

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462815

研究課題名(和文) 味細胞における苦味情報のコーディング

研究課題名(英文) Coding of bitter taste information among taste bud cells

研究代表者

吉田 竜介 (Yoshida, Ryusuke)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：60380705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な苦味物質に対する応答プロファイルによりマウス苦味受容細胞が幾つかのタイプに分類されること、茸状、有郭乳頭間でこれら苦味細胞の応答プロファイルに差がないこと、これら細胞での苦味受容にはgustducin-PLC 2-TRPM5を介する伝達経路が重要であること、ヒト苦味受容体阻害剤がマウスの苦味応答には影響を与えないこと、CCKが苦味受容細胞から味神経線維への情報伝達に関与する可能性を示した。これらにより、味細胞における苦味受容機構について明らかとし、末梢における苦味情報の伝達及びコーディングについての知見を得た。

研究成果の概要(英文)：This study has demonstrated that (1) Bitter sensitive taste cells are heterogeneous from the point of view of their responsiveness, (2) Overall response profile of bitter taste cells to multiple bitter compounds was not significantly different between fungiform and circumvallate papillae, (3) Bitter responses of taste cells were significantly suppressed by TRPM5 inhibitor and PLC inhibitor, (4) Bitter responses of mouse taste cells were not affected by human bitter receptor antagonists, (5) CCK may be involved in peripheral bitter taste signaling. These data help understanding receptors and transduction mechanisms for bitter taste and give insights into coding of bitter taste information in the peripheral taste system.

研究分野：口腔生理学

キーワード：味覚 苦味 味細胞 受容体 情報伝達機構 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

味覚は摂食調節において非常に重要な役割を持ち、その情報は動物に嗜好（甘味、うま味、低濃度の塩味）または忌避（酸味、苦味、高濃度の塩味）行動を惹起する。中でも苦味はアルカロイド、配糖体、アミノ酸、ペプチドなど非常に多様な物質により生じる感覚で、毒物検知の役割を持つと考えられる。実際には毒物のみならず、医薬品や食品の有効成分も苦味を呈することが多く、これらの分野では苦味を低減する技術の開発が重要となっている。また新たな展開として、苦味受容体が気道の化学受容細胞や気道平滑筋に発現し、苦味物質が気道での感染防御や気管支拡張に寄与する可能性が示され、感染症予防や喘息治療に対する苦味物質の有用性が示唆されている。さらに、苦味受容体は消化管や脳、精巣などにも発現し、何らかの機能を担っていると考えられる。このように、苦味は口腔内の感覚のみならず様々な器官で多様な役割を持つ可能性が示唆されている。これら苦味受容の分子基盤は口腔内の苦味受容細胞と同様であると考えられ、その詳細を理解することは苦味を制御・利用するうえで重要となってきている。

苦味物質は *TAS2R* 遺伝子ファミリーに属する多くのタンパク質 (*T2Rs*) により受容される。ヒトの場合、36 個の *TAS2R* 遺伝子のうち 25 個が機能的な苦味受容体をコードすると考えられており、その多様性が多彩な構造を持つ苦味物質を受容する基盤になると考えられている。実際、培養細胞を用いた異所発現系により、ヒト *T2Rs* のリガンドが同定されつつあり、様々な苦味物質により活性化されるものや (*T2R14* など)、特定の苦味物質にのみ活性化されるもの (*T2R5* など) が存在することが明らかとなってきた。しかし、未だどの *T2R* を活性化するか不明な苦味物質も多数存在しており、*T2R* 非依存的な苦味受容機構も存在する可能性が考えられる。これら *T2Rs* はマウスでは同じ味細胞に発現することが示されており、これは各苦味細胞が多種の苦味物質に応答することを示唆する。一方、ラットやヒトでは各 *T2R* の発現は味細胞により異なることが示されており、これは各味細胞の苦味物質に対する応答特性がそれぞれ異なることを示唆する。実際、マウス味細胞でも、苦味受容細胞の苦味物質に対する応答特異性は有郭乳頭領域では高く、茸状乳頭領域では低いことが示されており、両者が混在する可能性も否定できない。*T2R* 活性化に続き、*Gagust* を含む三量体 G タンパク質、*PLCβ2*、*IP<sub>3</sub>R3*、*TRPM5* が次々と活性化され、最終的に味細胞では活動電位が発生し、味覚神経へと情報が伝達される。これらの細胞内情報伝達分子を欠損したマウスの味覚応答を調べると、苦味物質に対する神経応答・行動応答が共に消失するという報告と、減少するが消失はしないという報告があり、苦味受

