

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580128

研究課題名 (和文) 味細胞タイプと味受容関連物質の同定に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on the types of the taste cell and taste perception.

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

研究成果の概要 (和文)：

味細胞は機能的に I～III 型の 3 種類に分類される。III 型細胞には味神経の間に典型的なシナプスが存在するが、II 型細胞には存在しない。よって II 型細胞で受容された味情報は III 型細胞に伝達されると考えられているが、味細胞-味細胞間および味細胞-味神経間の連絡経路については完全には明らかになっていない。本研究では苦味刺激物質と ATP を使用し、マウス味細胞を用いてカルシウムイメージング法と抗体染色法を行うことにより、II 型細胞内および III 型細胞のカフェイン味刺激伝達経路を解析した。

研究成果の概要 (英文)：

There are a lot of unsolved issues about the pathway from taste cells to taste cells or taste nerves. Therefore, we analyzed the caffeine transduction mechanism of mouse using behavioral test, calcium imaging, and immunocytochemistry. The responsiveness of taste cells to caffeine, ATP, and high concentration of  $K^+$  were examined by calcium imaging followed by immunocytochemistry to detect expression of  $G_{\alpha}$ -gustducin and  $IP_3R3$  which are known as type II cell markers. As a result, caffeine stimulated taste cells both type II and the other type of cells. A part of type II cells was depolarized by high concentration of  $K^+$ , and taste cells which responded to caffeine and high  $K^+$  existed. Therefore we concluded there are voltage-gated calcium channels in subset of type II cells. Also, ATP stimulates both type II and other type of cells. Considering the report that ATP is released from type II cells, it seems to play an autocrine role in taste cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：味覚、マウス、情報変換、苦味、味細胞

## 1. 研究開始当初の背景

味物質には、味細胞の細胞膜上に受容体という特殊なタンパク質によって感知されるものと、チャネルや細胞膜に直接働きかけるものがある。近年、ゲノムプロジェクトの成果とバイオインフォマティクス分野の発展から味受容体候補遺伝子や味情報伝達関連分子候補遺伝子の報告が相次いでいる。ゲノムから得た遺伝子の機能に関しては、今日に至るまでの累積された生理学的データと一致することで同定され、現在、約 200 ある受容体候補遺伝子は、いずれは 20 ほどに絞られるであろうと想定されている。また、受容体だけではなく、情報変換に関わる可能性のある遺伝子群の機能解明が待たれるところである。このように、ゲノムからの情報は膨大な量に登って来ており、それを整理するための生理学的研究が希求されている。

味を受容する味蕾の中には3種類の味細胞が存在し、それぞれマーカー分子が提唱されている。マーカー分子と電子顕微鏡的観察から得られた共通認識は、II型味細胞のみに味受容体があるが味神経とのシナプスはない、中枢に味情報を送る味神経はIII型味細胞とシナプスを作るがIII型味細胞には味受容体は存在しない、である。この大きな矛盾は現時点で明らかになっていない。I型味細胞はグリア様細胞で味受容に直接関係していないと考えられている。

申請者らが行った味受容と受容関連分子を視覚化する方法によって行った試験実験において、苦味受容には2タイプあり、苦味受容はII型、III型で行われている可能性が考えられた。ただし、試験実験においては、ガストジューシン(味細胞特異的Gタンパク質)抗体を用いてII型味細胞と判別して調べた。また、パッチクランプ法において、カルシウム電流を示すものをIII型味細胞と判別して調べた。ガストジューシンは半数のII型味細胞のしか持っていないがII型味細胞特異的なのでその抗体は汎用されている。II型味細胞は電位依存性カルシウムチャネルを持っていないと提唱されていた<sup>1)</sup>のであるが、2006年10月、II型味細胞にも電位依存性カルシウムチャネルが存在することが報告された<sup>2)</sup>。このことから申請者らが行った試験実験においてIII型味細胞と判断した細胞はガストジューシンを持たないII型味細胞である可能性が出てきた。これまでは、II型味細胞には電子顕微鏡観察よりシナプス小胞が存在することが既にわかっていたが、電位依存性カルシウムチャネルが存在しないと考えられ、シナプス小胞からの神経伝達物質放出に十分なカルシウム上昇を得ら

