

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592177

研究課題名(和文) 味蕾細胞分化メカニズムの解明：味細胞と味神経の相互作用を再現する培養系の利用

研究課題名(英文) Mechanisms of taste cell differentiation: interaction between taste cells and taste nerves in reconstruction system

研究代表者

原田 秀逸 (HARADA SHUITSU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60128452

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、軟口蓋と茸状乳頭の味蕾について、味蕾細胞分化への味覚神経の関与と味覚応答機構の口腔内の部位による差異を解析した。その結果、これらの部位間の味蕾細胞分化の差には、それぞれの部位に局在する味蕾を支配する味覚神経は関与していないことが示唆された。また、これらの領域の苦味情報伝達系には味蕾細胞に特異的に発現する Gα タンパク質の違いに加えて、苦味受容体の種類にも違いがあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The involvement of taste nerves in the regional differences in taste cell differentiation, and the regional differences in taste transduction machinery were analyzed between the soft palate and fungiform papillae. Our results suggested that taste nerves may not be involved in the regional differences in taste cell differentiation, and that the difference in bitter taste transduction may be caused by the differences in not only Gα proteins but also bitter taste receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	0	0	0
2007年度	0	0	0
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生理学、味覚、神経科学、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

口腔の味蕾は、舌の茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭の3種類の乳頭構造と軟口蓋に局在している。部位によって味蕾を支配する味覚神経は異なっており、味蕾は、軟口蓋では大錐体神経、茸状乳頭では鼓索神経、有核乳頭では舌咽神経に、それぞれ支配されている。

これらの味覚神経には、味蕾で受容した味覚情報を中枢に伝える役割に加えて、味蕾を維持する役割がある。そのため、味覚神経が手術で切断されると、神経支配を失った味蕾は約10日で消失する。その後、神経が再生すると味蕾は再び形成される。

これまでに、味蕾を構成している細胞には、味蕾が局在する部位によって違いがあるこ

とが示されていた。しかしながら、この違いが味覚神経に依存しているか否かは明らかではない。また、部位に応じた味蕾の味覚応答機能の差についても不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、味蕾の局在する部位による細胞分化の違いが、味覚神経からの誘導に依存しているかを検討した。また、各部位の味蕾で発現する分子と味覚情報伝達系の違いを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異なる神経によって再生を誘導した味蕾の細胞分化の解析

味覚神経を切断すると味蕾は消失するが、味覚神経が再生すれば、それに支配される味蕾は再生する。そこで、手術で味覚神経をつなぎ替えることにより神経支配を変えて味蕾を再生させて、味蕾が神経に依存して再生し、手術前とは異なる細胞分化をするかを解析した。実験には、SD ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下で、大錐体神経と鼓索神経を露出させ、各神経を切断した。大錐体神経の中核側断端と鼓索神経の末梢側断端を付着させて、本来は鼓索神経の支配下にある茸状乳頭の味蕾を大錐体神経の誘導により再生させた。また逆に、本来、大錐体神経の支配下にある軟口蓋の味蕾を鼓索神経の誘導により再生させた。

再生した味蕾の細胞分化は、味覚情報伝達に関与する3型IP3受容体(IP3R3)とGタンパク質(*Ga gustducin*)の2種類の分子が共発現する割合によって評価した。

(2) 軟口蓋と茸状乳頭の味蕾の味覚情報伝達系の解析

C57BL/6(野生型)マウスを用いて、軟口蓋と茸状乳頭の味蕾における*Ga gustducin*、甘味受容体(T1r2, T1r3)、苦味受容体(T2rs)の共発現パターンを *in situ hybridization* によって解析し比較した。

野生型マウスと*Ga gustducin*-ノックアウト(KO)マウスの大錐体神経と鼓索神経をペントバルビタール麻酔下で露出させ、全神経線維束の味覚応答を比較解析した。甘味刺激溶液として、Sucrose, Sucralose, Acesulfame K, Saccharin Na を用いた。また、苦味刺激溶液として、QHCl, Denatonium, Cycloheximide, Propylthiouracil を用いた。大錐体神経と鼓索神経の応答を比較して、部位による味覚情報