容機構が均一である可能性と複数存在する可能性が示されている。このように異なる種、舌部位、手法により異なる結果が示されており、苦味受容に関し統一的な見解が得られていない。

これまで、申請者らは苦味以外の甘味、塩味、うま味の受容機構を解析してきたが、いずれの味質も複数の受容機構が関与する可能性が考えられた。例えば、甘味や塩味についてはその抑制剤の効果の有無により少なくとも 2 種の受容機構が存在すると考えられ、うま味についても *T1R* 系と *mGluR* 系の少なくとも 2 系統の受容機構が存在すると考えられる。申請者らは、甘味、塩味、うま味の受容機構と同様に、苦味受容機構も複数存在し、それが苦味情報のコーディングに影響を及ぼすのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、味細胞における苦味受容および伝達機構に注目し、既知の *T2R-Gagust-PLCβ2-TRPM5* を介した苦味受容機構と、これとは独立した新奇の苦味受容機構について生理学的、分子生物学的手法を用い追及し、味細胞における苦味受容機構と、苦味情報のコーディングにおける味細胞の果たす役割について明らかにすることを目的とする。具体的には、様々な遺伝子改変マウスと生理学的、薬理的、分子生物学的手法を用い、各種苦味物質に対する味細胞の応答や苦味阻害剤の効果、苦味受容細胞の *T2R* 発現などを調べることで、*T2R* 依存的苦味受容機構について解析し、これを介した苦味物質の弁別可能性について明らかとする。また、*T2R* 依存的苦味受容機構を保有せず、且つ苦味刺激に応答する味細胞を探索し、それら味細胞における各種味蕾マーカーの発現を探ることで、*T2R* 非依存的な新奇の苦味受容機構の存在について追求する。さらに、苦味刺激により特異的に放出される伝達物質候補の測定を試みる。

## 3. 研究の方法

## (1) マウス味細胞応答解析

本実験には、申請者らが開発した味細胞応答記録システムを利用した。マウス舌組織より茸状乳頭または有郭乳頭味蕾を単離し、その味孔側を刺激ピペットにより吸引保持する。各種味刺激はこの刺激ピペットを介し味細胞の味孔側のみと与えられる。動物には *gustducin-GFP* マウスを用い、共焦点レーザー顕微鏡観察下で *gustducin-GFP* 発現細胞に記録電極を当て、味細胞が発生する活動電位を記録する。基底外側膜側からは *PLCβ2* 阻害剤や *TRPM5* 阻害剤を与えることで、これらの味応答に対する効果を調べた。*T2R* 阻害剤は味孔側より与え、その効果について検討した。

## (2) マウス行動応答解析

2 3 時間絶水マウスをリック計測用ケージに移し、リック計測器より水を飲むトレーニングを行う。このトレーニングを5日間行い、6日目から各種味溶液に対する短時間(10秒間)リック応答を記録する。味溶液は苦味溶液が連続しないようランダムな順序で与えた。

## (3) 免疫組織化学的解析

マウスを安楽死させた後、有郭または茸状乳頭を含む舌組織、および膝神経節を取得し、4% PFA で固定後、薄切切片を作成する。CCK、TRPM5、PLC $\beta$ 2、T1R3、CCK-Ar、CCK-Br、P2X2 に対する一次抗体で処理後、対応する蛍光二次抗体で処理し、組織像を共焦点レーザー顕微鏡にて取得した。

