

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 15 年度 博士課程進学

氏 名 應本 真

指導教員名 阿部 啓子

論文題目 味覚情報伝達機構の解析

-味蕾細胞の遺伝子発現プロファイリングと味覚神経回路の可視化を基盤として

### 序章

食品の味は、食品中の呈味物質が主に舌上皮に分布する味蕾中の味細胞により受容され、その情報が神経系へと伝えられ、脳に達して認識される。味蕾細胞は上皮系の細胞系譜に属し、1 個の味蕾を構成する約 100 個の細胞は 10~14 日の周期でターンオーバーしているため、多様な細胞齢の細胞が存在する。また、近年の味覚レセプターの研究から、哺乳類では甘味・旨味・苦味を受容する細胞が異なることが明らかにされ、機能的側面においても味蕾細胞の多様性が明確となった。しかし、味蕾を構成するこれら多様な細胞について、味細胞以外の細胞の役割は何なのか、どのようにして細胞の多様性が生じるのかなど不明な事柄が多い。また、味蕾細胞がターンオーバーを繰り返すことから、味蕾細胞と味神経との間ではシナプスの形成と消失が繰り返されていると想定されるが、この末梢の回路が再現的に構築されるのか、無秩序に形成されるのかなど、味情報を中枢へと伝達していく回路の形成過程も不明である。

本研究は、味細胞により受容された情報がどのように神経系へと伝達されるのか、また、それらの情報は神経伝達経路においてどのように分離・統合されるのかを明らかにしようと試みたものである。第 1 章では、味蕾細胞の遺伝子発現情報から味細胞の再分極を担う細胞内シグナル伝達因子を同定し、シグナル伝達系の構築を細胞齢と関連づけて解析した。第 2 章では、味細胞での発現に関与するような遺伝子発現制御領域を解析した。第 3 章では、経シナプストレーサーを用いた発生工学的手法により味の情報伝達経路を解析した。

## 第1章 DNAマイクロアレイによる味蕾細胞のプロファイリング

当研究室では味蕾を含む有郭乳頭上皮 (Cvp-whole) の DNA マイクロアレイ解析を行い、乳頭を含まない上皮 (Np-Epi) と比較することにより味蕾特異的発現を示す遺伝子の探索を行ってきた。Cvp-whole での発現が Np-Epi よりも顕著に大きい約 40 遺伝子の発現を *in situ* hybridization (ISH) で解析した結果、約 7 割の遺伝子は有郭乳頭の味蕾以外の上皮 (Cvp-Epi) に発現していた。この結果は、舌上皮では、Np-Epi, Cvp-Epi, 味蕾という 3 つの組織において遺伝子発現が異なることを示唆しており、味蕾特異的遺伝子を同定するためには味蕾自身の遺伝子発現情報を取得し、他の 2 組織との比較解析を行うことが必要であると考えられた。そこで、DNA マイクロアレイを用い、有郭乳頭から単離した味蕾 (TB), Cvp-Epi, Np-Epi についてそれぞれ遺伝子発現情報を取得した (各 n=6)。遺伝子発現像全体を対象にした組織間のピアソン相関係数は、Cvp-Epi と Np-Epi で 0.966 であるのに対し、これら 2 者と TB とでは 0.86 未満であり、TB は味蕾以外の上皮組織とは大きく遺伝子発現パターンが異なることが確かめられた。統計学的に TB での発現量が有意に高い遺伝子は 5,729 個あり、既知の味蕾特異的遺伝子の殆どがこの中に含まれていた。したがって、これらの解析データは味蕾の特性を規定する因子に関するデータベースになり得ると考えられた。

