

## 高濃度の塩の受容細胞の分化・維持機構の解析

應本 真

高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科

### 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感覚である。ヒトが容易に認識、識別できる味として、甘味、うま味、苦味、酸味、塩味の 5 基本味がある。甘味、うま味、苦味、酸味はそれぞれ異なる味細胞で受容される。塩味に関しては、2 つ(低濃度のナトリウムの味、および、高濃度の塩の味)の受容経路があり、前者は、甘味、うま味、苦味、酸味を受容する味細胞とは異なる味細胞により、後者は苦味細胞および酸味細胞により受容されることが明らかになっている。こうした味細胞種の多様性を生み出す分子機構については、*Skn-1a*(*Pou2f3*)という転写因子が、甘味、うま味、苦味細胞および低濃度のナトリウムの味受容細胞に発現し、それらの細胞の発生に必須の因子であることが示されている。本研究では、苦味細胞(つまり、苦味や高濃度の塩を受容する味細胞)および未分化の味蕾細胞に発現する転写因子である *Eya1* に着目し、苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の発生・分化および機能維持における *Eya1* の関与を解析することを目的とした。

味蕾特異的に *Eya1* 遺伝子を欠損させるために、2 種類のマウス系統を用いた。1 つは、味蕾を産生する幹細胞において薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼである *CreERT2* を発現するマウスであり、もう1つは成熟した甘味・うま味・苦味細胞において Cre を発現するノックインマウスである。幹細胞特異的に *Eya1* を欠損させたマウスでは、苦味細胞の代わりに甘味・うま味細胞が産生されており、*Eya1* が苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生・分化に必要な因子であることが示唆された。また、成熟味細胞において *Eya1* 遺伝子を欠損させたマウスでも同様に、苦味受容体の発現が消失し、苦味細胞の代わりに甘味・うま味細胞が増加していた。さらには、*Eya1* 欠損マウスを用いた嗜好行動実験においては、苦味物質であるデナトニウムやシクロヘキシミドに対する忌避行動が観察されず、また、高濃度の塩化ナトリウムや塩化カルシウムなどに対する忌避行動もコントロールマウスと比較して低下していた。

これらのことから、*Eya1* は苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の分化だけでなく、分化後の成熟した味細胞の機能維持にも必要であることが示された。また、本研究で作製した *Eya1* 欠損マウスは、高濃度塩味の受容機構の解明にも有用なモデルであることが明らかとなった。

### 1. 研究目的

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感覚である。ヒトが容易に認識、識別できる味として、甘味、うま味、苦味、酸味、塩味の 5 基本味がある。これまでの研究により、味覚受容体として、G タンパク質共役型受容体(GPCR)

である甘味・うま味受容体(T1Rファミリー分子)および苦味受容体(T2Rファミリー分子)が同定された<sup>(1, 2)</sup>。酸味や塩味はこれらの GPCR を発現しない味細胞により受容される。酸味は *Otop1* を発現する味細胞により、ナトリウムの味である塩味は *ENaC $\alpha$*  を発現する味細胞の一部の細胞により受容される<sup>(3, 4)</sup>。これらの基本味は互いに異なる味細胞により受容されることから、味覚の多様性

は味細胞の種類の多様性と相関する。5 基本味のうち、塩味に関しては、2 つ(低濃度のナトリウムの味、および、高濃度の塩の味)の受容経路があり、前者は、甘味、うま味、苦味、酸味を受容する味細胞とは異なる味細胞により受容されること、また、後者は苦味細胞および酸味細胞により受容されることが明らかになっている<sup>(4, 5)</sup>。

我々は、味蕾中の味細胞の発生・分化に関する研究を進めてきており、これまで *Skn-1a* (*Pou2f3*)という転写因子が、甘味、うま味、苦味細胞および低濃度のナトリウムの味受容細胞に発現し、それらの味細胞の発生に必須の因子であることなどを明らかにしてきた<sup>(6, 7)</sup>。また、別の転写因子である *Eya1* が苦味細胞(つまり、苦味や高濃度の塩を受容する味細胞)に特異的に発現していることを見出し<sup>(8)</sup>、*Eya1* が苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の分化や機能維持に関与するという仮説を立て、その検証を進めている。我々はこれまで、味蕾の幹細胞において特異的に *Eya1* 遺伝子を欠損するマウス (*Eya1* conditional knockout (cKO) マウス)を作成し、解析を進めてきた。味蕾における味覚受容体の発現解析により、*Eya1* cKO マウスでは苦味受容体の発現頻度が大きく減少していることを明らかにした。また、行動学的解析の結果、*Eya1* cKO マウスでは苦味や高濃度の塩化ナトリウムに対する忌避行動がコントロールマウスに比べ減少していることが確認された(2022年度ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2237)。さらに、*Eya1* cKO マウスの味蕾においては、苦味および高濃度の塩味の受容に関与する味細胞が減少し、それらに代わって甘味・うま味細胞が増加していた(2023年度ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2338)。これらの結果から、*Eya1* が苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生・分化に不可欠な因子であることが示唆された。*Eya1* は、未成熟な味蕾細胞および成熟した苦味細胞の両方に発現していることから、*Eya1* は苦味細胞の発生・分化に加えて、成熟した苦味細胞の機能維持にも関与している可能性がある。そこで本研究では、その可能性を検証するため、成熟した味細胞異的において *Eya1* を欠損したマウスを作成し、組織学的および行動学的解析を行うことにより、成熟した苦味細胞における *Eya1* の必要性を明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究方法