## (4) マウス鼓索神経応答解析

麻醉下でマウスの右側鼓索神経を剖出し、記録電極に乗せる。舌に各種味溶液を与えた時の全神経束応答(積分応答)を記録した。動物間の個体差を考慮し、各種味刺激に対する応答は0.1M NH $_4$ Cl に対する応答を基準として標準化した。マウスは野生型、CCK-Ar 欠損、CCK-Br 欠損および CCA-Ar/Br 欠損マウスを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) マウス茸状乳頭および有郭乳頭の gustducin-GFP 発現細胞の苦味応答特性

マウス茸状乳頭および有郭乳頭味蕾の gustducin-GFP 味細胞から、10 種の苦味物質[quinine-HCl (QHCl)、denatonium (Den)、cyclohexamide (Chx)、caffeine (Caf)、sucrose octaacetate (SOA)、tetraethylammonium (TEA)、phenylthiourea (PTU)、L-phenylalanine (L-Phe)、MgSO $_4$ 、高濃度 saccharin (Sac)]、および高濃度 NaCl に対する応答を記録した。いずれの乳頭においても、一部の gustducin-GFP 味細胞は QHCl または Chx にかなり特異的な応答を示し、また逆に多種の苦味物質に幅広く応答する細胞も存在した(図1、2)。応答特異性を表すエントロピー値(0~1 で表される。1 種の刺激に特異的に応答した場合エントロピー値は0となり、10 種の刺激に同程度応答した場合は1となる。)は、茸状乳頭味細胞で  $0.462 \pm 0.072$  (n=30)、有郭乳頭味細胞で  $0.452 \pm 0.072$  (n=31) であり、両者に有意差はなかった。また、クラスター解析を用い、苦味物質に対する応答性により苦味細胞を分類すると、大きく5つのグループが形成されたが、茸状または有郭乳頭に特異的なグループは存在しなかった。これらの結果から、苦味感受性 gustducin-GFP 味細胞の応答性は茸状および有郭乳頭間で大きな違いは無いと考えられる。しかし、各味物質に対する応答強度には差が見られ、QHCl 応答は有郭乳頭味細胞で有意に大きく、また MgSO $_4$  応答は茸

状乳頭味細胞で有意に大きかった。

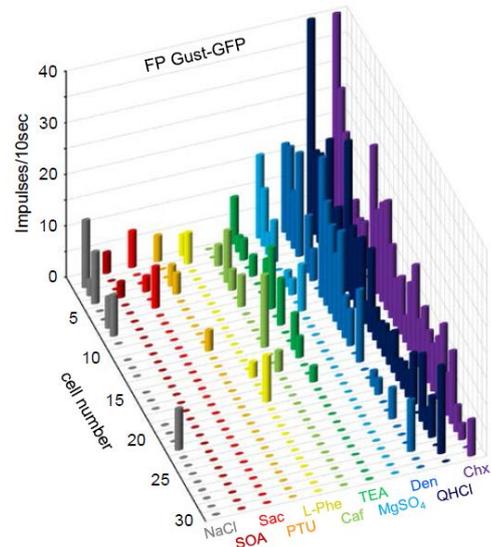


図1. マウス茸状乳頭における gustducin-GFP 味細胞の応答プロファイル. 30 個の gustducin-GFP 味細胞の各種苦味物質に対する応答を示す.

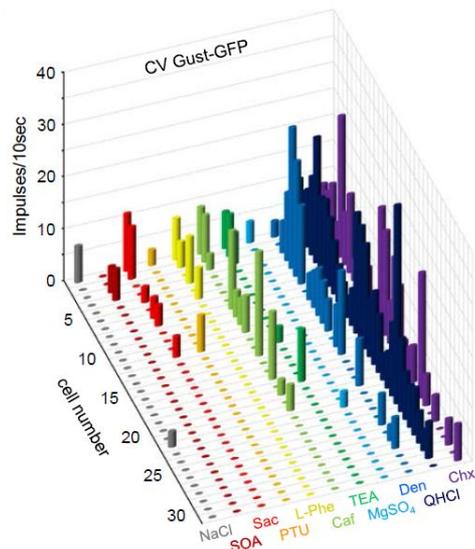


図2. マウス有郭乳頭における gustducin-GFP 味細胞の応答プロファイル. 31 個の gustducin-GFP 味細胞の各種苦味物質に対する応答を示す.

