生理機能は不明である。塩味受容細胞は type I 味蕾細胞の一部と言われている。Type I 味蕾細胞が味蕾全体の約半数を占めるのに比べ、塩味に応答する細胞はごく一部でしかないことから、type I 味蕾細胞の中には、未だ同定されていない 5 基本味以外の味の受容細胞も含まれる可能性がある。実際、脂質レセプター *Gpr120* および *Gpr40* が味蕾細胞に発現しており、脂肪酸を味物質として検出しているという報告もある (Cartoni et al., 2010)。ただし、脂質は物性の違いなどから、口腔内に存在する体性感覚の受容器でも検知されている可能性が高く、第 6 の味とは一般的には認められていない。

こうした知見は、食品の「味」を根本から分類する契機を与えるものであり、味覚研究、ひいては食品研究分野においてこれらの味蕾細胞を対象とすることが今後の課題となる。これらの味蕾細胞の分子知見は非常に少なかったが、本研究で新たに取得した type I 味蕾細胞に特異的に発現する *Ano1* や *Sec61a1*, *Kcne3* は非常に有用である。これらの遺伝子の転写制御領域下に G-CaMP のようなカルシウム濃度感受性タンパク質 (Nakai et al., 2001) を発現するトランスジェニックマウスを作出し、乳頭の切片や単離味蕾細胞の味刺激に対するイメージング解析を行うことにより、蛍光強度の上昇を指標にして、種々の化学物質に対する細胞応答を解析し、甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞が受容する化学物質を同定することが可能となる (図 5-2)。また、このトランスジェニックマウスにおいて、G-CaMP の蛍光を指標にして味蕾細胞のソーティングを行い、上記のような遺伝子発現解析を行うこともでき、既知味覚受容細胞以外の味蕾細胞の新たな分子知見を取得し、それらの細胞における味覚受容の分子機構を解明することに繋がる。さらには、このような *ex vivo* スクリーニング系を用いて、味の応答を増加させるような物質 (例えば、塩感受性亢進物質や脂感受性亢進物質) や味の応答を減少させるような物質 (味抑制物質) といった機能性食品素材の探索を行うことなど、味覚研究と食品科学研究を融合した新たな研究を展開することができるだろう。

味蕾 - 味神経 - 脳のコーディング機構

味蕾において、異なる味は異なる味細胞で受容されることから、味蕾における味覚情報のコーディング機構の第一段階は細胞種依存的な受容であることが明らかになっている。一方、異なる味細胞で受容された呈味物質の情報が、個別の味として知覚されるまでの過程でどのように伝達され、識別されているのかに関しては、味覚研究における主たる課題として残っている。

旧来の神経生理学的解析では、*across-fiber* 仮説が支持されている。味神経の単一線維から

の神経応答解析では、複数の味に応答するものがほとんどであることが知られている (Ludy and Contreras, 1999; Verhagen et al., 2003; Sollars et al., 2006)。

それに対し、現在主流を占めているのは、labeled-line 仮説である。すなわち、味細胞、味神経とも特定の味についての情報の受容・伝達のみを行い、各味質の情報は異なる神経回路を介して脳まで伝達されるというものである。味神経から脳皮質味覚野まで、個々のニューロンが異なる味溶液に対して示す応答を記録すると、特定の味に対して最も強く応答する神経細胞の群は味の種類ごとに異なるクラスターを形成する (Yamamoto et al., 1989; Lundy and Contreras, 1999; Accolla et al., 2007; Chen et al., 2011) ことが示されている。

さらに、改変 κ -オピオイド受容体 RASSL (Receptor Activated Solely by a Synthetic Ligand) を甘味受容体である T1r2 発現細胞に導入したトランスジェニックマウスは無味の人工甘味料 spiradoline を嗜好するようになり (Zhao et al., 2003)、逆に RASSL を苦味受容体である T2r5 発現細胞に導入したトランスジェニックマウスは spiradoline を忌避するようになる (Mueller et al., 2005) という興味深い実験結果から、味を規定するのは味受容細胞の段階であると考えられる。味神経においては、甘味細胞・苦味細胞・酸味細胞から (味情報とは限らないが) 入力を受ける味神経ではそれぞれ遺伝子発現が異なることが示されている (前田、博士論文、2010)。

以上から、甘味・旨味・苦味細胞は G タンパク質の下流のシグナル伝達経路が共通であり、神経伝達についても、pannexin1 による ATP の放出という共通の機構で行われると推定されているが、味蕾細胞と味神経との相互作用は type II 味蕾細胞の中で共通ではなく、甘味・旨味・苦味の味質ごとに異なると考えられる。

本研究での type II 味蕾細胞と味神経の相互作用を担う分子の候補として取得された分子の mRNA はほとんどが甘味細胞または苦味細胞のどちらかに特異的に発現している様子が観察された。これは甘味と苦味で分離した味質レベルでの接続機構を示唆しているものと考えられる。残念ながら機能解析までには至らなかったが、味神経側の相互作用分子の特定や、神経細胞の誘導実験などを通して、味神経誘導・接続機構の詳細を解析していきたい。

味覚と摂食行動の関わり

哺乳類においては基本的に、甘味・旨味・低濃度の塩味は正の摂食行動を引き起こし、酸味・苦味・高濃度の塩味は負の摂食行動 (忌避行動) を引き起こす。しかし、他にも摂食行動を制御する因子は多く、味覚以外の五感の情報、血糖値、消化管からの迷走神経の信号、レプチン、各種の摂食関連ニューロペプチドなどが存在する。そこに味覚がどのように、そしてどの程度寄与しているのかということは味覚研究を行う上で非常に興味深い。

