

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23248058

研究課題名(和文) 味覚シグナルの発信・伝導・認知の分子論的統合解析

研究課題名(英文) Integrated molecular analysis of taste signal generation, transmission and cognition

研究代表者

阿部 啓子 (Abe, Keiko)

東京大学・農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：10151094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 39,100,000円、(間接経費) 11,730,000円

研究成果の概要(和文)：味覚システムの統合的解析は、(1)塩味受容(type I)細胞の膜電位特性を構築する遺伝子Ano1, Kene3, Sec61a1を見い出した。(2)PLC-beta2-WGAメダカの解析から、苦味およびアミノ酸の受容味細胞から終脳にいたる味覚伝達路の全容を解明した。PKD1L3-WGAマウスの酸味受容細胞からNST味覚領域の可視化にも成功した。(3)マウス離乳期に大脳味覚野で発現するSNAP25, EGr-2, Krox-20マーカー遺伝子が離乳期に固形食を摂取させたマウスでは流動食摂取に比べ顕著な発現化が生じた。(4)味覚刺激と食物選択に相関性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Outline of the research: For the integrated analysis of taste systems, (1) we found the target genes Ano1, Kene3, Sec61a1 that are involved in construction of electric potential of saltiness reception (type I) cell membrane; (2) PLC-beta2-WGA medaka fish analysis led to comprehensive elucidation of the taste transmission pathway from bitterness/amino acid receiving cells to the endbrain and the visualization of saltiness-receiving cell to the NST taste area in PKD1L3-WGA mice was successive; and (3) integrated expression markers in weaning mice, SNAP25, EGr-2 and Krox-20, were distinctly activated its signal in the taste area when the mice were given a solid food at the stage of weaning in comparison with the case that they were still given a liquid food. (4) we also showed that there is a relationship between the tastant quality in diet and the food intake.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：食品 味覚 脳・神経 シグナル伝達 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

味の感覚（味覚）は人間の生存・生活のシグナルとなる重要な生命事象である。食品に含まれる味物質の情報は、味蕾、味神経を介して脳に伝達され、味が認知される。研究開始当初は、主に口腔・神経・大脳生理学によって個別の視点から、しかも現象論的に解析されてきた。味物質であるリガンドと味覚受容体が出会う味蕾、その味情報を伝える味神経伝導路、味覚を認識・識別する中枢の3ステージで生じる事象を分子レベルで解析し、味覚の受容から認知までを統合的に解明する研究はほとんどなかった。そのような状況下、我々は、ヒト味覚計測用培養細胞系の樹立、基本味受容細胞を完全消失したマウス・基本味伝達路を神経トレーサーコムギレクチン(WGA)で可視化するマウスの創出技術の構築など「味覚シグナルの発信・伝導・認知の分子論的統合解析」を実施する環境が整っていた。

## 2. 研究の目的

味覚システムの統合的解析：基本味と受容体の結合様式、その味シグナルを伝導する味神経細胞の分子特性や伝導路の時空間情報、中枢における認識部位の連結を、基本5味毎に解析する。とくに、塩味受容細胞を特徴づける遺伝子群を探索する。味物質発信（味蕾ステージ）伝達（味神経ステージ）認知（中枢ステージ）に至る味覚システムの統合的解析を行うため、WGAを味蕾細胞に導入したマウスおよびメダカを用いて、味覚伝導路を可視化する。

食刺激に伴って活性化する味覚認知地図の基盤確立：基本5味の味覚のみならず体性感覚（辛味、渋味、温度、弾力など）の食刺激によって生じる中枢認識部位を複数の分子マーカーを探索し、味覚認知地図を作成する。また分子マーカーを用いて、離乳期の食刺激による神経可塑性を解析し食育の科学的新側面を拓く。

食欲や食事が生理応答に影響する味覚感覚の解析：ヒトを含めた動物は甘味（ショ糖）と旨味（アミノ酸）を嗜好し、苦味を忌避する。このような「おいしい」「まずい」の食感の食

欲への関与、また、ショ糖摂取に伴うインスリンシグナリング系への関与を、甘・旨・苦味の認識・識別不全マウスを用いて測定し、味覚と栄養の関連性を解析する。

## 3. 研究の方法

・WGA導入動物の作出：酸味受容体PKD1L3プロモーターの下流にWGAを導入したマウスならびにPLC-β2プロモーターの下流にWGAを連結したメダカを作出した。

・DNAマイクロアレイ解析：野生型およびSkn-1aKOマウスの舌に存在する有郭乳頭上皮および乳頭外の舌上皮を用いてDNAマイクロアレイ解析（アフィメトリクス）を行った。

