

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780121

研究課題名(和文) 甘味・旨味・苦味・酸味受容細胞以外の味蕾細胞の機能解析

研究課題名(英文) Function of taste bud cells other than sweet, umami, bitter, and sour taste receptor cells

研究代表者：應本 真 (OHMOTO MAKOTO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教 研究者番号：30447362

研究成果の概要(和文)：甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に特異的に発現する新規遺伝子の取得を目指し、味蕾と味蕾を含まない有郭乳頭上皮組織のDNAマイクロアレイデータを基に、遺伝子の探索と発現解析を行った結果、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に特異的に発現する3つの遺伝子を取得した。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the physiological functions of the taste bud cells other than sweet, umami, bitter, and sour taste receptor cells (TRCs), we obtained the molecular characteristics of taste bud cells. Three genes were specifically expressed in the taste bud cells other than sweet, umami, bitter, and sour TRCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：味覚、味蕾

## 1. 研究開始当初の背景

食物摂取の際に生じる味覚は、食品に含まれる呈味物質が口腔内に存在する味蕾と呼ばれる組織中の味細胞により受容されるこ

とにより生じる。味蕾は、主として口腔咽頭部の上皮層に分布する。哺乳類では、味蕾の大部分は舌上皮の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭に存在している。それぞれの味蕾は100

個程度の細胞から構成され、タマネギ状の構造をしている。ヒトが感知する味のうち、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味は5基本味と呼ばれる。このうち甘味、旨味、苦味についてはGタンパク質共役型受容体が受容体として同定されており、甘味・旨味物質はT1Rファミリーの受容体により、苦味物質はT2Rファミリーの受容体により受容される。酸味物質については、TRP (transient receptor potential)ファミリーに属する分子 PKD2L1 および PKD1L3 が受容体候補分子として同定されている。T1Rs、T2Rs、PKD2L1/PKD1L3 は互いに異なる味細胞に発現することから、甘味・旨味、苦味、酸味はそれぞれ異なる味細胞により受容されることが明らかとなっている。

近年、当研究代表者らは、電位依存性カリウムチャンネルの一つであるKCNQ1が甘味、旨味、苦味、酸味を受容する味細胞の全てに発現し、これらの味細胞以外の味蕾細胞にも発現していることを見出した。味蕾中の細胞に対する味細胞の割合は、甘味、旨味、苦味細胞が合わせて30%程度、酸味細胞が15%程度であり、既知の味覚受容体を発現しない細胞群が残り半数近くを占める。このような味蕾細胞、つまり甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞にはNTPDase2

(Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2)が発現するという報告があるものの、他の分子知見はほとんどなかったため、それらの味蕾細胞の機能は不明であった。NTPDase2を発現する味蕾細胞が実際に味を受容する細胞であるかは不明であるが、これらの味蕾細胞はKCNQ1を発現することや、特有の膜電位変化パターンを示すことなどから、膜電位変化が生じると考えられる。また、甘味、旨味、苦味、酸味がそれぞれ異なる細胞で受容されることから、

塩味やその他の味を受容する細胞である可能性が考えられる。このような甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞の分子知見を取得し、その細胞の生理機能を解明することは、味覚研究における課題の1つであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述のように機能が未知である甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞に焦点を当て、それらの細胞の味覚応答機能の解析を行うことを目的とし、味蕾のDNAマイクロアレイによる遺伝子発現データを利用することにより、甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞の分子知見を獲得することを目的とした。

## 3. 研究の方法

味蕾は主に舌上皮層に存在していることから、味蕾に発現する遺伝子の探索には、ほとんどの場合において、味蕾を含む上皮層が解析対象組織とされ、味蕾以外の上皮層に発現する遺伝子が多数得られている。そのため、味蕾特異的な発現を示す遺伝子の探索には味蕾のみを解析対象とする方が効率的であることは自明である。当研究代表者は舌上皮層から単離した味蕾(TB)、味蕾を除いた乳頭上皮(Cvp-Epi)、および非乳頭上皮(Np-Epi)の3つの組織を丁寧に摘出し、DNAマイクロアレイを用いて、それぞれの遺伝子発現データを既に取得していた。このデータを用い、味蕾にのみ発現量の多い遺伝子を抽出することにより、味蕾細胞全体に発現する遺伝子や味蕾中の特定の細胞にのみ発現する遺伝子を同定した。後者の遺伝子群に対し、既知マーカー分子との二重あるいは三重染色を行い、NTPDase2と共発現する遺伝子群およびNTPDase2発現細胞の一部

に発現する遺伝子群を同定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 舌上皮層において味蕾特異的に発現する遺伝子の探索

本研究で用いた DNA マイクロアレイ GeneChip Rat Genome 230\_2.0 (Affymetrix 社)には約 3 万の遺伝子(プローブセット)が搭載されている。味蕾に特異性をもって発現する遺伝子は味蕾と上皮組織間での発現量の差が大きいと考えられる。TB での発現数値が Cvp-Epi に対して有意に大きいプローブセットは 11053 個得られた(Welch' s t-test, False Discovery Rate (FDR) < 0.1)。この中から TB での発現数値が Cvp-Epi での発現数値の 5 倍以上となり、かつ、TB での発現数値が 1000 以上となるプローブセットを抽出した。この中には味蕾で特異的に発現する遺伝子が多く含まれ、Krt2-8 のように味蕾全体に発現する遺伝子だけでなく、NTPDase2 や Gna14 のように味蕾の一部の細胞に特異的に発現する遺伝子も含まれていた。

