

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670897

研究課題名(和文)舌味蕾の味覚受容体遺伝子解析による新たな味覚診断法の確立と臨床応用

研究課題名(英文)Expression of umami-taste-related genes in the tongue.

研究代表者

笹野 高嗣 (Sasano, Takashi)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：10125560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：舌乳頭の擦過試料を用いた客観的味覚検査法の確立を目的として、ヒトの舌から採取した試料を対象として、うま味受容体候補であるT1R1、T1R3、mGluR1およびmGluR4の遺伝子発現について調べた。

その結果、舌乳頭擦過試料に味細胞が含まれること、および、リアルタイムPCR法を用いたシーケンス解析によりヒト由来の  $\beta$ -actin、Gustducinおよびうま味受容体遺伝子が特異的に増幅されることが示された。以上の結果より、舌乳頭擦過試料のうま味受容体遺伝子発現解析により客観的味覚検査法の臨床応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Expression of taste-related genes in the tongue was analysed to develop a technique for genetic diagnosis of umami taste disorders. Gustducin-positive cells were observed in the samples, indicating the presence of taste cells. Gene expression of  $\beta$ -actin, GNAT3, T1R1 and T1R3 was detected in all seven samples tested, while that of mGluR1 was detected in four samples. Sequence analysis by NCBI Blast showed that each polymerase chain reaction product had a 99% rate of identification of its target sequence. Stimulation of the tongue with monosodium glutamate significantly upregulated the gene expression levels of T1R1 and T1R3, indicating that this method can detect alterations in umami-related gene expression. Thus, evaluation of the expression of the umami receptor genes, T1R1 and T1R3, in the tongue may be clinically useful for objective genetic diagnosis of umami taste disorders.

研究分野：口腔診断学

キーワード：味覚検査 うま味受容体 遺伝子発現 客観的味覚診断

## 1. 研究開始当初の背景

味覚障害は、最近マスコミ等で取り上げられるようになり国民の関心も高まってきているが、未だに「検査・診断・治療」の対象となる疾患として広く認識されているとは言いがたい。実際、医療機関として味覚外来を開設している施設は国内医療機関の 2.1% (日本口腔咽喉頭学会調べ:1990年)にすぎず、半数以上の施設では味覚検査が実施されていない。この理由として、味覚障害に対する体系化された診断・治療法がないことが第一にあげられている。一方、我が国における味覚障害者は、高齢者においても若年者においても確実に増加している。最近の我々の調査では、65歳~94歳の高齢者の約37%に、18歳~31歳の若年者の約25%に味覚障害が認められている (Sato H, Sasano T et al: *Journal of Health Science*, 2009)。味覚障害は単に口腔感覚の低下を意味するのではなく、食欲不振や栄養バランスの低下など全身の健康および QOL と深く関わることから、その診断と治療法の確立は急務とされている。

舌の茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭には、口腔内の全味蕾の約 2/3 が存在している。従って、味覚受容体の異常を評価するためには、上記乳頭をターゲットとして味細胞を採取する方法が考えられる。近年、葉状乳頭の擦過試料を用いた苦味受容体の遺伝子発現解析法が報告された。しかしながら、この報告では、擦過試料中に味細胞が含まれているか否かの検証はなされておらず、口腔細菌由来の mRNA の混入による影響についても検討していないなど、その由来については問題点が多い。よって、うま味に関する客観的評価法を開発するためには、本擦過法で得られた試料にヒト味細胞が含まれること、さらに、得られた PCR 産物がターゲットとした遺伝子であることを確認することが必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

舌乳頭の擦過試料に味細胞が存在することを味細胞に特異的に発現している Gustducin をマーカーとして免疫細胞化学染色法により検討し、次に、House Keeping Gene である  $\beta$ -actin、上記 Gustducin およびうま味受容体遺伝子 (T1R1、T1R3、mGluR1 および

mGluR4) の特異的プライマーを選定することにより擦過試料のリアルタイム PCR 解析を行うこととした。また、増幅した PCR 産物のシーケンス解析を行い、ターゲット遺伝子の増幅について確認することを本課題の主たる目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 舌乳頭擦過による試料採取および cDNA の作製

擦過部位は、味蕾が多量に存在する舌後方側縁部の葉状乳頭領域とし、1.5ml プラスティックチューブを用い、被験者が痛みを感じない程度の力で、非観血的に擦過した。ただちに擦過試料をチューブごと液体窒素に投入し瞬時に凍結した。9 試料を免疫細胞化学染色用の 2 試料とリアルタイム PCR 解析用の 7 試料とに分け、使用時まで -80 の超低温槽内に保存した。