・摂食行動試験：AIN-93Gに甘・酸・塩・苦・うま味物質を添加した餌と無味餌の1種ずつ提示し、摂食量を測定した。また、2餌提示実験により嗜好性を測定した。

## 4. 研究成果

味覚システムの統合的解析：野生型マウスの有郭乳頭上皮(WT-CvP)、乳頭外の舌上皮(WT-Np)、Skn-1ノックアウト(S-KO)マウスの有郭乳頭上皮(KO-CvP)の3種類のサンプルについて、DNAマイクロアレイ解析を行い、味蕾特異的に発現する遺伝子を抽出した。type I, II, IIIに特異的に発現する候補遺伝子を抽出し *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を行った。その結果、*Ano1*, *Kcne3*, *Sc61a1* が塩味受容を担う type I 味蕾細胞に特異的に発現していることを見出した (図1)。さらに酸味受容を担う type III 味蕾細胞に前シナプス分子の1つであるコンプレキシン2が発現することを明らかにし (図1)、この分子をノックアウトしたマウスは、酸味に対する感受性が顕著に低下することを示した。

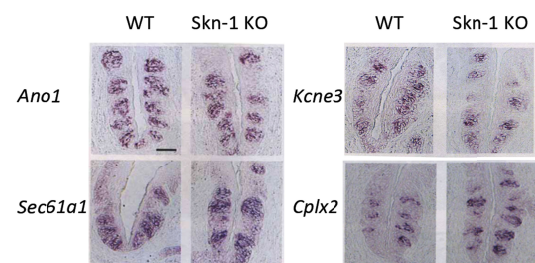


図1 味蕾細胞type Iおよびtype IIIに発現する遺伝子

C57BL/6 マウスは生後 18 日目までは母親からの授乳のみに依存し、19 日目から固形食を摂取する。離乳前後の 17 日目および 21 日目に大脳皮質を摘出し、タンパク質量を調べたところ、それぞれ核、軸索、グリアのマーカーである NeuN、MAP2、GFAP には変化が見られなかったけれど、シナプスに局在する SNAP25 が 3 倍に増えていた。離乳期に固形食を与えないマウス群と与えたマウス群の大脳皮質における SNAP25 の局在は固形食を与えた群にのみ観察され、体性感覚野に限定されていた(図 2)。次に、離乳期に固形食を

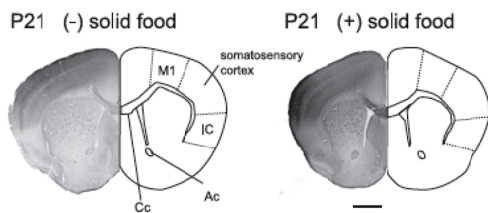


図2 固形食を与えた群(右)あるいは与えない群(左)のマウス大脳皮質におけるSNAP25の発現

えず、甘味を呈するサッカリン溶液と、痛覚を刺激するカプサイシン溶液を個別に提示したマウス群で大脳皮質における SNAP25 の局在を比較したところ、前者では味覚野に、後者では体性感覚野に、それぞれ蓄積していた。以上から、離乳期の刺激に依存して対応する領域でシナプスの活発な新生ないし再構築が起こっていることが示唆された(図 3)。

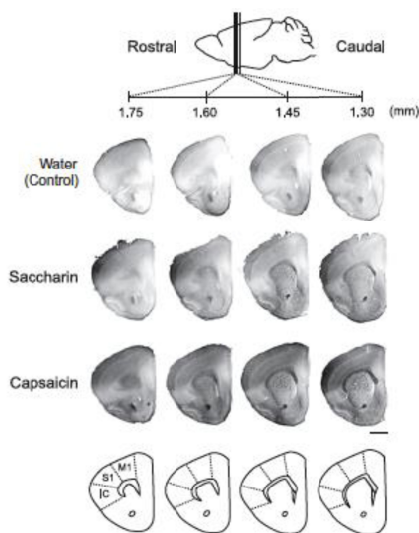


図3 離乳期に水(上)、サッカリン(中)およびカプサイシン溶液を与えた大脳皮質におけるSNAP25の発現

C57BL/6 マウスは生後 19 日目から固形食

を摂取するようになる。この時期の大脳皮質味覚野・体性感覚野の遺伝子発現特性として、ミエリン鞘形成関連タンパク質、転写調節因子群の上昇が際立ち、転写を伴う活発な軸索ネットワークの新生が起こっていることが示唆された。その 1 つ、転写調節因子

