

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07429

研究課題名(和文) 味細胞受容から味神経への味情報伝達経路の構築とATPの役割に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the construction of taste transmission pathway from taste receptor cells to taste nerves and the role of ATP

研究代表者

林 由佳子 (Hayashi, Yukako)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60212156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：味細胞のうち、甘味・うま味・苦味を受容するⅡ型細胞は味神経とシナプス形成をせず、酸味を受容するⅢ型細胞は味神経とシナプスを形成している。Ⅲ型細胞の味情報は、セロトニンを介して伝達される。Ⅲ型細胞は、「ATP受容型Ⅲ型細胞」と「酸味受容型Ⅲ型細胞」2種類に分化していると先行研究で明らかにしたのでこれらのⅢ型細胞が、それぞれ味神経とシナプス形成をして情報伝達を行っているかを調べた。その結果、「酸味受容型」Ⅲ型細胞はセロトニンを有しておらず、「ATP受容型」Ⅲ型細胞はセロトニンを有していることが明らかとなった。すなわち、「酸味受容型」Ⅲ型細胞が味神経とシナプス形成をしていないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Type II taste receptive cells that receive sweet, umami and bitterness do not form synapse with taste nerves, and type III taste receptive cells that accept sour taste form synapses with taste nerve. Taste information is transmitted from type III cells via serotonin. These type III cells make synapse with the taste nerve. From the result of previous studies, type III cells have been differentiated into "ATP receptor type III cell" and "sour taste receptor type III cell". To investigate whether it is communicating system are in the "sour taste receptive" type III cells. That is, it was suggested that "sour taste receptive" type III cells did not synapse with taste nerve.

研究分野：味覚生理学

キーワード：sour taste ATP synapse transduction nerve

1. 研究開始当初の背景

味を感じる器官である味蕾は、いくらかの味細胞によって構成されている。その味細胞は形態によって I~IV 型に分類される。そのうち I 型細胞と IV 型細胞はそれぞれ支持細胞、前駆細胞と考えられており、味の受容に関係しない。味の受容に主に関わるものは II 型細胞・III 型細胞であり、それぞれ甘味・うま味・苦味及び酸味を受容すると報告されている。形態的特徴として、II 型細胞は味神経とシナプスを形成しておらず、III 型細胞のみシナプスの形成が見られる。そのため、II 型細胞がどのようにして味情報を伝えていくのかまだ明らかになっていない。

II 型細胞は味神経と直接シナプスを形成し、味情報を伝達するため、SNAP25、PGP9.5、セロトニン、GAD67 および NCAM、ノリアドレナリンを発現している。また、酸味受容の役割を持ち、様々な酸味受容体を発現している。酸感受性イオンチャネルである ASIC や炭酸脱水素酵素である CAR-4、近年ではカリウムチャネルである Kir2.1 などが挙げられるが、現在の最有力候補として PKD2L1/PKD1L3 がある。また、活性化された II 型細胞はセロトニンを放出することが知られており、味神経に向けて味情報を伝達したり、III 型細胞の応答を減少させる負のフィードバックを起こしたりすることが報告されている。

現在仮説として挙げられている説は 2 つある。1 つは、II 型細胞から味情報として ATP を放出し、直接味神経へと伝達するという説である。味神経に存在する ATP 受容体 P2X2、P2X3 を KO したマウスは味を感じなくなり (12)、II 型細胞と味神経が近接した部分に P2X2 が存在することが裏付けとして報告されている。もう 1 つは、II 型細胞から放出された ATP を III 型細胞が受容し、味神経へと伝達されるという説である。II 型細胞によって放出された ATP が III 型細胞に 5-HT (セロトニン) を放出させるという報告がこの説を支持している。

我々は後者の説に着目した。後者の説の通りであるとする、II 型細胞は酸味を受容し、II 型細胞からの味情報である ATP の受容の 2 つの役割があると考えられる。そこで本研究では、受容体の存在様式と溶液に対する応答性の両面から、II 型細胞が機能的に分化しているかどうかを明らかにすることを目的に実験を行った。先行研究により、II 型細胞は、活性化された II 型細胞から放出される ATP を受容する「ATP 受容型 II 型細胞」と酸味物質を受容する「酸味受容型 II 型細胞」へと機能的に分化していることが確認された。このことから、味刺激を受容した II 型細胞が ATP を放出し、ATP を受容した III 型細胞が味神経へセロトニンを放出することが示唆された。しかしながら、新たに 2 種類に分化していると明らかとなった II 型細胞が、それぞれ味神経とシナプス形成をして情報伝達を行っている

