

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05869

研究課題名(和文) シングルセル解析による霊長類味覚受容機構の解明

研究課題名(英文) Primate taste signaling mechanism analyzed by single cell RNA-Seq

研究代表者

岩槻 健 (Iwatsuki, Ken)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50332375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：げっ歯類と霊長類とは味覚受容機構が異なるため、味覚研究には霊長類の細胞を利用することが望ましい。しかし、味覚研究はげっ歯類を用いて進められてきた歴史がある。本研究では、霊長類の味細胞モデルとしてサル味蕾オルガノイドを作製し、Single cell (sc) RNA-Seqにてマウス味蕾組織とサル味蕾オルガノイドとの遺伝子発現を比較した。その結果、味覚受容体はげっ歯類と霊長類の双方で確認された一方、一部の味細胞マーカーはサル味蕾オルガノイドからは検出できなかった。よって、今後霊長類の味覚研究を進めるためには、霊長類特異的なマーカーを探索することが重要になると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究は、ラットやマウスなどのげっ歯類を用いて味覚研究は進められてきた。しかしながら、最近の研究ではげっ歯類と霊長類では味覚感受度や選択性が全く違うことがわかってきた。今回、両者を比較することで、味覚受容メカニズムの中心を担う分子をscRNA-Seqにより比較したところ、甘味、うま味、苦味受容細胞のマーカーは同じように確認されたが、酸味受容細胞のマーカーは必ずしも一致しなかった。このことから、げっ歯類と霊長類では味覚受容機構に違いがあることが示唆された。今後、比較データを元に、霊長類独特の味覚受容メカニズムに迫ることができると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is preferable to use primate cells to study the taste system since mechanisms of taste perception differs between primates and mice, though taste research have been performed mostly using mice tissues. In this study, we generated monkey taste organoids to compare gene expression patterns of taste cells between rodents and humans by single cell RNA-Seq analysis. We found that both species expressed known taste cell markers such as taste receptors, however, we could not identify some of taste cell markers in monkey taste organoids. Therefore, we believe that hunting taste specific markers in primates would be one of important issue in the taste research.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：味細胞 幹細胞 霊長類 げっ歯類 RNA-Seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食物を選別するゲートキーパーである味細胞に関する研究は、今世紀に入り苦味、うま味、甘味受容体がクローニングされたことにより急速に進み、味蕾には 5 種類の味覚受容細胞と幹細胞および前駆細胞が存在することが明らかになった。特に、遺伝子改変マウスを用いた研究により、苦味、うま味、甘味受容細胞についての基本的な理解は進んだ。しかしながら、酸味や塩味受容細胞およびその受容メカニズムについては未だ明らかになっておらず、味覚研究におけるブラックボックスとなっている。これらの受容機構が明らかとなれば、呈味代替物の開発が可能になり生活習慣病の予防につながると考えられる。

(2) これまで、げっ歯類から得られる味覚情報は食品開発や新規味物質のスクリーニングなどにおいて不十分であることが課題であったため、研究対象をヒトと同じ霊長類であるサルなどシフトさせることが求められていた。げっ歯類の食性と食行動は霊長類とは異なるため、味覚研究においてはヒトのモデルとしては不向きであることが最近になり分かってきているからである。

(3) 従来型の味細胞の遺伝子解析は、舌上皮から味蕾を含む細胞塊を採取し RNA 抽出を行っていたため、味細胞の他に周辺の上皮細胞、血球、結合組織なども混入してしまっていた。ましてや個々の細胞の性質までは解析できていなかった。そこで、味細胞だけを分画し、それぞれの味細胞が持つ性質を詳細に調べられる新しい方法が必要になっていた。近年、シングルセルトランスクリプトーム解析の技術が飛躍的に向上し、一度に数千細胞のライブラリーを作製する事が可能となっている。

2. 研究の目的

(1) 研究の目的は、新しいサル味蕾オルガノイドを用いたシングルセルトランスクリプトーム解析により、霊長類に特徴的な味覚受容機構の存在を検証し、げっ歯類の味細胞の遺伝子発現プロファイルと比較することである。

まず、マウスのシングルセルトランスクリプトーム解析を行い、マウスにおいても世界に先駆けて味細胞の網羅的な遺伝子発現解析を行い、これまでの報告と相違がないか確認する。

次に、霊長類味蕾オルガノイドを用いたシングルセルトランスクリプトーム解析を行う。霊長類味細胞のシングルセル解析はサンプルの入手が難しい上、上皮細胞と真皮細胞の分離が難しく、これまでにシングルセル解析の報告はない。ヒトを含め霊長類味蕾の培養系にはこれまで多くのグループが挑戦してきたが、技術的に難しいことから、現在世の中に存在する霊長類味蕾オルガノイドは代表者のグループでのみ成功している。

3. 研究の方法

(1) マウス味細胞サンプルの調製

霊長類の味蕾オルガノイドと比較するためにマウス舌の味蕾から直接味細胞を採取する。方法は、有郭乳頭部の上皮と真皮の間にディスペラーゼを注入し真皮から上皮を分離後、上皮側に含まれる有郭乳頭を実体顕微鏡下で採取する。この時、周囲の上皮を可能な限り除き、げっ歯類のサンプルとする。

(2) 霊長類味蕾オルガノイドの作製

本研究では、京大霊長類研究所で飼育されており、旧世界ザルに属するニホンザルの舌の有郭乳頭をサンプルとして使用する。サル味蕾オルガノイドは、有郭乳頭下部のトレンチ部分から細