Egr-2/Krox-20 の mRNA シグナルは、離乳前は主に細胞質に、離乳後は細胞体外に多数の点状で観察され、樹状突起あるいは軸索構造における翻訳の増加が神経回路の再構築に関与することが推定された(図 4)。

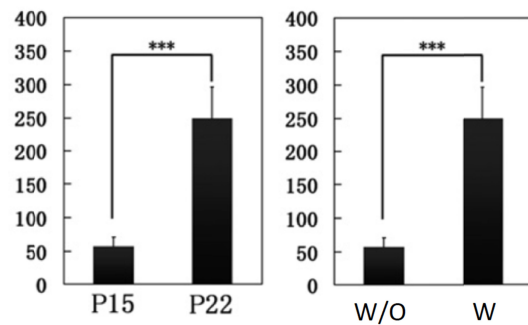


図4 大脳皮質味覚野・体性感覚野のEgr-2/Krox-20シグナルのP15およびP22における発現量(左)とP22における固形食有(W)無(W/O)による発現量

食刺激に伴って活性化する味覚認知地図の基盤確立：脊椎動物における味の情報伝達・認識に関わる神経細胞の詳細を解明するためのモデル動物として、小型魚類であるメダカに着目した。メダカは、マウスに比べて味蕾の数が多い、脳のサイズが小さい、神経が短いなどの特徴があるため、神経トレーサーの輸送効率が良い。また個体サイズが小さいため、遺伝子やタンパク質の局在を脳全体で網羅的に解析することが容易であり、味覚中枢神経の解析に有用な実験動物である。

味蕾細胞の 50% 以上に発現する PLC-β2 遺伝子のプロモーター下に WGA を導入した PLC-β2-WGA メダカを作出した。WGA は時間を経るごとにシナプスを介して徐々に高次中枢まで輸送されることが示された。図 5 に示すように WGA シグナルは、12 日齢の稚魚では、味蕾、味神経を含む 3 つの神経節、味覚 1 次中枢である迷走葉(XL)を含む延髄の複数の神経核で観察された。3 ヶ月齢では、新たにもう 1 つの味覚 1 次中枢である顔面葉(VIIL)、峡の味覚 2 次中枢である第 2 味覚核(NGS)、間脳と終脳の一部の神経核で観察さ



れた。9ヶ月齢では新たに間脳の味覚3次中枢である下葉分散核(NDLI)・系球体第3味覚核(pTGN)に検出された。哺乳類の味覚高次中枢である大脳皮質味覚野に対応するとされる終脳の背側野内側部の背側部(dDm)でも検出された。PLC-β2-WGAメダカを用いることで、哺乳類の味蕾から味覚高次中枢までの神経回路の可視化に初めて成功した(図5)。

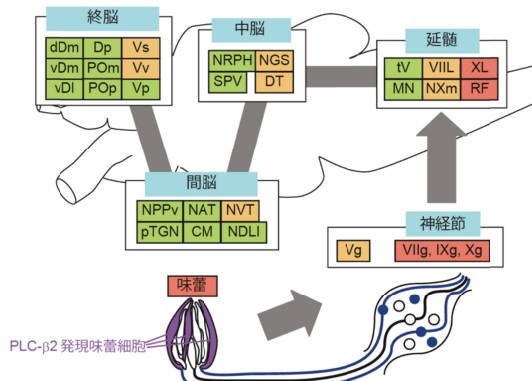


図5 PLC-β2 WGAメダカにおけるWGAタンパク質の経時的な輸送  
赤: 12日齢、橙: 3ヶ月齢、緑: 9ヶ月齢でWGAが検出された領域

酸味受容体候補分子PKD1L3プロモーターの下流にWGAを連結させたPKD1L3-WGAマウスを作成し酸味伝達経路を解析した。NPGの片側で約300細胞(約5%)、GGの片側で約10細胞(約1%)にWGAシグナルが観察された。これまで電気生理学的に証明されていた鼓索神経の葉状乳頭への投射を、初めて解剖学的に示した。酸味情報伝達神経の細胞体が舌咽神経に局在することから、NPGの中でも舌咽神経と迷走神経の細胞体の位置が大きく分かれている可能性が示唆された。WGA陽性細胞はP2X2とP2X3を発現したが、TRPV1は発現していなかった。高次のNSTにおいては、吻側800μmの範囲で強いシグナルが観察され、前後軸方向と垂直な面では味覚領域である中央背側にシグナルが分布していた(図6)。

