

## 高濃度の塩の受容に関わる味細胞の分化機構の解析

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、旨味、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、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から、*Eya1* が苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の分化に関与するという仮説を立て、それを検証することを目的とした。

味蕾における *Eya1* の機能を解析するために、味蕾の幹細胞において薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼである *CreERT2* を発現するノックインマウス系統(*Krt5-CreERT2*)および *Eya1-flox* 系統のマウスを用いて、味蕾特異的に *Eya1* を欠損したマウス(*Eya1 cKO* マウス)を作製した。*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を調べた結果、苦味受容体のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ大きく減少していた。一方、甘味・うま味受容体のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、*Eya1 cKO* マウスでは増加していた。また、*Eya1 cKO* マウスを用いて苦味や塩に対する嗜好テストを行った結果、苦味物質であるデナトニウム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た。以上の結果から、*Eya1* が苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の分化に関与することが示唆された。

### 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、旨味、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・旨味受容体(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 *ENaCa* 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が多様性と相関する。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、旨味、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<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、旨味、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などを明らかにしてきた<sup>(6,7)</sup>。近年、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に関与するという仮説を立て、その検証を進めている。本研究では、味蕾特異的に転写因子 Eya1 を欠損したマウスを作製し、組織学的解析・行動学的解析を行うことにより、味細胞分化における Eya1 の機能を明らかにすること、および、Eya1 遺伝子欠損による塩味応答への影響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-flox アリル)を持つノックインマウス Eya1(flox/+)マウスは、Cyagen 社より購入した。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 アリル)をもつノックインマウス Krt5(CreERT2/+)は、Jackson Laboratory より購入した。Krt5(CreERT2/+)マウスと Eya1(flox/+)マウスの掛け合わせにより、Krt5(CreERT2/+);Eya1(flox/+)マウスを作出した。また、Eya1(flox/+)マウスどうしの掛け合わせにより、Eya1(flox/flox)マウスを作出した。得られた Krt5(CreERT2/+);Eya1(flox/+)マウスと Eya1(flox/flox)マウスの掛け合わせにより、Krt5(CreERT2/+);Eya1(flox/flox)マウスを作出した。Krt5(CreERT2/+);Eya1(flox/flox)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)で標識したアンチセンス RNA プローブは、DIG 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ーブは、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で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。

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 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回行い、NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche Diagnostics)とBCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate, 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。

### 2.3 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。リックング装置を用いて、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), NaCl (0, 75, 150, 300, 600, 1000 mM), KCl (0, 75, 150, 300, 600, 1000 mM), CaCl<sub>2</sub> (0, 10, 30, 100, 300 mM), MgCl<sub>2</sub> (0, 3, 10, 30, 100, 300 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 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・解析が必要である。そのために、Eya1 遺伝子の flox マウス(Eya1 遺伝子のエクソン 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)を導入した (Fig. 1)。Eya1-flox アリルをホモに持つマウスにおいて、Cre リコンビナーゼにより 2 つの loxP 配列の間で組換えが生じると、エクソン 10 が切り離され、以降の配列でフレームシフトが生じ、機能的な Eya1 タンパク質が作られなくなるため、組織特異的な Eya1 遺伝子欠損マウスが作製される (Fig. 1)。また、味蕾特異的に Eya1 遺伝子を欠損するための Cre driver マウスとして、

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>。Eya1-flox マウスおよび Krt5-CreERT2 ノックインマウスを用いて、Krt5(CreERT2/+);Eya1(flox/flox) マウスを作製し、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 (Eya1 cKO マウス) を用いて以下の解析を行った。

まず、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 Tas2r のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは大きく減少していた (Fig. 2)。一方、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、Eya1 cKO マウスでは増加していた (Fig. 2)。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. 2)。

