

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07053

研究課題名(和文) 味蕾細胞と味神経終末の味蕾内分布に基づく細胞ネットワークの構造的機能的解析

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of cell networks within taste buds.

研究代表者

大坪 義孝(Ohtubo, Yoshitaka)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：00380725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：味覚器である味蕾は、異なるタイプの味蕾細胞や神経終末が細胞ネットワークを形成し味情報を伝達している。私は、傍分泌に関わるイオンチャネルの電気生理学的特徴、イオンチャネルおよび神経伝達物質受容体発現の細胞型依存性、イオンチャネルや受容体を発現する細胞型の単一味蕾に含まれる割合などを明らかにした。味情報伝達におけるイオンチャネルおよび神経伝達物質受容体の役割について議論する。

研究成果の概要(英文)：Taste buds consist of the heterogeneous population of taste bud cells with different cell types that may make cell-to-cell communications within taste buds. I show that the electrophysiological properties of ion channels for paracrine signaling, the cell-type dependent expression of the channel and neurotransmitter receptors, and the ratio of cell types expressing the channel and receptors in a single taste bud. The discussion is made on the role of these channels and receptors in the transmission of taste responses.

研究分野：感覚生理学

キーワード：傍分泌 ヘミチャネル アセチルコリン受容体 ATP受容体 電位依存性Kチャネル パッチクランプ法
細胞間情報伝達 味神経線維

1. 研究開始当初の背景

味を感じる小器官(味蕾)は、口腔内に分布し、味蕾細胞と味神経終末が集まることで機能する。味蕾細胞は、微細構造や免疫性から、 型に分類され、近年、味蕾細胞レベルの機能が明らかになってきた。 型は、甘味、うま味、苦味物質受容体をもつが、味神経と化学シナプスは形成せず、神経伝達物質として ATP を周囲にまき散らす(傍分泌する)。一方、 型は味神経と化学シナプス持つ唯一の細胞で、酸味物質を受容する。 型は支持細胞とされてきたが、塩味応答を生成する可能性がある。 型はこれらの前駆細胞である。さらに、味蕾内には、顔面神経、三叉神経などの求心性、遠心性終末が存在する。このように味蕾は、多種多様な細胞が集団を形成することで機能している。

味蕾の細胞集団において、味蕾細胞ネットワークに関する知見が、近年いくつか報告されている。我々も、傍分泌による 型細胞から 細胞型への味情報伝達の可能性や味蕾細胞のギャップ結合、神経伝達物質受容体を発見し、神経終末を含めた細胞ネットワークが味蕾としての味応答を生成することを示唆している。しかし、各細胞型および神経終末の味蕾内配置と細胞ネットワークの関係については、不明な点が多い。例えば、 型と 型細胞が空間的に離れた場所に存在するならば、 型 - 型間の情報伝達は困難となる。また、甘味受容体を持つ 型細胞と苦味受容体を持つ 型細胞が同一味蕾に発現すると、これらの細胞から傍分泌された ATP が味蕾内を自由に拡散し、同じ味神経終末にそれぞれの味応答を送ることになる。従って、味質を識別するためには、ATP 拡散の制御が必要となる。 型細胞の細胞膜には、ATP 分解酵素が発現しているため、 型、 型細胞および味神経終末の適切な配置があるに違いない。本研究では、味蕾細胞や神経終末の味蕾内配置(構造)と細胞ネットワークにおける味応答生成機構(機能)の関係を明らかにする。

2. 研究の目的

感覚細胞からの感覚情報は、通常、脳の特定位へ送られるため、特定の神経終末と感覚細胞間の化学シナプスを介して伝搬される。しかし、味を感じる感覚細胞(味蕾細胞)の多くは、味神経終末と化学シナプスを形成せず、むしろ神経伝達物質を周囲にまき散らす方法(傍分泌)によって、味情報を伝搬する。従って、傍分泌で放出された神経伝達物質は、本来の標的神経細胞に加え、近隣の細胞や神経終末までも刺激することになる。本研究では、味蕾という細胞集団の構造と機能に注目し、味蕾内における味蕾細胞および神経終末の空間配置と細胞ネットワー

クを用いた味応答の生成機構の関係を解明することを目的とした。上述のように、細胞型によって、生理学的役割は異なるので、本計画では、常に、味蕾細胞の構造や機能と細胞型とを関連付け、以下の点を明らかにした。

