

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06270

研究課題名(和文) 味細胞における味情報の生体情報変換機構

研究課題名(英文) Taste signal transduction in taste receptor cells

研究代表者

大坪 義孝 (Ohtubo, Yoshitaka)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00380725

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)：味の認識は味物質と口腔内に分布する味細胞との接触から始まる。味細胞は味物質が持つ化学情報を生体情報である電気信号に変換する。しかし、味細胞が生成する電気信号(受容器電位)は不明であった。本研究で、甘味、苦味、うま味、および塩味物質に対して、味細胞が活動電位を伴う振動性の脱分極応答を発生すること明らかにした。振動性の脱分極応答の周波数と振幅は味物質濃度依存的に増大し、周波数は～1Hz、振幅は約50mVに増加した。一方、酸味物質に対して、型味細胞は活動電位を伴う脱分極応答を示した。これらの結果は、活動電位の発火周波数と膜電位振動の振幅の両方が、味の“濃さ”の表現に寄与していることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味認識の初期過程である味の検出機構において、甘味、うま味、苦味受容細胞(Gタンパク質連結型味受容体を発現)は振動性の脱分極応答を示すことを明らかにした。興味深いことに一部の塩味受容細胞も膜電位振動を示した。味細胞に膜電位振動を発生させる外部装置を開発することで、味の修飾が可能かもしれない。低糖食や減塩食でも美味しく食べられる装置の開発に繋がることを期待する。

研究成果の概要(英文)：The sensation of taste is initiated by the interaction between taste substances, such as sweet, bitter, or umami tastants, and taste receptor cells in the mouth. The taste receptor cells convert the chemical information of the tastants into biological information such as the receptor potentials. However, the receptor potentials of taste receptor cells remain unclear. In this study, we have shown that taste receptor cells generate oscillating depolarization with action potentials in response to sweet, bitter, umami, and salty tastants in a concentration-dependent manner. Both the frequency and magnitude of oscillations increased when the tastant concentration was increased, to ~1 Hz and 50 mV in magnitude. In contrast, a sour tastant induced membrane depolarization with action potentials in type III taste receptor cells. These results suggest that both firing frequency and magnitude of oscillations may contribute to the expression of taste “thickness.”

研究分野：感覚生理学

キーワード：振動性脱分極応答 受容器電位 マウス味蕾 Gタンパク質連結型味受容体 穿孔パッチクランプ法 活動電位 茸状乳頭味蕾

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類味覚器である味蕾は、細胞の種類や成長段階が異なる約 50 個の細胞 (型 ~ 型) と味神経終末が集まることで機能する。味物質を受容する味細胞は、味物質と接触する受容膜と、生体内の安定した環境にある基底膜を持つ。受容膜には味物質受容体が、基底膜にはイオンチャネルや各種伝達物質受容体および傍分泌チャネルが発現している。飲食物は、浸透圧や pH が異なる多様な化学物質を含み、これらが、基底膜側へ侵入しないように細胞間の密着結合がバリアとなっている。従って、味受容器機構の研究には、受容膜と基底膜が区別可能な標本を用いることが重要である。

G 蛋白質連結型味物質受容体を持つ味細胞 (型) は、甘味、旨味、苦味を受容し、イオンチャネル型味物質受容体を持つ味細胞 (型) は、酸味を受容する。また、これら味細胞の細胞内シグナル伝達分子については、多数の研究が行われ、生体情報生成に關与する分子種は明らかになってきた。しかし、それらの分子がどのように連動することで、味受容時にどのような電気信号 (受容器電位) を生成するのか、不明である。

2. 研究の目的

本研究は、味細胞の受容膜と基底膜を独立にコントロールできる味応答測定システム (剥離舌上皮標本) を用いて、味刺激による受容器電位を穿孔パッチクランプ法で測定し、味細胞における味物質 (化学物質) から生体情報 (電気信号) への変換様式を解明する。更に、味物質受容により開口する傍分泌チャネルの同定および放出される伝達物質の同定を試み、味細胞から味神経への生体情報伝達機構を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 剥離舌上皮標本の調整

マウス (ddY 系統 5 ~ 8 週齢オス) を CO₂ 麻酔し、断首後、舌を切りだした。切りだした舌の皮下にコラゲナーゼ溶液を注入し、3 ~ 4 分間、25 °C でインキュベートした。その後、ピンセットを用いて茸状乳頭を含む舌上皮あるいは有郭乳頭を含む舌上皮を剥離した。茸状乳頭を含む舌上皮は測定用プラットホームに味蕾の基底膜側が上になるようにセットした。有郭乳頭を含む舌上皮は別の測定用プラットホームにセットした。

