

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592122

研究課題名（和文） 転写制御因子による味蕾細胞の分化制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of taste bud cell differentiation by transcription factors

研究代表者

瀬田 祐司 (SETA YUJI)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90291616

研究成果の概要：

bHLH 型転写制御因子の Mash1 は、嗅神経・自律神経などの一部の神経細胞や感覚細胞の分化に必須であることが明らかにされている。味覚器の味蕾においても Mash1 は、味蕾の基底細胞や 3 型細胞に発現していることが知られている。本研究では味蕾細胞の分化に Mash1 がどの様に機能しているのかを検索するために、胎生期ならびに生後直後の Mash1 ノックアウトマウスの有郭乳頭ならびに軟口蓋味蕾を組織学的に観察した。Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋では、胎生後期において味蕾としての形態がすでにできあがっているのが観察された。さらに Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋味蕾では gustducin 陽性の 2 型細胞は観察されるが、AADC 陽性の 3 型細胞は観察する事はできなかった。これらのことから、Mash1 が味蕾の 3 型細胞分化において重要な機能を演じていることが推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：口腔組織学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：味蕾・転写制御因子・Mash1・Hes6・AADC・マウス

1. 研究開始当初の背景

味覚は生物にとって食物と毒物との判別に重要な役割を演じている感覚である。味覚は口腔や咽頭に粘膜上皮内に散在する味蕾

と呼ばれる化学受容器によって受容されており、味蕾は約 50 から 100 個の細胞により構成されている。味蕾を構成する細胞は、微細構造により未分化な基底細胞 (IV 型) と

分化した3種類の細胞（Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型）に分類されている。ところが味蕾細胞の分化に関しては、分化した3種類の細胞型が味蕾細胞の成熟過程を示すものであるとする考え方、あるいはそれぞれ細胞型が別個の分化経路をもつ独立した細胞系であるとする考え方があり、未だに結論が出ていない。さらに、各細胞型の詳細な機能も不明で、味蕾全体でどの様に味覚情報が処理されて神経線維へ伝達されているのかも解明されていない。しかしながら、味蕾は支配神経の切断により、神経との接触が断たれると味蕾細胞が変性・消失するという性質をもつために、分化した味蕾細胞は培養系を用いた詳細な機能的な研究が困難である。そこで味蕾細胞の各細胞型の機能を対象とした研究を行うためには、各細胞型へ分化制御機構を解明し、*in vitro*の実験系でそれを再現させてそれぞれの細胞型を純化することが必要である。そのためには味蕾基底細胞から味蕾各細胞型への分化に関わる因子の機能を詳細に探索する必要がある。

これまでに我々は、味蕾細胞がもつ細胞生物学特性と味蕾細胞の分化について転写制御因子に注目して研究をおこなってきた。その中で、味蕾細胞の分化において神経細胞の分化に関わる Mash1, Hes6 などの bHLH 型転写制御因子とそれらを制御する Notch 関連遺伝子群が発現し、味蕾細胞と神経細胞との類似性が細胞分化の様式にもあてはまることがわかった (Seta et al. 1998, Seta et al. 2003)。Mash1, Hes6 は一部の分化した味蕾細胞にも発現が認められ、Mash1 はⅢ型細胞のマーカーと、Hes6 はⅡ型とⅢ型細胞のマーカーと局在が一致し、これらの転写制御因子が味蕾の細胞型の分化決定に重要な役割を演じていることが推測された。Mash1 は自律神経や嗅神経の分化に必須で、Mash1 ノックアウトマウスではこれらの神経細胞が欠失することが報告されている。Mash1 が生体の味蕾細胞の分化に与える影響を探索するためには、Mash1 ノックアウトマウスを使ってⅢ型細胞やその他の細胞型の分化に与える影響を探索する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、味蕾細胞の分化制御機構の解明を目的として、味蕾細胞（特にⅢ型細胞）の分化に関わる転写制御因子の探索とその

機能についての解析を行う。まず、味蕾細胞の分化における Mash1 の機能を探索するために、Mash1 ノックアウトマウスの味蕾の構造の変化を詳細に検討する。さらに Mash1 ノックアウトマウスと野生型マウスとの間での味蕾における遺伝子の発現の変化を探索する。その際、遺伝子発現の変化については神経細胞の分化に関わる転写制御因子（bHLH 型転写制御因子、ホメオボックス遺伝子など）の探索を中心に行う。新規に検索によって得られた転写制御因子が、実際に味蕾のどの細胞で発現しているかを探索し、味蕾の各細胞型の分化に関連する遺伝子の探索を行う。

これまでに味蕾で発現していることが報告されている転写制御因子 (Prox1, Hes6, Nkx2.2, Sox10, Mash1, Six1 など) と本研究により得られた新規の転写制御因子の機能を解析するために、生体の舌上皮細胞や初代培養舌上皮細胞に転写制御因子を単一で、あるいは組み合わせて発現させることで、*in vivo*, *in vitro* 条件下において味蕾細胞の分化誘導を試みることによって、味蕾細胞の分化制御機構の解明を計る。

