

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19601

研究課題名（和文）光遺伝子操作技術を用いた口腔-脳-腸連関における味覚機能の解明

研究課題名（英文）Analysis of taste function in oral-brain-gut axis using new photogenetical tool

研究代表者

吉田 竜介（Yoshida, Ryusuke）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：60380705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔感覚（味覚）、特に糖摂取により生じる非常に早い段階でのインスリン分泌（頭相インスリン分泌）について調べた。頭相インスリン分泌を生じさせるためには甘味受容体 Tas1r2/Tas1r3を介する糖受容経路ではなく、グルコーストランスポーターを介する糖受容機構を活性化することが示された。また、光による遺伝子改変という新技术を用い、舌上の味細胞に光刺激による遺伝子発現誘導に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、口腔内のグルコーストランスポーターが口腔内での糖の受容に寄与することを示すと同時に、そのシグナルが膵臓からのインスリン分泌を促す可能性について明らかとした。また光誘導性Creを用いることで、時空間的に味細胞の遺伝子発現をコントロールできる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated sensory mechanisms contributing to the very early phase of insulin secretion induced by sugar intake (cephalic phase insulin secretion). To induce cephalic phase insulin secretion, it is necessary to activate the glucose-sensing mechanism via glucose transporters rather than the sugar-sensing pathway through the sweet taste receptors Tas1r2/Tas1r3. Additionally, using a new technique of genetic modification by light, we successfully induced gene expression in taste cells on the tongue through light stimulation.

研究分野：口腔生理学

キーワード：甘味 糖受容 遺伝子改変マウス 光感受性Cre 時空間的遺伝子発現調節 頭相インスリン分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の生存には外部から栄養を摂取する必要がある。栄養源を検知するセンサーは口腔のみならず消化管や脳にも存在し、これらが協働し、体内恒常性を維持している。体内でエネルギー源となる糖のセンサーには、G タンパク質共役型甘味受容体 TAS1R2/TAS1R3 と、グルコーストランスポーター/K_{ATP} チャンネル (GT/K_{ATP}) の2系統が存在し、その両者が口腔での糖受容を担う。その情報は、味神経を介して脳へと伝えられ、味覚認知、快・不快の情動、記憶・学習、唾液・消化液・ホルモン分泌など意識下・無意識下に働き、摂食行動や糖吸収を調節する。これらセンサーは消化管にも存在し、糖吸収に積極的に関わるだけでなく、迷走神経を介しその情報を脳へと送り、摂食調節、学習や自律反射にも関与する。更にこれらセンサーは膵臓でのインスリン分泌、脳での糖受容にも関わり、摂食調節やエネルギー恒常性維持に重要な役割を果たす「口腔 - 脳 - 腸連関係」を形成する。この連関係の変調・異常は食調節・エネルギー恒常性の破綻を生じさせ、所謂メタボリックシンドロームに繋がる。味覚センサーによる口腔 - 脳 - 腸連関係の全容を把握し、その生体的意義について解明することは、食を通じた健康維持を図るためにも必要不可欠である。

このような口腔 - 脳 - 腸連関係の中で、糖に関する味覚情報は、味細胞・味神経線維レベルで TAS1R2/TAS1R3 系、GT/K_{ATP} 系、およびその両者から成る3系統に分類される。ノックアウト (KO) マウスの行動実験から、TAS1R3 が関与する系は意識下の甘味嗜好行動と強く連関すると思われるが、GT/K_{ATP} 系の役割については全く分かっていない。口腔からグルコースを摂取した方が胃に直接グルコースを投与した時よりも血中インスリン増加が大きく、また *Tas1r3*-KO マウスでも頭相インスリン分泌が生じるとの報告があり、申請者らは、GT/K_{ATP} チャンネル系を介する味覚情報が、無意識下のホルモン分泌や自律反射に関与すると考えた。しかし、GT/K_{ATP} チャンネル系自体が膵細胞でのインスリン分泌に必須であるだけでなく、消化管や脳でも機能することから、味覚組織における GT/K_{ATP} 系の役割を解析するためには、組織特異的にこの系を破壊する必要がある。