### 2) 免疫細胞化学染色による味細胞の確認

免疫細胞化学染色用試料に対し、99%エタノールにより 30 分間固定を行った。10mM リン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄後、遠心分離し、上澄み液を除去した後、ティッシュテック材 (Sakura fine tek, CA, USA) に包埋・凍結した。厚さ 30  $\mu$ m の薄切切片を作製し、3%  $H_2O_2$ -MeOH で 45 分間、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング処理を行った。10mM PBS-0.4% TritonX-100 による洗浄後、0.4% PBS-T を用いて 15 分間室温にて膜透過性亢進処理を行った。0.4% PBS-T 洗浄後、0.5% スキムミルク-5% NGS-10mMPBS-T によりブロッキングを 1 時間行った。0.4% PBS-T 洗浄後、ウサギ由来抗ヒト Gustducin 抗体 (SC-28586 dilution of 1:1000 Santa Cruz, CA, USA) による一次抗体反応を 4 で一晩 (16 時間) 反応させた。0.4% PBS-T による洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ抗体 (BX1000, dilution of 1:1000, Vector, CA, USA) で二次抗体反応を 1 時間行った。0.4% PBS-T による洗浄後、Vectastain ABC (Vector, CA, USA) を用いて反応感度を増幅し、洗浄後ジアミノベンジジン (DAB) による発色反応を行った。蒸留水 (DW) による洗浄後、対比染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。

また、抗ヒト Gustducin 抗体を添加しない試料をネガティブコントロールとした。

3) 特異的プライマーの設計およびその増幅 PCR 産物のシーケンス解析

3-1) total RNA 抽出と cDNA の作製

total RNA を抽出するために、試料に Glass beads (Cell Disruption Media, Scientific Industries, NY) を加えた後、ホモジナイズ (MM300, Retsch, Germany) を行った。その後、High Pure Tissue Kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を用い、total RNA を抽出し、逆転写反応 (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Indianapolis, IN) により cDNA を作製した。

3-2) 特異的プライマーの選定とリアルタイム PCR 解析

特異的プライマーを選定するために、被験者 7 名の増幅した PCR 産物が特異的な同一の融解温度 ( $T_m$ ) を持つか否かについて、リアルタイム PCR 融解曲線解析により検討した。なお、 $\beta$ -actin、Gustducin、T1R1、T1R3、mGluR1 および mGluR4 のプライマーは、設計ソフトである LASERGENE (DNASTAR, WI, USA) を用いて作製した。その後、cDNA をテンプレートとして、リアルタイム PCR 解析 (CFX96, Bio-Rad, CA, USA) を行った。PCR 反応は SSofast™EvaGreenSupermix (Bio-Rad, CA, USA) を用い、酵素活性化/熱変性 (95 : 30 秒) 熱変性 (95 : 5 秒) およびアニーリング/伸長反応 (60 : 5 秒) の 45cycle の条件で行った。

3-3) 増幅 PCR 産物のシーケンス解析

cDNA から増幅した各遺伝子の PCR 産物から各 1 サンプルを抽出し、臭化エチジウム (Ethidium bromide solution, Fluka SIGMA, MO, USA) 含有 3% アガロースゲル (Wako Chemical Osaka, Japan) を用いて電気泳動後、エレクトロニック UV トランスイルミネーター (Multi Image™Light Cabinet; Alpha Innotech, CA, USA) にてバンドを確認した。アガロースゲルからバンドを切り抜き、PCR 産物の精製 (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Duesseldorf, Germany) を行った。精製した PCR 産物のシーケンシングを北海道システムサイエンス社に委託し、その結果をもとに、NCBI Blast を利用したシーケンス解析を行った。

4. 研究成果

舌乳頭擦過試料に味細胞が含まれること (図 1) および、リアルタイム PCR 法を用いたシーケンス解析によりヒト由来の  $\beta$ -actin、Gustducin およびうま味受容体遺伝子が特異的に増幅されること (図 2) が示された。この結果より、舌乳頭擦過試料のうま味受容体遺伝子発現解析により客観的味覚検査法の臨床応用の可能性が示唆された。

