

## 論文内容の要旨

論文題目 遺伝子発現プロファイル解析による味覚系組織の特性の解明および組織特異的  
遺伝子の同定

氏名 松本 一朝

食物に含まれる化学情報は、味覚器である味蕾の味細胞と口腔内に神経終末を伸ばす体性感覚細胞によって受容され、末梢感覚神経節を経て、中枢において情報処理される。味細胞を介して生じる感覚が味覚であり、味の情報は、味細胞とシナプスを形成して求心性の伝達を行っている味神経に伝えられる。脊椎動物の外部感覚系全体を俯瞰したときには、味細胞は、視細胞や聴覚細胞、そして同様に化学物質を受容する嗅神経細胞と対比することができ、一方、味神経は、視神経や聴覚神経、また、感覚細胞であると同時に一次伝達神経でもある嗅神経細胞と対比することができる。味覚系を総合的に理解するためには、味覚系を構成する組織・細胞の個別の解析、特に遺伝子発現解析やタンパク質機能解析を中心とした分子的解析が必須である。本研究では、最近開発された技術である DNA マイクロアレイを用いて、味覚関連組織を対象として、感覚系組織と対比しながら遺伝子発現プロファイルを解析し、味覚受容と味覚伝達系の一端を解明することを試みた。

DNA マイクロアレイ解析は、遺伝子発現を全ゲノム的に網羅的に解析する手法としてここ数年の間に急速に普及している。マイクロアレイ解析では、遺伝子個々の発現レベルの相対値が求

められるが、それよりもむしろ、極めて類似した2つの状態の差異から細胞種や細胞状態の特性・全体像を得ることに重点が置かれてきた。しかし、本研究の標的である味覚組織（味蕾）と味神経は、組織レベルで他種の細胞（周边上皮細胞、味神経以外の神経細胞やグリア細胞）と混在しており、従来の解析手法では味細胞および味神経の特性を解明することは困難である。

以上のような状況を踏まえて、私は以下の2つの章に述べる解析を行い、味覚系における遺伝子発現プロファイルとその特性の解明、および味覚組織特異的な遺伝子の同定を行った。具体的には、ラットを実験動物として、第1章において、味神経を含む末梢感覚神経節を標的として組織間の差異が中程度の遺伝子発現プロファイルに対して階層的クラスター解析を適用し、遺伝子発現における全般的な特性と特異的遺伝子の同定を行い、第2章において、味蕾を含む上皮組織において特異的に発現する遺伝子を、発現プロファイル全体は大きく異なる嗅覚組織との類似性を抽出することによって同定した。

## 第1章 味神経を含む末梢感覚神経節の遺伝子発現プロファイルの解析

味細胞から味情報を受け取る味神経細胞は、次の3つの神経節に細胞体をおく。膝神経節（geniculate ganglion、以下 GG）には舌前部や軟口蓋の味蕾に存在する味蕾に終末を伸ばす味神経が、舌咽神経下神経節（petrosal ganglion、以下 PG）には舌後部や咽頭部に存在する味蕾に終末を伸ばす味神経が、そして迷走神経下神経節（nodose ganglion、以下 NG）には喉頭蓋に存在する少数の味蕾に終末を伸ばす味神経が含まれる。しかし、これらの神経節には、一般体性感覚神経や一般臓性感覚神経などの他の神経細胞が混在しており、また、味神経だけを示すマーカーやその特性はほとんど未知である。ここでは、神経細胞機能の点で類似性を有するこれらの神経節における遺伝子発現プロファイルの関連を解析する系を確立すること、味神経を含む神経節の特性を明らかにすること、そして、最終的には味神経の性状を味神経マーカーの獲得を含めて明らかにすることを目指した。このときの対照として、味神経を含まないが、口腔内に投射する一般体性感覚神経細胞を含む三叉神経節（trigeminal ganglion、以下 TG）を用い、合計4つの末梢感覚神経節の解析を行った。

まず、神経節の概要を把握し、さらには神経節内の区分といった微細構造を知るために、末梢感覚神経節での発現が示されているいくつかの遺伝子マーカーの発現プロファイルを *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析した。その結果、体性感覚の1つである温度感覚に関与する2つのイオンチャンネル（VR1 および TREK-1）は体性感覚神経をほとんど含まない GG 以外

の神経節で発現しており、一方、味神経などの感覚細胞で発現することが予想される TrkB は GG と NG で高頻度に発現することがわかった。また、4つの神経節を構成する細胞の均一性については、上記を含む6個のマーカー遺伝子の発現パターンから、TG と PG は異種性が高いこと、GG と NG は比較的均一であることがわかった。

