

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 293 号		学位申請者	友成 博
審査委員	主査	松口 徹也 教授	学位	博士 (歯学)
	副査	宮脇 正一 教授	副査	佐藤 友昭 教授
	副査	小松澤 均 教授	副査	八木 孝和 講師

主査および副査の5名は、平成26年6月10日、学位申請者友成 博君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 単一味細胞あたりの味覚受容体の密度が、神経応答の特性に起因すると考察していますが、その仮説を証明する方法はどのようなことが考えられますか。

回答 1) ラットとマウスの単離した苦味応答細胞と甘味応答細胞を用いて単細胞 RT-PCR 法により、単一細胞あたりの苦味受容体もしくは甘味受容体の mRNA の発現量を定量的に解析することで証明できると考えています。

質問 2) これまでの報告で、応答特性は受容体の密度に起因することを証明した報告はありますか。

回答 2) 神経のシナプス後膜電位の振幅は終末からの伝達物質放出量とシナプス後細胞の伝達物質受容体密度に依存することが報告されています。

質問 3) 神経応答の大きさと味覚受容体の発現パターンについて、統計解析は必要ないでしょうか。

回答 3) 各個体で神経応答と組織解析の対応関係を定量的評価する方法を検討すれば、統計的な有意差を検定できると考えます。

質問 4) ラットとマウスにおける種間の味覚応答特性の差について、生物学的意義はどう考えていますか。

回答 4) 生物は系統発生や進化の過程で、味覚感受性やその支配遺伝子が長い年月をかけた営みの中で、食環境に適応すべく変容を遂げてきたものと考えています。また、本研究で認められた種間の差は、人種間や個人間の遺伝的背景にある味覚受容体発現の差が、食習慣の嗜好に関連していることを示唆しており、種間の味覚受容メカニズムの解明に意義のある知見が得られたと考えています。

質問 5) リガンドが受容体に結合してからの味覚受容メカニズムについて、その伝達の経路について再度説明してください。

回答 5) II型細胞は甘味、苦味、うま味を細胞膜に存在する G タンパク質共役型受容体である味覚受容体により受容します。活性化した味覚受容体は G タンパク質の  $\gamma$ 、 $\beta$  サブユニットを介して PLC $\beta$ 2 を活性化し、IP $_3$  を産生して小胞体の IP $_3$  受容チャンネル (IP $_3$ R3) から Ca $^{2+}$  の放出を誘導し、細胞における Ca $^{2+}$  濃度を上昇させます。つぎに、この Ca $^{2+}$  濃度の上昇が細胞膜に存在する TRPM5 チャンネルを活性化し脱分極をひき起こし、活動電位発生の引き金となります。

質問 6) 味覚受容体の発現解析は、タンパク質レベルで解析する必要はありませんか。mRNA の発現だけで味覚受容体の発現を判断してよいのでしょうか。

回答 6) 本件研究で用いた RNA プローブは、特異的に甘味、苦味受容体に反応することが過去の報告で示されています。また、発現細胞のシグナル解析では、細胞の形が明瞭な味細胞のみにカウントし、異なる評価者でも数値に相違がないことも確認しました。よって、今回は mRNA の検出で十分信頼できる発現解析ができると判断しました。

質問 7) 甘味受容体のリガンドの認識の機構について、スクロースやスクロース以外の代用甘味料などは受容体の同じ部位に結合するのでしょうか？また、その応答特性に甘味物質間で違いはないのでしょうか。

回答 7) 哺乳類では様々な甘味物質をほぼすべて Tas1r2/Tas1r3 ヘテロダイマーで受容しており、この受容体には甘味物質が結合する複数の部位が存在することが明らかとなっています。