各組織における糖センサー発現細胞 (口腔：甘味細胞、腸管：内分泌細胞、膵臓：細胞、脳：視床下部ニューロン) は共通の遺伝子やシステムを利用しており、全身 KO マウスでは、生体内で各組織における各糖センサーの機能を切り分けて解析することが困難である。特定遺伝子の発現を基にしたコンディショナル KO マウスではこれが可能となるが、各組織の糖センサー細胞が共通のシステムを利用しているため、基となる特定遺伝子の選定が容易ではない。口腔器官は他の器官と比較し外部からのアプローチが容易であることから、申請者は、現在開発中の青色光により遺伝子操作が可能となる光活性化 Cre マウスに注目した。これにより、舌組織に青色光を照射することで、照射部位でのみ糖センサーを欠損させ、口腔 - 脳 - 腸連関係の口腔機能について完全に切り分けて解析できると考えられる。しかし、光活性化 Cre (PA-Cre) マウスを用いた生体機能解析を行った研究は未だほとんどなく、このマウスの有用性を実証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、光による遺伝子改変という新技术を用い、全身のエネルギー恒常性維持に寄与する糖センサーを介した口腔 - 脳 - 腸連関係の中で、口腔 (味覚) における糖センサー (TASAS1R3 系と GT/K_{ATP} 系) の機能を完全に切り分けて解析し、味覚が全身代謝に与える影響を理解することで、味覚および食を介した新たな健康維持手段の確立へと繋げる事を目的とした。具体的には、TASAS1R3 系と GT/K_{ATP} 系のどちらがマウスの頭相インスリン反応に関与するのか？、光活性化 Cre マウスを用いた舌 (味細胞) における部位特異的遺伝子改変マウスを作成することが出来るか？について追及した。

3. 研究の方法

(1) 頭相インスリン反応の測定

動物として野生型マウス (C57BL/6J) および甘味受容体欠損マウス (*Tas1r3*-GFP-KO) を用いた。全てのマウスはリック計測機から水を飲めるよう水飲みトレーニングを5日間行った。この間、リック数と飲水量とを測定し、各マウスの1リック当りの飲水量を求めた。

野生型マウスは、口腔からグルコース溶液を摂取する群 (OG 群)、グルコース溶液を胃内投与する群 (IG 群)、グルコーストランスポーター阻害剤を口腔内処理した後グルコース溶液を口腔から摂取する群 (OG+GTI 群) および溶媒で口腔内処理後グルコース溶液を口腔から摂取する群 (OG-GTI)、非代謝型グルコースを口腔から摂取しグルコース溶液を胃内投与する群 (OMDG+IG 群)、グルコースを口腔から摂取しグルコース溶液を胃内投与する群 (OG+IG 群) の6群に、*Tas1r3*-GFP-KO マウスはOG群とIG群の2群に分けた。

実験開始の12時間前からマウスを絶食・絶水させ、各群のプログラムに応じてグルコースを摂取させた。グルコース摂取前、摂取後5分、10分、30分、60、90分後に尾静脈より血液を採取し、グルコメーターで血糖値を、マウス/ラットインスリン ELIZA キットを用いて血漿イ

ンスリン濃度を測定した。

(2) 光感受性 Cre マウスの有用性の実証

動物として光刺激により Cre リコンビナーゼが活性化するマウス(PA-Cre)と全ての細胞で rtTA を発現するマウス (ROSA26-rtTA) レポーターマウス (ROSA26-tomato) を掛け合わせた (PA-Cre;ROSA26-rtTA/tomato) マウスを作成した。このマウスでは、ドキシサイクリン存在下で PA-Cre を誘導し、青色光を照射することでレポーター遺伝子(蛍光タンパク質 tomato)を発現させることが出来ると想定される。マウスに28日間ドキシサイクリンを摂取させた後、舌に青色光を照射し、7, 14, 28 日後に舌組織を取得し、免疫組織化学的実験により各種味覚マーカー遺伝子と tomato との共発現について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 頭相インスリン反応の測定

