

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19791367

研究課題名（和文） 味細胞による味覚情報のディスクリミネーション

研究課題名（英文） Discrimination of taste information among taste bud cells

研究代表者

吉田 竜介（Yoshida Ryusuke）

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：60380705

研究成果の概要：本研究では、5基本味（甘・苦・塩・酸・うま味）のうち、甘味、苦味、うま味を受容する味細胞と酸味を受容する味細胞の細胞型が異なること、塩味受容細胞はアミロライド感受性により2つのタイプが存在すること、うま味の受容細胞には甘味とうま味を受容する味細胞、うま味特異的味細胞が存在し、それぞれとうま味相乗効果の有無により更に2つのタイプに分類されることを明らかにした。これらは味情報が味細胞レベルで分別されている可能性を示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：味覚、味細胞、シナプス、遺伝子発現、細胞型、味覚受容体、基本味

1. 研究開始当初の背景

味覚は食物の取舍選択に関する重要な感覚である。一般的に、味覚は5つのカテゴリー（甘味、塩味、酸味、苦味、うま味）に分類され、甘味（炭水化物）、塩味（ミネラル）、うま味（アミノ酸、タンパク質）は主に嗜好行動を、酸味（酸・腐敗物など）、苦味（毒物）は主に忌避行動を惹起する。これらの味覚情報は口腔内の味蕾に存在する味細胞により検知され、その情報は味神経へと伝達される。当時、味細胞で味覚受容に関与する分

子が次々と発見され、味物質が味細胞を興奮させる分子的側面は徐々に明らかになりつつあったが、味覚受容分子と味細胞応答との関連を示す証拠は少なく、味細胞の生理的側面と分子的側面を同時に解析する必要があった。

味細胞では、甘味・うま味受容体（T1R3）発現細胞と苦味受容体（T2Rs）発現細胞は異なることが示されており、甘味と苦味は味細胞レベルで区別される事が示唆される。また申請者らは活動電位を発生し味刺激に应答する味細胞の約60%がうま味を除く4基本

味刺激のうちいずれか1種の刺激にのみ応答することを示しており、甘味、苦味のみならず味覚情報のディスクリミネーションは味細胞レベルで行われることが示唆された。さらに、茸状乳頭味細胞とそれを支配する鼓索神経線維の応答特性が非常に近似していること、マウス甘味感受性味細胞に本来マウスが嗜好性を示さないリガンドに対する受容体を強制発現させるとマウスがそのリガンドに嗜好行動を示すこと、甘味および苦味受容体に経シナプストレーサーをつけ味細胞に発現させると脳へは別々の情報ラインにより伝えられることが示されており、これらは、味細胞で分別された味覚情報はそれぞれ特定の神経ラインで中枢へ伝達される可能性、すなわち特定の味覚情報を運ぶニューラルコーディングチャンネルが形成されている可能性を示唆した。しかし、味覚の基点となる味細胞から味神経へどのように情報が伝達されるかは不明であった。

味細胞は形態学的に I~IV 型に分類され、このうち II 型および III 型が実際の味受容細胞であると考えられている。II 型細胞には PLCβ2 や gustducin などの甘・うま・苦味の情報伝達に關与する分子が発現するがシナプスは存在せず、逆に III 型細胞にはシナプスが存在するがこれら味覚関連遺伝子の発現が見られないことが示されていた。このため、II 型細胞 III 型細胞 味神経の順に情報が伝達されるといった説や、II 型細胞が古典的シナプス以外のシステムを用い神経に情報伝達している説などが唱えられていた。しかし、味刺激に対する応答特性と細胞型との関連性はほとんど調べられておらず、この課題は味細胞から味神経への味覚情報の伝達システムを解明する上で重要なポイントとなると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発した、単離味蕾を用い、その受容膜側にのみ味刺激を与え、基底外側膜側から味細胞の発する活動電位を記録する味細胞応答記録システム(図1)を用い、味細胞の各種味刺激に対する応答性や味覚抑制物質の効果などを詳細に追及し、味覚情報が味細胞レベルでどのように分別されているのかを明らかにすること、味細胞の応答性を調べた後、シングルセル RT-PCR によりその発現遺伝子を解析し、各応答特性に關与する味覚受容の分子機構や、応答特性と細胞型との関連を明らかにすること、また細胞型が容易に特定できる遺伝子改変マウスを用い、特定の細胞型の味細胞応答を詳細に調べ、応答特性と細胞型との関連を明らかにすることを目的とした。これらの実験から、味のニューラルコーディングチャ

