様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 30 年　 6 月　 9 日現在

機関番号：２７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ１１０１８

研究課題名（和文）Cre-loxPシステムを利用したGABA・セロトニンの味蕾における機能解析

研究課題名（英文）The functional study of GABA and serotonin in differentiation of taste bud cells using Cre-loxP system

研究代表者
瀬田　祐司（Seta, Yuji）

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：９０２９１６１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、味蕾細胞の分化におけるMash1の機能とGABA・セロトニンの機能検索を目的として、Mash1-CreERT2/ CAG-floxed Neo-DTAマウスにタモキシフェンを投与し、Mash1発現細胞を変性させることで味蕾の形態や細胞分化に変化が見られるかどうか検索したが、味蕾の形態には有意な変化は観察されなかった。さらにタモキシフェン投与による味細胞のマーカー発現細胞数の変化を検索した結果、Ⅲ型細胞マーカーを発現する細胞の数は、タモキシフェン投与日数が多いほど減少しているのが観察された。このことから、Mash1が味蕾においてⅢ型細胞の分化に関与していることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, to begin to understand these mechanisms, we investigated the role of Mash1-positive cells in regulating adult taste bud cell differentiation through the loss of Mash1-positive cells using the Cre-loxP system. We found that the cells expressing type III cell markers; aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), carbonic anhydrase 4 (CA4), glutamate decarboxylase 67 (GAD67), neural cell adhesion molecule (NCAM), and synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25); were significantly reduced in the circumvallate taste buds after administration of tamoxifen. However gustducin and Phospholipase C beta2 (PLC beta2); markers of type II taste bud cells; were not significantly changed in the circumvallate taste buds after administration of tamoxifen. These results suggest that Mash1-positive cells could be differentiated to the type III cells, not to the type II cells in the taste bud.

研究分野：解剖学

キーワード：味蕾　転写因子　Mash1　セロトニン　GABA

１．研究開始当初の背景

我々はこれまでに味蕾細胞の分化に関わる転写因子、特にMash1が味蕾細胞の分化にどのような機能を演じているのかについての研究を行ってきた。その中で、Mash1 が味蕾の一部の細胞に発現し、味蕾における Mash1の発現が味神経に依存する(Seta et al, 1999)、Mash1が味蕾細胞の中で未分化の基底細胞とⅢ型細胞の１部に発現し、Ⅲ型細胞の分化に関与している(Seta et al. 2003, 2006)、Mash1ノックアウトマウスの軟口蓋の味蕾においてセロトニンの合成酵素であるAADCとGABAの合成酵素であるGAD67の発現が消失し、Mash1 がⅢ型細胞の機能発現に関与していることを示してきた(Seta et al. 2011, Kito-Shingaki et al. 2014)。また、Mash1 を培養舌上皮に強制発現しても、一部のⅢ型細胞のマーカーしか誘導できないことから、Mash1 のみでは３型細胞の分化には不十分であることがわかった。しかしながら、Ⅲ型細胞の機能については酸味と塩味の受容に関与するなど限られたことしかわかっておらず、Ⅲ型細胞の分化制御や伝達物質の特定など解明すべき点が多く残されている。

２．研究の目的

本研究ではマウス味蕾の３型細胞がもつ生物学的特性の解明を目的として、Ⅲ型細胞が合成しているセロトニンならびに GABA の味蕾での機能の解析とⅢ型細胞の分化における転写制御因子 Mash1 の機能検索を行う。本研究では研究期間内に下記の実験を行い、味蕾のⅢ型細胞の生物学的特性の解明を試みる。

① 味蕾におけるMash1発現細胞がどの細胞型に分化しているのかを検討するために、Cre-loxPシステムを利用して、成体マウスでMash1発現細胞にGFPを発現させ、Mash1 発現細胞の細胞系譜を検索する。