本研究では Cplx2 ノックアウトマウスを用いて 2 種の行動試験、神経応答の記録を行った。神経応答では低濃度ではほぼ応答が消失したのに比較し、**brief access test** で有意差は見られたが、応答が消えたわけではない。二瓶選択試験では差が見られなかった。前者ほど関与している因子が少ない系であり、後者ほど入力情報と中枢を介した認識・判断の多い系の結果である。中枢を介した行動を評価する試験では、嗅覚や消化管を介した摂取後効果や記憶学習などの情報も影響していると考えられる。

今回は神経応答を行ったため、酸味伝達に対する味蕾・味神経間シナプスの寄与を示すことができた。これは、二瓶選択試験のような摂食行動で差が見られなかったことが、直接異常がないことに結びつくわけではないことを示す結果でもある。摂食関連ニューロペプチドのノックアウトマウスでは有意な体重変化、摂食量変化が見られない場合も報告されている(Näslund and Hellström, 2007)。摂食行動について研究を行う上で、考慮すべき因子は多く、実際は異常があっても有意差が出ない可能性もあることは肝に銘じておくべきだ。味覚の研究をする際には、関連因子の影響を除いた実験法を習得または新たに確立することが重要である。

しかし、その一方で、最終的に大切になるのはアウトプットで行動に反映されるかという点である。食品化学の一分野としての味覚研究を行う上で、味覚とその他の摂食関連因子との相互作用を解析していくことや、味覚の寄与を増大させる要因を探ることについても今後の課題としたい。

以上のように、本研究を基盤として新たに味覚研究を展開することが可能である。本研究により得られた知見を、今後の食と味覚の研究に生かしていきたい。

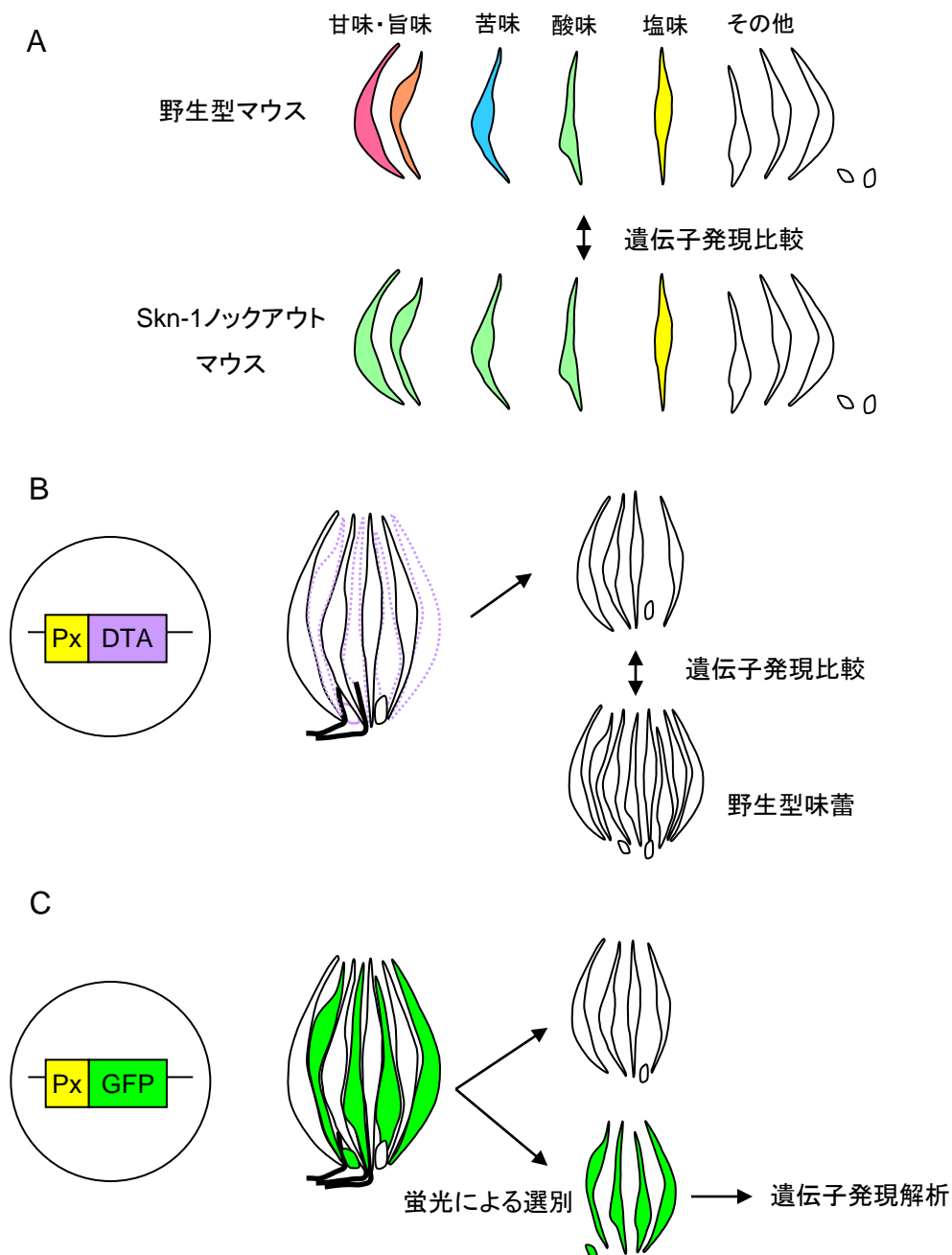


図5-1 味蕾の機能解明のための遺伝子改変マウスの作出例

A Skn-1ノックアウトマウス

B 特定の細胞に細胞を死に至らしめるような毒素を発現させた個体を作成する。特定の細胞が消失するので、個体レベルでの味受容伝達機能、味蕾レベルでの遺伝子発現を野生型と比較することができる。DTA: ジフテリア毒素。紫の点線は毒素の発現により細胞が消失していることを示す。

