

味覚の受容と味蕾細胞分化の分子メカニズム

三浦 裕仁

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻
生体機能制御学講座 口腔常態解析学分野

Molecular mechanisms of taste reception and taste cell differentiation

Hirohito Miura

Department of Oral physiology, Field of Functional Biology and Pharmacology,
Advanced Therapeutic Course,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

Abstract

Recently, there has been significant advance in understanding of the molecular mechanisms of taste reception. Taste receptors for sweet, umami and bitter have been cloned, and studies on the ligand specificity and functional domain of the receptor have been performed by Ca^{2+} imaging in HEK293 cells in the past few years. However, the cellular basis for taste perception still remains elusive. Taste receptors are specifically expressed in the taste buds that are distributed on the tongue and soft palate. In mammals, taste buds are maintained under the continuous cell renewal and the life span of taste bud cell is estimated about 10 days. Taste buds are trophically supported by taste nerve, and denervation causes the disappearance of taste buds in about 10 days. We have investigated on the molecular basis for the taste bud maintenance and the taste cell differentiation.

In the first part of this review, recent progress in understanding the taste receptor functions is described. In the second part, the molecular mechanisms of taste bud maintenance are discussed mainly based on our recent studies.

Key words: taste receptor, taste bud, cell differentiation

I. はじめに

味覚は、口腔領域の重要な感覚であるにもかかわらず、その分子メカニズムの解明は他の感覚に比べて遅れをとっている感があった。しかし、近年、味覚受容

体をはじめ味覚の受容と情報伝達を担う分子が次々と明らかにされ、その分子機能の解明が急速に進展してきた。その一方で、味蕾を構成する細胞については、依然として不明な点が多く残されており、個体におけ

る味覚機能の理解を難しくしている。本稿では、まず、味覚受容に関与する分子機能の研究がどのように進展しているか概説し、続いて味蕾における細胞分化の研究について筆者らの解析を中心に述べる。

本論に入る前に、まず、味覚受容器である味蕾と味神経について紹介したい。味蕾は30~70個程度の細胞から成る蕾状の細胞集合体で、口腔内では舌の茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭という3つの乳頭、そして軟口蓋の上皮に分布している。各味蕾の口腔側には味孔という開口部があり、呈味物質はここから味細胞に達する。味蕾は多様な細胞から構成されているが、紡錘形で味孔に達する細胞の中に味覚の受容を担当する味細胞が含まれている。味蕾で受容した味覚情報は味神経を介して脳に伝えられるが、茸状乳頭など舌尖側の味蕾は鼓索神経、有郭乳頭など舌根側は舌咽神経、そして軟口蓋の味蕾は大錐体神経という異なる味神経に支配されている。図1は、ヒトの舌と味蕾の模式図である。有郭乳頭は、周囲に円形の溝を持つ乳頭で、この溝に数百個の味蕾が分布する。ヒトでは舌根側に7~12個程度が逆V字型に並んでいるが、マウスやラッ

