

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11731

研究課題名（和文）味蕾におけるカドヘリンファミリーの局在と機能および味覚障害との関連

研究課題名（英文）Localization and function of the cadherin family in taste buds and their association with taste disorders.

研究代表者

濱田 俊（Hamada, Shun）

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：60282349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：味蕾にはⅡ型とⅢ型細胞の2種類の味受容細胞が存在する。これらの細胞は、それぞれ異なる味の受容を担い、対応した味覚を伝える神経線維とシナプス結合する。味蕾の細胞には入れ替わりがあるため、生涯を通じて味覚神経線維と味受容細胞は互いを識別し、適切なパートナー間でシナプスを形成している。本研究では遺伝子改変マウスを用いて、味蕾細胞で細胞接着分子N-カドヘリンの発現を減少させることで、N-カドヘリンがⅡ型細胞と味覚神経線維とのシナプス形成に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生した味受容細胞と既存の味覚神経線維が、どのような分子機構により味蕾内でシナプスを形成すべき相手を認識しているのかよくわかっていない。本研究によりⅢ型細胞が適切な味覚神経線維を認識してシナプスを形成する際には、N-カドヘリン同士の同種親和性による細胞接着が重要である可能性が示唆された。味蕾におけるシナプス形成の分子機構の理解は、味覚障害の発症機構の理解につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There are two types of taste receptor cells in mammalian taste buds, type II and type III cells, each responsible for the reception of different tastes and synaptically coupled to nerve fibers that transmit the corresponding taste sensation. As the cells in the taste buds are constantly being replaced, taste afferent nerve fibers select and form synapses with the appropriate taste receptor cells throughout the lifetime. In this study, by decreasing the expression of N-cadherin, a cell adhesion molecule, in taste bud cells using gene-targeted mice, we showed that this molecule may be involved in synapse formation between type II cells and afferent nerve fibers.

研究分野：Neuroscience

キーワード：味蕾 シナプス形成 カドヘリン 亜鉛

1. 研究開始当初の背景

味蕾は 50~100 個ほどの細胞からなる味覚の受容器官である。味蕾には味受容細胞が含まれており、形態や分子マーカーにより 型と 型細胞に分類される。このうち、 型細胞は甘・旨・苦味、 型細胞は酸味の受容を担う。これらの味受容細胞には、味覚神経線維がシナプス結合しており、中枢神経系へと味の情報を伝達している。

味蕾の細胞は、幹細胞から持続的に供給されていて、10-20 日ほどの寿命がつきると除去され、一定の細胞数を保っている。一方、味覚神経線維には入れ替わりはない。味覚神経線維が伝える味覚の種類は概ね決まっているため、味覚神経線維は自身が伝える味覚の種類に応じて、適切な味受容細胞を選択し、シナプスを形成していると考えられる。しかし、どのようなしくみで適切な味受容細胞を選択しているのか不明な点が多い。

中枢神経系のシナプス形成では、シナプス標的の選択に細胞接着分子であるカドヘリン・ファミリーの分子が関与することが知られている。我々はカドヘリン・ファミリーのうち、クラシカル・カドヘリンの1つである N-カドヘリンが主に 型細胞と味覚神経線維に発現しており、免疫電子顕微鏡法で観察すると、N-カドヘリンは 型細胞のシナプス部でシナプス前膜と後膜とに対称性に検出された (Ikuta et al, *J Comp Neurol*, 2021)。この結果は N-カドヘリンが同種親和性による細胞接着により 型細胞シナプスの形成に関与している可能性を示唆する。また、N-カドヘリンの発現強度と 型細胞の分化マーカーであるホスホリパーゼ C (PLC) 2 の発現強度の間には逆相関の関係がみられた。この発現様式は、PLC 2 の発現が弱い幼弱な 型細胞で N-カドヘリンが強く発現し、シナプス形成が促進され、シナプスが完成した成熟した 型細胞では N-カドヘリンの発現が低下するのではないかと考えられた。

型細胞のシナプス形成には、N-カドヘリン以外のカドヘリンファミリー分子が関与していると考えられるが、今回の研究ではクラスター型プロトカドヘリンの1つであるプロトカドヘリンファミリー (Pcdh) に着目した。Pcdh 分子群は 型細胞に発現することが単一細胞 RNA シークエンスにより示唆されている (Sukumaran et al, *Sci Rep*, 2017)。本研究では、Pcdh ファミリーが味蕾の 型細胞に発現しているかどうか、また全 Pcdh ノックアウトマウスの味蕾に何らかの異常があるかどうか神経線維マーカー、味蕾細胞種マーカー、味受容細胞のシナプスマーカーにより検討した。

