

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成21年度博士課程 進学
氏名 黒川 あずさ
指導教員名 三坂 巧

論文題目 マウス味蕾における細胞種特異的な遺伝子発現プロファイルの解析

食品中の呈味物質は、口腔内上皮層の味蕾という組織に存在する味細胞で受容される。近年、味覚受容体、ならびにその下流の細胞内情報伝達関連分子が同定され、味覚の受容・伝達メカニズムが分子生物学的に解明されてきた。その結果、甘味・旨味・苦味・酸味・塩味の5基本味は、それぞれ異なる味細胞で受容されることが明らかにされた。電子顕微鏡像から特定された type I ~ III の味蕾細胞種のうち、type II が甘味・旨味・苦味受容細胞、type III が酸味受容細胞、type I が塩味受容細胞を含むその他の細胞群に相当する。それぞれが受け持つ機能に応じて、シグナル伝達因子の発現、膜電位特性、細胞分化機構、神経との接続様式などが異なっていると推定されている。したがって、細胞種に注目した遺伝子発現プロファイルを解析することによって、より効率的に、味蕾細胞種ごとに機能する新たな分子の知見が得られることが期待された。

Type II 味蕾細胞に特異的に発現する転写因子 *Skn-1a* を欠損させたマウス (*Skn-1* ノックアウトマウス) は、甘味・旨味・苦味細胞が消失しており、それらの細胞に相当する数の酸味細胞が増加しているという特徴を持っている。この遺伝子改変マウスを用いて、味蕾細胞における遺伝子発現プロファイルを詳細に解析することで、特定の味蕾細胞種に発現する遺伝子を効率的に同定できるのではないかと考え、本研究を実施した。

本論文では、第 1 章にて *Skn-1* ノックアウトマウスの有郭乳頭上皮を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果を、野生型のものと比較することにより、味蕾細胞種特異的に発現する候補遺伝子を抽出できることを示した。第 2 章から第 4 章は各論であり、第 1 章において作成した細胞種ごとの遺伝子発現プロファイルから発展して行った研究の事例を示す。そのうち、第 2 章では、**type II** 味蕾細胞と味神経の相互作用を行う候補分子を取得し、**type II** 味蕾細胞はシナプスを持たないが、神経との連絡が行われていることを示唆する結果を述べた。第 3 章では、**type III** 味蕾細胞に発現する前シナプス分子群を新たに同定し、そのうちの一つであるコンプレキシソ II をノックアウトしたマウスにおいて酸味に対する感受性が顕著に低下することを示した。第 4 章では、**type I** 味蕾細胞に特異的に発現する膜貫通分子を探索し、**type I** 味蕾細胞の反応性、膜電位特性を浮き彫りにする試みについて論述した。

第 1 章 *Skn-1* ノックアウトマウスを用いた味蕾細胞種特異的な遺伝子の選別

野生型マウスの有郭乳頭上皮 (WT-CvP)、野生型マウスの乳頭外の舌上皮 (WT-Np)、*Skn-1* ノックアウトマウスの有郭乳頭上皮 (KO-CvP) の 3 種のサンプルについて、DNA マイクロアレイ解析を行った。まず味蕾に特異的に発現する遺伝子を抽出するため、WT-CvP での発現数値が WT-Np に対して有意に大きいプローブセットを選別した (Welch's t-test, FDR<0.1)。この中で WT-CvP / WT-Np 比が 2 以上のものは 5272 個、5 以上のものは 1610 個が抽出された。

次に、味蕾で細胞種特異的に発現することが既知の遺伝子群のデータに注目し、KO-CvP と WT-CvP の間の遺伝子発現変動と細胞種との関連を解析した。*Skn-1* ノックアウトマウスにおいては **type II** 細胞が消失し、**type III** 細胞が増加しているため、遺伝子発現プロファイルにおいてもその特徴が反映されていると期待された。実際、**type II**・**type III** に発現する遺伝子群では KO で WT に比べ有意に低下または上昇している一方、**type I** または味蕾全体に発現する遺伝子群では KO と WT で差が見られなかった。分離の指標として KO-CvP の WT-CvP に対する fold change の値 (KO-CvP / WT-CvP) を用いた。**type II** に発現する遺伝子の 90 % 以上では fold change が 0.5 より小さくなり、**type III** に発現する遺伝子の 95 % 以上では fold change が 2 より大きくなった。これを指標として、取得した味蕾発現プロファイルから **type II**、**type III** に特異的に発現する候補遺伝子を抽出した。また、**type I** 細胞および味蕾全体に発現する候補遺伝子として、WT-CvP と KO-CvP の間に発現量の有意差がなく、fold change が 0.7 より大きく 1.5 より小さい遺伝子を抽出した。このようにして抽出された候補遺伝子群のいくつかは、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) による発現解析から、予想された細胞腫に発現していることを実験的に明らかにした。

味蕾の細胞腫が変化した遺伝子改変マウスを利用した本解析手法により、細胞種特異的に発現する候補遺伝子を抽出する作業が飛躍的に効率化した。特定の味蕾細胞で機能する遺伝子を同定する上で、有力な手段であることが示された。

第2章 Type II 味蕾細胞に発現する神経接続因子の探索

Type II 味蕾細胞では、甘味・旨味・苦味の受容伝達機構はよく解明されている。しかし、type II 味蕾細胞はシナプス構造を持っておらず、味蕾細胞から味神経への味情報伝達の詳細や、その伝達様式が味質によって異なるのかなど、不明点が多い。また、特定の味の受容細胞がその味を伝達する味神経とどのように識別し合うかも未解明である。