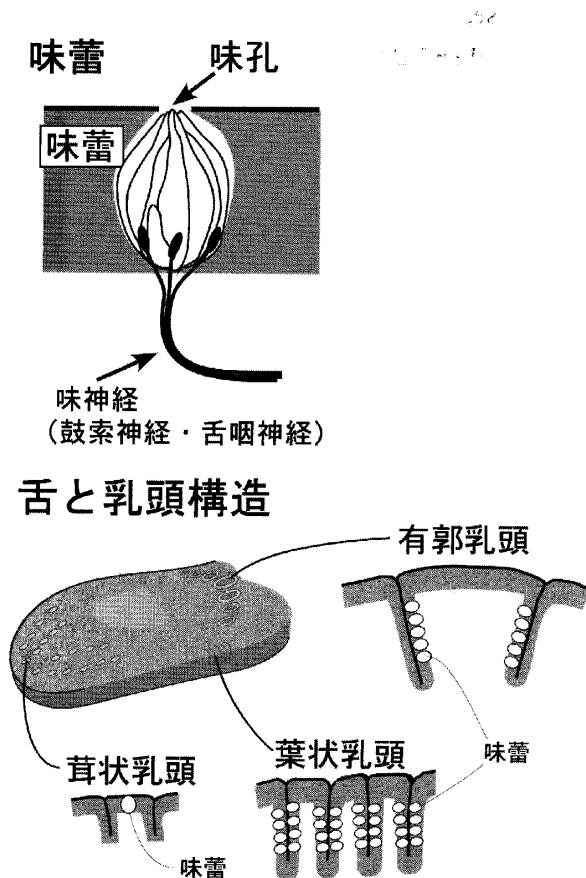


図1 ヒトの味蕾の構造と分布

トでは一つである。葉状乳頭でも味蕾は溝に分布するが、茸状乳頭ではその頭頂部に味蕾がある。ヒトの場合、1つの茸状乳頭に含まれる味蕾の数は幅があり、味蕾を持たない場合もあるが、マウスやラットではそれぞれに味蕾1個ずつが分布している。ヒトとマウス、ラットでは乳頭と味蕾の分布にこのような違いが認められるが、味蕾の構造と味覚の受容・伝達の機構は基本的に共通であると考えられており、これらの実験動物を使って分子レベルの解析が進められている。

II. 味覚受容に関与する分子：甘味・うま味・苦味受容体

A. 味覚の遺伝子研究のはじまり

生理学および生化学的な知見から甘味や苦味の受容体は細胞膜受容体タンパク質であると推測されていたが、味覚の受容機構に関する分子レベルの研究は、受容体ではなく、受容体に共役するGタンパク質のクローニングから始まった。1992年、Margolskeeら¹⁾は、いくつもの研究グループが味覚受容体のクローニングにてこずっている間に、Gタンパク質分子間で高度に保存されているアミノ酸配列に基づいて degenerate primer を作製し、味蕾に特異的に発現する新規のGタンパク質 gustducin をクローニングした。彼らは、1996年にはこの gustducin 遺伝子をノックアウト(KO)したマウスを作製して、このKOマウスでは甘味と苦味の感受性が低下することを示した。これが哺乳類において味覚感受性を支配する遺伝子を明らかにした最初の報告となった²⁾。

B. 甘味・うま味受容体

1999年には、後に甘味受容体の発見につながる T1r1 および T1r2 (当初は TR1, TR2 として報告された) という2つの新規のGタンパク質共役型受容体が Zukerらによって報告された³⁾。味蕾に特異的に発現するこれらの受容体は、相互に高い相同性を示すことから、新しい遺伝子ファミリー (T1rファミリー) に分類された。実験マウス系統には、甘味や苦味の感受性に関して系統間の差があることが知られており、遺伝学的解析によって味覚感受性に関与する幾つかの遺伝子座がマウス染色体上に明らかにされている。そこで、T1r1 と T1r2 遺伝子の機能を推測するために、すぐに染色体マッピングが行われた⁴⁾。その結果、これらの遺伝子は共に甘味の感受性を支配する第4染色体上の Sac 遺伝子座の近傍に位置しているが、Sac 遺伝子座には重ならないことが明らかになった。この結

果は、T1r1とT1r2の機能については不明のまま残すことになったが、Sac遺伝子座にT1rファミリーに属する他の受容体が存在し、甘味受容体として機能するという可能性を示していた。

そこで、筆者らはT1r1、T1r2のアミノ酸の配列情報に基づいてdegenerate primerを作製して味覚受容体の探索を行った。その結果、有郭乳頭に由来するcDNAから新規の受容体をコードする遺伝子のクローニングに成功した。この遺伝子は、味蕾を含む組織に特異的に発現しており(図2)、T1r1、T1r2と高い相同性を持つことからT1r3と命名した。さらに、染色体マッピングの結果、T1r3がSac遺伝子座に位置することが明らかになった(図3)。また、Sac遺伝子座に変異を持つサッカリン低感受性マウス系統(BALB/c, 129 Svj, DBA/2)のT1r3には、サッカリン高感受性マウス(C57BL/6)に対して、共通するアミノ酸置換(Thr55Ala, Ile60Thr, Pro61Leu, Arg371Glu, Ile706Thr)が認められた。筆者らは、これらの結果に基づき2001年にT1r3を甘味受容体候補分子として報告した⁵⁾。これは哺乳類の甘味受容体の最初の報告となったが、甘味受容体のクローニング競争は激しく、この年には筆者らの他に世界で5つのグループがT1r3について報告した。その中には、Margolis⁶⁾とZuker⁷⁾のグループだけでなく嗅覚受容体に関する研究で2004年にノーベル生理学医学賞を受賞したBuck⁸⁾のグループも含まれていたが、他のグループの殆どはSac遺伝子座の領域に対応するゲノムデータベースを検索することによって、T1r3を発見していた^{9,10)}。

