

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25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570134

研究課題名（和文） 味蕾細胞の機能形成機構の解析

研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of functional differentiation of taste bud cells

研究代表者

榎森 康文（EMORI YASUFUMI）

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60160389

研究成果の概要（和文）：味覚を担う味蕾を構成する細胞は、成体でも常に置換わる上皮系の細胞であり、同一の系譜から分化して機能する。しかし、この分化機構に関しては多くが不明なため、本研究では、味蕾に発現する転写因子を検索し、その発現や機能を検討した。その結果、MEF2ファミリーとNFATファミリーの転写因子が、味覚受容機能を担うII型細胞で分化開始と共に発現することを発見し、その調節機構として、味受容機構であるカルシウムシグナリングと関連していることを示した。

研究成果の概要（英文）：Taste bud cells, belonging to epithelial cell lineage, play essential roles in taste perception, and continuously turnover even in the adult stage. Many aspects about their differentiation are unknown, then, in this study, I searched for transcription factors expressed in taste bud cells, and investigated the expression and function of these factors. As a result, I found two factors of MEF2 and NFAT families, and found that they begin to express concomitantly with the differentiation of type II cells which have main taste sensations. In addition, the regulatory process is related to the calcium signaling of taste transduction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・機能生物学

キーワード：味覚、味蕾、分化、転写因子

1. 研究開始当初の背景 近年の味覚研究で解明された主要な味覚受容体の同定とそれらを発現する異なる細胞種の解析、および、私たちが行った味蕾細胞の分化時期と寿命の解明によって、これまでは全く未知であった味蕾細胞の分化と機能発現を解析する基

盤ができた。具体的には、味受容細胞を含むすべての味蕾細胞は成体においてもターンオーバーしていることはよく知られていたが、私たちの研究から、(1)味蕾細胞のうち約半数は短寿命で、周辺の上皮細胞とほぼ同じ3～4日程度の寿命である、(2)残りの半

数の味蕾細胞は長寿命で、平均2週間以上の寿命を持ち、長いものでは1ヶ月以上生存する、(3)長寿命の細胞には味受容細胞が30%程度含まれ、分化に1週間以上かかる、(4)分化マーカーであるMash1は一部の細胞に分裂後5~6日に発現のピークを持つものの、長期間にわたって低い頻度で発現する、(5)味受容細胞の機能マーカーであるPLC β 2は、分裂後6日ごろに一過的な発現ピークをむかえた後、従来は寿命とされていた10日以降に最大の発現ピークを持つことなどがわかった。これによって、次段階として味蕾細胞の分化過程や分化因子の研究が可能になった。すなわち、味蕾細胞が味受容細胞などの機能的な細胞になるには、まず何らかの生存シグナルを受けて長寿命の細胞となり、次に分化シグナルを受けて分化することが必要であり、また、分化するまでには、従来は寿命とされていた期間(10日程度)かかる。本研究では、こうした味覚研究のパラダイム変換を踏まえ、味蕾細胞がどのような機構によって、いつ機能発現するのか、また、それを生み出し、維持する分子を同定することを目指した。

2. 研究の目的 味蕾細胞が成熟し、その機能がピークに達するのは、分裂から10~20日目であり、甘味・旨味および苦味受容細胞の機能的マーカーであるPLC β 2の発現が開始するのは6日目ごろからである。したがって、味受容細胞系譜の決定と分化開始は3~6日目と予想される。これは分化マーカーであるMash1の発現ピークとほぼ一致するが、Mash1の発現頻度は味受容細胞マーカーの発現頻度よりもかなり小さいことから、Mash1自体が味受容細胞系譜の決定因子ではないと考えられる。したがって、現時点では味受容細胞の分化決定因子は未知であり、分化因子を上流から下流方向へとたどることで味受容細胞機能を与える分子系列を順次解明することは困難である。そのため、味受容細胞において味覚受容・シグナル伝達系の発現に関わる転写因子を同定する方向(下流)から研究を行う必要がある。特に、甘味、旨味、苦味の受容において共通のCa $^{2+}$ シグナリング系の下流因子となっているPLC β 2、IP $_3$ R3、

TRPM5をコードする遺伝子に作用する転写因子の同定が重要である。これらの因子のうち、少なくともPLC β 2は味受容細胞分化の比較的初期から発現を開始していることから、味受容細胞の最終分化と味受容細胞機能発現の両方にPLC β 2をはじめとするCa $^{2+}$ シグナリング関わっている可能性が高い。そこで、本研究では、Ca $^{2+}$ シグナリングによって影響を受け、かつ、次の段階で上記のCa $^{2+}$ シグナリング関連遺伝子の転写の制御を行う転写因子を検索する。これを端緒に、以下の研究を行うことによって各種の味蕾細胞機能を決定する転写ネットワークを解明する予定である。すなわち、(1)Ca $^{2+}$ シグナリングを担う転写因子の解析と従来解析系の改良による細胞齢における位置づけ、(2)Ca $^{2+}$ シグナリング系を持つ細胞を分化させる因子の同定と解析を行う。これによって、味蕾細胞の機能特性を、主要な転写因子とそれがもたらす機能ネットワークとして提出することを目的とした。

3. 研究の方法 味覚の細胞内シグナル伝達系の主経路であるCa $^{2+}$ シグナル伝達経路を構成する因子に共通に作用する転写装置を解明する。将来的には、これを構築する過程で作用する転写因子、と順次分化過程を遡って鍵因子を同定し、味受容細胞(タイプII細胞)が分化する分子機構の概要を知ることが念頭に置いている。また、これらの転写因子の機能を、培養細胞系を用いてカルシウムシグナリング経路の転写、および、カルシウムシグナリングによる調節という観点から解析する。