れないことから、II型味細胞のシナプス小胞の役割について言及されていない。今回報告されたII型味細胞におけるカルシウムチャネルの存在は未だ広く受け入れていないが、申請者はこのシナプス小胞が細胞間伝達物質であり、III型味細胞は嗅覚における嗅球と類似の役割、すなわち味情報を洗練し味神経に味情報を送っているのではないかと考えた。そこで、カルシウムチャネルの存在を確認し、味応答とマーカー分子をより詳細に調べることによって、味細胞内だけではなく、味細胞間の味情報伝達機構も網羅して解析できるという発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで蓄積した生理学的研究を進展させて、これまで missing ring といわれていた味細胞-味細胞-味神経間の情報伝達カスケードの構築を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 短時間二瓶選択試験

個別飼育下のマウスに蒸留水と各濃度のカフェイン水溶液が入った二瓶を提示し、10分間自由に飲水させ、各瓶の飲水量を測定した。位置に対する嗜好性が出ないように、1分後、3分後、5分後に左右の瓶の位置を入れ替えた。二瓶の飲水量の合計のうち、カフェイン水溶液を飲水した割合をカフェイン嗜好率とした。

### (2) 味覚嫌悪条件付け試験

マウスを6時間絶水させ、直後に給水瓶を提示するとただちに飲水を始めるように数日間訓練し、訓練終了後に条件付けを行った。マウスを6時間絶水させ、10 mM カフェインの入った瓶を提示し10分間飲水させ、直後にLiCl (0.6 g/kg) を腹腔内に投与し、体調不全を誘発させた。3 mM カフェインの味認識について、対照として蒸留水を用いて短時間二瓶選択を行った。

### (3) カルシウムイメージング法

マウスより舌を摘出し、酵素処理後、舌上皮を筋肉層より剥離した。剥離した舌上皮から微小ガラスピペットを用いて有郭・葉状乳頭由来の味細胞を単離した。単離した味細胞に膜透過性のCa<sup>2+</sup>感受性蛍光プローブであるFluo-4AM (3 μM) を負荷させ(4°C、25分間)、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各溶液で刺激した時の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を調べた。

### (4) 抗体染色法

カルシウムイメージング終了後の味細胞に抗体染色を行うことによって細胞型を特

定した。一次抗体にはⅡ型細胞特異的に発現する  $G_{\alpha}$ -gustducin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, rabbit polyclonal) と  $IP_3R-3$  抗体 (BD Biosciences, mouse monoclonal) を使用した。二次抗体には Alexa Fluor 488 (goat, anti rabbit, invitrogen) と Alexa Fluor 555 (goat, anti mouse, invitrogen) を使用し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて以下のことの観察を行った。

#### ① Ⅱ型味細胞におけるカルシウムチャネルの確認

カルシウムチャネルの存在を、カルシウムイメージング法を用いて調べた。マウス舌から味細胞を単離し、遊離カルシウム指示薬 Fluo4 を細胞内に導入し、細胞外カリウム濃度を変えることによって細胞膜電位を脱分極方向に変化させた。電位依存性のカルシウムチャネルが存在すれば開口し、細胞内カルシウム濃度が上昇する。②単離した味細胞にカルシウムイメージング後、同細胞に免疫染色を行った。用いるのは、市販されているガストジューシン抗体、イノシトール3リン酸受容体 ( $IP_3R$ ) 抗体を用いた。

#### ② 味細胞のATPに対する応答解析

味蕾には  $P2Y_1$  受容体が存在し ATP に応答し細胞内カルシウムが上昇することがわかっている。ATP 応答と細胞タイプの同定は行われていないため、味細胞が ATP にどのように反応するか調べた。また、ATP による細胞間情報伝達には同時に他の神経伝達物質が関わっていることが中枢で報告されている。そこで、セロトニンと ATP に対する応答はカルシウムイメージング法で調べ、味細胞応答と味細胞タイプの関係を解析を行った。そのため、①ATP で単離味細胞を刺激しカルシウムイメージングを行味種によって異なるⅡ型味細胞が応答すると考えられているが、Ⅲ型味細胞は味種によって異なるかどうかについては未だ報告例がなかった。

#### (5) 苦味受容体抗体の作成

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて His タグ融合型の hTAS2R16 を大量精製した。精製した hTAS2R16 をニワトリに免疫 (0.2 ~ 0.5mg/羽) することにより hTAS2R16 に対する鶏卵抗体を作製した。この抗体の物理化学的特性、受容体発現 HEK293 細胞株への応答ならびに官能検査による苦味への影響を調べた。

#### 4. 研究成果

#### (1) カフェイン嗜好性

マウスは 5 mM 以上のカフェインを忌避する傾向があり、10 mM 以上のカフェインは有意に忌避した (図 1)。3 mM カフェインは忌避されなかったが、味覚嫌悪条件付け試験の結果、マウスはその味を認識しているということがわかった (図 2)。