次に、こうして得られた遺伝子発現情報に基づき、味蕾に発現する新規遺伝子の探索を行った。味細胞は呈味物質を受容後、膜電位変化 (脱分極) を起こすと考えられている。この過程に関わる遺伝子の多くは同定されているが、味細胞の脱分極を解消 (再分極) させる分子の存在は不明である。そこで、TB の遺伝子発現データベースに含まれる電位依存性カリウム (Kv) チャネルのうち、発現量が多いものから 3 種 (KCNQ1, KCNH2, KCNH3) を選択し、ISH により味蕾での発現様式を解析した。その結果、これらの遺伝子はいずれも有郭乳頭の舌上皮層においては味蕾にのみ発現していることが明らかとなった。既知の味細胞特異的遺伝子との発現相関を調べたところ、味細胞にはこれら 3 種の Kv チャネル全てを発現する細胞と KCNQ1 のみを発現する細胞の 2 種が存在すること、また、この発現様式は受容する味質の特性とは相関性がないことが明らかとなった。そこで、味細胞の一部でのみ発現が観察された KCNH2 および苦味受容細胞に発現する gustducin について、プロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた発現時期の解析を行った。これら両遺伝子は、BrdU 投与後 3 日目までいずれも発現細胞数は増加していたが、味蕾あたりの発現頻度は同程度であるにも関わらず、gustducin に比べ KCNH2 の方が発現細胞数は多かった。また、gustducin の発現細胞数は BrdU 投与後 4 日目以降も増加するが、KCNH2 は 3 日から 4 日を境に陽性細胞数は減少した。これらのことから、KCNH2, KCNH3 を発現する味細胞は比較的若い細胞であり、細胞齢が高くなると味細胞は KCNH2, KCNH3 の発現を停止し、KCNQ1 のみを発現することが示唆された。

## 第2章 味細胞特異的発現に關与するPLC-β2 遺伝子 5'上流域の解析

味蕾中の約 30% の細胞はホスホリパーゼ C-β2 (PLC-β2)を発現している。近年同定された 7 回膜貫通型の味覚レセプター (T1Rs, T2Rs) は、いずれも PLC-β2 発現細胞に発現しており、PLC-β2 はこれらレセプターの下流因子として必要不可欠な分子であることが明らかにされた。組織や細胞種特異的な遺伝子のエンハンサー / プロモーターは、遺伝子工学的解析に非常に有効かつ重要であるが、本研究開始当初は味覚レセプターの一部が同定されていたに過ぎず、味細胞での発現に關与するような遺伝子発現制御領域を取得する対象としては、PLC-β2 が最適であると考えられた。そこで PLC-β2 遺伝子の味細胞での発現に關与するような転写御領域の解析を行った。マウスとヒトの PLC-β2 遺伝子の 5'上流域を比較したところ、マウス PLC-β2 遺伝子の 5'上流 5.5 kb までに相同性の高い領域が計 7 カ所 (開始メチオニンに近い側から H1 から H7 と命名)存在した。H7 と上流 13.5 kb 付近に存在する相同性の高い領域 H8 との間には他の転写産物が 2 つ存在することから、H7 までの領域に PLC-β2 のエンハンサー / プロモーター領域が存在すると予想し、当研究室で確立した味蕾の初代培養細胞への発現系を用いて GFP をレポーターとしたエンハンサー / プロモーターアッセイを行った。その結果、H1 から H5 を含む 4 kb の範囲に味細胞特異的発現を誘導する転写制御領域があること、H1 から H3 を含む上流 1.8 kb までを用いると味細胞特異的発現の頻度が低下することが判明し、開始メチオニンから上流約 4 kb が外来遺伝子の味細胞特異的な発現誘導に有効であると判断した。