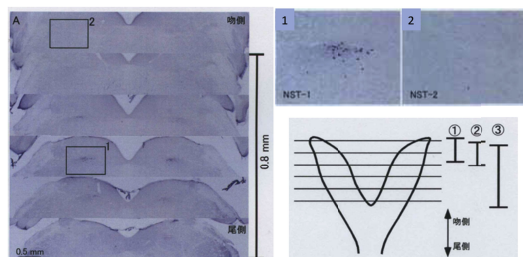


図6 NSTにおけるWGA陽性細胞の分布(前後軸方向)

食欲や食事が生理応答に影響する味覚感覚の解析: 食物由来の味覚刺激が摂食行動に与える影響を明らかにするため、野生型(WT)マウスに対して味物質添加餌を与え、摂食量の解析を行った。その結果、嗜好味では摂食量は変化しなかったが、高濃度の苦味では摂食量の低下が生じた。甘・苦・旨味の受容味細胞が消失し、これら3味を知覚できないS-KOマウス(図7)でもWTマウスと同様に忌避味に対する摂食量が低下した(図8)。しかし、忌避する割合は減少したことから味覚感知機能消失が忌避の緩和を引き起こした可能性が示唆され、摂食行動は味覚による影響を受けると考えられた。次に、食物選択における味覚刺激の関与を2種類の餌を同時に提示する嗜好性試験にて評価した。甘味に対してはWTマウスのみで味覚刺激依存的な嗜好性を示し、苦味に対しては両マウス共に忌避が見られたが、S-KOマウスの忌避の程度はWTマウスに比べ緩和され、味覚刺激が食物選択に影響することが示唆された(図8)。

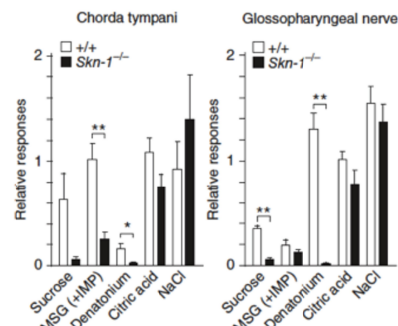


図7 S-KOマウスの味神経応答

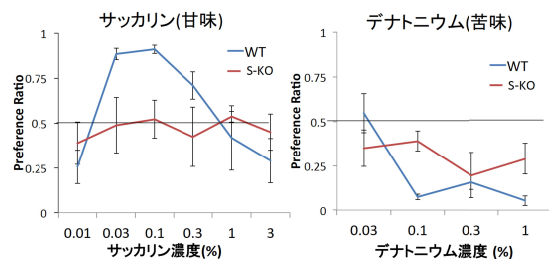


図8 嗜好性試験(2餌提示実験)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計24件)全て査読有り

1. Yamamoto, Abe, K. (7/8) Effects of inhaled (S)-linalool on hypothalamic gene expression

- in rats under restraint stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 2413-2418 (2013). [doi:10.1271/bbb.130524]
2. Kamei, A., Okada, S., Abe, K. (4,10/10) Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression profiles in rats. *PLoS ONE*, 8, e65732 (2013). [doi:10.1371/journal.pone.0065732]
  3. Abe, K. Introduction: Taste Perception, *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 199 (2013). [doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.03.003]
  4. Matsumoto, I., Abe, K. (3/3) Functional diversification of taste cells in vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 210-214 (2013). [doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.10.004]
  5. Maeda, N., Okada, S., Abe, K., Aizawa, H. (7,8,9/10) Differential expression analysis throughout the weaning period in the mouse cerebral cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431, 437-443 (2013). [doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.150]
  6. Ieki, T., Okada, S., Abe, K. (2,5/7) Transgenic labeling of higher- order neuronal circuits linked to phospholipase C- $\beta$ 2-expressing taste bud cells in medaka fish. *J. Comp. Neurol.*, 521, 1781-1802 (2013). [doi:10.1002/cne.23256]
  7. Kawakami, S., *et al.* Accumulation of SNAP25 in mouse gustatory and somatosensory cortices in response to food and chemical stimulation. *Neuroscience* 218, 326-334 (2012). [doi:org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.045]
  8. Ishimaru, Y., Abe, K. (5/5) Expression analysis of taste signal transduction molecules in the fungiform and circumvallate papillae of the rhesus macaque, *Macaca mulatta*. *PLoS ONE*, 7, e45426 (2012). [doi:10.1371/journal.pone.0045426]
  9. Abe, K. Studies on food functionality and safety in Japan—Evaluation by genomics. *J. Food and Drug Analysis* 20, 208-212 (2012).
  10. Homma, R., Ishimaru, Y., Abe, K. (6,7/8) Identification of bitterness-masking compounds from cheese. *J Agric. Food Chem.* 60, 4492-4499 (2012). [doi: 10.1021/jf300563n]
  11. Masuda, K., Abe, K. (5/7) Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS ONE*, 7, e35380 (2012). [doi:10.1371/journal.pone.0035380]
  12. Imai, H., Ishimaru, Y., Abe, K. (3,7/9) Functional diversity of bitter taste receptor TAS2R16 in primates. *Biol. Lett.* 8, 652-656 (2012). [doi:10.1098/rsbl.2011.1251]
  13. Ishii, S., Okada, S., Abe, K. (4,5/6) The use of mammalian cultured cells loaded with a fluorescent dye shows specific membrane penetration of undissociated acetic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 523-529 (2012). [doi: 10.1271/bbb.110824]
  14. Fujiwara, S., Okada, S., Abe, K. (4,6/7) Sweeteners interacting with the trans-membrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures. *Food Chem.*, 130, 561-568 (2012). [doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.073]
  15. Yamamoto, K., Ishimaru, Y., Abe, K. (2,6/6) Genetic tracing of the gustatory neural pathway originating from *PKD113*-expressing type III taste cells in circumvallate and foliate papillae. *J. Neurochem.*, 119, 497-506 (2011). [doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07443.x]
  16. Koizumi, A., Abe, K. (10/10) Human sweet taste receptor mediates acid-induced sweetness of miraculin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 16819-16824 (2011). [doi:10.1073/pnas.1016644108]
  17. Yao, R., Abe, K. (10/10) Polyphenols in alcoholic beverages activating constitutive androstane receptor, CAR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1635-1637 (2011). [doi:10.1271/bbb.110444]
  18. Ueno, Y., Okada, S., Abe, K. (3,4/5) Human bitter taste receptors hTAS2R8 and hTAS2R39 with differential functions to

