

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 12 年度博士課程進学
氏名 石丸 喜朗
指導教官名 阿部 啓子

論文題目

アクチン制御因子 CAP の味細胞特異的発現の発見とその解析

味覚は生命維持に必要な食物の摂取、有害な物質の忌避を決定する重要な外部感覚である。食物は主に舌上皮に存在する味蕾という組織で受容され、その情報は味神経を通じて最終的に脳へと到達する。味蕾は約 50-100 個の細胞から構成されており、これらには味受容細胞（味細胞）、支持細胞、基底細胞といった機能的に異なる細胞が含まれる。また、味蕾細胞は約 10 日でターンオーバーを繰り返していることから、様々な分化段階の細胞が共存する。本研究では、味細胞と味細胞以外の細胞の特性や機能に関わる分子、また、味蕾細胞分化に関わる分子を同定することを目的に、単一細胞ライブラリーの作製、ディファレンシャルスクリーニングを行った。研究当初は味覚受容体が同定されておらず、味細胞を定義することもできなかったことから、味細胞マーカー分子の獲得も視野に入れて上記研究を行った。

1. 単一細胞ライブラリーから味細胞特異的発現を示すアクチン制御因子 CAP の同定

まず、ラット舌有郭乳頭を含む上皮を剥離し、さらに実体顕微鏡下で味蕾を単離したのち、ピペッティングによって単一の細胞に分離させた。味細胞を含む紡錘形細胞を単離し、それぞれから cDNA 合成と PCR 増幅を行った。得られた増幅 cDNA の品質を評価するため、味蕾発現遺伝子をプローブとしてサザンプロット解析を行い、cDNA 合成・増幅の効率が良いと判断された 3 個の細胞から cDNA ライブラリーを作製した。

次に、細胞特異的発現分子を獲得するため、ディファレンシャルスクリーニング、塩基配列解析、*in situ* ハイブリダイゼーションの 3 段階のスクリーニングを行った。細胞ごとに発現量に違いが見られる cDNA を平均的 cDNA 量からの差として抽出し、該当するクローンを 2 個のライブラリーから合計 460 個単離した。この中から、味蕾細胞機能への関わりが期待されるが

まだ報告のないクローンなど 15 種の cDNA クローンを選択し、有郭乳頭味蕾における発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーションによって解析したところ、アクチン制御因子である CAP (cyclase-associated protein) が、味蕾特異的であつ一部の味蕾細胞特異的に強く発現することが明らかになった。

CAP は真核細胞普遍的に存在するアクチン制御因子であり、N 末端領域、中央に位置するポリプロリン領域、C 末端領域に分けられる。C 末端領域は G アクチンと結合する領域であり、アクチン制御に直接関わる。一方、N 末端領域とポリプロリン領域は他のタンパク質との相互作用領域と考えられているが、哺乳類 CAP に関してはこれらと相互作用する分子は未同定である。酵母 CAP の cAMP 経路における機能、粘菌 CAP が N 末端領域を介して PIP₂ による制御を受けること、また、ショウジョウバエ CAP の C 末端領域 (G アクチン結合領域) が極性細胞の形態形成に重要であることなどを総合して考えたとき、味蕾における CAP に関して、(1)味蕾細胞の分化過程における形態形成、(2)味覚シグナル伝達分子の移動・局在、(3)シナプス伝達などの際にアクチン系細胞骨格を制御する、といったいくつかの仮説が想定される。そこで以下、味蕾における CAP 機能を明らかにする目的で、①CAP 発現細胞の同定と細胞内局在、②上流因子の検討と CAP 分子同士の相互作用、③味蕾における CAP とコフィリンの関係を解析した。

2. CAP 発現細胞の性質の解析

CAP が発現する細胞の性質とその細胞内存在部位を調べるため、CAP 特異的ポリクローナル抗体を作製し、免疫染色を行った。まず、甘味、苦味両方の味覚シグナル伝達経路に位置する 3 型 IP₃ 受容体を発現する細胞と CAP 発現細胞との関係を、免疫二重染色によって解析した結果、CAP 発現細胞は 3 型 IP₃ 受容体発現細胞、すなわち味を受容する細胞系列 (味細胞系列) に含まれた。次に、シナプス伝達に機能する SNAP25 を発現する細胞との関係を同様に解析した結果、CAP と SNAP25 発現細胞はほぼ一致し、CAP は味神経とシナプスを形成している成熟した味細胞で特異的に発現することが明らかになった。

