

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22790134

研究課題名(和文) 味細胞におけるアデノシンの生理的役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological roles of adenosine in taste cells

研究代表者

西田 健太郎(Nishida, Kentaro)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20533805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ATPは味蕾における味覚情報伝達に重要な役割を果たしている。一方で、ATPの代謝産物であるアデノシンの味蕾における役割については依然不明であった。本研究課題を実施したことにより、ラット味細胞において、アデノシンA2b受容体、アデノシン輸送能を有する輸送担体(ENT1)、ATP分解酵素の一つであるENPP3、AMP分解酵素の一つであるPAPなどが発現しており、これらの分子によるアデノシンを介した情報伝達系の存在、さらには細胞間のアデノシン濃度の制御メカニズムの一端を明らかにした。これらの成果は、味蕾におけるアデノシンを介した味覚情報伝達機構の存在を示唆する重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：ATP is one of the intercellular signaling molecules in taste buds, and extracellular ATP fate is tightly regulated by its cellular clearance. However, there is a little information on ATP clearance-relating molecules and adenosine receptors in taste buds. Therefore, we examined expression profiles of ecto-nucleotidases, equilibrative nucleoside transporter (ENT) and ARs in rat circumvallate papillae (CP) by immunohistochemistry. ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (ENPP) 3 as a one of the ATP-degradating enzymes, prostatic acid phosphatase (PAP) as a one of the AMP-degradating enzymes, ENT1 as a one of the adenosine transporters, adenosine 2bR (A2bR) were detected in the rat CP. These results indicate that an ATP clearance system mediated by ecto-nucleotidases and ENTs and an adenosine signaling system mediated by A2bR, their coordination being considered to be important for gustatory signaling.

研究分野：環境系薬学

科研費の分科・細目：栄養化学

キーワード：アデノシン ATP 味覚 味覚情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

味覚の感覚受容器は味蕾(みらい)に包まれた味(み)細胞に存在し、味覚情報は味蕾から顔面神経などを経て大脳皮質に伝えられる。近年、“生体エネルギーの貨幣”として知られているアデノシン三リン酸(ATP)が、味蕾から神経系への味覚情報伝達に重要であると報告された(Finger *et al.*, 2005)。細胞間において、ATPは、細胞外にある分解酵素により速やかにアデノシンなどに代謝されることで、ATPによる細胞間情報伝達をコントロールしている。これまでに、当研究室では、脳神経系細胞においてヌクレオシド輸送担体を介したアデノシンの細胞内取り込み機構について検討し、脳神経系における細胞外アデノシンの濃度制御メカニズムにヌクレオシド輸送担体が重要であることを明らかにした(Nagai *et al.*, 2005; Nagasawa *et al.*, 2007)。また、アデノシンはP1受容体に作用し、痛みの伝達に関与する(Sawynok, 1998)。最近になり、興味深い知見として、Diannaら(2006)は、型味細胞に細胞外ATP分解酵素(nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2; NTPDase 2)が発現することを報告した。このように、アデノシンは重要な情報伝達物質であるため、同じ感覚神経系である味覚においても情報伝達に関与することが推察される。しかし、味蕾における情報伝達分子としての細胞外アデノシンの濃度の制御機構については未だ不明である。したがって、味細胞におけるアデノシンの細胞膜輸送機構を検討すること、さらに、アデノシン受容体を介した情報伝達経路を解析することにより、味覚情報伝達におけるアデノシンの生理的役割を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、味覚情報伝達におけるアデノシンの生理的意義を明らかにすることにある。その中で今回、味細胞におけるアデノシンの細胞膜輸送機構及び情報伝達機構を明らかにするための研究計画を立案した。

## 3. 研究の方法

味蕾の各味細胞(型)におけるヌクレオシド輸送担体(NT)、アデノシン受容体及びヌクレオチド代謝酵素の発現及びその局在をRT-PCR及び免疫組織染色により検討した。

味細胞におけるアデノシン情報伝達経路を明らかにするために、細胞内cAMP量を指標に検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) 有郭乳頭におけるATP代謝関連酵素のmRNAレベルでの発現

ラット有郭乳頭におけるATP代謝関連酵素のmRNAレベルでの発現をRT-PCR法に

より検討した。有郭乳頭上皮(CP)及び非有郭乳頭舌上皮(NT)において、ENPP1, 3, NT5E, PAP及びNTPDase2のmRNA発現が認められた。一方、ENPP2及びPLC- $\beta$ 2に関しては、CPにのみmRNA発現が認められた。さらに、real-time PCRを用いて定量解析した結果、ENPP2, 3, NT5E及びPLC- $\beta$ 2のmRNA発現レベルは、NTに対してCPにおいて有意に高かった。

