

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石丸喜朗

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。食物を受容する組織である味蕾は、機能や分化段階が多様な約 50-100 個の細胞から構成されている。本論文では、一部の味蕾細胞に特異的に発現し、味蕾細胞を機能や分化から特徴づける分子を同定して、その分子から味蕾細胞の働きを解明することを目的としている。具体的には、単一細胞ライブラリーの作製とディファレンシャルスクリーニングを行った結果、味蕾特異的かつ一部の味蕾細胞特異的に強く発現するアクチン制御因子 CAP (*cyclase-associated protein*) の同定に成功した。さらに、味蕾における CAP 機能を明らかにする解析を行った。

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

まず、単離したラット味蕾細胞から cDNA 合成と PCR 増幅を行い、最終的に単一細胞 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。その結果、アクチン制御因子である CAP が、味蕾特異的か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。以下、味蕾における CAP 機能を明らかにする目的で、① CAP 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。甘味、苦味両方の味覚シグナル伝達経路に位置する 3 型 IP<sub>3</sub> 受容体、シナプス伝達に機能する SNAP25、苦味受容細胞系譜を示すガストデューシンそれぞれを発現する細胞と、CAP 発現細胞との関係を免疫二重染色によって解析した。その結果、CAP 発現細胞は 3 型 IP<sub>3</sub> 受容体発現細胞、すなわち味を受容する細胞系列 (味蕾細胞系列) に含まれ、SNAP25 発現細胞とほぼ一致し、ガストデューシン発現細胞とは互いの陽性細胞の一部が重なることが示された。さらに、CAP 発現細胞を分化段階から調べるため、出生後の味蕾形成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 IP<sub>3</sub> 受容体、ガストデューシンよりも 1 週程度遅れて発現し始めた。以上より、CAP は神経伝達機能を有する分化段階後期の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を想定している。

### 3. CAPの上流因子の解析

CAPのポリプロリン領域と相互作用し、上流からCAPを制御する因子を同定するため、様々な分子に存在するSH3領域とポリプロリン領域との相互作用に関して、酵母 two-hybrid 法、GST pull down 法、フィルター・オーバーレイ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。

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が有意な分子内・分子間相互作用が示された。一方、CAPのポリプロリン領域とSH3領域を持つ37種類のタンパク質との相互作用をフィルター・オーバーレイ法で解析した結果、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することが課題である。

### 4. CAPの下流因子の解析

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。

味蕾におけるコフィリンの発現様式を調べるため、RT-PCR法から主なコフィリンファミリー発現分子と同定されたコフィリン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。

以上本論文は、アクチン制御因子CAPが分化段階後期の味細胞特異的に、コフィリン1と共に存在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を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、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。