

助成番号 0917

塩味受容細胞の同定とその味覚応答機能の解析

應本 真

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻

概要 食物摂取の際に生じる味覚は、食品中に含まれる呈味物質が口腔内に存在する味蕾と呼ばれる組織中の味細胞により受容されることにより生じる。味は、一般に甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の5基本味に分類され、このうち、甘味、旨味、苦味、酸味の4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なっていた。味蕾を構成する細胞のうち、約半数が甘味、旨味、苦味、あるいは酸味を受容する細胞であるが、残る半数の味蕾細胞の生理機能については未知のままであり、特に、塩味を受容する細胞は特定されていなかった。ほぼ全ての味蕾細胞には電位依存性カリウムチャンネル *KCNQ1* が発現しており、ほぼ全ての味蕾細胞は膜電位変化を生じること、塩味以外の4基本味はそれぞれ異なる味細胞により受容されることから、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞は塩味など未だ同定されていない味の受容細胞であると考えられる。本研究では、機能が未知である甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に焦点を当て、それらの細胞の味覚応答機能の解析を行うために、それらの細胞の分子知見を獲得することを目的とした。

始めに、ラットの味蕾および味蕾を除いた有郭乳頭上皮組織における DNA マイクロアレイデータを元に、味蕾に特に高い発現を示す約50個の遺伝子を抽出した。この中には、既に味蕾特異的な発現を示すことが知られている遺伝子も含まれていた。味蕾における発現が知られていない遺伝子について、マウス有郭乳頭における発現分布を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した結果、17個の遺伝子が味蕾特異的に発現していた。このうち、既知味細胞マーカー分子との二重 *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行ったところ、2個の遺伝子が甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞特異的に発現していることを見出した。今後は、これらの遺伝子の味蕾における機能解析やこれらの遺伝子の転写制御領域を用いたトランスジェニックマウスを作出し、味刺激に対する細胞応答を観察していきたい。

1. 研究目的

味覚は味物質が味蕾中の味細胞に受容されることにより生じる感覚である。味物質を受容する組織である味蕾は、主として口腔咽頭部の上皮層に分布する。哺乳類では、味蕾の大部分は舌上皮の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭に存在している。それぞれの味蕾は100個程度の細胞から構成され、タマネギ状の構造をしている。ヒトが感知する味のうち、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味は5基本味と呼ばれる。このうち甘味、旨味、苦味についてはGタンパク質共役型受容体を受容体として同定されており、甘味・旨味物質はT1Rファミリーの受容体により、苦味物質はT2Rファミリーの受容体により受容される。酸味物質については、TRP (transient receptor potential) ファミリーに属す

る分子PKD2L1およびPKD1L3が受容体候補分子として同定されている。T1Rs、T2Rs、PKD2L1/PKD1L3は互いに異なる味細胞に発現することから、甘味・旨味、苦味、酸味はそれぞれ異なる味細胞により受容されることが明らかとなっている(Chandrashekar *et al.*, 2006)。

近年、著者らは、電位依存性カリウムチャンネルの一つである*KCNQ1*が甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞の全てに発現し、これらの味覚受容細胞以外の味蕾細胞にも発現していることを見出した(Ohmoto *et al.*, 2006)。味蕾中の細胞に対する味細胞の割合は、甘味、旨味、苦味受容細胞が合わせて30%程度、酸味受容細胞が15%程度であり、既知の味覚受容体を発現しない細胞群が残り半数近くを占める。このような味蕾細胞、つまり甘味、旨味、苦

味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞には NTPDase2 (Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2) が発現するという報告があるものの (Bartel *et al.*, 2006)、他の分子知見はほとんどないため、それらの味蕾細胞の機能は不明である。NTPDase2 を発現する味蕾細胞が実際に味を受容する細胞であるかは不明であるが、これらの味蕾細胞は KCNQ1 を発現することや、特有の膜電位変化パターンを示すことなどから、膜電位変化が生じる (Romanov *et al.*, 2007)。また、甘味、旨味、苦味、酸味がそれぞれ異なる細胞で受容されることから、塩味やその他の味を受容する細胞である可能性が考えられる。このような甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞の分子知見を取得し、その細胞の生理機能を解明することは、味覚研究における課題の1つである。

本研究では、機能が未知である甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に焦点を当て、それらの細胞の味覚応答機能の解析を行うことを目的とし、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現データを利用することにより、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞の分子知見を獲得することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 DNA マイクロアレイデータ解析

