

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390464

研究課題名（和文）味覚受容器の発生・再生と味覚受容機構の獲得に関する神経生物学的研究

研究課題名（英文）Neurobiological study on development and regeneration of taste buds:
histochemical and functional analysis

研究代表者

脇坂 聡 (WAKISAKA SATOSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40158598

研究成果の概要（和文）：「美味しく食べること」はQOLの向上に極めて重要である。本研究では「美味しく食べること」に極めて重要な感覚である味覚受容器（味蕾）の発生と再生過程での味覚受容関連分子の発現、特定の栄養成分を制限したときの味蕾細胞の変化について検索した。その結果、味覚受容関連分子の遺伝子は味蕾が形成、再生する前にすでに発現していることが分かった。また塩分制限した場合、塩味受容に関わる細胞に明らかな変化が認められた。

研究成果の概要（英文） Palatability improves the quality of life (QOL). The gustatory sensation mostly contribute the palatability. The peripheral gustatory receptor is taste buds, concentrated in lingual papillae and palatal epithelium. The gustatory nerves are excited by basic gustatory stimulation to taste buds. There are 5 basic gustatory stimulation; salt, acid, sweet, bitter and umami – these basic tastrants have specific receptors. We examined the expression of mRNA for taste-related receptors in developing lingual papilla, and found that mRNA for taste-related receptors expressed prenatal period when the apparent taste buds have not been formed. When sodium intake was restricted, the taste buds cell contributing to reception of salt has changed histochemically. There findings suggest the proper nutrition is important for developing of gustatory system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：味覚 味覚受容器 発生 再生 分化 細胞系譜

1. 研究開始当初の背景

口腔は消化器系に分類され、その重要な機能は生命の維持に必要な栄養摂取である。自分で食べて味わうことが、QO

Lの向上に結びつくことは言うまでもない。味覚は「味わうこと」の主役をなす感覚であるが、味覚受容器である味蕾での味覚受容機構の詳細については明ら

かになっていない。味覚における基本味は塩味、酸味、苦味、甘味、うま味の5つがあり、それらに対する受容体がクローニングされている。これらはイオンチャネル型受容体とG蛋白共役型受容体に大別され、前者に属するものとしては epithelial sodium channel (ENaC), acid sensing ion channel (ASIC) などが挙げられ、塩味と酸味の受容に関与する。一方G蛋白共役型受容体は甘味、苦味およびうま味の受容に関与しT1R1, T1R2, T1R3, T2Rなどがあり、また代謝型グルタミン酸受容体の一つである taste mGluR4がうま味関与することが明らかになり、味蕾における味覚受容機構に関する研究が精力的に進んでいる。

味蕾の多くは舌乳頭と口蓋粘膜に認められ、その発生を形態学的に観察したとき軟口蓋の味蕾は出生以前に成熟するが、舌乳頭の味蕾は出生後に形態学的に成熟する。我々はいままでに、味蕾の発生を組織化学的に詳細に検索し、味蕾形成以前に苦味受容関連分子である α -gustducin を発現する細胞が出現することを報告してきている。また、 α -gustducin を含む味細胞の発現や頻度が各部位の味蕾によって異なることも明らかにしてきた。このことは基本味の受容機構の獲得に時間的・空間的差異が存在することを示唆している。しかし、今まで指標としてきた α -gustducin は苦味受容体である T2R により活性化する G 蛋白質であり、味受容体の発現を直接的に証明したものではない。

一方口腔内味蕾は50~80個の細胞から形成され、組織学および微細構造学的に4つの細胞型に分類されている。このうち味蕾基底部の円形細胞は他の3つの細胞型の前駆細胞であることはほぼ間違いがないが、前駆細胞以降の細胞系譜や細胞分化については明らかにならず、前述の味受容体を発現する細胞が細胞系譜、細胞分化でどのような位置にあるのかも不明である。さらに味蕾はその支配神経を損傷すると変性・消失し、神経の再生に伴い味蕾も再生する。一般的に「再生」と「発生」はそのメカニズムが類似しているといわれ、味蕾においても「発生」と「再生」での味覚神経と味蕾の関係は類似している。この一連の変性・再生過程において、基本味の受容機構の変化が発生過程と同じ経過で起きるのか否かについては明らかでない。

