

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：27103

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：24650497

研究課題名(和文) 味蕾および味覚障害におけるカドヘリンの関与

研究課題名(英文) The roles of cadherins in the formation and maintenance of taste buds and taste disorder

研究代表者

重藤 麻美 (Shigeto, Mami)

福岡女子大学・国際文理学部・学術研究員

研究者番号：20458110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：味覚器である味蕾の形態形成・維持の分子機構を、同種親和性細胞接着分子である古典的カドヘリンに着目して解明することを目的とした。

本研究により、18種の古典的カドヘリンのうち11種がRNAレベルで味蕾細胞に発現していることが分かった。そのうちのいくつかは、タンパク質レベルで味蕾細胞に局在すること、細胞接着に必要なカテニンと共局在することが示された。さらに、のうち1種の古典的カドヘリン(以下Xと称す)は、形態学的に分類されるⅡ型味蕾細胞のうち、主にⅡ型細胞に局在していることが示された。超微形態レベルでXは細胞膜上に局在しているが、隣り合う細胞で発現していないことが示された。

研究成果の概要(英文)：We focus on the roles of classical cadherins in the formation and maintenance of taste buds, since they have been known as important molecules for morphogenesis.

In this study, we obtained the following results. Our results by RT-PCR indicated that among the 18 classical cadherins, which have been reported, 11 ones were expressed in taste bud cells. Using immunohistochemistry, it was confirmed that several of these 11 classical cadherins were localized in taste bud cells. Moreover, classical cadherin-positive taste bud cells showed immunoreactivity for alpha catenin, which is associated with the C-terminus of classical cadherins. The taste bud cells which expressed one of these classical cadherins were confirmed that they were the Type-II cells. Our immunohistochemical and ultrastructural analyses revealed that this classical cadherin localized on plasma membrane but was not expressed in adjacent cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：味蕾 古典的カドヘリン

### 1. 研究開始当初の背景

正常な味覚は、「おいしく食事をいただく」という生活の質の向上に重要なだけでなく、「健康な体を作る」上でも非常に重要である。味覚受容器である味蕾は、主に舌乳頭に存在し、周囲の上皮と明瞭に区別されるタマネギのような形態を有した 50~100 個の味蕾細胞の集合構造から成る。味蕾細胞は平均して約 10 日のサイクルで入れ替わっているが、味蕾の形態は常に維持されている。しかし、どのような分子機構により味蕾の形態が維持されているのかはよく分かっていない。

多くの組織では、形態形成や維持に細胞接着分子カドヘリンが重要な役割を果たすことが知られている。つまり、味蕾の形態形成や維持にカドヘリンが関与していることは妥当であると考えられる。しかし、本研究開始当初、味蕾の形態形成・維持にカドヘリンが関与するという報告はなかった。

申請者らは、カドヘリンスーパーファミリーの中でも、強い接着力を持ち、同種親和性を示す古典的カドヘリンに着目した。予備的な実験として、味蕾を含む舌組織（有郭乳頭を含む舌上皮）とそれに隣接する味蕾を含まない舌組織（有郭乳頭に隣接する舌上皮）を用いて、報告されている 18 種の古典的カドヘリンの発現を RT-PCR 法により検討したところ、2 種の組織の間で、いくつかの古典的カドヘリン特異的増幅産物の増幅量に差があることを見いだした。

### 2. 研究の目的

味蕾細胞とその周辺の上皮細胞との間で、発現量に差がある古典的カドヘリンを同定し、その発現様式・味蕾における機能を明らかにすることで、味蕾の形態形成・維持の分子機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究全般を通して、マウス舌有郭乳頭を用

いた。

#### (1) 味蕾における古典的カドヘリンの発現解析

味蕾細胞とその周辺の上皮細胞との間で、発現量に差がある古典的カドヘリンを選抜した。深麻酔下のマウスから舌を取り出し、有郭乳頭を切り出した。OCT コンパウンドに包埋後、ヘキササン+ドライアイス冷却剤で速やかに凍結させ、凍結切片作製用マイクロトームを用いて 7  $\mu\text{m}$  の新鮮凍結切片を作製した。細胞単位で単離することができるレーザーマイクロダイセクション法を用いて、これらの切片から味蕾細胞とその周辺の上皮細胞を別々に回収後、各細胞群から総 RNA を抽出し、逆転写酵素とオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。報告されている 18 種の古典的カドヘリンを増幅するプライマーペアを構築し、半定量的 RT-PCR 法を用いて各細胞群間の古典的カドヘリン特異的増幅産物の増幅量を比較した。