C 特定の細胞にGFPを発現する個体を作成する。蛍光を指標にして特定の細胞のみを選別し解析に使うことができる。Px: ある特定の細胞に発現する遺伝子Xのプロモーター。細胞の緑色はGFPの発現を示す。

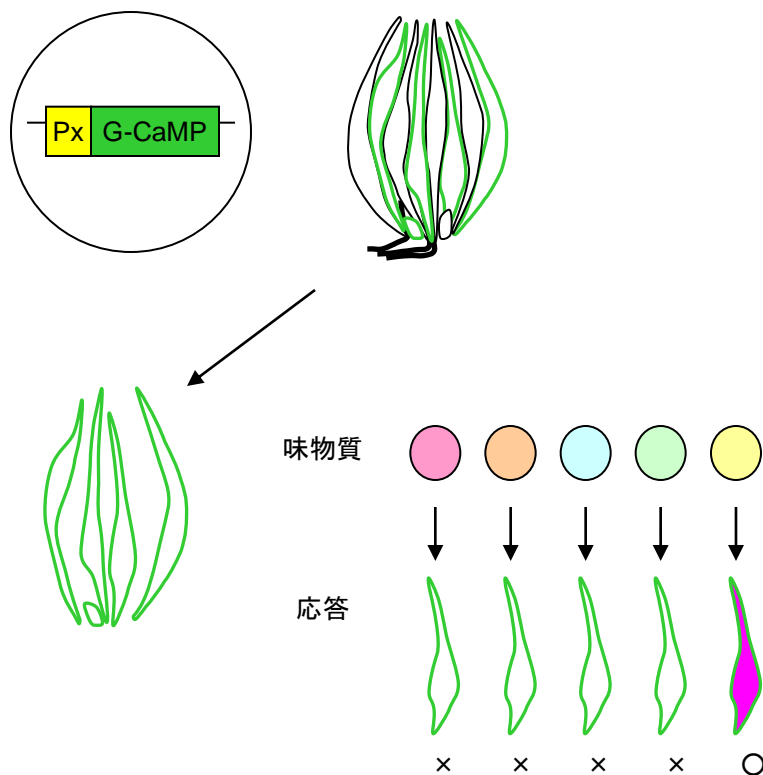


図5-2 カルシウム濃度感受性タンパク質を発現する遺伝子改変マウスの作出とその応用

特定の細胞にカルシウム濃度感受性タンパク質を発現するマウスを作出し、単離した味蕾細胞や乳頭切片を用いて味刺激に対するイメージング解析を行うことにより、その細胞が受容する化学物質を同定することが可能となる。

Px: ある特定の細胞に発現する遺伝子Xのプロモーター

G-CaMP: high-affinity Ca^{2+} probe composed of a single GFP

緑色で縁取りした細胞はG-CaMPを発現していることを表す。

参考文献

- Accolla R, Bathellier B, Petersen CC, Carleton A. (2007) Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci.* 27(6):1396-404
- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell.* 100(6):693-702.
- Almaça J, Tian Y, Aldehni F, Ousingsawat J, Kongsuphol P, Rock JR, Harfe BD, Schreiber R, Kunzelmann K. (2009) TMEM16 proteins produce volume-regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A. *J Biol Chem.* 284(42):28571-8.
- Asano-Miyoshi M, Kusakabe Y, Abe K, Emori Y. (1998) Identification of taste-tissue-specific cDNA clones from a subtraction cDNA library of rat circumvallate and foliate papillae. *J Biochem.* 124(5):927-33.
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol.* 497(1):1-12.
- Beidler LM, Smallman RL (1965) Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol.* 27(2):263-72.
- Bigiani (2001) Mouse Taste Cells With Glia like Membrane Properties *J Neurophysiol* 85:1552-1560
- Billig GM, Pál B, Fidzinski P, Jentsch TJ. (2011) Ca²⁺-activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nat Neurosci.* 14(6):763-9.
- Blednov YA, Walker DL, Iyer SV, Homanics G, Harris AR. (2010) Mice lacking Gad2 show altered behavioral effects of ethanol, flurazepam and gabaxadol. *Addict Biol.* 15(1):45-61.
- Braz JM, Rico B, Basbaum AI. (2002) Transneuronal tracing of diverse CNS circuits by Cre-mediated induction of wheat germ agglutinin in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(23):15148-53.
- Bráz JM, Basbaum AI. (2009) Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience.* 163(4):1220-32.

Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Sestan N, Molnár Z, Tarabykin V. (2008) Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. *Neuron*. 57(3):378-92.

Carr CM, Munson M. (2007) Tag team action at the synapse. *EMBO Rep*. 8(9):834-8.

Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak S. (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci*. 30(25):8376-82.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389(6653):816-24

Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*. 100(6):703-11.

Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 444(7117):288-94.

Chandrashekar J, Yarmolinsky D, von Buchholtz L, Oka Y, Sly W, Ryba NJ, Zuker CS. (2009) The taste of carbonation. *Science*. 326(5951):443-5.

Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*. 464(7286):297-301.

Chaudhari N, Roper SD. (2010) The cell biology of taste. *J Cell Biol*. 190(3):285-96.

Chen X, Gabitto M, Peng Y, Ryba NJ, Zuker CS. (2011) A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain. *Science*. 333(6047):1262-6.

Cho YK, Farbman AI, Smith DV (1998) The timing of alpha-gustducin expression during cell renewal in rat vallate taste buds. *Chem Senses*. 23(6):735-42.

Clapp TR, Medler KF, Damak S, Margolskee RF, Kinnamon SC. (2006) Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol*. 4:7.

Crescimanno C, Merigo F, Bernardi P, Osculati F, Sbarbati A. (2004) Neurochemistry of the gustatory subgemmal plexus. *Chem Senses*. 229(6):537-46.

DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, Chaudhari N. (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci*. 26(15):3971-80.