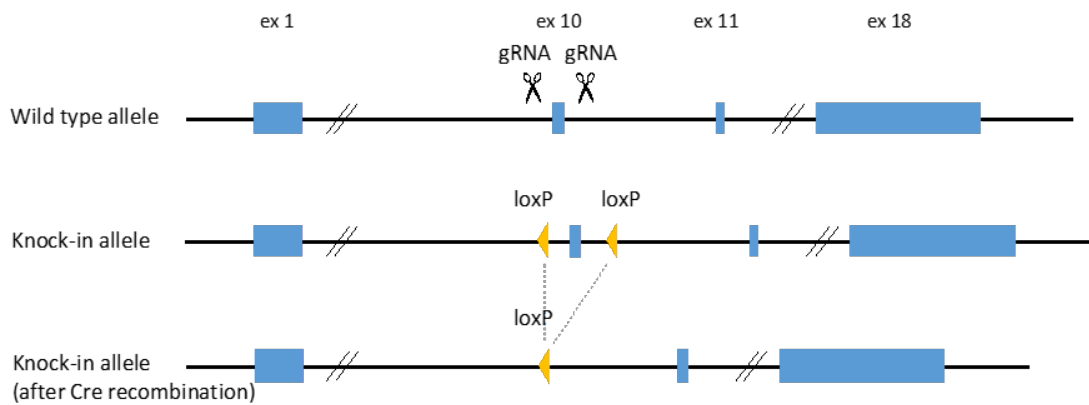
#### 3.2 Eya1 cKO の塩味に対する応答

次に、コントロールマウスおよび Eya1 cKO 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を計測することのできるリックング装置 (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 秒間のリック数を計数し、水に対する 5 秒間のリック数との比で示した。値が 1 に近いほど多くリックしたことを示し、値が 0 に近いほどリック数が減少した、つまり水溶液を忌避したことを示す。

Eya1 cKO 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に対するリック試験を行った。その結果、コントロールマウスはデナトニウムの濃度が高くなるにつれてリック数が減少していき、Eya1 cKO マウスでは、リック数の減少傾向は緩やかであり、高濃度のデナトニウムに対するリック数はコントロールマウスより大きかった (Fig. 3A)。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 Eya1 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、コントロールマウスに比べ Eya1 cKO マウスでリック数が有意に大きかった (Fig. 3B)。

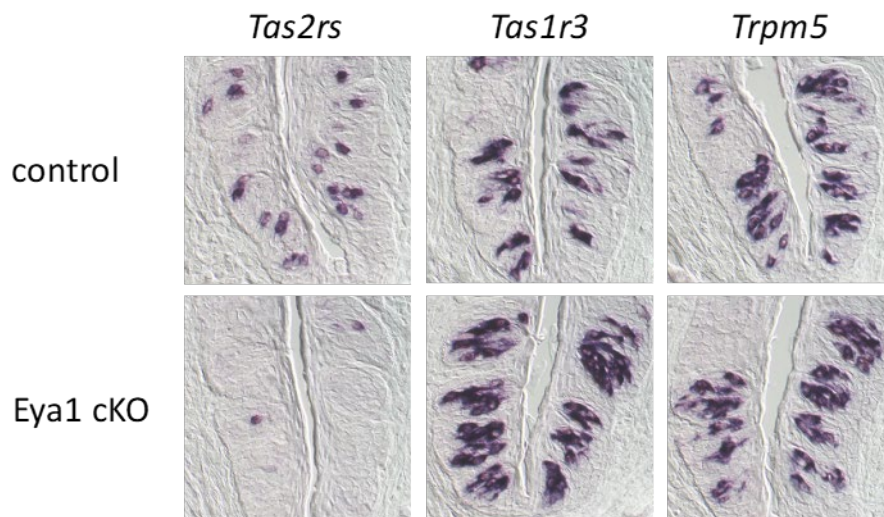
また、さらに高濃度(1000 mM)の塩化ナトリウムに対しては、Eya1 cKO マウスはコントロールマウスと同程度のリック数であった (**Fig. 3B**)。塩化カリウム(KCl)に対するリック試験では、低濃度(75~300 mM)においては、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスでリック数の差は見られず、また、高濃度(600 mM, 1000 mM)においても、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスでリック数は同じように減少した (**Fig. 3C**)。塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)に対するリック試験では、低濃度(10, 30 mM)においては、コントロールマウスおよび

Eya1 cKO マウスでリック数の差は見られず、また、高濃度(100 mM, 300 mM)においても、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスでリック数は同じように減少した (**Fig. 3D**)。塩化マグネシウム(MgCl<sub>2</sub>)に対するリック試験では、低濃度(3~30 mM)においては、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスでリック数の差は見られず、また、高濃度(100 mM, 300 mM)においても、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスでリック数は同じように減少した (**Fig. 3E**)。