ラット有郭乳頭から単離した味蕾 (TB) と味蕾を除いた後の有郭乳頭上皮 (Cvp-Epi) の DNA マイクロアレイデータは GeneChip Rat Genome 230_2.0 (Affymetrix) を用いて取得したものをを用いた (Ohmoto *et al.*, 2006)。このラットのマイクロアレイデータを用いて TB と Cvp-Epi の比較解析を行い、TB での発現量が Cvp-Epi に対して有意に大きいプローブセットを取得した (Welch's t-test で FDR (false discovery ratio) < 0.1)。この中から Cvp-Epi に対する TB での発現量が 5 倍以上となり、TB での発現数値が 1000 以上となるプローブセットを 50 個抽出した。

2.2 cDNA 断片のクローニング

マウス遺伝子由来の cDNA 断片は、有郭乳頭上皮、脳、精巢の total RNA を用いて RT-PCR により取得した。増幅した cDNA 断片を pBlueScript II SK- vector (Stratagene) にクローニングし、自動 DNA シークエンサー 310A (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を確認した。

2.3 マウス有郭乳頭切片の作成

野生型 C57BL/6J マウスを頸椎脱臼後、速やかに舌を摘出し、有郭乳頭を摘出した後、O.C.T.コンパウンド (Sakura) 中で凍結した。凍結ブロックは使用時まで -80°C で保存した。凍結ブロックはクライオスタット CM1900 (Leica) を用いて 7 μ m に薄切し、APS コートまたは MAS コートスライドガラス (Matsunami Glass) に貼りつけた。

2.4 *in situ* hybridization (ISH) 解析

ISH で用いたプローブはジゴキシゲニンまたはフルオロセインで標識したアンチセンス RNA プローブであり、前者は DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)、後者は Fluorescein RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を用いて、T3 または T7 RNA polymerase (Stratagene) で *in vitro* transcription を行うことにより、合成した。合成したアンチセンスプローブは、sizing 溶液中 (42 mM NaHCO₃, 63 mM Na₂CO₃, 5 mM dithiothreitol (DTT)) 60°C で断片化を行い、約 150 塩基の長さにして用いた。

マウス有郭乳頭の新鮮凍結切片は 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / PBS 溶液中室温で 10 分間固定した後、0.1% ジエチルピロカルボナート (DEPC) / PBS で 15 分間の処理を 2 回を行い、5×SSC に buffer を置換した。その後、プレハイブリダイゼーション溶液 (40 μ g/ml salmon sperm DNA, 5×SSC, 50% ホルムアミド溶液) で 58°C 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション溶液 (5×SSC, 50% ホルムアミド溶液, 5×Denhardt's solution, 500 μ g/ml salmon sperm DNA, 250 μ g/ml yeast tRNA, 1 mM DTT, 20-200 ng/ml アンチセンス RNA プローブ) を切片上に乗せ、58°C または 65°C で 40 時間行った。ハイブリダイゼーション後、いずれも 58°C あるいは 65°C のまま、5×SSC で 5 分間の洗浄を 2 回、0.2×SSC で 30 分間の洗浄を 2 回行った。さらに室温において 0.2×SSC で 5 分間洗浄した後、TBS に buffer を置換した。ブロッキング溶液 (0.5% blocking reagent (Roche Diagnostics) / TBS) で 1 時間ブロッキングを行った。単一プローブを着色シグナルで検出する場合、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ジゴキシゲニン抗体 Fab 断片 (AP-anti-DIG Ab, Roche Diagnostics) をブロッキング溶液で 500 倍に希釈し、室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。TBS による 15 分間の洗浄を室温で 3 回を行い、NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) と BCIP (5-bromo-4

-chloro-3-indolyphosphate)を基質として用い、室温で16時間発色反応を行った。着色シグナルは、顕微鏡(BX-51, Olympus)で観察、記録した。2種類のプローブを共に蛍光シグナルで検出する場合、500倍希釈のHRP結合ヤギ抗フルオレセイン抗体 Fab 断片 (Roche Diagnostics) および500倍希釈のAP-anti-Digoxigenin Abを含むブロッキング溶液で、室温で1時間抗原抗体反応を行った。TBSによる洗浄を10分間3回行った後、TSA Biotin System (PerkinElmer)を用いてビオチン化チラミド生成反応を行った。TBSによる洗浄を10分間3回行った後、30分間室温においてTBSで500倍希釈したStreptavidin-Alexa488 (Invitrogen)を反応させた。TBSで洗浄した後、TBSで3回洗浄した後、HNPP FastRed Detection Set (Roche Diagnostics)を用いて発色させた。蛍光シグナルは共焦点顕微鏡FV500(Olympus)で観察、記録した。画像の調整はFLUOVIEW Ver.1.5 Viewer (Olympus)を用いて行った。