Dvoryanchikov G, Sinclair MS, Perea-Martinez I, Wang T, Chaudhari N. (2009) Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *J Comp Neurol*. 517(1):1-14.

Eckler MJ, McKenna WL, Taghvaei S, McConnell SK, Chen B. (2011) Fezf1 and Fezf2 are required for olfactory development and sensory neuron identity. *J Comp Neurol*. 519(10):1829-46.

Farbman AI, (1980) Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinet*. 13(4):349-57.

Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC. (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*. 310(5753):1495-9

Fujitani M, Yamagishi S, Che YH, Hata K, Kubo T, Ino H, Tohyama M, Yamashita T. (2004) P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve. *J Neurochem*. 91(3):737-44.

Fujiwara T, Mishima T, Kofuji T, Chiba T, Tanaka K, Yamamoto A, Akagawa K (2006) Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *J Neurosci*. 26(21):5767-76.

Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC. (1994) Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*. ;79(4):717-27.

Gibson HE, Reim K, Brose N, Morton AJ, Jones S. (2005) A similar impairment in CA3 mossy fibre LTP in the R6/2 mouse model of Huntington's disease and in the complexin II knockout mouse. *Eur J Neurosci*. 22(7):1701-12.

Glendinning JI, Gresack J, Spector AC (2002) A High-throughput Screening Procedure for Identifying

Mice with Aberrant Taste and Oromotor Function. *Chem. Senses* 27 (5): 461-474.

Guth L (1957) The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat Rec.* 128(4):715-31.

Hamamichi R, Asano-Miyoshi M, Emori Y (2006) Taste bud contains both short-lived and long-lived cell populations. *Neuroscience*. 141(4):2129-38.

Hanno Y, Nakahira M, Jishage K, Noda T, Yoshihara Y. (2003) Tracking mouse visual pathways with WGA transgene. *Eur J Neurosci*. 18(10):2910-4.

Herness MS, Sun XD. (1999) Characterization of chloride currents and their noradrenergic modulation in rat taste receptor cells. *J Neurophysiol*. 82(1):260-71.

Hevezi P, Moyer BD, Lu M, Gao N, White E, Echeverri F, Kalabat D, Soto H, Laita B, Li C, Yeh SA, Zoller M, Zlotnik A. (2009) Genome-wide analysis of gene expression in primate taste buds reveals links to diverse processes. *PLoS One*. 4(7):e6395.

Hisatsune C, Yasumatsu K, Takahashi-Iwanaga H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninomiya Y, Mikoshiba K (2007) Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem*. 282(51):37225-31.

Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*. 96(4):541-51.

Hoon MA, Ryba NJ (1997) Analysis and comparison of partial sequences of clones from a taste-bud-enriched cDNA library. *J Dent Res*. 76(4):831-8.

Horio N, Yoshida R, Yasumatsu K, Yanagawa Y, Ishimaru Y, Matsunami H, Ninomiya Y. (2011) Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS One*. 6(5):

Hosley MA, Hughes SE, Oakley B (1987a) Neural induction of taste buds. *J Comp Neurol*. 260(2):224-32.

Hosley MA, Hughes SE, Morton LL, Oakley B (1987b) A sensitive period for the neural induction of taste buds. *J Neurosci*. 7(7):2075-80.

Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*. 442(7105):934-8.

Huang GZ, Ujihara H, Takahashi S, Kaba H, Yagi T, Inoue S. (2000) Involvement of complexin II in synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus: the use of complexin II-lacking mice. *Jpn J Pharmacol*. 84(2):179-87.

Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD. (2007) The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(15):6436-41.

Huang YA, Dando R, Roper SD. (2009) Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci*. 29(44):13909-18.

Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(33):12569-74.

Ito A, Nosrat CA. Gustatory papillae and taste bud development and maintenance in the absence of TrkB ligands BDNF and NT-4. (2009) *Cell Tissue Res*. 337(3):349-59.

Jin Y, Garner CC. (2008) Molecular mechanisms of presynaptic differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 24:237-62. Review.

Kadohisa M, Rolls ET, Verhagen JV (2004) Orbitofrontal cortex: neuronal representation of oral temperature and capsaicin in addition to taste and texture. *Neuroscience*. 127(1):207-21.

Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Sévigny J, Kinnamon JC, Finger TE (2008) The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem Senses*. 33(3):243-54.

Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Maruyama Y, Yanagawa Y, Murakami S, Tominaga M. (2010) Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J Biol Chem*. 285(23):17277-81..

Kennedy MJ, Ehlers MD. (2011) Mechanisms and function of dendritic exocytosis. *Neuron*. 69(5):856-75.

Kim JW, Roberts C, Maruyama Y, Berg S, Roper S, Chaudhari N. (2006) Faithful expression of GFP from the PLCbeta2 promoter in a functional class of taste receptor cells. *Chem Senses*. 31(3):213-9.

Kim DJ, Roper SD. (1995) Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol*. 353(3):364-70.

Krimm RF. (2006) Mice lacking the p75 receptor fail to acquire a normal complement of taste buds and geniculate ganglion neurons by adulthood. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Bio*:1294-302.

Lawton DM, Furness DN, Lindemann B, Hackney CM. (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci*. 12(9):3163-71.

Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(7):4692-6.

Lundy RF Jr, Contreras RJ. (1999) Gustatory neuron types in rat geniculate ganglion. *J Neurophysiol*. 2(6):2970-88.

Matsumoto I, Emori Y, Ninomiya Y, Abe K (2001) A comparative study of three cranial sensory ganglia projecting into the oral cavity: in situ hybridization analyses of neurotrophin receptors and thermosensitive cation channels. *Brain Res Mol Brain Res*. 93(2):105-12.

Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K. (2011) Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci*. 14(6):685-7

Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*. 404(6778):601-4.

Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S, Margolskee RF (2001) Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet*. 28(1):58-63

Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Szepietowski P, Imhof BA. (2009)

Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis. *FASEB J.* 23(12):4105-16.