### 2. 1 *Eya1* cKO の作製

*Eya1* 遺伝子のエクソン 10 を挟むようにして loxP 配列を導入したアリル (*Eya1*-floxed アリル)を持つノックインマウス *Eya1* (floxed)マウスは、Cyagen 社より購入した。*Eya1* 遺伝子の欠損には、2 つの Cre 発現マウスを用いた。1 つは、味蕾の幹細胞に発現する *Krt5* 遺伝子の終始コドン直後に *ires*-*CreERT2* 配列が導入されたアリル (*Krt5*-*CreERT2*)をもつノックインマウス (*Krt5*(*CreERT2*+/+), Jackson Laboratory より購入)であり、もう一つは、成熟した甘味・うま味・苦味細胞に発現する *Trpm5* 遺伝子の開始メチオニンコドンに Cre 配列が挿入されたアリル (*Trpm5*-Cre)をもつノックインマウス (*Trpm5*(*Cre*+/+), 共同研究者より譲渡)である。これらのマウスを用いて、*Krt5*(*CreERT2*+/+);*Eya1*(floxed/floxed)マウスおよび *Trpm5*(*Cre*+/+); *Eya1*(floxed/floxed) マウスを作成した。*Krt5*(*CreERT2*+/+);*Eya1*(floxed/floxed)マウスに対し、10 mg/ml となるようにコーン油に溶解したタモキシフェンを、100 mg/体重 1 kg あたりとなるように、マウスの腹腔に投与した。タモキシフェンの投与後、2 ヶ月以上経過したマウスを実験に使用した。対照群としてタモキシフェンを投与していないマウスを用いた。遺伝子組換え実験および動物実験は、高崎健康福祉大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を受けた上で実施した。

### 2. 2 *in situ* hybridization

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 CM1860 (Leica) を用いて 8 μm に薄切し、MAS コートスライドガラス (Matsunami Glass) に貼りつけた。切片は使用時まで -80°C で保存した。

*in situ* hybridization で用いる Digoxigenin (DIG) あるいは Fluorescein (FLU) で標識したアンチセンス RNA プロブは、DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) あるいは FLU RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)、および、T3 または T7 RNA polymerase (Roche Diagnostics) 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ブは、アルカリ溶液 (42 mM NaHCO<sub>3</sub>, 63 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 mM dithiothreitol (DTT)) 中で 60°C 処理することにより、断片化を行い、約 150 塩基の長さにして用いた。

## 2. 2. 1 Single *in situ* hybridization

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 µg/ml Herring sperm DNA(Promega), 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 µg/ml Herring sperm DNA, 250 µg/ml yeast tRNA(Roche Diagnostics), 1 mM DTT, 20-200 ng/ml DIG 標識アンチセンス RNA プローブ)を切片上に乗せ、58°C で 16 時間行った。ハイブリダイゼーション後、58°C で、5×SSC による 5 分間の洗浄を 2 回、0.2×SSC による 30 分間の洗浄を 2 回行った。室温において TBS で 5 分間洗浄した後、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。アルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体(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 回行い、NBT(Nitroblue tetrazolium chloride, Roche Diagnostics)と、BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, Roche Diagnostics)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-53, Olympus)および顕微鏡用デジタルカメラ(DP74, Olympus)を用いて観察、記録した。

## 2. 2. 2 Double-label *in situ* hybridization

上記と同様に、マウス有郭乳頭の新鮮凍結切片を用いてプレハイブリダイゼーションを行った後、DIG 標識アンチセンス RNA プローブおよび FLU 標識アンチセンス RNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を切片上に乗せ、58°C で 16 時間の反応を行った。ハイブリダイゼーション後、58°C で、5×SSC による 5 分間の洗浄を 2 回、0.2×SSC による 30 分間の洗浄を 2 回行った。室温において TBS で 5 分間洗浄した後、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。ビオチン結合抗フルオレセイン抗体(Biotin-anti-FLU Ab, Vector laboratory)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 回行い、Avidin-Biotin Complex

(VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit, Vector laboratory)と 30 分間反応させた。洗浄後、TSA Biotin Plus System(PerkinElmer)を用いて 10 分間のビオチン化チラミド反応を行った。洗浄後、3%過酸化水素水溶液と 60 分間反応させた。その後、HRP 結合抗ジゴキシゲニン抗体(HRP-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。洗浄後、TSA Plus Cy5 System(PerkinElmer)を用いて 10 分間の Cy5 化チラミド反応をした。ビオチン化チラミドは、Alexa 488 標識された Streptavidin(ThermoFisher)と反応させて蛍光標識した。洗浄後、DAPI 染色を行った。蛍光シグナルは、共焦点レーザー顕微鏡システム(Ti2, Nikon)を用いて観察、記録した。

## 2. 2. 3 味溶液に対する行動解析(リック試験)

味溶液に対するマウスのリック数を測定するために、リック装置(メルクエスト LKT-8)を用いた。リック装置を用いて、マウスに各種各濃度の水溶液を提示し、それに対する 5 秒間のリック数を測定するという試験である。水や水溶液へのアクセスは、シャッターの開閉により制御される。まず、試験に対するトレーニングとして、個別飼育したマウスを準備し、解析の 23 時間前から絶水(エサは自由摂取)を行った。トレーニングは、マウスに水を提示し、初めのリックを計測して 5 秒間水を与え、その後 10 秒間は水にアクセスできない、改めて水を提示し、初めのリックを計測して 5 秒間水を与えるという試行を 10 回以上繰り返した。以上を 1 日のセッションとし、少なくとも 5 日以上トレーニングを行った。本試験では、トレーニングと同様に、解析の 23 時間前から絶水(エサは自由摂取)を行った。リック装置を用いて、水に対する 5 秒間のリック数、次いで、味溶液に対する 5 秒間のリック数を測定した。味溶液は、濃度の低いものから高いものの順番で測定を行い、各濃度の味溶液の測定の間には 10 秒間アクセスできない時間を設けた。

使用した味溶液および濃度は以下の通りである; Denatonium Benzoate (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mM), Cycloheximide (0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 µM), NaCl (0, 75, 150, 300, 600, 1200 mM), KCl (0, 75, 150, 300, 600, 1200 mM), NH<sub>4</sub>Cl (0, 37.5, 75, 150, 300, 600, 1200 mM), Disodium Malate (0, 37.5, 75, 150, 300, 600 mM)。解析方法として、各濃度における 5 秒間のリック数を、水に対する

5 秒間のリック数で除して、相対値を算出した。統計的な解析は、Graphpad Prism 9 を用いて行った。2 元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行い、Holm-Sidak 多重比較を行った。

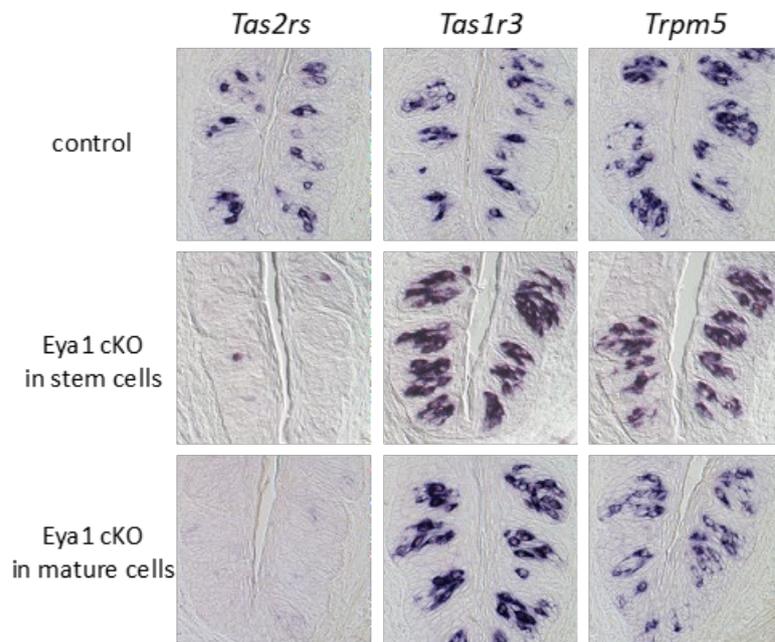
### 3. 研究結果

#### 3. 1 Eya1 cKO マウスの味蕾における味覚関連遺伝子の発現

Eya1 遺伝子を欠損したマウスは、生後直後に死んでしまうため<sup>(9)</sup>、成体での解析を行うためには、組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作製・解析が必要であり、Eya1 遺伝子の flox マウス (Eya1 遺伝子のエキソン 10 を挟むようにして 2 つの loxP 配列が挿入された遺伝子を持つマウス) を作成した。本研究では、味蕾特異的に Eya1 遺伝子を欠損するための Cre driver として、2 つのマウス系統を用いた。一つは、味蕾を産生する幹細胞において薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼである CreERT2 を発現する Krt5-CreERT2 ノックインマウスを用いた<sup>(10)</sup>。もう一つは、成熟した甘味・うま味・苦味細胞において Cre を発現する Trpm5-Cre ノックインマウスを用いた<sup>(11)</sup>。

