

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592125

研究課題名 (和文) 味蕾と舌乳頭形成における Six 遺伝子の役割

研究課題名 (英文) Role of Six gene in the morphogenesis of lingual papillae and taste buds.

研究代表者

鈴木 裕子 (SUZUKI YUKO)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：90137422

研究成果の概要：Six ホメオボックス遺伝子は眼、耳、鼻などの感覚器の発生に共通して作用することが知られ、なかでも *Six1* と *Six4* が欠損すると嗅上皮や内耳の形成が著しく阻害される。味覚器である味蕾と味蕾を生じる舌乳頭に影響があるかどうか組織学的手法を用いて調べた。

交付額

(金額単位：円)

|      | 直接経費     | 間接経費    | 合計       |
|------|----------|---------|----------|
| 19年度 | 1200,000 | 360,000 | 1560,000 |
| 20年度 | 700,000  | 210,000 | 910,000  |
| 年度   |          |         |          |
| 年度   |          |         |          |
| 年度   |          |         |          |
| 総計   | 190,000  | 570,000 | 2470,000 |

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学・7401

キーワード：Six 遺伝子、茸状乳頭、有郭乳頭、葉状乳頭、味蕾

## 1. 研究開始当初の背景

Six 遺伝子はショウジョウバエ複眼形成に必要な *sine oculis* のホモログであり、ヒトやマウスでは *Six1* から *Six6* の 6 種類が存在するが、なかでも *Six1* と *Six4* はプラコードマーカ遺伝子として耳、眼、鼻などの感覚器に共通して作用することが知られている。*Six1*mRNA がマウス嗅上皮に発現すること、またその欠損マウスでは胎生期に嗅上皮形成が阻害され、出生時致死となることがわかっていた。胎生 14.5 日の嗅上皮標本の下部にある舌を観察すると *Six1*mRNA が茸状乳頭に発現していたことから、味覚器である味蕾、味蕾を生じる舌乳頭の形成に *Six1* および *Six4* 遺伝子が関与すると推測し本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

*Six1* および *Six4* 遺伝子の味蕾と、舌乳頭のうち味蕾を生じる茸状乳頭、有郭乳頭、葉状乳頭における発現を調べ、これらの組織の形成におよぼす役割を解析する。

## 3. 研究の方法

## (1) 舌乳頭

野生型および *Six1*、*Six4* 遺伝子改変マウスは自治医大分子病態治療研究センター細胞生物研究部の川上教授のもとに作られたものを使用した。

胎生 11.5-18.5 日マウスの頭部を 4%パラフォルムアルデヒド溶液で固定し、定法により凍結切片を作製した。*Six1*、*Six4*、*IGFBP-4*、*sonic hedgehog (Shh)* のリボプローブを作製し *in situ* hybridization (ISH) 法を行った。*Six1* 抗体、神経のマーカである protein gene product (PGP) 9.5 抗体(Ultraclone)、茸状乳頭のマーカ

ーである Shh 抗体(R&D Systems) を用いて免疫組織化学を行った。野生型と *Six* 欠損マウスの舌を 2% グルタルアルデヒド・2% パラフォルムアルデヒド混液で固定後、1% オスミウム液で後固定し、臨界点乾燥を行い走査型電子顕微鏡で観察した。また胎生 13 日の舌に *Shh*, *Wnt10b* のリボプローブを用いてホールマウント ISH 法を行った。

## (2) 味蕾

野生型の成熟マウスと *Six1Six4* ヘテロマウスを 4% パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定し、舌の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭と軟口蓋、喉頭蓋味蕾の凍結切片を作製した。*Six1* と *Six4* のリボプローブを用いて ISH 法を行った。*Six1* 抗体と phospholipase C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2, Santa Cruz), inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3 (IP3R3, Transduction Lab), neural cell adhesion molecule (NCAM, Chemicon) など味蕾の細胞型のマーカー抗体を用いて二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。またヘテロマウスの味蕾を GFP(*Six1*)抗体、 $\beta$ -gal (*Six4*)抗体で染色し、*Six1* 抗体染色像と比較した。

## 4. 研究成果

### (1) *Six1* と *Six4* の発現

*Six1*mRNA は胎生 11.5 日、舌の間葉にあらわれた。胎生 14.5-17.5 日では茸状乳頭上皮に発現した (図 1A)。舌筋には強い発現が見られた。舌後部では胎生 13.5 日有郭乳頭の上皮の陥入部に始まり胎生 15.5 日では乳頭上皮と溝に発現した (図 1B)。葉状乳頭では胎生 15.5 日から溝に発現した。これらの発現は茸状乳頭では胎生 18.5 日に、有郭、葉状乳頭では出生 0 日で消失した。また味蕾の原基が胎生 17.5 日の有郭乳頭上皮に出現すると *Six1*mRNA が発現していた。*Six4* mRNA の発現パターンは *Six1* とほぼ一致した。糸状乳頭には発現がみられなかった。

