

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592773

研究課題名(和文) 味蕾の甘味情報伝達系におけるアディポネクチンの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis for the Adiponectin Receptors in Mouse Gustatory Papillae

研究代表者

豊野 孝 (Toyono, Takashi)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10311929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、味蕾におけるアディポネクチン受容体(AdipoR1)の発現の検索および、栄養状態による本受容体の発現調節に関して研究を行った。

マウス有郭乳頭におけるAdipoR1の局在を蛍光抗体法により調べた。その結果、AdipoR1は味蕾の味毛、味蕾基底部の細胞およびその周囲の細胞に局在が認められた。次に絶食条件下の有郭乳頭でのAdipoR1の発現量変化をリアルタイムPCR法にて調べた。その結果、給餌条件下と比較し1.4倍の発現量の増加が認められた。絶食時には視床下部のAdipoR1の発現量も増加することから、味蕾においても中枢神経系と同様な、AdipoR1の発現調節機構の存在が推定された。

研究成果の概要(英文)：In the gustatory system, the function of adiponectin signaling in gustatory tissues has not been elucidated yet. Therefore, we have examined the expression patterns of adiponectin receptor, AdipoR1 in mouse gustatory tissues. In addition, we examined the expression levels of AdipoR1 and T1R family (T1R1, T2R2 and T1R3) in the fed or fasted mice by real-time PCR.

Using immunohistochemistry, the anti-AdipoR1 antibody labeled at the taste hairs, a subset of basal cells within the taste buds and extragemmal epithelium cells in the circumvallate papillae. Real-time PCR analysis demonstrated that the levels of AdipoR1 and T1R family members were significantly higher in fasted compared to fed mice in circumvallate papillae. These results show that the fasting condition of animal up-regulates expression levels of AdipoR1 and T1R family members in mouse circumvallate taste buds.

研究分野：口腔組織学

キーワード：アディポネクチン受容体 AdipoR1 甘味受容体 うま味受容体 T1R1 T1R2 T1R3

1. 研究開始当初の背景

味蕾での甘味感受性は空腹や満腹など摂食状態によって変化することから、摂食状態の情報が味蕾に伝達され、それにより味覚感受性が調節され、摂食を促進または抑制していると予想される。摂食状態の情報は、脂肪細胞から血液中に分泌されるレプチンやアディポネクチンにより全身へと伝達される。

アディポネクチンは、グルコースの恒常性維持および脂質代謝において重要な役割をはたしている。アディポネクチンは絶食時にはその血中濃度は高く、再摂食時には低下する。中枢神経系においては、絶食時にアディポネクチン受容体AdipoR1の発現量が増加し、摂食後減少する。絶食時にはアディポネクチンは中枢神経系に作用し、レプチンとは逆の摂食促進に働いている。しかしながら、味蕾でのアディポネクチン受容体 (AdipoR1, AdipoR2) の発現およびその機能は明らかになっていない。レプチンが中枢神経系および味蕾で機能していること、およびアディポネクチンが中枢神経系でレプチンと逆の作用を有することから、アディポネクチンも味蕾において何からの機能を有すると推測される。

2. 研究の目的

本研究では、味蕾でのアディポネクチン受容体の機能解明を目的として行った。最初にマウス味蕾でのアディポネクチン受容体の発現様式を調べた。次に、絶食時における味蕾におけるアディポネクチン受容体の発現量の変化を調べた。さらに味覚感受性は摂食状態により変化することから、絶食条件による甘味、苦味、酸味およびうま味の味覚受容体の発現量の変化に関しても調べた。

3. 研究の方法

以下の動物実験に関しては九州歯科大学動物実験委員会の承認後、その規定に則って行われた。

(1) RT-PCR 法

ペントバルビタールの過剰投与による安楽死後、8週齢の C57BL6J 雄マウスの舌を摘出し、室温で 20 分間の酵素処理後、有郭乳頭および味蕾を含まない舌上皮から上皮のみを摘出した。これらから、RNeasy protect (Sigma) を用いて total RNA を調製し DNase 処理後、Random primer および High Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied biosystems) を用い cDNA を調製した。これらの cDNA を鋳型として AdipoR1 および AdipoR2 に関して Ex-Taq (TaKaRa) を用いて PCR を行った。

(2) ウェスタンブロッティング法

ペントバルビタールの過剰投与による安楽死後、8週齢の C57BL6J 雄マウスから有郭乳頭、葉状乳頭、心臓、肝臓を摘出した。こ

れらから、Proteo JET 哺乳動物細胞溶解試薬 (Fermentas) を用いてタンパク質を調製し、1次抗体抗: AdipoR1 抗体, 抗 AdipoR2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 2次抗体: 西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG(H+L) ロバ抗体 (Vector) を用いてウェスタンブロッティング法を行った。ブロッティング膜として Immobilon-P (Millipore) を使用し、発光基質として Immobilon Western (Millipore) を使用した。発光シグナルの検出は、LAS-4000mini (Fuji Film) を用いて行った。

(3) 蛍光抗体法

4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて 8 週齢の C57BL6J 雄マウスの灌流固定を行った。PBS で洗浄後、ショ糖溶液で置換し OCT Compound に包埋凍結させ、8 μm の切片を作製した。この切片を TE (10mM Tris-HCl pH9.0, 1mM EDTA) で、95°C, 40 分間保温し、次に室温で 20 分間放置する抗原賦活化処理を行った。次に以下の抗体を用いて蛍光抗体法を行った。1次抗体: 抗 AdipoR1 ヤギ抗体, 抗 AdipoR2 ヤギ抗体, 抗 GLAST ウサギ抗体 (Miltenyi Biotec), 抗 PLCβ2 ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 AADC ウサギ抗体 (Genetex), 抗 Shh ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 2次抗体: CF488A 標識抗ヤギ IgG(H+L) ロバ抗体 (Biotium), CF555 標識抗ウサギ IgG(H+L) ロバ抗体 (Biotium)

(4) 絶食実験

C57BL6J雄マウスに自由飲水下で2日間絶食、または通常給餌(各々の条件で5匹使用)を行った。ペントバルビタールの過剰投与による安楽死後、舌の摘出を行った。次に、酵素処理により有郭乳頭から味蕾を含む上皮を剥離し、NucleoSpin® RNA XS (MACHEREY-NAGEL) を用いて total RNA の調製および DNase 処理を行った。

(5) リアルタイム PCR 法

0.1 μg total RNA から Superscript VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies) を用いて cDNA を調製した。次にこれらの cDNA を鋳型として、Eco Real-Time PCR System (illumina) を用いてリアルタイムPCR法による解析を行った。使用した Taqman プローブおよびプライマー (AdipoR1, T1R1, T1R2, T1R3, T2R138, PKD2L1, PPIA (cyclophilin A)) は Applied Biosystems から購入した。内部標準遺伝子としては PPIA を使用した。通常給餌の場合の発現量を基準 (100%) として、絶食条件下での発現量の変化を調べた。

4. 研究成果

① RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法

RT-PCR法によりマウス有郭乳頭においてAdipoR1およびAdipoR2のmRNAが発現していることが明らかになった(図1)。さらにウエスタンブロッティング法により、タンパク質レベルではAdipoR1のみが有郭乳頭で発現していることが明らかになった(図2)。

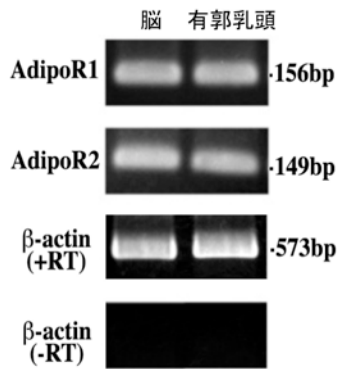


図1 マウス有郭乳頭におけるAdipoR1, AdipoR2の発現

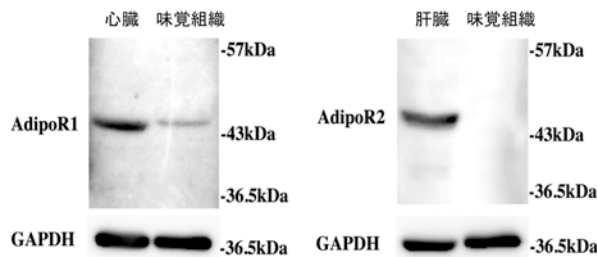


図2 マウス有郭乳頭におけるAdipoR1, AdipoR2タンパク質の発現 味覚組織(有郭乳頭+葉状乳頭)

② 蛍光抗体法

蛍光抗体法によりマウス有郭乳頭におけるAdipoR1タンパク質の局在を調べた。その結果、AdipoR1は有郭乳頭において味蕾の味毛、味蕾基部近傍の細胞および、味蕾外縁部の細胞に局在が認められた(図3)。一方、有郭乳頭におけるAdipoR2タンパク質の局在も調べたが、その局在は認められなかった。

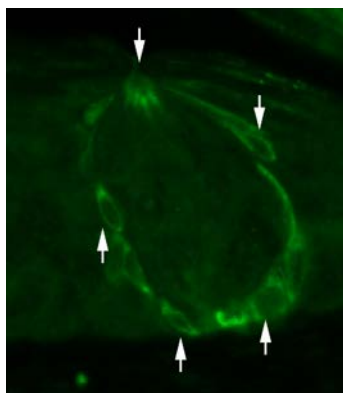


図3 マウス有郭乳頭味蕾におけるAdipoR1の局在

矢印は蛍光抗体法による抗AdipoR1抗体の陽性シグナルを示す。味蕾の味毛、味蕾基部の細胞およびその周囲の細胞においてAdipoR1の局在が認められた。

次に蛍光2重染色法により、味蕾基部近傍にあるAdipoR1発現細胞が味蕾のどの細胞型に属しているかを調べた。各細胞型のマ-

ーカータンパク質として、GLAST(グルタミン酸トランスポーター; I型細胞マーカー)、PLCβ2(ホスホリパーゼCβ2; II型細胞マーカー)、AADC(セロトニン合成酵素; III型細胞マーカー)およびShh(ソニックヘッジホッグ; 基底細胞マーカー)を使用した。その結果、味蕾基部近傍のAdipoR1細胞において、Shhが発現していることが明らかになった(図4)。一方、I型、II型、III型の細胞マーカータンパク質との共発現は認められなかった(データ未掲載)。

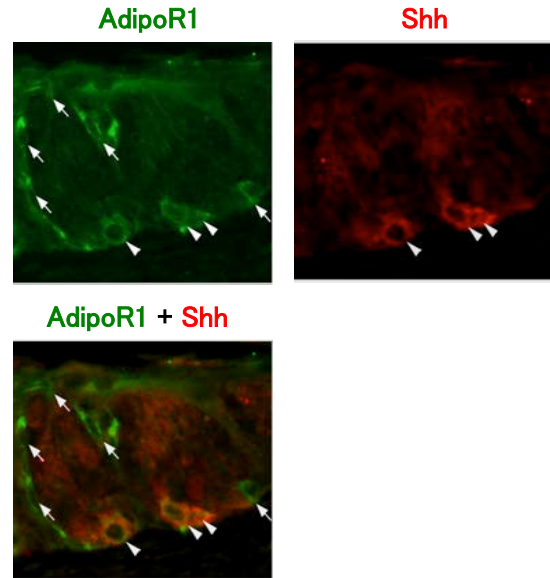


図4 マウス有郭乳頭におけるAdipoR1およびShhの発現 矢印はAdipoR1の局在, 矢頭はAdipoR1とShhの共発現を示す。

③ 絶食実験およびリアルタイムPCR法

AdipoR1に関しては、摂食時と比較して絶食時では1.4倍の発現量の増加が認められた(図5)。

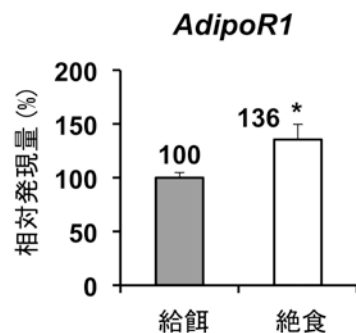


図5 マウス有郭乳頭における給餌および絶食条件下でのAdipoR1の発現量 給餌条件での発現量を100%とした。(mean±S. E., n=10, *p<0.05)

次に甘味・うま味受容体T1Rファミリー(*T1R1*, *T1R2*, *T1R3*)に関しては、摂食時と比較して絶食時ではそれぞれ1.9倍、3.7倍および2.3倍の発現量の増加が認められた(図6)。一方、苦味受容体*T2R138*および酸味受容体*PKD2L1*に関しては、絶食時では*T2R138*の発現量の変化は認められなかったが、*PKD2L1*では1.4倍の発現量の増加が認められた(データ未掲載)。

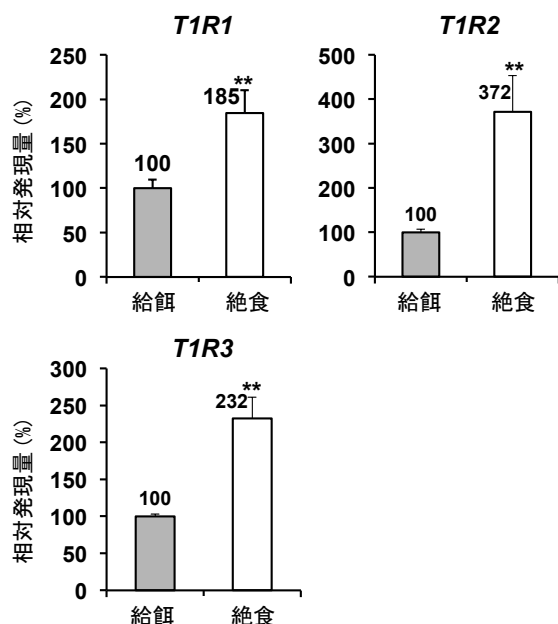


図6 マウス有郭乳頭における給餌および絶食条件下での味覚受容体の発現量
給餌条件での発現量を100%とした。(mean±S. E., n=10, **p<0.01)

④ 考察

RT-PCR法およびウエスタンブロッティング法により、マウス有郭乳頭においてAdipoR1が発現していることが明らかになった。

次に蛍光抗体法によりAdipoR1は有郭乳頭において味蕾の味毛、味蕾基底近傍の細胞および、味蕾外縁部の細胞に局在が認められた。アディポネクチンは血清中以外にも唾液中に含まれており、その濃度は血清中のものと相関していることが明らかになっている。味毛においてAdipoR1が発現が認められたことから、唾液中のアディポネクチンは味毛上のAdipoR1のリガンドとして機能し、生体の栄養状態を味蕾に伝達している可能性があるとして推測された。レプチンは中枢神経系において摂食抑制に働き、アディポネクチンは摂食促進へと働いている。さらにレプチンは味蕾においてレプチン受容体を介して甘味感受性の調節に関与している。これらのことから、味蕾において唾液中のアディポネクチンは、味毛上のAdipoR1と結合して細胞内味覚情報伝達系の調節に関与している可能性があるとして推察された。

さらに蛍光抗体法により、味蕾基底近傍のAdipoR1発現細胞はShhを発現していることが認められた。味蕾基底部のShh発現細胞は、味蕾細胞の分化に関わっている。一方、アディポネクチンは、細胞増殖や分化においても機能していることが明らかになっている。従って、AdipoR1およびShh共発現細胞において、アディポネクチンはAdipoR1を介して細胞増殖や分化に関与している可能性が推測された。

絶食条件下の有郭乳頭において、AdipoR1の発現量が給餌条件下と比較して1.4倍に増

加することが明らかになった。中枢神経系では絶食時にAdipoR1発現量の増加が認められている。このことから、味蕾においても中枢神経系と同様な、絶食時におけるAdipoR1の発現調節機構の存在が推定された。さらに絶食条件下の各種の味覚受容体において、酸味受容体PKD2L1よりも、甘味・うま味受容体T1R1, T1R2, T1R3の発現量が特に増加することが明らかになった。一方、苦味受容体Tas2r138の関しては、絶食条件下でもその発現量は変化しないことが明らかになった。このように絶食条件下において、特にT1Rファミリーの発現量の増加が認められたが、肥満ラットの味蕾においては、T1R3の発現量の低下が報告されている。これらのことから、肥満や痩身など、栄養状態により味蕾でのT1R3の発現量が調節を受けている可能性が推察された。

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6件)

① 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 小谷武司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “甘味・うま味受容体T1Rファミリーの転写制御因子の検索” 日本味と匂学会雑誌 19. 291-292 (2012), 査読有

② 瀬田祐司, 鬼頭文恵, 小谷武司, 片岡真司, 豊野孝, 豊島邦昭: “マウス味蕾におけるMash1によるAADCとGAD67の発現調節” 日本味と匂学会雑誌 19. 307-308 (2012), 査読有

③ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “絶食条件下での味蕾における味覚情報伝達系に関わる分子の発現調節” 日本味と匂学会誌 20. 223-224 (2013), 査読有

④ Kurata, S., Goto, T., K. Gunjigake, K Kataoka, S., N. Kuroishi, K. Ono, K., Toyono, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, K: “Nerve Growth Factor Involves Mutual Interaction between Neurons and Satellite Glial Cells in the Rat Trigeminal Ganglion” Acta Histochem Cytochem 46. 65-73 (2013), 査読有

⑤ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 豊島邦昭: “筋芽細胞株C2C12におけるアミノ酸(うま味)受容体T1R1遺伝子のプロモーター領域の解析” 日本味と匂学会誌 21(3): 235-236, 2014, 査読有

⑥ Nagao, S., Goto, T., Kataoka, S., Toyono, T., Joujima, T., Egusa, H., Yatani, H., Kobayashi, S., Maki, K. Expression of neuropeptide receptor mRNA during osteoblastic differentiation of mouse iPS cells.” Neuropeptides, 48(6):399-406, 2014, 査読有

[学会発表] (計21件)

- ① 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 小谷武司, 豊島邦昭: “甘味・うま味受容体T1Rファミリーの転写制御因子の検索” 日本味と匂学会. (20121003-20121005). 大阪
- ② 瀬田祐司, 鬼頭文恵, 片岡真司, 豊野孝, 豊島邦昭: “マウス味蕾におけるMash1によるAADCとGAD67の発現制御” 日本味と匂学会. (20121003-20121005). 大阪
- ③ 小谷武司, 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 豊島邦昭: “ラット味蕾におけるシナプトグリン-1の発現” 日本味と匂学会. (20121003-20121005). 大阪
- ④ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “ラット味蕾における摂食調節ペプチドAgRPの発現” 九州歯科学会. (20120519-20120520). 北九州
- ⑤ 瀬田祐司, 豊島邦昭, 森本泰宏, 小野聖太郎, 豊野孝, 片岡真司: “味覚情報処理機構の解明” 九州歯科学会. (20120519-20120520). 北九州
- ⑥ 鬼頭文恵, 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 小田昌史, 豊島邦昭, 柿木保明: “Mash1による味蕾細胞分化の調節について” 九州歯科学会. (20120519-20120520). 北九州
- ⑦ 片岡真司, Thomas E. Finger, 豊野孝, 瀬田祐司, 豊島邦昭, 後藤哲哉, 小林繁: “アデノシン受容体A2Bのマウス舌での発現” 九州歯科学会. (20120519-20120520). 北九州
- ⑧ Takashi Toyono, Yuji Seta, Ayae Kito, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: “The food deprivation increase the expression levels of sweet/umami receptors, T1R family in mouse circumvallate taste buds.” 11th international Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. (20131102-20131103). 福岡
- ⑨ Yuji Seta, Ayae Kito-Shingaki, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Yasuaki Kakinoki, Kuniaki Toyoshima: “Expression of GAD67 and Dlx5 in taste buds of mice genetically lacking Mash1.” 11th international Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. (20131102-20131103). 福岡
- ⑩ 豊野孝, 瀬田祐司, 小谷武司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “ラット味蕾における消化管ホルモンガストリンの発現.” 第73回九州歯科学会総会. (20130518-20130519). 北九州
- ⑪ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: “マウス味蕾におけるMash1によるAADCとGAD67の発現制御” 第73回九州歯科学会総会. (20130518-20130519). 北九州
- ⑫ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “絶食条件下での味蕾における味覚情報伝達系に関わる分子の発現調節” 日本味と匂学会第46回大会. (20130905-20130907). 仙台

- ⑬ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “絶食条件下での味蕾における味覚情報伝達系に関わる分子の発現調節.” 第55回歯科基礎医学会学術大会. (20130920-20130922). 岡山
- ⑭ 瀬田祐司, 鬼頭文恵, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: “味蕾におけるカドヘリンの発現” 第55回歯科基礎医学会学術大会. (20130920-20130922). 岡山
- ⑮ 鬼頭文恵, 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 柿木保明, 豊島邦昭: “味蕾3型細胞分化におけるMash1によるGAD67発現調節” 第55回歯科基礎医学会学術大会. (20130920-20130922). 岡山
- ⑯ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 豊島邦昭: “筋細胞分化におけるうま味受容体T1R1遺伝子の発現制御機構の解析” 第119回日本解剖学会総会大会. (20140326-20140328). 栃木県下野市
- ⑰ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 鬼頭文恵, 豊島邦昭: “筋芽細胞株C2C12におけるアミノ酸(うま味)受容体T1R1遺伝子のプロモーター領域の解析.” 第74回九州歯科学会総会. (20140531-20140601). 北九州
- ⑱ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: “Cre-loxリコンビナーゼ系による成体マウス味蕾におけるMash1の機能解析.” 第74回九州歯科学会総会. (20140531-20140601). 北九州
- ⑲ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 豊島邦昭: “筋芽細胞株C2C12におけるアミノ酸(うま味)受容体T1R1遺伝子のプロモーター領域の解析” 日本味と匂学会第48回大会. (20141002-20141004). 清水
- ⑳ 豊野孝, 瀬田祐司, 片岡真司, 豊島邦昭: “筋芽細胞株C2C12におけるアミノ酸(うま味)受容体T1R1遺伝子のプロモーター領域の解析.” 第56回歯科基礎医学会学術大会. (20140925-20140927). 福岡
- ㉑ 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 豊島邦昭: “Cre-lox リコンビナーゼ系による成体マウス味蕾における Mash1 の機能解析”. 第56回歯科基礎医学会学術大会. (20140925-20140927). 福岡

[その他]

ホームページ

<http://www2.kyu-dent.ac.jp/depart/2kaibu/Site/HOME.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊野孝 (TAKASHI TOYONO)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 10311929

(2) 研究分担者

豊島 邦昭 (KUNIAKI TOYOSHIMA)

九州歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：10112559

瀬田 祐司 (YUJI SETA)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90291616

片岡 真司 (SHINJI KATAOKA)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80364149