

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791808

研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた味細胞の甘味受容・感受性調節機構の解析

研究課題名（英文） Reception, transduction, and modulation of sweet taste in taste receptor cells: Analysis by using transgenic mice.

研究代表者

吉田 竜介 (Yoshida Ryusuke)

九州大学・歯学研究院・口腔機能解析学分野

研究者番号：60380705

研究成果の概要（和文）：本研究では、①内因性カンナビノイドが甘味受容細胞の応答を増強することおよび、その増強効果は味細胞に発現する CB<sub>1</sub> 受容体を介し生じること、②甘味受容体である T1R3 を発現する細胞は甘味、うま味刺激に対し応答を示すこと、③甘味、うま味の受容・情報伝達に関する遺伝子（T1R3、gustducin、TRPM5）を欠損した遺伝子改変マウスにおいて、T1R3 発現細胞が味刺激に対して応答を示さないこと、④T1R3 発現細胞には gustducin 以外にも Gαサブユニット（11、14、s、q、i2）が存在することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：This study has revealed (1) Endocannabinoids selectively enhance sweet taste via CB<sub>1</sub> receptor on sweet sensitive taste cells, (2) Taste cells expressing T1R3, a sweet and umami taste receptor component, that are identified by using T1R3-GFP mice respond to various sweet and/or umami taste stimuli, (3) T1R3-GFP taste cells lacking T1R3, gustducin, or TRPM5 do not respond to taste stimuli, (4) T1R3-GFP taste cells express Gα11, 14, s, q, and i2 as Gα subunits other than gustducin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：味覚、味細胞、甘味、遺伝子改変マウス、受容体、情報伝達機構、カンナビノイド

## 1. 研究開始当初の背景

動物が生存してゆくためには外部から栄養物を取り入れる必要がある。それらを取捨選択するための情報として味覚は非常に重要である。味覚（塩、甘、酸、苦、うま味）の中で、甘味はエネルギー源（糖や炭水化物）を検知する感覚で、動物に嗜好行動を生じさ

せる。しかし、糖や炭水化物の過剰摂取は肥満を生じさせ、引いては高血圧、糖尿病、心臓病などの生活習慣病に罹患する確率を高める。これら生活習慣病への罹患リスクを低減する方法として、甘味感受性の調節による摂食行動の抑制という手段が考えられるが、それにはまず甘味の受容・伝達・調節機構を

解明する必要がある。

甘味の受容には、T1R2/T1R3 ヘテロダイマー（甘味受容体）、gustducin（Gタンパク質 $\alpha$ サブユニット）、PLC $\beta$ 2、TRPM5 チャンネルなどの分子が関与し、これらは同じ味細胞に発現し機能すると考えられている。しかし、T1R3やTRPM5を欠損したマウスにおいても甘味物質に対する感受性が完全に失われることはない。また、マウス鼓索神経の単一神経線維応答の研究では、マウスの甘味を抑制する物質であるグルマリンにより、糖応答が抑制されるタイプと抑制されないタイプの神経線維が存在することが示されており、少なくとも2つのタイプの甘味応答味細胞が存在すると考えられる。しかし、味細胞応答の記録や応答細胞の発現遺伝子解析の困難さ故に、甘味応答細胞の詳細な分類や、T1R3などの遺伝子発現との関連、また味細胞レベルでの味覚関連遺伝子欠損の影響を解明するまでには至っていない。

甘味感受性はホルモンなど生理活性物質により調節されることが知られている。マウスでは飽食ホルモンであるレプチンが味細胞レベルで甘味感受性を調節することが報告され、近年、この機構はヒトでも機能する可能性が示唆されている。また、予備実験によりマリファナ様物質であるカンナビノイドが甘味感受性を増強することを示唆するデータを得ている。これらはいずれも甘味応答味細胞に直接影響を与えると考えられ、味細胞は甘味物質の受容・伝達に関わるのみならず、脳に伝達される甘味情報を調節する場としても機能する可能性が示唆される。上記のように複数のタイプの甘味応答細胞が存在するならば、レプチンやカンナビノイドによる甘味感受性調節機構がどのタイプの味細胞に存在するのかを明らかにすることは、脳に伝達される甘味情報の意義を考えるうえでも非常に重要である。

申請者らはこれまでの研究で、特定遺伝子のプロモーターの調節の下、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する遺伝子改変マウスを用い、GFP発現細胞の味応答を記録することで、特定の遺伝子が発現する味細胞群の応答特性を明らかにしてきた。この過程で、gustducin発現味細胞（II型細胞）は甘味、苦味、うま味刺激に特異的に反応し、GAD67発現味細胞（III型細胞）はすべてが酸味刺激に反応し、一部は他の電解質刺激にも反応するという結果を得た。これは、GFPマーカーを指標として特定の味覚感受性をもつ味細胞から味応答を記録できることを示唆する。このようなGFPノックインマウスや、各種味覚遺伝子ノックアウトマウスをツールとして用いることで、これまで困難であった甘味応答細胞における味覚関連遺伝子の機能解析や、甘味感受性調節機構との関連を調べ、

