

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689076

研究課題名(和文) 味蕾内 GABA 系を介した味細胞の機能的成熟

研究課題名(英文) The roles of GABA on development and function of taste bud cells

研究代表者

吉田 竜介 (Yoshida, Ryusuke)

九州大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60380705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000 円、(間接経費) 5,430,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、末梢の味覚受容器官である味蕾の形態的な発生・発達やその神経支配の過程において味蕾内の GABA は明確な役割を持たない可能性、味蕾内で GABA は一部味細胞の興奮により放出されること、味細胞の細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度は非常に高く、GABA により興奮性の応答が生じることを示し、味蕾内では GABA は主に味覚受容の調節機構の一旦として機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study has demonstrated that (1) GABA may not have a pivotal role in development of taste buds or taste cells and in innervation of gustatory nerve fibers to taste buds, (2) GABA may be released from a subset of taste cells, possibly Type III cells, by depolarization of these cells, (3) intracellular Cl<sup>-</sup> concentration in taste cells may be very high therefore GABA would induce excitatory responses in these taste cells. These results suggest that GABA may play some roles in modulation of taste sensitivities in taste buds.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：味細胞 GABA 遺伝子改変マウス 味覚 発達 Cl<sup>-</sup>濃度

## 1. 研究開始当初の背景

食物に含まれる化学物質は舌や口蓋に存在する味蕾内の味細胞により検知され、その情報は味神経を通じ脳へと伝達される。味覚情報は甘味(エネルギー)、うま味(アミノ酸・タンパク質)、塩味(ミネラル)、酸味(酸)、苦味(苦味)の5基本味に分類され、味蕾にはこれら基本味に特異的に応答する味細胞や、複数の味質に応答を示す味細胞が混在している。味蕾細胞は形態学的に I-IV 型に分類され、そのうち II 型細胞は甘、うま、苦味受容細胞、III 型細胞は酸特異的、または多種の味質に応答する味細胞である。塩味特異的細胞は存在するが、その細胞型は同定されていない。これら味細胞の味覚応答特性と、それらと接続する味神経線維の味覚応答特性は非常に近似しており、味細胞レベルで弁別された情報は特異的な味覚情報ラインを通じ中枢へと伝達される可能性が示唆される。このように成熟味細胞の機能は徐々に明らかとなりつつあるが、味細胞は約 10 日という早いサイクルでターンオーバーしており、その過程でどのようにして機能的成熟を果たし、特異的な神経接続を得るのかについては不明な点が多い。しかし、味蕾内で短い周期で起こるこのようなダイナミックな過程は、他の神経系における分化・発生・再生の研究モデルとしても活用できるのではないかと考えられる。

味神経を挫滅すると一時的に味蕾は萎縮・消失するが、神経再生に伴って味蕾は再生し、最終的には挫滅前と同様の味覚情報ラインが形成される。この味覚情報ラインの再生過程を追うと、塩味を抑制するアミロライドに感受性を持つ塩味感受性神経線維が非感受性の塩味感受性神経線維に遅れて出現し、甘味を抑制するグルマリンに感受性を持つ甘味感受性神経線維が非感受性の神経線維に遅れて出現する。また、相乗効果を示すうま味感受性神経線維が示さない神経線維に遅れて出現する。このように、味覚情報ラインにより再生時期に差が生じる。再生過程において先に出現する神経線維の応答性から、その味覚情報の発信源は多種類の味刺激に応答する GAD67 発現味細胞 (III 型細胞) である可能性が考えられる。GAD67 は GABA の合成酵素であり、この細胞は GABA を持つが、味蕾内での機能は不明な点が多い。近年 2 種類の Cl<sup>-</sup> トランスポーター [KCC2 (Cl<sup>-</sup> 排出)、NKCC1 (Cl<sup>-</sup> 取り込み)] の働きにより細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度が変化することで GABA が興奮性にも抑制性にも機能することが明らかとなってきており、実際味蕾においても GABA 投与により自発電頻度の増加または減少が見られる味細胞が共に存在する。また、GABA 作動性興奮は神経系の分化、細胞移動、シナプス形成など、神経回路の発達過程に重要な役割を果たすと考えられている。さらに GAD67 発現細胞は、味神経の味蕾へのターゲティングに関与し