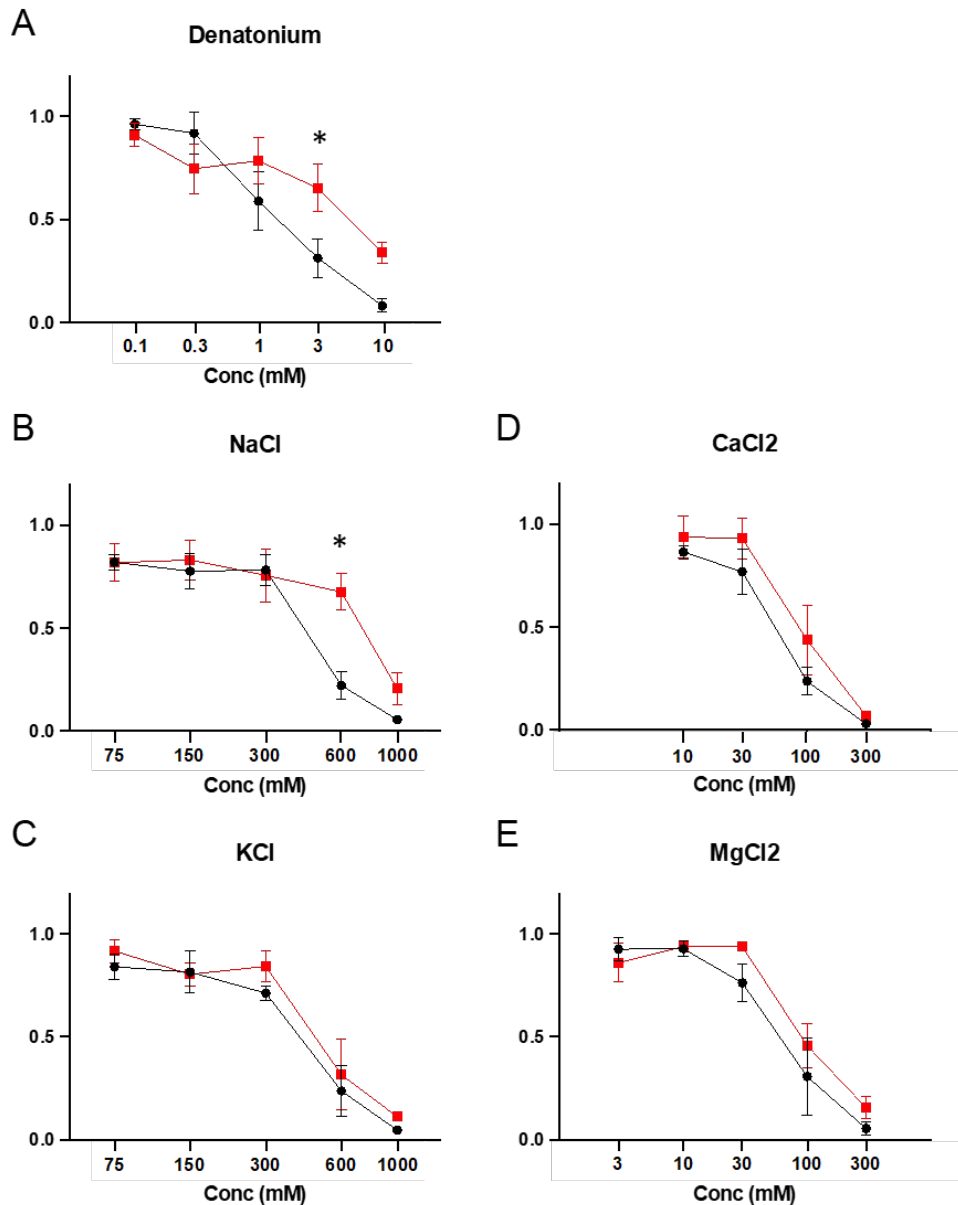
**Fig. 1** Constructs of Eya1-flox mouse

Eya1-flox mice carrying two loxP sequences inserted across exon 10 of the Eya1 gene were used for analysis. Sequences were cut using the CRISPR/Cas9 system and loxP sequences were inserted. In homozygous mice for knock-in alleles, recombination between the two loxP sequences by Cre recombinase results in the truncation of exon 10 and a frameshift in the subsequent sequence, resulting in the loss of functional Eya1 protein, thus creating tissue-specific Eya1 gene-deficient mice. Blue squares indicate exons of the Eya1 gene and yellow triangles indicate loxP sequences.