## 第3章 経シナプストレーサーを用いた味覚神経回路の可視化

味蕾が受容した呈味物質の情報は末梢感覚神経を経て、延髄弧束核 (NST)、橋結合腕傍核 (PBN) などを経由し、大脳皮質へと伝達される。味蕾内では甘味物質と苦味物質は異なる細胞で受容され、PBN においてもこれらの情報を中継する神経細胞は異なることが示唆されている。しかし、味蕾から PBN へ至る途上、および PBN より上流の中枢神経核において、末梢で分離されていた味情報が分離したまま伝達されるのか、あるいはどこかで統合されるのかは不明である。そこで、本章では味細胞特異的発現を誘導するエンハンサー / プロモーターおよび経シナプストレーサー (小麦胚芽レクチン、WGA) を用い、味覚情報の神経伝達経路の可視化を試みた。第 2 章で同定した転写制御領域を含む PLC-β2 および本研究途上に報告された甘味・旨味レセプター T1R3 の 5'上流域をそれぞれ約 7 kb および 12 kb に、WGA と GFP を bicistronic に発現させるような遺伝子を連結した遺伝子 (それぞれ PLCβ2-WiG, T1R3-WiG とする) をもつようなトランスジェニックマウスを作製した。トランスジーンをヘテロに有するトランスジェニックマウスとして、PLCβ2-WiG は 2 系統 (M3 および M4)、T1R3-WiG は 1 系統 (M1) を獲得することができた。免疫組織化学的解析の結果、PLCβ2-WiG M3 系マウスでは PLC-β2 タンパク質のシグナルが観察された一部の細胞でのみ GFP 蛍光が観察されたが、もう一方の M4

系マウスでは GFP 蛍光と PLC- $\beta$ 2 タンパク質のシグナルが、T1R3-WiG M1 系マウスでは GFP 蛍光と T1R3 タンパク質のシグナルがほぼ一致していた。しかし、いずれの系統のトランスジェニックマウスにおいても、味蕾においては WGA タンパク質のシグナルは見られるものの、味神経細胞を含む神経節では WGA タンパク質の明確なシグナルは検出されなかった。

次に、外来遺伝子が bicistronic であることによる mRNA の不安定化や蛍光タンパク質による WGA タンパク質発現への負の制御の可能性などを考慮し、T1R3 遺伝子の発現制御領域に WGA のみが発現するような遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。現在までにトランスジーンをヘテロに有するマウス 3 系統を確立し、これら全ての系統の味蕾において T1R3 mRNA と WGA mRNA の発現がほぼ一致することを確認した。WGA タンパク質に対する免疫組織染色を行った結果、味蕾においては ISH による mRNA のシグナルよりも高頻度でシグナルが観察され、味神経細胞体が存在する神経節において、各神経節中の一部の細胞で WGA タンパク質のシグナルが検出された。これらのことから、T1R3 発現細胞から味神経への神経伝導路が可視化できたことが示され、味蕾中の WGA タンパク質の分布頻度の高さは、味蕾細胞に投射している末梢感覚神経繊維終末におけるシグナルが含まれているためと考えられた。WGA タンパク質のシグナルは味神経と連絡する NST でも検出されたが、NST の次の中継核である PBN やそれより上流の神経核では検出されなかった。以上のように、WGA を用いて呈味物質受容細胞から中枢神経系中継核までの甘味・旨味情報伝導路を可視化することに成功した。

## まとめ

食品の「味」の情報の受容伝達機構の一端を明らかにしようとした本研究では、まず、味蕾の遺伝子発現プロファイルの解析を行い、味蕾の特性と密接に関わる遺伝子の発現情報データベースを作製した。ここには、味蕾を構成する様々な細胞の分化や死・成熟期の機能に関する分子知見などが含まれており、新たな研究の端緒を与えるものとなりうる。また、WGA を用いて、中枢神経系までの味覚情報伝導路を可視化できるトランスジェニックマウスを作製した。味蕾において神経繊維とシナプスを形成している細胞は PLC- $\beta$ 2 を発現する味細胞ではないという報告や味細胞以外の細胞による神経伝達物質の放出などが報告されており、味細胞から味神経への情報の伝達がシナプスを介した直接的なものなのか、また味蕾中の他の細胞も関与するのかなど、見解が分かれている。本研究で作製したマウスを用いて WGA の輸送経路を精査することで、末梢部における味覚情報伝達回路を明らかにできると期待される。