### (2) 苦味受容機構の解析

Gustducin-GFP 味細胞における苦味受容機構を調べるため、PLC $\beta$ 2 阻害薬 (U73122) および TRPM5 阻害薬 (TPPO) の苦味応答への影響を調べた。Gustducin-GFP 味細胞の苦味応答は U73122 投与、または TPPO 投与によりほぼ完全に消失した。TPPO 洗浄後には苦味応答はほぼ元の大きさまで回復したが、U73122 洗浄後には苦味応答の回復は見られなかった(図3A,B)。これらの結果から、gustducin 発現細胞において PLC $\beta$ 2 や TRPM5 が苦味応答に必要不可欠である可能性が示

唆される。

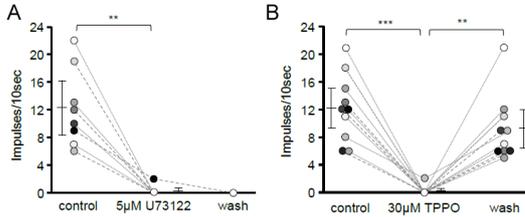


図3. PLCβ2 阻害剤および TRPM5 阻害剤の gustducin-GFP 味細胞苦味応答に対する効果 . A: PLCβ2 阻害剤 ( U73122 ) の効果, B: TRPM5 阻害剤 ( TPPO ) の効果

近年、アミノ酸誘導体である GABA および Na,Na-bis(carboxymethyl)-L-Lysine (BCML) がヒト T2R4 受容体の阻害剤として機能し、QHCl に対する応答を抑制すること、Probenecid がヒト T2R38 を阻害し phenylthiocarbamide (PTC) に対する応答を抑制することが報告されている。Gustducin-GFP 味細胞では QHCl 応答を容易に記録できることから、この細胞の QHCl 応答に対する GABA および BCML の阻害効果を調べた。その結果、GABA および BCML 共に有効濃度であっても gustducin-GFP 味細胞の QHCl 応答に影響を与えなかった ( 図 4 A,B )。また、マウス行動応答においても GABA、BCML および Probenecid の苦味抑制効果について解析したが、いずれもマウスの苦味物質に対する行動応答に影響を与えなかった。これらの結果から、これらヒト苦味受容体阻害剤はマウス苦味受容体には影響を与えない可能性が示唆される。

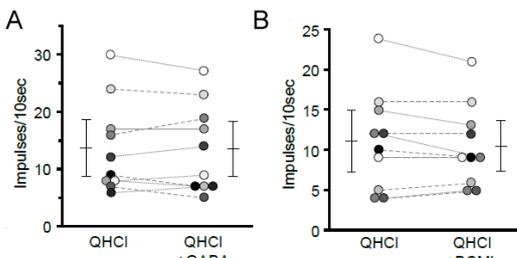


図4 . ヒト苦味受容体阻害剤の gustducin-GFP 味細胞苦味応答に対する効果 . A: ヒト T2R4 阻害剤 ( GABA ) の効果, B: ヒト T2R4 阻害剤 ( BCML ) の効果

### (3) 苦味の情報伝達機構の解析

味細胞から味神経への情報伝達に ATP 以外の伝達物質としてコレシストキニン (CCK) が関与するかについて解析した。免疫組織化学的解析により、味蕾内で CCK は主に TRPM5 や PLCβ2、gustducin 発現細胞に発現していた。これは、甘味、うま味、苦味の受容細胞である II 型細胞が CCK を保有することを示す。また、甘味・うま味受容体コンポーネントである T1R3 との共発現の割合が少ないことから、多くの CCK 発現細胞は苦味細胞であると考えられた ( 図 5 )。また、

