

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月10日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592338

研究課題名（和文） 味蕾における選択的神経回路形成機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of neuronal network formation in mouse taste buds

## 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（和文）：

常に味細胞が更新される味蕾において、味の識別が常に正しく行われるためには、味細胞の更新が正確に行われ、かつ味情報を伝達する味神経がその味刺激に対する受容体を発現する味細胞を正確に認識して、シナプスを形成しなければならない。

本研究では、味細胞の分化制御機構の解明と、味細胞と味神経との間で行われている選択的なシナプス形成機序の解明を目的として、転写因子 *Mash1* の味細胞分化における機能と、さらに味蕾における細胞膜表面分子の発現を検索した。

味蕾において細胞膜表面分子の *N-cadherin*, *Neurexin1* の発現が RT-PCR, *in situ* Hybridization, 免疫染色によって認められた。また、味蕾内で *N-cadherin* は2型細胞のマーカーと *Neurexin1* は3型細胞のマーカーとの局在が一致した。

*Mash1* ノックアウトマウスの味蕾を検索すると3型細胞のマーカーの *AADC*, *GAD67* の発現が消失し、*Mash1* が3型細胞の分化に関与していることが推測された。味蕾細胞の細胞型には、細胞型特有の膜表面分子が発現し、味神経が特定の味細胞を認識するために、味細胞の膜表面分子を認識している可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

*Mash1* is expressed in subsets of neuronal precursors in both the central nervous system and the peripheral nervous system. However, involvement of *Mash1* in taste bud cell differentiation remained to be demonstrated. In the present study, to begin to understand the mechanisms that regulate taste bud cell differentiation, we have investigated the role of *Mash1* in regulating taste bud cell differentiation using *Mash1* KO mice. In *Mash1* KO mice, AADC-IR cells are missing both in the *Mash1* mutant circumvallate papilla epithelium and in the taste buds of soft palate. In *Mash1* KO/*GAD67*-GFP mice, GFP-positive (*GAD67* expression type III cell) cells are also missing in the taste buds of soft palate. On the other hand, *Gustducin*, a type II cell marker of taste bud, is expressed in soft palate taste bud in *Mash1* mutant mice. These results suggest *Mash1* play an important role for expression of AADC and *GAD67* in type III cell in taste buds.

Taste receptor cells are epithelial in sense that they have a limited life span and therefore must be replaced to maintain the structure of the epithelium. Therefore gustatory nerves need to make synapse with appropriate taste receptor cells. However, mechanism of recognition of taste receptor cells which express appropriate taste receptor still unknown. The cadherin superfamily of cell-cell adhesion molecules controls a series of interactions that regulate the dissociation, synapse formation. In this study,

in order to test whether the cadherins are required for formation of synapse between gustatory nerve and taste receptor cell, we have investigated expression patterns of cadherin superfamily in the taste buds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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・カドヘリン・転写制御因子・Mash1・GAD67・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の栄養性（甘味、うま味）・毒性（苦味）・腐敗度（酸味）・塩濃度の識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散在する味蕾と呼ばれる感覚器において受容されている。1つの味蕾は約50から100個の細胞により構成されていて、微細構造的に4種類の細胞に分類されている。味刺激は味細胞の先端にある味毛と呼ばれる微絨毛に存在する味受容体によって検知される。食物の味物質によって味受容体が活性化されると、味細胞が興奮し、シナプスを介して味情報が味神経に伝わり、中枢へ伝達されて味が認識される。味蕾の味細胞が受容する味は、甘味・苦味・うま味・酸味・塩味の5種類の基本味で、最近の研究でこれらの基本味の中で甘味・苦味・うま味・酸味に対する味受容体の存在が明らかになってきている。これらの味受容体は味蕾の中でそれぞれ異なる細胞に発現していることから、味蕾内の個々の味細胞は1種類の基本味に特異的に応答していることが示唆されている。味の識別が正確に行われるためには、味情報を中枢へ伝達する味神経は伝達する味に対する受容体を発現している味細胞と選択的かつ恒常的にシナプスを形成していることが必要となる。

