

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05888

研究課題名(和文) 苦味を受容する味細胞の分化を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the differentiation of bitter taste cells

研究代表者

應本 真 (Ohmoto, Makoto)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・講師

研究者番号：30447362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：味覚は、食品に含まれる物質が口腔内の味蕾中の味細胞により受容されることにより生じる。甘味、うま味、苦味、酸味、塩味の5基本味は、それぞれ異なる味細胞によって受容される。こうした味細胞種の多様性を生み出す分子機構を明らかにするため、特定の味細胞に発現する転写因子の探索を行ったところ、Eya1が苦味細胞に特異的に発現することを見出した。次に、味蕾におけるEya1の機能を解析するために、味蕾特異的にEya1を欠損したマウスを作製した。このマウスの味蕾では、苦味受容体のシグナル頻度が減少していたことから、Eya1が苦味受容味細胞の分化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味細胞は1-3週間の寿命を持ち、口腔内では、上皮系の細胞系譜に属する幹細胞から絶えず新たな味細胞が供給され続けている。常に様々な味を感じることができるのは、種々の味細胞が一定の割合で存在しているためである。こうした味覚の恒常性を解明するためには、種々の味細胞がどのように産生され、それぞれの機能を持った味細胞に分化していくのかを理解する必要がある。本研究の成果は、味覚の恒常性を維持するための機構の解明やさらには味覚障害の発症機構の解明へと繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The sense of taste occurs when chemical substances in food are detected by taste cells in the taste buds. The five basic tastes (sweet, umami, bitter, sour, and salty) are each detected by different taste cells. To elucidate the molecular mechanism underlying the diversity of taste cells, we searched for the transcription factors that are expressed in specific taste cells and found that Eya1 is specifically expressed in bitter taste cells. To further investigate the role of Eya1 in taste buds, we created mice that lacked Eya1 in their taste buds. In these mice, we observed a reduction in the signal frequency of bitter taste receptors in the taste buds, indicating that Eya1 plays a role in the differentiation of bitter taste cells.

研究分野：食品科学

キーワード：味覚 味細胞 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

味覚は、食品中の化学物質を味蓄と呼ばれる感覚組織中の味細胞が感知し、その情報が脳に伝達されることにより生じる感覚である。我々ヒトが容易に認知・識別できる甘味、旨味、苦味、酸味、および塩味は5基本味と呼ばれている。これまでの研究から、味覚受容体として、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)である甘味・旨味受容体T1Rファミリー分子および苦味受容体T2Rファミリー分子が同定された。酸味や塩味はこれらのGPCRを発現しない味細胞により受容される。酸味はPkd2l1を発現する味細胞により、塩味はENaC $\alpha$ を発現する味細胞の一部の細胞により受容される。このように、5基本味は互いに異なる味細胞により受容されることから、味覚の多様性は味細胞の種類が多様性に相関していることが示されている。味細胞は1~3週間の寿命を持ち、上皮系の細胞系譜に属する幹細胞から絶えず新たな味細胞が供給され続けている。我々が常に様々な味を感じるのは、絶えず味細胞が産生され、種々の味細胞が一定の割合で存在しているからである。こうした味覚の恒常性を解明するためには、種々の味細胞がどのように産生され、それぞれの機能を持った味細胞へと分化するのか、といったことを知る必要がある。

我々は、味蓄に発現する転写因子遺伝子に着目し、POUホメオドメインタンパク質Skn-1aが甘味、旨味、苦味を受容する味細胞(それぞれ、甘味細胞、旨味細胞、苦味細胞と呼ぶ)に特異的に発現し、これらの味細胞への運命決定を制御していることを発見し、味細胞の多様性が産生される分子機構の一端を明らかにしてきた。また、塩味細胞も甘味、旨味、苦味細胞と同様にSkn-1a依存的な味細胞であることを見出した。しかしながら、Skn-1a依存的な味細胞である甘味、旨味、苦味、塩味細胞の4種の味細胞がどのように細分化するのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、種々の味細胞がどのように産生されそれぞれの機能を持った味細胞へと分化するのかを明らかにするため、特にSkn-1a依存的な味細胞の細分化に関与する分子機構を解明するため、Skn-1a依存的な味細胞に発現する転写因子を探索することを目的とした。

(2) また、特定の味細胞に発現する転写因子を見出し、その遺伝子の変異マウスを作製、解析することにより、味細胞の発生・分化機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Skn-1a依存的な味細胞に発現する転写因子を探索するため、野生型マウスの味蓄および甘味、旨味、苦味、塩味細胞の4種の味細胞が消失したSkn-1aノックアウト(KO)マウスの味蓄のトランスクリプトーム解析を行い、それぞれの比較を行った。野生型マウスの味蓄で高く、かつ、Skn-1aノックアウトマウスの味蓄で低く発現している遺伝子を抽出し、それぞれの遺伝子の発現の様子をin situ hybridization (ISH)により観察した。また、味蓄中の一部の細胞にのみ発現する遺伝子について、味細胞マーカーとの二重ISHを行い、転写因子が発現する味細胞の同定を行った。