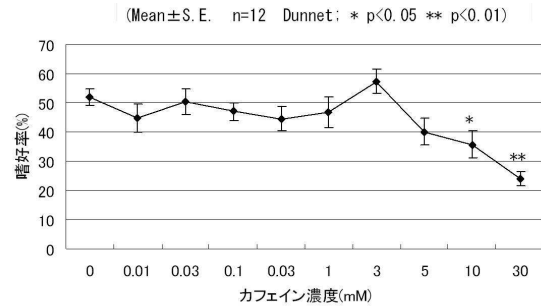


図 1 短時間二瓶選択試験

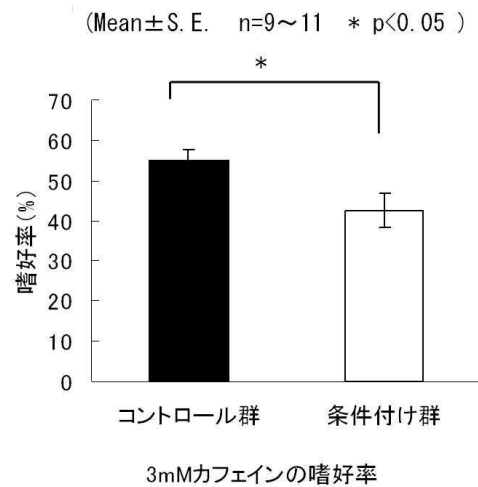


図 2 味覚嫌悪条件付け試験

#### (2) 味細胞のカフェイン濃度別応答パターン

カフェインの嗜好性が味細胞のカフェイン応答パターンの違いに起因している可能性について検討するために、マウスが完全に忌避する 10 mM カフェインと認識しているが忌避しない 3 mM カフェインを使用し、細胞外  $Ca^{2+}$  枯渇下 ( $Ca^{2+}$  free 液かん流下) と細胞

胞内  $Ca^{2+}$  ストア枯渇下 ( $1\mu M$  thapsigargin かん流下) で味細胞のカフェイン応答を解析した。図 3 に  $10\text{ mM}$  カフェインの応答例を、表 1 にカフェインに応答した全細胞のうち、各応答パターンが見られた細胞の割合を濃度別に示した。カフェインに応答した細胞のうち、大部分の細胞はいずれの濃度でも細胞内  $Ca^{2+}$  および細胞外  $Ca^{2+}$  を利用していた。

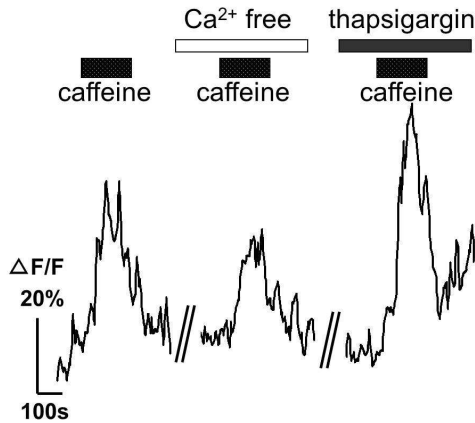


図 3  $10\text{ mM}$  カフェインの応答例

### (3) II型・III型細胞のカフェイン味刺激伝達経路

味細胞タイプ別の味刺激伝達経路を解析するために  $10\text{ mM}$  カフェイン、 $10\mu M$  ATP、High  $K^+$ 液を用いてカルシウムイメージングを行った。さらに応答細胞に対してII型細胞のマーカーである  $G_{\alpha}$ -gustducin と  $IP_3R-3$  に対する抗体を用いて抗体染色を行い、細胞型を判別した。応答パターンは以下の7種類に分類された。表 2 にそれぞれの応答パターンを示した細胞の割合と染色率 ( $G_{\alpha}$ -gustducin または  $IP_3R-3$  が発現している細胞、すなわちII型細胞の割合) を示した。図 4 は表 2 から

作成したグラフである。(a) には各刺激に応答する細胞の染色率を示した。全細胞中、カフェイン応答細胞、ATP 応答細胞、および High  $K^+$  応答細胞の染色率はそれぞれ  $70.4\%$ 、 $36.7\%$ 、 $33.3\%$  であった。(b) にはカフェインまたは High  $K^+$  に応答する細胞の染色率を示した。カフェインのみに応答する細胞の染色率は  $71.6\%$ 、カフェインと High  $K^+$  の両方に応答する細胞の染色率は  $67.6\%$  であり、両者の間に明らかな差はなかった。High  $K^+$  のみに応答する細胞の染色率は  $23.3\%$  であった。