GABA 系とのインタラクションが示唆される BDNF を保有すると考えられる。以上のことから、味覚情報ラインの再生過程において、先に再生される GAD67 発現味細胞から放出される GABA が周囲の味細胞の分化、成熟、神経線維との接続などに関与し、アミロライド感受性神経線維、グルマリン感受性神経線維などが遅れて再生するという仮説を考えた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、GABA の神経回路発達過程での機能に注目し、神経挫滅後の再生過程における味蕾内 GABA 系の機能・動態および作動機序を解析することで、味細胞の機能成熟における GABA の役割を明らかとすると共に神経系における分化・発生・再生のモデルと成すことを目的とする。また、味覚受容における GABA の機能的役割について解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

1). 免疫組織化学的手法による味蕾内での各種タンパク質の発現解析

GAD67-GFP マウス、T1R3-GFP マウスを用い、舌の茸状乳頭および有郭乳頭領域の薄切切片を作成し、gustducin、SNAP、NKCC1、KCC2 に対する一次抗体およびそれらに対する蛍光二次抗体により処理し、味蕾内におけるこれら分子の発現を調べた。

2). 味細胞より放出される GABA の測定

味細胞応答記録システムを用い味細胞より味応答を記録する。これにより放出された GABA は記録電極内液に拡散すると考えられ、電極内液を回収し、そこに含まれる GABA の濃度を測定した。GABA の検出には基質(α-ketoglutarate)および酵素(GABase)を用いた NADP<sup>+</sup>→NADPH 変換による蛍光検出法を利用した。また、石英ガラススライド表面に GABase を固着させ、味蕾をその近傍にセットし、α-ketoglutarate を含む細胞外液で灌流し、刺激により放出される GABA をイメージングにより検出した。

3). 味細胞の細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度変化

各種 GFP マウスを用い、Cl<sup>-</sup> 感受性色素である 6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ) を味孔側より電気穿孔的に細胞内に導入し、紫外線 (300-360nm) で励起された MEQ の蛍光強度 (420-480nm) を計測した。細胞外液に Nigericin と Tributyltin を加え細胞内外の Cl<sup>-</sup> 濃度を等しくし、細胞外液の Cl<sup>-</sup> 濃度を变化させた時の MEQ 蛍光強度変化を測定することで、静止時の細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度を定量した。また GABA を細胞外液に加えた時の MEQ 蛍光強度変化を測定した。

## 4. 研究成果

1) GAD67 欠損マウスにおける味蕾組織の形態的变化

GABA の味蕾での発達段階での影響を調べるため、GABA の合成酵素である GAD67 を欠損させた遺伝子改変マウスを用い、味蕾組織に形態的变化が生じるかを調べた。GAD67-GFP ノックインマウスは、ホモマウスでは GAD67 を欠損することとなり、口蓋裂により生後まもなく死亡する。しかし、生後 1 日目は生存することから、生後 1 日目のホモマウスおよびヘテロマウスでの味蕾組織における各種味蕾マーカー (gustducin:II 型細胞マーカー、SNAP25:III 型細胞マーカーおよび GAD67-GFP) の発現を調べた。しかし、この段階ではホモマウス、およびヘテロマウス間でこれら味蕾マーカーの発現に差は見られなかった (図 1)。また、SNAP25 陽性神経線維の味蕾への投射も同様に見られた (図 2 A-B)。これらは、味細胞の発達過程や神経支配の過程において GABA は明白な役割を持たない可能性を示唆する。ヘテロマウスで生後 3 日目に gustducin や GAD-GFP の発現を調べると、gustducin 発現細胞は生後 1 日目と比較し増加する傾向が見られたが、GAD67-GFP 発現細胞は特に有郭乳頭領域で減少する傾向が見られた (図 2C)。しかしその要因や生理的意義については不明である。

