

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14957

研究課題名（和文）畜産動物における苦味受容特性の分子基盤の解明

研究課題名（英文）A study on the molecular mechanisms of bitter taste sense in livestock animals

研究代表者

吉田 悠太（YOSHIDA, YUTA）

茨城大学・農学部・助教

研究者番号：00875023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、家禽であるニワトリとウズラの苦味受容特性を比較した。行動解析の結果、ニワトリは苦味物質を濃度依存的に忌避したが、ウズラはキニーネなどの複数の苦味物質に対して全く忌避を示さなかった。ウズラの口腔にはニワトリと同様に味蕾様の器官が認められ、3種類の苦味受容体遺伝子（T2R1、T2R2、及びT2R7）のうち主にT2R7が発現していた。ニワトリの苦味受容体T2R7において苦味物質との結合に寄与するアミノ酸残基がウズラではほとんど変異しており、特定の苦味物質に対する応答性が低いことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品残渣を活用したエコフィードにおいて、主に植物由来の飼料材料には苦味物質などの忌避成分が含まれる場合がある。本研究で分子基盤の一端を明らかにしたウズラが苦味を忌避しない性質を利用して、苦味を有する未活用の飼料材料の積極的活用が期待できる。渡りを行うヨーロッパウズラの肉には毒があり、毒を持つ種子の摂取が原因とされる。他の動物が食べない苦い毒物を食べられることが進化の過程で生存に有利に働いたのかもしれない。本研究はキジ目の鳥類の進化生態学にも新たな洞察を与える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we compared the bitter taste sensing profiles of chickens and quails. Behavioral analysis revealed that chickens showed the behavioral aversion to multiple bitter substances, while quails didn't show any aversion to the bitter substances, such as quinine. Quails have taste bud-like organs in their oral cavity, and one of the bitter taste receptor genes, T2R7 was primarily expressed in their oral cavity. Compared to the chickens, the amino acid residues related to the binding of bitter substances in the bitter taste receptor T2R7 were largely mutated in the quails. Cell-based assay revealed that the responsiveness of the quail T2R7 was lower compared to the chicken T2R7. These results suggested that low sensitivity to bitter taste substances in the quails partly related to the low responsiveness of the quail T2R7.

研究分野：動物生体機構学

キーワード：苦味受容体 ウズラ ニワトリ ヨーロッパウズラ

1. 研究開始当初の背景

味覚は、動物の摂食行動を制御する化学感覚である。従って、畜産動物の味覚受容機構の解明は、畜産動物の効率的な飼養管理技術、及び新規飼料材料の開発につながる。その中でも苦味は飼料の嗜好性低下に寄与する味覚である。特に畜産動物の飼養において食品残渣を利用したエコフィードの利用が推進されており、主に植物由来の飼料材料に含まれる植物アルカロイド等の苦味成分に対する畜産動物の反応性を検討する必要がある。脊椎動物において、苦味受容体遺伝子数、並びに塩基配列は、動物種間・種内で非常に高い多様性を示すことが知られていることから、畜産動物の苦味受容体の機能的多様性を理解することが重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、畜産動物の一種であるニホンウズラに着目した。先行研究において、ニワトリは代表的な苦味物質である塩酸キニーネ溶液を忌避するが、ウズラは高濃度の塩酸キニーネ溶液に対しても全く忌避を示さないことが報告されている(浦田ら, 1992)。苦味は、食物中の毒物の存在を示す味覚であり、動物は苦味を忌避するよう進化してきたと考えられている。一部の海生哺乳類では苦味受容体の喪失が報告されているものの(Jiang *et al.*, 2012)、陸上動物において苦味の忌避は個体の生存にとって重要であると考えられるため、ウズラが苦味を忌避しないことは生物進化の観点からも興味深い。もしウズラが苦味を忌避しない場合は、これまで苦味のため使われてこなかった植物由来の飼料材料を積極的に活用する道を拓く可能性がある。そこで本研究では、ウズラの苦味受容特性を詳細に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ニワトリとウズラにおける苦味物質に対する嗜好性解析