(1) 舌後部味蕾を構成する細胞の細胞型比率および味神経終末の味蕾内配置パターン

舌後部中央および舌後部両側に分布する味蕾について、単一味蕾に含まれる細胞数および味覚受容に重要な役割を果たす 型、 型細胞数を定量的に調べ、味蕾を構成する細胞型について明らかにした。また、味神経終末に発現する ATP 受容体サブタイプを免疫染色し、味蕾内での配置パターンを明らかにした。

(2) ATP 放出チャネルの薬理的性質

味蕾細胞の傍分泌に関わるイオンチャネルは電位依存性および細胞外 Ca 依存性があり、複数のタイプが関与しているとの報告がある。生理学的実験によって、ATP 放出チャネルの薬理的性質を明らかにした。

(3) 細胞ネットワークに關与するアセチルコリン (ACh) 受容体発現の細胞型依存性

味蕾細胞は ACh 受容体を発現し、ACh 刺激によって細胞内 Ca 濃度上昇を引き起こすことを我々は報告している。しかし、ACh 受容体を発現する細胞の型や細胞内 Ca 濃度上昇の分子機構については不明だったので、これらの点について明らかにした。

(4) 興奮性に關与する A 型 K チャネル電流

味蕾細胞は各種電位依存性 K チャネルを発現する。この中で、活動電位の生成や発火周波数の調節に關与する A 型電流について電気生理学的特徴を明らかにした。また、遺伝子サブタイプの同定および電流発現の細胞型依存性を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 舌後部味蕾を構成する細胞の細胞型比率および味神経終末の味蕾内配置パターン

単一味蕾を構成する細胞の細胞数および細胞型の同定は、免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。具体的には、舌後部中央に存在する有郭乳頭および舌後部両側に分布する葉状乳頭を酵素処理で剥離し(剥離舌上皮標本)、固定後、 型および 型に特異的な抗体と核染色の三重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で、味孔から味蕾基底部分まで連続光学切片を撮影した。単一味蕾に含まれる 型、 型細胞数、味蕾の大きさなどを定量化し、舌前方に分布する茸状乳頭味蕾

および軟口蓋味蕾と比較した。

味神経終末には、ATP 受容体である P2X2 および P2X3 受容体が発現している。P2X2 受容体および 型、 型細胞マーカーの多重免疫染色をおこない、超高解像蛍光顕微鏡で抗体の分布を可視化した。剥離舌上皮標本は味蕾構造が保存されているので、茸状乳頭における味神経終末の味蕾内の配置を明らかにすることができた。

(2) ATP 放出チャネルの薬理的性質

生理学実験として、電気生理学的測定（ホールセルパッチクランプ法）と色素の取り込み実験のなる二つの異方法で、ATP 放出チャネルの薬理的性質を調べた。ホールセルパッチクランプ法には、電極内液に Cs⁺イオンを含む溶液およびマーカー物質（バイオサイチン）を充填することで、電位依存性 K チャネルの抑制および測定した細胞型の同定を行った。具体的には、剥離舌上皮に含まれる茸状乳頭味蕾細胞にパッチクランプ法を適用し、各種ブロッカーの投与および細胞外 Ca 濃度を変化させて、電位依存性電流を測定し、投与前後で比較した。電気測定終了後、その標本に対し、免疫染色法を適用した。型および 型細胞に特異的な抗体と、バイオサイチン-アビジン反応を利用した三重染色法を用い、共焦点レーザー顕微鏡で測定した細胞の細胞型を同定した。色素の取り込み実験は、剥離舌上皮の茸状乳頭味蕾に対し、細胞外にバイオサイチン存在下で、高カリウム刺激および低 Ca 刺激をおこなった。刺激によって細胞外バイオサイチンは細胞内へ取り込まれるので、各種ブロッカーの有無でバイオサイチンを含む細胞数を比較した。細胞数の定量化および取り込んだ細胞型の同定は、上述の免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(3) 細胞ネットワークに關与する ACh 受容体発現の細胞型依存性

茸状乳頭味蕾を Ca 感受性色素で染色し、ACh に応答する細胞を Ca イメージング法で調べた。各種アゴニストおよびアンタゴニスト存在下で、Ca 応答を測定し、細胞内情報伝達経路を明らかにした。また、細胞型の同定には、Ca 応答測定後、高カリウム刺激で蛍光色素を細胞内に取り込ませてから標本を固定し、同一標本に対し、前述の免疫染色法を適用することをおこなった。細胞内情報伝達経路に關与する分子の同定は、その分子に特異的なプライマーを設計し、Reverse Transcription (RT)-PCR 法を用いておこなった。