か否かは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

II 型細胞からの情報伝達機構として、「活性化された II 型細胞が放出した ATP が味神経によって受容され、味情報が伝達される説」と「活性化された II 型細胞が放出した ATP を III 型細胞が受容し、III 型細胞が味神経に向けて神経伝達物質を放出し、味情報が伝達される説」があった。本研究室では、II 型細胞が ATP 受容体を有していることから、後者の説を解明することを目的として研究をしてきた。この説が正しければ、II 型細胞は II 型細胞からの ATP を受容する「ATP 受容」と酸味を受容する「酸味受容」の 2 つの役割があると考えた。本研究室の先行研究により、これらの 2 つの機能をそれぞれ別の II 型細胞が担うことを示し、II 型細胞は機能性の面から、「ATP 受容型 II 型細胞」と「酸味受容型 II 型細胞」に分化していることが示唆された。

II 型細胞は前述のように、II 型細胞は味神経とシナプス形成をしており、セロトニンを介して情報伝達を行っていることが知られている。しかしながら、「ATP 受容型 II 型細胞」と「酸味受容型 II 型細胞」の両方ともが、味神経とシナプス形成をしていることは未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、これら 2 種類の II 型細胞におけるセロトニンの局在を観察することで、シナプス形成の有無を確認することにより、2 種類の II 型細胞の情報伝達機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

C57BL/6J Jms SLC マウス (メス、8~14 週齢)。実験期間中は個別飼育し、水と固形飼料 (オリエンタル酵母社製 MF) を自由摂取させた。10~22 時を暗期、22~10 時を明期とし、室温 23℃、湿度 45~50% にて個別飼育装置 (LP-80CCFL-6AR 日本医化器械製作所、京都) 内で飼育した。全実験は京都大学動物実験委員会の規定に従って行った。

(2) カルシウムイメージング法

マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、舌を摘出した。これを、事前に混合 O₂/CO₂ (5%) 京都帝酸、京都) で 10~15 分間バブリング (31.5 インキュベーター下) して、pH を 7.4 に調整しておいた Free 液中で洗浄した。次に、31.5 に温めた酵素液を舌上皮下に注射器 (テルモシリジ、中口、1 mL、テルモ、東京、TELMO NEEDLE、27G×3/4、テルモ、東京) を用いて注入し、これを pH 調整後の Free 液で 10~13 分バブリングしながらインキュベーターした (31.5)。その後、実体顕微鏡下で舌上皮を筋肉層から剥離して、Free 液で洗浄後、あり液中で保存した (4)。味細胞は、プレー (FLAMING / BROWNS MICROPIPETTE PULLER MODEL P-97, SUTTER INSTRUMENT CO., California) とフォーシ (NARISHIGE, 東京)

で口径を 30~45 μm に調節した微小ガラスキャピラリー(1.5 mm O.D \times 1.17 mm I.D, HARVARD APPARATUS LTD, Massachusetts, #300062)を用いて、舌上皮の有郭乳頭から吸い取り、0.1 %コンカナバリン A(ナカライテスク, 京都, #0944694)をコーティングしたマイクロカバーガラス(松浪硝子工業, 大阪, 特注5 \times 5 mm,)に吐き出した後、定着させた。マイクロカバーガラスに定着させた単離味細胞に細胞膜透過性のカルシウム感受性蛍光色素である Fluo-8AM(3 μM)を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、遮光下で 20~25 分間負荷させ、その後なし液で洗浄、あり液で保存した。このカバーガラスをディッシュに乗せ、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス, 東京)のアルゴンレーザーを用いて、Fluo-8AM が 488 nm 励起で発する蛍光を Fluoview FV 300(オリンパス, 東京)で観察した。共焦点像は 3 秒に 1 枚の速度で撮影し、細胞内のカルシウムイオン濃度変化は相対的変動 $F/F_0 = (F - F_0) / F_0$ で算出した。ここで F_0 は静止時の蛍光強度で、最初の 30 枚の共焦点像の平均を F_0 とした。溶液を灌流させた時に F/F_0 が 20 %以上上昇した細胞を、「応答がある」と定義した(Fig 3)。励起が終わるまでなし液を灌流させ、各溶液を 30 秒間灌流させた。各溶液を灌流する間の洗浄は、細胞内カルシウムイオンレベルが再び標準化されるまでなし液を灌流させた。