Type II 味蕾細胞と味神経との接続機構についての分子的知見を得るために、type II 味蕾細胞に特異的に発現する候補遺伝子のアノテーションの中から、Biological Process に関する Gene Ontology term で検索を行い、“nervous system development”、“axon guidance”、“cell adhesion”、またはそれらの下位の term を持つものを抽出した。その結果、11 遺伝子が抽出され、そのうち 9 遺伝子が有郭乳頭で味蕾特異的に発現していることを ISH により明らかにした。特に発現が強い遺伝子について二重 ISH により発現細胞種を詳細に調べたところ、*Gfra2*, *SrpX2* が甘味細胞に、*Slit2*, *D0H4S114(p311)*, *Edil3* が苦味細胞に特異的に発現していた。これらのうち、*Slit2*, *Gfra2* については相互作用する分子が同定されている。*Slit2* の受容体である *Robo1/2* の発現を味神経の細胞体を含む神経節で調べたところ、*Robo2* が発現していることを見出し、味神経と type II 味蕾細胞の相互作用が存在することを新たに提唱することができた。

第3章 Type III 味蕾細胞に発現する前シナプス分子の探索と Cplx2 ノックアウトマウスの解析

Type III 味蕾細胞は、唯一シナプスを持つ味蕾細胞種である。既知の前シナプス分子のうち、type III 味蕾細胞ではどの分子種が発現しているのかについて、DNA マイクロアレイ解析結果から候補分子を抽出し、組織学的な解析を実施した。その結果、type III 味蕾細胞特異的に発現する前シナプス分子として、*Cplx2*, *Syt7*, *Stxbp1*, *Cadps*, *Scg5*, *Pclo* の 6 種を新たに同定した。

Cplx2 (コンプレキシン II) は、シナプス小胞の膜融合を制御する分子で、今回 type III 味蕾細胞特異的に発現していることを見出した。type III 味蕾細胞のシナプスと酸味受容の必要十分性を理解するために、*Cplx2* ノックアウトマウスを解析した。ノックアウトマウスの味蕾では、野生型と同様に他の分子種のコンプレキシンは発現しておらず、味覚受容体、その他の味蕾細胞種マーカー遺伝子、主要な前シナプス遺伝子の発現は野生型と同様であった。味嗜好性の変化を調べるために、5 基本味の溶液に対する行動試験を行ったところ、酸味を忌避する閾値が上昇し、その感受性が低下していることが分かった。さらに口腔内味溶液刺激に対する鼓索神経・舌咽神経の応答を調べたところ、低濃度の酸味に対する応答がほぼ消失していることが分かった。しかし、酸味に対する応答は完全には消失していないことから、type III 味蕾細胞を介さない酸味認識機構も存在することが示唆された。酸味以外の味については行動試験、味神経応答ともに有意な差は見られなかった。したがって、酸味の伝達におけるシナプスを介した神経連絡の重要性が示された。

第4章 Type I 味蕾細胞に発現する膜貫通分子の探索

Type I 味蕾細胞は、長らく味受容細胞なのか支持細胞なのか不明であった。近年、type I 味蕾細胞の一部が塩味の受容を担うという知見が得られている。塩味の受容を含む味物質に対する応答に関与する遺伝子は、細胞膜に局在すると考えられる。前述のDNAマイクロアレイ解析によって選別された type I 味蕾細胞(または味蕾全体)に特異的に発現する候補遺伝子のうち、膜貫通領域を持つものをタンパク質情報データベース UniProt および膜貫通部位予測プログラム SOSUI を用いて抽出し、ISH を行って味蕾での発現を調べた。このうち、味蕾全体ではなく一部の味蕾細胞に特異的に強い発現が見られた *Ano1*, *Kcne3*, *Sec61a1* については二重 ISH を行い、type I 味蕾細胞に特異的に発現していることを確認した。

Kcne3 は電位依存性カリウムチャネルのβサブユニット(調節サブユニット)である。電位センサー部位に作用してチャネルを常時開状態にし、電位依存性チャネルから漏洩チャネルに近い性質にすることが知られている。αサブユニットとしては味蕾全体に *Kcnq1* が発現しており、これとヘテロマーを形成して type I に特徴的な膜電位特性を構築していると考えられる。

Ano1 は、近年新たに同定されたカルシウム依存性塩化物イオンチャネルである。*Ano1* の抗体染色を行ったところ、味物質と接する味孔付近に局在していた。*Ano1* の発現から type I 味蕾細胞が細胞内カルシウム濃度の上昇に応答する機構を持つことが示唆された。さらに、*Ano1* に類縁のアノクタミンファミリー遺伝子 10 種について味蕾での発現を ISH により調べたところ、*Ano1* に加えて *Ano7*, *Ano10* が味蕾特異的に発現していた。しかし、互いに発現する細胞種が異なり、*Ano7* は甘味・旨味・苦味細胞の全体に、*Ano10* は苦味細胞に特異的に発現していた。*Ano1*, 7, 10 は同じファミリーの遺伝子であるがイオンチャネルとしての特性が異なることから、細胞種ごとの反応性や膜電位特性の差に寄与していると考えられる。

今回の研究では、味蕾の細胞種ごとの遺伝子発現プロファイルの解析を行い、味蕾細胞の特性と密接に関わる遺伝子の発現情報をデータベース化することができた。ここには、味蕾を構成する様々な細胞の分化や、機能に関する分子知見が含まれている。各味蕾細胞種について得たこの事例は、今後の味覚研究に新たな端緒を与えるものと期待する。