3. 研究結果

3. 1 舌上皮層において味蕾特異的に発現する遺伝子の探索

本研究で用いたDNAマイクロアレイGeneChip Rat Genome 230_2.0(Affymetrix)には約3万の遺伝子(プローブセット)が搭載されている。味蕾に特異性をもって発現する遺伝子は味蕾と上皮組織間での発現量の差が大きいと考えられる。TBでの発現数値がCvp-Epiに対して有意に大きいプローブセットは11,053個得られた(Welch's t-test, FDR < 0.1)。この中からTBでの発現数値がCvp-Epiでの発現数値の5倍以上となり、かつ、TBでの発現数値が1,000以上となるプローブセットを抽出した。この中には味蕾で特異的に発現する遺伝子が多く含まれ、Krt2-8のように味蕾全体に発現する遺伝子だけでなく、NTPDase2やGna14のように味蕾の一部の細胞に特異的に発現する遺伝子も含まれていた(Bartel *et al.*, 2006; Shindo *et al.*, 2008; Tizzano *et al.*, 2008)。これらKrt2-8、NTPDase2、Gna14のように味蕾特異的に発現することが知られているものを除いた遺伝子を解析対象とした。

Table 1には、抽出した遺伝子の名前とDNAマイクロアレイ

Table 1. Genes for *in situ* hybridization analysis obtained from DNA microarray

Gene	Gene symbol	probe ID	signal		fold change
			taste bud	Cvp-Epi	
chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Cxcl14	1388485_at	5431.06	204.55	26.55
mesothelin	Msln	1368441_at	4051.38	183.97	22.02
SPARC related modular calcium binding 2	Smoc2	1392965_a_at	3914.32	306.47	12.77
RIKEN cDNA 0610010O12 gene	0610010O12Rik	1373088_at	3738.32	700.27	5.34
profilin 2	Pfn2	1387015_at	3088.24	200.38	15.41
transmembrane 4 superfamily member 13	Tm4sf13	1377630_at	3081.82	509.17	6.05
placenta-specific 8	Plac8	1371447_at	2271.70	236.80	9.59
acetyl-Coenzyme A synthetase 2 (ADP forming)	Acas2	1375944_at	2086.22	412.47	5.06
phospholipid scramblase 1	Plscr1	1369029_at	2050.34	359.12	5.71
kit ligand	Kitl	1388856_at	2019.36	190.53	10.60
beta-2 microglobulin	B2m	1371440_at	1829.98	349.43	5.24
transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	Tmed4	1373056_at	1684.38	232.60	7.24
transmembrane 4 superfamily member 9	Tm4sf9	1377089_a_at	1628.34	174.15	9.35
disrupted in renal carcinoma 2 (human)	Dirc2	1390102_at	1544.18	251.02	6.15
melanoma antigen, family D, 1	Maged1	1386895_at	1512.76	241.65	6.26
tubulin, beta 2b	Tubb2b	1388131_at	1339.90	132.52	10.11
chemokine (C-X-C motif) receptor 7	Cxcr7	1367940_at	1334.54	183.02	7.29
fibroblast growth factor receptor-like 1	Fgfr1	1390374_at	1328.02	95.27	13.94
lysozyme	Lyz	1370154_at	1316.38	254.85	5.17
transmembrane protein 176B	Tmem176b	1368840_at	1302.86	76.67	16.99
ninjurin 1	Ninj1	1370348_at	1272.08	80.82	15.74
leucine rich repeat containing 26	Lrrc26	1385136_at	1200.20	97.25	12.34
ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	Enpp3	1367905_at	1113.24	122.32	9.10
Brain abundant, membrane attached signal protein 1	Basp1	1369310_at	1078.28	51.30	21.02
proline rich 15	Prr15	1374142_at	1052.52	65.68	16.02
p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	Pak1	1389093_at	1046.84	191.92	5.46