② セロトニンならびに GABA が味蕾内でどのような機能しているのかを検討するために、Cre-loxP システムを利用して、成体マウスでMash1発現細胞にジフテリア毒素を発現させ、Mash1 コンディショナルノックアウトマウス(Mash1 CKO)を作製して検索する。

３．研究の方法

（１）成体マウス味蕾における Mash1 発現細胞の細胞系譜の検索

① Mash1-CreER^{T2} マウスと CAG-floxed Neo-EGFPマウスを交配させ、Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-EGFPマウスを作製する。

②①で作製したマウスにタモキシフェンを投与して、味蕾における Mash1 発現細胞の系譜を味細胞のマーカー（Ⅱ型:gustducin, PLCβ2, Ⅲ型：AADC, CA4, SNAP25, NCAM）を用いて検索する。

（２）成体マウス味蕾における Mash1 の機能検索

① Mash1-CreER^{T2} マウスと CAG-floxed Neo-DTAマウスを交配させ、Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-DTAマウスを作製する。

②①で作製したマウスにタモキシフェンを投与して、Mash1欠損による味蕾の細胞型の構成の変化を味細胞のマーカー（Ⅱ型：gustducin, PLCβ2, Ⅲ型：AADC, CA4, SNAP25, NCAM）を使用して検索する。

（３）味蕾のおけるセロトニン・GABA受容体の発現の検索

①セロトニン受容体・GABA受容体のサブタイプの発現をRT-PCR法で検索する。

②①において味蕾で発現が認められたセロトニン・GABA受容体の味蕾における局在を ***in situ*** Hybridization、免疫染色を用いて検索する。特に発現が認められた受容体が、味蕾のどの細胞型に発現しているのかを各細胞型のマーカー（gustducin, PGP9.5, NCAM, serotoninなど）との２重染色により確認する。

（４）味蕾におけるセロトニン・GABAの機能検索

①Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-DTAマウスにタモキシフェンを投与して、味蕾におけるセロトニン産生細胞とGABA産生細胞を変性させる。

②２ボトルテストで①のマウスが各味覚に対する感受性の変化が生じているかどうかを検索する。

③①のマウスと野生型マウスの舌に味物質（酸味・塩味・甘味・うま味・苦味）で刺激して、舌咽神経ならびに鼓索神経の応答の変化を比較する。

（５）Ⅲ型細胞の分化における Mash1 の機能検索

①マウスの有郭乳頭上皮と味蕾を含まない舌上皮、さらにタモキシフェン投与Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-DTAマウスからそれぞれmRNAを抽出し、PCR-array法で神経細胞の分化関連する転写因子の発現のプロファイルを作製する。

②作製したプロファイルを解析ソフトウェアにより詳細に解析する。有郭乳頭上皮に

において発現頻度の高い転写因子の抽出（特に bHLH 型ならびにホメオボックス型）をおこなう。

４．研究成果

（１）Mash1 発現細胞の細胞系譜検索

Mash1-CreER^{T2} マウスと CAG-floxed Neo-EGFP マウスを交配させて作製した Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-EGFP マウスにタモキシフェンを投与し、３～10 日後の味蕾で EGFP 発現細胞と味細胞のマーカーとの局在を検索した。EGFP 発現細胞（Mash1 発現細胞）の中で味細胞のマーカーとの局在が一致した細胞はタモキシフェン投与後 3 日後から観察されるようになった。タモキシフェン投与後 10 日の味蕾では、EGFP 発現細胞（Mash1 発現細胞）の中にはⅢ型細胞のマーカーとの局在が一致する細胞が観察されたが、Ⅱ型細胞のマーカーと局在が一致する細胞は認められなかった。これらの結果は、味蕾における Mash1 発現細胞はⅡ型細胞ではなく、Ⅲ型細胞に分化することを示しており、Mash1 がⅢ型細胞の分化に関係している可能性が強く示唆された。

