

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861422

研究課題名(和文) ラットの舌の味覚受容体遺伝子(T1Rs)発現に対する亜鉛による影響の検討

研究課題名(英文) Examination of the influence of zinc on the expression of taste receptor genes(T1Rs) in the rat tongue

研究代表者

田中 真琴(TANAKA, Makoto)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00526121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの有郭乳頭部の上皮において、甘味と旨味の味覚受容体であるT1Rsの遺伝子発現が、亜鉛の欠乏より影響されるのか、RT-PCRを用いて検討した。正常食飼育ラットおよび亜鉛欠乏食飼育ラットで、同様の遺伝子発現を認め、亜鉛欠乏による明らかな影響は認めなかった。また、in situ hybridizationを用いて、T1Rsの正常ラットの味蕾における発現を検討した。T1Rsの発現は、味蕾周囲の上皮細胞には認めず、味蕾内の味細胞に特異的に認められた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of zinc deficiency on gene expression for T1Rs, sweet and umami taste receptors, using rat circumvallate papilla epithelium by RT-PCR. Zinc deficiency did not affect gene expression for T1R1, T1R2, T1R3. In situ hybridization was performed to investigate the expression and localization of T1Rs. The expression of T1Rs was specifically found in taste cells in taste bud.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：味覚受容体遺伝子

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物は口腔内に取り込まれると、味蕾に存在する味覚受容体に感知され、細胞内シグナル伝達系を介して、味神経に神経伝達物質が放出される。神経に伝達されたシグナルは脳に到達し、味として認知される。味蕾で受容されるのは、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の5味質であり、そのうち甘味・うま味受容体はG蛋白質共役型受容体(GPCR)のひとつであるT1Rファミリーである。

临床上、味覚障害と亜鉛欠乏との関連は以前より指摘されているが、その発症機序は明らかでない。味覚受容体遺伝子の発現および味細胞の分化に、亜鉛がどのように関与しているかを検討することは、味覚障害の原因の解明に重要であると考えた。

これまでの研究で、亜鉛欠乏によって苦味の味覚受容体遺伝子であるT2Rファミリーの一部の遺伝子の発現頻度が低下することが知られている。

ラットの有郭乳頭部の上皮における、T1Rファミリーの発現に変化については、これまで報告がなく、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

(1) 正常食飼料で飼育したラットの舌の有郭乳頭部の上皮における甘味・旨味の味覚受容体遺伝子であるT1Rファミリーの発現をRT-PCRを用いて検討する。

(2) 亜鉛欠乏飼料で飼育したラットの有郭乳頭部の上皮におけるT1Rファミリーの発現をRT-PCRを用いて測定し、正常ラットとの相違を検討する。

(3) in situ hybridizationを用いて、ラットの舌の味細胞でのT1Rファミリーの存在の有無と原位置を確認する。

3. 研究の方法

(1) RT-PCR

対象

・正常食飼育ラット(Control # 1、2)

: n=2

正常飼料(亜鉛欠乏飼料に亜鉛7mg/100gを添加)で飼育し、8週齢時に検体を採取した。

・亜鉛欠乏飼料飼育群(Zn # 1、2)

: n=2

正常飼料で飼育した4週齢のラットを、亜鉛欠乏飼料(亜鉛含有量0.06mg/100g以下)で4週間飼育し、8週齢時に検体を採取した。

舌の有郭乳頭部の上皮の採取

人道的な方法で安楽死させたラットから舌を摘出した。舌の上皮下に、上皮剥離用酵素溶液を注入し、有郭乳頭部の上皮を採取した。

RT-PCR (End-point 法)

プロメガ社のGoTaq®システムを用いて以下の条件でRT-PCRを施行した。

・cDNA: ラット舌上皮

: control#1、control#2、Zn#1、Zn#2

・Template: 25 ng/reaction

・Primer set:

Tas1r1(1345-1738 in NM_001288618.1)
size = 394bp

Tas1r2 (1401-2235 in NM_001271266.1)
size = 835bp

Tas1r3(1228-1655 in NM_130818.1)
size = 428bp

Gapdh

・Enzyme: GoTaq(promega)

・PCR cycles:

35, 40, 45, 50 cycles

(Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3)

25, 30, 35 cycles (Gapdh)

ラットの上皮における mRNA の発現を、電気泳動での輝度の有無で評価した。

(2) in situ hybridization (ISH)

人道的な方法で安楽死させたラットから舌を摘出し、ホルムアルデヒド系の組織固定液 G-Fix (Genostaff) を使って浸漬固定した。

キシレン代替品として低毒性溶剤 G-Nox (Genostaff) を使ったプロトコールのもと、パラフィン包埋装置 CT-Pro20 (Genostaff) を用いてパラフィン包埋してブロックを作製した。

約6µmの厚さで薄切して切片を作製した。

ISH

以下の条件・方法でISHを施行した。

(1) T1r1ならびにT1r2については正常ラット舌の1st Strand cDNA (Genostaff) をもとに、またT1r3については正常ラット胃の1st Strand cDNA (Genostaff) をもとにクローニングしたのち、in vitro transcription 法のもとジゴキシゲニンを標識 (DIG RNA Labeling Mix; Roche Diagnostics) してプローブを作製した。

・T1R1 (1805-2676 in NM_053305.1)
size=872

・T1R2 (1401-2235 in NM_001271266.1)
size=835

・T2R3 (646-1592 in NM_130818.1)
size=947

) 試薬キット: ISH Reagent Kit (Genostaff)
) 酵素: Proteinase K (Wako Pure Chemical Industries)

) 検出抗体: アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche Diagnostics)

) 発色基質: NBT/BCIP (Sigma-Aldrich)

) 対比染色: Kernechtrot Stain Sol.