イにおける数値を載せた。

3.2 マイクロアレイデータから抽出した遺伝子のマウス有郭乳頭における発現解析

上述のように抽出してきた遺伝子のマウス舌上皮層における発現分布を調べるため、cDNA を取得し、マウス有郭乳頭上皮層切片を用いて *in situ* hybridization (ISH) を行った (Figure 1)。味蕾や有郭乳頭上皮層におけるシグナルの分布から、各遺伝子の発現パターンを4つに分類した。

- (1) 有郭乳頭上皮層において有意なシグナルが観察されなかった遺伝子
 - 2 遺伝子 (Tmem176b および Tm4sf9)
- (2) 味蕾を含む有郭乳頭上皮層に全体的にシグナルが観察される遺伝子
 - 7 遺伝子 (Msln, Basp1, B2m, Lrrc26, Tmed4, Acss2, Enpp3)
- (3) 味蕾特異的なシグナルは観察されるが、味蕾における発現が弱い遺伝子
 - 9 遺伝子 (Pfn2, Tm4sf13, Plscr, Dirc2, Tubb2b, Cxcr7, Fgf11, Lyz, Ninj1)
- (4) 味蕾の全体または味蕾の一部の細胞に特異的な強いシグナルが観察された遺伝子
 - 8 遺伝子 (Cxcl14, Smoc2, 0610010012 Rik, Plac8, Kitl, Maged1, Prr15, Pak1)

(3)のグループに含まれる遺伝子は、味蕾が存在しない上皮に発現は観察されないが、味蕾におけるシグナルは非常に弱く、発現細胞種ははっきりとは分からなかった (Figure 1)。(4)のグループに含まれる遺伝子については、Kitl, Cxcl14, Pak1 は味蕾のほぼ全ての細胞に発現していた (Figure 1)。他の Plac8, Prr15, 0610010012Rik, Smoc2, Maged1 は味蕾の 5~7 割程度の細胞に発現していた (Figure 1)。これまでに味蕾で機能することが分かっている

分子のほとんどは(4)と同程度かそれ以上の強い発現を示すため、(3)のグループに含まれる遺伝子は解析対象から外し、(4)のグループに含まれる遺伝子について、以下の解析を行った。

3.3 新規遺伝子の発現細胞種の同定

味蕾特異的に強いシグナルが観察された遺伝子の発現細胞種を同定するため、マウス有郭乳頭切片において二重 ISH を行った。その際、味蕾において同程度のシグナルが観察される TRPM5 および PKD1L3 を、それぞれ甘味、旨味、苦味細胞のマーカー遺伝子、酸味細胞のマーカー遺伝子として用いた。はじめに、各遺伝子が既知の味細胞に発現するか調べるため、TRPM5 および PKD1L3 の混合プローブを用い、各遺伝子のシグナルと比較した。その結果、Kitl, Cxcl14, Pak1 のシグナルは TRPM5 および PKD1L3 のシグナルを全て内包しており、TRPM5 および PKD1L3 を発現しない味蕾細胞にも観察された (data not shown)。また、Cxcl14 と甘味、旨味、苦味、酸味以外の味細胞に発現する NTPDase2 との発現相関を二重 ISH により調べたところ、Entpd2 のシグナルは Cxcl14 のシグナルの部分集合に観察された (data not shown)。これらのことから、Kitl, Cxcl14, Pak1 は全ての甘味、旨味、苦味、酸味細胞と既知の味細胞以外の味蕾細胞のほとんどに発現していることが明らかとなった。Plac8、0610010012Rik、Maged1 のシグナルは TRPM5 および PKD1L3 のシグナルを全て内包していた (data not shown)。一方、Smoc2、Prr15 のシグナルは TRPM5 および PKD1L3 のシグナルと完全に排他的であった (Figure 2)。NTPDase2 との発現相関を二重 ISH により調べたところ、Smoc2、Prr15 のシグナルは NTPDase2 のシグナルとほぼ一致していた (Figure 2)。以上のことから、Smoc2 と Prr15 は甘味、旨味、苦味、酸味細胞には発現せず、これら以外の味蕾細胞に発現することが明らかとなった。