茸状乳頭を含む舌上皮をセットした測定用プラットホームは 60 倍水浸対物レンズを装備した顕微鏡下に置いた。測定用プラットホームの外側 (味細胞の基底膜側) は生理的塩類溶液で持続的に還流し、測定用プラットホームの内側 (味細胞の受容膜側) は脱イオン水で持続的に還流した。味物質は脱イオン水に溶解させ、味細胞の受容膜側にのみ与え、味物質による味応答を測定した。

(2) 穿孔パッチクランプ法による味応答測定

味細胞の膜電位と電位依存性電流は、in situ 穿孔パッチクランプ法で測定した。電極内液にアンフォテリシン B と Pluronic F-127 を含む K-gluconate 溶液を用い、顕微鏡下で味細胞の基底膜側の細胞膜にガラス電極を密着させ、約 20 分で穿孔パッチクランプを作製した。膜電位または電位依存性電流は膜電位固定アンプ (Axopatch 200B) で増幅し、10 kHz のローパスフィルターを通し、A/D 変換装置 (Digidata 1322A) でデジタル変換後、pCLAMP ソフト (ver. 9.0) を用いて、PC に保存した。

アンフォテリシン B を DMSO に入れ、超音波で十分に溶解させ、保存溶液 (25-50 mg/ml) を作製した。この保存溶液は -20 °C で保存し、5 日以内に使用した。Pluronic F-127 を 20 mg/ml 含む K-gluconate 溶液は、超音波で十分に溶解させた。電極内液 (K-gluconate 溶液) は、アンフォテリシン B の最終濃度が 300-500 µg/ml に、Pluronic F-127 の最終濃度が 250 µg/ml になるように調整した。その後、この電極内液を 1-3 分間超音波処理で十分溶解させ、0.22 µm のフィルターを通してろ過した。電極内液は、氷上で、遮光状態で保存し、4 時間ごとに新しく作り直した。

ガラス電極は電極フラー (PC-10) を用いて作製し、電極先端をヒートポリッシュした。電極内液を満たした状態で、電極抵抗が 2-4 M Ω になるガラス電極を測定に使用した。細胞膜にガラス電極先端を密着させ、ギガオームシールを作成し、-70 mV から -65 mV の 5 mV の矩形波を連続的に与えながら、膜容量の変化をモニターした。膜容量が増大し定常状態に達するまで約 10-20 分待った。膜電位固定法により電位依存性電流を測定した後、電流固定法で味細胞の膜電位変化を測定した。

(3) 傍分泌チャネルを介した細胞外からの色素導入

傍分泌チャネルを発現する細胞数および各種化学刺激に対する応答を調べるため、細胞外か

らのバイオサイチン取込実験を実施した。茸状乳頭を含む舌上皮をセットした測定用プラットフォームの基底膜側を 2 mg/ml のバイオサイチンを含む細胞外液で満たし、受容膜側を 1 M スクロースあるいは 30 mM サッカリンを含む脱イオン水で 5 分間甘味刺激をおこなった。甘味刺激を十分に洗い流した後、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で剥離舌上皮標本を固定した。その後、標本に対して、細胞型マーカー分子である PLC 2 と SNAP-25 および蛍光色素が結合したストレプトアビジンで免疫染色を実施した。免疫染色後の標本は包埋し、共焦点レーザー顕微鏡で連続共焦点画像を取得し、味蕾あたりのバイオサイチン取込細胞数を定量化した。

(4) 単一細胞からの RT-PCR 法

単一味細胞からの RT-PCR は、Multiplex nested 法を用いて行った。まず、茸状乳頭を含む舌上皮を測定用プラットフォームにセットした。Ca イオンと Mg イオンを含まない細胞外液に、味細胞の基底膜側を 90-120 秒間浸漬し、その後、60 倍水浸対物レンズを装備した顕微鏡下に置いた。ガラス電極を用いて単一味細胞を味蕾から離して、別のガラス電極内に吸引した。吸引した単一味細胞は、第 1 回目の RT-PCR 反応液の中に入れた。第 1 回目の溶液には味細胞のマーカー分子の遺伝子に対するプライマーおよび Kv3.3 と Kv3.4 の遺伝子に対するプライマーを入れて、RT 反応後、35 サイクルで遺伝子増幅を行った。その後、増幅産物を 2 μ l 取り出し、それぞれの遺伝子のプライマーが入っている第 2 回目の PCR 反応液に入れた。第 2 回目の PCR 反応液に入っているプライマーは第 1 回目のプライマーの内側に設計した。第 2 回目の PCR は 40 サイクルで遺伝子増幅をおこなった。増幅産物は、アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、電気泳動画像を撮影した。

