

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580341

研究課題名（和文） 画像化技術を用いた家畜・家禽由来味細胞の味覚応答

研究課題名（英文） The responses of taste cells from the swine and the fowl revealed with the confocal laser scanning microscopy.

研究代表者

田畑 正志（TABATA SHOJI）

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：

本研究の最終的な目的は、家畜・家禽由来の味蕾を単離培養し、これに味物質を添加後の味蕾構成細胞の応答反応を共焦点レーザー顕微鏡で観察することである。ニワトリ味蕾の分布については、前年度の成果として学会発表を行なった。学术论文の成果は本年度に下記記載のような成果を得ることができた。この実体顕微鏡で確認できるようになった、味蕾を採取し培養系で単離する技術の確立を図ることが本年度の目的であり、これが達成されれば画像化技術を用いてその味覚受容反応の可視化がもたらされる。マイクロマニピュレータを用いて吸引採取した味蕾様細胞塊の単離培養系の確立が可能となった。同様にして得られたラット味蕾様細胞塊に対する味蕾特異的G-タンパク質のガストデュエシン抗体を用いた免疫組織化学的手法により、細胞塊の一部の細胞が明瞭な陽性反応を示したことから、これら細胞塊が味蕾であることが明らかになった。現在までに、ニワトリ味蕾に対するマーカー抗体が存在しないことから、この単離培養系が確立された味蕾様細胞塊が間違いなく味蕾であることを証明する必要が生じた。そこで、分子生物学的手法を用いて、ガストデュエシン予想配列を作製し、味蕾が存在する口腔内組織と他の臓器を用いてRT-PCR法を用いてその存在について検討したところ、口腔内上皮においてのみ明瞭なバンドが確認できた。この方法を味蕾様細胞塊について同様に行なったところ、ガストデュエシンの存在を証明する明瞭なバンドが得られた。すなわち、この単離培養系として確立された細胞塊が間違いなく味蕾であることが証明された。この成果は学会において発表を行ない、また学术论文でもその成果の一部を発表することができた。今後このニワトリ味蕾を用いて味覚応答反応を検証する作業に移行する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：形態、ニワトリ、味蕾、培養、分子生物学、画像化技術

1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオンは、本来生きた細胞にとって毒性をもたらす物質であり、細胞はイオンポンプやナトリウムイオンとの交換系を用いて細胞外および細胞内の特定の貯蔵部位にこれを追い出し、その濃度を低く抑えている。ところが、種々の機能を発揮する際にはカルシウムイオンを細胞質に一過性に放出し、反応の開始をもたらす。例えば、筋細胞が収縮する時、卵細胞が受精したとき、あるいは調節分泌時において細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が起こることは広く知られている。近年、光学器機の発達とカルシウムイオン検出指示薬の開発に伴い、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を細胞にダメージを与えることの少ない状態で、しかも数十ミリ秒という非常に高い時間分解能で観察することが可能となってきた。我々の研究室でも共焦点レーザー走査顕微鏡（ニコンRCM8000）の導入とFluo-3蛍光指示薬の利用によってカルシウムイオン濃度変化の画像化法、いわゆるカルシウムイメージング法の利用が行える環境が整ってきており、培養筋細胞および卵細胞を用いて安定した結果を得ることが可能となってきた。近年、哺乳類特に実験動物のラットおよびマウスの味蕾を単離培養する技術が報告されるようになり、味覚研究領域でもこのイメージング法の応用が可能となるようになった。この画像化技術が家畜・家禽の味蕾細胞に利用可能になれば、これら畜産動物の味覚応答反応を容易に知ることが可能となり、ひいては、飼養管理技術への応用が可能となることが期待されている。

2. 研究の目的

脳でおいしい（快）と感じる甘味とうま味はT1R群遺伝子が作る受容体タンパク質が味物質を感知することによって引き起こされる。これら味受容体は、味蕾を構成する味細胞に分布し、味覚受容反応の最初のカスケードと

なる。甘味は砂糖や人工甘味料のみならずD型アミノ酸やグリシンによって励起され、また、うま味はグルタミン酸をはじめとする多くのL型アミノ酸で励起される。一方、動物は体にとって毒になる物質に対して苦味として味覚応答を示し、摂食を控える行動（不快）を示す。この味覚受容にはT2Rs遺伝子が作り出す受容体タンパク質によって味細胞によって味覚受容されている。これらの味覚受容が励起された味細胞において、この味応答を脳に伝えるために味細胞においてカルシウムイオン上昇反応が起こり、シナプスを介してニューロンにその反応を伝えていることが知られている。すなわち、家畜・家禽由来の単離培養味蕾を獲得することが可能となれば、画像化技術を利用して、畜産動物の味覚応答反応を詳細に知ることが可能となる。しかし、現在までに家畜・家禽由来の味蕾の単離培養法は確立されておらず、画像化技術の利用には、まず味蕾の単離培養法の確立が必要であり、本研究期間において第一の目的である。研究の最終目的は、レーザー顕微鏡とFluo-3を用いたカルシウムイメージングを行い、家畜・家禽由来の味細胞の味覚受容機構を知ることである。