掛け合わせにより、Krt5(CreERT2/+); Eya1(flox/flox) マウスおよび Trpm5(Cre/+); Eya1(flox/flox) マウス (以下、Eya1 cKO in mature cells) を作製した。Krt5(CreERT2/+); Eya1(flox/flox) マウスは、タモキシフェンの投与により、味蕾幹細胞において組換えを誘導したマウス (以下、Eya1 cKO in stem cells) を用いて解析を行った。

まず、2 種の Eya1 cKO マウスの有郭乳頭の味蕾における味覚関連遺伝子の発現の様子を *in situ* hybridization により調べた。その結果、苦味受容体である Tas2rs のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、大きく減少していた (Fig. 1)。Eya1 cKO in stem cells の味蕾では、強いシグナルを持つ少数の細胞が観察された一方、Eya1 cKO in mature cells の味蕾では、Tas2rs のシグナルはほとんど観察されなかった。甘味・うま味受容体である Tas1r3 のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、2 種の Eya1 cKO マウスでは増加していた (Fig. 1)。甘味、うま味、苦味細胞に共通して発現する Trpm5 のシグナルは、コントロールマウスと Eya1 cKO マウスで大きな差は見られなかった (Fig. 1)。



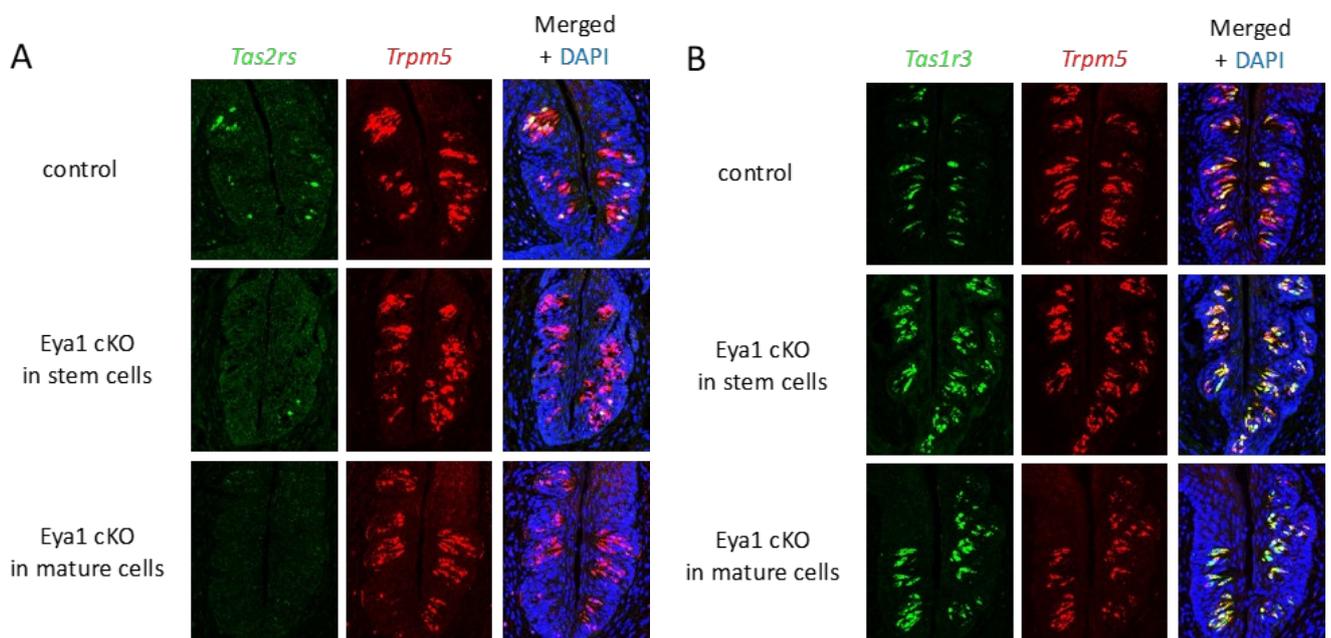
**Fig 1.** Expression of taste-related genes by *in situ* hybridization analysis

Gene expression in the circumvallate papillae was analyzed in control (top), Eya1 conditional knockout (cKO) in stem cells (middle), and Eya1 cKO in mature cells (bottom). A mixture of Tas2r104, Tas2r105, Tas2r118, and Tas2r126 probes was used to detect Tas2r genes.

