

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580181

研究課題名(和文) 味情報処理に関わるATP受容体の解明に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the role of ATP receptor in taste transduction

研究代表者

林 由佳子 (Hayashi, Yukako)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60212156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：味細胞の応答頻度が味神経応答頻度と一致しないことから、その途中になんらかの情報の整理整頓が行われていると考えられる。しかし味蕾のなかに4種の味細胞が存在し、III型味細胞には酸味受容する細胞のほかにATPを受容する細胞が存在する。そこで本研究においては、ATP受容に関わる受容体の同定と細胞における存在場所に関して明らかにし味情報の整理を明らかにすることを目的に行った。その結果ATP受容する細胞には酸味受容体の発現は見られず、反対に酸味受容する細胞はATP受容体の発現は見られなかった。このことからIII型味細胞は少なくとも酸味を受容する細胞、ATPを受容する細胞の2種類が存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Type III taste cells play to receive sour taste and also to receive taste information from type II taste cells through ATP. It had been a great mystery whether a type III taste cell acts both roles or two kinds of type III taste cells share each role separately. Our previous paper suggested that there were the two separate subpopulations of type III taste cells. Here, we focus on sour and ATP receptors. We tried to reveal sour and ATP receptor distributions in taste buds. We also attempted revealing whether ATP-responding cells have a sour receptor or not. This study revealed that there are the two separate subpopulations of type III taste cells (sour-responsive cell and ATP-responsive cell to receive intercellular messenger(ATP) from type II taste cells to type III taste cells).

研究分野：品質評価

キーワード：味覚 受容機構 味細胞 マウス 細胞タイプ 味情報伝達

1. 研究開始当初の背景

五感の中の視覚・嗅覚・味覚は化学感覚に分類され、類似の機構で感知・情報変換・伝達・処理されると考えられてきた。研究が進むにつれ感知には、7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体で受容され、セカンドメッセンジャーを介し、神経がその情報を中枢に伝達することが共通して存在することがわかってきた。嗅覚・視覚ではさらに次の研究

情報をいかに精密化するのか、情報の統合などに着手されている。味覚はそれらに比べて情報伝達の経路すら確立されていない。なぜなら、味を受容する味蕾という組織の中に4つのタイプの味細胞が存在することに起因する。現在、型味細胞の機能は、塩味受容の可能性が提唱されたが明確ではない。

型味細胞に甘味やうま味、苦味の味受容体が発現しATPを放出する。型細胞だけが味神経とシナプスをつくり、近年型味細胞が酸味や塩味を受容しているという研究結果が示された。型味細胞は前駆細胞であると考えられている。そこで、味の情報は型、型の味細胞で感知されてから味神経にどのように伝達されるのかを明らかにしようとする研究が活発化している。

味情報は、型味細胞から直接味神経に行くのか、型味細胞を経由するのかについて諸説が提唱されている。直接味神経に情報がいくという説には、型味細胞と味神経には明確なシナプスが存在しない矛盾が、味神経とシナプスを作る型味細胞を経由する説には、酸味と塩味が型で受容されていることと型と型の間の情報伝達方法が不明である点が挙げられている。

申請者は基盤研究(C)(平成20年から22年)において、味細胞の味受容とATP受容に関して、細胞内カルシウム濃度変化と免疫抗体染色を行った。型の指標として苦味受容とGタンパク質のサブユニットのガストジューシンとIP₃受容体タイプ3の抗体を用いた。型の指標は高カリウム液による電位依存性カルシウムチャネルを用いた。そしてATP受容を行う細胞を解析した結果、型・型味細胞両方にATP応答が見られることが分かった。この結果は、型味細胞にフィードバック的にATPが作用すること、型細胞は型味細胞からのATPを使った情報を受け入れることが可能であることを示している。次に、カルシウムイメージングによる酸味応答とATP応答を調べた結果から、酸味受容体とATP受容体が異なる細胞群に存在することが示唆された。また、酸味に応答する細胞は型味細胞マーカーでは染まらなかった。すなわち、酸味を受容する型味細胞はATP受容を行う型味細胞と異なる可能性を示唆した

