

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12322

研究課題名(和文) イメージング解析を基盤とした味覚情報コーディング機構の研究

研究課題名(英文) The elucidation of taste coding mechanisms based on imaging techniques

研究代表者

岡田 晋治 (Okada, Shinji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任准教授

研究者番号：50376563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、味覚受容機構解明の基盤となり、また、様々な味物質・非味物質で構成される食品の味の総合的な評価を実現する解析系の構築を目指したものである。
Ca²⁺感受性蛍光タンパク質遺伝子を味蕾細胞に発現する複数系統の動物の作製に成功した。これらの動物を用いて、遺伝子導入によって味蕾細胞に発現したCa²⁺感受性蛍光タンパク質の蛍光観察による味蕾細胞の味刺激応答のイメージングを試みた。結果として、基本味の1つを呈する味溶液の刺激によって、わずかであるが有意に味蕾細胞における蛍光の変化を観察することが出来た。つまり、味刺激に対する味蕾細胞の応答を観察できた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms in taste reception, we have tried to build its assay system based on in vivo Ca²⁺-imaging technique. Two lines of transgenic animals expressing Ca²⁺-indicator proteins in their taste bud cells were successfully established. Slight but significant changes of fluorescence in their taste bud cells were observed after the stimulation of taste solution. Further improvement of this assay system would enable the evaluation of taste of foods with highly complicated composition and contribute to both the basic research of taste reception and the food product development.

研究分野：食品科学

キーワード：味覚 イメージング

1. 研究開始当初の背景

味覚は、生体にとって栄養となる物質と害となる物質とを判断するための、動物の生存にとって重要な化学感覚である。そして、食べ物の「おいしさ」を決める最も重要な要素である。

味覚感覚の理解のため、また応用的には「おいしい」食品の開発のため、味物質の受容の全容解明が求められている。近年、いくつかの味覚受容体分子が同定されたことから、これらを培養細胞にヘテロ発現させることで味物質受容機構の解明が進んできている。申請者のグループも甘、苦、旨味の受容機構について解析を行ってきた (Oike H. *et al.*, *J. Neurosci.*, 2007, Imada T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, Toda Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2013)。

一方、このような *in vitro* の解析系にはいくつかの問題点が存在する。例えば、酸味や高濃度塩味など受容体分子が同定されていない味については解析できないことや、*in vivo* と異なる細胞内シグナル伝達分子を用いること、苦味受容体はヒトで 25 種と多数でその全てを解析することが困難であることなどである。そして、応用的に強く求められているのは、様々な味物質・非味物質で構成される食品の味の総合的な評価であり、これを実現することは、個々の味覚受容体の解析からは非常に困難である。

これらの問題点を克服しうる手法として、*in vivo* やそれに近い状態で、味受容細胞群 (味蕾) の応答に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を解析する Ca^{2+} イメージング解析がある。これまでに、味蕾への Ca^{2+} 指示薬導入法が様々な検討されて、一定の成果を挙げってきた (Caicedo A. *et al.*, *J. Neurosci.*, 1999, Chandrashekar J. *et al.*, *Nature*, 2010)。一方、近年、GCaMP に代表される Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を標的細胞に発現させた遺伝子組換え動物を作出し、イメージング解析する手法が様々な神経系、受容組織に適用されて成果を挙げている (Zariwala H.A. *et al.*, *J. Neurosci.*, 2012)。この手法は、手技および条件設定が困難な Ca^{2+} 指示薬導入の過程を排除できることから、簡便性・再現性に優れているが、これまでに味蕾細胞の応答解析に適用された例はない。

本申請研究では、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を味覚受容組織である味蕾に発現する動物の作出およびそのイメージングにより、各味覚受容細胞の応答解析を実現する系の構築を目的とする。

2. 研究の目的

本申請研究では、各味覚受容細胞の応答解析系の構築を目的とする。また期間内に、成果発表を行うため、下記 3 を行う。

1. 味蕾全細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を発現するマウス系統の作出
2. マウス味蕾の Ca^{2+} イメージング解析

法の確立

3. 味蕾の Ca^{2+} イメージング解析による脂肪味受容細胞の同定

3. 研究の方法

メダカ苦味受容体 *mftas2r1* の遺伝子上流の発現制御領域ゲノム配列に Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 A の cDNA を接続したコンストラクトを作製した。このコンストラクトをメダカ受精卵に微量注入した。発生、孵化した個体からゲノムに遺伝子挿入された個体を選抜し、野生型メダカ個体と交配することによって系統化した (*mft2r1-A Tg* メダカ)。