Miyoshi MA, Abe K, Emori Y (2001) IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chem Senses.* 26(3):259-65.

Montmayeur JP, Liberles SD, Matsunami H, Buck LB (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci.* 4(5):492-8.

Moyer BD, Hevezi P, Gao N, Lu M, Kalabat D, Soto H, Echeverri F, Laita B, Yeh SA, Zoller M, Zlotnik A. (2009) Expression of genes encoding multi-transmembrane proteins in specific primate taste cell populations. *PLoS One.* 4(12)

Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ (2005) The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature.* 434(7030):225-9. Erratum in: *Nature.* 446(7133):342.

Murray RG, Murray A. (1960) The fine structure of the taste buds of rhesus and cynomolgus monkeys. *Anat Rec.* 138:211-33.

Murray RG (1963) The ultrastructure of taste buds. I Friedmann, ed, Ultrastructure of sensory organs, Vol. I. *American Elsevier*, pp1-81

Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 19(2):137-41.

Näslund E, Hellström PM (2007) Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav.* 92(1-2):256-62.

Nelson GM, Finger TE. (1993) Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J Comp Neurol.* 336(4):507-16.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell.* 106(3):381-90.

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature.* 416(6877):199-202.

Ogura T, Margolskee RF, Kinnamon SC (2002) Taste receptor cell responses to the bitter stimulus denatonium involve Ca^{2+} influx via store-operated channels. *J Neurophysiol.* 87(6):3152-5.

Ohmoto M, Matsumoto I, Misaka T, Abe K (2006) Taste receptor cells express voltage-dependent potassium channels in a cell age-specific manner. *Chem Senses.* 31(8):739-46.

Ohmoto M, Matsumoto I, Yasuoka A, Yoshihara Y, Abe K (2008) Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells. *Mol Cell Neurosci.* 38(4):505-17.

Ohmoto M, Maeda N, Abe K, Yoshihara Y, Matsumoto I. (2010) Genetic tracing of the neural pathway for bitter taste in t2r5-WGA transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(4):734-8.

Oike H, Matsumoto I, Abe K (2006) Group IIA phospholipase A(2) is coexpressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J Comp Neurol.* 494(6):876-86.

Ousingsawat J, Martins JR, Schreiber R, Rock JR, Harfe BD, Kunzelmann K. (2009) Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca^{2+} -dependent chloride transport. *J Biol Chem.* 284(42):28698-703.

Radyushkin K, El-Kordi A, Boretius S, Castaneda S, Ronnenberg A, Reim K, Bickeböller H, Frahm J, Brose N, Ehrenreich H. (2010) Complexin2 null mutation requires a 'second hit' for induction of phenotypic changes relevant to schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 9(6):592-602.

Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Südhof TC, Brose N, Rosenmund C. (2001) Complexins regulate a late step in Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release. *Cell.* 104(1):71-81.

Rochlin MW, O'Connor R, Giger RJ, Verhaagen J, Farbman AI. (2000) Comparison of neurotrophin and repellent sensitivities of early embryonic geniculate and trigeminal axons. *J Comp Neurol.* 422(4):579-93.

Rock JR, Futtner CR, Harfe BD. (2008) The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea. *Dev Biol.* 321(1):141-9.

Rock JR, O'Neal WK, Gabriel SE, Randell SH, Harfe BD, Boucher RC, Grubb BR. (2009) Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca^{2+} -regulated Cl^- secretory channel in mouse airways.

J Biol Chem. 284(22):14875-80.

Romanov RA, Kolesnikov SS. (2006) Electrophysiologically identified subpopulations of taste bud cells. *Neurosci Lett.* 395(3):249-54.

Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF, Kolesnikov SS (2007) Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 26(3):657-67.

Romanov RA, Rogachevskaja OA, Khokhlov AA, Kolesnikov SS (2008) Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. *J Gen Physiol.* 132(6):731-44

Schoch S, Deák F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Südhof TC, Kavalali ET. (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science.* 294(5544):1117-22.

Schreiber R, Uliyakina I, Kongsuphol P, Warth R, Mirza M, Martins JR, Kunzelmann K. (2010) Expression and function of epithelial anoctamins. *J Biol Chem.* 285(10):7838-45.

Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, Bleich M, Warth R, Greger R, Jentsch TJ. (2000) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature.* 403(6766):196-9.

Seta Y, Kataoka S, Toyono T, Toyoshima K. (2007) Immunohistochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in mouse taste buds and developing taste papillae. *Histochem Cell Biol.* 127(4):415-22.

Shimizu T, Hibi M. (2009) Formation and patterning of the forebrain and olfactory system by zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2*. *Dev Growth Differ.* 51(3):221-31.

Shindo Y, Miura H, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ninomiya Y, Hino A, Kanda T, Kusakabe Y (2008) G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(3):504-8.

Sinclair MS, Perea-Martinez I, Dvoryanchikov G, Yoshida M, Nishimori K, Roper SD, Chaudhari N. (2010) Oxytocin signaling in mouse taste buds. *PLoS One.* 5(8)

Sollars SI, Walker BR, Thaw AK, Hill DL.(2006) Age-related decrease of the chorda tympani nerve terminal field in the nucleus of the solitary tract is prevented by dietary sodium restriction during

development. *Neuroscience*. 137(4):1229-36

Stephan AB, Shum EY, Hirsh S, Cygnar KD, Reisert J, Zhao H. (2009) ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(28):11776-81.

Sun YG, Gao YJ, Zhao ZQ, Huang B, Yin J, Taylor GA, Chen ZF. (2008) Involvement of P311 in the affective, but not in the sensory component of pain. *Mol Pain*. 4:23.