特に、Zukerら⁷⁾のグループは、この受容体の機能解析において先行しており、サッカリン低感受性マウス(129Sv)に高感受性マウス(C57BL/6)のT1r3遺伝子を導入したトランスジェニック(Tg)マウスを作製した。このTgマウスで甘味感受性が高感受性マウスとほぼ同じ程度まで回復することから、T1r3が甘味受容体であることが機能的に証明された。また、培養細胞HEK293に強制発現させて味覚応答を測定すると、T1r3を単独で発現させても甘味応答を示さないが、T1r2と組み合わせて発現させた時には甘味応答が見られることを見だし、T1r3がT1r2とヘテロダイマーを形成して甘味受容体として機能することを明らかにした。この甘味受容体は糖だけでなく、甘味を呈するD体のアミノ酸や甘味タンパク質など様々な甘味物質に幅広く応答することも明らかになった。さらに、興味深いことに、T1r3はT1r1とヘテロダイマーを形成すると甘味アミノ酸以外の多くのアミノ酸に対する味覚受容体として機能することも明らかにされた¹¹⁾。また、T1r3とT1r1のヘテロダイマーはマウスやラットの場合には様々なアミノ酸に対して応答するのに対して、ヒト場合にはうま味物質であるL-グルタミン酸に選択的に応答するうま味受容体として機能していることも明らかにされた¹²⁾。これらの

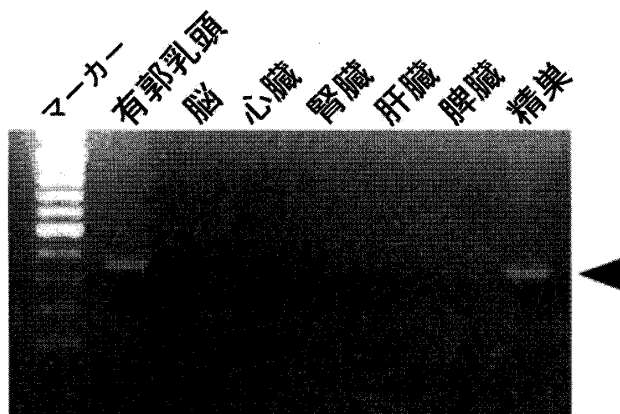


図2 T1r3遺伝子の発現 (RT-PCR)

成体マウスの各組織からmRNAを抽出し、RT-PCRを行った。矢じりはT1r3のバンドを示す。T1r3は、精巣での発現が検出されるものの、味蕾を含む組織に特異的に発現している。(Kitagawa et al., 2001⁵⁾から)

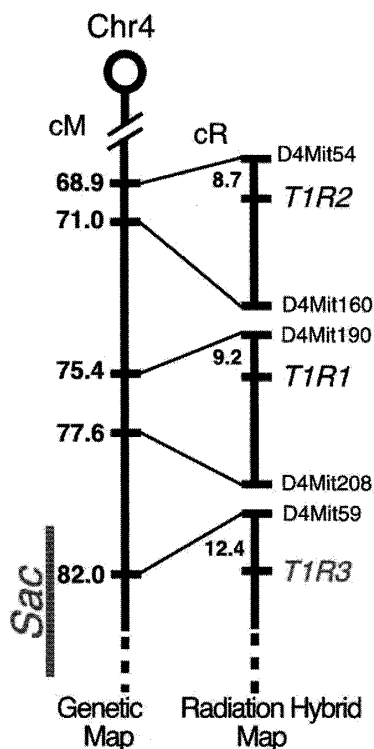


図3 T1r3遺伝子のマウス染色体マッピング (Kitagawa et al., 2001⁵⁾ら)