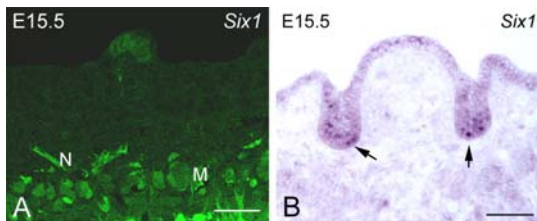


図 1A 茸状乳頭上皮における *Six1*(GFP 蛍光) の発現。B 有郭乳頭の *Six1*mRNA の発現 (矢印)。scale=50 $\mu$ m

### (2) ノックアウトマウスの解析

*Six1KO*, *Six1Six4dKO*, *Six4KO* マウスを用いた。*Six4KO* は野生型と同様であった。*Six1KO*,

*Six1Six4dKO* では舌咽神経節、膝神経節の細胞が少なくなるので、舌乳頭に入る神経も減少する。従って胎生後期では神経の影響があると思われる。詳細な解析には胎生中期のマウスを用いた。

### ① 茸状乳頭

胎生 13 日の舌の走査電顕観察では茸状乳頭原基があらわれていたが *Six1KO*、*Six1Six4dKO* は野生型と大差ないようにみえた。胎生 14.5 日になると *Six1Six4dKO* と *Six1KO* の舌は野生型(WT)より小さくなっていった。*Six1KO* の茸状乳頭は野生型に比べて数が多く (野生型平均 85、*Six1KO* 平均 104)、大きく (野生型の直径の平均 20 $\mu$ m、*Six1KO* 平均 24 $\mu$ m)、背が高く配列が乱れていた。舌中央部では乳頭の密度が高くなっており (野生型平均 7.2/300 $\mu$ m<sup>2</sup>, *Six1KO* 平均 19/300 $\mu$ m<sup>2</sup>)、お互いに融合しているものもあった (図 2A, B)。

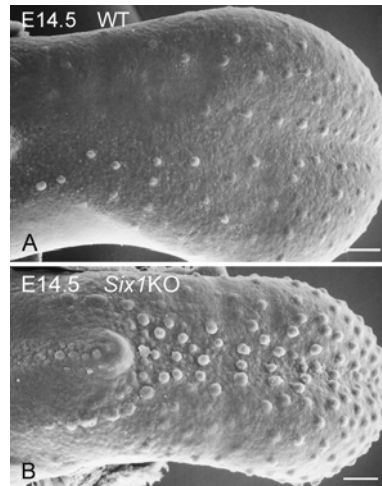


図 2 胎生 14.5 日舌の走査電顕像。A 野生型 B *Six1KO*。scale=50 $\mu$ m

胎生 15.5 日、PGP9.5 抗体と Shh 抗体を用いた二重染色像では *Six1KO*、*Six1Six4dKO* の茸状乳頭は野生型に比べ大きかったが、神経の乳頭への侵入は *Six1KO* で少なく *Six1Six4dKO* では見られなかった。胎生後期では神経の影響があるので *Six1KO*、*Six1Six4dKO* の茸状乳頭は逆に小さくなっていった。

*Six1* と他の分子の関係を調べるため胎生 13 日の野生型と *Six1KO* マウスの舌の *Shh* と *Wnt10b* の発現をホールマウント ISH 法で比較した。*Six1KO* ではこれらを発現する茸状乳頭原基数が多く (図 3A 野生型、B *Six1KO*)、*Six1* は茸状乳頭の発生を抑制していると思われた。*Six1* と *Shh*, *Wnt10b* 相互のシグナルネ

ネットワークが示唆された。

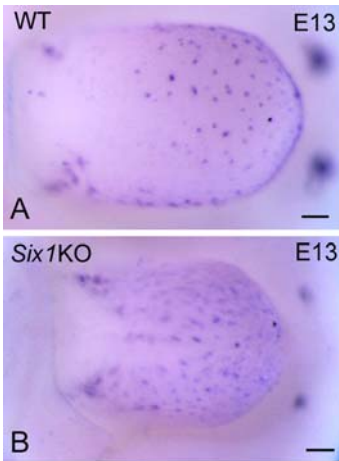


図3 胎生13日の舌。ホールマウントISH法により検出した *Shh* mRNA。scale=50μm

### ②有郭乳頭

*Six1*KO マウスの有郭乳頭は胎生 13.5 日に舌後部に現れ、野生型より深い上皮の陥入がみられた。胎生 14.5 日には乳頭と溝があらわれたが、乳頭の隆起が野生型 (図 4A) に比べ悪かった (図 4B)。その後乳頭と溝の発育は悪くエブネル腺はあらわれなかった (図 4C, D)。溝のマーカである *IGFBP-4* mRNA の発現も弱かった。野生型に比べ過剰な溝、非対称な溝も見られた。*Six1Six4dKO* の乳頭は極めて小さく溝は非対称であった。また野生型では胎生後期の乳頭上皮に味蕾の原基が現れたが、*Six1*KO、*Six1Six4dKO* ともに味蕾は出現しなかった。