メダカ β -アクチン (*mfactb*) の遺伝子上流の発現制御領域ゲノム配列に Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 A の cDNA を接続したコンストラクトを作製した。このコンストラクトをメダカ受精卵に微量注入した。発生、孵化した個体からゲノムに遺伝子挿入された個体を選抜し、野生型メダカ個体と交配することによって系統化した (*mfactb-A Tg* メダカ)。

Tg メダカ稚魚を味溶液で刺激した後、薄切切片にし、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、蛍光変化値を計測した。

4. 研究成果

本申請研究では、当初、遺伝子改変 (*Tg*) マウスを作出し、それを用いて解析系を構築することを計画していた。しかし、研究開始時に動物実験施設が使用不可能な状況になり、研究期間内に目的を達しするために計画の大幅な変更を余儀なくされた。目的である各味覚受容細胞の応答解析系の構築を実現するため、遺伝子改変ではなく、ウイルス感染によって Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質を発現する方法などを検討した。最終的に、実験動物をマウスからメダカに変更して、遺伝子改変メダカを作出することで目的達成を目指した。

メダカ苦味受容体 *mftas2r1* の発現制御領域を用いて、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 A をメダカ味蕾の苦味受容細胞に発現する *Tg* メダカを作出した (*mft2r1-A Tg* メダカ、図 1)。また、メダカ β -アクチン (*mfactb*) の発現制御領域を用いて、メダカ味蕾細胞を含む全細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 A を発現する *Tg* メダカを作出した (*mfactb-A Tg* メダカ、図 2)。

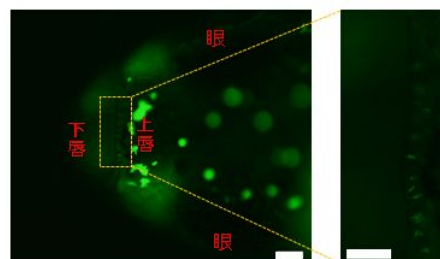


図 1. *mft2r1-A Tg* メダカ稚魚の観察
口唇の味蕾細胞の一部で緑色蛍光が観察できた。
右の画像は黄色点線内の拡大写真。
スケールバーは左が 100 μ m、右が 50 μ m。

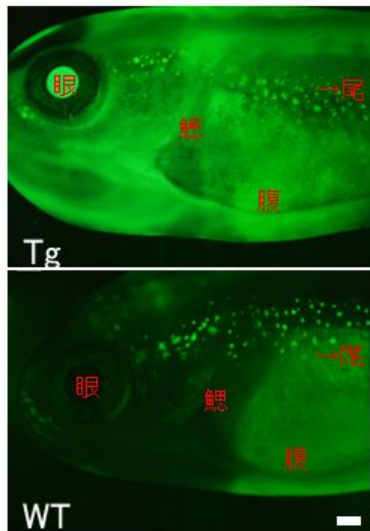


図2. mfactb-A Tgメダカ稚魚の観察
全身で綠色蛍光が観察できた(上
図)。下図は比較のためのWT個体。
スケールバーは200 μm。

作出した Tg メダカを用いて、味蕾細胞の味物質応答の解析系構築を検討した。まず、mft2r1-A Tg メダカを苦味物質である安息香酸の 10 mM 溶液で刺激し、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質 A の蛍光変化について解析した。しかし、検討した条件では、Ca²⁺感受性蛍光タンパク質 A の蛍光変化は観察されなかった。

次に、mfactb-A Tg メダカに対して、酸味物質クエン酸の 25 mM 溶液で刺激した(図3)。その結果、味蕾細胞における蛍光変化が観察された。一方、味蕾周辺の上皮細胞においても蛍光変化が観察された。味蕾細胞における蛍光変化値は上皮細胞における蛍光変化値よりも有意に高かった。味蕾細胞の酸味刺激応答を検出可能であることが示唆された。