(5) 味刺激で放出される伝達物質の同定

有郭乳頭を含む舌上皮を剥離し、測定用のプラットフォームにセットした。受容膜側に苦味物質である 20 mM デナトニウムを投与し、基底膜側の溶液 100 μ l を採取した。刺激液および細胞外液 (グルコースを含まない) は 38 $^{\circ}$ C に保温し、刺激前と刺激中、刺激後の 3 種類の溶液を採取した。6 標本からの溶液を 1 本にまとめて分析用サンプルとした。分析用サンプルは凍結乾燥し、誘導化処理を行った。その後、ガスクロマトグラフィー (GC) で分離した成分を質量分析計 (MS) で検出する GC/MS 解析法を用いて誘導化済みのサンプルを定性分析した。デナトニウム刺激のサンプルで検出された化合物から、刺激前後の条件で検出されたサンプルを差し引くことで、デナトニウム刺激により放出された物質として解析した。

4. 研究成果

(1) 穿孔パッチクランプ法による味応答測定

味細胞の受容膜のみを味刺激することで、味細胞が生成する膜電位変化を穿孔パッチクランプ法で測定した。88 個の味細胞に穿孔パッチクランプ法適用し、21 細胞から味応答を測定できた。基本五味 (甘味、旨味、苦味、塩味、酸味) に対する膜電位変化は大きく 2 種類に分類することができた。甘味、旨味、苦味刺激に対して味細胞は振動性の脱分極変化を示し (図 1)、酸味刺激に対して、通常の脱分極変化を示した。また、興味深いことに、高濃度の塩刺激に対して、振動性の脱分極応答と通常の脱分極応答を示す 2 種類の味細胞が存在した。振動性の脱分極応答は、味物質濃度が低い時は、低周波数、小振幅で発生し、味刺激濃度が高くなると、周波数および振幅は増大し、周波数は約 1Hz、振幅は約 50 mV 程度 (-64 mV から -19 mV) に変化した。また、味刺激中は持続的に活動電位を発生した。味応答を示した味細胞に複数の味質を投与したが、複数の味質に応答した味細胞は今回の実験では無かった。味物質受容体の遺伝子発現の研究では、味細胞は 1 つの味質に対応する味物質受容体を発現している報告がある。今回の味応答の電気生理学的な結果は分子生物学的な知見と一致した。本研究で、味刺激により味細胞が振動性の脱分極応答を示すことを明らかにした。また、味物質濃度依存的に振動周波数と振幅が増加したことから、これらのパラメーターが味の“濃さ”の表現に関与していると考えた。今後、振動性膜電位変化の生成分子機構を明らかにしたい。

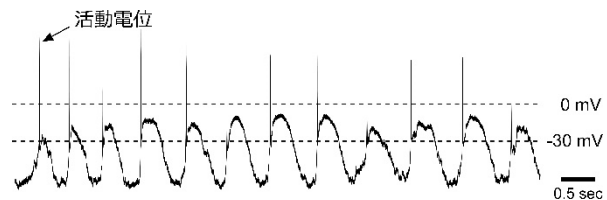


図 1 甘味刺激による振動性の脱分極応答

(2) 傍分泌チャネルを介した細胞外からの色素導入

傍分泌チャネルが開口し細胞外からのバイオサイチン取込が生じているのかを確認するため、基底膜側を高カリウム刺激し、細胞を脱分極させた。この状態でバイオサイチンの取込を実施したところ、型細胞マーカー分子である PLC 2 陽性細胞の約 9 割がバイオサイチンを取り込むことを確認した。一方、型細胞マーカー分子である SNAP-25 陽性細胞にバイオサイチンの取込は確認できなかった。このことから、高カリウム刺激 (細胞の脱分極) により大多数の型細胞は大口徑のイオンチャネルを開口させ、細胞外のバイオサイチンを取り込むことを確認できた。