2. 研究の目的

味細胞は形態、機能によりI~IV型に分類さ

れる。そのうち、型細胞は甘味・うま味・苦味を、型細胞は酸味を受容すると考えられている。味情報はこれら味細胞で受容され、味神経へと伝達される。しかし、味神経とシナプスを形成しているのは型細胞のみであり、型細胞からの味情報がどのようにして味神経へと伝達されるのかは未だ不明である。その仮説として、味刺激を受容した型細胞がATPを放出し、型細胞を経由し味神経に味情報が伝達されるという説¹⁾がある。この説が正しいとすれば、型細胞は「酸味の受容」と「型細胞からの味情報受容・統合」の2つの役割が存在することになる。これらの役割が1つの味細胞で担われているのか、それとも別々の味細胞によって担われているのか不明であった。そこで、酸味物質の受容とATPの受容は異なる型細胞が担うのかについてさらに詳細に調べようとする目的とした。

3. 研究の方法

実験にはC57BL6J Jms Slc 系統マウス(雌、6-19週齢)を用いた。なお、動物実験は京都大学動物実験指針に基づき、京都大学大学院農学研究科動物実験委員会の規定に則って行った。

1. 免疫組織染色

マウスを4%PFA(パラホルムアルデヒド)で灌流固定し、舌を0.C.Tコンパウンドで包埋・凍結した後、クライオスタットで有郭乳頭周辺の組織スライスを作成し、抗体を用いて免疫組織染色を行った。一次抗体にはATP受容体抗体としてP2Y₁抗体(MBL)、P2Y₂抗体(Abcam)、P2Y₄抗体(Novus Biologicals)を、酸味受容体抗体としてPKD2L1抗体(石丸善朗先生より供与)を使用した。二次抗体にはAlexa Fluor 488(Invitrogen)とAlexa Fluor 555(Invitrogen)で標識された抗体を使用した。一次抗体が全てRabbit抗体であるため、二重染色の際にはTSA kit(Invitrogen)を用いて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

2. カルシウムイメージング

マウスの舌を摘出し、酵素処理をした後、舌上皮を剥離した。剥離した舌上皮から微小ガラスピペットを用いて有郭・葉状乳頭より味細胞を単離した。単離した味細胞に膜透過性Ca²⁺感受性蛍光プローブであるFluo-8 AM(3 μM)を負荷させ(4°C、25分間)、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各味溶液で刺激した細胞内Ca²⁺濃度変化を調べた。

3. 免疫細胞染色

カルシウムイメージング終了後の味細胞に免疫細胞染色を行った。一次抗体にはATP受容体抗体としてP2Y₁抗体(MBL)、P2Y₄抗体(Novus Biologicals)を、酸味受容体抗体としてPKD2L1抗体(石丸善朗先生より供与)を使用した。二次抗体には免疫細胞染色と同様のものを使用し、一次抗体が全てRabbit抗

体であるため、二重染色の際には TSA kit(Invitrogen)を使用し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

味細胞の酸味・ATP 応答

まず、ATP 受容と酸味受容が別々の型細胞で行われていることを確認するため、カルシウムイメージングと免疫細胞染色を行った。10 μ M ATP と 10 mM クエン酸で味細胞を刺激し、型細胞マーカーである IP₃R-3 抗体と型細胞マーカーである CAR-4 抗体で免疫細胞染色を行うと、多くの味細胞は ATP またはクエン酸のどちらか一方に応答し(図 1-f, g, h)、両方に応答した味細胞はわずかであった(図 1-e, h)。さらに、ATP に応答した味細胞の 34.8%(8/23)が IP₃R-3 を、52.2%(12/23)が CAR-4 を発現しており(図 1-a, b)、クエン酸に応答した味細胞の 6.3%(2/32)が IP₃R-3 を、73.1%(16/21)が CAR-4 を発現していた(図 1-c, d)。これらの結果は過去の研究報告²⁾とも一致していた。