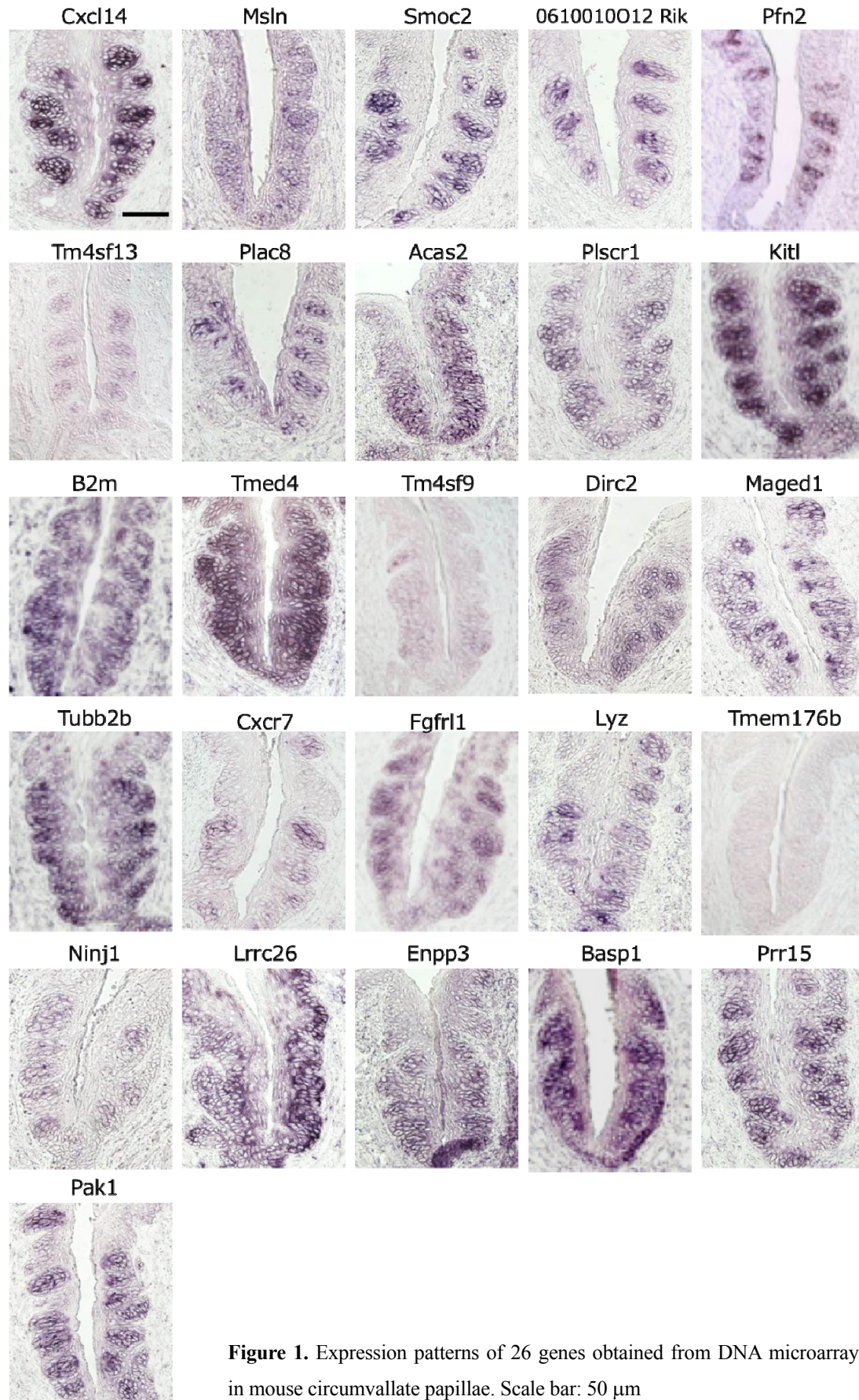


Figure 1. Expression patterns of 26 genes obtained from DNA microarray in mouse circumvallate papillae. Scale bar: 50 μ m