3. 研究の方法

(1) Mash1 ノックアウトマウスにおける味蕾の構造変化の探索

(2) 味蕾細胞の分化における転写制御因子の機能解明

① 味蕾における転写制御因子の発現の探索

② 培養細胞における転写制御因子の機能の探索

4. 研究成果

Mash1 ノックアウトマウスの有郭乳頭は、形態・大きさとも野生型の有郭乳頭と比較して大きな変化は観察されなかった。胎生 18 日から生後まで、有郭乳頭と神経線維との関係を、PGP9.5 抗体を用いて探索を行うと、胎生 18 日には Mash1 ノックアウトと野生型マウスの有郭乳頭上皮に神経線維の侵入が同様に観察されたが、生後のノックアウトマウスの有郭乳頭では神経の上皮への侵入が減少しているのが観察された。さらに Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋を観察すると、胎生 18 日には野生型同様に味蕾の形態が完成しているのが観察された。

Mash1 ノックアウトマウスにおける Hes6 の

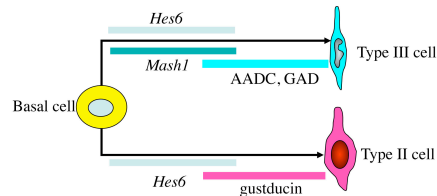
遺伝子発現を検索すると、野生型同様に Hes6 は茸状乳頭背部上皮、有郭乳頭の背部・溝部上皮、軟口蓋味蕾に発現が認められ、発現パターンには変化は観察されなかった。

胎生期の有郭乳頭・軟口蓋味蕾における味蕾細胞のマーカの発現を検索すると、胎生 18 日に野生型の有郭乳頭上皮や軟口蓋味蕾において認められた 3 型細胞のマーカである AADC の発現が、Mash1 ノックアウトマウスにおいては観察されなかった。また、軟口蓋味蕾において 2 型細胞のマーカである gustducin の発現を検索すると、Mash1 ノックアウトと野生型マウスの軟口蓋味蕾で gustducin 陽性細胞が認められた。

胎生 18 日の軟口蓋上皮における遺伝子発現を RT-PCR を用いて検索すると、Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋では、gustducin の発現は認められたが AADC の発現は認められなかった。

マウスの初代培養舌上皮に Mash1 を強制発現させると、GAD1, AADC などの味蕾の III 型細胞に発現が認められる遺伝子の発現が RT-PCR で確認された。さらに、免疫染色でも AADC の発現が Mash1 発現舌上皮細胞に観察された。

味蕾を構成する各細胞型への分化については、様々な考え方が存在し、いまだ明らかにされていない。代表的な考え方として、味蕾の各細胞型は分化の成熟過程を示すという考え方と、各細胞型は独立した細胞であるという考え方である。Mash1 は、味蕾において基底細胞と一部の味蕾細胞に発現していることが示され、味蕾の分化に重要な役割を演じていることが推測されてきた。Mash1 ノックアウトマウスの解析により、Mash1 が欠損しても味蕾の形成に変化は見られず、Hes6 などの味蕾分化に関わる遺伝子発現に影響を及ぼさないことから、Mash1 が味蕾の分化そのものに必須ではないことが示された。しかしながら、軟口蓋味蕾や有郭乳頭上皮における味蕾 3 型細胞のマーカの AADC の発現が消失することから、3 型細胞の分化に Mash1 が必要であることが推測された。また、軟口蓋味蕾において 2 型細胞のマーカの gustducin の発現に変化は見られないことから、2 型細胞の分化には Mash1 が必要ないことが示された (図 1)。



これらの結果から、味蕾細胞の各細胞型は独立した細胞系譜の細胞であることが示唆され、Mash1 は 3 型細胞の分化に重要な役割を演じていることが示された (図 2)。



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 3 件)

- ① 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: Mash1 欠損による味蕾細胞分化への影響, 日本味と匂学会誌 15: 349-352, 2008 査読有
- ② Seta Y, Kataoka S, Toyono T, Toyoshima K. Immunohistochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in mouse taste buds and developing taste papillae. Histochem Cell Biol. 127(4):415-422: 2007. 査読有
- ③ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: 転写制御因子による味蕾細胞の分化制御., 日本味と匂学会誌, 14(3), 373-374, 2007. 査読有

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: 味蕾 3 型細胞の分化における Mash1 の役割, 歯科基礎医学会, 9 月 25 日, 東京 2008
- ② 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: Mash1 欠損による味蕾細胞分化への影響, 日本味と匂学会第 42 回大会, 9 月 20 日, 富山, 2008
- ③ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: Mash1 による味蕾 III 型細胞の分化制御, 第 68 回九州歯科学会総会, 5 月 31 日, 北九州, 2008
- ④ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: Mash1 による味蕾 3 型細胞の分化制御, 解剖学会, 大分, 3 月 28 日, 2008
- ⑤ Seta Y, Toyono T, Kataoka S, Toyoshima K. Mash1 regulates the type III cell differentiation of taste bud. The 5th international symposium on molecular and neural mechanisms of taste and olfactory perception. Fukuoka, Nov. 2-3, 2007
- ⑥ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: 転写制御因子による味蕾細胞の分化制御: 日本味と匂学会第 41 回

大会・東京・7月26～28日、2007

⑦瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：Mash1による味蕾細胞の分化制御：第67回九州歯科学会総会・北九州・5月19日、2007

⑧瀬田祐司、片岡真司、豊野孝、豊島邦昭：味蕾細胞の分化におけるMash1の役割：第112回日本解剖学会総会・大阪・3月28日、2007

〔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〕

ホームページ

<http://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/2kai bou/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・准教授

研究者番号：90291616

(2) 研究分担者

豊島 邦昭 (TOYOSHIMA KUNIAKI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10112559

豊野 孝 (TOYONO TAKASHI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：10311929

(3) 連携研究者