#### (2) 味蕾における古典的カドヘリンの局在解析

半定量的 RT-PCR の結果、味蕾細胞とその周辺の上皮細胞との間で増幅量に差があった古典的カドヘリンの局在を検討するため、これらの古典的カドヘリンに対する抗体を用いた免疫組織化学を行った。深麻酔下のマウスから、舌を取り出すか、もしくは、適当な濃度のパラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定したマウスから舌を取り出して有郭乳頭を切り出した。前者は OCT コンパウンドに包埋後、ヘキササン+ドライアイス冷却剤で速やかに凍結させ、凍結切片作製用マイクロトームを用いて 7  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。後者は、灌流固定に用いた固定液による後固定、25%スクロース溶液による置換の後、同様に OCT コンパウンドに包埋、凍結、切片作製を行った。新鮮凍結切片は、スライドグ

ラスに貼付、風乾後、適当な固定液で固定し、ブロッッキング剤、古典的カドヘリンに対する抗体、適当な二次抗体と順次反応させ、その局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。灌流固定したマウスから作製した切片は、固定の操作を除いて、新鮮凍結切片と同様に行った。

#### (3) 味蕾における古典的カドヘリン局在細胞の味蕾細胞種の検討

味蕾細胞は、形態学的に I~III 型に分類される。I~III 型のどの味蕾細胞種に古典的カドヘリンが局在しているのかを検討するため、I~III 型細胞に特異的なマーカー抗体を用いて古典的カドヘリン抗体との二重免疫染色を行った。方法は、(2)に準ずる。ただし、古典的カドヘリンに対する抗体との反応の後に、各味蕾細胞マーカー抗体との反応を行った。

#### (4) 超微形態レベルでの古典的カドヘリンの局在検討

超微形態レベルでの古典的カドヘリンの局在を明らかにするため、包埋前免疫電子顕微鏡法による観察を行った。深麻酔下のマウスを、適当な濃度のパラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合溶液を用いて灌流固定した後、舌を取り出し、有郭乳頭を切り出して同固定液による後固定を行った。25% スクロース溶液による置換の後、組織を OCT コンパウンドに包埋し、ヘキサン+ドライアイス冷却剤で速やかに凍結させて 7  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。凍結切片は、スライドグラスに貼付、風乾後、ブロッッキング剤、古典的カドヘリンに対する抗体、ビオチン標識二次抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン、3,3' ジアミノベンジジン四塩酸塩溶液と順次反応させた。同切片は、続けて、オスミウム酸固定液を用いて固定し、50、70、80、95、100%エタノール系列による脱水の後、

エポキシ樹脂包埋超薄切片を作製し、透過電子顕微鏡を用いて観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 味蕾における古典的カドヘリンの発現解析

現在までに報告されている 18 種の古典的カドヘリンのうち 10 種類において、味蕾細胞とその周辺の上皮細胞との間で半定量的 RT-PCR 増幅産物の増幅量に差があることを見出した。このうち、味蕾細胞で特異的に増幅された、もしくは、味蕾細胞での増幅量が上皮細胞でのそれを上回ったものは 9 種類、上皮細胞で特異的に増幅された、もしくは、上皮細胞での増幅量が味蕾細胞でのそれを上回ったものは 1 種類であった。また、どちらの細胞でも増幅され、今回用いた方法ではその増幅量に差が見られなかった古典的カドヘリンが 1 種類あった。

### (2) 味蕾における古典的カドヘリンの局在解析

(1)の結果、増幅量に差があった古典的カドヘリンのうち、抗体が市販されている複数種について、その局在を免疫組織化学を用いて検討した。その結果、いくつかの古典的カドヘリンが味蕾細胞特異的に局在していることが明らかになった(図1)。