味蕾を構成する細胞は周囲の上皮細胞と同様に、約10日の寿命を持ち、味蕾の内で常に味細胞の更新が行われている。したがって常に味細胞が更新される味蕾において、味の識別が常に正しく行われるためには味情報を伝達する味神経が、その味刺激に対する受容体を発現する味細胞を正確に認識して、シナプスを再形成しなければならない。しかしながら、味蕾においてどの様にして味神経が特定の味受容体を発現する味細胞を認識して、シナプスを形成するのかについては未だに解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、味細胞と味神経との間で行われている選択的なシナプス形成機序の解明を目的として、味細胞の細胞膜に発現しているカドヘリンスーパーファミリーをはじめとした接着分子の探索と、その機能についての解析をおこなう。まず、マウスの味蕾における接着分子の発現を RT-PCR や *in situ* Hybridization を用いて詳細に検索する。検索によって発現が認められた接着分子が、実際に味蕾のどの細胞型に発現しているのかを検索し、味細胞に発現する味受容体と接着分子との関係を検索する。また3型細胞が消失する Mash1 ノックアウトマウスを用いて、酸味伝達のシナプス形成に関わる接着分子

を検索する。さらに発現が認められた接着分子を培養舌上皮細胞に発現させ、舌咽神経節の神経細胞と共培養し、神経細胞とのシナプス形成、味受容体発現などの機能実験を行い、接着分子が味神経と味細胞との間でのシナプス形成に関与するのかを検討する。

### 3. 研究の方法

①味蕾におけるカドヘリンスーパーファミリーをはじめとした膜表面分子の発現の検索

i. RT-PCRにより、味蕾に発現する膜表面分子を検索する。

ii. 検出された膜表面分子と味細胞のマーカールと2重染色により、膜表面分子の味蕾における局在を検索

②SAGE法による味蕾における膜表面分子の検索

③Mash1ノックアウトマウスにおける膜表面分子の発現の変化検索

④初代培養舌上皮細胞に膜表面分子を発現させて、舌咽神経節細胞との共培養による神経回路形成の構築

### 4. 研究成果

我々はシナプス形成に関与する接着分子の中からクラシカルカドヘリンファミリーの発現に注目して、味蕾を含まない舌上皮と味蕾を含む有郭乳頭上皮間で、カドヘリンファミリーの発現の差を検索した。その結果、有郭乳頭上皮には舌上皮に発現が認められるP-, E-カドヘリンに加えて、R-, N-, OB-カドヘリンの発現が認められた。有郭乳頭上を *in situ* ハイブリダイゼーションにより、有郭乳頭での発現の局在を検索すると、R-, N-, OB-カドヘリンは味蕾での発現が認められた。特にR-, N-カドヘリンは味蕾細胞の一部の細胞に発現が認められ、R-カドヘリンは味蕾細胞の中で、2型細胞と3型細胞のマーカールと局在が一致し、N-カドヘリンは2型細胞のマーカールとの局在が一致した。このことから、R-カドヘリンは味細胞の膜表面に発現し、N-カドヘリンは味細胞の中でも甘味・苦味・うま味を受容する細胞に発現しているこ

とが示唆された。

さらに、RT-PCRにより、Neurexin1の発現が有郭乳頭上皮に認められた。味蕾内におけるNeurexin1の発現は味蕾の3型細胞のマーカール(AADC, NCAM)と一致した。3型細胞は味蕾内で酸味受容に関係していることから、Neurexin1は酸味受容細胞の膜表面分子としてのマーカールとして、酸味伝達神経との神経回路形成に機能していることが推測された。

SAGE法により有郭乳頭上皮と舌上皮との間で膜表面分子の発現の差を検索するとカドヘリン24(CDH24)の発現が有郭乳頭上皮において認められた。さらに *in situ* ハイブリダイゼーションにより、有郭乳頭での発現の局在を検索すると、味蕾細胞の一部の細胞において発現が認められた。味蕾細胞のマーカールと2重染色を行うと、CDH24は味蕾の2型細胞と3型細胞のマーカールの局在と一致していた。このことはCDH24は甘味・苦味・うま味・酸味を受容する味細胞に発現していることが示唆された。