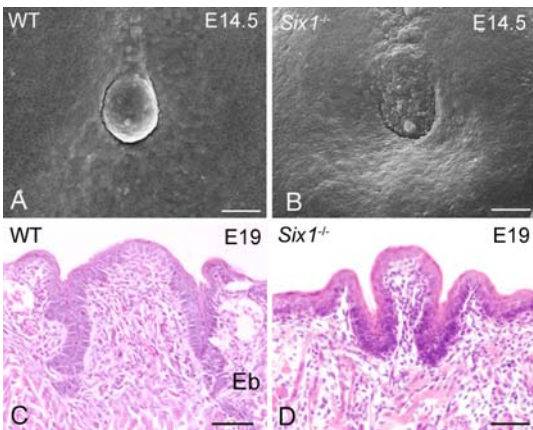


図4 胎生14.5日有郭乳頭の走査電顕像(A,B)。胎生19日のH.E.染色像(C,D)。scale=50μm

有郭乳頭の乳頭と溝の形成に *Shh* が関与することが知られているので *Shh* mRNA の発現を比較した。胎生 13.5 日 *Shh* mRNA は上皮の陥入部に発現し、野生型と *Six1*KO では差が

なかった。胎生 14.5 日になると乳頭上皮に発現が見られたが *Six1*KO では弱かった。その後、野生型では溝に強く発現していたが *Six1*KO では弱かった。

### ③葉状乳頭

胎生 15.5 日、葉状乳頭は舌後部の両側面に隆起として現れた (図 5A)。 *Six1*KO ではすでに4列の隆起と溝ができていた (図 5B)。しかし、その後の溝の発育は悪くエブネル腺も現れなかった (図 5C, D)。 *Six1Six4dKO* の溝の発育も悪かった。

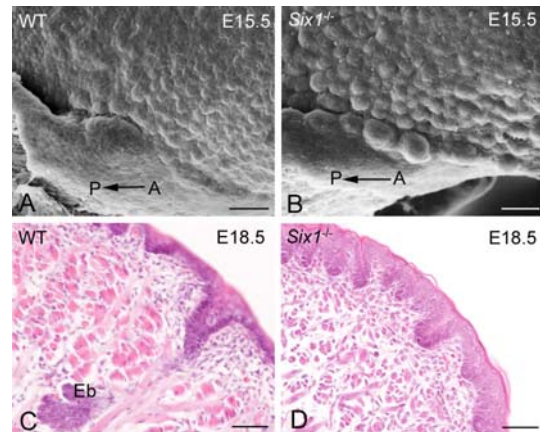


図5 胎生15.5日葉状乳頭の走査電顕像(A,B)。胎生19日のH.E.染色像(C,D)。scale=50μm

いずれの *Six* 欠損マウスの糸状乳頭の形態は野生型と同様であった。

*Six* 遺伝子は舌乳頭の発生において新規遺伝子であり、本研究では *Six1* と *Six4* が発達過程の味蕾を生じる舌乳頭に発現すること、欠損マウスの詳細な解析からその役割を明らかにした。

茸状乳頭形成のシグナル分子や転写因子である *Shh*, *Wnt10b*, *Lef1*, *BMP4*, *Sox2* は上皮のみに発現し *Ptc*, *Gli1* は上皮と間葉の両方に発現する。しかし *Six1* と *Six4* は最初、舌の間葉に発現しており胎生 14.5 日茸状乳頭の形態ができてからその上皮に発現していた。間葉の *Six1* が上皮に発現する分子との共同のもとに茸状乳頭の形態形成に働くと思われる。*Six1* 欠損マウスでは茸状乳頭形成が亢進し配列が乱れていた。*Wnt/β-catenin* シグナリングが亢進すると乳頭数とサイズの増加をもたらす、*Shh* シグナリングの阻害により乳頭の規則的な配列が乱れることが報告されており、*Six1* と *Wnt- Shh* ループが茸状乳頭の形態を決めていると思われる。