さらに、3 型 IP₃ 受容体発現細胞における CAP 陽性細胞と陰性細胞の違い、すなわち、異なる細胞系譜に属するのか、あるいは、同じ細胞系譜に含まれる分化段階が違う細胞であるかを調べるため、出生後の味蕾分化過程における各分子の発現解析を行った。その結果、CAP は SNAP25 同様に、味蕾細胞マーカー分子サイトケラチン 8 や 3 型 IP₃ 受容体よりも 1 週程度遅れて発現し始めた。つまり、CAP を発現する細胞は、3 型 IP₃ 受容体発現細胞と同じ細胞系譜に属し、分化段階後期になってシナプス関連分子と共に発現を開始することが強く示唆された。

また、苦味受容細胞系譜を示すガストデューシン陽性細胞との関連を検討したところ、互いの陽性細胞の一部が重なることが示された。同様の分化過程の解析から、CAP 陽性ガストデューシン陰性細胞は甘味受容細胞を、CAP 陰性ガストデューシン陽性細胞は分化途中の苦味受容細胞を表していることが明らかになった。すなわち、CAP は神経伝達機能を有する成熟した甘

味と苦味の受容細胞に発現していることが示された。

細胞内の存在部位については、主に細胞の上半分に、一部は基底部の細胞質部位に局在し、それぞれ、味覚シグナリングおよびシナプス伝達という場で、CAP がアクチン系細胞骨格を制御することが予想された（図参照）。

3. CAPの上流因子の解析

CAP は N 末端領域やポリプロリン領域において他の因子からの調節を受け、アクチン系細胞骨格を制御していると考えられる。この CAP の上流に位置する制御因子を同定するため、ここでは CAP のポリプロリン領域とこれと相互作用する SH3 領域に着目し、様々な分子に存在する SH3 領域に関して、酵母 two-hybrid 法と GST pull down 法を用いて解析した。同時にこれまでも報告があった CAP の各領域間の相互作用も検討し、他分子との相互作用との比較から CAP がとりうる分子状態を考察した。

具体的には、味細胞におけるシナプス構造及び細胞接着構造における足場タンパク質 SAP ファミリーの SH3 領域、ショウジョウバエ CAP で遺伝学的相互作用をすることが知られている非受容体型チロシンキナーゼ Abl の SH3 領域と F アクチン結合タンパク質 Mena のポリプロリン結合領域を検討した。その結果、これらの分子に関しては現在までのところ、次に示す CAP の各領域間の相互作用ほど明確な結合は上記方法では検出されなかった。一方、CAP の各領域間の相互作用に関しては、C 末端領域同士の強い分子間相互作用、N 末端領域と C 末端領域のそれよりは弱い有意な分子内・分子間相互作用が示された。以上の結果、上記の方法では、CAP 分子内および CAP 同士の強い相互作用の中に、他分子との弱い相互作用が埋もれてしまっている可能性が示唆された。