CCK の受容体である CCK-Ar および CCK-Br は味蕾内で CCK 発現細胞に見られると共に、膝神経節での発現が見られた。各種味刺激に対する鼓索・舌咽神経応答を調べると、野生型マウスと比較し、CCK-Ar 欠損マウス、CCK-Br 欠損マウス、両受容体欠損マウスの苦味物質に対する神経応答が減少していた ( 図 6 )。静脈に CCK-8 を投与すると濃度依存的な鼓索神経活動が見られ、CCK-Ar 阻害剤である lorglumide を投与すると苦味物質に対する鼓索神経応答が抑制された。これらの結果から、苦味刺激により味細胞から CCK が分泌され、味神経に発現する CCK 受容体を介し味神経線維を活性化すると考えられる。このように、CCK は味細胞から味神経への苦味情報の伝達に關与する可能性が示唆される。

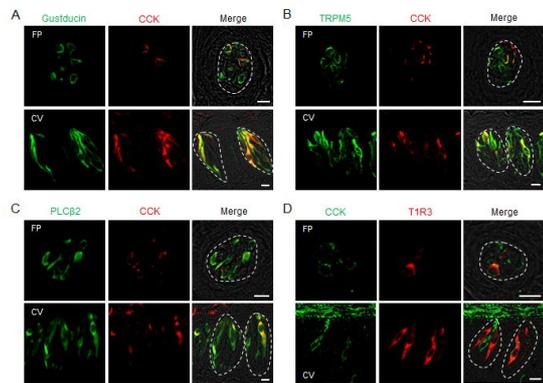


図5 . 味蕾内での CCK と味細胞マーカー分子との共発現 . A. gustducin と CCK の共発現 . B. TRPM5 と CCK の共発現 . C. PLCβ2 と CCK の共発現 . D. T1R3 と CCK の共発現 .

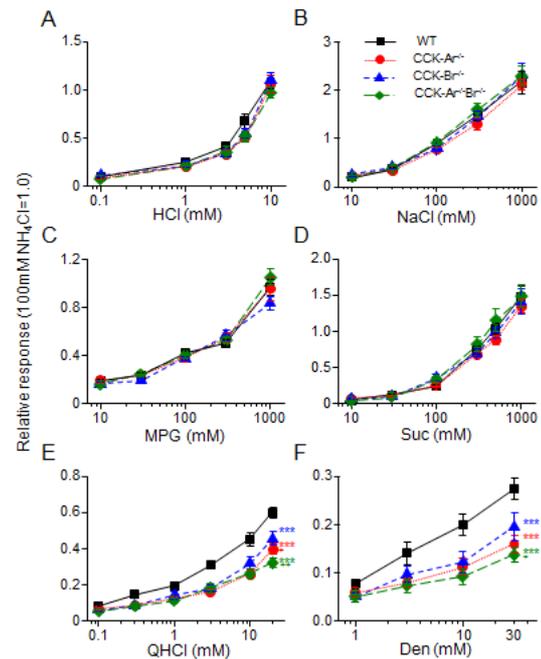


図6 . 各種味溶液に対する野生型、CCK-Ar 欠損、CCK-Br 欠損、CCK-Ar/Br 欠損マウスの鼓索神経応答 . A. HCl, B. NaCl, C. グルタミン酸カリウム, D. ショ糖, E. キニーネ、F. デナトニウムに対する応答 .