味細胞における甘味受容機構、および甘味感受性調節機構について追究できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、甘味受容体コンポーネントT1R3の遺伝子プロモーターの調節の下、GFPを発現するマウス（T1R3-GFPマウス）、および甘味関連遺伝子ノックアウトマウス（T1R3-KO、TRPM5-KO、gustducin-KOマウス）を掛け合わせた遺伝子改変マウス（GFP-KOマウス）を材料として用い、申請者らが開発した味細胞応答記録システムを利用し、T1R3発現味細胞の各種甘味物質に対する応答やグルマリン感受性、甘味感受性調節物質（レプチン、カンナビノイド）の効果、遺伝子欠損の効果を調べることで、T1R3発現味細胞を介した甘味受容、および感受性調節機構について追究し、味覚末梢における甘味情報の受容・調節機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウスの作出

海外共同研究者（アメリカ・モネル化学感覚研究所、Dr. Margolskee）より供与されたT1R3-GFPマウスとT1R3-KO、TRPM5-KO、gustducin-KOマウスを掛け合わせ、以下の3種のマウスを作出した。

A: T1R3-GFP-KOマウス

B: T1R3-GFP, TRPM5-KOマウス

C: T1R3-GFP, gustducin-KOマウス

### (2) T1R3-GFP発現細胞からの応答記録

各種T1R3-GFPマウスより舌を取り出し、酵素処理などにより個々の茸状乳頭味蕾を単離し、その味孔側を刺激ピペットにて吸引保持し、共焦点レーザー顕微鏡観察下で基底外側膜側よりT1R3-GFP味細胞にガラス微小電極を当て、各種味刺激に対する応答を記録した。また基底外側膜側に内因性カンナビノイド（アナンダミド[AEA]、2-AG）、およびその受容体アンタゴニスト（AM251、AM630）を与えたときの味応答の変化を解析した。

### (3) T1R3-GFP味細胞の発現遺伝子解析

T1R3-GFPマウスより茸状および有郭乳頭味蕾を酵素処理により単離し、その中に含まれる単一GFP発現細胞をガラス電極により採取し、マルチプレックス single cell RT-PCRにより発現遺伝子解析を行った。発現解析を行った遺伝子はG $\alpha$ サブユニット、T1Rs、SNAP、GAD67、GLASTである。

## 4. 研究成果

## (1)内因性カンナビノイドによる甘味応答増強効果

**T1R3-GFP** 発現細胞、およびランダムに味応答を記録した味細胞のうち甘味（サッカリン）刺激に反応したものを、基底外側膜側への内因性カンナビノイド（AEA、2-AG）投与の効果調べた（図1A）。1mg/mlの濃度において、AEA、2-AG共に味細胞の甘味応答をおよそ40%増強した。その効果は濃度依存的で、2-AGの方がより低濃度でその効果を示した（図1B）。またこの甘味増強効果は内因性カンナビノイドの受容体であるCB<sub>1</sub>を欠損したマウスでは見られなかった（図1B）。さらに2種類あるカンナビノイド受容体（CB<sub>1</sub>およびCB<sub>2</sub>）の阻害剤を用い、薬理的に関連する受容体を解析したところ、CB<sub>1</sub>受容体の阻害剤であるAM251を加えた場合、2-AGの甘味増強効果が抑制されたが、CB<sub>2</sub>受容体の阻害剤であるAM630を加えた場合、そのような抑制は見られなかった（図1C,D）。以上の結果は、内因性カンナビノイドが甘味応答細胞に存在するCB<sub>1</sub>受容体を介し、その感受性を増強させることを示唆する。

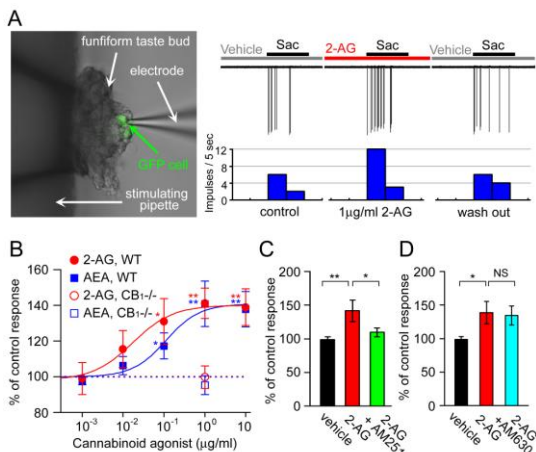


図1 味細胞における内因性カンナビノイド投与の効果。A. T1R3-GFP 味細胞における1μg/ml 2-AG投与の効果を示す例。この細胞は甘味（サッカリン）刺激に対し反応を示し、その反応は2-AG投与により増大した。B. 2-AGとAEAの濃度反応曲線。WT:野生型マウス、CB<sub>1</sub><sup>-/-</sup>:CB<sub>1</sub>-KOマウスの味細胞反応。C、D. 2-AGの甘味反応増強効果に対するCB<sub>1</sub>受容体阻害剤AM251およびCB<sub>2</sub>受容体阻害剤AM630の阻害効果。