次に、コントロールマウスおよび *Eya1* cKO マウスを用いて、Double-label *in situ* hybridization を行った。Trpm5 と苦味受容体である Tas2rs の発現相関を解析した結果、コントロールマウスでは、Trpm5 シグナルが観察された細胞の一部の細胞において Tas2rs のシグナルが観察された (Fig. 2A)。Eya1 cKO in stem cells マウスでは、Trpm5 シグナルが観察される味細胞のごく一部に、Tas2rs のシグナルが観察された (Fig. 2A)。

また、Eya1 cKO in mature cells マウスでは、Tas2rs のシグナルはほとんど観察されなかった (Fig. 2A)。Trpm5

と甘味・うま味受容体である Tas1r3 の発現相関を解析した結果、コントロールマウスでは、Trpm5 シグナルが観察された細胞の一部の細胞において Tas1r3 のシグナルが観察された (Fig. 2B)。Trpm5 陽性細胞の約 50% の細胞が Tas1r3 を発現していた。Eya1 cKO in stem cells マウスでは、Trpm5 陽性細胞の大部分の細胞で Tas1r3 のシグナルが観察され、Eya1 cKO in mature cells マウスにおいても同様に、Trpm5 陽性細胞の大部分の細胞で Tas1r3 のシグナルが観察された (Fig. 2B)。



**Fig 2.** Expression correlation of taste-related genes by double-label in situ hybridization analysis

- A. Expression of Tas2rs (green) and Trpm5 (red) was examined in the circumvallate papillae of control (top), Eya1 cKO in stem cells (middle), and Eya1 cKO in mature cells (bottom). Merged images with DAPI stain are shown on the right. A mixture of Tas2r104, Tas2r105, Tas2r118, and Tas2r126 probes was used to detect Tas2r genes.
- B. Expression of Tas1r3 (green) and Trpm5 (red) was examined in the circumvallate papillae of control (top), Eya1 cKO in stem cells (middle), and Eya1 cKO in mature cells

### 3. 2 Eya1 cKO の塩味に対する応答

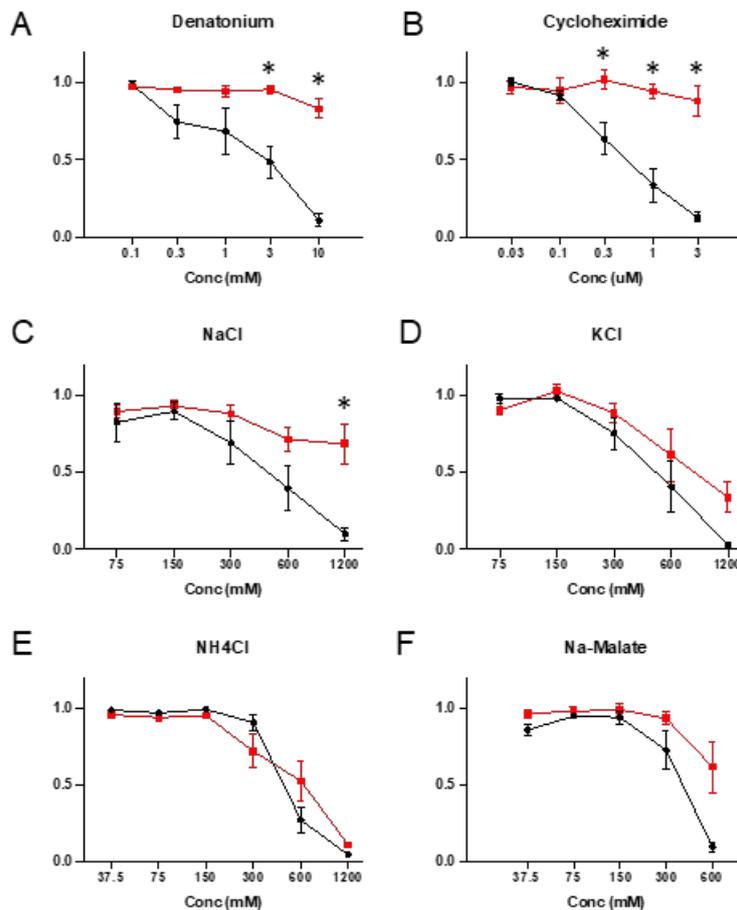
次に、コントロールマウスおよび *Eya1* cKO in mature cells マウスを用いて、味溶液に対する行動解析を行った。解析は、水あるいは味溶液を含んだ瓶の先端を舐めた回数と計測することのできるリッキング装置 (メルクエスト LKT-8) を用いて行った。結果は、各濃度の水溶液に対する 5 秒間のリッキング数を計数し、水に対する 5 秒間のリッ