## 最終試験の結果の要旨

質問 8) 苦みの受容体はマウスとラットは 35 種類程度存在するとのことですが、甘味に比べ多くの苦み物質を受容するというのでしょうか。

回答 8) 苦味受容体は甘味受容体と異なり、特定の苦味物質に対して親和性の高い苦味受容体が報告されています。マウス mTas2r5 とラット rTas2r9 はシクロヘキサミド、ヒト hTas2r4 はデナトニウム、hTas2r38 は PTC と PROP などの特異的に受容するが明らかになっています。

質問 9) 味覚の情報伝達において、一つの味蕾の中で多くの甘味、苦み細胞が存在しているようですがその応答は甘味、苦味など情報をどのように識別して伝達しているのでしょうか。

回答 9) 味の識別機構については、味覚受容体の発現解析から、甘味受容体と苦味受容体は同じ細胞で共発現せず、基本的には別々の甘味/苦味応答細胞が存在していることが明らかになっています。また、単一神経応答解析から、一つの神経は苦味刺激、または、甘味刺激で最も多数のインパルスを発生する線維に分類されることも報告されています。よって、味細胞と神経線維は、特定の味質を伝えると考えられます。

質問 10) 掲載論文に示された CT 応答解析結果は今回の発表には含まれてない理由はなんのでしょうか。

回答 10) CT 応答解析については、応答特性が phasic 応答と tonic 応答で一定の傾向が認められず、閾値も差がありませんでした。また、CT 応答は gustducin ノックアウトにより苦味応答は抑制されないため、受容体発現解析結果と比較できません。よって、発表内容を明確にするため除外させていただきました。

質問 11) GSP 応答と CT 応答は中枢への投射経路は同じなのでしょうか。

回答 11) CT 神経、GSP 神経は延髄の孤束核に終止します。

質問 12) 発現解析において G タンパク質である gustducin を発現する細胞のうち、甘味/苦味受容体を共発現する細胞をカウントした理由はなんのでしょうか。

回答 12) gustducin は甘味、苦味応答細胞で特異的に発現し、gustducin ノックアウトで応答はほとんど消失します。よって、本研究では、gustducin を発現している味細胞を甘味/苦味に応答する機能的な細胞と判断しました。

質問 13) 苦味応答と甘味応答の積分応答波形の解析において、塩味である NaCl を種間の基準とした理由を教えてください。

回答 13) 甘味、苦味を受容する II 型細胞とは全く別の経路で味覚情報は伝達されることが示されています。また、NaCl 応答は、繰り返し刺激や時間経過による影響が少なく、極めて安定した積分応答波形が得られることから、神経応答解析の相対的な基準として広く用いられていますので、本研究においても、NaCl を基準として苦味と甘味応答の相対的な応答値を算出しました。

質問 14) ラットとマウスの苦味受容体 35 種類のうち、発現解析で用いる Tas2rs 受容体の RNA プローブはどのように選別したのでしょうか。

回答 14) 本研究では、マウスは 22 種類、ラットは 4 種類の Tas2rs 受容体の RNA プローブをミックスして発現解析を行いました。これらのプローブは、ラットとマウスの苦味受容体を特異的に検出することが報告されています。

質問 15) 味覚受容体の発現量の差は *in situ* hybridization 法のプローブの濃度などを検討してシグナルの強度で定量評価はできないのでしょうか。

回答 15) 発現量の定量評価には、各 RNA プローブの検出感度を甘味と苦味受容体の間、また、マウスとラットの種間で検討し、受容体の発現量とプローブの濃度や反応時間を検討することが必要と考えられます。今後の検討課題にしたいと思います。

質問 16) 味覚応答特性は各細胞に存在する受容体の密度に起因すると考察されているですが、ラットとマウスの間で、味覚情報のシグナル伝達の差が神経応答に影響している可能性は考えませんか。

回答 16) 種間の味覚情報シグナル伝達の効率に差がある可能性は十分考えられると思います。しかし、本研究の神経応答解析の結果である、種間で認められた甘味/苦味応答の閾値の違いを考慮すると、味応答の特性は、受容体の密度に起因すると考察しました。

以上の質疑応答の結果、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。