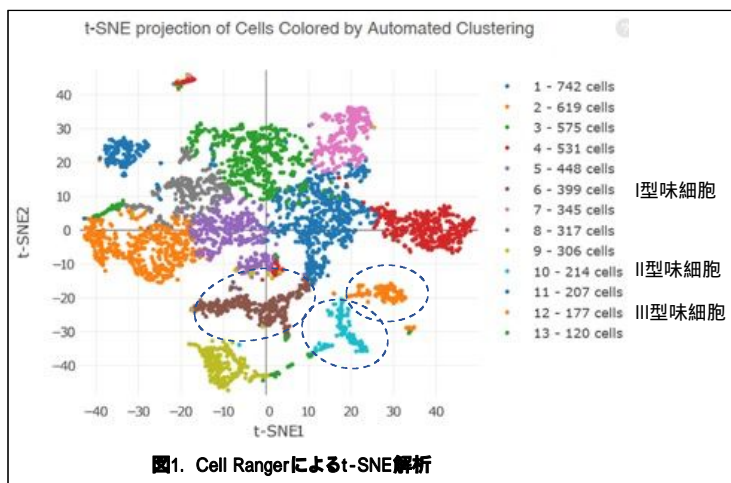
胞を取得し、マトリゲルを含む味蕾オルガノイド用培地(研究室で作製した Wnt3a-CM、R-spondin CM や Noggin などを基本培地に添加したもの)にて培養することで作製する。

(3) シングルセルトランスクリプトーム解析

まず、霊長類味蕾のコントロールとしてマウスのサンプルを調製した。C57BL/6J マウス 6 匹の舌より有郭乳頭を採取し、トリプシン/EDTA にて 1 細胞にした後、10x Genomics 社 Chromium システムを用いて Single cell 3' Library を構築した。MGI 社 MGISEQ2000 によりシーケンスを行い、シングルセルシーケンス解析パイプライン Cell Ranger および Loupe Cell Browser により 1 細胞レベルでの遺伝子発現情報の可視化・分類を行った。Loupe Cell Browser 上の細胞クラスターにおける遺伝子発現データと、これまでの味細胞研究から得られていた遺伝子発現データの比較解析を行った。

4. 研究成果

(1)有郭乳頭からは約 5 千細胞の 1 細胞レベルでの遺伝子発現情報を得た。1 細胞あたりの平均検出遺伝子数は約 5 千遺伝子だった。Loupe Cell Browser 上のクラスター解析からは、有郭乳頭からも I 型、II 型、III 型と考えられるクラスターが得られた(図 1)。これまでの報告通り、II 型クラスターには甘味、うま味、苦味受容体と味覚シグナルを伝える分子が特異的に発現しており、III 型クラスターには酸味受容体候補の発現が確認できている。一方、ChgA など内分泌細胞のマーカーが III 型味細胞に発現していることや、解析が進んでいない I 型味細胞の新たなマーカー分子となりうるものも多数見出された。また、味細胞様の Dclk1 陽性クラスターも新たに発見されるなど、これまで見落としていた細胞群が本研究で明らかとなっている。今後、味幹細胞から味前駆細胞へ、そして最終的に成熟した味細胞への分化経路をマッピングできたらと考えている。



(2)コロナ禍の影響のため、旧京大霊長類研究所には予定を下回る回数しかサンプリングに訪れることができなかったが、サル味蕾オルガノイドの作製には毎回成功している。作製したサル味蕾オルガノイドをシングルセル化し、10x Genomics 社 Chromium システムにてライブラリーを構築し、シーケンスに供している。現在結果の解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩槻健
2. 発表標題 霊長類味センサー細胞の培養とその利用
3. 学会等名 感覚研究コンソーシアム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩槻健
2. 発表標題 オルガノイド培養用法を用いた消化器味センサー細胞の機能解析
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーjing学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ken Iwatsuki
2. 発表標題 Generation and characterization of endoderm-derived chemosensory cells from non-human primates
3. 学会等名 International Symposium on Affective Science and Engineering 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩槻健
2. 発表標題 消化器における栄養素と危険物のセンサー
3. 学会等名 第107回 日本栄養・食糧学会関東支部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩槻健
2. 発表標題 Generation and characterization of endoderm-derived chemosensory cells from non-human primates
3. 学会等名 International Symposium on Affective Science and Engineering 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩槻健
2. 発表標題 消化器における栄養素と危険物のセンサー
3. 学会等名 第107回 日本栄養・食糧学会関東支部シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩槻健
2. 発表標題 オルガノイド培養用法を用いた消化器味センサー細胞の機能解析
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーシング学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩槻健、早津徳人、岡崎康司、遠藤高帆、橋本浩介、金丸青里香、山根拓実、大石祐一
2. 発表標題 1細胞トランスクリプトーム解析によるマウス味細胞の分類
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中安亜希、金丸青里香、稲葉明彦、佐藤幸治、今井啓雄、山根拓実、大石祐一、岩槻健
2. 発表標題 霊長類オルガノイドを用いたうま味評価系構築の試み
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩槻健、金丸青里香、中安亜希、稲葉明彦、田中啓介、今井啓雄、山根拓実、大石祐一
2. 発表標題 - アミノ酪酸 (GABA) がニホンザル由来味蓄オルガノイドに及ぼす影響
3. 学会等名 第74回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩槻健、稲葉明彦、中嶋ちえみ	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 242
3. 書名 実験医学 増刊 食と健康を結ぶメディカルサイエンス	

〔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	早津 徳人 (Hayatsu Norihito) (80543058)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------