ネルにおける味細胞の役割(味覚情報の収集と伝達、およびそのメカニズム)を究明することを最終目的とした。

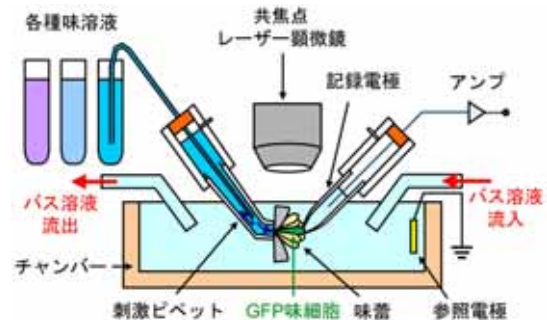


図1. 味細胞応答記録システム

3. 研究の方法

(1) 味細胞応答の記録

実験動物として最も味覚感受性が高いと考えられている C57BL/6N 系統のマウス、およびこれらを背景に持ち、特定遺伝子プロモーター制御下に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する 2 種類の遺伝子改変マウス (GAD67-GFP マウス、gustducin-GFP マウス) を用いた。マウスより舌を取り出し、酵素処理などにより個々の茸状乳頭味蕾を単離し、その味孔側を刺激ピペットにて吸引保持し、基底外側膜側よりガラス電極を当て、味細胞が発する活動電位を記録した(図1)。応答記録後に、後の遺伝子発現解析のために記録電極を用い味細胞を回収した。

(2) 発現遺伝子解析

応答記録後、回収した味細胞をサンプルとして用い、マルチプレックスシングルセル RT-PCR により発現遺伝子解析を行った。発現解析を行った遺伝子群は次の通り：
gustducin (G タンパク質 サブユニット、および II 型細胞マーカー)、GAD67、SNAP25 (III 型細胞マーカー)、ENaC α, β, γ-subunit (塩味受容体候補)、T1r3 (甘味、うま味受容体コンポーネント)、TRPM5 (甘味、うま味、苦味トランスダクションコンポーネント)、PKD1L3/PKD2L1 (酸味受容体候補)

4. 研究成果

(1) 味細胞の細胞型と応答特性

II 型細胞の応答特性

Gustducin を II 型細胞のマーカーとして用い、Gustducin-GFP マウスにおいて GFP を発現する味細胞、および味蕾細胞からランダムで応答を記録したもののうち、シングルセル RT-PCR で gustducin の発現が見られたものから 5 基本味に対する応答を記録した。全体で

49個の gustducin 発現細胞から応答を記録し、そのうち 25 個は甘味に、20 個は苦味に、4 個はうま味に最も強く応答した(図2)。これらのうち、38 個は 1 種の、10 個は 2 種の、1 個は 3 種の味刺激に応答したことから、II 型細胞は甘味、苦味、またはうま味により特異的に応答することを示唆する。これは、甘味受容体と苦味受容体は排他的に発現するという遺伝子発現の結果や、II 型細胞が甘味、苦味、うま味に応答する味細胞であるというこれまでの仮説と一致する。今回の実験では舌前方の茸状乳頭の味蕾に属する味細胞の応答を記録した。しかし gustducin を含む味覚関連遺伝子の発現パターンや、味覚神経線維応答には舌部位差があり、茸状乳頭のみならず有郭乳頭の味蕾内の味細胞の応答性も検討する必要がある。