3. 研究の方法

（1）本研究を達成する際の大きな障壁は2つある。第1は、味蕾細胞の単離培養法の確立であり、第2は、培養味細胞を用いたカルシウムイオン濃度変化に関する画像化技術の確立である。この2つの課題を克服すれば、容易に研究目的を達成することが可能であると考えている。第1番目の課題である家畜・家禽由来の味蕾細胞の単離培養について簡単に述べる。Kinnamonらの方法（*Chemical Senses*, 26:861-873, 2001）に従い、麻酔下の動物の口腔内上皮下にディスパーゼ/コラゲナーゼ混合液を注入する。実験動物としては、ラットおよびニワトリを用いる。30分

から1時間静置後動物をと殺し、クリーンベンチ (Astec社、現有設備) 内で、口腔上皮から実態顕微鏡 (Wild社、現有設備) 下にマイクロピペットを用いて味蕾組織を吸引採取し、培地に移す。培養用ディッシュに味蕾を移しCO₂インキュベータ (Astec社、現有設備) で初代培養を行うと、しだいに単離した味細胞がディッシュ上に張り付く。この単離培養細胞に免疫組織化学的手法で味細胞特有の陽性反応を得ることができれば、初年度の目的は達成されることになる。この単離培養細胞に味細胞特異的のマーカで免疫組織化学的方法によって陽性反応を得ることで研究初年度の目的は達成される。マーカ抗体として味細胞特異的Gタンパク質であるgustducinを用いる。また、ニューロンマーカとしてのPGP9.5抗体も一部の味細胞を認識することが知られている。さらに最近報告されたうま味および甘味受容体構成タンパク質であるT1R3に体する抗体もSanta Cruz社から販売されるようになった。培養細胞を冷アセトンまたはパラフォルムアルデヒドで固定する。バッファ洗浄および2次抗体作成動物の正常血清で非特異的反応を抑制した後、上記の1次抗体を用いて免疫反応を開始する。バッファ洗浄後、FITC結合2次抗体で処理し、蛍光顕微鏡 (ニコン Diaphot-300、現有設備) で観察および撮影を行う。この方法を用いて撮影した培養筋細胞のミオシン抗体に対するFITC蛍光像を次ページに示した。

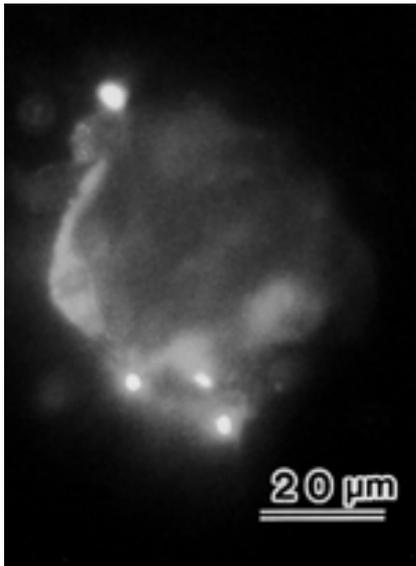
(2) 研究最終年度には培養味細胞を用いて、味物質 (基本味をもたらす種々の物質) を用いたカルシウムイオン濃度変化の画像化法を確立する。すでに我々は目的の章で述べたようにカルシウムイオンの画像化法を培養筋細胞および卵細胞で確立している。培養味細胞はFluo-3/AMを含む液で30分間静置され、バッファで洗浄後レーザー顕微鏡下に設置する。アルゴンイオンレーザーを用いて走査しながら味物質を添加する。理論的には8ミ

リ秒の時間分解能が得られると言われるが、これまでの我々の経験では、100~400ミリ秒程度の積算像が最も鮮明な濃度変化像をもたらすことが明らかになっている。今日までに家畜・家禽由来の味細胞を用いたカルシウムイオン濃度変化の画像化法に関する報告はなく、全く新しい研究領域が開拓されるものと期待している。

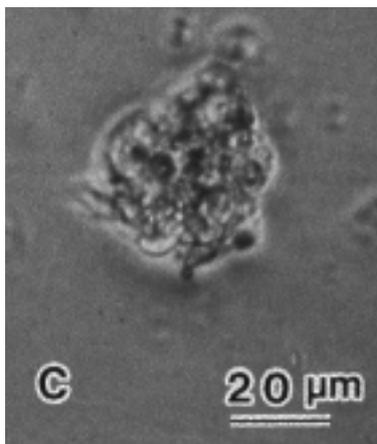
4. 研究成果 成果

家畜の材料として利用するブタについては、味覚受容機構がほとんど知られていない。例えば、味覚信号伝達機構において、ガストデューシンが介在するかどうか。本研究期間の最初に、まずこの不明な点を解明することにした。福岡県農業総合試験場から譲渡された生後数日の若齢ブタを材料に用いた。免疫組織化学的手法および分子生物学的手法においてガストデューシンがブタ舌に存在することを明らかにした。この成果は日本畜産学会および味と匂学会において発表した。一方家禽の材料として用いるニワトリについては、味蕾の分布を明らかにして、および実体顕微鏡下での識別できることが味蕾の培養法の確立にはぜひ必要とされる。そこで、走査型顕微鏡を用いて味蕾の分布図を作成する研究を開始した。この成果は、学会発表のみならず味と匂学会誌 (14: 279-282, 2007) およびAnimal Science Journal 誌 (79: 680-685, 2008) に投稿し、受理され、出版された。