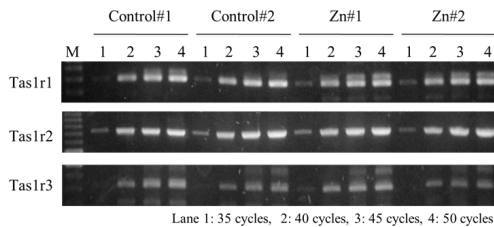
(Muto Pure Chemicals)

) 封入: G Mount (Genostaff)

4. 研究成果

(1) RT-PCR

電気泳動の結果を以下に示す。



Control # 1 ・ Control # 2 ・ Zn # 1 ・ Zn # 2
いずれも、T1R1、T1R2、T1R3 すべてで良好なバンドを検出した。

Sekineらは、ラットの有郭乳頭部の上皮を用いて、苦味の味覚受容体遺伝子である T2R ファミリーの発現を、RT-PCR によって検討し、以下のように報告している。¹⁾

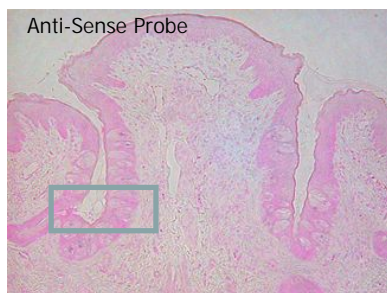
- ・ 亜鉛欠乏食飼育ラットで発現が低下
T2R40、T2R107
- ・ 亜鉛欠乏食飼育ラットで発現に変化なし
T2R105、T2R118、T2R121

今回の結果では、T2R105、T2R118、T2R121 と同様に、亜鉛欠乏状態においても、味覚受容体遺伝子 T1R ファミリーは変化を認めなかった。これらの結果は、その原因はいまだ明らかでないが、味覚受容体遺伝子の発現に対する亜鉛の影響は、味覚に關与する全ての遺伝子に一律に及ぶものではないことを示唆していると考えられた。

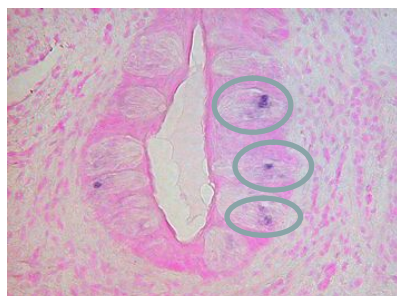
(2) in situ hybridization (ISH)

ISH において、いずれのラットでも細胞特異的なシグナルが検出された。

有郭乳頭部の切片



味細胞部の拡大 (×200)



シグナル陽性と判断した部位

アンチセンスプローブで処理した 2 枚のスライド (切片) で染まっていた細胞の数を以下の表に示す。

	T1R1	T1R2	T1R3
#1	51	176	150
#2	63	317	229
#3	64	188	147

Ikeda らは苦味受容体遺伝子である T2R ファミリーのうち、T2R105、T2R118、T2R136 に対して、ISH にてその原位置は味蕾中の味細胞に存在するとしている一方、塩味の味覚受容体遺伝子である ENaC については、舌の上皮全体にシグナルが検出されたと報告している。²⁾

今回の検討では、T1R ファミリーは、T2R の一部の遺伝子と同様、舌の味蕾中の味細胞のみに発現しており、それ以外の細胞には発現していないことが示された。これは、味細胞のみが、甘味・旨味を受容していることが推定された。

(3) 今後の展望

RT-PCR にて、正常食飼育ラット・亜鉛欠乏食ラットともに味覚受容体遺伝子の発現を認めた。ただし、End-point 法では、増幅された PCR 産物の量は、反応開始時のテンプレート量の初期値と必ずしも相関しないため、亜鉛欠乏で発現量が低下している可能性は考えられる。ISH にて、T1R ファミリーは、味細胞に特異的に発現していることが示されたので、今後は亜鉛欠乏食飼育ラットの味細胞での ISH のシグナル陽性細胞数を測定し、亜鉛の味覚受容体遺伝子発現への影響を更に検討したいと考えている。

引用文献

- 1) Sekine H et al. Effects of zinc deficiency and supplementation on gene expression of bitter taste receptors (TAS2Rs) on the tongue. *Laryngoscope* 2012; 122:2411-2417.
- 2) Ikeda A et al. Expression and localization of taste receptor genes in the vallate papillae of rats: effect of zinc deficiency. *Acta otolaryngol* 2013; 133(9):957-964.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

ラットの有郭乳頭部における味覚受容体遺伝子 (T1R1s) の発現の検討
2016.5.19 日本耳鼻咽喉科学会総会(愛知県名古屋市名古屋国際会議場)

〔図書〕(計 0 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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 真琴 (TANAKA, Makoto)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00526121

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：