(3) 免疫細胞染色法

カルシウムイメージング後のマイクロカバーガラス上の味細胞を 4% PFA で室温、1 時間で固定する。PBS で 5 分 \times 3 回洗浄した後、ブロッキング溶液で室温、1 時間でブロッキングする。続いて、一次抗体溶液で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晩で一次抗体反応をさせる。その後、PBS で 10 分 \times 3 回洗浄した後、二次抗体溶液で遮光、室温、1 時間で二次抗体反応をさせる。反応後、PBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、スライドガラス上に Fluomount を用いて包埋する。二重染色を行う場合、1 回目の二次抗体反応をして PBS 洗浄した後に、再び一次抗体反応、二次抗体反応を行い、包埋を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡のアルゴンレーザーとヘリウムネオンレーザーを用いて、Alexa Fluor 488 と Alexa Fluor 555 が発する蛍光を Fluoview FV 300 で観察した。

(4) 免疫組織染色法

マウスに 0.85 %生理食塩水で 10 倍に希釈したネブタール(大日本製薬、大阪)をおよそ 0.5 ml を腹腔内注射した。麻酔が効いた後、マウスを仰向けに寝かせて開腹開胸をし、心臓を露出させた。次に、心臓の左心室から大動脈付近に向けて、細いチューブを挿入した。右心耳に穴をあけた後、0.85 %生理食塩水 15 ml を全身に灌流し、血液と生理食塩水を入れ換えた。続いて 4 %PFA 溶液を全身に灌流し、全身のタンパク質を固定させた。固定後のマウスから舌を摘出し、有郭乳頭付

近をトリミングし 4 %PFA に浸漬し、4 $^{\circ}\text{C}$ で追加固定を行った。7~8 時間固定後、浸漬していた組織を 30 %スクロース溶液中に移し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置した。プラスチック包埋皿のクリオモルド 1号(サクラファインテックジャパン、東京)にティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド(サクラファインテックジャパン、東京)を流し込み、その中に固定後の組織を埋め込んだ。組織の入った包埋皿を液体窒素に接触させ、組織を凍結させた。凍結した組織はディープフリーザーで保存した。凍結した組織から、クライオスタットを使用して有郭乳頭近辺の組織切片を作成した。切片の厚さは 20 μm とした。作製した組織切片は 0.3% Triton-X 100 in PBS 溶液中で 1~2 時間静置した。染色は 24 穴ウェルプレート上で行った。溶液や抗体の反応は全て室温で振盪させながら行った。まず Starting Block Blocking Buffer (Thermo Scientific, Massachusetts, #37515) 100 μl を 0.3% Triton-X 100 in PBS 400 μl に溶解させたものを用いて、組織切片にブロッキング処理を行った。0.3% Triton-X 100 in PBS で 5 分程度洗浄した後、一次抗体 (goat) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反応させた。次に 0.3% Triton-X 100 in PBS で 15 分 \times 3 回洗浄した後、二次抗体(各一次抗体と同濃度, Alexa Fluor 555)を常温で 1 時間反応させた。さらに、0.3% Triton-X 100 in PBS で 5 分 \times 3 回洗浄した後、一次抗体 (rabbit) 反応、二次抗体反応(各一次抗体と同濃度, Alexa Fluor 488) 反応、洗浄を同様に繰り返した。その後、組織切片をスライドガラスに張り付けて乾燥させ、Fluoromount を垂らし、カバーガラスを乗せて包埋した。観察には共焦点レーザー顕微鏡のアルゴンレーザーとヘリウムネオンレーザーを用いて、Alexa Fluor 488 と Alexa Fluor 555 が発する蛍光を Fluoview FV 300 で観察した。

4. 研究成果

(1) 酸味と ATP への応答による 型味細胞の分類

現在セロトニンが 型味細胞から味神経に向けての神経伝達物質として考えられている。しかしながら、 型細胞がさらに「ATP 受容型 型細胞」と「味物質受容型 型細胞」の 2 種類に細分化していることが明らかとなったため、セロトニンが神経伝達物質として共通に利用されているのが明らかになっていない。そこで、味細胞に応答した細胞にセロトニンが発現していることを確認するために、ATP 溶液および酸溶液のそれぞれに応答した細胞を選別するために、カルシウムイメージング法を用いた。