（２）生体マウス味蕾における Mash1 の機能検索

Mash1-CreER^{T2} マウスと CAG-floxed Neo-DTA マウスを交配させて作製した Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-DTA マウスにタモキシフェンを連続投与し、3、5、10 日後の味蕾における味細胞のマーカーの発現変化を観察した。Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-DTA マウスにタモキシフェンを投与し、Mash1 発現細胞を変性させることで味蕾の形態に変化が見られるかどうか検索したが、タモキシフェン連続投与後 10 日の味蕾においても、味蕾の直径と細胞数には有意な変化は観察されなかった。さらにタモキシフェン投与による味細胞のマーカー発現細胞数の変化を検索した結果、タモキシフェン投与後３、５、10 日後

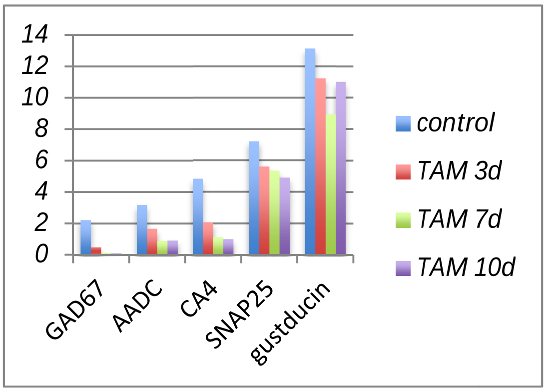

図１　タモキシフェン投与による味細胞マーカー発現細胞の変化

において 、Ⅱ型細胞のマーカー（gustducin, PLCβ2）を発現する細胞の数に変化は観察されなかった。一方、Ⅲ型細胞のマーカー（AADC, CA4, GAD67, SNAP25, NCAM）を発現する細胞の数は、タモキシフェン投与日数が多いほど減少しているのが観察された。また、Ⅲ型細胞のマーカー間でも、発現細胞の減少に差が見られ、AADC, CA4, GAD67 はタモキシフェン連続投与 10 日で発現細胞がコントロールと比較して約 10～30%に減少していたが、SNAP25, NCAM 発現細胞はタモキシフェン連続投与 10 日でも、約 50～70%にしか減少していなかった。これらの結果から、味蕾において Mash1 はⅡ型細胞の分化には関与せず、Ⅲ型細胞の分化に関係していることが示された。また、Ⅲ型細胞の中でも減少するマーカーに差が見られたことから、Ⅲ型細胞にはサブタイプが存在し、Mash1 は AADC, CA4, GAD67 を発現するⅢ型細胞の分化に関与していることが推測された。

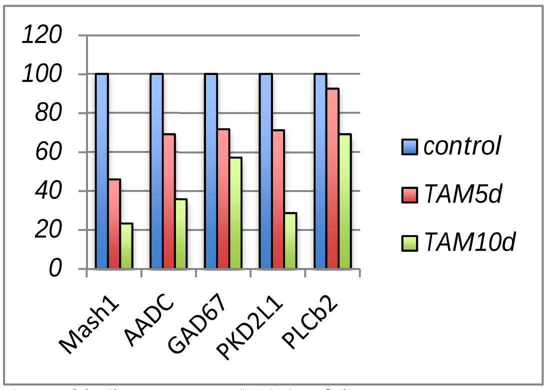

図２　味細胞マーカーの発現量の変化

（３）セロトニン・GABA 受容体の発現の検索

マウス味蕾におけるセロトニン・GABA 受容体の発現を RT-PCR, ***in situ*** Hybridization、免疫染色を用いて検索した結果、セロトニン受容体では 5HT1B と 5HT3 が、GABA 受容体ではδ受容体が味蕾において発現しているのが認められた。