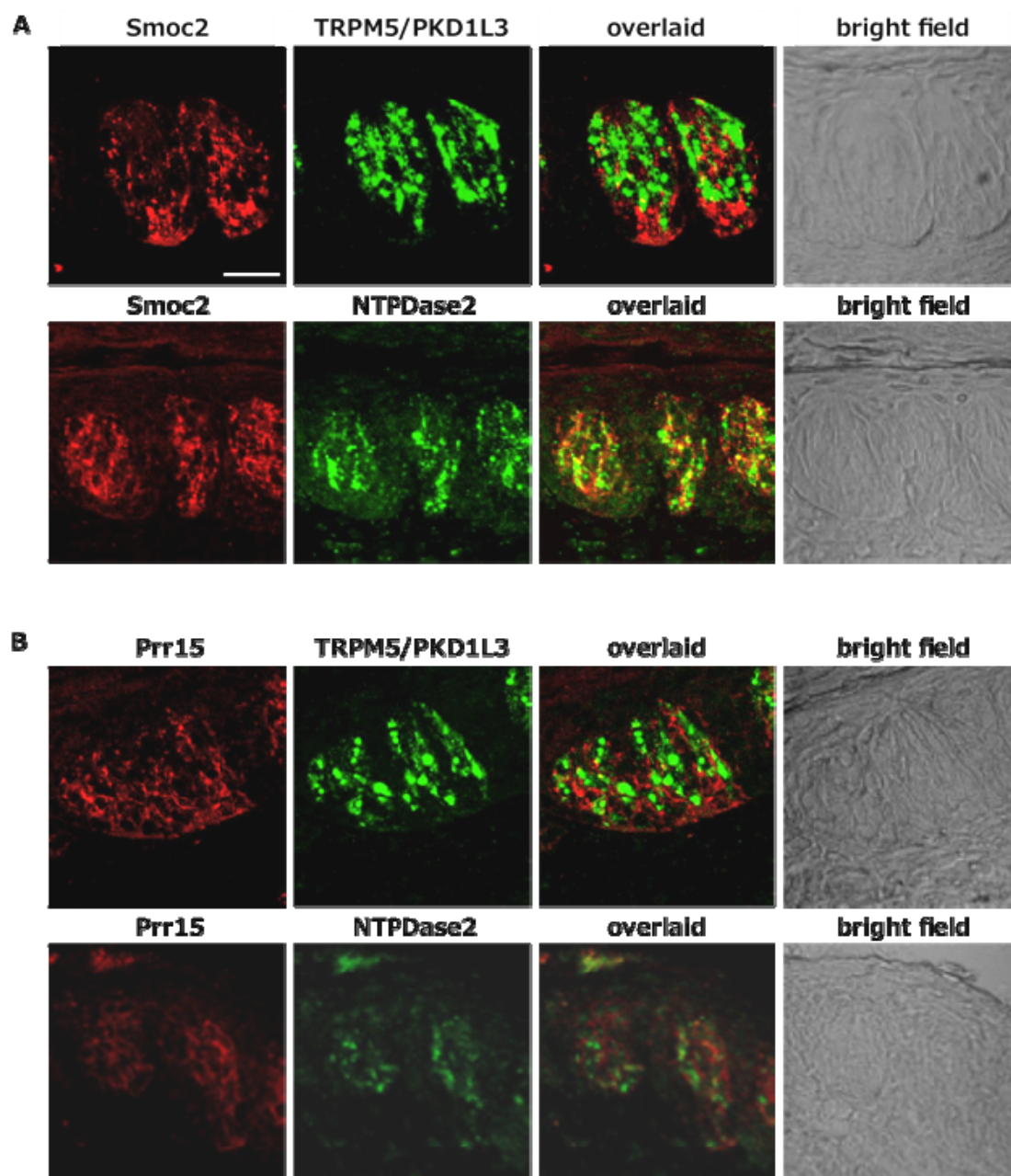


Figure 2. Expression correlation of Smoc2 and Prr15 with TRPM5 and PKD1L3 or NTPDase2 in mouse circumvallate papillae. (A) The signals of Smoc2 (red) were segregated from those of mixed probes for TRPM5 and PKD1L3 (green), and overlapped with those of NTPDase2 (green). (B) The signals of Prr15 (red) were segregated from those of mixed probes for TRPM5 and PKD1L3 (green), and overlapped with those of NTPDase2 (green). Scale bar: 20 μ m

4. 考察

本研究では、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に特異的に発現する新規遺伝子の取得を目指し、味蕾と味蕾を含まない有郭乳頭上皮組織のDNAマイクロアレイデータを基に、遺伝子の探索と発現解析を行った。その結果、甘味、旨味、苦味、酸味細胞以外の味蕾細胞に

特異的に発現する2つの遺伝子を取得した。

4. 1 DNA マイクロアレイによる味蕾特異的に発現する遺伝子の探索

マイクロアレイに搭載されている約3万個のプローブセットからの味蕾特異的に発現する遺伝子の探索にあたり、アノテーション情報は用いず、単純に発現数値のみで抽

出を行った。用いたマイクロアレイ中のプローブセットの約半数は機能未知の EST に相当するものであり、これらの中にはアノテーション情報が付されていないものが多い。マイクロアレイデータからの遺伝子を抽出する場合、“channel”、“transmembrane” など機能や細胞内局在をキーワードとして抽出する方法も考えられるが、最初から取得する分子の特性をある程度規定した検索となる上、検索対象はアノテーションが揃っているプローブセットに限られてしまう。そのため、本研究では、発現数値を用いることにより、EST を含めた全プローブセットを対象として、味蕾に特異的に発現する遺伝子を幅広く検索した。そのため、0610010012Rik や Prr15 のような EST として登録されている遺伝子も抽出することができた。