Takahashi S, Ujihara H, Huang GZ, Yagyu KI, Sanbo M, Kaba H, Yagi T. (1999) Reduced hippocampal LTP in mice lacking a presynaptic protein: complexin II. *Eur J Neurosci*. 11(7):2359-66.

Takai A, Inomata H, Arakawa A, Yakura R, Matsuo-Takasaki M, Sasai Y. (2010) Anterior neural development requires Del1, a matrix-associated protein that attenuates canonical Wnt signaling via the Ror2 pathway. *Development*. 137(19):3293-302.

Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Uchida N, Kawakoshi K. (2004) Expression of GDNF and GFR alpha 1 in mouse taste bud cells. *J Comp Neurol*. 479(1):94-102.

Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Uchida N, Kawakoshi K. (2005) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and GDNF family receptor alpha1 in mouse taste bud cells after denervation. *Anat Sci Int*. 80(2):105-10.

Taylor GA, Rodriguiz RM, Greene RI, Daniell X, Henry SC, Crooks KR, Kotloski R, Tessarollo L, Phillips LE, Wetsel WC. (2008) Behavioral characterization of P311 knockout mice. *Genes Brain Behav*. 7(7):786-95.

Tizzano M, Dvoryanchikov G, Barrows JK, Kim S, Chaudhari N, Finger TE (2008) Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci*. 9:110.

Vandenbeuch A, Clapp TR, Kinnamon SC. (2008) Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci*. 2008 Jan 2;9:1.

Vandenbeuch A, Kinnamon SC. (2009) Why do taste cells generate action potentials? *J Biol*. 8(4):42.

Verhagen JV, Giza BK, Scott TR. (2003) Responses to taste stimulation in the ventroposteromedial

nucleus of the thalamus in rats. *J Neurophysiol.* 89(1):265-75.

Vilbig R, Cosmano J, Giger R, Rochlin MW. (2004) Distinct roles for Sema3A, Sema3F, and an unidentified trophic factor in controlling the advance of geniculate axons to gustatory lingual epithelium. *J Neurocytol.* 33(6):591-606.

Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez-Bendito G, Molnár Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD, Wilson MC. (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci.* 5(1):19-26.

Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature.* 381(6585):796-800. Erratum in: *Nature* 383(6600):557.

Yamamoto K, Ishimaru Y, Ohmoto M, Matsumoto I, Asakura T, Abe K. (2011) Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from Pkd1l3-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae. *J Neurochem.* 119(3):497-506.

Yamamoto T, Matsuo R, Kiyomitsu Y, Kitamura R. (1989) Response properties of lateral hypothalamic neurons during ingestive behavior with special reference to licking of various taste solutions. *Brain Res.* 481(2):286-97.

Yamasaki H, Kubota Y, Takagi H, Tohyama M. (1984) Immunoelectron-microscopic study on the fine structure of substance-P-containing fibers in the taste buds of the rat. *J Comp Neurol.* 227(3):380-92.

Yan W, Sunavala G, Rosenzweig S, Dasso M, Brand JG, Spielman AI. (2001) Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280(4):C742-51.

Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* 455(7217):1210-5.

Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJ. (2009) Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell.* 139(2):234-44.

Yee CL, Yang R, Böttger B, Finger TE, Kinnamon JC. (2001) "Type III" cells of rat taste buds:

immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol.* 440(1):97-108.

Yee C, Bartel DL, Finger TE. (2005) Effects of glossopharyngeal nerve section on the expression of neurotrophins and their receptors in lingual taste buds of adult mice. *J Comp Neurol.* 490(4):371-90.

Yoshida R, Horio N, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. (2009) NaCl responsive taste cells in the mouse fungiform taste buds. *Neuroscience.* 159(2):795-803.

Yoshihara Y, Mizuno T, Nakahira M, Kawasaki M, Watanabe Y, Kagamiyama H, Jishage K, Ueda O, Suzuki H, Tabuchi K, Sawamoto K, Okano H, Noda T, Mori K. (1999) A genetic approach to visualization of multisynaptic neural pathways using plant lectin transgene. *Neuron.* 22(1):33-41.

Ypsilanti AR, Zagar Y, Chédotal A. (2010) Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development.* 137(12):1939-52.

Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell.* 112(3):293-301.

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell.* 115(3):255-66

Zylka MJ. (2005) Nonpeptidergic circuits feel your pain. *Neuron.* 47(6):771-2.

應本真 (2006) 博士論文

平松美和子 (2006) 修士論文

笠原雅代 (2007) 修士論文

前田尚廣 (2010) 博士論文

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成21年度博士課程 進学

氏 名 黒川 あずさ

指導教員名 三坂 巧

論文題目 マウス味蕾における細胞種特異的な遺伝子発現プロファイルの解析

食品中の呈味物質は、口腔内上皮層の味蕾という組織に存在する味細胞で受容される。近年、味覚受容体、ならびにその下流の細胞内情報伝達関連分子が同定され、味覚の受容・伝達メカニズムが分子生物学的に解明されてきた。その結果、甘味・旨味・苦味・酸味・塩味の 5 基本味は、それぞれ異なる味細胞で受容されることが明らかにされた。電子顕微鏡像から特定された type I ～Ⅲの味蕾細胞種のうち、type II が甘味・旨味・苦味受容細胞、type III が酸味受容細胞、type I が塩味受容細胞を含むその他の細胞群に相当する。それぞれが受け持つ機能に応じて、シグナル伝達因子の発現、膜電位特性、細胞分化機構、神経との接続様式などが異なっていると推定されている。したがって、細胞種に注目した遺伝子発現プロファイルを解析することによって、より効率的に、味蕾細胞種ごとに機能する新たな分子の知見が得られることが期待された。

