

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580363

研究課題名（和文）現象と発現の両解析法によって解明する家畜・家禽の味覚受容機構

研究課題名（英文） The mechanism of taste transduction of the chicken - molecular biological, behavioral analytical and  $Ca^{2+}$  imaging studies-

研究代表者：田畑正志（Shoji Tabata）

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：40145503

## 研究成果の概要（和文）：

ニワトリのゲノムを解析すると苦味関連遺伝子 T2Rs は3種類存在する。これは齧歯類やヒト（40種類程度と考えられている）に比べると著しく少ないと思われる。まず著者らは分子生物学的手法を用いて T2R1、T2R2 および T2R3 の3種類の T2Rs 受容体遺伝子の発現を味蕾を含む口腔上皮に証明した。味蕾を含まない上皮では発現しないことから、この3種類の苦味関連遺伝子が苦味受容において機能していることを示唆する結果である。次に哺乳類で苦味物質として知られている塩酸キニーネを用いて行動実験を行った。するとニワトリは明らかに塩酸キニーネを忌避していることが明らかになり、苦味として認識していることが考えられた。最後に味蕾を単離して  $Ca^{2+}$  イメージング法による解析が可能かを試みた。単離味蕾に研究期間中に作成したニワトリガストデュシン抗体を用いて免疫組織化学法を適用すると明瞭な陽性反応を得た。すなわち、ニワトリ味蕾の単離が可能となった。そこでこの単離味蕾を用いて共焦点レーザー顕微鏡下に  $Ca^{2+}$  イメージング法を行った。還流液に塩酸キニーネを2回投与すると、投与に応じて明瞭な  $Ca^{2+}$  濃度上昇反応が得られた。味蕾の全ての細胞が応答反応を示すのではなく、一部の細胞が応答反応を示すことが明らかになった。この現象は、哺乳類と類似するものであった。

## 研究成果の概要（英文）：

The mechanism of taste transduction of the chicken was investigated with the molecular biological, behavioral analytical and  $Ca^{2+}$  imaging studies. The T2R1, T2R2 and T2R3 were confirmed in the oral epithelium, that contained the taste buds, by means of the molecular biological method. The quinine which was known as a bitter substance for mammals was also tasted as the bitter substance for the chicken by the behavioral analysis. We could obtain the antiserum against the chicken gustducin in this investigation period. The isolated taste bud-like tissues were positively reacted with this chicken gustducin, that was, these isolated taste-bud tissues were undoubtedly the taste buds. The isolated taste buds showed the taste response with the quinine by means of the  $Ca^{2+}$  imaging method.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000

2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ニワトリ、味覚、T2Rs、ガストデューシン、カルシウムイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

今(21)世紀初頭、甘味および旨味の味覚受容において、T1R遺伝子群に由来する味覚受容体の存在が報告された。すなわち、実験動物のラットおよびマウスを用いて、甘味受容体はT1R2とT1R3遺伝子が共発現する味細胞(すなわち甘味受容細胞)は、甘味物質に対する味応答性を示し、旨味受容体はT1R1とT1R3遺伝子が共発現する味細胞(旨味受容細胞)は、アミノ酸に対する味応答性を示すことが明らかにされた。興味あることに、これら2種類の受容体は同一細胞で共発現することはない。すなわち甘味を受容する細胞は甘味のみを、旨味を受容する細胞は旨味のみを感じるということである。一方、それぞれの細胞はガストデューシンと呼ばれる味蕾特異的 G-タンパク質を発現することから、甘味および旨味ともに味覚受容において下流域で働く信号伝達機構は同様であり、結果として味細胞においてカルシウムイオン濃度の一過性の上昇が起こり、最終的にニューロンへの伝達が起こることが想像されている。ここで、ガストデューシンについて手短かに述べる。著者らは、この G-タンパク質が味蕾を構成する4種類の味細胞のうち II 型味細胞に発現することを電顕免疫組織化学的方法でラット (Yang, Tabata et al., J. Comp. Neurol., 2000) およびウシ (Tabata et al., Anat. Rec., 2003; Tabata et al., J. Vet. Med. Sci., 2006) の味蕾を材料に用いて証明した。すなわちガストデューシンは II 型味細胞のマーカータンパク質として利用でき、本研究でもそのようにして利用する。ガストデューシンは信号伝達系の下流域で PLC $\beta$ 2 に働き、2次メッセンジャーとして IP $_3$  を派生させ、近年ではさらに細胞膜の TRPM5 陽イオン動員チャンネルに働くことが想像されている。