##### (2) マイクロアレイデータから抽出した遺伝子のマウス有郭乳頭における発現解析

上述のように抽出してきた遺伝子のマウス舌上皮層における発現分布を調べるため、マウス有郭乳頭上皮層切片を用いて *in situ* hybridization (ISH)を行い、味蕾や有郭乳頭上皮層におけるシグナルの分布から、各遺伝子の発現パターンを 4 つに分類した。

1. 有郭乳頭上皮層において有意なシグナルが観察されなかった遺伝子
2. 味蕾を含む有郭乳頭上皮層に全体的にシグナルが観察される遺伝子
3. 味蕾特異的なシグナルは観察されるが、味蕾における発現が弱い遺伝子

##### 4. 味蕾の全体または味蕾の一部の細胞に特異的な強いシグナルが観察された遺伝子

上記 3.のグループに含まれる遺伝子は、味蕾が存在しない上皮に発現は観察されないが、味蕾におけるシグナルは非常に弱く、発現細胞種ははっきりとは分からなかった。一方、4.のグループに含まれる遺伝子については、味蕾のほぼ全ての細胞に発現していた遺伝子の他、味蕾の 5~7 割程度の細胞に発現していた遺伝子も存在した。

##### (3) 新規遺伝子の発現細胞種の同定

味蕾特異的に強いシグナルが観察された遺伝子の発現細胞種を同定するため、マウス有郭乳頭切片において二重 ISH を行った。その際、TRPM5、PKD1L3、NTPDase2 を、それぞれ甘味・旨味・苦味細胞のマーカー遺伝子、酸味細胞のマーカー遺伝子、甘味・旨味・苦味・酸味細胞以外の味蕾細胞のマーカー遺伝子として用いた。はじめに、各遺伝子が既知の味細胞に発現するか調べるため、TRPM5およびPKD1L3の混合プローブを用い、各遺伝子のシグナルと比較した。その結果、3 つの遺伝子のシグナルは TRPM5 および PKD1L3 のシグナルと完全に排他的であった。一方、これらの遺伝子のシグナルは NTPDase2 のシグナルとほぼ一致していた。以上のことから、当研究で取得した 3 つの遺伝子は甘味、旨味、苦味、酸味細胞には発現せず、これら以外の味蕾細胞に発現することが明らかとなった。

本研究では、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に特異的に発現する新規遺伝子の取得を目指し、味蕾と味蕾を含まない有郭乳頭上皮組織の DNA マイクロアレイデータを基に、遺伝子の探索と発現解析を行った。その結果、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に特異的に発現する 3 つの遺伝子を取得した。これらの既知の味覚受容体を

発現しない味蕾細胞の機能は不明だが、膜電位変化を生じうることや、甘味、旨味、苦味、酸味が互いに異なる細胞で受容されることから、未だ同定されていない塩味やその他の味の受容細胞である可能性が考えられる。

この細胞群に発現する遺伝子は NTPDase2 以外に報告されておらず、遺伝子発現から味蕾細胞での分子機能を予測することは難しいが、機能が未知であった味蕾細胞に新たな分子知見が加わった。今後は、これらの遺伝子を分子ツールとして、機能が未知であった味蕾細胞の機能を明らかにできることが期待される。

#### 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 4 件)

- 1) Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K. Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nature Neuroscience* 査読有 vol.14、2011、pp.685-687
- 2) Ohmoto M, Okada S, Nakamura S, Abe K, Matsumoto I. Mutually exclusive expression of Gaia and G $\alpha$ 14 reveals diversification of taste receptor cells in zebrafish. *Journal of Comparative Neurology* 査読有 vol.519、2011、pp.1616-1629
- 3) Ohmoto M, Maeda N, Abe K, Yoshihara Y, Matsumoto I. Genetic tracing of the neural pathway for bitter taste in t2r5-WGA transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有 vol.400、2010、pp.734-738
- 4) Maeda N, Onimura M, Ohmoto M, Inui T,

Yamamoto T, Matsumoto I, Abe K. Spatial differences in molecular characteristics of the pontine parabrachial nucleus. *Brain Research* 査読有 vol.1296、2009、pp.24-34

[学会発表] (計 13 件)

- 1) 黒川 あずさ、應本 真、阿部 啓子、三坂 巧  
味蕾に発現する塩化物イオンチャネルの同定 日本農芸化学会 2011 年度大会、京都、2011 年 3 月
- 2) Ohmoto M, Okada S, Nakamura S, Abe K, Matsumoto I. G $\alpha$  genes expressed in fish taste receptor cells. 33rd Annual Meeting of Association for Chemoreception Sciences, St. Pete Beach, Florida, April, 2011
- 3) Ohmoto M, Okada S, Nakamura S, Abe K, Matsumoto I. Expression of G protein in fish gustatory system reveals the diversification of fish taste receptor cells. The 8th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR mami Forum 2010), Fukuoka, November, 2010
- 4) Maeda N, Onimura M, Ohmoto M, Inui T, Yamamoto T, Matsumoto I, Abe K.  
Spatial differences in molecular characteristics of the pontine parabrachial nucleus. 32nd Annual Meeting of Association for Chemoreception Sciences, St. Pete Beach, Florida, April, 2010

[図書] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

應本 真 (OHMOTO MAKOTO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：30447360