発達過程の有郭乳頭では乳頭上皮と溝に、葉状乳頭では溝に、またエブネル腺に *Six1* と

*Six4* が発現した。有郭乳頭の発生に関与する分子は *Shh* のみ知られ、葉状乳頭では皆無である。*Shh* の役割の一つに細胞増殖が知られている。*Six1KO* では早期に *Shh* が消失することから *Six1* は *Shh* を維持して乳頭構造を保つと思われた。胎生後期に発達する溝は神経の影響を受けると思われるが、茸状乳頭のみならず有郭乳頭、葉状乳頭の発生も *Six1* により調節されていることが明らかとなった。

### (3) 成熟マウスの味蕾

*Six1KO*、*Six1Six4dKO* マウスは出生時に致死となるので、生後発達する味蕾の解析は困難であり、発現のみを調べた。*In situ* hybridization により有郭乳頭味蕾では *Six1*mRNA と *Six4*mRNA が発現した。

*Six1* 抗体と味蕾細胞のマーカー抗体を用いた二重免疫染色を行うと *Six1* 陽性 (図 6A) の核は PLCβ2 あるいは IP3R3 陽性の II 型細胞の大部分に相当していた。GFP の発現は *Six1*mRNA の発現した履歴を現し、β-gal の発現は *Six4*mRNA の発現した履歴を現す。GFP 発現細胞 (図 6B) は II 型細胞に一致していた。β-gal 発現細胞は II 型細胞に一致した。また β-gal 陽性と GFP 陽性は一致した。葉状乳頭、軟口蓋、喉頭蓋の味蕾も同様であった。茸状乳頭味蕾では GFP 陽性、β-gal 陽性細胞は味蕾の殆どを占めていた。

味蕾の II 型細胞は味覚受容体を発現する細胞である。*Six1* と *Six4* の発現は II 型細胞全てに履歴があった。*Six1* 抗体陽性細胞は II 型細胞の何らかの状態を現すと考えられる。*Six1* 欠損マウスの神経節細胞の培養ではアポトーシスで死ぬという報告などから *Six* 遺伝子は味蕾細胞の生存に働くことが推測される。

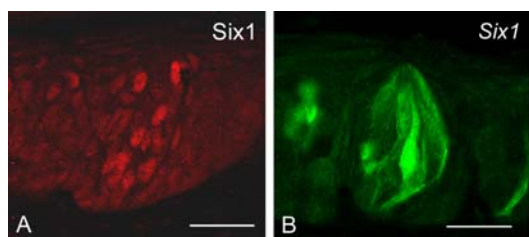


図 6 *Six1* 抗体 (A) と GFP 抗体 (B) の免疫組織化学。scale=10 μm

### 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 Suzuki Y, Mizoguchi I, Uchida N. Detection of neurotrophic factors in taste buds by

laser capture microdissection, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization. Arch. Histol. Cytol., 70:117-126. 2007 査読有

- ② Suzuki Y. Apoptosis and the insulin-like growth factor family in the developing olfactory epithelium. Anat. Sci. Int., 82:200-206. 2007 査読有
- ③ Suzuki Y. Expression of Sox2 in relation to innervation. Cell Tissue Res., 332:393-401. 2008 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 鈴木裕子、池田啓子、川上潔、舌乳頭形成に関わる *Six1* 遺伝子、日本味と匂学会 2007 年 7 月 28 日東京
- ② 鈴木裕子、恒川寛明、内田暢彦、再生および発達過程の味蕾の *Six1*、歯科基礎医学会 2007 年 8 月 31 日札幌
- ③ 鈴木裕子、池田啓子、川上潔、舌乳頭形成過程における *Six4* の発現、解剖学会総会 2008 年 3 月 29 日大分
- ④ 鈴木裕子、有郭乳頭と味蕾の分化における *Sox2* の発現、日本味と匂学会 2008 年 9 月 18-19 日富山
- ⑤ 鈴木裕子、転写因子 *Sox2* の味蕾における発現と神経支配の関係、歯科基礎医学会 2008 年 9 月 25 日東京
- ⑥ 柴田俊一、田巻玉器、鈴木裕子、マウス下顎頭軟骨発生過程における IGF family の発現に関する研究、歯科基礎医学会 2008 年 9 月 25 日東京
- ⑦ 鈴木裕子、嗅上皮と味蕾における転写因子 *Six* の局在、解剖学会総会 2009 年 3 月 30 日岡山

[図書] (計 2 件)

- ① 匂いと香りの科学 (渋谷達明、市川真澄編) 嗅覚器の発生 鈴木裕子、朝倉書店 29-32P 2007
- ② レーヴンジョンソン生物学、活動のための燃料の供給：消化 鈴木裕子、培風館 887-906P 2007

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

鈴木 裕子 (SUZUKI YUKO)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号：90137422