近年胃粘膜や小腸粘膜の brush 細胞が α -gustducin を発現することが報告され、消化器においても味覚受容が行われている可能性が示唆されている。しかしな

がら胃粘膜や腸粘膜での味受容体の発現については不明である。さらにこれら消化管粘膜で α -gustducin や味受容体がいつから発現するかは不明である。

2. 研究の目的

本研究においては以下の点を明らかにすることを目的としている。

- ① 味蕾の発育と味覚受容関連分子の発現
- ② 味蕾細胞の細胞系譜
- ③ 味覚神経損傷後の味蕾再生過程における味覚受容関連分子の発現
- ④ 味覚神経損傷後の味蕾変性における味蕾細胞の組織化学的变化とアポトーシス
- ⑤ 胃・腸粘膜における味覚受容関連分子の時間的発現
- ⑥ 低塩分飼育における味蕾構成細胞の組織化学的变化

3. 研究の方法

実験動物としてラットを用い、舌後方部の有郭乳頭、および胃、十二指腸、小腸について検索する。

味覚受容関連分子として、塩味受容体として ENaC、酸味受容体として ASIC、苦味受容関連分子として α -gustducin、甘味受容体として T1R2/T1R3、うま味受容体として T1R1/T1R3 および mGluR の遺伝子発現を RT-PCR によりそれらの mRNA の時間的発現を検索する。

アポトーシスの検索には単鎖 DNA (ssDNA) を指標として、免疫組織学的に検索し、味蕾を構成する細胞については、II型細胞には α -gustducin と phospholipase C β 2 subunit (PLC β 2) を、III型細胞には neural cell adhesion molecule (NCAM) を、IV型細胞には Jacalin をそれぞれマーカーとして組織学的に検索した。

低塩分の影響を検索するために、低塩分飼料で飼育したラットの有郭乳頭をそれぞれの味蕾構成細胞のマーカーで検索した。

4. 研究成果

① 味蕾の発育と味覚受容関連分子の発現

ラット有郭乳頭では味孔を持った形態学的に成熟した味蕾は生後に認められる。しかしながら、味覚受容関連遺伝子の発現を RT-PCR法により観察すると、五種類の基本味のいずれも成熟した味蕾が認められない胎生18日までには発現していることが明らかになった。このことは、形態学的に成熟していない味蕾においても味覚受容が行われている可能性を示すものである。

② 味蕾細胞の細胞系譜

味蕾には I 型から IV 型の四種類の細胞が認められる。このうち IV 型細胞は他の細胞型

への前駆細胞と考えられているが、IV型細胞がどの細胞型に分化してゆくかについては明らかではない。また味蕾細胞の寿命は約10日といわれ、アポトーシスによって消失すると報告されている。そこでアポトーシスの指標として単鎖DNA (ssDNA)を用い、それぞれの細胞型のマーカーと二重染色を行ったところssDNA陽性細胞はIII型、IV型細胞のマーカーを発現しないことがわかった。また、II型細胞とIII型細胞には組織化学的な共通点が多いことも明らかになった。このことから、IV型細胞は、一型細胞とIII型細胞に分化し、III型細胞はさらにII型細胞に分化するという2つの細胞系譜が存在することが明らかとなった。

③ 味覚神経損傷後の味蕾再生過程における味覚受容関連分子の発現

舌咽神経の両側損傷により有郭乳頭味蕾の変性・再生と、基本味の受容に関連する分子の発現の時間的・空間的発現を苦味受容に関するGタンパクである α -gustducinを指標として検索した。その結果味蕾の変性で α -gustducin陽性細胞は消失するが、溝上皮でのmRNAは味蕾が消失しても発現することが分かった。

