

機関番号：27102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 20 年度 ～ 平成 22 年度

課題番号：20592143

研究課題名 (和文) 味覚情報伝達における性ステロイドーエストロゲンの機能解析

研究課題名 (英文) Possible function of estrogen on the taste transduction system.

研究代表者 豊島邦昭 (KUNIAKI TOYOSHIMA)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10112559

## 研究成果の概要 (和文)：

味蕾は微細構造的ならびに免疫組織化学的に複数の細胞型から構成されることが知られている。この中で II 型細胞は G タンパク質共役味受容体 (GPCR) が発現することから、味覚情報伝達細胞 (味細胞) とみなされている。しかしながら、II 型細胞は神経と広く接続するにもかかわらず、微細構造的にシナプス小胞はみられず、化学的シナプスの形をなしていない。情報伝達物質に関しても、いまだよく理解されていない。我々は、II 型細胞にはよく発達した滑面小胞体、ミトコンドリアに加えて脂肪滴が存在し、ステロイド産生細胞に形態的に類似することを見いだした。さらに性ステロイド生合成に必須の酵素 (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>arom</sub>) を発現することを免疫組織学的に示し、II 型細胞がエストロゲン合成能をもつことを示してきた。本研究では、エストロゲン受容体が味蕾に発現するのかを RT-PCR と免疫組織化学的、ならびに免疫電顕的に観察したものである。その結果、おそらく II 型細胞と思われる味蕾の一部の細胞に、エストロゲン受容体 (ER- $\alpha$ , と GPR30) が発現することが明らかとなった。

## 研究成果の概要 (英文)：

The present study demonstrated for the first time the localization and pattern of expression of key enzymes for steroidogenesis, cytochrome P450 side-chain-cleavage (P450<sub>scc</sub>) and P450 aromatase, in the taste buds of rat circumvallate papillae, using immunoblot analyses and immunohistochemistry. Immunoblot analyses showed that proteins with a molecular weight close to that of rat adrenal cytochrome P450<sub>scc</sub> and a molecular weight close to that of rat ovary cytochrome P450 aromatase were present in the rat circumvallate papillae. In immunohistochemistry, antibodies against cytochrome P450<sub>scc</sub> and P450<sub>aromatase</sub> yielded the labelings of a subset of taste bud cells. In double immunolabeling of P450<sub>scc</sub> and  $\alpha$ -gustducin or phospholipase C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2), which were considered as markers of a majority of type II cells, P450<sub>scc</sub> co-expressed in a subset of  $\alpha$ -gustducin or PLC $\beta$ 2, but did not co-express major type III cell marker, neural adhesion molecule (NCAM). Further double immunolabeled studies showed that P450<sub>aromatase</sub> co-expressed in a subset of  $\alpha$ -gustducin or PLC $\beta$ 2, but did not co-express PGP9.5, a marker of a majority of type III cell. The selective localization of cytochrome P450<sub>scc</sub> and P450<sub>aromatase</sub> strongly suggests that estrogen biosynthesis from cholesterol might occur in a subset of type II cells of the rat taste buds. Although the full significance of estrogens in the taste bud function is not yet understood, estrogens appears to be an important regulator of taste transduction, as is the case with ATP (Finger *et al.*, 2005), which further supports the centrality of taste cells in the life of taste buds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,900,000	570,000	2,500,000
平成21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科医学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）、味蕾

1. 研究開始当初の背景：我々は、ラットの味細胞が、P450<sub>scc</sub>、P450<sub>aroma</sub>をはじめとしたステロイド合成酵素を含有することを、初めて発見し、報告した。とくに味細胞での P450<sub>aroma</sub> 発現の発見は、味覚情報伝達にエストロゲンが重要な役割をもつことを強く示唆する。これは、エストロゲンが激減する更年期以降の女性に味覚障害が多く発症することを裏付けるものと考えられる。本研究では、P450<sub>aroma</sub> 遺伝子欠損マウスを用いて、味蕾の構造や味覚行動解析をおこない、性ステロイドの味覚受容伝達における重要性を直接証明することを試みる。これによって、味覚障害の治療法の開発と臨床応用への展開が期待されるが、このような観点に立った研究は、これまで全くない。