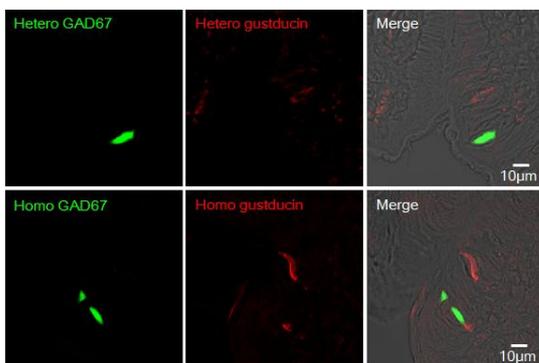


図 1 .生後 1 日目の GAD67-GFP ヘテロおよびホモマウスにおける GAD67-GFP と gustducin の発現 (有郭乳頭)。どちらのマウスでも、GAD67-GFP および gustducin 発現細胞は同程度存在した。

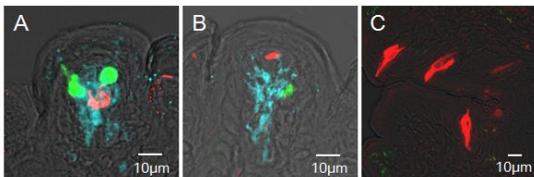


図 2 . A,B: 生後 1 日目の GAD67-GFP ヘテロ(A)およびホモマウス(B)における SNAP25 陽性神経線維支配の様子 (茸状乳頭)。緑:GAD67-GFP、赤:gustducin、水色:SNAP25 の発現を示す。C:生後 3 日目の GAD-GFP ヘテロマウスにおける GAD67-GFP (緑) と gustducin (赤) の発現。図 1 と比較し、gustducin 陽性細胞は増加しているが、GAD67-GFP 発現細胞は見られない。

## 2) 味細胞からの GABA の放出

味蕾において、III 型細胞に GAD67 が発現

することから、III 型細胞より GABA が放出されると考えられる。そこで、実際に III 型細胞から GABA が刺激により放出されるかを調べた。先行研究での味細胞からの ATP 放出検出に倣い、味細胞から味刺激により放出される GABA を基質 ( $\alpha$ -ketoglutarate) および酵素 (GABase) を用いた  $\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$  変換による蛍光検出法を用い測定したが、検出感度不足のため GABA を定量できるまでに至らなかった (図 3)。次に GABA イメージングによる味細胞からの GABA 放出の検出を試みた。その結果、III 型細胞を脱分極させる高  $\text{K}^+$  溶液による刺激により、GAD67-GFP 発現細胞近傍での蛍光強度変化が観察された (図 4)。しかし、味刺激を味蕾の味孔側のみに与え、GABA 放出を記録するシステムを確立するまでは至らなかった。

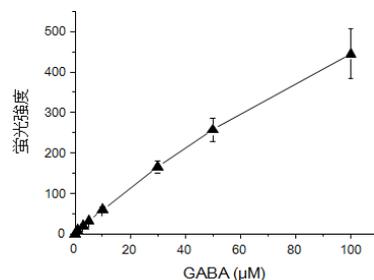


図 3 . GABA 蛍光検出法による GABA の検量線。1  $\mu\text{M}$  以上の GABA であれば定量可能

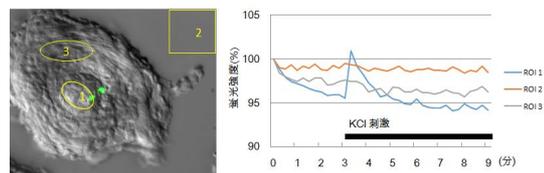


図 4 .GABA イメージングによる味細胞から放出された GABA の検出。高  $\text{K}^+$  溶液刺激により領域 2 の部分で蛍光強度の増加 (GABA 濃度の増加) が観察された。

## 3) 味細胞の細胞内 $\text{Cl}^-$ 濃度の測定

GABA の GABA<sub>A</sub> 受容体を介する効果は細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度に依存し、その濃度が低い場合は抑制性の高い場合は興奮性の応答を生じさせる。そこで、味細胞の細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度について調べた。茸状乳頭味蕾内の味細胞に MEQ を導入し、Nigericin と Tributyltin を用い細胞内外の  $\text{Cl}^-$  濃度を一致させ、細胞外溶液の  $\text{Cl}^-$  濃度を変化させることで、味細胞の静止時の細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度について解析した (図 5)。T1R3-GFP 発現細胞、GAD67-GFP 発現細胞共に、細胞外  $\text{Cl}^-$  濃度が 60-80mM の間で MEQ 蛍光強度の逆転が生じ、予想される細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度は約 72mM と非常に高値であった。次に、細胞外に GABA を投与した時の細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度変化について調べた。その結果、一部の T1R3-GFP 発現細胞で、GABA 投与により MEQ 蛍光強度の増加 (細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度の低下) が見られた (図 6)。また免疫組織化学的手法により細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度調節に