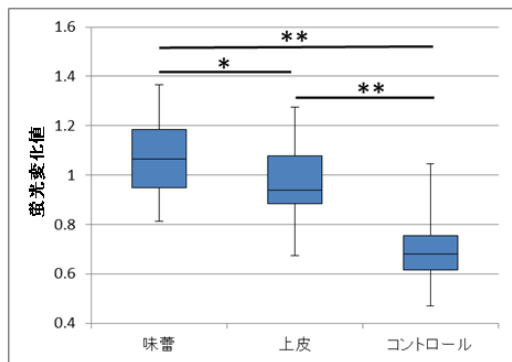


図3. mfactb-A Tgメダカ稚魚クエン酸刺激後の蛍光変化値
25 mMクエン酸刺激後の細胞の蛍光変化を定量化した(n=3)。
クエン酸刺激個体の味蕾および味蕾以外の上皮細胞、ネガティブコントロールの味蕾で計測した。
細胞数は味蕾はN=27、上皮はN=25、コントロールはN=77。
*p < 0.05, **p < 0.01, Student's t-test

続いて、mfactb-A Tg メダカに対して、旨味物質アミノ酸(L-Ala、L-Arg、L-Pro、L-Serの混合)の各 100 mM 溶液で刺激した(図4)。その結果、味蕾細胞における蛍光変化が観察された。一方、味蕾周辺の上皮細胞においても蛍光変化が観察された。味蕾細胞における蛍光変化値は上皮細胞における蛍光変化値との間に有意差は観察されなかった。

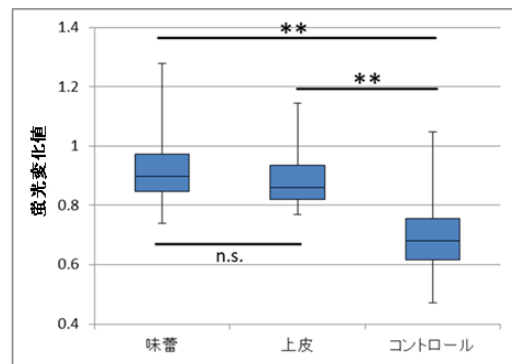


図4. mfactb-A Tgメダカ稚魚アミノ酸刺激後の蛍光変化値
100 mMアミノ酸混合刺激後の細胞の蛍光変化を定量化した(n=3)。
アミノ酸刺激個体の味蕾および味蕾以外の上皮細胞、ネガティブコントロールの味蕾で計測した。
細胞数は味蕾はN=70、上皮はN=45、コントロールはN=77。
**p < 0.01, Student's t-test

今後、味刺激法の検討、蛍光変化観察法の検討を行って、本申請研究で開発した系を改善し、再現的に信頼度高く、味応答を解析できる系の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Soulika, M., Kaushik, A. L., Mathieu, B., Lourenco, R., Komisarczuk, A. Z., Romano, S. A., Jouary, A., Lardennois, A., Tissot, N., Okada, S., Abe, K., Becker, T. S., and Kapsimali, M. Diversity in cell motility reveals the dynamic nature of the formation of zebrafish taste sensory organs. *Development* 143, 2012-2024, 2016. DOI: 10.1242/dev.134817 (査読あり)
2. Yoshimoto, J., Okada, S., Kishi, M., and Misaka, T. Ulex europaeus agglutinin-1 is a reliable taste bud marker for in situ hybridization analyses. *J. Histochem. Cytochem.* 64, 205-215, 2016. DOI: 10.1369/0022155415626987 (査読あり)
3. Okada, S. The taste system of small fish species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1039-1043, 2015. DOI: 10.1080/09168451.2015.1023251 (査読あり)

[学会発表](計 23 件)

1. 内田 健志、宇都宮 さち、上東 亮太、澤井 真梨子、韓 力、藤谷 美菜、速水 耕介、岡田 晋治、岸田 太郎、スケトウダラタンパク質の筋量増加効果の作用成分の探索、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018.
2. 安岡 顕人、亀井 飛鳥、篠崎 文夏、嶋田 耕育、野原 正勝、飯尾 将太、近藤 香、岡田 晋治、近藤 隆、阿部 啓子、エタノール誘導代謝ストレスの次世代への影響