浦田ら(1992)の再現性の確認と塩酸キニーネ以外の苦味物質に対するウズラの嗜好性を解析するため、短時間アクセス試験による行動解析を実施した。苦味溶液(0.5~3 mMの硫酸キニーネ溶液またはクロラムフェニコール溶液)、酸味溶液(16~256 mMクエン酸ナトリウム溶液)、または水をニワトリまたはウズラに5分間呈示し、それぞれの飲水量を比較した。

(2) ウズラの味蕾における組織化学的解析

ウズラの口腔における味蕾の存在を組織化学的に特徴づけるため、口蓋及び口腔底におけるH&E染色による形態観察と化学感覚細胞に特異的に存在するGタンパク質の一つであるGustducinに対する抗血清を用いた免疫組織化学染色を行った。10%中性緩衝ホルマリン液で固定したウズラの口蓋及び口腔底をパラフィン包埋して4 µm厚に薄切した。一部の切片は、定法に従いH&E染色に供した。残りの切片は免疫組織化学染色に供した。脱パラフィン処理を行い、正常ヤギ血清でブロッキングした後、500倍希釈したGustducin抗血清で一晩4℃でインキュベートした。洗浄後、蛍光標識二次抗体でインキュベートしてDAPI入り封入剤を用いて封入した。それぞれ光学顕微鏡または蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(3) ウズラの口腔組織における苦味受容体遺伝子の発現解析

ニワトリは機能的な3個の苦味受容体遺伝子(T2R1、T2R2、及びT2R7)を有する(Behrens *et al.*, 2014)。BLAST検索の結果、ウズラも類似の苦味受容体遺伝子を3個持っていることが分かった。そこで、ニワトリとウズラの口腔組織における苦味受容体遺伝子の発現を定量PCR法により解析した。検量線法を用いて内部標準遺伝子に対する相対発現量を算出した。

(4) ニワトリとウズラにおける苦味受容体のアミノ酸配列の比較

ニワトリとウズラの苦味受容特性の差異の原因を探るため、それぞれの苦味受容体のアミノ酸配列をBLAST検索により比較した。特にニワトリの苦味受容体のリガンド結合部位のアミノ酸残基に着目した(Di Pizio *et al.*, 2018)。

(5) ニワトリとウズラの苦味受容体発現細胞を用いた機能解析

ニワトリとウズラの苦味受容体の機能的差異を明らかにするため、ニワトリとウズラの苦味受容体T2R7を外来的に発現させた培養細胞を用いて、苦味物質に対する応答を蛍光カルシウム指示薬Fluo4を用いたカルシウムイメージング法により解析した。

4. 研究成果

ニワトリとウズラにおける苦味物質に対する嗜好性解析の結果、ニワトリは硫酸キニーネ溶液やクロラムフェニコール溶液を濃度依存的に忌避したが、ウズラは3 mMもの高濃度の苦味溶液に対しても忌避を示さなかった(図1A)。これらの結果は、浦田ら(1992)の塩酸キニーネを用いた報告を裏付けるものであり、塩酸キニーネ以外にも硫酸キニーネやクロラムフェニコールをウズラは忌避しないことを新たに見出した。今後の研究では、実際に飼料材料として利用される場合がある茶飲料残渣に含まれる苦味成分であるカテキンなどについても嗜好性試験を実施したい。一方で、ニワトリとウズラは同様にクエン酸ナトリウム溶液を濃度依存的に忌避したことから、酸味に対する忌避は保存されていた。

次に、ウズラの口腔における味蕾の存在を組織学的に確認するため、H&E染色及び免疫組織化

学を行った。口蓋及び口腔底における H&E 染色の結果、味蕾様の形態を示す器官を確認した。さらに免疫組織化学解析の結果、ウズラ口腔における味蕾様器官における化学感覚細胞に特異的な G タンパク質として知られる *Gustducin* の局在を見出した。以上の結果より、ウズラは苦味を忌避しないものの、機能的な味蕾を有している可能性が考えられた。今後は、ウズラの味蕾における苦味受容体タンパク質の局在についても検討したい。

次に、ニワトリとウズラの口腔組織における苦味受容体遺伝子の発現を定量 PCR 法により解析した。その結果、ニワトリとウズラの口腔組織において全 3 種の苦味受容体遺伝子 (*T2R1*、*T2R2*、及び *T2R7*) のうち、*T2R1* と *T2R2* はほとんど発現が見られなかった。一方、ニワトリとウズラの口蓋及び口腔底において *T2R7* の mRNA 発現が観察された。従って、mRNA レベルではウズラの口腔組織において少なくとも苦味受容体遺伝子のうち *T2R7* が発現していることが分かった。