4.2 マイクロアレイデータから抽出した遺伝子の味蕾における発現

味蕾特異的に発現する遺伝子を抽出する基準として、DNA マイクロアレイの TB での発現数値が Cyp-Epi の発現数値の5倍以上であり、TB での発現数値が1,000以上となる遺伝子を選択した。ISH によりマウス有郭乳頭における発現解析を行ったところ、抽出された50個のうち、味蕾で発現していることが確認されている遺伝子を含めると、45遺伝子中36遺伝子が味蕾特異的に発現していた。残りの5遺伝子のcDNAは取得できなかった。味蕾と味蕾を除いた有郭乳頭上皮の遺伝子発現特性の差異を反映し、マイクロアレイデータと非常によく一致した結果と言え、非常に効率よく味蕾特異的に発現する遺伝子が取得できたと言える。その他の遺伝子は、味蕾と味蕾周辺の上皮層両方に発現しているもの、あるいは味蕾にシグナルが見られないものであった。シグナルが検出できなかった遺伝子については、マイクロアレイの発現数値が大きい遺伝子でも味蕾細胞全体に弱く発現するなどの理由でISHの検出閾値に達していなかったと考えられる。味蕾に特異的に発現する36遺伝子の中で、味蕾の全ての細胞種に発現するものは11遺伝子、甘味、旨味、苦味受容細胞（すなわちTRPM5発現細胞）の全てあるいはその一部に発現するのは9遺伝子、既知味受容細胞以外の味蕾細胞に発現するのは3遺伝子であった。本解析では、味細胞種特異的に発現する遺伝子を多く抽出することは出来なかった。味細胞種特異的に発現する遺伝子がどの程度存在するか不明であるが、味覚受容体やシグナル伝達分子、

それらの発現を制御する転写因子など味細胞種により発現する遺伝子の種類が異なることが予想される。また、酸味受容細胞特異的に発現するSNAP-25、NCAMなどは、本解析の抽出過程で外れてしまった。このような少数の味細胞種特異的に発現する遺伝子は、TB での発現数値が1,000以上という条件で抽出したため、抽出過程で外れてしまった可能性が考えられ、逆に味蕾の多くの細胞で発現している遺伝子ほど抽出されやすかったと考えられる。味細胞特異的な遺伝子を抽出するには、発現数値の基準を下げて再解析を行う必要があるが、解析対象とする遺伝子が増えるとともに、TB における発現数値が低くても味蕾全体に弱く発現している遺伝子も抽出される可能性が大いにあり、あまり現実的ではない。味細胞種特異的に発現する遺伝子を探索するには、味細胞ごとの遺伝子発現プロファイリングを行うなどの工夫が必要である。また、本研究で解析した(3)のグループに属する9遺伝子は味蕾でのシグナルが弱いため(Figure 1)、マーカー遺伝子との発現相関解析ができないものであった。これらの遺伝子については、ISH のプローブを長くしたり抗体を用いたりするなどして味蕾における発現細胞種の解析を行う必要がある。

4.3 新規遺伝子の発現する味蕾細胞種

本研究で新たに取得した味蕾特異的に強い発現を示す8遺伝子のうち3遺伝子(Kitl, Cxcl14, Pak1)は甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞を含む味蕾のほとんどの細胞に発現していた。これらは味細胞種全体の機能に共通して関与する分子であることが示唆される。注目すべきは、甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞には発現せず、それ以外の味蕾細胞に発現する2つの遺伝子(Smoc2, Prr15)を同定したことである。これらの既知の味覚受容体を発現しない味蕾細胞の機能は不明だが、膜電位変化を生じることや、甘味、旨味、苦味、酸味が互いに異なる細胞で受容されることから、未だ同定されていない塩味やその他の味の受容細胞である可能性が考えられる。この細胞群に発現する遺伝子は NTPDase2 以外に報告されておらず、遺伝子発現から味蕾細胞での分子機能を予測することは難しいが、機能が未知であった味蕾細胞に新たな分子知見が加わった。今後は、これらの遺伝子を分子ツールとして、機能が未知であった味蕾細胞の機能を明らかにして行くことが期待される。