## (2)T1R3-GFP 味細胞の味反応特性

T1R3-GFPマウスを用い、茸状乳頭GFP発現細胞から5基本味刺激（塩味:0.3M NaCl、酸味:0.01M HCl、苦味:0.02M キニーネ、甘味:0.02M サッカリン、および0.5M ショ糖、うま味:0.3M グルタミン酸ナトリウム(MSG)および0.3M MSG+0.5mM IMP)に対する反応を記録した。全部で20個のT1R3-GFP 味細胞より反応を記録し、そのほ

とんど(19個)は甘味刺激に最大反応を示し、1個はうま味に特異的な反応を示した(図2)。甘味に最大反応を示した細胞のうち5個はうま味刺激にも反応を示し、14個は甘味特異的な反応を示した。また、複数種の甘味刺激(サッカリン、ショ糖、グルコース、SC45647、D-phenylalanineなど)に対する反応を調べたところ、多くの細胞は多数の甘味刺激に対し反応を示した(図3)。この結果は、茸状乳頭のT1R3発現細胞が甘味、うま味の情報を検出する役割を持つことを示唆する。

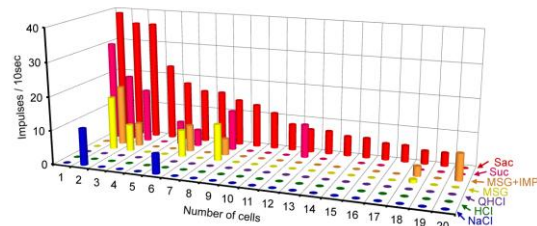


図2 20個のT1R3-GFP味細胞の基本味刺激に対する反応プロファイル。NaCl: 0.3M NaCl、HCl: 0.01M HCl、QHCl: 0.02M キニーネ、MSG: 0.3M MSG、MSG+IMP: 0.3M MSG + 0.5 mM IMP、Suc: 0.5M ショ糖、Sac: 0.02M サッカリンに対する反応を示す。

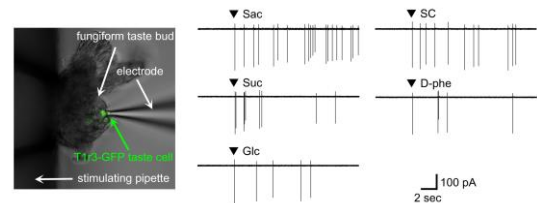


図3 T1R3-GFP 味細胞の各種甘味物質に対する反応例。Sac:0.02M サッカリン、SC: SC45647、Suc: 0.5M ショ糖、D-phe: 0.1 M D-phenylalanine、Glc: 0.5M グルコース

さらに、作成した3種のGFP-KOマウス(T1R3-GFP-KO、T1R3-GFP、TRPM5-KO、T1R3-GFP、gustducin-KO)を用い、茸状乳頭味蕾内のGFP発現細胞から反応を記録したが、いずれのKO-GFP味細胞においても明確な味反応を記録することができなかった。これは、T1R3発現味細胞において、T1R3、TRPM5、gustducinがいずれも味反応発現に重要な役割を持つことを示唆する。

## (3)T1R3-GFP 発現細胞の発現遺伝子解析

茸状乳頭(FP)、および有郭乳頭(CV)に存在する単一T1R3-GFP味細胞を用い、16種のGタンパク質αサブユニットの発現遺伝子解析を行った。その結果、Gαgust(FF: 100%、CV: 19%)以外に、Gα11(FF:33%、CV:57%)、Gα14(FF:11%、CV: 81%)、Gαi2(FF: 67%、CV: 71%)、Gαq(FF: 67%、CV: 81%)、Gαs(FF: 89%、CV: 86%)を発現する細胞が多く存在した。こ

これらの G タンパク質は T1R3 発現細胞において味覚応答の発現に関与するか、味覚応答の修飾（例えば内因性カンナビノイドによる甘味応答増強効果）に関与する可能性が考えられる。また、gustducin は FP 領域で、Gα14 は CV 領域で T1R3 発現細胞に発現する割合が高く、これらは FP 領域と CV 領域での T1R3 発現細胞の応答性の差に関与する可能性が考えられる。