(2) 上記の方法で見出した転写因子Eya1の味蓄における機能を明らかにするため、Eya1遺伝子欠損マウスの作製を行った。Eya1遺伝子を欠損したマウスは胎生致死であるため、成体マウスでのEya1の機能を解析することはできない。そこで、味蓄特異的にEya1遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスの作成に取り組んだ。Eya1遺伝子のエクソンの1つを挟むようにして2つのloxP配列を挿入したfloxマウスを作製し、このマウスと、味蓄の幹細胞に薬剤誘導性CreリコンビナーゼであるCreERT2を誘導することができるノックインマウス系統(Krt5-CreERT2マウス)を掛け合わせることで、味蓄特異的にEya1遺伝子を欠損することのできるマウスを作製した。得られたマウスにタモキシフェンを投与することによって、味蓄の幹細胞においてEya1遺伝子の欠損を誘導し、誘導後2ヶ月以降のマウスの味蓄における味覚関連遺伝子の発現解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 上記方法で抽出された遺伝子の味蓄における発現解析を行ったところ、転写因子Eya1のmRNAのシグナルが野生型マウスの味蓄中の一部の細胞で強く観察された。一方、Skn-1a KOマウスの味蓄にはEya1のシグナルはほとんど観察されなかったことから、Eya1はSkn-1a系譜の味細胞特異的に発現することが示唆された。次に、野生型マウスの有郭乳頭の味蓄において、Eya1と甘味、旨味、苦味細胞マーカーであるTrpm5の二重ISHを行った結果、Trpm5のシグナルが観察された細胞のうち、約半数の細胞においてEya1のシグナルが観察された(図1)。また、Eya1のシグナルが観察された細胞のうち、ごく少数の細胞においてTrpm5のシグナルが観察されなかった。これらのEya1陽性/Trpm5陰性細胞は主に味蓄の基底部に観察された。Eya1と味覚受容体との発現相関を二重ISHにより解析したところ、甘味・うま味受容体Tas1r3を発現する味細胞の大部分の細胞においてEya1のシグナルは観察されず、苦味受容体

Tas2rs を発現する味細胞の大部分の細胞において Eya1 のシグナルが観察された (図 1)。以上の結果から有郭乳頭において Eya1 は甘味、うま味細胞には発現せず、主に苦味細胞に発現していることが明らかになった。また、Eya1 を単独で発現する細胞 (主に味蕾の基底部に観察される Eya1 陽性/Trpm5 陰性細胞) が未分化細胞であるかどうか調べるため、Skn-1a と Eya1 の二重 ISH を行った結果、Eya1 のシグナルが観察された細胞のほぼ全ての細胞において、Skn-1a のシグナルが観察された (図 1)。以上の結果から、Eya1 は有郭乳頭の味蕾において、苦味細胞に加え、未分化の状態にある細胞にも発現することが明らかとなった。

(2) Eya1 遺伝子の組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作製するために、Eya1 遺伝子の flox マウス (Eya1 遺伝子のエクソン 10 を挟むようにして 2 つの loxP 配列が挿入された遺伝子を持つマウス) を作製した (図 2)。

Eya1-flox アリルをホモに持つマウスにおいて、Cre リコンビナーゼにより 2 つの loxP 配列の間で組換えが生じると、エクソン 10 が切り離され、以降の配列でフレームシフトが生じ、機能的な Eya1 タンパク質が作られなくなるため、組織特異的な Eya1 遺伝子欠損マウスが作製される (図 2)。また、味蕾特異的に Eya1 遺伝子を欠損するための Cre driver マウスとして、味蕾を産生する幹細胞において薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼである CreERT2 を発現する Krt5-CreERT2 ノックインマウスを用いた。Eya1-flox マウスおよび Krt5-CreERT2 ノックインマウスを用いて、Krt5(CreERT2/+); Eya1(flox/flox)マウスを作製し、タモキシフェンの投与により、味蕾幹細胞において組換えを誘導したマウス (Eya1 cKO マウス) を作製した。Eya1 cKO マウスの有郭乳頭の味蕾における味覚関連遺伝子の発現の様子を ISH により調べた結果、苦味受容体である Tas2r のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは減少していた。一方、甘味・うま味受容体である Tas1r3 のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは増加していた。甘味、うま味、苦味細胞に共通して発現する Trpm5 のシグナルは、コントロールマウスと Eya1 cKO マウスで大きな差は見られなかった。以上の結果から、Eya1 は苦味細胞の発生や分化において何らかの関与をしていることが示唆された。