数との比で示した。値が 1 に近いほど多くリッキングしたことを示し、値が 0 に近いほどリッキング数が減少した、つまり水溶液を忌避したことを示す。

*Eya1* cKO in mature cells マウスの味蕾において、苦味受容体である Tas2r 遺伝子の発現が大きく減少していたことから、苦味物質であるデナトニウムおよびシクロヘキシミドに対するリッキング試験を行った。その結果、コントロールマ

ウスはデナトニウムやシクロヘキシミドの濃度が高くなるにつれてリック数が減少していき, Eyal cKO マウスでは, リック数はあまり減少せず, 高濃度のデナトニウムやシクロヘキシミドに対するリック数はコントロールマウスより有意に大きかった (**Fig. 3A, B**)。次いで, 塩溶液に対するリック試験を行った。塩化ナトリウム (NaCl) に対するリック試験では, 低濃度 (75~300 mM) においては, コントロールマウスおよび Eyal cKO マウスでリック数の差は見られなかったが, 高濃度 (600~1200 mM) においては, コントロールマウスに比べ Eyal cKO マウスでリック数の減少は緩やかになり, 1200 mM の NaCl に対するリック数はコントロールマウスより有意に大きかった (**Fig. 3C**)。塩化カリウム

(KCl) に対するリック試験では, 解析した全ての濃度において, コントロールマウスおよび Eyal cKO マウスでリック数の差は見られなかったが, 高濃度 (600~1200 mM) においては, Eyal cKO マウスでリック数が大きいという傾向があった (**Fig. 3D**)。塩化アンモニウム (NH<sub>4</sub>Cl) に対するリック試験では, 解析した全ての濃度において, コントロールマウスおよび Eyal cKO マウスでリック数の差は見られなかった (**Fig. 3E**)。リンゴ酸二ナトリウムを用いた解析においても, すべての濃度において, コントロールマウスおよび Eyal cKO マウスでリック数の差は見られなかったが, 高濃度 (600 mM) においては, Eyal cKO マウスでリック数が大きいという傾向があった (**Fig. 3F**)。



**Fig 3.** Response to taste solutions by lick tests

The number of licks during 5 seconds for each concentration of taste solution was counted and expressed as a ratio to the number of licks during 5 seconds for water. A value closer to 1 indicates more licks, and a value closer to 0 indicates fewer licks, i.e., avoidance of the aqueous solution. Symbols depict means, error bars,  $\pm$  s.e.m (n = 5 control (black) and Eyal cKO in mature cells (red)); \* P < 0.05

#### 4. 考察

我々はこれまで、味蕾の幹細胞特異的に *Eyal* 遺伝子を欠損するマウス (*Eyal* cKO in stem cells マウス) の解析を行い、*Eyal* cKO マウスでは苦味受容体の発現頻度が大きく減少していること、*Eyal* cKO マウスでは苦味や高濃度の塩化ナトリウムに対する忌避行動がコントロールマウスに比べ減少すること、また、*Eyal* cKO in stem cells マウスの味蕾において、苦味および高濃度の塩味の受容に関与する味細胞の代わりに甘味・うま味細胞が増加することを示してきた (ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2237, 2338)。これらの結果は、*Eyal* が苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生・分化に不可欠な因子であることを示唆するものであるが、分化後の (成熟した) 苦味および高濃度の塩味の受容細胞において *Eyal* が細胞の機能維持にどのように関与するのことは不明であった。本研究では、成熟した味細胞における *Eyal* 遺伝子の機能を明らかにするために、成熟味細胞特異的に *Eyal* を欠損するマウス (*Eyal* cKO in mature cells) を作製し、解析した。組織学的な解析を行ったところ、味蕾において、苦味受容体の発現が大きく減少する一方、甘味・うま味受容体の発現は増加していた。また、行動学的な解析を行ったところ、苦味や高濃度の塩に対する忌避行動がコントロールマウスに比べ減少していることから、*Eyal* は、成熟した味細胞の機能にも必要であることが明らかとなった。

##### 4.1 成熟味細胞における *Eyal* の機能

*Eyal* は、味蕾中の苦味細胞および未分化の細胞に発現する転写因子として同定された<sup>(8)</sup>。我々はまず、味蕾の幹細胞に発現する *Krt5-CreERT2* 系統を用いて、味蕾の幹細胞特異的に *Eyal* を欠損させることで、未分化の細胞における *Eyal* の機能の解析を試みた。その結果は、昨年の報告書に記述したとおり、有郭乳頭の味蕾において *Tas2rs* 発現細胞 (苦味および高濃度の塩を受容する細胞) が産生される代わりに *Tas1r3* 発現細胞 (甘味・うま味細胞) が産生されることから、*Eyal* は未分化の細胞から苦味および高濃度の塩味を受容する細胞への運命決定に必要な因子であり、有郭乳頭の味蕾では、*Tas1r3* 発現細胞あるいは *Tas2rs* 発現細胞のデフォルトは *Tas1r3* を発現する細胞である可能性があることが示された (2023 年度ソルトサイエンス研究助成助成番号 2338)。本研究では、分化後の成熟した味細胞において *Eyal* を欠損させたマウスを解析したところ、非常に興味深いことに、幹細胞において *Eyal* を欠損させたマウス