また、味覚障害の主要な原因に亜鉛欠乏がある。N-カドヘリンと同じクラシカル・カドヘリンに属する E-カドヘリンは亜鉛要求性転写因子により発現調節が行われていることから、亜鉛欠乏状態では、N-カドヘリンやその他のカドヘリンの発現が変化する可能性が考えられた。そこで本研究では N-カドヘリンと、遺伝子欠損マウスで味覚異常がみられ、味蕾で強く発現することが知られている T-カドヘリンの発現について検討した。

2. 研究の目的

本研究では、

- 1) N-カドヘリンは 型細胞シナプス形成に関与しているかどうか、
 - 2) プロトカドヘリン ファミリーの発現様式を明らかにし、Pcdh 遺伝子欠損マウスの味蕾にシナプスの異常等の構造異常がみられるかどうか、
 - 3) 亜鉛欠乏マウスの味蕾では N-および T-カドヘリンの発現・局在に変化がみられるかどうか、
- の3点を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

1) 型細胞の成熟と N-カドヘリンの発現強度の関係について

マウスヘエチニルデオキシウリジン (EdU) を投与し S 期の細胞を標識し、4.5 日、6.5 日、8.5 日、10.5 日後にマウスを固定した。味蕾を取り出し、PLC 2、N-カドヘリンおよび EdU を免疫蛍光法と蛍光色素アジドを用いて検出し、共焦点レーザー顕微鏡で画像化した。EdU で核を標識された細胞の PLC 2 と N-カドヘリンの発現強度を画像解析ソフトウェアにより測定した。

2) 味蕾細胞での N-カドヘリン遺伝子機能喪失が 型細胞シナプスの形成に及ぼす影響

分化した味蕾細胞は keratin 8 を発現する。そこで本研究では、keratin 8 遺伝子のプロモーター制御下で Cre/ERT2 たんぱく質を発現するトランスジェニックマウス (K8-Cre; JAX stock #017947) と、Nカドヘリン遺伝子の第1エキソンの上流と下流に lox-P 配列を挿入した遺伝子標的組換えマウス (floxed N-cad; Kostetskii et al, *Circ. Res*, 2005) と、Cre リコンビナーゼ活性により赤色蛍光たんぱく質 tdTomato を発現するマウス (Ai14; JAX stock #007914) の3系統のマウスを交配し、タモキシフェン投与により、分化した味蕾細胞で N-カドヘリン遺伝子の機能喪失と tdTomato の発現を生じるマウス (K8-Cre/+; Ai14/+; floxed-Ncad/floxed-Ncad) を作成した。タモキシフェンを 0.5 $\mu\text{mol/g}$ 体重、月～金曜日までの5日連続投与を3週間連続で行った。タモキシフェン投与終了後14日目に組織をパラホルムアルデヒドで固定した。固定後、有郭乳頭を切り出し、7 μm 厚の凍結切片を作成した。

型細胞シナプスのマーカーにはこのシナプスの伝達に必須のタンパク質である CALHM1 を利用した。市販品で良好な免疫陽性像が得られなかったため、新たに CALHM1 抗体を作成し (Ikuta et al, *Chemical Senses*, 2024)、型細胞シナプスの検出に用いた。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、有郭乳頭味蕾における PLC 2 免疫陽性反応、CALHM1 免疫陽性反応、tdTomato の蛍光を検出・撮影した。

3) Pdch ファミリーの味蕾における発現と Pcdh 欠損マウスの味蕾における表現型の探索

Pdch ファミリーの1つ、Pdch 3 の発現を tdTomato で可視化できるレポーターマウスを用いて Pcdh が発現する細胞の種類を検討した。また、Pcdh α および の両方を欠損する遺伝子改変マウスの味蕾を各種マーカー抗体 (細胞種マーカー、神経マーカー、シナプスマーカー) で免疫染色し野生型マウスの味蕾と比較した。

4) 亜鉛欠乏が N-および T-カドヘリンの発現に与える影響

亜鉛欠乏飼料を与え、4週間飼育した。4週目の時点で、血清亜鉛濃度が低下し、亜鉛欠乏の症状である発育遅延、皮膚症状がみられた。これらのマウスを灌流固定し、N-カドヘリンと T-カドヘリンの局在様式を免疫染色により検討した。