ATP 応答細胞と酸応答細胞を選別した結果を Fig. 1 に示している。観察された細胞はそれぞれ、ATP 応答細胞は 22 個、酸応答細胞は 9 個観察された。また、ATP 溶液および酸溶液の両方に応答する細胞は、本研究では観察

されなかった (Fig 2)

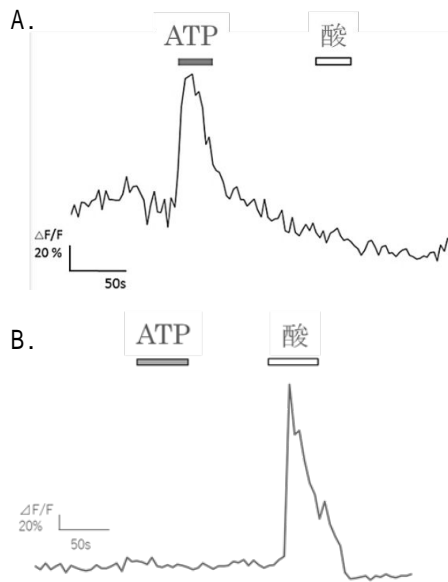


Fig.1 各溶液に対する応答味細胞数と味細胞の応答パターン。A.ATP 応答細胞、B. 酸応答細胞。ATP:10 μ M ATP, 酸:3 mM クエン酸 or pH4.0 HCl 溶液

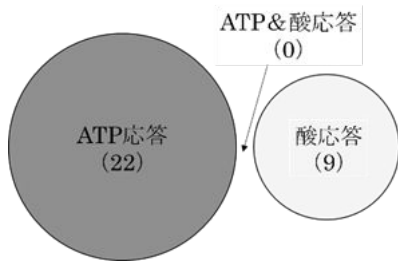


Fig. 2. 各味溶液に応答した細胞数

(2) 酸味および ATP に応答した細胞の分子学的特徴

実験 1 で選別した応答細胞におけるセロトニンの局在を観察することを目的として、細胞免疫染色法を用いた。

各種応細胞におけるセロトニンの発現
各種味溶液に応答した味細胞におけるセロトニンの発現を観察した (Table 1.)

Table 1. 各味溶液応答細胞におけるセロトニン発現細胞数とその割合

	Serotonin発現細胞の数と割合
ATP応答細胞	72.7% (16/22)
酸味応答細胞	88.9% (8/9)

ATP 応答細胞のうち 100%がセロトニンを有しており、これは ATP 応答細胞が味神経とシナプス形成をしていることを示唆しており、従来の情報伝達機構とも合致する。一方酸味

応答細胞のうち 55.6%しかセロトニンを有していなかった。これは決して高い数値でなく、酸味応答細胞がセロトニンを持っていない、すなわち味神経とシナプス形成をして、情報伝達を行っていない可能性が示唆された。

各種応答細胞における酸味受容体の発現
各種味溶液に応答した味細胞における酸味受容体 CAR-4 の発現を観察した (Table 2)

Table 2. 各味溶液応答細胞における CAR-4 発現細胞数とその割合

	CAR-4発現細胞の数と割合
ATP応答細胞	72.7% (16/22)
酸味応答細胞	88.9% (8/9)

ATP 応答細胞のうち、72.7%が酸味受容体を発現していた。これらの細胞は酸味応答を示していないため、矛盾が生じている。この原因として考えられることを考察で言及する。一方、酸味応答細胞は 88.9%と、高い割合で酸味受容体を発現していた。

(3) 免疫組織染色学的 型味細胞の特徴

カルシウムイメージングによる細胞応答の結果と免疫細胞染色の結果から、「酸味応答細胞がセロトニンを有しておらず、味神経とシナプス形成をしていない」可能性が示唆された。味蕾内の各味細胞におけるセロトニンの発現を観察することで、この可能性の妥当性を検討することを目的として、免疫組織染色法を用いた。

型味細胞における各マーカーの関係
今回使用した 型細胞マーカーは、型細胞のほぼすべて、すなわち「ATP 受容型 型細胞」と「酸味受容型 型細胞」のどちらにも発現していると考えられる NCAM。酸味受容型 型マーカーは、現在酸味受容体の最有力候補として考えられている PKD2L1、および炭酸脱水素酵素である CAR-4 である。これらの細胞マーカーの関係性を確認するために、NCAM と CAR-4、NCAM と PKD2L1、および PKD2L1 と CAR-4 の免疫組織二重染色を行った。