- と食品ポリフェノールによるその緩和、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018.
3. 井土 良一、甲木 孝弘、豊田 集、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、ポモル酸の投与がラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018.
 4. 豊田 集、石島 智子、亀井 飛鳥、阿部 啓子、岡田 晋治、メープルシロップ抽出物が 2 型糖尿病モデルマウスのコレステロール代謝に与える影響、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018.
 5. 嶋津 京子、福光 聡、岡田 晋治、石島 智子、豊田 集、間 和彦、日野 明寛、阿部 啓子、オリーブ由来マスリン酸を経口摂取した関節炎モデルマウスの滑膜における遺伝子発現解析、第 7 回 食品薬学シンポジウム、2017.
 6. 岡田 晋治、澤井 真梨子、宇都宮 さち、原 由真、藤谷 美菜、速水 耕介、内田 健志、韓 力、岸田 太郎、スケソウダラタンパク質摂取による骨格筋量増大の作用機序解析、日本アミノ酸学会 第 11 回学術大会、2017.
 7. 内田 健志、上東 亮太、宇都宮 さち、速水 耕介、韓 力、岡田 晋治、藤谷 美奈、岸田 太郎、スケトウダラタンパク質の筋肉増加作用に関する有効投与量の検討、日本アミノ酸学会 第 11 回学術大会、2017.
 8. 嶋津 京子、福光 聡、岡田 晋治、石島 智子、豊田 集、間 和彦、日野 明寛、阿部 啓子、マスリン酸を経口摂取した関節炎モデルマウスの滑膜における遺伝子発現解析、第 71 回 日本栄養・食糧学会、2017.
 9. 藤谷美菜、澤井 真梨子、宇都宮 さち、原 由真、速水 耕介、韓 力、内田 健志、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉および畜肉タンパク質は筋重量を増加させるが、魚肉組成アミノ酸混合物の摂取は筋重量を増加させない、第 71 回 日本栄養・食糧学会、2017.
 10. 矢後 拓己、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、マグネシウム欠乏食摂取ラット大腿骨における遺伝子発現解析、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.
 11. 鳴神 未稀、矢後 拓己、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、リン供給源の形態の違いが、高リン食摂取ラットの骨代謝に及ぼす影響の包括的検討、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017.
 12. 宇都宮 さち、澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、内田 健志、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉及び畜肉のタンパク質摂取は筋重量を増加させる、第 49 回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会、2016.
 13. 宇都宮 さち、澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、内田 健志、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉及び畜肉のタンパク質

- 取は筋重量を増加させる、第 49 回 日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会、2016.
14. 澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、内田 健志、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉および畜肉タンパク質摂取は筋重量を増加させるが魚肉タンパク質組成アミノ酸混合物の摂取は筋重量を増加させない、日本アミノ酸学会 10 周年記念大会、2016.
 15. 矢後 拓己、生貝 咲貴、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、マグネシウム摂取不足がラット大腿骨に及ぼす影響：QCT 法を用いた解析、第 70 回 日本栄養・食糧学会、2016.
 16. 石島 智子、生貝 咲貴、矢後 拓己、阿部 啓子、岡田 晋治、高リン食摂取ラット大腿骨における遺伝子発現解析、第 70 回 日本栄養・食糧学会、2016.
 17. 澤井 真梨子、原 由真、速水 耕介、韓 力、岡田 晋治、岸田 太郎、魚肉タンパク質摂取は飼料中のアルギニン及び分岐鎖アミノ酸含量に関係なく筋重量を増加させる、日本栄養・食糧学会 2016 年度大会、2016.
 18. 橋詰 力、岡田 晋治、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎、筋萎縮時における ActRIIB 遺伝子発現制御機構の解析、第 70 回 日本栄養・食糧学会、2016.
 19. 横井 京子、池永 直弥、三坂 巧、岡田 晋治、メダカを用いた新規経シナプス性トレーサーの開発、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.
 20. 若泉 宏樹、川崎 隆史、弓場 俊輔、阿部 啓子、岡田 晋治、小型魚類を用いた味覚情報伝達・処理のイメージング解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.
 21. 矢後 拓己、生貝 咲貴、石島 智子、阿部 啓子、岡田 晋治、マグネシウム摂取不足が骨代謝に及ぼす影響の包括的検討、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.
 22. 岸田 太郎、原 由真、澤井 真梨子、山本 晋平、速水 耕介、韓 力、岡田 晋治、魚肉タンパク質摂取による筋重量増増加 - 他のタンパク質源との比較およびアルギニンの関与の検討 - 、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.
 23. 井土 良一、甲木 孝弘、豊田 集、石島 智子、岡田 晋治、3T3-L1 脂肪細胞に対するポモル酸の脂肪蓄積抑制機構の解明、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」
(<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ilsi/index.html>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 晋治 (Okada, Shinji)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特
任准教授
研究者番号：50376563

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()