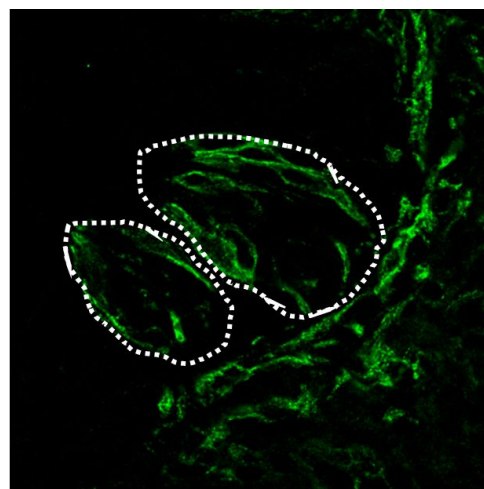


図1 味蕾における古典的カドヘリンの局在例  
白の点線で囲んだ部分が味蕾。味蕾細胞でシグナルが観察できる。

古典的カドヘリンの細胞接着は、古典的カドヘリンの細胞内領域が、カテニン分子群を介して細胞骨格とつながることで機能することが知られている。このカテニン分子群のうち $\alpha$ カテニンに対する抗体と、古典的カドヘリンに対する抗体を用いた二重免疫染色を行ったところ、古典的カドヘリンは $\alpha$ カテニンと共局在しており、味蕾においても古典的カドヘリンが細胞接着の機能を担っていることが示唆された。

### (3) 味蕾における古典的カドヘリン局在細胞の味蕾細胞種の検討

(2)の結果、味蕾細胞に局在していることが明らかになった古典的カドヘリンに関して、形態学的に分類されるI~III型のどの味蕾細胞に局在しているのかを、二重免疫染色によって検討した。本報告までに、1種類の古典的カドヘリン(以下、Xと称する)についてのみ、明瞭な結果が得られており、主にII型細胞に局在することが明らかとなった(図2)。X以外の古典的カドヘリンについては、現在検討中である。

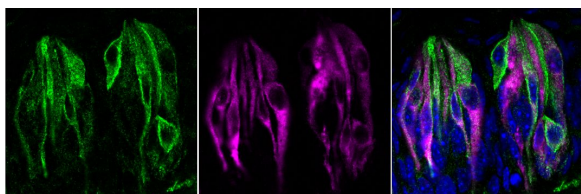


図2 古典的カドヘリン(X)は主にII型細胞に局在する  
パネル左から、古典的カドヘリン(緑)、II型細胞マーカー(PLC $\beta$ 2)(マゼンタ)、マージ(青は細胞核を示す)。

### (4) 超微形態レベルでの古典的カドヘリンの局在検討

Xについて、超微形態レベルでの局在を明らかにするため、包埋前免疫電子顕微鏡法による観察を行った。その結果、Xは、細胞膜上に局在しているが、隣り合う細胞で発現していないことが明らかとなった。このことより、少なくとも、Xは同種親和性結合ではない様式で細胞接着を行っていることが示唆

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 3 件)

Hamaguchi-Hamada K, Kurumata-Shigeto M, Minobe S, Fukuoka N, Sato M, Matsufuji M, Koizumi O, Hamada S. Thrombospondin Type-1 Repeat Domain-Containing Proteins Are Strongly Expressed in the Head Region of *Hydra*. PloS One, 11(4), e0151823, 2016 (査読有)

Koizumi O, Hamada S, Minobe S, Hamaguchi-Hamada K, Kurumata-Shigeto M, Nakamura M, Namikawa H. The nerve ring in cnidarians: its presence and structure in hydrozoan medusae. Zoology, 118(2), 79, 2015 (査読有)

Hamada S, Hirashima H, Imaeda M, Okamoto Y, Hamaguchi-Hamada K, Kurumata-Shigeto M. Thiamine deficiency induces massive cell death in the olfactory bulbs of mice. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 72(12), 2013 (査読有)

[学会発表](計 1 件)

Mami Kurumata-Shigeto, The roles of classical cadherins in the formation and maintenance of taste buds, 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会, 2015年12月11日~13日, JMS アステールプラザ(広島県広島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

重藤 麻美 (SHIGETO Mami)

福岡女子大学・国際文理学部・学術研究員  
研究者番号: 20458110

### (2) 連携研究者

濱田 俊 (HAMADA Shun)

福岡女子大学・国際文理学部・教授  
研究者番号: 60282349