伝達系の差を解析した。

4. 研究成果

当研究グループでは、これまでにラットの軟口蓋と茸状乳頭の味蕾で、IP3R3 を発現する細胞に*Ga gustducin* の発現する割合(共発現パターン)が大きく異なっていることを明らかにした。軟口蓋ではIP3R3 発現細胞の96.7%に*Ga gustducin* の発現が認められたのに対して、茸状乳頭ではIP3R3 発現細胞の42.4%であった(Miura *et al.*, *Chem Senses* 32 (7): 689-696, 2007)。本研究では、この差を指標にして、再生した味蕾が茸状乳頭タイプか軟口蓋タイプかを判別した。免疫染色で解析を行ったところ、大錐体神経によって茸状乳頭に再生が誘導された味蕾は、鼓索神経に支配される本来の茸状乳頭の味蕾と同様の*Ga gustducin* とIP3R3 の共発現パターンであった。また、鼓索神経によって軟口蓋に再生が誘導された味蕾も、大錐体神経に支配される本来の軟口蓋の味蕾と同様の共発現パターンであった。

これらの結果は、味蕾の再生過程では、再生を誘導した神経に関わらず各部位に特徴的な細胞分化が進行したことを示しており、味蕾の細胞分化の部位差は味覚神経には依存しないことを示唆している。

味蕾が局在する部位間の味覚情報伝達系分子の発現の差を解析するために、マウスの軟口蓋と茸状乳頭の味蕾について、甘味受容細胞と苦味受容細胞で*Ga gustducin* が発現する割合を比較した。その結果、軟口蓋と茸状乳頭の両方で、甘味受容細胞、苦味受容細胞のいずれも、その約90%で*Ga gustducin* が発現していることが明らかになった。この発現パターンは、*Ga gustducin* が、軟口蓋と茸状乳頭の味蕾で甘味と苦味の両方の情報伝達に重要な役割を担っていることを示唆していた。

しかしながら、*Ga gustducin*-KO マウスと野生型マウスを用いて、軟口蓋を支配する大錐体神経と茸状乳頭を支配する鼓索神経で味覚応答を比較解析したところ、*Ga gustducin* の役割には甘味と苦味で違いがあることが明らかになった。甘味は、検討した刺激物質の全てについて、大錐体神経、鼓索神経ともに*Ga gustducin* のKOによって神経応答が大きく低下した。また、苦味では、Denatonium とCycloheximide については、両神経共に神経応答が大きく低下し、甘味の場合と同様に部位差は認められなかった。しかし、QHCl とDenatonium については、大錐体神経の応答は濃度-応答曲線が*Ga gustducin* のKOによって明らかに右方にシフトして、応答が大きく

低下するとともに顕著な閾値の上昇が認められたのに対して、鼓索神経の応答はほとんど低下しなかった。

これらの結果は、甘味情報伝達には軟口蓋、茸状乳頭ともに *Ga gustducin* が重要である一方で、QHCl と Denatonium の苦味情報伝達には、茸状乳頭では *Ga gustducin* 以外の *Ga* タンパク質の関与が大きいことを示している。また、軟口蓋のQHCl と Denatonium に対する応答には、低閾値受容体と高閾値受容体の少なくとも2種類の受容体が関与しており、*Ga gustducin* は特に低閾値受容体の情報伝達に重要であることを示唆している。

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9件)

1. Miura H, Barlow L: Taste bud regeneration and the search for taste progenitor cells, *Arch Ital Biol.*, Vol.148, No.2, pp.107-118 (2010). (査読有り)
2. Shindo Y, Kim MR, Miura H, Yuuki T, Kanda T, Hino A, Kusakabe Y: *Lrmp/Jaw1* is expressed in sweet, bitter and umami receptor-expressing cells., *Chem. Senses*, Vol.35, No.2, pp.171-177 (2010). (査読有り)
3. 大木誠, 三浦裕仁, 友成博, 中山歩, Robert F. Margolskee, 二ノ宮裕三, 原田秀逸: *Gustducin* を介さない苦味情報伝達系の licking 解析による評価, *味と匂学会誌*, Vol. 17, No.3, pp.223-224 (2010). (査読有り)
4. 日下部裕子, 進藤洋一郎, 三浦裕仁, カルニンチ ピエロ, 河合純, 林崎良英, 二ノ宮裕三, 日野明寛: 味蕾細胞特異的に発現する遺伝子の口腔内の部位による多様な発現様式, *味と匂学会誌*, Vol.16, No.3, pp.269-270 (2009). (査読有り)
5. 友成博, 三浦裕仁, 中山歩, 松村江梨子, 進藤洋一郎, 日下部裕子, Robert F Margolskee, 二ノ宮裕三, 原田秀逸: 軟口蓋味蕾の味覚受容体発現パターンと *gustducin* KO マウスの軟口蓋味蕾の味覚応答解析, *日本味と匂学会誌*, Vol.16, No.3, pp.319-320 (2009). (査読有り)
6. 松村江梨子, 三浦裕仁, 中山歩, 友成博, 大木誠, 原田秀逸: マウス味蕾における線維芽細胞増殖因子 *Fgf* およびその受容体 *Fgfr* の RT-PCR 解析, *日本味と匂学会誌*, Vol.16, No.3, pp.291-292 (2009). (査読有り)
7. 友成博, 三浦裕仁, 中山歩, 松村江梨子, 進藤洋一郎, 日下部裕子, Robert F Margolskee, 二ノ宮裕三, 原田秀逸: 軟口蓋味蕾の味覚受容体発現パターンと *gustducin* ノックアウトマウスの軟口蓋味蕾の味覚応答解析, *日本味と匂学会誌*, Vol.15, No.3, pp.419-422 (2008). (査読有り)
8. 中山歩, 友成博, 三浦裕仁, 松村江梨子, 原田秀逸: 大錐体神経と鼓索神経とをつなぎ換えて再生させた味蕾の細胞分化, *日本味と匂学会誌*, Vol.15, No.3, pp.357-358 (2008). (査読有り)
9. Shindo Y, Miura H, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ninomiya Y, Hino A, Kanda T, Kusakabe Y: *Ga14* is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.509, No.2, pp.211-224 (2008). (査読有り)