次に、ラットの遺伝子約 8,700 個がスポットされた DNA マイクロアレイを用いて、これら 4 種の末梢感覚神経節における遺伝子発現プロファイルを解析した。まず、実験系の改善を行った。味覚関連神経節は小さく、含まれる神経細胞も最少で 1,000 個程度 (GG) であることから、少量の全 RNA を用いて再現性と定量性がある発現プロファイルを得る条件を検討し、10 個の GG から得られる全 RNA で解析できる条件を確立した。この条件下で得られた全遺伝子の発現データを、4つの神経節の中で最大値を与える発現量によって区分し、組織・細胞特異的な発現を示す遺伝子を含むことが予想される中間的な発現量を与える遺伝子群(2,662 遺伝子)を特定した。次に、階層的クラスター解析を行い、神経節間で発現様式が異なるクラスター37 個を選択して、そこに含まれる 498 遺伝子を同定した。この遺伝子群において、神経節間の発現プロファイルの類似性を示す組織樹を作成したところ、PG と TG が遺伝子発現レベルで密接に関連していることが明らかになった。さらに、組織樹の性状と発現量の相対値から、神経節特異的遺伝子を含むことが期待される 18 のクラスターグループを見出し、そのうちの 13 グループから 22 個の遺伝子を選択して、*in situ* ハイブリダイゼーション法による細胞レベルでの発現様式を検討した。その結果、DNA マイクロアレイ解析から予想される発現様式と、実際に細胞レベルまで解像度を上げて解析した組織発現データは基本的に一致した。すなわち、網羅的な発現量のデータ解析によって、組織特異性などを示す遺伝子を同定する可能性を提示した。

## 第2章 味覚系組織の遺伝子発現プロファイルからの味蕾特異的遺伝子の同定

第1章で述べたように、細胞構成がかなり異なる神経節のような組織において階層的クラスター解析を行うことで、組織における遺伝子発現の特性や特異的遺伝子の同定を行い得ることが明らかになった。そこで、次段階として、より類縁性が乏しい比較組織しか存在しない味蕾への DNA マイクロアレイ解析の適用を試みた。味蕾細胞の周辺には上皮細胞が存在し、DNA マイクロアレイ解析に供与し得る量の細胞を純度よく取り出すことが難しいほか、2者の細胞構造と機能が大きく異なるため、発現に差異が見られる遺伝子数は多いと予想され、単なる引き算(ネガティブな選択)からは味覚機能に関連する遺伝子発現像を得ることは困難であると予想される。

したがって、味蕾細胞と類似した機能を有する組織からのポジティブな選択を併せて用いることができれば、味覚機能に関連する遺伝子の選別が効率的に行えることが予想される。そこで、本章では、味蕾を含む乳頭上皮と味蕾を含まない舌上皮の対照とともに、嗅覚系組織である主嗅上皮と鋤鼻嗅上皮を類似性を提示する組織として用い、合計4組織による DNA マイクロアレイ-階層的クラスター解析を行い、味蕾の遺伝子発現プロファイルを得るとともに、味蕾特異的遺伝子の同定を行った。

4つの発現プロファイルを第1章と同様に階層的クラスター解析を行い、組織間で異なる発現様式を示すクラスター38個を見出した。しかし、これらのクラスターに含まれる遺伝子全体では、味蕾と嗅覚組織との類縁性を明確に見出すことはできなかった。そこで、乳頭上皮と嗅上皮との類似性を組織樹と発現量データから検討したところ、5つのクラスターが味蕾特異的に発現する遺伝子を含むクラスターとして見出された。これらに含まれる38種の遺伝子全てに関して、乳頭上皮層における発現様式を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析したところ、味蕾の全てあるいは一部の細胞で発現する遺伝子を11種、味蕾特異的ではないものの乳頭特異的に発現する遺伝子を19種同定した。以上の結果から、新たに味蕾においても組織特異的遺伝子の同定を行い得ることが明らかになった。

本研究では、味覚系の第1段階を担う感覚組織である味蕾と、第2段階である一次神経を含む味覚系末梢感覚神経節における遺伝子発現を、DNA マイクロアレイを用いて解析した。本研究で対象とした遺伝子に対しては、専攻研究のように状況証拠や遺伝子機能の知見による前段階選別は行っておらず、基本的に全ての可能性を網羅している。実際、新たに組織特異的な発現を見出した遺伝子には、既知の遺伝子機能からは味覚系における機能が想像しにくいものが含まれている。また、同時に、味覚系組織の遺伝子全体における発現の基礎データが得られた。一方、ラットの全ゲノムは公開されておらず、DNA マイクロアレイには全ての遺伝子は含まれていないことは、今後さらに全ゲノムを含む新規のマイクロアレイを用いて研究を継続する必要性を示している。本研究で新たに同定された組織・細胞特異的発現の知見を基に、味覚におけるそれらの遺伝子機能を個別に研究することも急務であろう。