2. 研究の目的：我々は、ラットの味細胞が、P450<sub>scc</sub>、P450<sub>aroma</sub>をはじめとしたステロイド合成酵素を含有することを、初めて発見した。近年、性ステロイドが第4世代の細胞間、特に神経情報伝達に重要な役割をもつことが示唆されている。本研究は性ステロイド、特にエストロゲンが味覚情報伝達に重要であることを示すのを目的としている。エストロゲンはテストステロンから P450<sub>aroma</sub> の酵素作用で合成される。本研究では P450<sub>aromatase</sub> 遺伝子欠損マウス(ArKO)を用いて、味蕾の形態、機能、味覚行動の解析をおこない、味覚の情報伝達にエストロゲンが重要であることを、直接証明するとともに、味覚障害治療への新しい研究の展開を試みるものである。

3. 研究の方法：本研究に用いるチトクローム P450<sub>aromatase</sub> ノックアウトマウス(C57BL/6J, ArKO<sup>-/-</sup>)は、藤田保健衛生大学医学部生化学第一講座の原田信広教授の研究グループに

よって作製されたもので、その heterozygous (+/-)ArKO、male, female を供与していたとき、本学動物実験施設で作製したものである(Honda S, Harada N. et al. *Biochem Biophys Res Commun* 252:445-449, 1998).

(1) マウス有郭乳頭におけるエストロゲン合成にかかわる酵素群の mRNA と蛋白質の発現の検索

① C57BL/6J, wild-type (+/+)マウス有郭乳頭から total RNA を採取し、次にあげる酵素群の遺伝子発現を RT-PCR, in situ hybridization により検出を試みる. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), Cholesterol side-chain cleavage (P450<sub>scc</sub>:CYP11A), 3 $\beta$ -HSDtype 1 (HSD3B1), 3 $\beta$ -HSDtype 2 (HSD3B2), 17 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP17), 21-Hydroxylase (CYP21), 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP11B1), P450 aromatase (CYP19)

② 各酵素に対する抗体を用いて、光顕的ならびに電顕的免疫組織化学をおこなう。さらに、各味蕾細胞型のマーカー分子に対する抗体(II型細胞：a-gustducin, PLC $\beta$ 2 など, III型細胞：NCAM など)をもちいて、二重免疫染色をおこない、エストロゲン合成にかかわる酵素が、どの細胞型に発現するのかを検索する。免疫電顕法では、Immunogold法を用いる。

(2) Homozygous(-/-)ArKO マウスの作製

① 供与された heterozygous (+/-)ArKO マウス(♂, ♀)の mating をおこなう。3種類のプライマー (AR-OV-1, AR-OV-2R, Neo-6R)を組み合わせて PCR を行う。野生型マウスでは、AR-OV-1 と AR-OV-2R の組み合わせで PCR を行うと、504 bp の DNA

産物が検出される。ArKO マウスでは、AR-OV-2R と Neo-6R の組み合わせで PCR をおこなうと、180 bp の DNA 産物が検出されることにより判別する。ヘテロ型マウスでは、180 bp と 504 bp の両方の DNA 産物が検出されることによって判別する。

② homozygous (-/-)ArKO, heterozygous(+/-)ArKO,wild-type (+/+)の各マウスを 4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した後、有郭乳頭、葉状乳頭ならびに茸状乳頭を切り出し、凍結切片を作製する。a-gustducin, PLCβ2, IP3R3, PGP9.5, P2X2, P2X3, mGluR1a などをはじめとした、味蕾や味神経に発現することが知られている分子群に対する各抗体をもちいて免疫組織化学的に検索を行い、味蕾の細胞生物学的特性の比較検討をおこなう。