④ 味覚神経損傷後の味蕾変性における味覚細胞の組織化学的变化とアポトーシス

味覚神経損傷により味蕾は消失するが、その際の味蕾細胞の組織化学的变化とアポトーシスについて検索した。味覚神経損傷後有郭乳頭における味蕾の数は損傷初期には変化しないが、一個の味蕾内の味蕾細胞は損傷2日から有意に減少していた。また神経損傷後正常な状態ではアポトーシスを起こさないIII型細胞、前駆細胞であるIV型細胞にもアポトーシスを起こすことが分かった。

⑤ 胃・腸粘膜における味覚受容関連分子の時間的発現

胃粘膜と小腸粘膜における味覚受容関連分子として、苦味受容関連分子である α -gustducin、甘味受容体としてT1R2/T1R3、うま味受容体としてT1R1/T1R3およびmGluRの遺伝子発現を検索したところ、いずれにおいても α -gustducinは胎生18日、T1R1、T1R2、T1R3、mGluR1は胎生16日から遺伝子発現が認められ、有郭乳頭での発現開始時期とほぼ同じであった。有郭乳頭や消化管で甘味やうま味受容に関わる分子の遺伝子が胎生期から発現していることは、出生直後からの栄養摂取に深く関わっていると考えられた。

⑥ 低塩分飼育における味蕾構成細胞の組織化学的变化

低塩分飼料で飼育したラットの有郭乳頭について組織化学的に検索した結果、低塩分飼料飼育では苦味、甘味、うま味受容に関わるII型細胞の組織化学的变化は認められず、塩味、酸味受容に関わるIII型細胞に組織化学

的变化が認められた。これらの変化は低塩分飼料を正常飼料にすることにより回復が認められた。このことから、栄養状態は味覚受容機構に深く関与することが明らかになった。

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2件)

① Y. Ichimori, K. Ueda, H. Okada, S. Honma, S. Wakisaka: Histochemical changes and apoptosis in degenerating taste buds of rat circumvallate papilla, Arch Histol Cytol 72: 91-100, 2009. 査読有

② K. Ueda, Y. Ichimori, H. Maruyama, Y. Murakami, M. Fujii, S. Honma, S. Wakisaka: Cell-type specific occurrence of apoptosis in taste buds of the rat circumvallate papilla, Arch Hitol Cytol, 71: 59-67, 2009. 査読有

[学会発表] (計22件)

① 上田甲寅、隈部俊二、中塚美智子、安 春英、松田哲史、脇坂 聡、岩井康智：塩分欠乏が味蕾構成細胞におよぼす組織化学的影響、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010年3月28日、盛岡

② S. Wakisaka: Cell lineage and apoptosis of normal and degenerating taste bud cells, Kyungpook-Osaka University International Symposium, December 11, 2009, Daegu (Korea).

③ K. Ueda, S. Wakisaka, Y. Iwai: Histochemical alteration of taste cells of dietary sodium restricted rats, 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, December 3, 2009, Fukuoka.

④ S. Wakisaka, H. Okada, S. Honma, T. Maeda: Expression of α -gustducin mRNA in developing, degenerating and regenerating circumvallate papilla of the rat, 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, October 21, 2009, Chicago (USA).

⑤ S. Wakisaka, H. Okada, K. Kadono, S. Honma, T. Maeda: Expression of taste reception-related molecules in

circumvallate papilla and gastrointestinal tract of developing rat. 20th Congress of European Chemoreception Research Organization (ECRO), September 25, 2009, Villasimius (Sardinia, Italy).