（４）セロトニン・GABA の機能検索

（２）において Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-EGFP マウスにタモキシフェンを 10 日連続投与してもⅢ型細胞は完全に変性させることはできていないことがわかった。また、マウスにタモキシフェンを 10 日連続投与を行うと、マウス個体への影響が大きく、飲水量が極端に減少していたので、2 ボトルテストを行ったが、コントロール・実験群ともほとんど飲水せず、結果が得ることができなかった。現在、Mash1 発現細胞を変性・消失させる別の方法を模索中である。

（５）Ⅲ型細胞の分化における Mash1 の機能検索

Mash1-CreER^{T2}/ CAG-floxed Neo-EGFP マウスにタモキシフェンを 10 日連続投与して、有郭乳頭上皮から mRNA を抽出し、PCR-array 法で神経細胞の分化関連する転写因子の発現のプロファイルの作製を現在行っている。現在の所、Math2 の発現がタモキシフェン投与により、発現が減少しているが認められたの

で、RT-PCR で発現が有郭乳頭上皮に認められるかどうか検索中である。

助成期間で得られた結果から、Mash1 は味蕾のⅢ型細胞の一部の細胞の分化に深く関与していることが強く示唆された。

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１０件）

①Mash1-expressing cells could differentiate to type III cells in adult mouse taste buds. Takagi H, Seta Y, Kataoka S, Nakatomi M, Toyono T, Kawamoto T. Anat Sci Int. 2018 Mar 10. doi: 10.1007/s12565-018-0431-4.
②Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4 is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells.Tabe S, Hikiji H, Ariyoshi W, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Shimizu T, Okinaga T, Seta Y, Tominaga K, Nishihara T. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1):16701. doi: 10.1038/s41598-017-16902-4.
③Hey1 and Hey2 are differently expressed during mouse tooth development. Kibe K, Nakatomi M, Kataoka S, Toyono T, Seta Y. Gene Expr Patterns. 2018 Jan;27:99-105.
④Expression of N-cadherin and cell surface molecules in the taste buds of mouse circumvallate papillae. Matsuyama K, Seta Y, Kataoka S, Nakatomi M, Toyono T, Kawamoto T. J. Oral Biosci. 2017;59(4):218-233.
⑤Ikeda E, Goto T, Gunjigake K, Kuroishi K, Udea M, Kataoka S, Toyono T, Nakatomi M, Seta Y, Kitamura C, Nishihara T, Kawamoto T: Expression of vascular nucleotide transporter in rat odontoblasts. Acta Histochem. Cytochem.49: 21-28, 2016.
⑥Oda M, Miyamoto I, Nishida I, Tanaka T, Kito S, Seta Y, Yada N, Saeki K, Matsumoto-Takeda S, Wakasugi-Sato N, Habu M, Kodama M, Kokuryo S, Nishimura S, Matsuo K, Tominaga K, Yoshioka I, Maki K, Morimoto Y: A spatial association between odontomas and the gubemaculum tracts. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. 121: 91-95, 2016.
⑦Ueda M, Goto T, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Ikeda E, Kataoka S, Nakatomi M, Toyono T, Seta Y, Kawamoto T: Asorin in compressed periodontal ligament cells inhibits bone formation. Arch. Oral Biol. 62: 86-92, 2016.
⑧Kokabu, Lowery, Toyono, Seta, Hitomi, Sato, Enoki, Okubo, Fukushima, Yoda: Muscle regulatory factors regulate T1R3 taste receptor expression. Biochem Biophys Res Commun. 468: 568-573, 2015
⑨Nishida, Oda, Tanaka, Kito, Seta, Yada, Fujirta, Saeki, Morioka, Matsumoto-Takeda, Wakashugi-Sato, Habu, Kodama, Miyamoto, Kokuryo, Nishimura, Matsuo, Tominaga, Yoshioka, Maki, Morimoto: Detection and imaging characteristics of the gubernacular tract in children on cone beam and multidetector computed tomography. Oral Pathology and Oral Radiology 120: 109-117, 2015.
⑩Hitomi S, Ono K, Miyano K, Ota Y, Uezono Y, Matoba M, Kuramitsu S, Yamaguchi K, Matsuo K, Seta Y, Harano N, Inenaga K. Novel methods of applying direct chemical and mechanical stimulation to the oral mucosa for traditional behavioral pain assays in conscious rats. Journal of Neuroscience Methods: 239: 162-169, 2015