関与するNKCC1とKCC2の発現を調べたところ、T1R3発現細胞ではCl<sup>-</sup>排出型のKCC2（172/323, 53.3%）よりもCl<sup>-</sup>取り込み型のNKCC1（242/323, 74.9%）の発現割合が大きかった（図7）。これらの結果から、一部の甘味細胞ではNKCC1を優位に発現し細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が高くなるためGABAにより興奮性の応答が生じる可能性が示唆される。

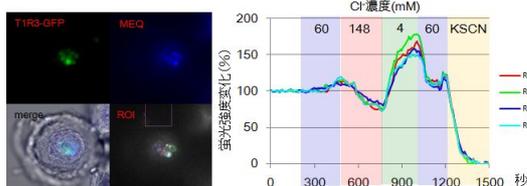


図5 静止時の細胞内Cl<sup>-</sup>濃度測定。NigericinとTributyltinを細胞外液に加えることで細胞内外のCl<sup>-</sup>濃度を均一にする。細胞外Cl<sup>-</sup>濃度を変化させるとそれに合わせて、MEQ蛍光強度が変化する。蛍光強度増加はCl<sup>-</sup>濃度の増加を、蛍光強度低下はCl<sup>-</sup>濃度増加を示す。KSCNはMEQ蛍光を完全に消失させる。

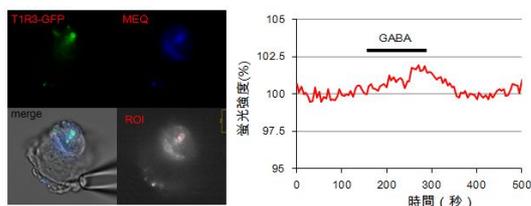


図6 GABA投与による細胞内Cl<sup>-</sup>濃度変化。このT1R3-GFP細胞はGABAを細胞外溶液に加えることでMEQ蛍光強度の増加（細胞内Cl<sup>-</sup>濃度の低下）が生じた。

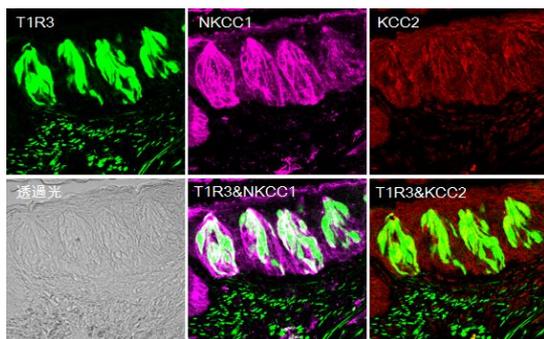


図7 有郭乳頭味蕾におけるT1R3（緑）NKCC1（マゼンタ）KCC2（赤）の発現。

#### 4) 総括

本研究では、味蕾発生時におけるGABAの機能について解析したが、GABAの合成酵素であるGAD67を欠損したマウスにおいても、生後1日目の段階では野生型マウスの味蕾の形態や神経支配には明確な差は見られなかった。これは味蕾ではGABAが発達の段階では明白な機能を持たない可能性を示唆する。しかし、近年別のGABA合成酵素であるGAD65が味蕾内のI型細胞に発現するという報告もあり、I型細胞から放出されるGABAが何らかの役割を果たす可能性が残されている。

