

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 黒川 あずさ

本論文は、味蕾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で、新たな機能分子の知見を取得する方法を開発し、得られた知見を利用して味覚受容伝達機構の解析を行った結果をまとめたものである。論文は序章、第1、2、3、4章の本論、および総合討論から成る。

第1章では *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について述べている。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、**type II** 味蕾細胞が消失し、それに相当する数の **type III** 味蕾細胞が増加するという特徴を持つ。この遺伝子改変マウスの味蕾における遺伝子発現を解析することで、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と考えた。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。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。**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。細胞種の分離の指標として KO-CvP の WT-CvP に対する **fold change** の値(KO-CvP / WT-CvP)を用いて、**type** ごとに発現する候補遺伝子を選別した。これらの一部については、*in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)による発現解析により、予想された細胞腫に発現していることを示した。

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。

第2章では **type II** 味蕾細胞に発現する神経接続因子の探索について述べている。**type II** 味蕾細胞は甘味・旨味・苦味の受容細胞だが、シナプス構造を持たず、味蕾から味神経への味情報伝達の詳細や、味蕾細胞と味神経の間の識別機構は不明である。**type II** 味蕾細胞と味神経との接続機構についての分子知見を得るために、**type II** 味蕾細胞に発現する候補遺伝子について神経接続関連因子を検索し、9 遺伝子が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。これらは、甘味・旨味細胞か苦味細胞に偏って発現する傾向が見られた。また、その1つである *Slit2* の受容体 *Robo* 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章ではtypeIII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について述べている。typeIII味蕾細胞は酸味受容細胞であり、唯一シナプスを持つ細胞種である。DNAマイクロアレイ解析結果から前シナプス分子の候補を抽出し手発現解析を行い、typeIII味蕾細胞特異的に発現する前シナプス分子として6種を新たに同定した。

そのうちの1つである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ある。typeIII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。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、酸味の感受性が低下していた。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、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。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章ではtypeI味蕾細胞に発現する膜貫通分子を探索し、typeI味蕾細胞の反応性についての分子知見を得たことを述べている。typeIに発現する候補遺伝子から膜貫通領域を持つものを抽出し、味蕾での発現を調べたところ、Ano1、Kcne3、Sec61a1がtypeI味蕾細胞に特異的に発現していた。Ano1は、カルシウム依存性塩化物イオンチャネルとして機能する。Ano1の発現からtypeI味蕾細胞が細胞内カルシウム濃度の上昇を伴う機構を持つことが示唆された。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。さらに、Ano1に類縁のアノクタミンファミリー遺伝子のうち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り、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推測できる。

本論文は、遺伝子改変マウスを用いて味蕾細胞種ごとの遺伝子発現を解析する手法を世界で初めて提示し、さらに味蕾に特有の現象の分子機構の解明を行ったものである。これは社会的にも注目の集まる味覚の受容・伝達機構を理解するために大変有用な知見であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。