〔学会発表〕（計１５件）

①豊野孝、平田祐基、片岡真司、中富満城、細川隆司、瀬田祐司：筋芽細胞株 C2C12 における、転写因子 KLF2 によるアミノ酸（うま味）受容体 T1R1 遺伝子の転写調節機構の解析、第１２２回日本解剖学会全国学術集会
②中富満城、片岡真司、豊野孝、瀬田祐司：口唇裂発症モデルマウスにおける遺伝-環境相互作用の解析　第 59 回歯科基礎医学会学術大会
③木部琴乃、中富満城、片岡真司、豊野孝、瀬田祐司：マウス歯胚形成過程における低酸素負荷の影響　第 59 回歯科基礎医学会学術大会
④豊野孝、平田祐基、片岡真司、中富満城、瀬田祐司：DNA アフィニティ沈降法を用いたうま味（アミノ酸）受容体 T1R1 遺伝子の転写調節機構の解析、第 59 回歯科基礎医学会学術大会
⑤松山佳永、川元龍夫、瀬田祐司：マウス味蕾における膜表面分子の発現、第７６回九州歯科学会学術総会
⑥高木拓樹、川元龍夫、瀬田祐司：Mash1 による味蕾細胞分化制御、第７６回九州歯科学会学術総会
⑦平田祐基、豊野孝、片岡真司、中富満城、細川隆司、瀬田祐司：筋芽細胞株 C2C12 の筋管細胞への分化段階における、アミノ酸（うま味）受容体 T1R1 遺伝子の転写調節機構の解析、第７６回九州歯科学会学術総会
⑧木部琴乃、中富満城、片岡真司、豊野孝、瀬田祐司：マウス歯胚における Hey1 および Hey2 遺伝子発現の定量的解析、第５８回歯

科基礎医学会学術大会
⑨松山佳永、川元龍夫、瀬田祐司：マウス味蕾における膜表面分子の発現、第５８回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会
⑩高木拓樹、川元龍夫、瀬田祐司：Cre-loxP システムを利用した味蕾Ⅲ型細胞分化における Mash1 の機能解析、第５８回日本顕微鏡学会九州支部学術講演会
⑪Seta Y, Toyono T, Kataoka S, Nakatomi M: The functional analysis of Mash1 in mouse taste bud cell differentiation using Cre-loxP system. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception.
⑫ Toyono T, Hirata Y, Kataoka S, Nakatomi M, Seta Y: Cis element analysis of umami (amino acids) receptor, T1R1 gene in C2C12 cells. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception.
⑬瀬田祐司：Mash1 による味蕾細胞の分化制御　第 57 回　日本顕微鏡学会　九州支部総会
⑭豊野孝、瀬田祐司、片岡真司、中富満城、豊島邦昭：筋芽細胞株 C2C12 におけるアミノ酸（うま味）受容体 T1R1 遺伝子の転写活性化領域の解析　九州歯科学会総会
⑮瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、中富満城、木部琴乃：Cre-loxP によるマウス味蕾３型細胞における Mash1 の機能解析　第 57 回歯科基礎医学会学術大会

〔図書〕（計　０件）

〔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://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/2kaibou/Site/HOME.html

６．研究組織
(1)研究代表者
瀬田　祐司（SETA YUJI）
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90291616

(2)研究分担者
豊野　孝（TOYONO TAKASHI）
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：10311929

中富　満城（NAKATOMI MITSUSHIRO）
九州歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：10571771

小野　堅太郎（ONO KENTARO）
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40316154

片岡　真司（KATAOKA SHINJI）
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80364149