5. 今後の課題

本研究で新たに取得した既知味覚受容細胞以外の味蕾細胞に特異的に発現する *Smoc2*, *Prr15* の2遺伝子は非常に有用である。これらの遺伝子の転写制御領域下に G-CaMP のようなカルシウム濃度感受性タンパク質 (Nakai *et al.*, 2001) を発現するトランスジェニックマウスを作出し、乳頭の切片や単離味蕾細胞の味刺激に対するイメージング解析を行うことにより、蛍光強度の上昇を指標にして、塩味物質など種々の化学物質に対する細胞応答を解析し、甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞が受容する化学物質を同定することが可能となる。また、このトランスジェニックマウスにおいて、G-CaMP の蛍光を指標にして味蕾細胞のソーティングを行い、遺伝子発現解析を行うことにより、既知味覚受容細胞以外の味蕾細胞の新たな分子知見を取得し、それらの細胞における味覚受容の分子機構を解明することに繋がる。これらの解析は今後の課題として研究していきたい。

今年の始め、アミロライド感受性のナトリウムチャンネル ENaC が低濃度の好ましい塩味の受容に深く関与していることが証明された (Chandrashekar *et al.*, 2010)。この塩味の受容に関与する味細胞は、甘味、旨味、苦味、酸味を受容する味細胞とは異なるものであった。また、低濃度の塩味に応答する味細胞だけでなく、高濃度の塩味(好ましくない味)に応答する味細胞も存在することも示唆されている。甘味、旨味、苦味、酸味受容細胞以外の味蕾細胞の遺伝子発現データを得ることにより、低濃度の塩味受容細胞に特異的に発現する遺伝子の取得や高濃度の塩味に応答する細胞の同定に繋がることが考えられ、今後の課題であろう。

参考文献

- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol.* 497(1): 1-12.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature.* 444(7117): 288-94.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Edith Hummler, Ryba NJ, Zuker CS (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464(7286): 297-301
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 19(2): 137-41.
- Ohmoto M, Matsumoto I, Misaka T, Abe K (2006) Taste receptor cells express voltage-dependent potassium channels in a cell age-specific manner. *Chem Senses.* 31(8): 739-46.
- Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF, Kolesnikov SS (2007) Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* 26(3): 657-67.
- Shindo Y, Miura H, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ninomiya Y, Hino A, Kanda T, Kusakabe Y (2008) G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun.* 376(3): 504-8.
- Tizzano M, Dvoryanchikov G, Barrows JK, Kim S, Chaudhari N, Finger TE (2008) Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci.* 9: 110.

No. 0917

Identification of Salt-Responsive Taste Receptor Cells and Analysis of Their Functions

Makoto Ohmoto

Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo

Summary

Taste signals arise on reception of taste substances by taste receptor cells (TRCs) located in taste buds; these taste signals are transmitted to the gustatory neurons innervating the TRCs. In general, taste qualities are classified into 5 basic tastes: sweetness, umami, bitterness, sourness, and saltiness. Sweet, umami, bitter, and sour tastants are received by different TRCs. Approximately half of the taste bud cells are sweet-, umami-, bitter-, or sour-responsive TRCs. However, the physiological functions of the remaining taste bud cells are unclear. In particular, salt-responsive TRCs have not been identified. Almost all taste bud cells have one of voltage-dependent potassium channels, KCNQ1, indicating that their membrane potentials can be changed. Four basic tastes other than saltiness are received by different TRCs. These suggest that the taste bud cells other than the sweet-, umami-, bitter-, and sour-responsive TRCs could be the salt-responsive TRCs. The purpose of this study is to determine the molecular characteristics of the taste bud cells other than the sweet-, umami-, bitter-, and sour-responsive TRCs, in order to analyze their physiological functions.

Using the DNA microarray data on the isolated taste buds from rat circumvallate papillae and circumvallate papillar epithelia after dissection of taste buds, we obtained approximately 50 genes that are expressed at a higher level in the taste buds than in the epithelia. These included genes that are known to be expressed at a high level in taste buds. *In situ* hybridization analysis was performed to investigate the gene expression patterns in the taste bud cells. The mRNA signals of 17 genes were observed specifically in the taste bud cells. Double-labeled *in situ* hybridization analysis revealed that 2 genes were specifically expressed in taste bud cells other than the sweet-, umami-, bitter-, and sour-responsive TRCs.