味蕾内において、GABAは高K<sup>+</sup>溶液による脱分極刺激により放出された。この刺激ではGAD67を発現するIII型細胞が刺激されることが報告されていることから、III型細胞の興奮によりGABAが放出される可能性が考えられる。GAD67発現細胞は主に酸味刺激または様々な電解質刺激で興奮することから、これらの味刺激によりGABAが放出される可能性が考えられる。本研究ではその特定にはいたらなかったが、近年、別のグループが酸味刺激による味細胞からのGABA放出を報告している。本研究では、甘味・うま味の受容細胞であるT1R3発現細胞の細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が非常に高く、一部のT1R3発現細胞がGABA刺激により細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が低下した。またT1R3発現細胞ではCl<sup>-</sup>排出型のKCC2よりもCl<sup>-</sup>取り込み型のNKCC1の発現割合が高かった。これらのことから、一部の甘味細胞はNKCC1を有意に発現し、細胞内Cl<sup>-</sup>濃度が高く保たれるため、GABAによる脱分極性応答が生じる可能性が示唆される。このように味蕾内でGABAは味覚受容を調節するよう機能している可能性が考えられる。

#### 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11件)

- 1). Horio N, Yoshida R, Yasumatsu K, Yanagawa Y, Ishimaru Y, Matsunami H, Ninomiya Y. Sour Taste Responses in Mice Lacking PKD Channels. PLoS ONE 6: E20007, 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0020007
- 2). Niki M, Takai S, Kusuhara Y, Ninomiya Y, Yoshida R. Responses to apical and basolateral application of glutamate in mouse fungiform taste cells with action potentials. Cell Mol Neurobiol 31: 1033-40, 2011, DOI: 10.1007/s10571-011-9702-5
- 3). 仁木麻由、上瀧将史、吉田竜介、二ノ宮裕三. レプチン受容体アンタゴニストによるマウスの甘味応答. 日本味と匂学会誌 18: 255-8, 2011
- 4). Yasumatsu K, Ogiwara Y, Takai S, Yoshida R, Iwatsuki K, Torii K, Margolskee RF, Ninomiya Y. Umami taste in mice uses multiple receptors and transduction pathways. J Physiol 590: 1155-70, 2012, DOI: 10.1113/jphysiol.2011.211920
- 5). Yoshida R. Hormones and bioactive substances that affect peripheral taste sensitivity. J Oral Biosci 54: 67-72, 2012
- 6). 吉田竜介、二ノ宮裕三. 食欲調節物質による甘味感受性の調節. 日本薬理学雑誌 139: 131, 2012
- 7). Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y.

Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Semin Cell Dev Biol* 24: 226-31, 2013, DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.08.004.

8). Kusuhara Y, Yoshida R, Ohkuri T, Yasumatsu K, Voigt A, Hübner S, Maeda K, Boehm U, Meyerhof W, Ninomiya Y. Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1. *J Physiol* 591: 1967-85, 2013, DOI: 10.1113/jphysiol.2012.236604.

9). Shigemura N, Iwata S, Yasumatsu K, Ohkuri T, Horio N, Sanematsu K, Yoshida R, Margolskee RF, Ninomiya Y. Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. *J Neurosci* 33: 6267-77, 2013 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5599-12.2013.

10). 吉田竜介, ニノ宮裕三. 味細胞における味の情報伝達. *JOHNS* 29: 13-5, 2013

11). Iwata S, Yoshida R, Ninomiya Y. Taste transductions in taste receptor cells: basic tastes and moreover. *Curr Pharm Des* 20: 2684-92, 2014

〔学会発表〕(計 51 件)

1). Yoshida R, Miyauchi A, Margolskee RF, Ninomiya Y. Expression analysis of Gα subunits in sweet and umami taste cells by single cell RT-PCR. ECRO 2011, 2011, Manchester, UK

2). Yoshida R, Miyauchi A, Ninomiya Y. Expression analysis of G protein alpha subunits in mouse taste cells responsible for sweet and umami taste. ICCPB2011, 2011, Nagoya, Japan

3). 吉田竜介, 宮内彩, Margolskee RF, ニノ宮裕三. マウス甘味・うま味細胞における Gα サブユニットの発現検索第 3 4 回日本神経科学学会大会, 2011, パシフィコ横浜, 横浜

4). 吉田竜介. 末梢味覚器における味覚情報の受容・伝達とその調節機構. 第 5 3 回歯科基礎医学会学術大会, 2011, 長良川国際会議場, 岐阜

5). 吉田竜介, 高井信吾, Margolskee RF, ニノ宮裕三. T1R3 発現細胞の応答性と味覚関連遺伝子欠損の効果. 日本味と匂学会大会第 4 5 回大会, 2011, 石川県立音楽堂, 金沢