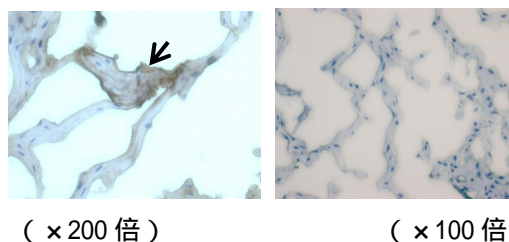


図 1 抗ヒト Gustducin 抗体による舌乳頭擦過試料の免疫組織像

(左) 抗ヒト Gustducin 抗体を添加した切片では、抗ヒト Gustducin 抗体陽性細胞が認められた(矢印)。(右) 抗ヒト Gustducin 抗体を添加しなかった切片 (ネガティブコントロール) では、DAB による非特異的な発色細胞は認めなかった。

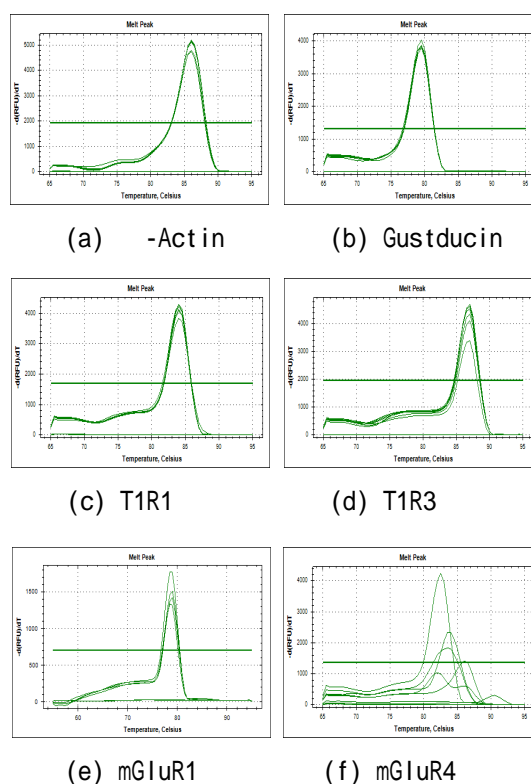


図 2 リアルタイム PCR 法による融解曲線 (Melting Peak) 解析

(a) -actin、(b)Gustducin、(c)T1R1、(d)T1R3、(e)mGluR1 では、全てのサンプルで単一の融解温度(変曲点)を示した。一方、(f)mGluR4 では、非特異的の反応物の増幅を認めた。

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2件)

Shoji N, Satoh-Kuriwada S, Sasano T. Clinical Significance of Umami Taste and Umami-Related Gene Expression Analysis for the Objective Assessment of Umami Taste Loss. *Curr Pharm Des.* (査読有) 22(15):2238-2244, 2016.

Shoji N, Kaneta N, Satoh-Kuriwada S, Tsuchiya M, Hashimoto N, Uneyama H, Kawai M, Sasano T. Expression of umami-taste-related genes in the tongue: a pilot study for genetic taste diagnosis. *Oral Dis.* (査読有) 21(6):801-806. doi: 10.1111/odi.12350. Epub 2015.

[学会発表](計4件)

Takashi Sasano. Significance of taste and olfaction in healthy life: The key role of umami taste in oral and overall health. 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfactory and Taste、2016年6月7日、パシフィコ横浜(横浜)

Noriaki Shoji, Shizuko Satoh-Kuriwada, Masahiro Tsuchiya, Hisayuki Uneyama, Misako Kawai, Takashi Sasano. Expression of umami taste-related genes in the tongue: A pilot study for genetic taste diagnosis. The 17<sup>th</sup> International Symposium on Olfaction and Taste、2016年6月6日、パシフィコ横浜(横浜)

Shoji N, Satoh-Kuriwada S, Sasano T. The important role of umami taste in oral and overall health and a possible genetic diagnosis for umami taste disorders. Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organization、

2015年9月3日、イスタンブール(トルコ)

庄司憲明、金田直人、佐藤しづ子、土谷昌広、橋本直也、笹野高嗣.

味覚受容体遺伝子発現を指標とした客観的「うま味」検査法の開発. 第25回日本口腔内科学会学術大会、2015年9月1日、大阪国際会議場(大阪)

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹野 高嗣 (Sasano, Takashi)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 10125560

(2)研究分担者

庄司 憲明 (Shoji, Noriaki)  
東北大学・病院・講師  
研究者番号: 70250800

飯久保 正弘 (Ikubo, Masahiro)  
東北大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号: 80302157

佐藤 しづ子 (Satoh, Shizuko)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 60225274

菅原 俊二 (Sugawara, Shunji)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 10121639

市川 博之 (Ichikawa, Hiroyuki)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 20193435