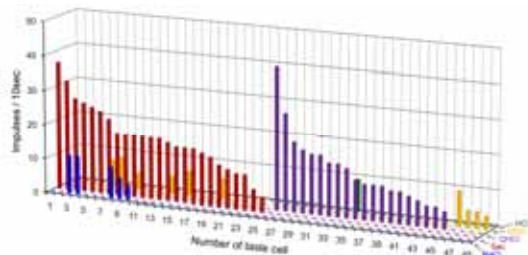


図2 . Gustducin 発現細胞の応答性
青 : NaCl、赤 : サッカリン、紫 : キニーネ、黄 : グルタミン酸、緑 : HCl に対する応答

III 型細胞の応答特性

GAD67 を III 型細胞マーカーとして用い、GAD67-GFP マウスにおいて GFP を発現する味細胞から 5 基本味に対する応答を記録した。44 個の GAD67-GFP 味細胞から応答を記録し、そのすべてが HCl に最も強く応答した(図3)。これらのうち 33 個は HCl 特異的に、11 個は他の味刺激にも応答を示した。これらの細胞は HCl のみならず、クエン酸や酢酸といった他の酸味刺激にも同様に応答を示したことから、III 型細胞は酸の受容に関与することが示唆される。また、例数は少ないが、応答記録後の細胞の遺伝子解析を行った結果、酸味受容体候補である PKD2L1 を発現する細胞が存在した。これらの結果は、有郭乳頭の III 型味細胞の多くが多種類の味刺激に応答を示したという他のグループからの報告と若干異なるが、これは舌の部位によって III 型細胞の役割が異なる可能性を示唆する。しかし、同じグループは III 型細胞は酸感受性細胞であるという報告もしており、III 型細胞は酸の受容および、それ以外の働きを持つ細胞に分類される可能性が示唆される。酸の受容メカニズムに関しては PKD1L3/PKD2L1 のみならず、ASIC、HCN、Cl⁻チャネル、K⁺チャネルなどが関与するという報告もあり、まだ完全に解明されたわけではない。GAD67-GFP 細

胞を用い、酸味受容メカニズムにアプローチできるのではないかと考えられる。

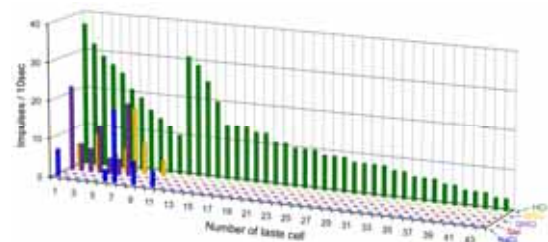


図3 . GAD67-GFP 発現細胞の応答性
青 : NaCl、赤 : サッカリン、紫 : キニーネ、黄 : グルタミン酸、緑 : HCl に対する応答

(2) 塩味感受性細胞

塩味に応答する味神経線維はアミロライド感受性により 2 群に分類される。NaCl に応答する味細胞においてアミロライド感受性を調べた結果、味神経線維と同様に 2 群に分類された。アミロライド感受性味細胞 (AS 細胞) は NaCl 特異的な応答を示し、非感受性細胞 (AI 細胞) は KCl や HCl など他の電解質にも応答を示した(図4)。これらの性質はそれぞれアミロライド感受性 (N タイプ) および非感受性 (E タイプ) 味神経線維のものと一致していた。この結果は AS 細胞からの情報は N タイプ神経線維に、AI 細胞からの情報は E タイプ神経線維に特異的に伝達される可能性を示唆する。また、これらの細胞で塩味受容体候補 ENaC の発現を解析した結果、AS 細胞の一部は ENaC サブユニットを発現していたが、AI 細胞では ENaC の発現は見られなかった(図4)。