初代培養舌上皮細胞にN-カドヘリンCDH24を強制発現させて、舌咽神経節細胞と共培養を行い、培養細胞と神経細胞との間に神経回路が形成されるかどうかを検索したが、膜表面分子のみの発現では、神経回路の形成は行われず、培養舌上皮細胞に味蕾細胞のマーカール等の形態的变化は観察することができなかった。このことは、味蕾における神経回路の形成のためには、膜表面分子だけでなく、味蕾細胞がもつ膜表面分子以外の因子も必要であることが示唆された。

### 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5件)

- ①瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：転写因子による味蕾細胞の分化制御 日本味と匂学会誌 18(1) 23-28, 2011.
- ② Yuji Seta, Masafumi Oda, Shinji Kataoka, Takashi Toyono, Kuniaki Toyoshima: Mash1 is required for the differentiation of AADC-positive type III

cells in mouse taste buds. *Developmental Dynamics* 240: 775-784, 2011.

③ Takashi Toyono, Yuji Seta, Shinji Kataoka, Masafumi Oda, Kuniaki Toyoshima: Differential expression of the glucose transporters in mouse gustatory papillae. *Cell Tissue Res* 345: 243-252, 2011.

④ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における細胞分化と神経回路形成について *日本味と匂学会誌* 17(1) 13-19, 2010.

⑤ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における細胞分化と神経回路形成について *日本味と匂学会誌* 16(3), 271-272, 2009.

〔学会発表〕(計17件)

① Ayae Kito, Yuji Seta, Masafumi Oda, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima, Yasuaki Kakinoki: Cell differentiation of taste bud and neuronal network formation. 4<sup>th</sup> JKBT Kitakyushu

② Yuji Seta, Ayae Kito, Masafumi Oda, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Yasuaki Kakinoki, Kuniaki Toyoshima: Cell differentiation of taste bud and neuronal network formation. 9<sup>th</sup> international Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception Fukuoka.

③ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における細胞分化と神経回路形成について *日本解剖学会総会* 横浜

④ 瀬田祐司、豊島邦昭、森本泰宏、豊野孝、片岡真司：味覚情報処理機構の解明 *九州歯科学会総会* 北九州

⑤ 瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における細胞分化と神経回路形成について *歯科基礎医学会総会* 岐阜

⑥ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における細胞分化と神経回路形成について *日本味と匂学会* 金沢

⑦ 瀬田祐司、鬼頭文恵、小田昌史、豊野孝、片岡真司、柿木保明、豊島邦昭：味蕾を創る味覚による健康の維持 *歯工学連携事業市民公開講座*

⑧ Yuji Seta, Masafumi Oda, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: Regulation of type III cell by transcription factors. The 8<sup>th</sup> International symposium on molecular and neural mechanisms of taste and olfaction perception. Fukuoka. 2010

⑨ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における膜表面分子の発現 *日本解剖学会総会* 盛岡

⑩ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味覚情報処理機構の解明 *九州歯科学会総会* 北九州

⑪ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：転写因子による味蕾細胞の分化制御 *日本味と匂学会総会* 北九州

⑫ 瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における膜表面分子の発現 *歯科基礎医学会総会* 東京

⑬ Yuji Seta, Masafumi Oda, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: Mash1 regulates the type III cell differentiation of taste buds. The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology. Kitakyushu, 2009.

⑭ Yuji Seta, Masafumi Oda, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: Requirement of Mash1 for AADC expression of the type III cell. The 7<sup>th</sup> International symposium on molecular and neural mechanisms of taste and olfaction perception. Fukuoka

⑮ 瀬田祐司、小田昌史、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 の機能について *日本解剖学会総会* 岡山

⑯ 瀬田祐司、小田昌史、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 の機能について *九州歯科学会総会* 北九州

⑰ 瀬田祐司、小田昌史、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：味蕾における細胞分化と神経回路形成について *日本味と匂学会総会* 旭川、2009

〔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・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

片岡真司 (KATAOKA SHINJI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80364149

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：