Type II 味蕾細胞に特異的に発現する転写因子 *Skn-1a* を欠損させたマウス (*Skn-1* ノックアウトマウス) は、甘味・旨味・苦味細胞が消失しており、それらの細胞に相当する数の酸味細胞が増加しているという特徴を持っている。この遺伝子改変マウスを用いて、味蕾細胞における遺伝子発現プロファイルを詳細に解析することで、特定の味蕾細胞種に発現する遺伝子を効率的に同定できるのではないかと考え、本研究を実施した。

本論文では、第 1 章にて **Skn-1** ノックアウトマウスの有郭乳頭上皮を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果を、野生型のものと比較することにより、味蕾細胞種特異的に発現する候補遺伝子を抽出できることを示した。第 2 章から第 4 章は各論であり、第 1 章において作成した細胞種ごとの遺伝子発現プロファイルから発展して行った研究の事例を示す。そのうち、第 2 章では、**type II** 味蕾細胞と味神経の相互作用を行う候補分子を取得し、**type II** 味蕾細胞はシナプスを持たないが、神経との連絡が行われていることを示唆する結果を述べた。第 3 章では、**type III** 味蕾細胞に発現する前シナプス分子群を新たに同定し、そのうちの一つであるコンプレキシン II をノックアウトしたマウスにおいて酸味に対する感受性が顕著に低下することを示した。第 4 章では、**type I** 味蕾細胞に特異的に発現する膜貫通分子を探索し、**type I** 味蕾細胞の反応性、膜電位特性を浮き彫りにする試みについて論述した。

第 1 章 **Skn-1** ノックアウトマウスを用いた味蕾細胞種特異的な遺伝子の選別

野生型マウスの有郭乳頭上皮 (**WT-CvP**)、野生型マウスの乳頭外の舌上皮 (**WT-Np**)、**Skn-1** ノックアウトマウスの有郭乳頭上皮 (**KO-CvP**) の 3 種のサンプルについて、DNA マイクロアレイ解析を行った。まず味蕾に特異的に発現する遺伝子を抽出するため、**WT-CvP** での発現数値が **WT-Np** に対して有意に大きいプローブセットを選別した (**Welch's t-test**, **FDR**<0.1)。この中で **WT-CvP / WT-Np** 比が 2 以上のものは 5272 個、5 以上のものは 1610 個が抽出された。

次に、味蕾で細胞種特異的に発現することが既知の遺伝子群のデータに注目し、**KO-CvP** と **WT-CvP** の間の遺伝子発現変動と細胞種との関連を解析した。**Skn-1** ノックアウトマウスにおいては **type II** 細胞が消失し、**type III** 細胞が増加しているので、遺伝子発現プロファイルにおいてもその特徴が反映されていると期待された。実際、**type II**・**type III** に発現する遺伝子群では **KO** で **WT** に比べ有意に低下または上昇している一方、**type I** または味蕾全体に発現する遺伝子群では **KO** と **WT** で差が見られなかった。分離の指標として **KO-CvP** の **WT-CvP** に対する **fold change** の値 (**KO-CvP / WT-CvP**) を用いた。**type II** に発現する遺伝子の 90 % 以上では **fold change** が 0.5 より小さくなり、**type III** に発現する遺伝子の 95 % 以上では **fold change** が 2 より大きくなった。これを指標として、取得した味蕾発現プロファイルから **type II**、**type III** に特異的に発現する候補遺伝子を抽出した。また、**type I** 細胞および味蕾全体に発現する候補遺伝子として、**WT-CvP** と **KO-CvP** の間に発現量の有意差がなく、**fold change** が 0.7 より大きく 1.5 より小さい遺伝子を抽出した。このようにして抽出された候補遺伝子群のいくつかは、*in situ* ハイブリダイゼーション (**ISH**) による発現解析から、予想された細胞腫に発現していることを実験的に明らかにした。

味蕾の細胞腫が変化した遺伝子改変マウスを利用した本解析手法により、細胞種特異的に発現する候補遺伝子を抽出する作業が飛躍的に効率化した。特定の味蕾細胞で機能する遺伝子を同定する上で、有力な手段であることが示された。

第2章 Type II 味蕾細胞に発現する神経接続因子の探索

Type II 味蕾細胞では、甘味・旨味・苦味の受容伝達機構はよく解明されている。しかし、type II 味蕾細胞はシナプス構造を持っておらず、味蕾細胞から味神経への味情報伝達の詳細や、その伝達様式が味質によって異なるのかなど、不明点が多い。また、特定の味の受容細胞がその味を伝達する味神経とどのように識別し合うかも未解明である。

Type II 味蕾細胞と味神経との接続機構についての分子的知見を得るために、type II 味蕾細胞に特異的に発現する候補遺伝子のアノテーションの中から、Biological Process に関する Gene Ontology term で検索を行い、“nervous system development”、“axon guidance”、“cell adhesion”、またはそれらの下位の term を持つものを抽出した。その結果、11 遺伝子が抽出され、そのうち 9 遺伝子が有郭乳頭で味蕾特異的に発現していることを ISH により明らかにした。特に発現が強い遺伝子について二重 ISH により発現細胞種を詳細に調べたところ、*Gfra2*, *Srp2* が甘味細胞に、*Slit2*, *D0H4S114(p311)*, *Edil3* が苦味細胞に特異的に発現していた。これらのうち、*Slit2*, *Gfra2* については相互作用する分子が同定されている。*Slit2* の受容体である *Robo1/2* の発現を味神経の細胞体を含む神経節で調べたところ、*Robo2* が発現していることを見出し、味神経と type II 味蕾細胞の相互作用が存在することを新たに提唱することができた。

第3章 Type III 味蕾細胞に発現する前シナプス分子の探索と *Cplx2* ノックアウトマウスの解析

Type III 味蕾細胞は、唯一シナプスを持つ味蕾細胞種である。既知の前シナプス分子のうち、type III 味蕾細胞ではどの分子種が発現しているのかについて、DNA マイクロアレイ解析結果から候補分子を抽出し、組織学的な解析を実施した。その結果、type III 味蕾細胞特異的に発現する前シナプス分子として、*Cplx2*, *Syt7*, *Stxbp1*, *Cadps*, *Scg5*, *Pclo* の 6 種を新たに同定した。