次に、ニワトリとウズラの苦味受容体の機能的差異が苦味に対する応答性に寄与している可能性を疑い、ニワトリとウズラの苦味受容体のアミノ酸配列を比較した。先行研究においてニワトリの苦味受容体の苦味物質との結合に寄与するアミノ酸残基が同定されていることから (Di Pizio *et al.*, 2018)、特にこれらのアミノ酸残基について比較を行った。その結果、ニワトリとウズラの *T2R1* と *T2R2* についてはリガンド結合部位と推定されるアミノ酸残基は全て同一であった。一方、ニワトリとウズラの *T2R7* のリガンド結合部位のアミノ酸残基を比較すると、ほとんどのアミノ酸配列が異なっていた (図 1B)。このことから、ウズラが塩酸キニーネなどの苦味物質を忌避しない現象には、ウズラの口腔に発現する *T2R7* のリガンド結合部位のアミノ酸配列の差異に起因する可能性が考えられた。

最後に、ニワトリとウズラの苦味受容体 *T2R7* の機能的差異を証明するため、ニワトリとウズラの *T2R7* を発現させた培養細胞を用いた異種細胞発現系により、苦味物質に対する応答性をカルシウムイメージング法により検証した。その結果、苦味を呈するサッカリンナトリウム溶液に対して、コントロールの G タンパク質のみを導入した培養細胞は応答を示さなかったが、ニワトリの *T2R7* と G タンパク質を共発現させた細胞は一過性に応答を示した。一方、ウズラの *T2R7* と G タンパク質を共発現させた細胞は、ニワトリの *T2R7* の応答性と比較して低い応答性を示した。これらの結果から、ウズラが行動学的に苦味物質を忌避しない現象は、ウズラの口腔に発現する *T2R7* の低感受性が原因である可能性が考えられた。

本研究により、ウズラが行動学的に苦味に対して抵抗性を持つこと、及びその分子基盤の一端を明らかにすることができた。苦味は毒物の摂取を回避するための味覚であると考えられている。本来は動物の生存に重要な役割を果たすはずの苦味を失った動物は、一部の海生哺乳類を除いて報告はない (Jiang *et al.*, 2012)。興味深いことに、ヨーロッパウズラは筋肉に毒を蓄積することが知られている (Korkmaz *et al.*, 2011)。渡りを経験したヨーロッパウズラの肉を摂取すると "coturnism" と呼ばれる中毒を引き起こす場合があり、ヨーロッパウズラの筋肉における毒の蓄積は、毒を持つ種子の摂取が原因であると信じられている (Korkmaz *et al.*, 2011)。ウズラは本来生存に有利なはずの苦味を失うことで、他の動物は苦くて食べられない毒を持つ食物を摂餌できるようになり、生態学的なニッチを獲得してきたのかもしれない。本研究結果は、キジ目の進化生態学にも新たな知見を提供する可能性があり、進化系統樹を元にしたキジ目における苦味受容体の分子進化のシナリオの解明を今後の課題としたい。