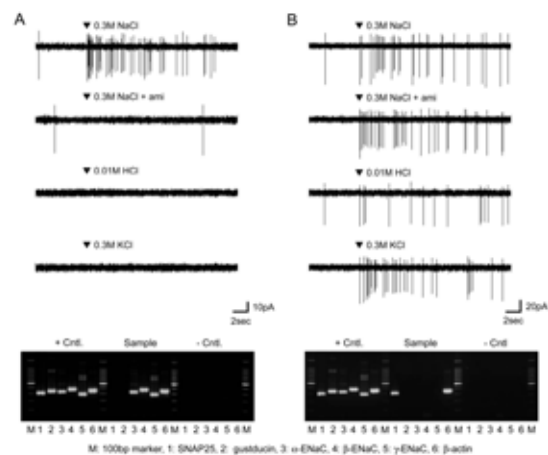


図4 . アミロライド感受性細胞(A)と非感受性細胞(B)

この結果はアミロライド感受性塩味応答の受容には ENaC が関与する可能性を示唆する。GAD67-GFP マウスの応答解析では AI 細胞様の応答が見られたことから、AI 細胞の一部は III 型細胞であることが示唆される。しかし、gustducin 発現細胞にも GAD67 発現細胞にも

AS 細胞様の応答を示すものはなかった。これらの結果は AS 細胞が II 型、III 型以外の細胞型である可能性、II 型、III 型で GAD や gustducin を発現していない細胞である可能性を示唆するが、さらなる研究が必要である。AS 細胞の応答は NaCl 特異的であることから、主な塩味の情報は AS 細胞からもたらされるものと考えられる。この細胞の細胞型や応答特性を明らかにすることは、塩味の摂取量の調節といったより健康に密接に関連する課題を追及するために重要となりうる。

(3) うま味感受性細胞

近年の分子生物学的研究から、うま味（グルタミン酸）の受容体として T1r1/T1r3、mGluR1、mGluR4 といった多様な分子群が関与する可能性が示唆されている。味細胞のうま味応答を調べた結果、甘味に強く応答するタイプ（S タイプ）とうま味に強く応答するタイプ（M タイプ）に大別された。さらに S タイプ、M タイプともに、うま味の特徴であるイノシン酸添加による相乗効果が見られるもの（S1 および M1 タイプ）と見られないもの（S2 および M2 タイプ）が存在した（図 5）。

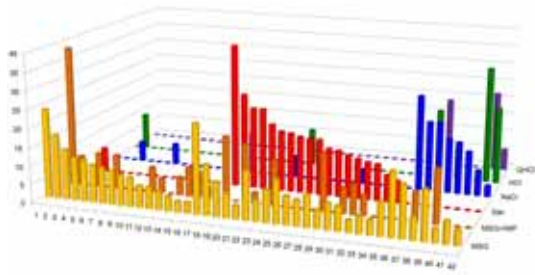


図 5 . うま味応答細胞の応答特性
黄：グルタミン酸、オレンジ：グルタミン酸 + イノシン酸、青：NaCl、赤：サッカリン、紫：キニーネ、緑：HCl に対する応答

この結果は、うま味の受容細胞が多種類存在することを示唆する。mGluR1 および mGluR4 のアンタゴニスト AIDA および CPPG の添加により、M タイプ味細胞の応答が一部抑制されたことから、M タイプ味細胞では mGluR がうま味の受容体として機能している可能性が示唆された。S タイプ味細胞では T1r1/T1r3 がうま味受容体として機能しているのではないかと予想される。

(4) 総括

本研究により、味覚情報は味細胞レベルで分別され、その情報はそれぞれの神経線維に特異的に伝達される可能性が示唆された。今後は味細胞と神経線維との間の情報伝達システムや、選択的な結合に関与するメカニズム、および個々の味細胞の詳細な応答特性と遺伝子発現との関連性を追求する必要があ

ると考えられる。

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 8 件)

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

Yoshida R, Yasumatsu K, Shirotsuki S, Jyotaki M, Horio N, Murata Y, Shigemura N, Nakashima K, Ninomiya Y : Multiple receptor systems for umami taste. *Ann. NY Acad. Sci.* (in press)

吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三：味細胞の細胞型と応答特性 . *日本味と匂学会誌* 15: 285-288 (2008)

Talavera K, Yasumatsu K, Yoshida R, Margolskee RF, Voets T, Ninomiya Y, Nilius B : The taste transduction channel TRPM5 is a locus for bitter-sweet taste interactions. *FASEB J.* 22: 1343-1355 (2008)