## 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 11 件)

1. Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Yoshida R, Ninomiya Y. Leptin suppresses sweet taste responses of enteroendocrine STC-1 cells. *Neuroscience*. 332: 76-87, 2016
2. Sanematsu K, Kitagawa M, Yoshida R, Nirasawa S, Shigemura N, Ninomiya Y. Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. *Sci Rep*, 6: 22807, 2016
3. Yoshida R, Ninomiya Y. Taste information derived from T1R-expressing taste cells in mice. *Biochem J*, 473: 525-536, 2016
4. Yoshida R, Noguchi K, Shigemura N, Jyotaki M, Takahashi I, Margolskee RF, Ninomiya Y. Leptin Suppresses Mouse Taste Cell Responses to Sweet Compounds. *Diabetes*, 64: 3751-62, 2015
5. Niki M, Jyotaki M, Yoshida R, Yasumatsu K, Shigemura N, DiPatrizio NV, Piomelli D, Ninomiya Y. Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *J Physiol*, 593: 2527-45, 2015
6. Takai S, Yasumatsu K, Inoue M, Iwata S, Yoshida R, Shigemura N, Yanagawa Y, Drucker DJ, Margolskee RF, Ninomiya Y. Glucagon-like peptide-1 is specifically involved in sweet taste transmission. *FASEB J*, 29: 2268-80, 2015
7. Yasumatsu K, Manabe T, Yoshida R, Iwatsuki K, Uneyama H, Takahashi I, Ninomiya Y. Involvement of multiple taste receptors in umami taste: analysis of gustatory nerve responses in metabotropic glutamate receptor 4 knockout mice. *J Physiol*, 593: 1021-34, 2015
8. Sanematsu K, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y. Structure, function, and signaling of taste G-protein-coupled receptors. *Curr Pharm Biotechnol*, 15: 951-61, 2014
9. Iwata S, Yoshida R, Ninomiya Y. Taste transductions in taste receptor cells: basic tastes and moreover. *Curr Pharm Des*, 20: 2684-92, 2014
10. 岩田周介, 吉田竜介, 重村憲徳, ニノ宮裕三. アンギオテンシン II によるエンドカンナビノイド受容体を介した甘味の増強. *日本味と匂学会誌*, 21: 259-262, 2014
11. 高井信吾, 安松啓子, 吉田竜介, 重村憲徳, ニノ宮裕三. 味神経に発現する GLP-1 レセプターとその役割. *日本味と匂学会誌*, 21: 253-256, 2014

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Yoshida R, Nakano-Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. Gustatory

responses of taste receptor cells expressing fluorescent proteins in transgenic mice. 17th ISOT, Yokohama, Japan, 2016

2. Yoshida R, Nakano-Yasumatsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. Detection of bitter compounds in mouse fungiform and circumvallate taste cells. Neuro2016, Yokohama, Japan, 2016

3. 吉田竜介. 味覚調節系と肥満によるその変化. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌, 2016

4. Yoshida R, Takai S, Sanematsu K, Margolskee RF, Shigemura N, Ninomiya Y. Responsiveness of gustducin-expressing taste cells to multiple bitter compounds. ISMNTOP2016Fall, Fukuoka, Japan, 2016

5. 吉田竜介, 重村憲徳, ニノ宮裕三. レプチンによる甘味抑制機構. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌, 2016

6. 吉田竜介, 重村憲徳, ニノ宮裕三. レプチンによる甘味応答抑制のメカニズム. 日本味と匂学会第 49 回大会, 岐阜, 2015

7. 吉田竜介, ニノ宮裕三. マウス苦味受容体細胞の応答特性. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 新潟, 2015

8. 吉田竜介, 野口健志, 上瀧将史, Margolskee RF, 重村憲徳, ニノ宮裕三. レプチンによる甘味抑制はレプチン受容体 Ob-Rb とメタボリックセンサー-K<sub>ATP</sub> チャンネルを介して生じる. 第 92 回日本生理学会大会, 神戸, 2015

9. 吉田竜介, 野口健志, 上瀧将史, 重村憲徳, Margolskee RF, ニノ宮裕三. レプチンの甘味応答抑制効果は ATP 感受性 K<sup>+</sup>チャンネルの活性化により生じる. 日本味と匂学会第 48 回大会, 静岡, 2014

10. 吉田竜介, 野口健志, 重村憲徳, ニノ宮裕三. レプチンによる甘味応答抑制には K<sub>ATP</sub> チャンネルが関与する. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡, 2014

11. 吉田竜介, 進美沙, Margolskee RF, ニノ宮裕三. マウス茸状乳頭の苦味感受性細胞の応答特性. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014

12. Yoshida R, Ninomiya Y. Bitter taste responses in mouse fungiform taste receptor cells. AChemS2014, Bonita Springs, FL, USA, 2014

〔図書〕(計 2 件)

1. Takai S, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y. Peptide Signaling in Taste Transduction. In Zufall F, Munger SD, eds. *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*. Academic Press, 2016

2. 吉田竜介. マウス味細胞応答記録法. 日本比較生理成果学会編. 研究者が教える動物実験・第 1 巻・感覚. 共立出版, 2015

〔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

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>

## 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・准教授  
研究者番号：60380705