(2) 有郭乳頭におけるENPP2のタンパク質レベルでの発現局在

有郭乳頭におけるENPP2の発現局在を検討するために、型味細胞マーカーとの免疫二重染色を行った。ENPP2の免疫活性は主に味蕾周辺部位に、また型味細胞に発現しているsonic hedgehog(SHH; Miura H *et al.*, 2001)陽性味細胞の一部において認められた。一方、型味細胞に発現しているNTPDase2(Bartel DL *et al.*, 2006)、型味細胞に発現しているIP<sub>3</sub>R3(Clapp TR *et al.*, 2001)及び型味細胞に発現しているsynaptosomal-associated protein, 25 kDa(SNAP-25; Yang R *et al.*, 2000; DeFazio RA *et al.*, 2006)の各味細胞マーカー陽性細胞において、ENPP2の免疫活性は認められなかった。これらのことより、ENPP2は味蕾周辺部位及び型味細胞の一部に発現していることが示された。

(3) 有郭乳頭におけるENPP3のタンパク質レベルでの発現局在

ENPP2と同様に有郭乳頭におけるENPP3の発現局在を検討した。ENPP3の免疫活性は、味蕾周辺部位及び味蕾内部の型(NTPDase2)、型(IP<sub>3</sub>R3)及び型(SNAP-25)の各味細胞マーカー陽性細胞において検出された。よって、型、型及び型味細胞にENPP3が発現していることが明らかとなった。

(4) 有郭乳頭におけるNT5E及びPAPのタンパク質レベルでの発現

AMP代謝酵素であるNT5E及びPAPの発現局在を検討した。味蕾の横断面及び縦断面のいずれにおいても、味蕾周辺部位では主にNT5Eの、味蕾内部では主にPAPの免疫活性が認められた。したがって、味蕾内部においては、NT5EよりもPAPが主に発現していることが示された。

(5) 有郭乳頭におけるPAPのタンパク質レベルでの発現局在

味蕾内部で発現していたPAPの局在を明確にするために、型味細胞マーカーとの免疫二重染色により評価した。NTPDase2陽性型及びSNAP-25陽性型の各味細胞において、PAPの免疫活性は検出されたが、NTPDase2及びSNAP-25の各陽性細胞と共局在しない味細胞も検出された。一方で、

phospholipase C beta-2 (PLC-β2; Clapp TR *et al.*, 2004) 及び α-gustducin (Yang R *et al.*, 2000, 2007) 陽性 型味細胞及び aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC; Seta Y *et al.*, 2007) 陽性 型味細胞において、PAP の免疫活性は認められなかった。以上のことより、PAP は 型及び SNAP-25 陽性 型味細胞に発現していることが明らかとなった。

(6) 有郭乳頭における adenosine 受容体の mRNA レベルでの発現

Adenosine 受容体の mRNA レベルの発現について、RT-PCR 法を用いて検討した。CP 及び NT において、adenosine A2B 受容体 (A2BR) の mRNA 発現が認められた。さらに、real-time PCR 法を用いて定量解析した結果、CP における A2BR mRNA 発現レベルは NT に比べて有意に高かった。その他の adenosine 受容体アイソフォームの mRNA 発現レベルは、CP と NT との間において差はなかった。

(7) 有郭乳頭における A2bR のタンパク質レベルでの発現局在

抗 A2bR 抗体の A2bR 抗原に対する免疫特異性を確認することを目的として抗体吸収試験を行った。まず、抗 A2bR 抗体による免疫組織染色を行ったところ、味蕾の味細胞における免疫活性が認められた。次に、あらかじめ抗原ペプチドを吸収させた抗 A2bR 抗体を用いたところ、抗 A2bR 抗体に起因する免疫活性は消失した。なお、negative control として一次抗体を用いず二次抗体のみを作用させた場合、免疫活性は検出されなかった。したがって、抗 A2BR 抗体は A2BR に対して特異的であり、免疫シグナルは、A2BR に起因するものであることが示された。

(8) 各味細胞における A2bR 発現局在

有郭乳頭組織の横断面切片を用いて、型味細胞における A2bR の発現局在を免疫二重染色により検討した。NTPDase2 陽性 I 型味細胞において抗 A2bR 抗体の免疫活性はほとんど検出されなかった。一方、IP<sub>3</sub>R3 陽性 型味細胞及び GAD67 陽性 型味細胞において抗 A2bR 抗体の免疫活性が認められた。しかし、GAD67 陽性 型味細胞における A2bR の共発現は一部の 型味細胞でのみ認められた。さらに、縦断面切片による免疫二重染色を行った。その結果、NTPDase2 陽性 型味細胞において、横断面切片と同様、A2bR の免疫活性を検出できなかったが、IP<sub>3</sub>R3 陽性 型味細胞においては、A2bR 発現が認められた。一方、GAD67 陽性 型味細胞の一部では A2bR 発現が検出された。以上の結果より、A2BR は主に 型味細胞及び一部の 型味細胞において発現することが示された。