Shigemura N, Ohkuri T, Sadamitsu C, Yasumatsu K, Yoshida R, Beauchamp GK, Bachmanov AA, Ninomiya Y : Amiloride-sensitive NaCl taste responses are associated with genetic variation of ENAC alpha-subunit in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: R66-75 (2008)

Hisatsune C, Yasumatsu K, Takahashi-Iwanaga H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninomiya Y, Mikoshiba K : Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 282: 37225-37231 (2007)

吉田竜介、安松啓子、二ノ宮裕三：活動電位を発する味細胞は味覚情報伝達経路の起始点となりうる . *日本味と匂学会誌* . 14: 163-170 (2007)

吉田竜介、安尾敏明、村田芳博、上瀧将史、二ノ宮裕三：単一細胞応答の観点からみたマウス茸状乳頭味蕾の応答特性 . *日本味と匂学会誌* 14: 395-398 (2007)

〔学会発表〕(計 14 件)

Yoshida R, Yasumatsu K, Shirotsuki S, Kawato Y, Murata Y, Shigemura N, Nakashima K, Margolskee RF, Ninomiya Y (Invited speaker): Multiple receptor systems for umami taste in mice. The 15th ISOT, San

Francisco, USA (2008)

Yoshida R, Murata Y, Yasumatsu K, Ninomiya Y (Invited speaker): Modulation and transmission of taste information from receptor cells to taste axons. The 22nd SICE symposium on biological and physiological engineering, Harbin, China (2008)

吉田竜介、村田芳博、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三(シンポジスト): 甘味の受容・伝達・調節機構と ATP. 生理学研究所研究会「病態と細胞外プリン - 治療標的としての可能性を探る」 岡崎 (2008)

吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三(シンポジスト): 味細胞の細胞型と応答特性. 日本味と匂学会第 4 2 回大会 富山 (2008)

吉田竜介、安松啓子、城崎慎也、川東由利子、村田芳博、重村憲徳、中島清人、Margolskee RF、二ノ宮裕三(シンポジスト): 味蕾におけるグルタミン酸シグナルの受容と伝達. 第 8 5 回日本生理学会大会 東京 (2008)

吉田竜介、安松啓子、城崎慎也、川東由利子、村田芳博、重村憲徳、中島清人、Margolskee RF、二ノ宮裕三: マウスにおけるうま味の受容・伝達メカニズムの解析. 第 4 6 回日本生物物理学会年会 福岡 (2008)

吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三: GFP ノックインマウスを用いた II 型および III 型味細胞の応答特性の解析. 第 5 0 回歯科基礎医学会大会 東京 (2008)

吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三: 味細胞の細胞型により異なる応答特性. 第 3 1 回日本神経科学大会 東京 (2008)

Yoshida R, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Ninomiya Y: Response properties of mouse taste receptor cells within a single taste bud of fungiform papillae. 29th AChemS, Sarasota, USA, (2007)

吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三: 味細胞の細胞型による応答特性の差異. 第 4 5 回生物物理学会年会 横浜 (2007)

吉田竜介、安尾敏明、村田芳博、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三: 単一味蕾中の複数の味受容細胞は様々な応答特性を持つ. 第 4 9 回歯科基礎医学会大会 札幌 (2007)

吉田竜介、安尾敏明、村田芳博、上瀧将史、二ノ宮裕三: 単一細胞応答の観点からみたマウス茸状乳頭味蕾の応答性. 日本味と匂学会第 4 1 回大会 東京 (2007)

吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三: 単一味蕾中に存在する活動電位を発生する味細胞の応答解析. 第 3 0 回日本神経科学大会 横浜 (2007)

吉田竜介、安尾敏明、村田芳博、上瀧将史、二ノ宮裕三: 単一味蕾内の複数の味細胞の応答特性. 第 5 8 回西日本生理学会 福岡 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 竜介 (YOSHIDA RYUSUKE)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 60380705