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

Gene expression was examined in the circumvallate papilla of control mice (top) and Eya1 conditional knockout (cKO) mice (bottom). The frequency of Tas2r gene signals was apparently reduced in Eya1 cKO mice compared to control mice, while the frequency of Tas1r3 signals was increased in Eya1 cKO mice compared to control mice. Trpm5 signals were not significantly different between control and Eya1 cKO mice. A mixture of Tas2r104, Tasr105, Tas2r118, and Tas2r126 probes was used for Tas2r genes.



**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 Eya1 cKO (red) mice); \* P < 0.05.

#### 4. 考察

本研究では、味蕾中の一部の味細胞(苦味および高濃度の塩味の受容に関与)および未分化の細胞に発現する Eya1 遺伝子の機能を明らかにするために、味蕾特異的な Eya1 欠損マウスを作製・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していることを見出した。また、行動学的な解析を行ったところ、苦味に対する応答がコントロールマウスに比べ減少していることを見出した。さらに、苦味細胞が高濃度の塩の受容に関

与することから、Eya1 欠損マウスを用いて、塩味に対する行動を解析し、Eya1 遺伝子と塩味応答との関連を調べた。

##### 4.1 味細胞分化における Eya1 の機能

Eya1 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>。Eya1 が Skn-1a 系譜の味細胞(甘味, うま味, 苦味, 低濃度の塩味を受容する味細胞)の一部において分化段階の比較的早い時期から発現すること、また、Skn-1a 欠損マウスにおいて Eya1 の発現が消失することから、Eya1 は、Skn-1a 系譜の味細胞の分化に関与

していることが推測されたが、その機能に関しては不明であった。そこで、味蕾特異的に *Eyal* を欠損するマウスを作製し、解析したところ、味蕾において、苦味受容体である *Tas2r* 遺伝子の発現頻度が大きく減少していた。一方、甘味・うま味受容体 *Tas1r3* 遺伝子の発現頻度が増大していた。苦味受容体 *Tas2r* 遺伝子の発現が減少したことで、以下の2つの可能性が考えられる。一つは、苦味受容体の発現制御に関与すること、もう一つは、苦味細胞自体の発生・分化に関与することである。*Tas1r3* 遺伝子の発現頻度が増大していたこと、および、甘味、うま味、苦味細胞に発現する *Trpm5* 遺伝子の発現頻度はコントロールマウスと同程度であったことから、*Eyal* cKO マウスの味蕾では、苦味細胞が大きく減少し、代わりに甘味、うま味細胞が増加していると考えられる。この可能性は二重 *in situ* hybridization による解析や味蕾を構成する細胞を計数することにより確かめる必要があるが、*Eyal* は苦味細胞(つまり苦味および高濃度の塩味を受容する細胞)の発生・分化に関与すると考えられる。

#### 4.2 塩味受容における苦味細胞の関与

味蕾中の苦味および高濃度の塩味を受容する細胞が大きく減少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 マウスでは高濃度(3 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に比べ有意に大きかった。これは、*Eyal* cKO マウスの味蕾における苦味細胞が減少しているためであると考えられる。一方、さらに高濃度(10 mM)のデナトニウムに対するリック数は、*Eyal* cKO マウスでも減少しており、コントロールマウスに比べ有意な差はなかった。これは、*Eyal* cKO マウスは高濃度の苦味を忌避することを示しているが、*Eyal* cKO マウスの味蕾において、*Tas2r* 遺伝子を発現する味細胞(苦味細胞)が少数ではあるが観察され(Fig. 1)、苦味細胞が残存しているためであると考えられる。これらの残存した味細胞は組換えが起こらなかった幹細胞由来の細胞であるのか、あるいは、予想外に長期にわたって生存する味細胞であるのかを明らかにする必要がある。高濃度(600 mM)の塩化ナトリウムに対するリック数は、コントロールマウスに比べ *Eyal* cKO マウスで有意に大きかった。この結果は、コントロールマウスは600 mMの塩化ナトリウムに対する忌避を示すのに対し、*Eyal* cKO マウスは600 mMの塩化ナトリウム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)が減少しているためであると考えられる。一方、より高濃度(1000 mM)の塩化ナトリウムに対しては、*Eyal* cKO マウスはコントロールマウスと同様に忌避を示した。これは、苦味細胞が残存していること、および、苦味細胞以外の細胞(おそらく酸味細胞)が存在しているため、高濃度の塩化ナトリウムの受容に関与し、忌避していると考えられる。低濃度の塩化ナトリウム(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、*Eyal* 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。他の塩(塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム)に関しては、コントロールマウスと *Eyal* cKO マウスでも忌避の様子に差は見られなかった。これは、これらの塩の受容に苦味細胞があまり関与していない、酸味細胞の関与が大きいなどが考えられるが、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