甘味刺激(1 M スクロース)により、約2割の型細胞がバイオサイチンを取込、この割合は脱イオン水のみ刺激に比べ有意に大きいことがわかった。甘味刺激により味細胞は振動性の脱分極応答を示す(図1)。膜電位が-30 mVより大きい電位では傍分泌チャンネルが開くことから、周期的な傍分泌チャンネルの開閉によりバイオサイチンが取り込まれたと考えた。甘味刺激によるバイオサイチン取込細胞数の割合は、味蕾ごとにバラツキが大きいことから、味蕾ごとに甘味受容体を発現する型細胞の割合が大きく異なることが予想される。今後、細胞内シグナル分子の阻害剤を用いて、甘味受容から傍分泌チャンネルの開閉までの分子メカニズムを明らかにしたい。

(3) 酸味応答細胞に発現するA型K電流の遺伝子解析

酸味刺激(10 mM HCl)により型細胞は活動電位を伴う脱分極応答を示した。この型細胞の活動電位は、型細胞の活動電位の波形と異なり、大きな後過分極電位を生成した。これはA型K電流の発現を示唆する。茸状乳頭味蕾からtotal RNAを抽出し、RT-PCR法で、A型K電流を生成するチャンネル遺伝子の発現を調べたところ、数種類の遺伝子の発現を確認することができた。A型K電流の電気生理学的特徴および味蕾の遺伝子発現の結果からKv3.3とKv3.4の発現が示唆された。そこで、7個の単一型細胞からRT-PCRを実施したが、単一細胞レベルではKv3.3およびKv3.4の遺伝子を検出することはできなかった。また、予想通り、単一型細胞(20個)および単一型細胞(16個)からはmRNAを検出できなかった。同様の実験を味蕾レベル(1~3味蕾を含む標本)で実施したら、7回のうち1回の実験でKv3.3とKv3.4の両方のmRNAが、2回の実験でKv3.4のmRNAが検出できた。味蕾にはこれら遺伝子は発現しているが、単一細胞レベルの発現量が少ないため検出できなかったと考えた。酸味受容細胞である型細胞はTEA感受性の遅延整流性Kチャンネルも発現していることが報告されている。型細胞のA型Kチャンネル、多分Kv3.3とKv3.4、は遅延整流性Kチャンネルと共同することで活動電位の下降相、特に急速な再分極の形成に寄与していると考えた。

(4) 味刺激で放出される伝達物質の同定

有郭乳頭の4サンプルを解析した。サンプル間で検出される物質は異なったが、L-AlanineおよびL-Alanine誘導体が数回検出された。一方、茸状乳頭の1サンプルを解析したがL-AlanineおよびL-Alanine誘導体は検出されなかった。茸状乳頭標本は測定チェンバーにセットする際、味蕾はチェンバー内に10個程度しか含まれない。有郭乳頭標本より味蕾数が少ないことから検出されなかったと考えた。有郭乳頭味蕾ではL-AlanineおよびL-Alanine誘導体が検出されたが、再現性など不十分な点もあるので今後明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeru Moribayashi, Yoshiki Nakao, and Yoshitaka Ohtubo	4. 巻 396
2. 論文標題 Characteristics of A-type voltage-gated K ⁺ currents expressed on sour-sensing type III taste receptor cells in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 353-369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-024-03887-6	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 -

1. 著者名 Yoshiki Nakao, Katsumi Tateno and Yoshitaka Ohtubo	4. 巻 -
2. 論文標題 Taste receptor cells generate oscillating receptor potentials by activating G protein-coupled taste receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	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） 10.3389/fphys.2022.883372	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嘉悦勝博, 高橋奈々, 中尾吉貴, 中川裕之, 大坪義孝
2. 発表標題 味刺激および高カリウム刺激によるバイオサイチン取込味細胞数の定量的解析
3. 学会等名 第57回 日本味と匂学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北野沙樹, 高橋奈々, 大坪義孝, 越村匡博, 山崎隆志
2. 発表標題 味刺激によって放出される神経伝達物質の探索
3. 学会等名 第29回日本生物工学会九州支部福岡大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嘉悦勝博, 中尾吉貴, 中川裕之, 大坪義孝
2. 発表標題 甘味刺激によるバイオサイチン取込味細胞数の定量的解析
3. 学会等名 第101回 日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.brain.kyutech.ac.jp/~otsubo/research.html

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	山崎 隆志 (Yamasaki Takashi) (20270382)	佐世保工業高等専門学校・物質工学科・教授 (57301)	

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
---------	---------