OG 群にて野生型マウスおよび甘味受容体欠損マウスのグルコース経口摂取後の血糖値、および血漿インスリン濃度変化を調べたところ、両マウス間に有意な差は認められなかった。頭相インスリン反応の指標として、グルコース摂取後5分のインスリン上昇について検討したところ、両マウスにおいて、有意なインスリン濃度の増加が認められた。またその上昇値は両マウス間で有意差がなかった。以上の結果から、口腔からグルコースを摂取した場合、甘味受容体欠損マウスにおいても野生型マウスと同様の頭相インスリン反応を示すことが示唆される。

IG 群にて野生型マウスおよび甘味受容体欠損マウスのグルコース胃内投与後の血糖値、および血漿インスリン濃度変化を調べたところ、両マウス間に有意な差は認められなかった。しかし、両マウスとも OG 群に比べ血糖値のピークとなる時間に遅れが見られ、胃内投与後10分の血糖値は甘味受容体欠損マウスで高い傾向が見られた。一方、グルコース摂取後5分の有意なインスリン上昇は認められなかった。以上の結果から、グルコースを直接胃内投与した場合、甘味受容体欠損マウスも野生型マウスも頭相インスリン反応を示さないと考えられる。

グルコーストランスポーター阻害剤処理群(OG+GTI)と非処理群(OG-GTI)では、血糖値変化に有意差があり、OG-GTI 群では10分にピークを、OG+GTI 群では30分にピークを示した。また、グルコース摂取後5分の有意なインスリン上昇は両群で見られたが、OG-GTI 群の方がOG+GTI 群より血漿インスリン濃度増加が有意に大きかった。この結果は、口腔のグルコーストランスポーターが糖により生じる頭相インスリン反応に重要な役割を持つことを示す。

非代謝型グルコースの口腔摂取の影響を調べると、グルコース摂取後5分の有意なインスリン上昇は両群で見られたが、OG-GTI 群の方がOG+GTI 群より血漿インスリン濃度増加が有意に大きかった。このことより、グルコースが細胞に取り込まれた後の代謝が頭相インスリン反応を引き起こすために必要であることを示唆する。

以上のように、糖を摂取した際に生じる頭相インスリン分泌には、味覚受容体 Tas1r2/Tas1r3 を介する受容機構はほとんど寄与せず、グルコーストランスポーターを介した糖の取り込みおよびその細胞内代謝が重要な役割を持つことを示している。

(2) 光感受性 Cre マウスの有用性の実証

PA-Cre;ROSA26-rtTA/tomato マウスにおいて、ドキシサイクリンを摂取した後、舌に青色光を照射した7日後の舌組織では、味蕾内でマーカー遺伝子である tomato を発現する細胞がほとんど見られなかった。14日後および28日後の舌組織では茸状乳頭味蕾内で tomato を発現する味細胞が検出された。味細胞マーカーである gustducin と tomato の共発現を調べたところ、14日後の舌組織では約40%の gustducin 発現細胞が tomato を発現し、28日後の舌組織では約55%の gustducin 発現細胞が tomato を発現していた。以上の結果から、光感受性 Cre マウスを利用することで舌組織特異的に遺伝子発現を誘導できるが、味蕾の場合にはその効率はあまり高いものと推定される。舌への青色光照射後の時間経過により tomato 発現細胞が増加していることから、味蕾幹細胞で光刺激により組換えが生じ、その後分化した味細胞がレポーター遺伝子を発現している可能性が考えられる。