*Skn-1a* は、前駆細胞から甘味、旨味、苦味、塩味細胞への分化に必要であることが示されていたが、これらの *Skn-1a* 系譜の味細胞の細分化機構は不明であった。本研究では、*Skn-1a* 系譜の味細胞の一種である苦味および高濃度の塩味の受容細胞に発現する転写因子 *Eyal* の機能を解析することにより、*Eyal* がこれらの味受容細胞の分化に関与することが示唆された。一方で、いくつか検討すべき課題もある。上述したように、*Eyal* cKO マウスの味蕾を構成する細胞を計数することにより、甘味・うま味細胞と苦味細胞(つまり苦味および高濃度の塩味を受容する細胞)の発生・分化における *Eyal* の関与を明らかにする必要がある。また、*Eyal* cKO マウスの味蕾において、*Tas2r* 遺伝子を発現する味細胞(苦味細胞)は組換えが起こらなかった幹細胞由来の細胞であるのか、あるいは、予想外に長期にわたって生存する味細胞であるのかを明らかにすることは今後の課題の一つである。また、*Eyal* cKO マウスにおいて観察された高濃度の塩化ナトリウムに対する忌避は、酸味細胞によるものであると考えられるが、これには酸味細胞が存在しないマウスなどを用いて解析することにより明らかにしていきたい。このためには、味蕾が消失したマウスを用いることも有効な手段の一つであると考えられる<sup>(10)</sup>。また、このようなマウスは他の塩の

受容機構を解析する上で有用であると考えられる。今後の解析により、高濃度の塩の受容機構の解明につながる事が期待される。

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共同で転写を制御し、苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生や分化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、本研究で作製した Eya1 cKO は非常に有用である。つまり、Eya1 cKO およびコントロールマウスの味蕾のトランスクリプトーム解析を行うことにより、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することが可能になると考えられる。このような解析を行うことにより、苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生や分化に関する分子機構を明らかにすることを目指したい。

## 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.

## Molecular Mechanisms Underlying Differentiation of High Salt Taste Cells

Makoto Ohmoto

Department of Nutrition, Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare

### Summary

The sense of taste occurs when chemical substances in food are detected by taste cells in the taste buds located in the epithelium of the oral cavity. The five basic tastes that humans can recognize are sweet, umami, bitter, salty, and sour. Sweet, umami, bitter, and sour tastes are each detected by different taste cells. It has been shown that salty tastes have two different detection pathways (low-concentration sodium taste and high-concentration salt taste), and that the former is detected by different taste cells from those that detect sweet, umami, bitter, and sour tastes, while the latter is detected by bitter and sour taste cells. Regarding the molecular mechanism underlying the generation of diverse taste cell types, the transcription factor *Skn-1a* (*Pou2f3*) plays a crucial role. *Skn-1a* is expressed in sweet, umami, and bitter taste cells, as well as in taste cells responsible for detecting low concentrations of sodium tastes. It has been previously demonstrated that *Skn-1a* is essential for the development and differentiation of these specific taste cells. In this study, we hypothesized that *Eya1*, a transcription factor specifically expressed in bitter taste cells responsible for detecting bitter substances and high concentrations of salt, plays a role in the differentiation of these taste cells. Thus, our aim was to test this hypothesis.

To investigate the function of *Eya1* in taste buds, we generated conditional knock-out mice lacking the *Eya1* gene specifically in taste buds. This was achieved by crossing a knock-in mouse line expressing CreERT2, a drug-inducible Cre recombinase, in taste bud stem cells (*Krt5-CreERT2*), with an *Eya1*-flox mouse line. The expression of taste-related genes in the taste buds of the circumvallate papilla of *Eya1* cKO mice showed that the signal frequency of bitter taste receptors was greatly reduced compared to that of control mice. On the other hand, the signal frequency of sweet and umami taste receptors was increased in *Eya1* cKO mice compared to control mice. Furthermore, preference tests conducted on *Eya1* cKO mice revealed a decrease in aversive behavior towards the bitter substance denatonium and high concentrations of sodium chloride, as compared to control mice. Based on these results, it can be inferred that *Eya1* plays a role in the differentiation of taste cells responsible for detecting bitter tastes and high concentrations of salty tastes.