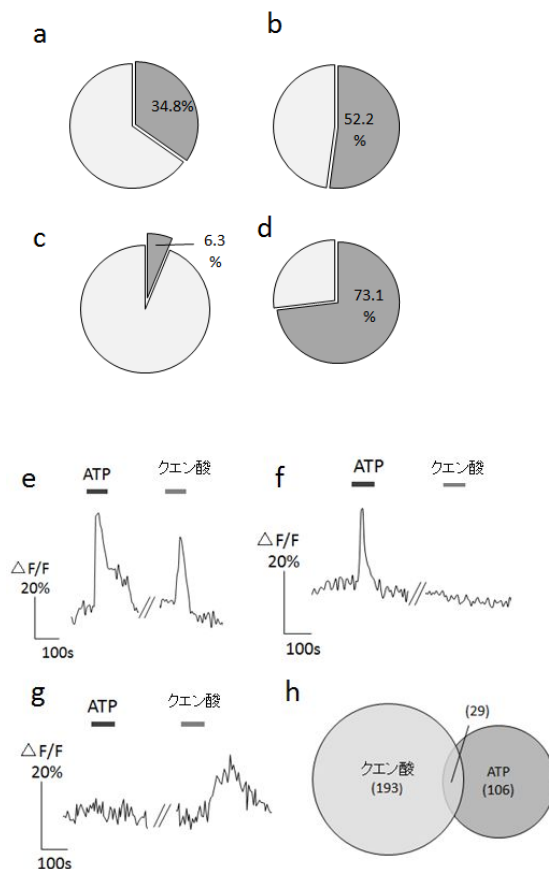


図1 ATP・クエン酸に対する応答と細胞型の推定。a: ATP に応答した味細胞のうち IP₃R-3 を発現している細胞の割合 b: ATP に応答した味細胞のうち CAR-4 を発現している細胞の割合 c: クエン酸に応答した味細胞のうち

IP₃-R3 を発現している細胞の割合 d: クエン酸に応答した味細胞のうち CAR-4 を発現している細胞の割合 e: ATP とクエン酸の両方に応答する例 f: ATP のみに応答する例 g: クエン酸のみに応答する例 h: ATP とクエン酸に対する応答味細胞数

酸味・ATP 応答に発現する ATP 受容体

ATP に応答する味細胞の ATP 受容体の機能性を確認するため、10 μ M ATP で味細胞を刺激した後、ATP 受容体である P2X₂, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ 抗体で免疫細胞染色を行い、ATP に応答した味細胞での各 ATP 受容体の発現を調べた。その結果、P2X₂ 以外の ATP 受容体について ATP 応答味細胞における発現が確認できた(表 1)。また、酸味受容細胞に ATP 受容機能があるかを解明するため、酸味溶液である 10 mM クエン酸溶液で味細胞を刺激した後、ATP 受容体である P2X₂, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ 抗体で免疫細胞染色を行い、クエン酸に応答した味細胞に各 ATP 受容体の発現を調べた。その結果、クエン酸に応答した味細胞の多くは ATP 受容体を発現していなかった(表 2)。

表1 ATP 応答味細胞中で各 ATP 受容体を発現している味細胞数

	P2X ₂	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄
染色細胞数	2/98	97/402	90/164	42/396

