

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11647

研究課題名(和文) 味蕾細胞分化メカニズムの解明： ， ， 型の枠を越えて味覚機能を制御する転写因子

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of taste bud cell differentiation: Transcription factors regulating gustatory function over Type I, II, III cells in taste buds.

研究代表者

三浦 裕仁 (Miura, Hirohito)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：80353936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢の味覚受容器である味蕾は、I、II、III型という3種類の機能細胞を含む。これらの細胞は、味蕾周囲の上皮幹細胞から細胞分裂が終了した細胞として味蕾の基底部に供給される味蕾前駆細胞から常に新しく生まれ、置き換わっている。私達は、これまでに、全ての味蕾細胞で発現する転写因子を報告した。本研究では、その機能を解明するために、ノックアウトマウスの解析を行った。その結果、甘味や苦味に対する感受性が低下していること、また、味蕾内で、味受容機能を有する細胞が減少する一方で、未分化な前駆細胞は増加していることが明らかになった。これは、この転写因子が味蕾細胞の成熟分化に重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は、味覚を通して食事を楽しむと同時に、食欲を増進させている。超高齢社会となった日本では、味覚障害が多くなっており、食を通じた健康維持のために味覚を正常に保つ意義は極めて大きい。味覚受容器である味蕾を構成する細胞は、常に新しい細胞に置き換わっており、これをターンオーバーという。様々な要因で味覚障害が生じるが、味蕾細胞のターンオーバーの異常は端的に味覚障害を発生させる。しかし、ターンオーバーに異常が生じる分子機構には、未だに不明な点が多い。本研究では味蕾細胞の成熟分化に重要な分子機構の一端を明らかにした。この知見は、味覚障害の予防法や治療法の開発に繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Taste buds, the peripheral gustatory sensory organ, contain three functional cell types, type I (Gila-like), type II (sweet, umami, and bitter sensing) and type III (sour sensing) cells. These cells are constantly renewed from the post-mitotic precursor cells reside in the basal region of taste buds, which are derived from epithelial stem cells surrounding taste buds. We previously reported a transcription factor expressed in almost all taste bud cells. In the present study, to clarify its function, we analyzed the knockout mice of the transcription factor. It was revealed that the nerve responses and behavioral sensitivities to sweet and bitter taste stimuli were markedly reduced and that immature precursor cells were increased although functional cells were decreased. These results imply that the transcription factor plays an important role in the maturation of taste bud cells.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物の味は、味覚受容器である味蕾で受容される。味蕾は、上皮由来の細胞が蕾状に集まった細胞集団で、平均すると10~14日の周期で次々と新しい細胞に置き換わっている(ターンオーバー)。味蕾は、口腔内では、舌の3種類の味覚乳頭(茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭)と軟口蓋に分布している。味蕾内で基底部から味孔まで長く伸長した細胞は、機能的に成熟した細胞で、電子顕微鏡で観察される形態の違いに基づいてI, II, IIIの3つの細胞型に分類されている。

このうち、III型細胞は酸味に応答する細胞を含んでいる。III型細胞は、味蕾の中で最も神経細胞に類似した性質を有する細胞で、神経伝達物質の放出に必要な電位依存性カルシウムチャンネルを有し、味神経と間にシナプス構造を形成する。II型細胞は、いわゆる典型的なシナプス構造を持たないが、甘味・うま味・苦味に応答する細胞を含んでおり、味刺激を受けると神経伝達物質としてATPを放出する。I型細胞は、ニューロンよりもグリアに近い性質を有する細胞で、II型やIII型細胞に巻き付くような複雑な形態を示し、その細胞表面には細胞外に放出されたATPを分解する酵素を有している。また、I型細胞の一部は塩味に応答する細胞である可能性が示唆されている。