(4) 興奮性に關与する A 型 K チャネル電流

電位依存性 K チャネルの中で、A 型電流の生成に関わっている K チャネルについて電気生理学的特徴、発現する遺伝子サブタイプを調べた。A 型 K 電流は、ホールセルパッチクランプ法で測定し、各種ブロッカー存在下で、K 電流の薬理的性質および電気生理学的特徴を明らかにした。細胞型の同定は、前述のようにバイオサイチンを電極内液に導入し、免疫染色法にて行った。遺伝子サブタイプについては、A 型電流を形成する K チャネルに特異的なプライマーを設計し、RT-PCR で行った。具体的には、剥離舌上皮標本は、味蕾以外の細胞も含むため、2本のガラスピペットを用いて、茸状乳頭味蕾を採取し、一定量の味蕾を集めてから、total RNA の抽出、DNase 処理後、RT-PCR を行った。増幅産物の確認は、アガロースゲル電気泳動でおこなった。

4. 研究成果

(1) 舌後部味蕾を構成する細胞の細胞型比率および味神経終末の味蕾内配置パターン

剥離舌上皮に含まれる有郭乳頭および葉状乳頭味蕾から、味蕾構造を保持した状態で、味蕾全体から連続光学切片画像を取得することに成功した。味蕾の形態および単一味蕾に含まれる 型、 型細胞数を明らかにし、茸状乳頭味蕾と比較した。その結果、単一味蕾に含まれる各細胞型の割合は、味蕾の存在部位によって異なることを明らかにした。型細胞のマーカー分子は数種類存在する。これら 型細胞マーカーの共発現率も部位によって異なることも明らかにした。また、味蕾の大きさが部位によって異なることも解明した。味蕾で生成される味情報は、味神経を介して脳へ送られる。味質に対する味神経の応答特性は、舌の部位ごとに異なるとの報告がある。舌の部位ごとに味蕾を構成する細胞型の比率が異なることは、味神経応答の応答特性に影響を与えている可能性を示唆した。

味蕾構造が保存されている茸状乳頭味蕾標本に対して、P2X2 および SNAP25 の二重免疫染色法を適用し、共焦点連続画像を撮影して、それらの味蕾内分布を調べた。P2X2 免疫陽性神経線維の大部分は、SNAP25 に対して免疫陽性を示すことを明らかにした。SNAP25 は 型細胞の細胞型マーカー分子としても使用される。SNAP25 免疫陽性 型細胞の近くに存在する神経線維が P2X2 免疫陽性を示すことから、SNAP25 免疫陽性神経線維終末から 型細胞へ放出される伝達物質に ATP が含まれている可能性を示唆した。後述するが、ACh 受容体は 型細胞に特異的に発現している。ACh と ATP が味神経から

放出され、型細胞の味情報を修飾している可能性がある。このとき、味神経に発現する P2X2 がオートレセプターとして機能し、ACh の放出量の調節に関与しているのかもしれない。味蕾における ACh の役割を明らかにするためには、更なる研究が必要である。

(2) ATP 放出チャネルの薬理的性質

パッチクランプ法および色素の取り込み実験によって、ATP 放出チャネルの薬理的性質を明らかにした。両方の実験手技で同様の結果が得られ、味蕾細胞に発現するこのイオンチャネルの性質は、イオンチャネルを強制発現させた実験系で得られたイオンチャネルの薬理的性質と異なることを明らかにした。また、高カリウム刺激および脱分極によって開口するチャネルは、ほぼ全ての型細胞に存在するのに対し、細胞外 Ca 濃度低下によって開口するチャネルは型細胞の一部に存在することを明らかにした。

(3) 細胞ネットワークに関与する ACh 受容体発現の細胞型依存性

Ca 感受性色素で染色した味蕾細胞の基底膜側に ACh を与えると、味蕾細胞は細胞内 Ca 濃度上昇を引き起こした。過去の研究より、ムスカリン性受容体である M3 受容体が味蕾に発現していることを我々は報告しているが、発現している細胞型については、不明だった。今回、ACh 刺激によって Ca 応答した細胞の細胞型を同定する新規同定法を開発し、細胞型の同定に成功した。ACh 応答細胞の全てが型細胞であることを明らかにした。また、ACh 応答の分子機構については、ACh 応答が PLC 阻害剤で抑制されたことから、PCL 経路を介していることを明らかにした。型細胞には、PLC 経路に関わる分子として、PLC 2 および IP₃ 受容体 type3 が発現していない。味蕾には PLC 3 や IP₃ 受容体 type1 の遺伝子が発現していることを明らかにし、これらの分子が細胞内 Ca 濃度変動に関与していると考えた。ACh がどこから放出されるのか、味情報伝達における ACh の生理的役割など、まだ不明な点もあり、追加の研究が必要である。