表2 クエン酸応答味細胞中で各 ATP 受容体を発現している味細胞数

	P2X ₂	P2Y ₁	P2Y ₂	P2Y ₄
染色細胞数	0/6	1/20	2/13	2/48

型 型味細胞マーカー染色細胞に存在する ATP 受容体

味蕾の ATP 受容体分布を明らかにするため、ATP 受容体である P2X₂, P2X₃, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ 抗体と型細胞マーカーである PLC 2 抗体、型細胞マーカーである CAR-4 抗体を用いて有郭乳頭に存在する味蕾の免疫組織染色を行った。その結果、P2X₂, P2X₃ は味神経に存在し、P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ は型細胞に存在することがわかった(表 3)。P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ については、P2Y₁, P2Y₂ は CAR-4 発現細胞で共発現が確認された(表 3)。そのため、P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ は型細胞に存在する可能性が高いことが示唆された。さらに型視細胞マーカーの NCAM に関して同様の実験を行った(表 4)。その結果、一部の P2Y₄ と NCAM のみが同一細胞に発現されており、P2Y₁, P2Y₂ は CAR-4, NCAM のどちらとも共発現していなかった(表 1)。そのため、型細胞の一部に P2Y₄ が発現している可能性が高いことが示唆された。

表 3 型・型細胞マーカー発現味細胞中で各 ATP 受容体を共発現している割合(味細胞数)

	PLCβ2 (Ⅱ型細胞)	CAR-4 (Ⅲ型細胞)
P2X ₂	Not Detected	Not Detected
P2X ₃	Not Detected	Not Detected
P2Y ₁	95%(180/189)	96%(322/335)
P2Y ₂	100%(236/236)	55%(165/300)
P2Y ₄	88%(127/145)	0%(0/70)

表 4 型細胞マーカー発現味細胞中で各 ATP 受容体を共発現している割合(味細胞数)

	CAR-4 (Ⅲ型細胞)	NCAM (Ⅲ型細胞)
P2Y ₁	0%(0/42)	0%(0/51)
P2Y ₂	2.9%(4/136)	1.4%(2/146)
P2Y ₄	5.4%(6/112)	17%(98/574)

酸味受容体と ATP 受容体の局在性

ATP 受容体と酸味受容体の局在性を調べるため、免疫組織染色を行った。味細胞内に存在することを確認した ATP 受容体である P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄ の抗体と、酸味受容体である PKD2L1 の抗体を用いて、有郭乳頭に存在する味蕾の免疫組織染色を行った。その結果、P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄ は PKD2L1 と同一細胞にほぼ見られなかった(図 2)。そのため、ATP 受容体と酸味受容体は別々の型細胞で発現されていることが示唆された。

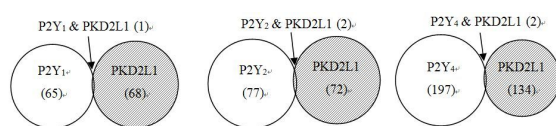


図 2 免疫組織染色での ATP 受容体と PKD2L1 の発現細胞数 a: P2Y1 と PKD2L1, b: P2Y2 と PKD2L1, c: P2Y4 と PKD2L1

ATP, 酸味受容性と ATP, 酸味受容体分布

最後に、受容体の機能性及び ATP に応答した味細胞が酸味受容体を持つか確かめるため、イメージングを行った味細胞に対し、ATP 受容体 P2Y₁、P2Y₄ 抗体と、酸味受容体 PKD2L1 抗体で免疫細胞染色を行った。その結果、ATP に応答した味細胞の一部が P2Y₁、P2Y₄ を発現し、PKD2L1 を発現しておらず、クエン酸に応答した味細胞の多くが酸味受容体 PKD2L1 を

発現し、P2Y₁、P2Y₄ を発現していなかった(表 5)。そのため、過去の研究³⁾と同じく酸味応答味細胞は ATP 受容体を持たないことを確認し、新たに ATP 応答味細胞は酸味受容体を持たず、酸味に応答する機能を持たないことが示唆された。

	P2Y ₁	P2Y ₄	PKD2L1	ATP 受容体 & PKD2L1
ATP 応答	25%(14/56)	38%(14/37)	2%(2/93)	0%(0/93)
クエン酸応答	0%(0/16)	0%(0/15)	77%(24/31)	0%(0/31)