味蕾の基底部には、伸長していない未分化(未成熟)な細胞が存在する。私達は、これまでに、この味蕾基底細胞が特異的に、1)細胞の増殖・分化の誘導因子であるSonic hedgehog(Shh)を発現することを見いだした¹⁾。さらに、このShh発現細胞が、2)I, II, IIIすべての細胞型に分化すること、3)すでに最後の細胞分裂を終えた細胞であることを明らかにした²⁾。すなわち、味蕾の細胞は、味蕾の周囲で増殖する上皮の細胞の中から、増殖を停止してShhを発現する細胞が出現して味蕾基底細胞となり、味蕾のI, II, III型細胞へと成熟分化する過程でShhの発現を失う。Shhは、マウスの発生過程では、胎生期に味蕾構造が形成される前の味蕾原基で発現していた。さらに、私達は、胎生期の味蕾原基でShhと共発現し、成体の味蕾では未分化な基底細胞から成熟した味蕾細胞まで、ほぼ全ての味蕾細胞で発現する転写因子を見いだした³⁾。しかし、その機能は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、私達が見いだした味蕾の全ての細胞に発現する転写因子について、成体の味蕾細胞ターンオーバーにおける機能を解析し、味蕾細胞の成熟分化を正常に保つ分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子ノックアウトマウス

転写因子の機能を解析するために、ノックアウトマウスと野生型マウス(C57BL/6J)の比較を行うことにした。当該転写因子の遺伝子を通常の方法でノックアウトしたマウスは、生後すぐに致死となるが、マウスを含む齧歯類の味蕾は口腔内部位によって発生の進行に大きな差がある⁵⁾。マウスが出生する段階では、軟口蓋の味蕾の発生が最も進んでおり、軟口蓋味蕾の約半数が味孔を有しており、味覚受容機能を発現していると考えられている。一方、茸状乳頭では味孔を持つ味蕾は14%とまだ少ない。さらに、有郭乳頭では、味蕾はその形態すら殆ど認められない。そのため、生後すぐ致死となるノックアウトマウスでは、味蕾細胞のターンオーバーにおける転写因子の機能を解析することはできない。そこで、致死を避けて成体のマウスの味蕾を解析するため、Cre-loxPシステムを用いて、舌上皮で選択的にノックアウトを行うコンディショナルノックアウトを用いることにした。

(2) ノックアウトマウスの味覚感受性の解析

行動応答：二瓶選択法を用いて、野生型マウス(C57BL/6J)とコンディショナルノックアウトマウスの基本味に対する味覚感受性を比較解析した。味溶液を入れた給水瓶と水を入れた給水瓶を左右に並べて、24時間自由に飲ませて、それぞれの飲量を測定した。さらに、味溶液と水の給水瓶の位置を左右入れ替えた後、24時間自由に飲ませて、それぞれの飲量を測定した。このようにして得られた48時間の飲量に基づいて、味覚嗜好性 $[(\text{味溶液の飲量})/(\text{味溶液の飲量} + \text{水の飲量})]$ を算出した。マウスが味溶液を水と区別できない場合は、味覚嗜好性は0.5となる。味溶液を水と区別することができて、水よりも好む程度が大きいほど、味覚嗜好性は1に近づく。一方、水と区別して、忌避する程度が大きいほど味覚嗜好性は0に近づく。味溶液として、甘味(スクロース)、酸味(HCL)、苦味(塩酸キニーネ)、塩味(NaCl)の濃度希釈列を用いた。

神経応答：軟口蓋味蕾を支配する大錐体神経と、茸状乳頭味蕾を支配する鼓索神経について、味覚神経応答を記録して、野生型マウスとコンディショナルノックアウトマウスの応答性を比

較した。味刺激には、行動応答の解析と同じ味物質を用いた。

(3) 味蕾の組織解析

免疫組織化学：味覚の各細胞種に特異的に発現する下記の分子の抗体を用いて味蕾の形態を解析した。

I 型細胞：ENTPD2 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2)

II 型細胞：IP3R3 (Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor)

III 型細胞：CA4 (Carbonic anhydrase 4)

味蕾基底細胞：Shh (Sonic hedgehog)

定量 PCR：定量 PCR を用いて、味蕾基底細胞で発現する Shh、味蕾全体で発現する KCNQ1、味覚受容体について、野生型マウスとコンディショナルノックアウトマウスで発現量を比較した。

