

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 永井 俊匡

脊椎動物の味覚受容機構については、近年、哺乳類において、味覚受容体 T1R および T2R が発見され解明へ大きく進展をみせたが、その他の脊椎動物についてはほとんど解明されていない。脊椎動物がどのように食物を選択しているかという生命現象の基本原理を明らかにするために、脊椎動物に共通した味覚受容機構を解明する必要がある。申請者は、進化系統学的に脊椎動物の中で最も古くに分岐した魚類を解析して、脊椎動物の味覚受容機構の普遍性を明らかにし、モデル生物としてのメリットも多い魚類の味覚研究の分子基盤構築を目指した。その第一歩として、本論文にて魚類味覚受容体の同定を行った。

本論文は3章から成り、第1章にて同定した遺伝子を、第2章にて発現解析、第3章にて機能解析し、魚類味覚受容体の特性を総合的に解明している。

### 1. 魚類 T1R および T2R ファミリー遺伝子のデータベース検索

魚類ゲノムデータベースの検索によって、哺乳類 T1R あるいは T2R と相同性を有する遺伝子を同定した。T1R については、哺乳類と同様に T1R1, 2, 3 の3つのサブタイプが存在し、分子系統学的な解析から、哺乳類と魚類の各サブタイプがそれぞれオルソログであることを推定した。また、魚類 T1R2 は複数種の遺伝子に多様化しているという特異な特徴も見出した。

T2R については、哺乳類に比べて遺伝子数が少ないという相違点を見出した。また、分子系統学的に異なるクラスターを形成することから、魚類と四肢動物の T2R ファミリーは、独自に分子進化したとする仮説を提唱した。

### 2. 魚類 T1R および T2R ファミリー遺伝子の発現解析

魚類 T1R および T2R ファミリー遺伝子の組織発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法によって解析した。その結果、ゼブラフィッシュおよびメダカの T1R, T2R が味蕾に特異的に発現していることを明らかにし、味覚受容体として機能している可能性を示した。

次に、発現様式から受容体の機能を予想するため、多重標識 ISH 解析を行った。その結果、まず T1R および T2R が PLC- $\beta$ 2 発現細胞に発現していることを明らかにし、哺乳類と同様に PLC- $\beta$ 2 が T1R および T2R の下流の細胞内シグナル伝達因子として機能している可能性を示した。また、T1R および T2R の発現解析を詳細に解析し、脊椎動物の味覚受容機構を理解する上で重要な2つの仮説、すなわち哺乳類と同様に T1R1+3, T1R2+3 のヘテロ

マーで機能している可能性、および末梢の味細胞レベルで、T1R と T2R の発現細胞によって区別される 2 種類の味覚受容経路が存在する可能性を提示した。

### 3. 魚類 T1R および T2R ファミリー受容体のリガンド同定

魚類 T1R および T2R のリガンドを同定し、味覚受容体としてのそれぞれの機能を明らかにした。まず、ゼブラフィッシュの顔面神経応答を電気生理学的に解析し、L-アミノ酸および哺乳類にとっての苦味物質（デナトニウム、キニーネ）に対して味覚応答しうることを見出した。この 2 種類の味物質候補を受容する味覚受容体として、それぞれ T1R および T2R を想定し、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で、それを証明した。すなわち、T1R1+3 および T1R2+3 のヘテロマーが L-アミノ酸を、T2R のうち 2 遺伝子がデナトニウムを受容することを明らかにした。このことから、T1R および T2R が、それぞれ嗜好する味物質と忌避する味物質を受容する味覚受容体であることを強く示唆した。T1R2+3 については、糖類などを受容する哺乳類とは大きく機能が異なることに注目し、分子進化学的な考察を加えている。

第 3 章では、味覚受容体の同定を目的とした解析に加えて、T2R 遺伝子の変異体が野生型と異なりデナトニウム受容能を持つことの発見に端を発して、デナトニウム受容体の構造機能相関の解析を試みた。その結果、リガンドが受容体の活性部位に結合する前に、細胞外第 3 ループに一時的に結合 (Landing) するという、新規性の高いモデルを提唱し、今後の魚類と哺乳類の受容体を比較することによる構造機能相関解析の可能性を提示した。

以上のように、哺乳類味覚受容体と相同性を有する遺伝子を同定し、その発現解析および機能解析を行うことで、見出した遺伝子が魚類における味覚受容体であることを、順を追って解明した。さらに、脊椎動物に共通して、嗜好する味物質と忌避する味物質を受容する味細胞は分かれており、末梢のレベルで味質が区別されているという、大変興味深い知見を示した。本論文は、味覚受容機構の進化生物学的な解明の基礎となるとともに、モデル生物としての魚類研究の分子的な基盤となる非常に価値の高い内容である。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文としての水準を十分に満たしたものであると認めた。