(1) Ca $^{2+}$ シグナリングを担う転写因子の解析と細胞齢における位置づけ

味受容細胞のうち甘味・旨味受容細胞と苦味受容細胞には、PLC β 2、IP $_3$ R3、およびTRPM5というCa $^{2+}$ シグナリング系の分子が共通に発現している。さらに、PLC β 2の味受容細胞特異的な発現制御領域は転写開始点上流数kbp以内に存在することも知られている。ここでは、Ca $^{2+}$ シグナリング系に関わる転写因子の同定を行い、これが味蕾特異的遺伝子に対してどのような制御を行っているかを解明する。

①Ca²⁺シグナリングによって影響を受け、また、それを調節する可能性を持つ一連の転写因子の味蕾における発現様式を、RT-PCR 法、*in situ*ハイブリダイゼーション法、および、免疫組織染色法によって明らかにする。

②上記因子と PLCβ2 などとの二重染色から味受容細胞系列における発現を検討するとともに、これまでに確立している細胞年齢計測法を用いて、各転写因子の発現細胞の細胞年齢を特定する。

③マウス・ラット・ヒトのゲノムデータから PLCβ2、IP3R3、および TRPM5 の転写開始上流域の配列情報とゲノム DNA 断片を得ると共に、相同性や各種転写制御因子の結合配列のプロフィールから味受容細胞特異的な発現を担う領域を推定する。

(2) Ca²⁺シグナリング系を持つ細胞を用いた転写因子機能の解析

①上記転写因子の解析に適した培養細胞株を用いて、味受容細胞特異的な転写因子の作用(転写活性化と Ca²⁺シグナリングによる制御)を明らかにする。具体的には、一過的発現によるレポーター遺伝子アッセイを行う。

②上記の基本的な転写活性化能と複数の因子の組み合わせ効果、および、標的 DNA 領域の推定と解析を、上記の培養細胞系を用いて行う。

③転写因子自身の機能の Ca²⁺シグナリングによる制御を外来のリガンドによる Ca²⁺シグナリング系の活性化による転写活性化能の変化として解析する。

4. 研究成果

Ca²⁺シグナル伝達経路を構成する因子に共通に作用する可能性をもつ転写装置をカルシウムシグナリング経路という観点から検索した。その結果、MEF ファミリーに属する転写因子の一つ(転写因子 X)と、NFAT ファミリーに属する転写因子の一つ(転写因子 Y)が RT-PCR 法で味蕾に発現することを発見した。この二つの転写因子に関連して、これらの発現と機能を解析し、次のような結果を得た。

(1) 転写因子 X および Y の発現解析と細胞年齢における位置づけ

味受容細胞のうち甘味・旨味受容細胞と苦

味受容細胞には、Ca²⁺シグナリング系の分子が共通に発現している。これらのタイプ II 細胞における発現を解析した結果、いずれも既知のマーカーと 90%以上重複する細胞で発現していることが判明した。BrdU による分裂細胞の標識とその後の継時的な発現過程を解析した結果、予想されたように、発現する細胞年齢も PLC-β2 と同様であり、分裂後 3 日から 2 週間以上まで発現しており、タイプ II 細胞の分化時期および寿命にほぼ一致した。

(2) 培養細胞を用いた転写因子 X および Y の解析

上記で同定した転写因子 X および Y の転写活性化能などの解析に適した培養細胞系として、関連する内在性因子を有する Jurkat 細胞等を選んだ。この細胞系を用い、ルシフェラーゼをレポーターとしてこれに PLC-β2 上流領域を連結したコンストラクトを作成し、一過的発現によってレポーターアッセイを行った。その結果、内在性因子だけではレポーター遺伝子の発現量は少なかったが、転写因子 X の導入によって大幅に増加した。さらに、この量は転写因子 Y の共発現によってさらに増加した。したがって、転写因子 X と Y は、PLC-β2 遺伝子の上流域に協同的に作用して、祖の転写を活性化していることがわかった。

(3) 転写因子 X および Y の Ca²⁺シグナリングによる制御

転写因子 X と Y が発現するタイプ II 細胞は、味覚受容とともに Ca²⁺シグナリングが発生し、味覚伝達をはじめとするさまざまな応答を示す。また、タイプ II 細胞の分化時にもこれらの Ca²⁺シグナリングを担う因子が発現することから、転写因子系列と Ca²⁺シグナリングがフィードバックループを形成している可能性がある。そこで、この点を上記(2)のアッセイ系で検討したところ、外部刺激による Ca²⁺シグナリングによって、転写因子 X と Y を介した PLC-β2 領域への作用がさらに昂進することがわかった。

(4) 総括

本研究によって得られた 2 つの転写因子が機能する味蕾細胞で発現していたことは、同じ転写因子が分化途中の神経細胞や感覚上

皮細胞で発現していることから予想外であった。それが何を意味するかは現時点では不明であるが、味蕾細胞の寿命が短いため、最終分化に至らない時期から味覚受容と味覚伝達という、味覚機能を示すことと関係するのかもしれない。そのため、味蕾細胞の初期分化を担う分子を同定することは本研究ではできなかったが、さまざまな点で興味深い知見が得られたと考えている。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- 1 Lifespans of type II and type III cells of mouse taste buds in circumvallate papillae. Togawa H., Asano-Miyoshi M., and Emori Y., 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜、横浜市
- 2 ショウジョウバエの二つの組織普遍的カルパイン(カルパイン A と B)の酵素学的性質の類似性と相違点。東海林保志、小田有沙、榎森康文、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会、共同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド、神戸市

[図書] (計 1 件)

- 1 シグナル伝達キーワード事典、榎森康文、他、羊土社、2012、p16-18、および p274-282

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎森 康文 (EMORI YASUFUMI)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：60160389