シナプスを有する 型味細胞と酸味応答細胞 (NCAM と CAR-4)

NCAM と CAR-4 を用いて免疫組織二重染色を行ったところ、CAR-4 で染色された味細胞は必ず NCAM を発現している一方で、NCAM で染色された味細胞であっても CAR-4 を発現していないものが観察された (Table 3)

Table 3. NCAM と CAR-4 の細胞数と両者を共発現した細胞数と共染色の割合

(NCAM+CAR-4)/NCAM	(NCAM+CAR-4)/CAR-4
148/215(68.8%)	148/148(100%)

シナプスを有する 型味細胞と酸味応答細胞 (NCAM と PKD2L1)

続いて、NCAM と PKD2L1 を用いて免疫組織二重染色を行ったところ、PKD2L1 で染色された味細胞は必ず NCAM を発現している一方で、NCAM で染色された味細胞であっても PKD2L1 を発現していないものが観察された (Fig 3)

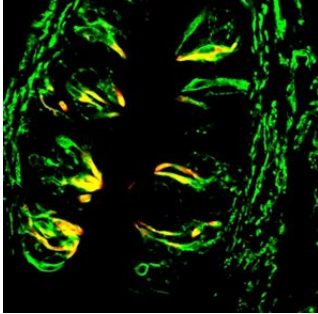


Fig 3. NCAM (緑) と PKD2L1 (赤) の免疫組織染色

酸味応答細胞 (PKD2L1 と CAR-4)

最後に、PKD2L1 と CAR-4 を用いて免疫組織二重染色を行ったところ、CAR-4 で染色された味細胞は必ず PKD2L1 を発現している一方で、PKD2L1 で染色された味細胞であっても CAR-4 を発現していないものが観察された (Fig 4)

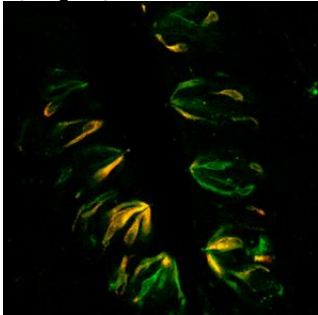


Fig 4. PKD2L1 (緑) と CAR-4 (赤) の免疫組織染色

以上の結果から、酸味受容型 型細胞は、型細胞内に局在し、さらに前任者の結果と合わせると、型細胞は「ATP 受容型 型細胞」と「酸味受容型 型細胞」に受容体の面で分化していることが示唆された。さらに、酸味受容型 型細胞マーカーにおいても、CAR-4 は、PKD2L1 発現細胞に局在することが示唆された。

セロトニンと 型細胞マーカー

本手法は、2 種の 型細胞におけるセロトニンの局在を観察することを目的としている。ここでは、型細胞においてセロトニンが発現していないこと確認することを目的として、各種 型細胞マーカーとセロトニンの共発現を観察した。

G-gustducin

セロトニンと 型細胞マーカーである G-gustducin を用いて免疫組織染色を行った。

その結果、G-gustducin を発現している細胞のうち 14.0%しかセロトニンを発現していなかった。これは他文献と比べても低い値である。これより、セロトニンは 型細胞には存在しないことが示唆された。(Fig 5, Table 4)

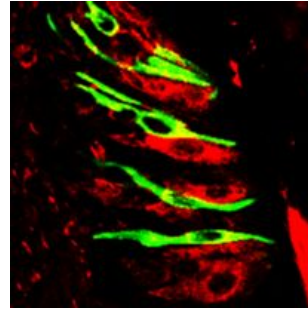


Fig 5. G-gustducin (緑) と セロトニン (赤) の免疫組織染色

Table 4. セロトニンと Ga-gustducin の発現細胞数と共発現率

(Serotonin+Ga-gustducin) /Serotonin	(Serotonin+Ga-gustducin) /Ga-gustducin
13/95(14.0%)	13/93(13.7%)

セロトニンと 型細胞マーカー

2 種の 型細胞におけるセロトニンの発現を観察するために、セロトニンと各種 型細胞マーカーの免疫組織二重染色を行った。

NCAM

セロトニンと 型細胞マーカーである NCAM を用いて免疫組織染色を行った。その結果、NCAM を発現している細胞のうち 74.7%がセロトニンを共発現していた。この値は決して高いと言える数値ではない。これより、型細胞でもセロトニンを有していない、すなわち味神経とシナプス形成をしていないものが一定割合存在することが示唆された (Fig. 6、Table 5)