6). 吉田竜介, 高井信吾, Margolskee RF, ニノ宮裕三. 甘味・うま味コンポーネント T1R3 を発現する味細胞の応答性. 第 6 2 回西日本生理学会, 2011, 佐賀大学, 佐賀

7). 吉田竜介, 仁木真由, 村田芳博, ニノ宮裕三. 味覚情報伝達における ATP の役割. 生理研研究会「情報伝達物質としてのプリンの意義」, 2011, 岡崎コンベンションセンター, 岡崎

8). 吉田竜介. 味細胞における味受容・調節機構の解明. 第 8 9 回日本生理学会大会, 2012, 長野県松本文化会館, 松本

9). Yoshida R, Niki M, Takai S, Ninomiya Y.

Coding of taste signals in the mouse periphery. ISOT XVI, 2012, Stockholm, Sweden

10). 吉田竜介, 高井信吾, ニノ宮裕三. 甘味・うま味受容体 (T1R1 または T1R3) を発現する味細胞の応答解析. 第 5 4 回歯科基礎医学会学術大会, 2012, 奥羽大学, 郡山

11). Yoshida R, Takai S, Margolskee RF, Boehm U, Meyerhof W, Ninomiya Y. Response profiles of taste cells expressing sweet and umami taste receptor, T1Rs. 第 3 5 回日本神経科学学会大会, 2012, 名古屋国際会議場, 名古屋

12). 吉田竜介, 高井信吾, 仁木麻由, Robert F. Margolskee, ニノ宮裕三. マウス味細胞応答に対するレプチンの効果. 日本味と匂学会大会第 4 6 回大会, 2012, 大阪大学, 大阪

13). 吉田竜介, 重村憲徳, ニノ宮裕三. 末梢における味覚の受容とその調節機構. 細胞センサーの分子機構・相互連関・ネットワーク研究会, 2012, 生理学研究所, 岡崎

14). Yoshida R, Takai S, Niki M, Margolskee RF, Ninomiya Y. Detection and modulation of taste responses of mouse fungiform taste cells. Symposium on sensory systems & neural circuits, Tokyo, Japan

15). 吉田竜介, 高井信吾, 仁木麻由, Robert F. Margolskee, ニノ宮裕三. レプチンはマウス茸状乳頭味細胞の甘味応答を抑制する. 第 9 0 回日本生理学会大会, 2013, タワーホール船橋, 東京

16). Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Ohkuri T, Shigemura N, Ninomiya Y. Modulation of sweet taste sensitivity by leptin and endocannabinoids. SSIB2013, 2013, New Orleans, USA

17). Yoshida R, Takai S, Niki M, Margolskee RF, Ninomiya Y. レプチンは味細胞の甘味応答を抑制する. *Neuro*2013, 2013, 京都国際会議場, 京都

18). 吉田竜介, 上瀧将史, 高井信吾, 重村憲徳, ニノ宮裕三. T1R3 発現味細胞における ATP 感受性 K チャネルの薬理的解析. 日本味と匂学会第 4 7 回大会, 2013, 仙台市民会館, 仙台

19). 吉田竜介, 仁木真由, 上瀧将史, 高井信吾, ニノ宮裕三. レプチンは甘味応答味細胞の甘味応答を特異的に抑制する. 第 5 5 回歯科基礎医学会大会, 岡山コンベンションセンター, 岡山

20). 吉田竜介, 上瀧将史, 高井信吾, 重村憲徳, ニノ宮裕三. 口腔と腸管における甘味シグナリング: レプチン, 内因性カンナビノイド, GLP-1 の機能的役割, 第 9 1 回日本生理学会大会, 2014, 鹿児島大学, 鹿児島

〔図書〕(計 2 件)

1). 吉田竜介. 研究者が教える動物飼育第 3 巻 マウス, 共立出版, 2012, 173 ページ中 5

ページを担当

2). 吉田竜介、二ノ宮裕三. 基礎歯科生理学第  
6版 味覚、医歯薬出版、436 ページ中 16 ペ  
ージ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 竜介 (YOSHIDA Ryusuke)  
九州大学・大学院歯学研究院・講師  
研究者番号：60380705

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し