4. 研究成果

コンディショナルノックアウトマウスでは、野生型マウスに比べて、甘味に対する嗜好性、苦味・塩味・酸味に対する忌避性が低下していた。特に、苦味に対する影響が大きく、0.1 mM 塩酸キニーネに対する嗜好性は、野生型では約 0.2 であったが、コンディショナルノックアウトマウスではほぼ 0.5 で水と区別できていなかった。しかし、1 mM 塩酸キニーネに対しては、コンディショナルノックアウトマウスでも嗜好性は 0.1 となり、高濃度では苦味を識別した。

二瓶選択法で明らかになった味覚行動応答の感受性の低下と対応するように、コンディショナルノックアウトマウスでは、鼓索神経と大錐体神経の味覚神経応答は、ともに野生型マウスと比較して顕著に低下していた。塩酸キニーネの苦味については、コンディショナルノックアウトマウスの鼓索神経と大錐体神経における応答の低下はほぼ同程度で、大きく低下していた。その一方で、スクロースの甘味については神経間で差があり、コンディショナルノックアウトマウスの応答は、鼓索神経では野生型に対して 1/10 程度まで大きく低下していたのに対して、大錐体神経では 50%以上の応答が残っていることが示唆された。このように、遺伝子をノックアウトしても甘味に対する大錐体神経の応答が比較的大きく残っていたことが、二瓶選択法において、苦味と比べて甘味の感受性に対する影響が小さいことに対応していると考えられる。

免疫組織化学解析を行ったところ、軟口蓋、茸状乳頭、有郭乳頭いずれの領域でも、味蕾の数は野生型マウスとコンディショナルノックアウトマウスの間に差がないことが明らかになった。その一方で、それぞれの味蕾を構成する細胞の数は、コンディショナルノックアウトマウスで大きく減少していた。影響には部位によって差があり、味蕾あたりの II 型細胞の数では、軟口蓋と茸状乳頭の味蕾では野生型の味蕾に対して、およそ 3 割程度まで減少していた。一方、有郭乳頭の味蕾では、減少は小さく、コンディショナルノックアウトマウスの II 型細胞の数は野生型に対して約 7 割程度であった。このように機能的に成熟した細胞が減少する一方で、味蕾基底細胞の数はコンディショナルノックアウトマウスで増えていることが示された。この組織解析の結果は、定量 PCR によっても確認された。これらの結果は、当該転写因子が味蕾細胞のターンオーバーにおいて、成熟分化の制御に重要な役割を果たすことを示唆している。

<引用文献>

1. Miura H, Kusakabe Y, Harada S: Cell lineage and differentiation in taste buds. Arch Histol Cytol 69(4):209-225 (2006)
2. Miura H, Scott JK, Harada S, Barlow LA: Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells. Dev Dyn 243(19): 1286-1297 (2014)
3. Nakayama A, Miura H, Ooki M, Harada S: During development intense Sox2 expression marks not only Prox1-expressing taste bud cell but also perigemmal cell lineages. Cell Tissue Res 39(3): 743-753 (2015)
4. Nakayama A, Miura H, Shindo Y, Kusakabe Y, Tomonari H, Harada S: Expression of the Basal cell makers of taste buds in the anterior tongue and soft palate of the mouse embryo. J Comp Neurol 509(2):211-224 (2008)
5. Harada S, Yamaguchi K, Kanemaru N, Kasahara Y: Maturation of taste buds on the soft plate of the postnatal rat. Physiol Behav 68:222-229 (2000)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miura H, Koyanagi E, Harada S.
2. 発表標題 Regulation of taste cell maturation
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory perception (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦裕仁、小柳江梨子、原田秀逸
2. 発表標題 味蕾細胞分化の調節因子
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会 シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦裕仁、小柳江梨子、原田秀逸
2. 発表標題 味蕾細胞分化の調節因子
3. 学会等名 日本解剖学会 第75回 九州支部学術集会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小柳 江梨子 (Koyanagi Eriko) (20791700)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 秀逸 (Harada Shuitsu) (60128452)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	大木 誠 (Ooki Makoto) (60596104)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	
連携研究者	日下部 裕子 (Kusakabe Yuko) (90353937)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門食品健康機能研究領域・ユニット長 (82111)	