

平成 22 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手（B）
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20770124
研究課題名（和文） 味蕾細胞間相互作用の機能解明

研究課題名（英文） Cell to cell interaction within mouse taste buds

研究代表者 大坪 義孝（OTSUBO YOSHITAKA）
九州工業大学・生命体工学研究科・助教

研究者番号：00380725

研究成果の概要（和文）：

膜蛋白質コネキシンは、隣接する細胞のコネキシンと結合する場合は物質通路であるギャップ結合として、結合しない場合は伝達物質を放出するヘミチャネルとして機能する。私は、味蕾に数種類のコネキシンサブタイプが発現すること、単一味蕾細胞に注入した色素が隣接する細胞に拡散することがほとんどないことを明らかにした。味蕾に発現するコネキシンは、ギャップ結合としてよりもヘミチャネルとして機能することで細胞間相互作用を可能にしていることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Connexins, membrane proteins form two types of corridors for small molecules (molar mass < ~1000). One is gap junctions between cells, and another is hemichannels between inside and outside the cell. I show that taste bud cells expressed a few connexin subtypes, and that there are few dye-coupling among taste bud cells. These results suggest that connexins play an important role as hemichannels rather than gap junctions. The role of hemichannels is discussed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：受容体・イオンチャネル・味覚器・細胞型

1. 研究開始当初の背景

生物は細胞間の相互作用を利用し、生体内情報の伝達や協調した動作を行っている。例えば、心臓では、細胞間のギャップ結合がリズムカルな心収縮の形成に重要である。私は、味覚器である味蕾に細胞間相互作用の形成に必要なギャップ結合や各種神経伝達物質受容体が存在するのを明らかにした。しかし、細胞間相互作用の生理的役割については不明である。

哺乳類の味蕾は、約50味蕾細胞が集団を形成することで機能している。従来の味蕾研究では、少数の味蕾細胞が、味物質から味情報を取り出すと考えられていた。しかし、私は、味物質に対し応答する細胞数は味情報を脳へ送り出す細胞数より多いことを明らかにした(Ohtubo et al., J. Physiol., 2001)。さらに、味蕾細胞間に細胞間チャネルであるギャップ結合が存在すること(Yoshii, 2005)、味蕾細胞はアセチルコリン、ATP受容体を発現していることを明らかにした(Eguchi et al., Chem. Senses, 2007, Hayato et al., J. Physiol., 2007)。また、味刺激によって味蕾細胞はATPやセロトニンを放出すること、味蕾細胞からのセロトニン放出はATP受容体の阻害剤で抑制されるとの報告がある(Huang et al., PNAS, 2007)。これらの結果は、味蕾は細胞間相互作用を利用し、味情報伝達および味情報の修飾を行っていることを示唆する。本研究では、我々が長年かけて開発した味蕾構造を保持した標本(剥離味蕾標本)を用いて、ギャップ結合や神経伝達物質を利用した細胞間相互作用に注目し、その役割を遺伝子レベルから細胞集団レベルで明らかにする。

2. 研究の目的

(1) 味蕾細胞型の定量的解析

紡錘形の味蕾細胞は、I型～III型の3種類の細胞型に分類され、各細胞型の生理的役割が明らかになっている。III型細胞は味蕾機能の維持に必要な支持細胞、II型は甘味・旨味・苦味に対する味物質受容体を発現している味受容細胞、I型は酸味に対する味物質受容体を発現し、味神経と化学シナプスを形成す

ることで味情報を伝達する細胞である。細胞間相互作用は、細胞同士が隣接している必要があるため、どの細胞型同士が隣接する傾向があるのか?調べることは、細胞間相互作用の研究として重要である。単一味蕾に発現するI型、II型細胞の数および味蕾内での3次元位置関係を調べる。

(2) コネキシンサブタイプの同定

細胞間相互作用の形成に必要な蛋白質の一つであるコネキシンは、隣接する細胞のコネキシンと結合することでギャップ結合を形成する。哺乳類では約20種類のコネキシンサブタイプが存在し、ほとんどの組織(心臓や肝臓など)では数種類のコネキシンサブタイプが発現し、機能発現に関与している。味蕾細胞に発現するコネキシンサブタイプの同定をおこなう。

(3) ギャップ結合と傍分泌

コネキシンによって形成されるギャップ結合は、分子量約1000 Da以下の分子を通す細胞間の物質通路として機能する。従って、味刺激によって生じる細胞の膜電位や細胞内カルシウム濃度の変化の情報は、ギャップ結合を介して隣接する細胞へ伝達されることになる。前述のように、味蕾細胞は細胞型によって、発現している味物質受容体蛋白質が異なるので、どの細胞型間にギャップ結合が存在するのか明らかにすることは、味情報処理機構の解明に重要である。味蕾細胞間ギャップ結合の有無および細胞型との関係を明らかにする。

また、コネキシンは、細胞間の結合がない場合は、細胞内容物を伝達物質として放出(傍分泌)するヘミチャネルとしても機能する。このヘミチャネルの開口は電位依存性があり、伝達物質の放出には細胞の脱分極および活動電位が重要となる。各細胞型について、ヘミチャネルおよび細胞の興奮性など電気生理学的性質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 味蕾細胞型の定量的解析