の有郭乳頭における遺伝子発現解析の結果と同様結果が得られた (Fig. 1)。すなわち、分化後の成熟した味細胞において *Eyal* を欠損させたマウスの味蕾においても、苦味受容体の発現が消失し、*Tas2rs* 発現細胞 (苦味および高濃度の塩を受容する細胞) が産生される代わりに *Tas1r3* 発現細胞 (甘味・うま味細胞) が産生されるという結果である。ただし、このことを厳密に証明するためには、各遺伝子の発現細胞の定量解析が必要である。苦味および高濃度の塩を受容する細胞へと運命が決定して分化した後も、*Eyal* を欠損することによってデフォルトであると考えられる甘味・うま味細胞へとなりうるものが考えられる。*Eyal* は、苦味および高濃度の塩を受容する細胞の機能を維持するためにも必要な因子であることが示唆される。

##### 4.2 高濃度の塩味受容における苦味細胞の関与

本研究では、味蕾中の苦味および高濃度の塩味を受容する細胞がほぼ消失したマウスを用いて、行動学的な解析を行った。苦味物質として用いたデナトニウムやシクロヘキシミドに対する応答は、コントロールマウスでは濃度依存的にリック数が減少していったのに対し、*Eyal* cKO マウスではリック数の減少はほとんど見られず、高濃度 (3, 10 mM) のデナトニウム、高濃度 (0.3, 1, 3 mM) のシクロヘキシミドに対するリック数がコントロールマウスに比べ有意に大きかった (Fig. 3A, B)。これは、*Eyal* cKO マウスの味蕾における苦味受容体の発現がほぼ観察されず、苦味細胞が存在しないことと合致している。また、幹細胞において *Eyal* を欠損させたマウスでは最も高濃度 (10 mM) のデナトニウムに対するリック数がコントロールマウスと同程度に少なかった (2022 年度ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2237) のは、*Eyal* cKO in stem cells において、苦味受容体の発現や苦味細胞が少し残存しているためであると考えられる (Fig. 1, 2)。

高濃度 (600 mM) の NaCl に対するリック数は、統計学的な有意差は観察されなかったものの、コントロールマウスに比べ *Eyal* cKO マウスで大きく、1200 mM の NaCl に対するリック数は、*Eyal* cKO マウスで有意に大きかった (Fig. 3C)。この結果は、コントロールマウスは高濃度の NaCl に対する忌避を示すのに対し、*Eyal* cKO マウスはそれらを忌避しないということを示すものであり、苦味細胞 (および高濃度の塩の受容細胞) が存在しないためであると考えられる。一方、低濃度の NaCl (75~300 mM) に関しては、コントロールマウスおよび *Eyal* cKO マウスで忌避やリック数の差は見られな

かったのは, *Eya1* が低濃度のナトリウムを受容する味細胞の発生や分化には大きく関与していないためであるということが示唆されるが, 詳細な解析により明らかにする必要がある。KCl に対するリック数は, 高濃度領域において, コントロールマウスに比べ *Eya1* cKO マウスで大きかったものの, 統計学的な有意差は観察されなかった。これは高濃度の KCl に対する忌避が, 苦味細胞よりも酸味細胞の方が大きいということを表しているのかもしれない。NH<sub>4</sub>Cl に関しては, コントロールマウスと *Eya1* cKO マウスで同様に忌避するという結果であり, NH<sub>4</sub>Cl に対する受容体 (OTOP1)<sup>(12)</sup> を発現する酸味細胞の関与が大きい可能性が考えられる。リンゴ酸 Na に関しては, *Eya1* cKO マウスでは高濃度でリック数の減少は観察されたが, リック数はコントロールマウスよりも大きい傾向があった。これらの塩に対しては, 嗜好性との関連や苦味細胞と酸味細胞の関与の大きさなど, 複数の条件が影響している可能性があり, 受容機構を明らかにするにはより詳細な解析が必要である。