本研究申請時にはニワトリの味蕾単離培養法は確立されておらず、また、味蕾細胞

であることを証明するマーカータンパク質の存在も知られていなかった。まずは、ニワトリの味覚受容機構をタンパク質の発現面から解明することに務めることにした。そして、行動学的解析手法を用いて哺乳類で苦味物質として知られている塩酸キニーネに対する応答反応を明らかにすることにした。最後にニワトリ単離味蕾を採取して培養下にカルシウムイメージング法による研究が可能か否かを証明することにした。

### 2. 研究の目的

家畜・家禽、今回は特にニワトリの味覚受容機構解明を目的に本研究を行った。研究初年度は、T1Rs 遺伝子および T2Rs 遺伝子の味蕾を含む上皮における発現と他臓器における発現解析を行った。研究第二年度は哺乳類に対する苦味物質として知られている塩酸キニーネを用いた行動解析法により、ニワトリは塩酸キニーネを苦味物質として味覚受容しているか否かを明らかにした。さらに、味蕾単離法の確立に先立って、味蕾特異的 G-タンパク質のガストデューシンに対する抗体の作成を試みた。研究最終年度は、ニワトリ味蕾単離法の確立と、カルシウムイメージング法を用いた苦味物質である塩酸キニーネに対する応答反応を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

### 3. 研究の方法

ニワトリゲノムより予測される T1R1、T1R3、T2R1、T2R2 および T2R3 の塩基配列をもとにプライマー作成し、味蕾を含む口蓋と味蕾のない脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、小腸および精巣を材料に用いて PCR 反応を行った。得られた PCR 産物はゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、紫外線確認した。

塩酸キニーネは哺乳類の苦味物質として知られている。この塩酸キニーネを用いて

行動学的解析法を利用してニワトリが塩酸キニーネに対して忌避行動を示すかを行動学的に解析した。

ニワトリガストデューシン配列から合成タンパク質を作成し、これをウサギに免疫した。得られた抗血清をウェスタンブロット法と免疫組織化学法を用いて証明し、さらに mRNA と免疫組織化学法を同一片上で行う FISH 法を用いてその特異性を確認した。

ニワトリ口蓋からガラスピペットを用いて味蕾と思われる組織塊を採取した。これが味蕾組織であることを確認するために、ガストデューシン抗体で免疫染色を行った。味蕾であることを確認後、底面がガバガラスで作られたディッシュ中に味蕾組織を付着させた。液を還流させながら共焦点レーザー顕微鏡を用いて  $Ca^{2+}$  イメージングを行った。苦味物質の塩酸キニーネを時間において 2 回投与した。

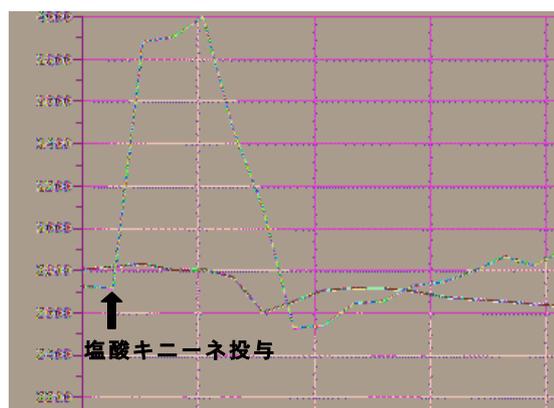
#### 4. 研究成果

研究初年度において以下の成果が得られた。すなわち、ニワトリ味蕾を含む上皮は、T1R1 と T1R3 の T1Rs 受容体遺伝子の発現が認められた。これら 2 種類の遺伝子のうち、前者は口蓋（味蕾を含む）上皮にのみ発現し、脳、心臓、肝臓他の臓器に発現は認められなかったが、後者は多くの臓器で遺伝子発現が確認された。さらに T2R1、T2R2 および T2R3 の 3 種類の T2Rs 受容体遺伝子の発現解析を行ったところ、口蓋（味蕾を含む）上皮に発現が確認されたが、他のどの臓器にも発現は確認されなかった。