(c) にはカフェインまたは ATP に応答する細胞の染色率を示した。カフェインのみに応答する細胞、カフェインおよび ATP に応答する細胞、ATP のみに応答する細胞の染色率はそれぞれ  $72.2\%$ 、 $61.1\%$ 、 $22.6\%$  であった。

苦味受容体との関連性をみて、さらに研究を深めようと苦味受容体 T2R16 の抗体を作成中である。今回得られた抗体は、salicin 刺激に対する受容体発現 HEK293 細胞株のカルシウム応答を部分的に抑制した。更に官能評価を実施した結果、hTAS2R16 のリガンドである salicin の苦味を減少させる傾向があり、アンタゴニスト抗体の可能性を示唆した。しかし、活性が弱いため、本研究では使用できなかった。

表 1. カフェイン濃度別の応答率

	細胞内 $Ca^{2+}$ および 細胞外 $Ca^{2+}$ を利用	細胞内 $Ca^{2+}$ のみを利用	細胞外 $Ca^{2+}$ のみ を利用	どちらでもな い
$10\text{ mM}$ カフェイン 応答率	$92.4\%$ (97/105)	$4.8\%$ (5/105)	$1.0\%$ (1/105)	$1.9\%$ (2/105)
$3\text{ mM}$ カフェイン 応答率	$92.9\%$ (13/14)	$0\%$ (0/14)	$7.1\%$ (1/14)	$0\%$ (0/14)

表 2. 味細胞の応答パターン別の応答率と染色率

	(a)カフ エインの みに応答	(b)ATP のみに応 答	(c)High K <sup>+</sup> のみに 応答	(d)カフ エインお よびATP に応答	(e)カフェ インおよ びHigh K <sup>+</sup> に応 答	(f)ATP およ びHigh K <sup>+</sup> に 応答	(g)カフェ イン、ATP、およ びHigh K <sup>+</sup> に 応答
応答 率	10.2% (99/972)	2.5% (24/972)	17.0% (165/972)	1.6% (16/972)	3.4%(33/972)	3.8%(37/972)	1.4%(14/972)
染色 率	74.2% (49/66)	0% (0/6)	22.0% (20/91)	50% (4/8)	66.7%(16/24)	28%(7/25)	70%(7/10)

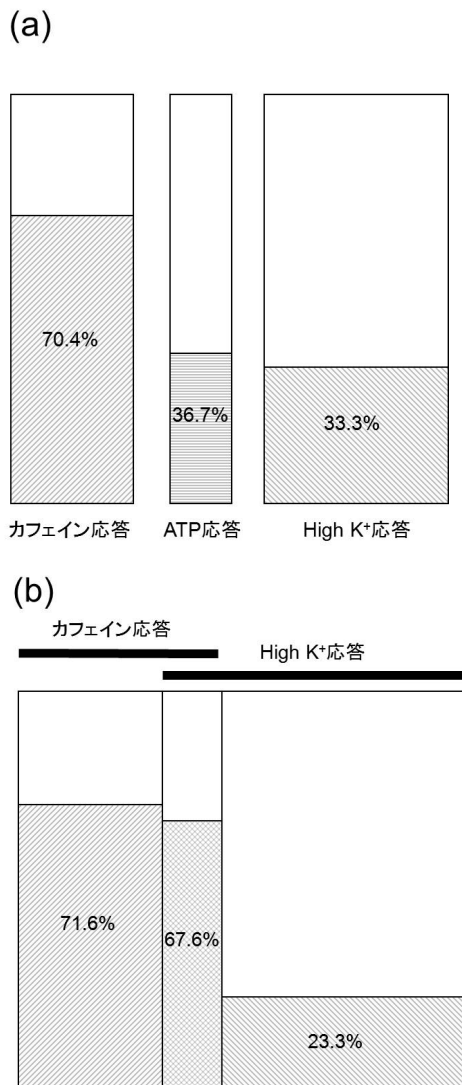


図 4 味細胞の応答パターン別の染色率  
(a) 各刺激に応答する細胞, (b) カフェ  
インまたは High K<sup>+</sup>に応答する細胞, (c)  
カフェインまたは ATP に応答する細胞

#### 考 察

本研究では、まずマウスのカフェインの嗜好性について行動学的に検討した。苦味物質は基本的に忌避されるが、カフェインの場合、マウスは 3 mM カフェインを認識しているものの忌避しなかった。よって 3 mM カフェインは苦味の嗜好性に関わる濃度であることが考えられる。実際に食品に含まれるカフェインの濃度も同程度である。