(3) C57BL/6J wild-type (+/+)マウスと homozygous (-/-)ArKO マウスの味覚応答の検討。

① NaCl(300mM), sucrose (500mM), quinine hydrochloride (QHCl, 20mM), citric acid (20mM), monosodium glutamate(MSG, 200mM)をはじめとした各味液で舌を刺激し、鼓索神経および舌咽神経から味覚応答を記録し、C57BL/6J wild-type (+/+)マウスと homozygous (-/-)ArKO マウスで比較検討を行う。

(4) C57BL/6J wild-type (+/+)マウスと homozygous (-/-)ArKO マウスを用いて Two Bottle Choice Test をおこなう。

①脱イオンした蒸留水と saccharin(1-3mM), SC45647(10-300μM), Quinine(0.01-3.0mM), sucrose 1-100mM), monosodium glutamate(3-300mM), Denatonium(0.03-3mM), citric aci(1-30mM), caffeine(1-30mM) などの味液の飲量の差を two bottle choice test 法により検討し、味覚に与えるエストロゲンの役割を調べる。

② NaCl(300mM), sucrose (500mM), quinine hydrochloride (QHCl, 20mM), citric acid (20mM), monosodium glutamate(MSG, 200mM)をはじめとした各味液で舌を刺激し、鼓索神経および舌咽神経から味覚応答を記録し、C57BL/6J wild-type (+/+)マウスと homozygous (-/-)ArKO マウスで比較検討を行う。

(2) homozygous (-/-)ArKO, heterozygous(+/-)ArKO,wild-type (+/+)の各

マウスの有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭の味蕾の微細構造的観察。

① homozygous (-/-)ArKO, heterozygous(+/-)ArKO,wild-type (+/+)の各マウスを 1/2Karnovsky 固定液で灌流固定をおこない、有郭乳頭、葉状乳頭ならびに茸状乳頭を切り出した後、オスミック酸にて後固定し、Epon812 樹脂に包埋する。超薄切片を作製した後、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色した後、透過型電顕 (JSM1200EX) で観察し、各マウスの味蕾の微細構造を比較検討する。

4. 研究成果：味蕾は微細構造的ならびに免疫組織化学的に複数の細胞型から構成されることが知られている。この中で II 型細胞は G タンパク質共役味受容体 (GPCR) が発現することから、味覚情報伝達細胞 (味細胞) とみなされている。しかしながら、II 型細胞は神経と広く接続するにもかかわらず、微細構造的にシナプス小胞はみられず、化学的シナプスの形をなしていない。情報伝達物質に関しても、いまだよく理解されていない。我々は、II 型細胞にはよく発達した滑面小胞体、ミトコンドリアに加えて脂肪滴が存在し、ステロイド産生細胞に形態的に類似することを見いだした。さらに性ステロイド生合成に必須の酵素 (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>arom</sub>) を発現することを免疫組織学的に示し、II 型細胞がエストロゲン合成能をもつことを示してきた。本研究では、エストロゲン受容体が味蕾に発現するのかを RT-PCR と免疫組織化学的、ならびに免疫電顕的に観察したものである。その結果、おそらく II 型細胞と思われる味蕾の一部の細胞に、エストロゲン受容体 (ER-α, と GPR30) が発現することが明らかとなった。

#### 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)

Seta, Y., Oda, M., Kataoka, S., Toyono, T., Toyoshima, K. : Mash 1 is required for the differentiation of AADC-positive type III cells in mouse taste buds. *Developmental Dynamics* 240:775-784, 2011.

[雑誌論文] (計 9 件)

〔学会発表〕（計6件）

〔図書〕（計1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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者：豊島邦昭

(KUNIAKI TOYOSHIMA)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10112559

(2) 研究分担者：瀬田祐司

(YUJI SETA)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90291616

(3) 研究分担者：豊野孝

(TAKASHI TOYONO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10311929