(9) 舌上皮組織における adenosine 刺激による組織内 cAMP 量の変動

A2BR の活性化は G<sub>s</sub> タンパク質を介して、細胞内 cAMP 量を増加させる (Ryzhov *et al.*, 2006)。そこで、味細胞に発現する A2BR の機能的発現を明らかにするため、有郭乳頭部位を含む舌上皮組織を用いて、adenosine 刺激による組織内 cAMP 量を ELISA 法により測定した。その結果、非選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤 IBMX 存在下において組織内 cAMP 量は 500 μM adenosine を作用させることにより、control (0 μM adenosine) 群に比べて有意に増加した。このことから舌上皮組織において、adenosine は組織内 cAMP 量を増加させることが示された。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nishida K, Dohi Y, Yamanaka Y, Miyata A, Tsukamoto K, Yabu M, Ohishi A, Nagasawa K., Expression of adenosine A2b receptor in rat type II and III taste cells. 141(5): 499-506, 2014, doi: 10.1007/s00418-013-1171-0.

Nishida K, Kitada T, Kato J, Dohi Y, Nagasawa K., Expression of equilibrative nucleoside transporter 1 in rat circumvallate papillae. 533: 104-108, 2013, doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.063.

〔学会発表〕(計 10 件)

1) 松本沙希、久保田晃代、加藤淳貴、生川晃子、西田健太郎、長澤一樹：ラット有郭乳頭におけるヌクレオチド代謝酵素の発現解析。日本薬学会第 133 年会 (横浜), 2013. 3.

2) 久保田晃代、松本沙希、加藤淳貴、松尾剛明、西田健太郎、長澤一樹：ラット有郭乳頭における ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (ENPPs) の発現解析。第 62 回日本薬学会 近畿支部総会・大会 (兵庫), 2012. 10.

3) 西田健太郎、加藤淳貴、久保田晃代、松本沙希、生川晃子、大石晃弘、松尾剛明、長澤一樹：ラット有郭乳頭における ATP 分解酵素の発現解析。日本味と匂学会 第 46 回大会 (大阪), 2012. 10.

4) Kentaro Nishida, Jyunki Kato, Yukari Dohi, Teruyo Kubota, Saki Matsumoto, Ai Miyata, Yuri Yamanaka, Akiko Ikukawa, Katsunobu Tsukamoto, Takaaki Matsuo, Kazuki Nagasawa: Expression profile of ecto-nucleotidases and adenosine receptors in rat circumvallate papillae. The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry / 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, (Kobe, Japan),

2012. 9.

5) Kentaro Nishida, Jyunki Kato, Yukari Dohi, Teruyo Kubota, Saki Matsumoto, Ai Miyata, Yuri Yamanaka, Takaaki Matsuo, Kazuki Nagasawa: Expression profile of ecto-nucleotidases and equilibrative nucleoside transporter in the rat circumvallate papillae. Purine 2012 (Fukuoka, Japan), 2012. 5.

6) 土肥由香里、西田健太郎、宮田麻衣、山中優里、生川晃子、松尾剛明、長澤一樹：ラット有郭乳頭における adenosine 受容体の発現局在について .日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012. 3.

7) 西田健太郎、加藤淳貴、土肥由香里、久保田晃代、松本沙希、宮田麻衣、山中優里、松尾剛明、長澤一樹：ラット有郭乳頭におけるヌクレオチド代謝酵素及び輸送担体の発現解析 . 第 54 回日本神経化学学会大会 (石川), 2011. 9.

8) 加藤淳貴、西田健太郎、久保田晃代、松本沙希、松尾剛明、長澤一樹：有郭乳頭におけるヌクレオチド代謝酵素の発現解析 . 第 84 回日本生化学会大会 (京都), 2011. 9.

9) 北田剛士、西田健太郎、久保田晃代、松本沙希、宮田麻衣、山中優里、加藤淳貴、土肥由香里、長澤一樹：ラット有郭乳頭におけるヌクレオチド輸送担体の発現局在 . 日本薬学会第 131 年会 (静岡), 2011.3.

10) 西田健太郎、北田剛士、加藤淳貴、土肥由香里、安田江里、長澤一樹：ラット有郭乳頭における equilibrative nucleoside transporter の発現局在について . 日本味と匂学会第 44 回大会 (北九州), 2010. 9.

〔図書〕(計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者 西田健太郎  
(Nishida Kentaro)

研究者番号 : 20533805