

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大池 秀明

脊椎動物の味覚受容組織である味蕾は数十個の細胞によって構成され、その一部が実際に味を感じる味細胞である。味細胞内シグナリング経路は、未だ全容が理解されるには至っていない。一般に、細胞内情報伝達系においてアラキドン酸(AA)は重要な役割を果たす。単離味蕾細胞において、 $K^+$ チャンネルの活性を阻害することや、その産生酵素であるホスホリパーゼ  $A_2$  ( $PLA_2$ ) の阻害剤がスナネズミの味神経応答に影響を及ぼすことから、 $PLA_2$  および AA が味シグナリングの制御に関与している可能性が示唆された。

本論文は、味蕾に発現する  $PLA_2$  分子種を特定し、IIA 型 ( $PLA_2$ -IIA) が味シグナリングに関わる分子種である可能性が高いことを示した。また、AA が味細胞に与える影響を解析し、 $PLA_2$  が味シグナリングに及ぼす機能を考察した。本論文は3つの章から構成されている。

### 1. 味蕾に発現する $PLA_2$ 分子種の特定

$PLA_2$  は哺乳類で 16 分子種が報告されている。ラットで既知の 13 分子種について、有郭・葉状乳頭上皮由来 cDNA より RT-PCR を行った。その結果、IB 型を除く全ての分子種で発現が確認された。より詳細な発現状況を、*in situ* ハイブリダイゼーションにより解析し、IIA 型のみが味蕾の一部の細胞に強く発現することを示した。

### 2. $PLA_2$ -IIA の味蕾における発現解析

$PLA_2$ -IIA の細胞内局在を解析するため、ゴルジ体マーカー、GM130 との免疫二重染色を行った。シグナルはよく重なり、分泌経路上に多く存在していることを明らかにした。

続いて、 $PLA_2$ -IIA を発現する細胞の特性について調べた。味細胞マーカーであるホスホリパーゼ  $C \beta 2$  ( $PLC\beta 2$ ) との免疫二重染色を行い、 $PLA_2$ -IIA は味細胞の一部の細胞集団に発現することを明らかにした。続いて、苦味細胞特異的に発現している *gustducin* との関係調べた。両者の発現は一部の細胞のみで重なり合い、 $PLA_2$ -IIA は特定の味種に依存しないことを明らかにした。味細胞で受容した味情報は、シナプスを介して味神経へ伝達されると考えられている。そこで、シナプス形成細胞マーカー、SNAP-25 との免疫二重染色を行った。 $PLA_2$ -IIA と SNAP-25 のシグナルはよく一致しており、味細胞の一部がシナプスを形成し、その細胞にのみ  $PLA_2$ -IIA が発現していることを明らかにした。

味蕾細胞は 10 日前後で新しい細胞へと入れ替っていくことから、味蕾中には、分裂後の細胞齢が異なる細胞が混在している。そこで、 $PLA_2$ -IIA の発現開始時期を解析するため、味蕾の初期発生過程である新生児ラット有郭乳頭切片の免疫染色を行った。*gustducin* は生

後 2 日目より染色シグナルが検出されたのに対し、PLA<sub>2</sub>-IIA や SNAP-25 は生後 8 日目までシグナルが確認できなかった。また、成体ラット味蕾細胞における、BrdU 追跡実験の結果、PLA<sub>2</sub>-IIA が発現し始めたのは、4 日目以降の細胞であり、gustducin よりも 2 日ほど遅いことが明らかとなった。このことから、味蕾細胞では gustducin などのシグナリング分子が先行して発現し、2 日ほど成熟が進んだところでシナプスが形成され、PLA<sub>2</sub>-IIA や SNAP-25 が発現し、機能していると推察された。

### 3. アラキドン酸と味蕾細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化の解析

味蕾細胞内での Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は神経伝達物質放出に重要な過程と考えられることから、単離味蕾細胞を用いた Ca<sup>2+</sup>イメージングを行い、AA が与える影響を解析した。その結果、100 μM の AA 刺激により、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を起こす細胞が多く存在した。イメージング後の細胞を固定し、免疫染色を行ったところ、PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性細胞もこれに含まれていた。AA 代謝酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX) を NDGA で阻害したところ、PLA<sub>2</sub>-IIA 陽性細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇した。これは、LOX を阻害したことにより細胞内に AA が蓄積し、それにより Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇したと解釈できる。AA は様々なイオンチャンネルの活性を制御することから、味蕾細胞においても、Ca<sup>2+</sup>透過性のチャンネルや、脱分極を引き起こすチャンネルの活性に影響を与えた結果、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が引き起こされたと考えられる。以上の結果から、PLA<sub>2</sub>-IIA が AA の産生を介して細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させる可能性が示唆された。

以上、本研究は、味シグナリングに関与する可能性の高い PLA<sub>2</sub> 分子種を特定し、詳細な発現解析と生理的機能解析により、その役割を明らかにするとともに、味蕾細胞の成熟とシナプス形成に関する新たな知見も提示し、学術上、応用上価値が高い。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。