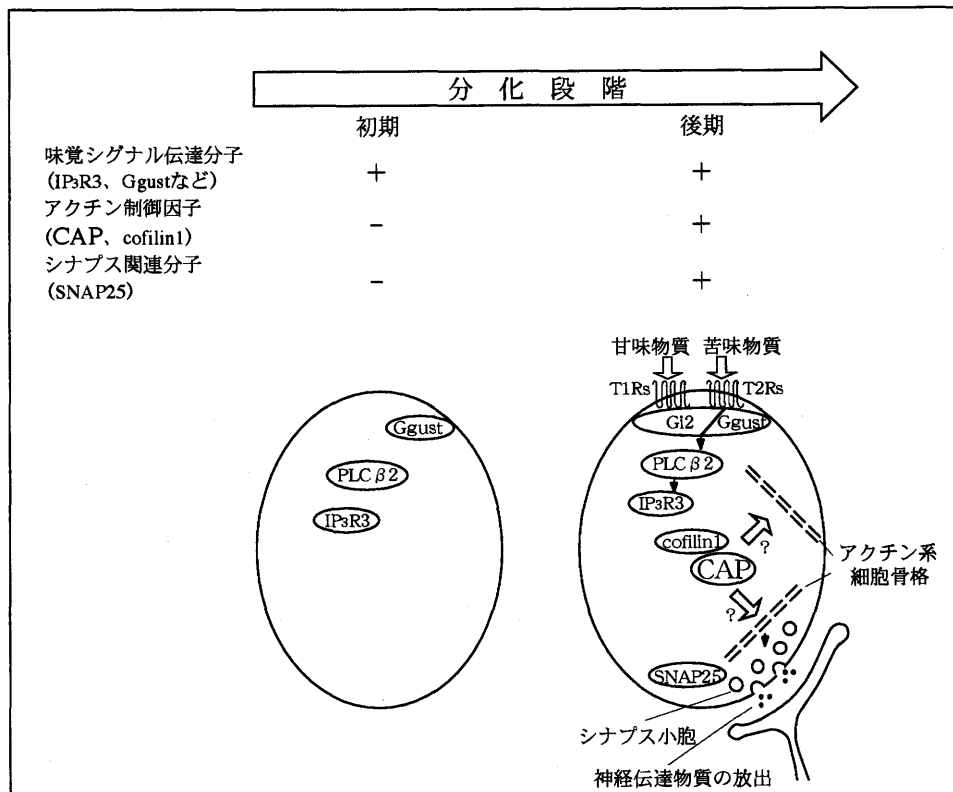
そこで、SH3 領域を持つ 37 種類のタンパク質を固定した PVDF 膜を用い、分子内・分子間相互作用が起きにくい CAP のポリプロリン領域と各種 SH3 領域との相互作用を解析した。その結果、非受容体型チロシンキナーゼ Src をはじめ、いくつかの分子が強度は強くないが、ある程度特異的に相互作用する可能性が示された。今後、味細胞において、これらの分子が CAP に対してどのように作用し、それがどのような生理的意義を持つかを明らかにしたい。

4. CAPの下流因子の解析

従来 CAP は、その C 末端領域が G アクチンと直接結合することで、細胞内のフリーなアクチンモノマー濃度を減少させ、その結果アクチン繊維の重合を阻害すると考えられてきた。しかし最近、別のアクチン制御因子であるコフィリンに関する免疫沈降実験と生化学的解析から、CAP はフリーの G アクチンをトラップするだけでなく、G アクチンの ADP-ATP 交換反応を促進させること、また、コフィリンのアクチン繊維脱重合活性を促進させることが新たに示された。つまり、CAP はコフィリンと共にアクチン繊維のターンオーバー速度を主に促進する方向に調節する可能性が出てきた。

そこで、味蕾におけるコフィリンの発現様式を調べたところ、RT-PCR 法ではコフィリン 1 が主なコフィリンファミリー発現分子と同定されたため、コフィリン 1 特異的抗体を用いて免疫染色した。その結果、CAP と同様に一部の味蕾細胞に強い染色が観察され、さらに、CAP との免疫二重染色の結果、コフィリン 1 と CAP はほぼ同じ細胞に発現していることが明らかになった。この結果は分化過程における発現開始時期の解析からも支持された。すなわち、味蕾においては、CAP はコフィリン 1 と協調してアクチン系細胞骨格を制御していると考えられる。

以上のように本研究から、アクチン制御因子 CAP が分化段階後期の味細胞特異的に発現することを明らかにし、コフィリン 1 と協調してアクチン繊維の流動性を高めている可能性が提案された。具体的には、味細胞が味神経とシナプスを形成する際に、あるいはシナプス小胞輸送など味細胞の味覚伝達機能が発現する際に、アクチン系細胞骨格の再構築が行われ、そこで CAP が作用していると考えられる。今後、味蕾の培養細胞を用いた細胞レベル、あるいは、味蕾細胞特異的発現分子プロモーターを用いた遺伝子導入動物系による個体レベルでの機能を CAP/コフィリン系の発現・存在状態の変化から解析したい。また、解析途中である上流制御因子の同定とその CAP 活性調節機構も明らかにし、味蕾における CAP の機能の全体像を解明したい。



発表論文

Ishimaru, Y., Yasuoka, A., Asano-Miyoshi, M., Abe, K. and Emori, Y. An actin-binding protein, CAP, is expressed in a subset of rat taste bud cells. *NeuroReport*, 12, 233-235 (2001)