次に、忌避される濃度である 10 mM カフェインと 3 mM カフェインを用いて、カルシウムイメージングを行い、味細胞がカフェイン応答の際に動員する Ca<sup>2+</sup>の由来を解析した。

結果として、どちらの濃度でも味細胞は細胞内外  $Ca^{2+}$  の両方を利用したことから、カフェインの嗜好性は味細胞の応答パターンの差によるものではないということが示唆された。

さらに、味細胞タイプ別の味刺激伝達経路を解析するために 10 mM カフェイン、10  $\mu$ M ATP、High  $K^+$ 液を用いてカルシウムイメージングを行い、さらに応答味細胞に対して抗体染色を行うことで細胞型を判別した。一般的に苦味物質はⅡ型細胞で受容され、High  $K^+$ はⅢ型細胞を刺激すると考えられている。また、ATP は味細胞における神経伝達物質の候補であり、味刺激によってⅡ型細胞から放出され、Ⅲ型細胞、もしくはⅡ型細胞とⅢ型細胞の両方で受容されると言われている。今回の結果では、カフェイン応答細胞、ATP 応答細胞、および High  $K^+$ 応答細胞のⅡ型細胞の割合はそれぞれ 70.4%、36.7%、33.3%であった(図 4a)。これは、カフェイン応答細胞でⅡ型細胞以外のものが 29.6%存在するということになる。スライス標本による実験では、Ⅲ型細胞が苦味物質を含む様々な味質に応答することが知られているが、今回、Ⅱ型細胞以外にもカフェイン応答が見られたことは興味深い知見である。今後、Ⅲ型細胞のマーカーを使用した追加実験が必要である。また、High  $K^+$ 応答細胞の 33.3%がⅡ型細胞である(図 4a) ことと、カフェインと High  $K^+$ の両方に応答する味細胞が全細胞の 4.8%存在し(表 2e, g)、そのうち 67.6%はⅡ型細胞である(図 4b) ことは、一部のⅡ型細胞に電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルが存在することを示唆している。現在、Ⅱ型細胞には電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネルは存在しないという報告と一部には存在するという相反する報告があるが、今回の結果は後者を支持するものとなった。ATP はカフェインや High  $K^+$ と共に応答することが多く(表 2d, f, g)、ATP 応答細胞もⅡ型細胞とⅡ型細胞以外の細胞の両方が存在したので(図 4a, c)、ATP はⅡ型・Ⅲ型細胞の両方で受容されると考えられる。これは ATP が神経伝達物質としてⅢ型細胞を刺激する一方でⅡ型細胞にポジティブフィードバックをかけるという報告と一致した。

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 3 件)

- ① Evaluation of Umami Substances and the Characterization of Umami Receptor and Coupling G Protein, Masataka Narukawa

and Yukako Hayashi, *Flavour and Fragrance Journal*, (査読有), *in press* 2011

- ② Signalling mechanisms in mouse bitter responsive taste cells. Narukawa M, Minamisawa E, Hayashi Y. *Neuroreport*. (2009) Jul 1;20(10):936-40. (査読有)
- ③ 味細胞におけるカフェイン味刺激伝達経路の解析, 藤戸洋聡、谷口友朗、北田亮、呉性姫、松村康生、林由佳子, 日本味と匂い学会誌, (2009) 16 (3) 331-334 (査読有)

[学会発表](計 3 件)

- ① 北田 亮(林 由佳子) 味細胞タイプ別のカフェイン味刺激伝達経路の解析、日本農芸化学 2011 年大会、京都(地震のため口頭発表中止)
- ② 佐藤創平(林由佳子) 苦味を制御する鶏卵抗体の作製とその評価、日本農芸化学 2011 年大会、京都(地震のため口頭発表中止)
- ③ Yukako Hayashi, Evaluation of Umami Substances and the Characterization of Umami Receptor and Coupling G Protein. Taste and food acceptance: chemistry and molecular biology of sweet, bitter and umami taste (Protida, Italy, 2010 年 4 月 16 日)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 苦味受容体の抗体作成

発明者: 林由佳子、(株)ファーマシューズ、日本農業大学

権利者: 同上

種類: 国内(JST 海外出願支援申請する・しない)・大学資金外国・国内優先・分割・譲渡受入

番号: 510249667

出願年月日: 2010 年 9 月 21 日

国内外の別: 国内

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

(3) 連携研究者