味蕾構造が保存されている剥離味蕾標本に免疫染色法を適用し、共焦点レーザー顕微鏡をもちいて、連続画像を取得・解析する。

具体的には、型細胞のマーカー蛋白質 (PLC β 2, IP $_3$ R3) および 型細胞のマーカー蛋白質 (SNAP-25) 核染色の三重染色法を用いた。

(2) コネキシンサブタイプの同定

コネキシンは、様々な組織に存在するため、味蕾細胞のみを採取する技術が必要となる。二本のガラス電極を用いた方法で、剥離味蕾標本から味蕾細胞のみを採取する技術を開発した。具体的には、一本目の先端が細いガラス電極で味蕾を剥離味蕾標本から切り離し、味蕾を吸い付ける。剥離味蕾標本から離れた位置に、先端が太い二本目の吸引用ガラス電極を待機させる。一本目の電極に吸い付いている味蕾を二本目の電極開口部までマイクロマニピレーターで移動させ、二本目の吸引電極で味蕾の一部を吸い取り、電極内に吸引した味蕾細胞のみを実験に用いる。この技術により採取した味蕾からRNAを単離し、RT (Reverse Transcription) - PCR法を用いて、味蕾に発現するコネキシンサブタイプを調べた。

(3) ギャップ結合と傍分泌

単一味蕾細胞に注入した色素の拡散を調べることで、味蕾細胞間にギャップ結合が存在するかを調べた。具体的には、バイオサイチンを含む細胞内液をガラス電極内に充填し、電極先端と細胞膜の間の膜を破ることで、色素を注入した。同時に、パッチクランプ法で味蕾細胞を電位固定し、その細胞に発現している電位依存性チャンネル、特に活動電位の上昇相を形成する電位依存性ナトリウムチャンネルとヘミチャンネル、の電気生理学および薬理学的性質を調べた。生理学実験終了後、その標本を固定し、免疫染色法を用いて色素が入っている細胞型を同定した。型細胞のマーカーとして、IP $_3$ R3、型細胞のマーカーとしてSNAP-25を用いた。

4. 研究成果

(1) 味蕾細胞型の定量的解析

単一味蕾に含まれる型および型細胞の数を明らかにした。舌前方に分布する味蕾、茸状乳頭味蕾は、味蕾ごとに大きさが異なる。単一味蕾に占める型および型細胞の割合は、味蕾細胞の大きさによらず一定であった。この結果は、生物が型・型細胞をランダムに生成しているのではなく、何らかの制御因子によって比率を一定にしていることを示唆する。この比率が味情報伝達に重要なかもしれない。また、味覚嫌悪学習やガンなど病気による味覚変化と各細胞型の数の関係を調べることで、中枢で生じる味

覚と末梢である味覚器の新しい関係性が調べることができるかもしれない。

従来の研究は、味蕾を構成する味蕾細胞に注目した研究が多かったが、本研究は、味蕾という機能的細胞集団に注目した点でユニークである。本成果は、今後の味覚研究の基盤になると考える。

(2) コネキシンサブタイプの同定

味蕾には数種類のコネキシンサブタイプが発現していた。コネキシンサブタイプと味蕾細胞型の関係を今後明らかにする予定である。コネキシンサブタイプの発現は、成長によって変化する。各成長段階において、味蕾細胞に発現するコネキシンサブタイプについても明らかにする。

(3) ギャップ結合と傍分泌

単一味蕾細胞に注入した色素が、隣接する味蕾細胞を染色することがほとんど生じなかったことから、味蕾細胞間におけるギャップ結合の存在は極めて少ないことが分かった。しかし、前述したように、コネキシンの発現や種類は、成長段階によって異なることがわかっている。味蕾細胞においても、同様のことが期待できるので、成長段階のある時期にギャップ結合が多く存在している可能性もある。成長や細胞のターンオーバーという、味情報伝達とは異なる観点で、味蕾細胞におけるギャップ結合の意義を明らかにしたい。

味蕾細胞におけるヘミチャンネルおよび活動電位発生に必要な電位依存性ナトリウムチャンネルの電気生理学的特性を調べた結果、型細胞のヘミチャンネルは、約20 mV程度から開口すること、型細胞は、酸味受容体を発現する細胞(型細胞)より、低い電位で電位依存性ナトリウムチャンネルが活性化することを明らかにした。型細胞は、効率よく活動電位を発生させ、ヘミチャンネルを開口し、情報伝達を行うことを示唆した。細胞間相互作用装置の一つであるコネキシンは、味蕾細胞においては、ギャップ結合を介した情報伝達として機能するよりも、ヘミチャンネルの開口を利用した情報伝達として機能し、細胞間相互作用を可能としている。

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1件)

大坪義孝、哺乳類味蕾細胞の電位依存性Naチャンネル、日本味と匂学会誌、査読 有、17巻1号 p21-27 (2010)

〔学会発表〕(計4件)

Yoshitaka Ohtubo, Voltage-gated Na⁺ currents of each cell type in mouse taste buds, ECRO 2008, 2008.9.03, スロベニア、

大坪義孝、味蕾細胞の電位依存性ナトリウムチャンネル、第43回味と匂学会、2009年9月3日、北海道旭川市

Yoshitaka Ohtubo, Voltage-gated sodium currents of cell types in mouse taste bud cells, The 7th ISMNTOP, 2009.11.03, Fukuoka

大坪義孝、味蕾細胞電位依存性ナトリウムチャンネルの電気生理学的・分子生物学的研究、第60回西日本生理学会、2009.11.06、福岡

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者：大坪 義孝
九州工業大学 生命体工学研究科(助教)

研究者番号：00380725