## 5. 今後の課題

*Eya1* は, *Six* などの他の DNA 結合能を持つ転写因子と結合して転写を活性化する補助因子であり, *Eya1* 単独では DNA 結合能を持たないため, *Eya1* と他の因子との複合体が協働して転写を制御し, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生・分化・機能維持に関与すると考えられる。*Eya1* と協働して味細胞の分化に関連する転写因子の候補因子の探索には, 本研究で作成した *Eya1* cKO の味蕾のトランスクリプトームデータが非常に有用である。これらのデータを解析することにより, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞に特異的に発現する遺伝子を取得し, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生や分化に関与する分子機構の詳細を明らかにすることを目指したい。さらには, トランスクリプトームデータを用いて, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞に特異的に発現する遺伝子を取得することにより, 特に, 高濃度の塩味の受容に関与する新たな分子知見が得られることが期待される。

## 6. 文献

- 1) Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288–294.
- 2) Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. 2009. Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* 139:234–244.
- 3) Tu, Y.-H., Cooper, A.J., Teng, B., Chang, R.B., Artiga, D.J., Turner, H.N., Mulhall, E.M., Ye, W., Smith, A.D., and Liman, E.R. 2018. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* 359:1047–1050.
- 4) Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2010. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297–301.
- 5) Oka, Y., Butnaru, M., Buchholtz, L. Von, Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2013. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494:472–475.
- 6) Matsumoto, I., Ohmoto, M., Narukawa, M., Yoshihara, Y., and Abe, K. 2011. *Skn-1a* (*Pou2f3*) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci* 14:685–687.
- 7) Ohmoto, M., Jyotaki, M., Foskett, J.K., and Matsumoto, I. 2020. Sodium-Taste Cells Require *Skn-1a* for Generation and Share Molecular Features with Sweet, Umami, and Bitter Taste Cells. *ENeuro* 7.
- 8) Ohmoto, M., Kitamoto, S., and Hirota, J. 2021. Expression of *Eya1* in mouse taste buds. *Cell Tissue Res* 383:979–986.
- 9) Xu, P.X., Adams, J., Peters, H., Brown, M.C., Heaney, S., and Maas, R. 1999. *Eya1*-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23:113–7.
- 10) Ohmoto, M., Lei, W., Yamashita, J., Hirota, J., Jiang, P., and Matsumoto, I. 2020. *SOX2* regulates homeostasis of taste bud cells and lingual epithelial cells in posterior tongue. *PLoS One* 15.
- 11) Soma, S. et al. 2025. Channel synapse mediates neurotransmission of airway protective chemoreflexes. *Cell* 188:2687-2704.e29.
- 12) Liang, X., Wilson, C.E., Teng, B., Kinnamon, S.C., Liman, E.R. 2023. The proton channel *OTOP1* is a sensor for the taste of ammonium chloride. *Nat Commun* 14:6194.

# Molecular Mechanisms Underlying Differentiation and Maintenance of High Salt Taste Cells

Makoto Ohmoto

Takasaki University of Health and Welfare

## Summary

Taste perception is initiated when chemical substances in food are detected by taste cells located within taste buds in the oral epithelium. Humans can recognize five basic taste qualities: sweet, umami, bitter, salty, and sour. Each of the sweet, umami, bitter, and sour tastes is detected by distinct populations of taste cells. Salty taste is mediated by two separate pathways: low-concentration sodium taste and high-concentration salt taste. The former is detected by a unique population of taste cells distinct from those sensing sweet, umami, bitter, and sour, whereas the latter is detected by bitter and sour taste cells. This study focuses on *Eya1*, a transcription factor expressed in bitter taste cells (i.e., taste cells that detect bitter taste and high-concentration salt taste) and undifferentiated taste bud cells, to investigate its role in the differentiation and maintenance of taste cells responsible for bitter and high-salt taste detection.

To analyze the functions of *Eya1* in taste buds, we used *Eya1*-floxed mice in combination with two Cre-expressing lines: one expressing the tamoxifen-inducible CreERT2 recombinase in taste stem cells, and the other expressing Cre in mature sweet, umami, and bitter taste cells. In mice lacking *Eya1* in taste stem cells, bitter/high-salt taste cells were replaced by sweet and umami taste cells, indicating that *Eya1* is essential for the differentiation of bitter/high-salt taste cells. Similarly, in mice lacking *Eya1* in mature taste cells, expression of bitter taste receptors was markedly reduced, and bitter/high-salt taste cells were replaced by sweet and umami taste cells. Behavioral assays revealed that mice lacking *Eya1* in mature taste cells failed to avoid bitter substances such as denatonium and cycloheximide, as well as high concentrations of sodium chloride and calcium chloride. These findings suggest that *Eya1* is required not only for the differentiation but also for the maintenance of bitter/high-salt taste cells. Overall, this study demonstrates that *Eya1* is a key regulator of bitter and high-salt taste cell identity and function and that the *Eya1*-deficient mice generated here serve as a valuable model for investigating the molecular mechanisms underlying high-salt taste perception.