- recognize bitter peptides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1188-1190 (2011).  
[doi:10.1271/bbb.100893]
19. Matsumoto, I., Abe, K. (5/5) Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat. Neurosci.*, 14, 685-687 (2011).  
[doi:10.1038/nn0911-1217f]
20. Nakajima, K., Abe, K. (10/10) Non-acidic compounds induce the intense sweet taste of neoculin, a taste-modifying protein. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 75, 1600-1602 (2011).  
[doi:10.1271/bbb.110081]
21. Nakajima, K., Abe, K. (11/11) Identification and modulation of the key amino acid residue responsible for the pH sensitivity of Neoculin, a taste-modifying protein. *PLoS ONE*, 6, e19448, (2011).  
[doi:10.1371/journal.pone.0019448]
22. Ito, K., Abe, K. (7/10) Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.*, 408, 177-186 (2011).  
[doi:10.1016/j.jmb.2011.02.028]
23. Ohmoto, M., Okada, S., Abe, K. (2,4/5) Mutually exclusive expression of Gαia and Gα14 reveals diversification of taste receptor cells in zebrafish. *J. Comp. Neurol.*, 519, 1616-1629 (2011). [DOI:10.1002/cne.22589]
24. Fujimoto, C., Ishimaru, Y., Abe, K. (2,7/7) The single pore residue Asp<sup>523</sup> in PKD2L1 determines Ca<sup>2+</sup> permeation of a PKD1L3/PKD2L1 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404, 946-951 (2011). [doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.086]

[学会発表](計7件)

吉岡美紗子他「マウス小腸上皮における味覚関連遺伝子群の発現解析」日本農芸化学会 2012 年度大会 2013.3.27 (仙台)  
牛尼翔太他「人工甘味料の摂取がマウス肝臓遺伝子発現プロファイルに与える影響の網羅的解析」日本農芸化学会 2013 年度大会 2013.3.25 (仙台)  
黒川あずさ他「味蕾におけるアノクタミン

ファミリーの細胞種特異的発現」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012.3.23 (京都)  
前田尚廣他「味神経における味覚情報コーディング機構の解析」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012.3.24 (京都)  
家木誉史他「メダカ PLC-2 発現細胞を起点とした経シナプス性トレーサー輸送の経時的解析」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012.3.24 (京都)  
古泉文子他「ヒト甘味受容体における低分子甘味物質の相互作用部位の同定」日本農芸化学会 2011 年度大会 2011.3.26 (京都)  
伊藤俊輔他「離乳マウスの脳体性感覚野における SNAP25 発現の経時変化」日本農芸化学会 2011 年度大会 2011.3.26 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 啓子 (ABE, Keiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：10151094

(2) 研究分担者

藍沢 広行 (AIZAWA, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：90221704

(3) 連携研究者

石丸 喜朗 (ISHIMARU, Yoshiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10451840

岡田晋治 (OKADA, Shinji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：50376563