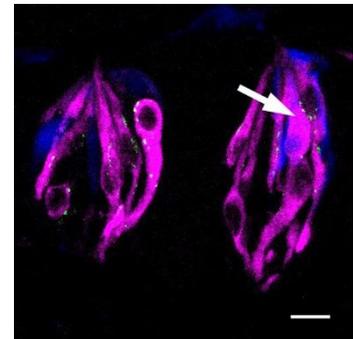
4. 研究成果

1) 型細胞の分化とN-カドヘリンの発現強度の関係について

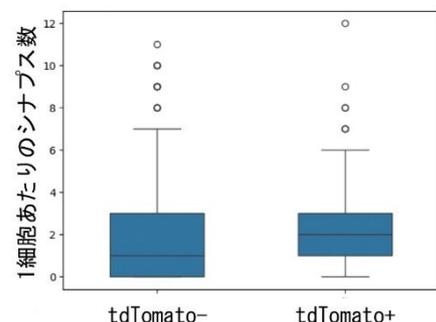
当初の我々の仮説では、幼若な型細胞は PLC 2 の発現が弱く N-カドヘリンが強く発現し、その後 N-カドヘリンの接着活性によりシナプスが形成されるとともに PLC 2 の発現が増加し、N-カドヘリンの発現は低下するのではないかと予想した。しかし実験の結果、型細胞に分化すると N-カドヘリンの発現は低いまま、PLC 2 の発現が先に増加し、最終分裂から 10.5 日以降の十分成熟したと考えられる型細胞で N-カドヘリンの発現が増加する様子が観察され、仮説を支持する結果とはならなかった。

2) 味蕾細胞での N-カドヘリン遺伝子機能喪失が型細胞シナプスの形成に及ぼす影響

作成した条件的 N-カドヘリン遺伝子欠損マウス (K8-Cre/+; Ai14/+; floxed-Ncad/floxed-Ncad) にタモキシフェンを投与し、味蕾内の PLC 2 陽性細胞、CALHM1 陽性瘤状構造、tdTomato の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で撮影した (右図 緑が CALHM1, マゼンタは PLC 2、青は tdTomato。矢印の細胞は tdTomato 陽性 PLC 2 陽性の型細胞である。スケールバー: 10 μ m)。



撮影した画像に含まれる PLC 2 陽性細胞 (n=1009) を、tdTomato を発現する細胞 (tdTomato+細胞, n=240) と発現が見られない細胞 (tdTomato-細胞, n=769) に分け、それぞれの PLC 2 陽性細胞 1 プロファイルあたりにみられる CALHM1 陽性瘤状構造 (シナプス) の数を評価した。その結果、細胞 1 個あたりにみられるシナプスの数は tdTomato+細胞では平均 2.0 個、tdTomato-細胞では 1.8 個であった。しかし中央値で見ると、tdTomato+細胞では 2 個であるのに対し、tdTomato-細胞では 1 個と差がみられた。そこで両者に対しデータの分布に差があるかどうか Mann-Whitney U 検定を行ったところ、有意差が認められた ($p = 0.0189$)。tdTomato-型細胞と tdTomato+型細胞における、細胞 1 個あたりのシナプス数の分布を調べたところ (右図) tdTomato 陽性細胞では 1 細胞プロファイルあたりのシナプス数が少ない細胞が減少していることがわかった。



本研究の結果は、味蕾細胞で N-カドヘリンを欠損させると、シナプスが多く形成されている型細胞ではあまり変化が見られないが、シナプスがあまり形成されていない型細胞ではシナプスが減少することを示唆している。シナプスをあまり持たない型細胞がどのような型細胞集団なのかは不明であるが、分化直後の幼弱な型細胞であることが考えられる。味蕾の N-カドヘリン欠損により、幼弱な型細胞でのシナプス新生が阻害される