研究第二年度において以下の成果が得られた。すなわち、ロード・アイランド・レッド種ニワトリは 0.5mM 塩酸キニーネ添加水を有意差が認められないながら忌避しているようであった。2mM 濃度の添加水に対しては有意に忌避行動を示した。一方、ブライラー用ニワトリは 0.5mM 濃度塩酸キニーネ添加水に対して忌避行動を示し、有意差が認められた。次に、ガストデューシン抗体作成について述べる。抗ニワトリ-ガストデューシンタンパク質を投与されたウサギの血清を採取し、ウェスタンブロット法で確認したところ、45kD 付近に明瞭な免疫陽性のバンドが確認された。さらにこの抗血清を用いると、ニワトリ口蓋に存在する味蕾細胞が特異的に免疫陽性反応を示した。以上のことから、得られた抗血清はニワトリ抗ガストデューシン抗体を含むことが明らかになった。さらにガストデューシン mRNA とガストデューシン抗体を用いた二重染色法 (FISH 法) を用いると同じ味蕾細胞に反応が得られ、ガストデューシン抗体が特異性のある抗体であることも証明さ

れた。

最終年度において以下の成果が得られた。すなわち、ニワトリ味蕾特異的 G-タンパク質のガストデューシン抗体を用いて得られた単離組織塊に蛍光免疫染色を施した。するとこの組織塊は明瞭な蛍光像を示し、味蕾であることが明らかになり、本単離法によってニワトリ味蕾を選択的に採取し、培養することが可能であることが証明された。そしてこの味蕾を用いてカルシウムイメージング法を行った。苦味物質の塩酸キニーネを還流液に加えて観察すると味蕾のある特定の細胞群がカルシウムイオン濃度上昇応答を示した（下の図赤線）。別な細胞群はこの苦味物質に対して何ら応答を示さなかった（下の図青線）。すなわち、ニワトリ味蕾細胞は苦味に応答する細胞とそれには応答しない細胞が存在することが明らかになった。このことは、哺乳類味蕾細胞と同一であり、鳥類であるニワトリも味覚受容機構は哺乳類と類似していることを示唆する結果であり、今後、別種の味物質、例えば甘味、あるいは旨味（アミノ酸）、に対しての味応答反応の解析実験を次年度以降行いたいと考えている。



#### 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 4 件）

1. Gustducin is expressed in the taste buds of the chicken. K. Kudo, K. Wakamatsu, S. Nishijmura and S. Tabata Animal Science Journal, 査読あり 81:666-672, 2010.

2. The number of taste buds is related to bitter taste sensitivity in layer and broiler chickens. K. Kudo, J. Shiraishi, S. Nishimura, T. Bungo and S. Tabata. Animal Science Journal, 査読あり 81:240-244, 2010

3. ニワトリにおける味覚受容体 T1R1 および T1R3 の発現 瑞慶山耕平 工藤健一 西村正太郎 田畑正志 日本味と匂学会誌、査読あり 日本味と匂学会誌 16:299-302 2009.

4. ニワトリにおける G タンパク質 gustducin の発現について 工藤健一 若松啓一 西村正太郎 田畑正志 日本味と匂学会誌、査読あり 16:295-298 2009.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. ニワトリ味蕾の単離法および  $Ca^{2+}$  イメージング法の確立 野村透美 西村正太郎 田畑正志 日本畜産学会第 114 回大会 平成 23 年 8 月 26 日 青森県十和田市

2. ニワトリ gustducin の mRNA とタンパク質の局在の検討 勝部亮介 西村正太郎 田畑正志 日本畜産学会第 114 回大会 平成 23 年 8 月 26 日 青森県十和田市

3. ニワトリにおける味覚受容体遺伝子 T1R1 および T1R3 の発現 瑞慶山耕平 工藤健一 西村正太郎 田畑正志 日本味と匂学会第 43 回大会 平成 21 年 9 月 2~4 日 北海道旭川市

4. ニワトリにおける G タンパク質 gustducin の発現について 工藤健一 若松啓一 西村正太郎 田畑正志 日本味と匂学会第 43 回大会 平成 21 年 9 月 2~4 日 北海道旭川市

〔図書〕(計 0 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：田畑正志 (Shoji Tabata)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：40145503

(2)研究分担者：なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者：なし  
( )

研究者番号：