⑥ 上田甲寅、中塚美智子、隈部俊二、河野彰代、石丸喜朗、脇坂 聡、岩井康智：継続的塩分摂取制限が味蕾発育に及ぼす組織化学的影響、日本味と匂学会 第 43 回大会、2009 年 9 月 3 日、旭川

⑦ K. Ueda, S. Wakisaka: Effects of continuous dietary sodium restriction on the histochemical properties of taste buds of rat circumvallate papilla, 6th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, December 6, 2008, Fukuoka.

⑧ 上田甲寅、渡邊彰代、浜田尚香、脇坂 聡：塩分摂取制限による末梢味覚受容器細胞の組織化学的变化、日本味と匂学会 第 42 回大会、2008 年 9 月 18 日、富山

⑨ S. Wakisaka, Y. Ichimori, K. Ueda, S. Honma: Histochemical changes and apoptosis in taste buds of rat circumvallate papilla following axotomy of glossopharyngeal nerve. 19th Congress of European Chemoreception Research Organization (ECRO), September 6, 2008, Portoroz (Slovenia).

⑩ S. Wakisaka, H. Okada, S. Honma: Expression of c-fos in parabrachial nucleus following bitter stimulation to denervated taste buds of ther rat, International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), July 26, 2008, San Francisco (USA)

⑪ S. Wakisaka: Cell lineage of taste buds cells, 5th Asian Pacific International Congress of Anatomists, May 15, 2008, Teheran (Iran).

⑫ 上田甲寅、一森康男、脇坂 聡：ラット口腔内味覚受容器における細胞分化 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月 28 日、大分

⑬ 角野公紀、本間志保、岡田宏之、脇坂 聡：消化管の発生に伴う味覚受容関連遺伝子の発現 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月 28 日、大分

⑭ Y. Ichimori, K. Ueda, H. Okada, S. Wakisaka: Apoptosis in denervated taste buds of rat circumvallate papilla, 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 7, 2007, San Diego (USA).

⑮ K. Ueda, Y. Ichimori, H. Okada, S. Wakisaka: Synapse-associated proteins in taste cells of rat oral cavity, 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience, November 7, 2007, San Diego (USA).

⑯ H. Okada, S. Honma, S. Wakisaka: Expression of taste reception-related genes in developing and regenerating taste buds of the rat, 5th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, November 2, 2007, Fukuoka.

⑰ 一森康男、上田甲寅、岡田宏之、脇坂 聡：舌咽神経損傷後のラット有郭乳頭におけるアポトーシス、第 49 回歯科基礎医学会学術大会、2007 年 8 月 31 日、札幌

⑱ 岡田宏之、本間志保、脇坂 聡：ラット有郭乳頭形成における味覚受容関連遺伝子の発現、第 49 回歯科基礎医学会学術大会、2007 年 8 月 30 日、札幌

⑲ 上田甲寅、一森康男、岡田宏之、脇坂 聡：ラット味蕾におけるアポトーシス、第 49 回歯科基礎医学会学術大会、2007 年 8 月 30 日、札幌

⑳ 一森康男、上田甲寅、岡田宏之、脇坂 聡：舌咽神経損傷後のラット有郭乳頭における味覚受容関連遺伝子の発現、日本味と匂学会 第 41 回大会、2007 年 7 月 28 日、東京

㉑ 上田甲寅、一森康男、岡田宏之、脇坂 聡：ラット口腔内味覚受容器における SNARE 関連タンパク質の分布 日本味と匂学会 第 41 回大会、2007 年 7 月 28 日、東京

㉒ 岡田宏之、本間志保、脇坂 聡：舌咽神経損傷後のラット有郭乳頭における味覚受容関連遺伝子の発現、日本味と匂学会 第 41 回大会、2007 年 7 月 28 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇坂 聡 (WAKISAKA SATOSHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：40158598

(2)研究分担者

前田 隆史 (MAEDA TAKASHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：80324789

本間 志保 (HONMA SHIHO)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40372627

阿部 真土 (ABE MAKOTO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40448105