表 5 各溶液応答味細胞の ATP 受容体と PKD2L1 の発現割合(受容体発現味細胞数/応答味細胞数)

考察

型細胞の役割として、酸味物質を受容する役割と型細胞からの味情報伝達物質である ATP を受容し味神経へと伝達する役割がある¹⁾と考えられている。これらの役割は同一の型細胞ではなく、異なる型細胞によってそれぞれ果たされていることが示唆された²⁾が、ATP 受容体の観点からの解析が不十分であった。

本研究では、まず ATP と酸味溶液が別々の細胞で受容されること(図 1-h)、ATP 受容が型と型で行われ、酸味受容が主に型で行われることを示し(図 1)、型細胞では酸味受容と ATP 受容とで機能分化が生じている可能性が高いことを改めて示した。

次に、ATP に応答した味細胞に発現した ATP 受容体を調べ、ATP 受容体の機能性を解明することを試みた。味蕾においてタンパク質レベルでの発現が報告されているのは、イオンチャネル型受容体の P2X₂³⁾、P2X₃³⁾、P2X₇⁴⁾ と代謝型受容体の P2Y₁⁴⁾、P2Y₂⁵⁾、P2Y₆⁶⁾ である。これらのうち、P2X₂、P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄ について実験を行った。その結果、P2X₂ 以外の ATP 受容体で発現を確認できた(表 1)。P2X₂ の機能性を確認できなかったのは、P2X₂ の発現部位が味神経であったためと考えられる。今回実験を行っていない P2X₃ も味神経に発現しており³⁾、P2X₇ は細胞死に関わる受容体と考えられ⁷⁾、EC₅₀ が他の ATP 受容体と比較して数百倍高い⁸⁾ため、今回の手法ではこれらの受容体の機能性が確認される可能性が低いと予想されるが、今後検討する必要がある。また、同一の味細胞に複数の ATP 受容体が発現していることも考えられるため、ATP 受容体の機能性解明にはさらなる検討を行う必要がある。また、酸味受容細胞では今回検討した ATP 受容体の発現がほぼ認められず、型細胞に存在する可能性の高い P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄(表 3)について酸味受容細胞では発現がみられなかった(表 2)。このことも型細胞の機能分化を支持している。

免疫組織染色により、P2X₂、P2X₃ が味神経、P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄ が型細胞に発現していることが明らかになった(表 3)。これらのこと

から、型細胞のATP受容はP2Y₁、P2Y₂、P2Y₄によって行われている可能性が高い。しかし、型細胞に発現しているATP受容体については、マーカー抗体によって結果が異なり、P2Y₁、P2Y₂とCAR-4が、P2Y₄とNCAMがそれぞれ同一味細胞で共発現していた(表3)。そのため、CAR-4抗体とNCAM抗体はどちらも型細胞マーカーであるが、全ての型細胞を反映するわけではないと考えられる。

これらの結果から、型細胞が酸味を受容する細胞と型細胞からの味情報であるATPを受容し味情報を統合する細胞と2種類に分かれていることを裏付けるとともに、タンパク質レベルでの発現が報告されているほとんどのATP受容体の味蕾内での分布を示した。

酸味受容体に関する研究では、まず型細胞に発現するATP受容体を再度確認した(表5)上で、ATP受容体と酸味受容体がほぼ別の細胞で発現することを観察し(図2)、ATP受容体と酸味受容体は別々の型細胞で発現されていることを示した。さらに、ATP応答味細胞に酸味受容体が発現しないことを示し(表5)、応答性及び受容体の観点から、型細胞が酸味受容とATP受容を異なる細胞で担っていることを示した。

今回明らかになった型細胞マーカーとATP受容体との分布には、型細胞マーカー間で違いが見られ、CAR-4はどのATP受容体とも共発現がほぼみられなかったが、NCAMはP2Y₄と一部共発現していた(表5)。CAR-4は酸味受容体PKD2L1と発現がほぼ重なることが過去に報告されている⁹⁾。そのため、CAR-4は酸味受容型細胞のみを染色し、ATP受容体と共染色されなかったと考えられる。このことは別々の型細胞が役割を担うことを支持している。また、NCAMはCAR-4と異なり、

型細胞の特徴である神経シナプスに関する型細胞マーカー分子であり、かつPKD2L1を含むことが報告されており¹⁰⁾、酸味受容・ATP受容に関係なく型細胞が染色されたことが示唆された。

免疫組織染色により、ATP受容体P2Y₁、P2Y₂、P2Y₄と酸味受容体PKD2L1はほぼ別々の細胞で発現していた(図2)。型細胞には主要なATP受容体のうちP2Y₄のみが存在することを確認しているため、ATP受容体と酸味受容体は別々の型細胞で発現されていると考えられる。

応答性を確認した味細胞における受容体発現を調べたところ、酸味応答味細胞はATP受容体を持たないこと、ATP応答味細胞は酸味受容体を持たず、酸味に反応する機能を持たないことが観察された(表2)。これらの結果により、型細胞はATP受容及び酸味受容機能により分化されていることが示唆された。

文献

1) Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N and Roper SD: The

role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 6436-6441 (2007)

2) 北田亮, 松村成暢, 呉性姫, 林由佳子: 酸味物質とATPは異なる味細胞で受容される。味と匂誌 18, 219-222 (2011)

3) Bo X, Alavi A, Xiang Z, Oglesby I, Ford A and Burnstock G: Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *NeuroReport* 10, 1107-1111 (1999)

4) Hayato R, Ohtubo Y and Yoshii K: Functional expression of ionotropic purinergic receptors on mouse taste bud cells. *J Physiol* 584, 473-488 (2007)

5) Baryshnikov SG, Rogachevskaja OA and Kolesnikov SS: Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *J Neurophysiol* 90, 3283-3294 (2003)

6) Huang YA, Dando R and Roper SD: Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci* 29, 13909-13918 (2009)

7) Burnstock G: Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 364-373 (2002)

8) Jarvis MF and Khakh BS: ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56, 208-215 (2009)

9) Chandrashekar J, Yarmolinsky D, von Buchholtz L, Oka Y, Sly W, Ryba NJ, Zuker CS: The taste of carbonation. *Science* 326, 443-445 (2009)

10) Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Sévigny J, Kinnamon JC, Finger TE: The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type taste cells in the mouse. *Chem Senses* 33, 243-54 (2008)

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 2件)

型細胞の機能分化と味蕾でのATP受容体分布, 清水英憲, 北田亮, 松村成暢, 林由佳子. 日本味と匂学会誌, (2013) **20(3)** 325-328 (査読有)(平成26年度味と匂学会論文賞)

マウスIII型細胞の酸味及びATP受容解析, 清水英憲, 北田亮, 松村成暢, 林由佳子. 日本味と匂学会誌, (2014) **21(3)** 355-358 (査読有)

[学会発表](計 4件)

清水英憲(林由佳子), 型細胞の機能分化と

味蕾での ATP 受容体分布，日本味と匂学会，
2013 年 9 月 6-7 日，仙台市民会館（仙台市）

清水英憲(林由佳子) ，Distributions of type
III taste cell markers in taste buds, 第 11
回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機
構」，2013 年 11 月 3 日，九州大学（福岡市）

清水英憲(林由佳子) ，マウス III 型細胞の
酸味及び ATP 受容解析，日本味と匂学会，
2014 年 10 月 3-4 日，静岡市清水文化会館マ
リナート（静岡市）

清水英憲(林由佳子) ，The sour taste
receptor is not coexpressed with ATP
receptors in type III taste cells, 第 12
回国際シンポジウム「味覚嗅覚の分子神経機
構」，2014 年 11 月 2 日，九州大学（福岡市）

6．研究組織

(1)研究代表者

林 由佳子（HAYASHI, Yukako）

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：60212156