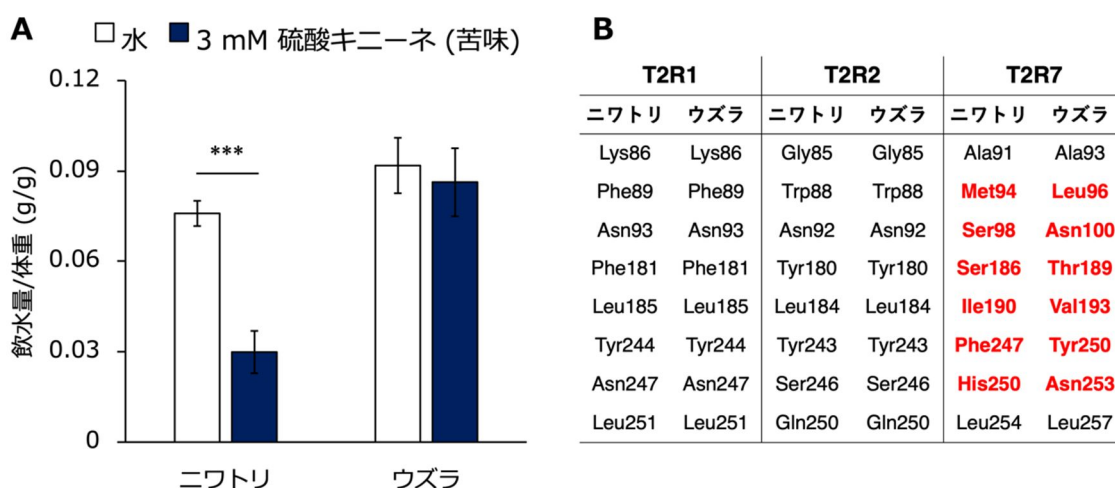


図 1. ニワトリとウズラの苦味応答と苦味受容体のアミノ酸配列の比較

(A) ニワトリとウズラにおける水と 3 mM 硫酸キニーネ (苦味溶液) の単位時間あたりの摂取量を示す。ニワトリは水と比較して苦味溶液の飲水量が有意に低下し、苦味溶液を忌避した。一方、ウズラは水と苦味溶液の飲水量は同程度であった。値は平均値 ± 標準誤差を示す (***) $p < 0.001$ by Welch's t-test)。

(B) ニワトリとウズラの 3 個の苦味受容体 (*T2R1*、*T2R2*、並びに *T2R7*) における、先行研究で報告されているニワトリの苦味受容体のリガンド結合部位のアミノ酸配列の比較結果を示す (Di Pizio *et al.*, 2018)。アミノ酸配列の差異は *T2R7* に集中していた。

参考文献：

- ◆ 浦田克博, 萬田正治, & 渡邊昭三. (1992). 家禽の基本味に対する味覚反応の行動学的研究. *日本畜産学会報*, 63(3), 325-331.
- ◆ Jiang, P., Josue, J., Li, X., Glaser, D., Li, W., Brand, J. G., Margolskee, R. F., Reed, D. R., & Beauchamp, G. K. (2012). Major taste loss in carnivorous mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 4956-4961.
- ◆ Behrens, M., Korsching, S. I., & Meyerhof, W. (2014). Tuning properties of avian and frog bitter taste receptors dynamically fit gene repertoire sizes. *Molecular Biology and Evolution*, 31(12), 3216-3227.
- ◆ Di Pizio, A., Shy, N., Behrens, M., Meyerhof, W., & Niv, M. Y. (2018). Molecular features underlying selectivity in chicken bitter taste receptors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 6.
- ◆ Korkmaz, İ., Güven, F. M. K., Eren, Ş. H., & Dogan, Z. (2011). Quail consumption can be harmful. *The Journal of Emergency Medicine*, 41(5), 499-502.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida Yuta, Fujishiro Shu, Kawai Ryota, Kawabata Fuminori	4. 巻 18
2. 論文標題 Characterization of taste sensitivities to amino acids and sugars by conditioned taste aversion learning in chickens	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 animal	6. 最初と最後の頁 101050 ~ 101050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.animal.2023.101050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuta, Tanaka Ryota, Fujishiro Shu, Nishimura Shotaro, Tabata Shoji, Kawabata Fuminori	4. 巻 59
2. 論文標題 Conditioned Taste Aversion to L-Amino Acid Taste Stimuli and Oral Transcriptional Changes to Type 1 Taste Receptors T1R1 and T1R3 on Chronic Exposure to L-Alanine Solution in Chickens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 348 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0210128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuta, Nishimura Shotaro, Tabata Shoji, Kawabata Fuminori	4. 巻 78
2. 論文標題 Chicken taste receptors and perception: recent advances in our understanding of poultry nutrient-sensing systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World's Poultry Science Journal	6. 最初と最後の頁 5 ~ 20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00439339.2022.2007437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田悠太, 藤代柊, 河合亮汰, 川端二功
2. 発表標題 ニワトリが味覚を感じるアミノ酸と糖のプロファイリング
3. 学会等名 日本家禽学会 2023年度秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤代柊, 川端二功, 吉田悠太
2. 発表標題 ニワトリが味覚を感じるL-アミノ酸のプロファイリング
3. 学会等名 日本畜産学会 第130回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------