

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 三 好 美 咲

味覚の研究では、従来、多くの生理学的知見が蓄積されてきたが、それを分子レベルで検証する研究は進んでいない。本論文は、味覚受容の分子機構の研究の基盤として、味覚組織において細胞特異的な分子マーカーを単離する方法およびその発現を細胞レベルで検出する方法を確立し、その上で、味蕾で細胞特異的な発現を示す複数のカルシウムシグナリングの構成因子に関して遺伝子発現の相関を解析し、分子機構を明らかにした結果を論述したもので、序章に続く3章から成る。

第1章は、味覚組織に適した *in situ*ハイブリダイゼーション法の検討結果を述べている。すなわち、種々の条件検討を行って、凍結切片にジエチルピロカルボネートによる前処理を行う方法が味覚組織に対して有効であることを見いだした筆者は、複数の分子の発現の相関関係を解析する手法として、連続切片による方法や蛍光基質による二重染色法の条件を確立した。その結果、一定以上の発現を示す遺伝子の味蕾における発現の解析と、2つの遺伝子の発現相関の解明が可能になった。

第2章に述べる研究では、ラット有郭、葉状乳頭 上皮特異的なサブトラクションライブラリーを作製し、味蕾細胞の特性を示す分子マーカーの単離・解析を行った。ここでは、サブプレッションPCR法とビオチン化ドライバーを用いたサブトラクション法の二つの方法を組み合わせてライブラリーを作製し、試料が少ないという問題点の克服に一定の成果を上げた。さらに、このライブラリーに対して、テスター、ドライバーの各cDNAをプローブに用いたディファレンシャルスクリーニングを行った結果、合計2344クローンの約5%にあたる117個が、テスターにより強いシグナルを示すクローンであった。その中には、*in situ*ハイブリダイゼーションで、乳頭上皮に特異的な発現が検出されるものが含まれていた。また、このうち、既知の遺伝子と高い相関を示した約43%のクローンの中には、神経細胞に特異的な発現を示す遺伝子、細胞の分泌機能、細胞接着や細胞内骨格系に関与する分子などが含まれており、味覚機能との関わりが強く予想された。他方、32.5%のクローンは、データベースに登録された配列とは相同性がなく、この中には味蕾の特性を示す新規な分子マーカー候補が含まれている可能性がある。

第3章は、味蕾中の一部の細胞に特異的な発現を示すカルシウムシグナリング構成要素についてcDNAクローンの単離と発現の相関関係を解析した結果を述べている。まず、ドジョウのヒゲからphospholipase C β 2(PLC β 2)を単離して味蕾細胞で特異的な発現を示すことを明らかにし、PLC β 2が脊椎動物の味蕾で普遍的にカルシウムシグナリングを担う分子として機能していることを示した。次に、PLC下流に位置するinositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP $_3$)受容体について、ラットの味覚組織に発現する分子種をRT-PCR法によって検索し、IP $_3$ R3が味蕾中の細胞に特異的な発現を示すことを明らかにした。以上の結果と従来の知見とから、味蕾で細胞特異的な発現を示すカルシウムシグナリング

経路に関係する分子として、G 蛋白質共役受容体である TR2、G 蛋白質である gustducin および Gi2、エフェクターである PLC β 2、その下流の IP $_3$ R3、という5つのプローブが得られた。そこで、ラット有郭乳頭におけるこれらの発現の相関性を第1章の研究で確立した方法を用いて検定した。その結果、Gi2、PLC β 2、IP $_3$ R3が味蕾中の約20~30%にあたる同一細胞群で発現することが明らかになった。一方、gustducin および TR2 発現細胞については互いの発現相関は見られず、共に上記3分子を発現している細胞群の中に含まれていた。したがって、味蕾のカルシウムシグナリングの分子機構として、Gi2 (β γ サブユニット) \rightarrow PLC β 2 \rightarrow IP $_3$ R3 という経路が存在し、TR2がこのような経路にシグナルを伝える受容体の1つであることが示唆された。また、このようなカルシウムシグナリング経路を有する細胞の約半数は gustducin を発現しており、gustducin も PLC β 2 を活性化する可能性が示された。

以上、本論文は、味覚受容の分子機構の研究の基盤となる手法を確立し、味蕾におけるカルシウムシグナリング経路の分子機構を明らかにしたものであって、学術上、応用上寄与するところが少なくない。よって、本審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。