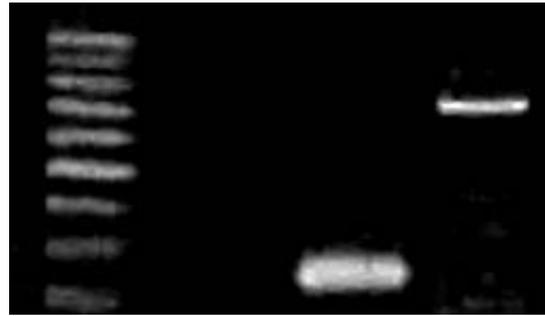
次にニワトリ味蕾の単離培養法の確立を試みた。下図はラット有郭乳頭由来の味蕾の顕微鏡像である。ガストデューシンに対する抗体を用いて免疫染色を行っているので、一部の味細胞が陽性反応を示している。このことから、単離培養された細胞塊が味蕾であることが明らかになった。



一方、下図はニワトリ由来の細胞塊である。ニワトリの場合、ガストデューシン抗体の交差性がないので、この抗体を用いて単離培養細胞塊が味蕾であることを証明が困難である。



そこで分子生物学的手法を用いることにした。RT-PCR 法を用いて検査したところ、ガストデューシンは味蕾の存在する舌上皮のみに発現し、単離培養細胞塊にも同様のバンドが認められ(右レーン)、味蕾であることが証明された。



以上のことから、本研究期間においてニワトリ味蕾の単離培養法の確立が可能となった。今後この味蕾組織を用いて画像化法に適用することで、ニワトリの味覚情報の可視化が可能となり、味覚受容機構の解明に結びつくことが期待される。

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3件)

①工藤健一、堀江祐介、瑞慶山耕平、西村正太郎、田畑正志、味と匂学会誌、14 巻、279-282、2007 年

②K. Kudo, S. Nishimura and S. Tabata, Animal Science Journal, 79: 680-685 2008.

③工藤健一、瑞慶山耕平、西村正太郎、田畑正志、味と匂学会誌、15 巻、377-380、2008 年

〔学会発表〕(計8件)

①工藤健一、堀江祐介、瑞慶山耕平、西村正太郎、田畑正志 ニワトリ味孔および味蕾の形態学的研究. 日本味と匂学会 P-011 東京都江戸川区タワーホール船堀 2007 年 7 月

②堀江祐介、工藤健一、大島一郎、村上徹哉、尾野喜孝、西村正太郎、田畑正志 ブタ味蕾に関する免疫組織化学的研究. 日本畜産学会 VI 26-10 岡山大学 2007 年 9 月

③工藤健一、堀江祐介、瑞慶山耕平、西村正太郎、田畑正志 ニワトリ味蕾の単離培養法に関する検討. 日本畜産学会 XI 29-22 常磐大学 2008 年 3 月

④工藤健一、瑞慶山耕平、西村正太郎、田

畑正志 ニワトリ味蕾の単離培養に関する技術的および分子生物学的検討. 日本味と匂学会 P-038 富山市民プラザ 2008年9月

⑤瑞慶山耕平, 工藤健一, 西村正太郎, 畑正志 ニワトリにおける味覚受容体 T1R3 遺伝子の発現. 日本味と匂学会 P-050 富山市民プラザ 2008年9月

⑥若松啓一, 工藤健一, 畑正志 ニワトリにおける gustducin の発現. 西日本畜産学会 II-28 佐賀大学 2008年10月

⑦ Ken-ichi Kudo, Kouhei Zukeyama, Kei-ichi Wakamatsu, Shotaro Nishimura, Shoji Tabata. T1R3 and gustducin expressed in oral tissues of chicken. The 5th International Joint Symposium between Japan and Korea, P-22. Daejeon, Korea, November, 2008.

⑧工藤健一, 白石純一, 西村正太郎, 豊後貴嗣, 畑正志 ニワトリにおける味蕾の数と苦味感受性について. 第110回日本畜産学会 IX 27-10 日本大学湘南キャンパス 2009年3月

〔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
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑正志 (TABATA SHOJI)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：40145503

(2) 研究分担者

西村正太郎 (NISHIMURA SHOTARO)
九州大学・農学研究院・助教
研究者番号：70237725

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：