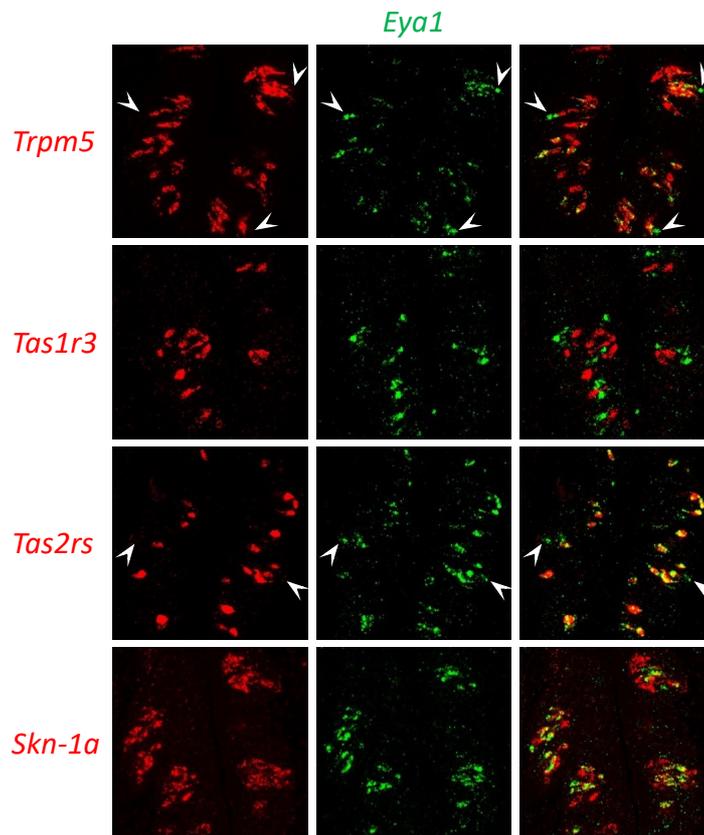


図1 Eya1を発現する味細胞種の解析

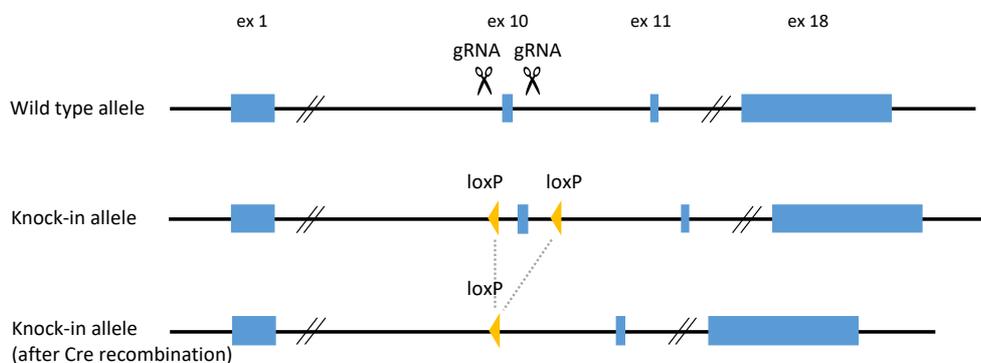


図2 Eya1-floxマウスのコンストラクト

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ohmoto M, Nakamura S, Wang H, Jiang P, Hirota J, Matsumoto I	4. 巻 17
2. 論文標題 Maintenance and turnover of Sox2+ adult stem cells in the gustatory epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0267683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0267683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 應本 真	4. 巻 6
2. 論文標題 様々な味細胞の産出の分子機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 52-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohmoto M, Lei W, Yamashita J, Hirota J, Jiang P, Matsumoto I	4. 巻 15
2. 論文標題 SOX2 regulates homeostasis of taste bud cells and lingual epithelial cells in posterior tongue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0240848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0240848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohmoto M, Jyotaki M, Foskett JK, Matsumoto I	4. 巻 7
2. 論文標題 Sodium-Taste Cells Require Skn-1a for Generation and Share Molecular Features with Sweet, Umami, and Bitter Taste Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0385-20.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohmoto M, Kitamoto S, Hirota J	4. 巻 383
2. 論文標題 Expression of Eya1 in mouse taste buds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 979-986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-020-03311-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ohmoto M, Jyotaki M, Matsumoto I
2. 発表標題 Characterizing sodium taste cells
3. 学会等名 International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北本 颯希、應本 真、廣田 順二
2. 発表標題 味細胞に発現する転写因子の探索
3. 学会等名 日本味と匂学会 第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 應本 真、北本 颯希、廣田 順二
2. 発表標題 苦味細胞における転写因子Eya1の発現
3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Monell Chemical Senses Center			