(4) 興奮性に関与する A 型 K チャネル電流

早期不活性化型 (A 型) K チャネルについて、発現する遺伝子サブタイプおよびチャネルの電気生理学的特徴を明らかにした。A 型 K チャネル電流を形成するイオンチャネルは、7 種類の遺伝子がある。これら遺伝子のうち、味蕾には、複数種類が発現していた。定量的な解析により主要なサブタイプを同定することができた。また、A 電流は特定の細胞型に発現すること、活性化電位は、単一指数関

数で良く近似でき、不活性化電位および不活性化過程からの回復過程は、二重指数関数で良く近似できること、A 電流の不活性化過程を修飾するリン酸化酵素の活性化剤は、不活性化過程の電流に大きな影響を与えなかったこと、などを明らかにした。味蕾には多種多様な神経伝達物質受容体が細胞型依存的に発現している。リン酸化酵素の活性化剤の効果は明確ではなかったが、味蕾における細胞ネットワークは、細胞型依存的に発現する A 型 K チャネルの電気生理学的性質を修飾し、味神経へ送られる味情報を修飾しているのかもしれない。

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)

大坪義孝, マウス味蕾細胞に発現する電位依存性チャネルおよび神経伝達物質受容体, 日本味と匂学会誌 25 巻 1 号, 25-34, 2018, 査読無
Mori Y, Eguchi K, Yoshii K, Ohtubo Y, Selective expression of muscarinic acetylcholine receptor subtype M3 by mouse type III taste bud cells. Pflugers Archiv 468(11), 2053-2059, 2016, 査読有

[学会発表](計 9 件)

Ohtubo Y, Voltage-gated channels and neurotransmitter receptors in mouse taste bud cells. The 51th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell, Program and Abstracts, p 64, 研究奨励賞, September 25-27, Kobe, Japan, 2017
Moribayashi T, Ohtubo Y, Electrophysiological properties of A-type potassium currents in mouse fungiform taste bud cells. The 51th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell, Program and Abstracts, p 96,

P-023, September 25-27, Kobe, Japan, 2017

Tateno K, Shiku O, Ohtubo Y, Counting algorithm for sequential optical images of immunoreactive mouse taste-bud cells. 3rd International Conference on Computational Methods in Engineering and Health Sciences (ICCMHE2016), A-4 14, Kitakyushu, Japan, 2016

松永絵理香、大坪義孝, マウス舌部位における味情報伝達に関する遺伝子発現の定量的解析, 第 67 回西日本生理学会 予稿集, p19, レインボー桜島, 2016

Ohtubo Y, Takashima M, Electrophysiological study on ATP-permeable voltage-gated ion channels in type II cells of mouse taste bud cells. 10th Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Programme book, p 128, D001, July 2-6, Copenhagen, Denmark, 2016

Ogata T, Ohtubo Y, Numerical studies on the expression of cell-type marker proteins in mouse foliate and circumvallate taste buds. 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), Program and Abstracts, p 129, P2-097, June 5-9, Yokohama, Japan, 2016

Iwamoto M, Ohtubo Y, Quantitative and pharmacological analyses of biocytin-labeled cell numbers in single mouse taste buds. The 49th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell, Program and Abstracts, p 78, P-019, September 24-26, Gifu, Japan, 2015

Ogata T, Ohtubo Y, Numerical analyses on the expression of cell type marker proteins in mouse foliate taste buds. The 49th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell, Program and Abstracts, p 77, P-018, September 24-26, Gifu, Japan, 2015

Takashima M, Ohtubo Y, Effects of hemi-channel blockers to Cs-insensitive outward currents on mouse taste bud cells. The 49th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell, Program and Abstracts, p 77, P-017, September 24-26, Gifu, Japan, 2015

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.brain.kyutech.ac.jp/~otsubo/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 義孝 (OHTUBO, Yoshitaka)
九州工業大学・大学院生命体工学研究科・
准教授

研究者番号 : 00380725

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()