Cplx2 (コンプレキシン II) は、シナプス小胞の膜融合を制御する分子で、今回 type III 味蕾細胞特異的に発現していることを見出した。type III 味蕾細胞のシナプスと酸味受容の必要十分性を理解するために、*Cplx2* ノックアウトマウスを解析した。ノックアウトマウスの味蕾では、野生型と同様に他の分子種のコンプレキシンは発現しておらず、味覚受容体、その他の味蕾細胞種マーカー遺伝子、主要な前シナプス遺伝子の発現は野生型と同様であった。味嗜好性の変化を調べるために、5 基本味の溶液に対する行動試験を行ったところ、酸味を忌避する閾値が上昇し、その感受性が低下していることが分かった。さらに口腔内味溶液刺激に対する鼓索神経・舌咽神経の応答を調べたところ、低濃度の酸味に対する応答がほぼ消失していることが分かった。しかし、酸味に対する応答は完全には消失していないことから、type III 味蕾細胞を介さない酸味認識機構も存在することが示唆された。酸味以外の味については行動試験、味神経応答ともに有意な差は見られなかった。したがって、酸味の伝達におけるシナプスを介した神経連絡の重要性が示された。

第4章 Type I 味蕾細胞に発現する膜貫通分子の探索

Type I 味蕾細胞は、長らく味受容細胞なのか支持細胞なのか不明であった。近年、type I 味蕾細胞の一部が塩味の受容を担うという知見が得られている。塩味の受容を含む味物質に対する応答に関与する遺伝子は、細胞膜に局在すると考えられる。前述のDNAマイクロアレイ解析によって選別された type I 味蕾細胞(または味蕾全体)に特異的に発現する候補遺伝子のうち、膜貫通領域を持つものをタンパク質情報データベース UniProt および膜貫通部位予測プログラム SOSUI を用いて抽出し、ISH を行って味蕾での発現を調べた。このうち、味蕾全体ではなく一部の味蕾細胞に特異的に強い発現が見られた *Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* については二重 ISH を行い、type I 味蕾細胞に特異的に発現していることを確認した。

Kcne3 は電位依存性カリウムチャネルの β サブユニット(調節サブユニット)である。電位センサー部位に作用してチャネルを常時開状態にし、電位依存性チャネルから漏洩チャネルに近い性質にすることが知られている。 α サブユニットとしては味蕾全体に *Kcnq1* が発現しており、これとヘテロマーを形成して type I に特徴的な膜電位特性を構築していると考えられる。

Ano1 は、近年新たに同定されたカルシウム依存性塩化物イオンチャネルである。*Ano1* の抗体染色を行ったところ、味物質と接する味孔付近に局在していた。*Ano1* の発現から type I 味蕾細胞が細胞内カルシウム濃度の上昇に応答する機構を持つことが示唆された。さらに、*Ano1* に類縁のアノクタミンファミリー遺伝子 10 種について味蕾での発現を ISH により調べたところ、*Ano1* に加えて *Ano7*, *Ano10* が味蕾特異的に発現していた。しかし、互いに発現する細胞種が異なり、*Ano7* は甘味・旨味・苦味細胞の全体に、*Ano10* は苦味細胞に特異的に発現していた。*Ano1*, *7*, *10* は同じファミリーの遺伝子であるがイオンチャネルとしての特性が異なることから、細胞種ごとの反応性や膜電位特性の差に寄与していると考えられる。

今回の研究では、味蕾の細胞種ごとの遺伝子発現プロファイルの解析を行い、味蕾細胞の特性と密接に関わる遺伝子の発現情報をデータベース化することができた。ここには、味蕾を構成する様々な細胞の分化や、機能に関する分子知見が含まれている。各味蕾細胞種について得たこの事例は、今後の味覚研究に新たな端緒を与えるものと期待する。

謝辞

本研究は、大勢の方々のご指導、ご鞭撻、ご協力により成し遂げることができました。以下に謝意を述べさせていただきます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 生物機能開発化学研究室 三坂巧准教授には、研究室生活全般にわたりご指導いただきました。有意義なディスカッションを通じて、本研究に対する深い洞察と的確なご助言を示していただきました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 阿部啓子特任教授には、研究室に配属されてから現在に至るまで、非常に熱心なご指導、ご鞭撻をいただきました。また、どんなときも温かく力強い言葉をかけてくださり、研究を行っていく上で何よりの励みになりました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 ILSI Japan 寄附講座 應本真特任助教には、実験手法やデータ分析を非常に丁寧にご指導頂きました。深く感謝いたします。アメリカでの益々のご活躍をお祈り申し上げます。

ドイツ栄養研究所 成川真隆博士には、動物の扱い方や動物行動実験、神経生理実験の方法を詳細にご指導頂きました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 日清食品寄付講座 石丸喜朗特任助教には研究内容、特に酸味に関する解析について、多くのアドバイスをいただきました。心より御礼申し上げます。

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 藍澤広行特任准教授、岡田晋治助教にはディスカッションを通じて多くの貴重なご意見を頂きました。心より御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科 前田尚廣博士には、組織化学実験にご助力いただきました。また、研究に関する多くのアドバイスを頂きました。心より御礼申し上げます。

生物機能開発化学研究室、ILSI Japan 寄附講座「機能性食品ゲノミクス」、日清食品寄附講座「味覚サイエンス」、食の安全研究センター 食品生体機能研究室の皆様には大変お世話になりました。お蔭で楽しく有意義な研究生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

最後に、いつも温かく見守り支え続けてくれた友人、家族、そして婚約者 三木順哉に感謝いたします。

2011 年 12 月 黒川 あずさ