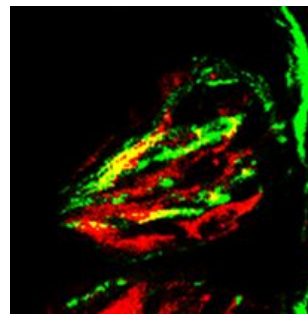


Fig 6. セロトニン (緑) と NCAM (赤) の免疫組織染色

Table 5. セロトニンと NCAM の発現細胞数と共発現率

(Serotonin+NCAM) /Serotonin	(Serotonin+NCAM) /NCAM
130/214(60.7%)	130/174(74.7%)

PKD2L1

セロトニンと「酸味受容型」細胞マーカーとして考えられる PKD2L1 を用いて免疫組織二重染色を行った。その結果、PKD2L1 を発現している細胞のうち 12.6%しかセロトニンを共発現していなかった。これより、大半の「酸味受容型 型細胞」がセロトニンを有していない、すなわち味神経とシナプス形成をしていない可能性が示唆された。(Fig. 7、Table 6)

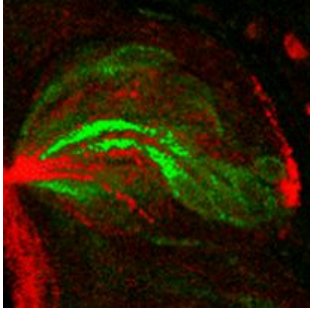


Fig 7. セロトニン(緑)と PKD2L1 (赤) の免疫組織染色

Table 6. セロトニンと PKD2L1 の発現細胞数と共発現率

(Serotonin+PKD2L1) /Serotonin	(Serotonin+PKD2L1) /PKD2L1
27/107(25.2%)	27/214(12.6%)

CAR-4

セロトニンと「酸味受容型」細胞マーカーとして考えられる CAR-4 を用いて免疫組織二重染色を行った。その結果、CAR-4 を発現している細胞のうち 16.8%しかセロトニンを共発現していなかった。これより、PKD2L1 の結果と同様、大半の「酸味受容型 型細胞」がセロトニンを有していない、すなわち味神経とシナプス形成をしていない可能性が示唆された (Fig. 8、Table 7)。

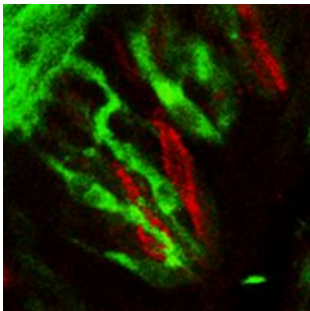


Fig 8. セロトニン(緑)と CAR-4(赤) の免疫組織染色

Table 7. セロトニンと CAR-4 の発現細胞数と共発現率

(Serotonin+CAR-4) /Serotonin	(Serotonin+CAR-4) /CAR-4
22/131(16.8%)	22/116(19.0%)

カルシウムイメージング法および免疫細胞染色の結果から酸味応答型 型細胞の全てがセロトニンを有していない結果が得られた。これより、全ての酸味応答型 型細胞が味神経とシナプス形成をしているわけではなく、味神経へ直接情報伝達を行っていない可能性が示唆された。

免疫組織染色法の結果から 型細胞にセロトニンが存在しないこと、 型細胞の全てがセロトニンを発現しているわけではないこと、そして酸味受容型 型細胞の多くがセロトニンを有していない、という結果が得られた。また、間接的に、ATP 受容型 型細胞の多くがセロトニンを有していることが示された。

これより、全ての 型細胞が味神経と直接シナプス形成をしているわけではなく、さらに酸味受容型 型細胞が味神経とシナプス形成をせず、味神経へ直接情報伝達を行っていない可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

主な発表

Norihiro Fujimoto, Hidenori Shimizu, Ryo Kitada, Yukako Hayashi(林由佳子) Immunohistochemical Localization of Serotonin in Taste Buds of Circumvallate Papillae in mice. International Symposium on Olfaction and Taste (2016.6.7) (Yokohama)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 由佳子 (HAYASHI, Yukako)
京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：60212156

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし