

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 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：24592774

研究課題名(和文)酸味・塩味受容細胞の味蕾内情報伝達系と分化制御機構の解明

研究課題名(英文)Cell differentiation of taste bud and neuronal network formation for salt and sour taste

研究代表者

瀬田 祐司 (SETA, YUJI)

九州歯科大学・歯学部・教授(移行)

研究者番号：90291616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は味蕾細胞の分化におけるMash1の機能に注目して、Mash1ノックアウトマウス軟口蓋味蕾における味細胞マーカーの発現や転写因子の発現変化を検索した。本研究では、さらにGABAの合成酵素の1つであるGAD67の発現変化についての検索を行った。Mash1ノックアウトマウスとGAD67-GFPマウスを交配させたマウスの軟口蓋の味蕾ではGAD67の発現が完全に消失していた。Mash1ノックアウトマウスの軟口蓋の味蕾ではDlx5の発現が消失していたことから、GAD67の発現は味蕾においても中枢神経系と同様な転写制御因子のカスケードが存在していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mash1 is expressed in subsets of neuronal precursors in both the central nervous system and the peripheral nervous system. However, involvement of Mash1 in taste bud cell differentiation remained to be demonstrated. In the present study, to begin to understand the mechanisms that regulate taste bud cell differentiation, we have investigated the role of Mash1 in regulating taste bud cell differentiation using Mash1 KO mice. In Mash1 KO mice, AADC-IR cells are missing both in the Mash1 mutant circumvallate papilla epithelium and in the taste buds of soft palate. In Mash1 KO/GAD67-GFP mice, GFP-positive (GAD67 expression type III cell) cells are also missing in the taste buds of soft palate. On the other hand, Gustducin, a type II cell marker of taste bud, is expressed in soft palate taste bud in Mash1 mutant mice. These results suggest Mash1 play an important role for expression of AADC and GAD67 in type III cell in taste buds.

研究分野：細胞生物学

キーワード：味蕾 Mash1 分化 AADC GAD67

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに味蕾細胞の分化に関わる転写因子、特に Mash1 が味蕾細胞の分化にどのような機能を演じているのかについての研究を行ってきた。その中で、Mash1 が味蕾の一部の細胞に発現し、味蕾における Mash1 の発現が味神経に依存する (Seta et al, 1999)、Mash1 が味蕾細胞の中で未分化の基底細胞と 3 型細胞の 1 部に発現し、3 型細胞の分化に関与している (Seta et al. 2003, 2006)、Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋の味蕾においてセロトニンの合成酵素である AADC の発現が消失し、Mash1 が 3 型細胞の機能発現に関与していることを示してきた (Seta et al. 2011)。また、Mash1 を培養舌上皮に強制発現しても、一部の 3 型細胞のマーカーしか誘導できないことから、Mash1 のみでは 3 型細胞の分化には不十分であることがわかった。しかしながら、3 型細胞の機能については酸味と塩味の受容に関与するなど限られたことしかわかっておらず、3 型細胞の分化制御や伝達物質の特定など未解明なことが多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究ではマウス味蕾の 3 型細胞がもつ生物学的特性の解明を目的として、3 型細胞が合成しているセロトニンならびに GABA の味蕾での機能の解析と 3 型細胞の分化に関与する転写因子の探索を行う。本研究では研究期間内に下記の実験を行い、味蕾の 3 型細胞の生物学的特性の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

セロトニンならびに GABA が味蕾内で機能しているのかを検討するために、味蕾におけるセロトニン受容体ならびに GABA 受容体のサブタイプの発現を RT-PCR, *in situ* Hybridization、免疫染色を用いて検索する。

セロトニンならびに GABA が味蕾において、どの味刺激で 3 型細胞から分泌されるのかを検討するため、茸状乳頭上皮から単離した味蕾に味刺激を与えたのち、培養液中に放出されたセロトニン・GABA を ELISA で検出を試みる。

Mash1 ノックアウト (KO) マウスの軟口蓋

味蕾の味刺激に対する神経応答を野生型マウスのものと比較して、セロトニン・GABA の味蕾での機能を検索する。

味蕾の 3 型細胞の分化に関わる転写因子を PCR-array を用いて検索する。

## 4. 研究成果

我々は味蕾細胞の分化における Mash1 の機能に注目して、Mash1 ノックアウトマウス軟口蓋味蕾における味細胞マーカーの発現や転写因子の発現変化を検索した。これまでの研究で Mash1 が、味蕾の中で 3 型細胞の分化に関与していることが、推測されており、味蕾 3 型細胞におけるセロトニン合成に関わる脱炭酸酵素である芳香族 L-アミノ脱炭酸酵素 (AADC) の発現に、Mash1 が必須であることを示してきた。本研究では、さらに GABA の合成酵素の 1 つである GAD67 の発現変化についての検索を行った。Mash1 ノックアウトマウスと GAD67-GFP マウスを交配させたマウスの軟口蓋の味蕾では GAD67 の発現が完全に消失していた。また、中枢神経系では GAD67 の発現には、Mash1 Dlx GAD67 のカスケードの存在が知られている。Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋の味蕾では Dlx5 の発現が消失していたことから、GAD67 の発現は味蕾においても中枢神経系と同様な転写制御因子のカスケードが存在していることが示唆された。

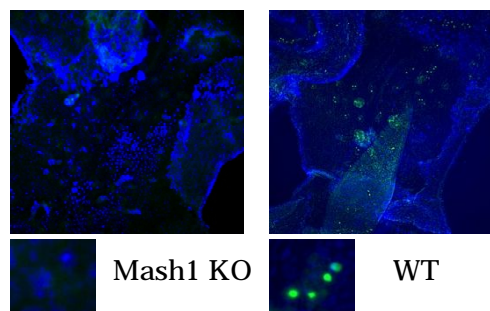


図1 軟口蓋における GAD67 の発現変化

さらに、味蕾におけるセロトニン受容体と GABA 受容体の発現を検索した。味蕾においてセロトニン受容体は、RT-PCR で検索したところ 5HT1b, 5HT3 が発現しているのが確認された。GABA 受容体の 1 つである  $\alpha$ サブユニットの発現を味蕾内で検索すると、3 型細胞と 2 型細胞のマーカーとの共発現が確認された。これらの事から、味蕾におけるセロトニンと

GABA は味覚情報伝達に関与していることが推測された。

PCR-array を用いて、Mash1 ノックアウトマウスの軟口蓋上皮と WT の軟口蓋上皮で発現する転写因子の差を比較すると、ノックアウトマウスでは、Dlx2, Dlx5, Ngn2, Math2 の発現に差が見られた。Realtime-PCR でも、これらの転写因子は、WT と比較して 5 倍から 20 倍の発現の差が認められた。

培養舌上皮細胞に Mash1 を強制発現させて、Realtime-PCR で遺伝子の変化を検索すると、AADC と GAD67 の発現がそれぞれ 20 倍、13 倍と増加しているのが観察された。また、Dlx5 を強制発現させると、AADC と GAD67 の発現がそれぞれ 13 倍、17 倍と増加していた。しかしながら、Dlx5 を発現させても Mash1 の発現には差をみることはできなかった。このことから、味蕾の型細胞における AADC と GAD67 の発現調節には、中枢神経系と同様に Mash1 から Dlx5 のカスケードが存在している可能性が推測された。

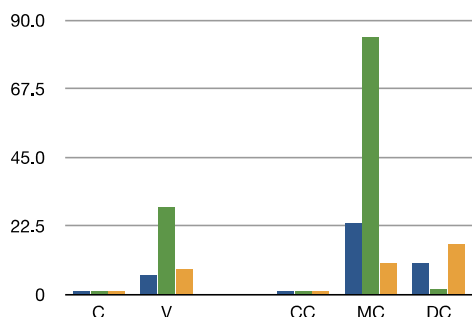


図2 培養舌上皮細胞へ遺伝子導入による発現変化

## 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13件)

1. Kito-Shingaki A, Seta Y, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1. *Chem. Senses*, 39(5):403-414:2014.
2. Shiiba S, Tanaka T, Sakamoto E, Oda M, Kito S, Ono K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Imamura Y, Nakanishi O, Inenaga K, Morimoto Y. Can the neurovascular compression volume of

the trigeminal nerve on magnetic resonance cisternography predict the success of local anesthetic block after initial treatment by the carbamazepine? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**: 117(1):e15-21, 2014.

3. Hitomi S, Ono K, Miyano K, Ota Y, Uezono Y, Matoba M, Kuramitsu S, Yamaguchi K, Matsuo K, Seta Y, Harano N, Inenaga K. Novel methods of applying direct chemical and mechanical stimulation to the oral mucosa for traditional behavioral pain assays in conscious rats. **Journal of Neuroscience Methods**: 239: 162-169, 2015.

4. 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(3): 223-224. 2013

5. Kotani T, Toyono T, Seta Y, Kitou A, Kataoka S, Toyoshima K.: Expression of synaptogyrin-1 in T1R2-expressing type II taste cells and type III taste cells of rat circumvallate taste buds. *Cell Tissue Res*. 353(3):391-8, 2013.

6. Oda M, Tanaka T, Yamashita Y, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Habu M, Kodama M, Uehara M, Kaneuji T, Kokuryo S, Miyamoto I, Yoshiga D, Seta Y, Tominaga K, Yoshioka I, Morimoto Y.: Identification of peripheral vessels in oral and maxillofacial regions on magnetic resonance angiography obtained using a balanced steady-state free-precession sequence with a time-spatial labeling inversion pulse and using fresh blood imaging. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 116(6):791-7, 2013.

7. Yamamoto N, Yamashita Y, Yoshiga D, Ishikawa A, Matsuo K, Miyamoto I, Oda M, Tanaka T, Kito S, Seta Y, Takahashi T, Koga H, Kawano K, Morimoto Y.: Occurrence of silk stitch abscess after surgery in patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 18(4):e701-5, 2013.

8. Kito S, Koga H, Kodama M, Habu M, Kokuryo S, Yamamoto N, Oda M, Nishino T, Zhang M, Matsuo K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Yoshiga D, Kaneuji T, Nogami S, Yoshioka I, Yamashita Y, Tanaka T, Miyamoto I, Kitamura C, Tominaga K, Morimoto Y.: Variety and complexity of fluorine-18-labelled fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulations in the oral cavity of patients with oral cancers. *Dentomaxillofac Radiol*. 42(7):20130014, 2013.

9. Nagai Y, Osawa K, Fukushima H, Tamura Y, Aoki K, Ohya K, Yasuda H, Hikiji H, Takahashi M, Seta Y, Seo S, Kurokawa M,

Kato S, Honda H, Nakamura I, Maki K, Jimi E.: p130Cas, Crk-associated substrate, plays important roles in osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Res.* 28(12):2449-62, 2013.

10. Yoshioka I, Tanaka T, Habu M, Oda M, Kodama M, Kokuryo S, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Fukudome Y, Tominaga K, Sakoda S, Morimoto Y.: Criteria and limitations for selecting a sagittal split ramus osteotomy for patients with skeletal mandibular prognathism and open bite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 115(4):455-65, 2013.

11. 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 *日本味と匂学会誌* 2012; 19(3) 307-308  
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 *日本味と匂学会誌* 2012; 19(3) 291-292

12. Kito S, Koga H, Kodama M, Yamamoto N, Kokuryo S, Habu M, Matsuo K, Nishino T, Kubota K, Muraoka K, Oda M, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Tanaka T, Miyamoto I, Yamashita Y, Kitamura C, Nakashima K, Takahashi T, Tominaga K, Morimoto Y. Reflection of <sup>18</sup>F-FDG accumulation in the evaluation of the extent of periapical or periodontal inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Dec;114(6):e62-9.

13. Oda M, Tanaka T, Kito S, Matsumoto-Takeda S, Otsuka K, Hayashi Y, Wakasugi-Sato N, Yoshioka I, Habu M, Kokuryo S, Kodama M, Nogami S, Miyamoto I, Yamamoto N, Ishikawa A, Zhang M, Matsuo K, Shiiba S, Seta Y, Yamashita Y, Takahashi T, Tominaga K, Morimoto Y. Magnetic resonance angiography with fresh blood imaging for identification of hemangiomas and blood vessels around hemangiomas in oral and maxillofacial regions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;113(4):559-66.

[学会発表](計 24 件)

1. Seta Y, Kito-Shingaki A, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: The functional analysis of Mash1 in mouse taste bud cell differentiation using Cre-loxP system.. International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu Kitakyushu Jan 24.

2. 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 九州歯科学会 北九州

3. 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 歯科基礎医学会学術大会 福岡

4. 瀬田祐司, 豊野孝, 片岡真司, 中富満城, 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 日本解剖学会全国学術集会 神戸

5. Seta Y, Kito-Shingaki A, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1. The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. Fukuoka.

6. Seta Y, Kito-Shingaki A, Toyono T, Kataoka S, Kakinoki Y, Yanagawa Y, Toyoshima K.: Expression of GAD67 and Dlx5 in the Taste Buds of Mice Genetically Lacking Mash1. International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu Kitakyushu.

7. 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, 歯科基礎医学会 岡山.

8. 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 九州歯科学会 北九州

9. 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 九州歯科学会 北九州

10. 豊野孝, 瀬田祐司, 小谷武司, 片岡真司, 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 仙台

11. 瀬田祐司, 豊野 孝, 片岡 真司, 豊島邦昭: マウス味蕾 型細胞の分化における Mash1 の機能について 日本解剖学会 下野

12. 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 日本解剖学会 下野

13. Yuji Seta, Ayae Kito, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: Regulation of taste bud cells by transcription factors. 5<sup>th</sup> JKB T Kitakyushu

14. Yuji Seta, Ayae Kito, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: Mash1 regulates expression of AADC and GAD67 in mouse taste bud cells. 10<sup>th</sup> international Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception Fukuoka

15. Yuji Seta, Ayae Kito, Takashi Toyono, Shinji Kataoka, Kuniaki Toyoshima: Regulation of taste bud cells by transcription factors. International

symposium on oral education and research in Kitakyushu

16. 瀬田祐司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：マウス味蕾におけるAADCとGAD67の発現制御 日本解剖学会総会 山梨

17. 片岡真司、Thomas Finger, 豊野孝、瀬田祐司、豊島邦昭、後藤哲哉、小林繁：マウス味蕾におけるアデノシン受容体の発現 日本解剖学会総会 山梨

18. 瀬田祐司、豊島邦昭、森本泰宏、小野堅太郎、豊野孝、片岡真司：味覚情報処理機構の解明 九州歯科学会総会 北九州

19. 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 九州歯科学会総会 北九州

20. 片岡真司、Thomas 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 九州歯科学会総会 北九州

21. 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 九州歯科学会総会 北九州

22. 瀬田祐司、鬼頭文恵、小谷武司、豊野孝、片岡真司、豊島邦昭：マウス味蕾におけるAADCとGAD67の発現制御 日本味と匂学会 大阪

23. 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 大阪

24. 小谷武司、豊野孝、瀬田祐司、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 大阪  
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬田 祐司 (SETA YUJI)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90291616

(2) 研究分担者

豊島 邦昭 (TOYOSHIMA KUNIAKI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10112559

豊野 孝 (TOYONO TAKASHI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10311929

小野 堅太郎 (ONO KENTARO)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40316154

片岡真司 (KATAOKA SHINJI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80364149

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：