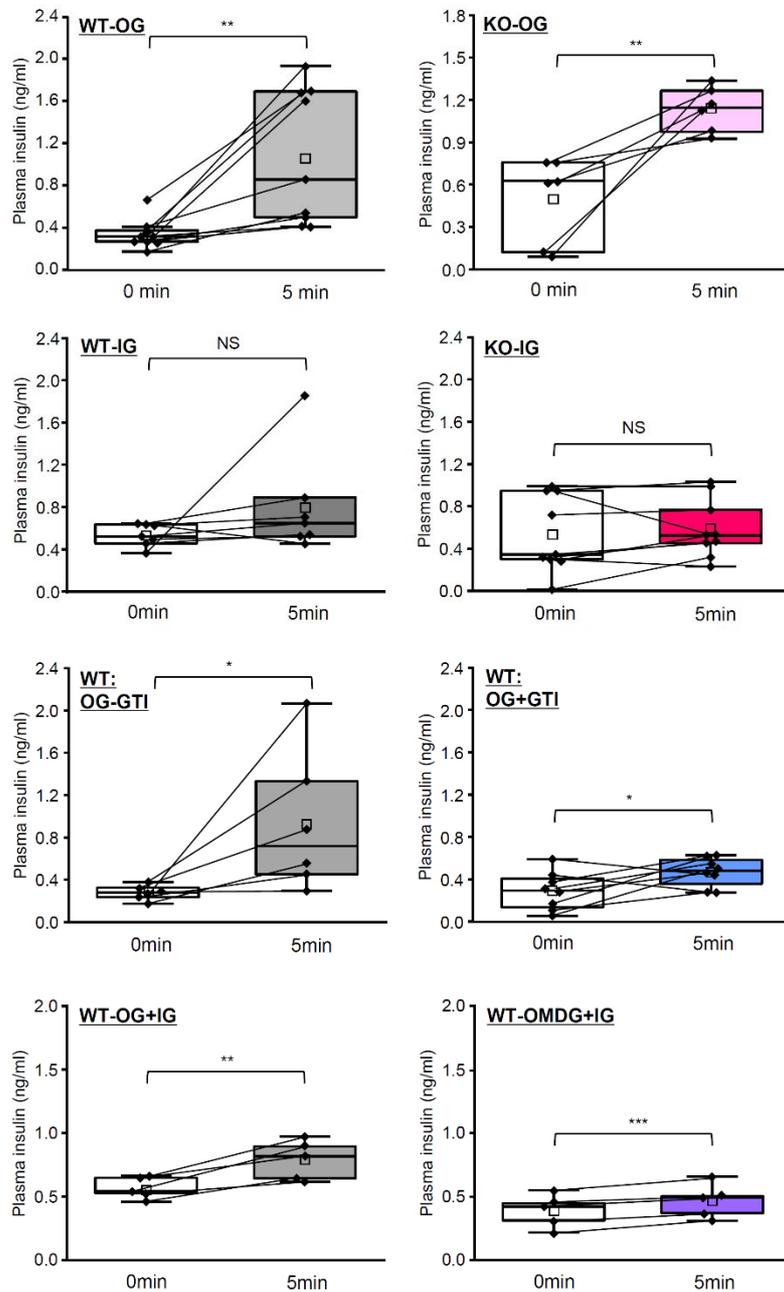


図1. マウスにおける糖摂取時の頭相インスリン反応

WT-OG: 野生型マウスが口腔からグルコースを摂取5分後の血漿インスリン増加

KO-OG: 甘味受容体欠損マウスが口腔からグルコースを摂取5分後の血漿インスリン増加

WT-IG: 野生型マウスにグルコースを胃内投与5分後の血漿インスリン増加

KO-IG: 甘味受容体欠損マウスにグルコースを胃内投与5分後の血漿インスリン増加

OG-GTI: 野生型マウスの口腔内を溶媒で処理後、口腔からグルコースを摂取させた5分後の血漿インスリン増加

OG+GTI: 野生型マウスの口腔内をグルコーストランスポーター阻害剤で処理後、口腔からグルコースを摂取させた5分後の血漿インスリン増加

OG+IG: 野生型マウスが口腔からグルコースを摂取したのちグルコースを胃内投与した5分後の血漿インスリン増加

OMDG+IG: 野生型マウスが口腔から非代謝型グルコースアナログを摂取したのちグルコースを胃内投与した5分後の血漿インスリン増加

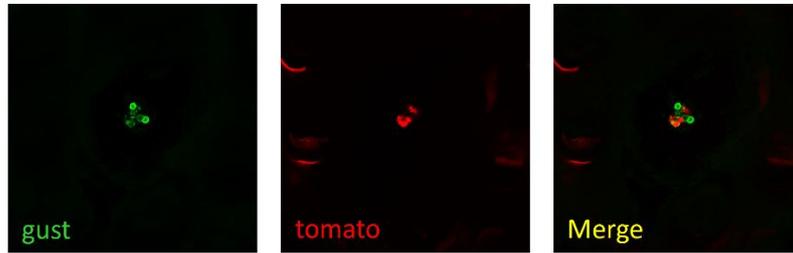


図2 . 光感受性 Cre マウスの味蕾における遺伝子発現誘導
PA-Cre;ROSA26-rtTA/tomato マウスにドキシサイクリン処理、および舌への青色光照射後 14 日目の茸状乳頭におけるレポーター遺伝子 (tomato、赤) と味細胞マーカー (gustducin、緑) の発現。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamase Yuko, Huang Hai, Mitoh Yoshihiro, Egusa Masahiko, Miyawaki Takuya, Yoshida Ryusuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Taste Responses and Ingestive Behaviors to Ingredients of Fermented Milk in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 1150 ~ 1150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods12061150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takamori Mitsuhiro, Mitoh Yoshihiro, Horie Kengo, Egusa Masahiko, Miyawaki Takuya, Yoshida Ryusuke	4. 巻 73
2. 論文標題 Sugar signals from oral glucose transporters elicit cephalic-phase insulin release in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-023-00875-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Iwata Shusuke, Yoshida Ryusuke, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Shigemura Noriatsu, Ninomiya Yuzo	4. 巻 15
2. 論文標題 Adrenomedullin Enhances Mouse Gustatory Nerve Responses to Sugars via T1R-Independent Sweet Taste Pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2941 ~ 2941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15132941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshida Ryusuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Sensory Systems for Sugar-Induced Cephalic Phase Insulin Release	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 117 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40496-023-00347-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuko Yamase, Huang Hai, Yoshihiro Mitoh, Masahiko Egusa, Takuya Miyawaki, Ryusuke Yoshida
2. 発表標題 Taste responses and ingestive behavior to fermented milk tastants
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山瀬裕子、黄海、美藤純弘、江草正彦、宮脇卓也、吉田竜介
2. 発表標題 発酵乳由来成分に対するマウス味覚行動応答の解析
3. 学会等名 日本味と匂学会第56回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高盛充仁、吉田竜介
2. 発表標題 マウスにおける頭相インスリン分泌に関する機構の解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高盛充仁、江草正彦、吉田竜介
2. 発表標題 口腔内糖受容センサーの頭相インスリン分泌への関与
3. 学会等名 第43回岡山歯学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山瀬裕子、黄海、美藤純弘、江草正彦、宮脇卓也、吉田竜介
2. 発表標題 発酵乳成分におけるマウスの味覚応答の解析
3. 学会等名 第43回岡山歯学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsuhiro Takamori Yoshihiro Mitoh, Kengo Horie, Masahiko Egusa, Takuya Miyawaki, Ryusuke Yoshida
2. 発表標題 Sugar signals from oral glucose transporters elicit cephalic-phase insulin release in mice
3. 学会等名 第101回日本生理学会（細胞と分子生理の集い・上皮膜研究グループ Journal of Physiological Sciences 優秀論文賞受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 吉田竜介
2. 発表標題 味覚と健口
3. 学会等名 第30回日本未病学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoshida R, Ninomiya Y.	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 35
3. 書名 Chapter 2: Umami and MSG. in Umami: Taste for Health	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ウェブサイト
<https://www.okayama-u.ac.jp/user/oralphys/0raIPhysiology.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古株 彰一郎 (Kokabu Shoichiro) (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	高尾 知佳 (Takao Chika) (40612429)	岡山大学・医歯薬学域・講師 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	モネル化学感覚研究所		