#### (4)総括

本研究により、新たに内因性カンナビノイドによる甘味増強効果が存在することを明らかとし、その機構の一端を解明した。また、甘味・うま味の受容体コンポーネントである T1R3 を発現する細胞が実際にこれらの味刺激に応答を示し、T1R3 発現細胞において T1R3、gustducin、TRPM5 といった味覚関連遺伝子が味覚応答の発現に重要な役割を持つことを明らかにした。さらに T1R3 発現細胞における Gαタンパク質の発現パターンを明らかとした。今後は、より詳細にカンナビノイドの甘味増強機構や、レプチンによる甘味抑制機構、およびそれらの関連性について明らかとする必要がある。また、T1R3 非依存性の甘味・うま味応答を担う味細胞の存在を明らかとする必要がある。

#### 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 18 件)

- ① Yoshida R, Niki M, Murata Y, Shigemura N, Ninomiya Y: Reception and transmission of taste information in Type II and Type III taste bud cells. *J. Oral. Biosci.* 52, 358-364, 2010
- ② Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF, Ninomiya Y: Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 935-939, 2010
- ③ Yoshida R, Ninomiya Y: New Insights into the Signal Transmission from Taste Cells to Gustatory Nerve Fibers. *Int. J. Cell. Mol. Biol.*, 279, 102-134, 2010
- ④ 吉田竜介, 大栗弾宏, 重村憲徳, ニノ宮裕三: 内因性カンナビノイドの甘味増強作用. *実験医学*, 28, 1405-1408, 2010
- ⑤ 吉田竜介, 仁木麻由, ニノ宮裕三: 末梢における味覚受容・情報伝達とその調節. *Clinical Neuroscience*, 28, 1227-1231, 2010
- ⑥ Yoshida R, Miyauchi A, Yasuo T, Jyotaki M, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y: Discrimination of taste qualities among mouse

fungiform taste bud cells. *J. Physiol.*, 587, 4425-4439, 2009

- ⑦ 吉田竜介, ニノ宮裕三: 味覚情報のコーディングにおける味細胞の役割. *味と匂学会誌*, 16, 117-124, 2009

[学会発表] (計 27 件)

- ① 吉田竜介, ニノ宮裕三: 味覚センサーの興奮性調節による行動変化. 第 8 8 回日本生理学会大会, 横浜 (震災により誌上に変更), 2011.
- ② 吉田竜介: マウス味細胞の生理機能解析. 日本味と匂学会第 4 4 回大会, 北九州, 2010
- ③ 吉田竜介, 大栗弾宏, 上瀧将史, 安尾敏明, 堀尾奈央, 安松啓子, 實松啓介, 重村憲徳, 山本経之, Margolskee RF, ニノ宮裕三: 内因性カンナビノイドはマウスの甘味応答を増大させる. 第 3 3 回日本神経科学大会, 神戸, 2010
- ④ 吉田竜介, ニノ宮裕三: 味細胞における味覚情報処理機構. 平成 2 2 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, 熊本, 2010
- ⑤ 吉田竜介, ニノ宮裕三: カンナビノイドによるマウス甘味応答の増強. 日本比較生理生化学会第 3 2 回大会, 福岡, 2010
- ⑥ Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF, Ninomiya Y: Endocannabinoids as modulators of sweet taste sensitivities in mice. *International Symposium on "Oral Health Science"*, Fukuoka, 2010
- ⑦ Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF, Ninomiya Y: Taste responses of mouse fungiform taste bud cells expressing gustducin or GAD67. *The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception*, Fukuoka, 2009
- ⑧ 吉田竜介, 安尾敏明, 宮内彩, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 植野洋志, Margolskee RF, ニノ宮裕三: マウス茸状乳頭味細胞の複数種の苦味、酸味物質に対する応答. 第 3 2 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009
- ⑨ 吉田竜介, 村田芳博, 安松啓子, 重村憲徳, ニノ宮裕三: 味細胞における味覚の受容と情報伝達. 第 5 1 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2009
- ⑩ 吉田竜介, 宮内彩, 安尾敏明, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 植野洋志, Margolskee RF, ニノ宮裕三: 同一味質を呈す味物質に対する味細胞の応答性. 日本味と匂学会第 4 3 回大会, 旭川, 2009
- ⑪ Yoshida R, Yasuo T, Murata Y, Jyotaki M, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Damak S, Margolskee RF, Ninomiya Y: Taste responsiveness of Type II and III taste bud cells

in mouse fungiform papillae. IUPS2009, Kyoto, 2009

⑫ **Yoshida R**, Yasuo T, Murata Y, Jyotaki M, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y: Different response properties between Type II and Type III taste bud cells in mouse fungiform papillae. AChemS 2009, Sarasota, FL, USA, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 竜介 (Yoshida Ryusuke)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：60380705