[学会発表] (計8件)

1. 三浦裕仁, 中山歩, 大木誠, 原田秀逸, 味蕾細胞の発生とターンオーバーにおける *Prox1* 細胞の出現 (Appearance of *Prox1* cells during taste bud development and turnover), 第8回国際シンポジウム「味覚・嗅覚の分子神経機構」(The 8th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception), 2010年10月6日(日本、福岡).
2. 進藤洋一郎, 三浦裕仁, カルニンチピエロ, 河合純, 林崎良英, 二ノ宮裕三, 日野明寛, 神田智正, 日下部裕子: マウス舌後方における甘味・うま味情報伝達分子候補としての *Ga14* (*Ga14* is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue), 第6回国際シンポジウム「味覚・嗅覚の分子神経機構」(The 6th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception), 2008年12月6日(日本、福岡).
3. 三浦裕仁, 友成博, 中山歩, 松村江梨子, 原田秀逸: 味蕾 II 型細胞における *gustducin* と IP3R3 の発現の部位差は神経に依存しない (Regional difference in

gustducin and IP3R3 expression in Type II taste bud cells is nerve-independent), 第6回国際シンポジウム「味覚・嗅覚の分子神経機構」(The 6th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception), 2008年12月6日(日本、福岡).

4. 友成博、中山歩、三浦裕仁、松村江梨子、進藤洋一郎、日下部裕子、二ノ宮裕三、Robert F Margolskee、原田秀逸: 軟口蓋味蕾の味覚受容体発現パターンと gustducin ノックアウトマウスの味覚神経応答, 日本味と匂学会第42回大会, 2008年9月17-19日(9日本、富山).
5. 中山歩、友成博、三浦裕仁、松村江梨子、進藤洋一郎、日下部裕子、原田秀逸: 大錐体神経と鼓索神経とをつなぎ換えて再生させた味蕾の細胞分化, 日本味と匂学会第42回大会, 2008年9月17-19日(日本、富山).
6. Harada S, Tomonari H, Nakayama A, Shindo Y, Kusakabe Y, Miura H: Cell differentiation of the taste buds on the soft palate and fungiform papillae reconnected to different gustatory nerves, 第15回嗅覚・味覚国際シンポジウム(The 15th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)) (共催 第30回米国化学感覚学会), 2008年7月21-26日(米国、カルフォルニア).
7. Nakayama A, Tomonari H, Miura H, Shindo Y, Kusakabe Y, Ninomiya Y, Margolskee R, Harada S: The function of the gustducin in the soft palate taste buds differs from that in the tongue, 第15回嗅覚・味覚国際シンポジウム(The 15th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)) (共催 第30回米国化学感覚学会), 2008年7月21-26日(米国、カルフォルニア).
8. Miura H, Nakayama A, Shindo Y, Kusakabe Y, Tomonari H, Harada S: Expression of the basal cell markers of taste buds during mouse embryonic development., 第15回嗅覚・味覚国際シンポジウム(The 15th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)) (共催 第30回米国化学感覚学会), 2008年7月21-26日(米国、カルフォルニア).

6. 研究組織

(1)研究代表者 (2009, 2010年度)

原田 秀逸 (HARADA SHITSU)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60128452

(2)研究分担者

中山 歩 (NAKAYAMA AYUMI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 10398290

(3)研究代表者 (2008年度)

三浦裕仁 (MIURA HIROHITO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 80353969