可能性が示唆された。

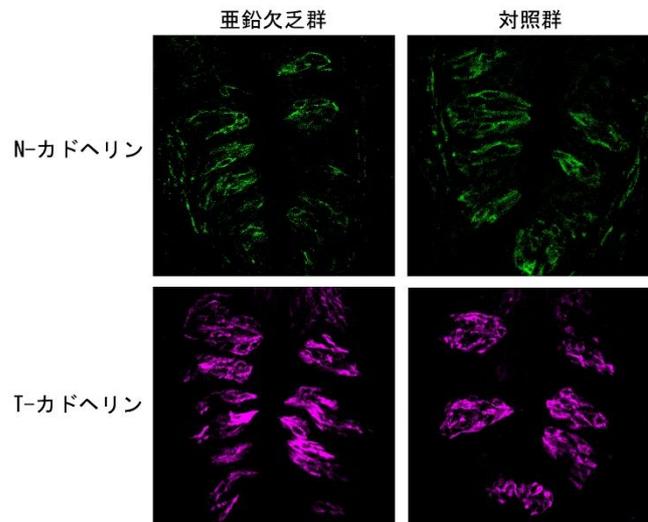
3) Pcdh 3 レポーターマウスによる Pcdh ファミリーの発現解析

既報の結果とは異なり、Pcdh 3 は PLC 2 陽性細胞にも発現がみられた。また、味蕾周辺の重層扁平上皮細胞にも発現がみられた。

Pcdh 3 / 欠損マウスの味蕾で、keratin 8、ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (ENTPD2, 型細胞マーカー)、PLC 2、carbonic anhydrase 4 (CA4、型細胞マーカー)、SNAP-25、チューブリン、PGP9.5、N-カドヘリン、GAP-43、Tカドヘリン、Bassoon、CALHM1 の免疫染色を行い、野生型マウスとの比較を行ったが、はっきりとした差異はみられなかった。本実験の過程で、シナプス前部足場たんぱく質である Bassoon が 型細胞のシナプス・マーカーとして有用であることを見出した (Ikuta & Hamada, *Chem Senses*, 2022)。

4) 亜鉛欠乏が N-および T-カドヘリンの発現に与える影響

亜鉛欠乏マウスの味蕾における N-カドヘリン、T-カドヘリンの局在を対照群マウスと比較したが、局在様式に大きな変化は認められなかった(右図)。



5. 引用文献

Ikuta R, Wasano J, Myouenzono K, Hamada S (co-corresponding author), Kurumata-Shigeto M. N-cadherin localization in taste buds of mouse circumvallate papillae. *J Comp Neurol*, 529 (9), 2227-2242, 2021

Sukumaran SK, Lewandowski BC, Qin Y, Kotha R, Bachmanov AA, Margolskee RF. Whole transcriptome profiling of taste bud cells. *Sci Rep*, 7, Article number 7595, 2017

Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari VA, Patel VV, Molkentin JD, Radice GL. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res*, 96(3), 34-354, 2005

Ikuta R, Kakinohana Y, Hamada S. Ultrastructural localization of calcium homeostasis modulator 1 in mouse taste buds *Chem Senses* 49, bjae019, 2024

Ikuta R, Hamada S. The presynaptic active zone protein Bassoon as a marker for synapses between Type III cells and afferent nerve fibers in taste buds. *Chem Senses* 47, bjac016, 2022

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 1件）

1. 著者名 Ikuta R., Hamada S.	4. 巻 47
2. 論文標題 The presynaptic active zone protein Bassoon as a marker for synapses between Type III cells and afferent nerve fibers in taste buds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Senses	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） 10.1093/chemse/bjac016	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 Ikuta R., Kakinohana Y., Hamada S.	4. 巻 49
2. 論文標題 Ultrastructural localization of calcium homeostasis modulator 1 in mouse taste buds	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Senses	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） 10.1093/chemse/bjae019	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 0件）

1. 発表者名 生田 李緒、垣花 優、濱田 俊
2. 発表標題 マウス有郭乳頭味蕾におけるCALHM1の超微形態レベルでの局在
3. 学会等名 日本味と匂学会第 57 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生田李緒、濱田俊
2. 発表標題 シナプス前部の足場タンパク質Bassoonはマウス味蕾の 型細胞のシナプスマーカーである
3. 学会等名 日本味と匂学会 第56回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生田李緒、妙園園香苗、和佐野潤、濱田香世子、重藤麻美、濱田俊
2. 発表標題 マウス有郭乳頭味蕾におけるNカドヘリンの局在
3. 学会等名 日本味と匂い学会第55回大会
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
研究分担者	生田 李緒 (Ikuta Rio) (90853557)	福岡女子大学・国際文理学部・助手 (27103)	

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