研究により、甘味とうま味およびアミノ酸の味覚受容体の分子の実体が解明された。最近では、様々な変異を導入した T1r 受容体を HEK293 細胞で発現させて味覚応答を解析することにより、呈味物質の結合や機能調節に関与する部位の探索が行われている^{13, 14, 15)}。これらの解析結果は、新規の甘味物質やうま味物質の分子設計やスクリーニングに利用することができることから、産業的な意義も大きい。

C. 苦味受容体

一方、T1r3 のクローニングよりもわずかに早く、2000年に Zuker ら^{16, 17)}によって苦味受容体もクローニングされた。苦味受容体も遺伝子ファミリーを形成しており T2r と命名されたが、3つの分子からなる T1r ファミリーよりもファミリーのメンバーはかなり多く、ヒトでは40~80個と推測された。HEK293 細胞での強制発現による機能解析から、それぞれの T2r 受容体はごく限られた苦味物質だけを認識する受容体として機能することが示されている。その一方で、*in situ hybridization* による発現解析の結果は、複数の T2r 受容体が特定の味細胞に共発現していることを示しており、これらの結果は T2r を発現する味細胞が様々な苦味物質に応答できる可能性を示していた。しかし、ラットの味細胞に Ca^{2+} 濃度指示薬を取り込ませて Ca^{2+} イメージングにより苦味物質に対する応答を解析した結果は、特定の味細胞はごく限られた苦味物質にだけ応答することを示していた¹⁸⁾。T2r 遺伝子発現からの予想と Ca^{2+} イメージングの結果の矛盾の理由として、複数の T2r 受容体の mRNA が合成されても特定の受容体タンパク質しか合成されないといった翻訳レベルの調節が存在する可能性が予想されるが、その詳細については、まだ、全く明らかにされていない。

III. 味蕾における細胞分化の研究

A. 序

ヒトを含むほ乳類では、味覚受容器である味蕾を構成する細胞は平均して約10日の周期で新しい細胞に置き換わっており、味蕾の構造は細胞の増殖・分化と細胞死がバランスを保って進行することにより維持されている。前節で述べた味覚受容体はこの味蕾における細胞分化の過程で発現する。味神経は味蕾で受容される味覚情報を脳に伝えているが、味蕾の維持にも重要で、味神経を切断すると約10日で味蕾の構造が消失する。近年、味覚障害の増加が問題となっているが、味蕾の異常がその代表的な原因の一つと考えられ

ており、味蕾における細胞分化の解明は重要な課題である。しかし、味覚受容機構の解明が急速に進む一方で、味蕾における細胞のターンオーバーの分子メカニズムには不明な点が多い。また、味蕾には、細胞間の情報伝達¹⁹⁾や生理的調節^{20, 21)}によって味覚感受性を調節する機能があることが示唆されているが、その解析も遅れている。この点からも、味蕾の細胞分化の解明が必要であると考えられる。そこで、筆者らは味蕾における細胞分化の分子メカニズムの研究を進めてきた。

筆者らが研究を開始した時点では、味蕾の維持や細胞分化に関与する分子は、殆ど解析が進んでおらず、味蕾から分泌される BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor: 脳由来神経栄養因子) が味神経で発現する BDNF の受容体 *trkB* (Neurotrophin Receptor Tyrosine Kinase B: 受容体型チロシンリン酸化酵素 B) に作用して、味神経の生存を維持していることが知られているだけであった。BDNF 遺伝子をノックアウト(KO)すると、味蕾から BDNF が分泌されないために、味神経が生存できなくなる。その結果、味神経の支持を失った味蕾は消失する²²⁾。しかし、1) 味蕾における細胞の増殖および細胞分化に関与する分子、2) 味神経から味蕾に作用する味蕾の維持因子については全く不明であった。

B. Shh シグナル系

筆者らは、まず、細胞の増殖と分化の調節という観点から味蕾の維持機構の解析を進めて、Sonic hedgehog (Shh) が成体マウスの味蕾の基底部に発現していることを見いだした(図4)²³⁾。Shh は進化的に高度に保存されている分泌性のタンパク質因子で、動物の個体発生において、神経細胞分化や肢芽の形態形成をはじめとして様々な細胞の増殖と分化の調節に重要な

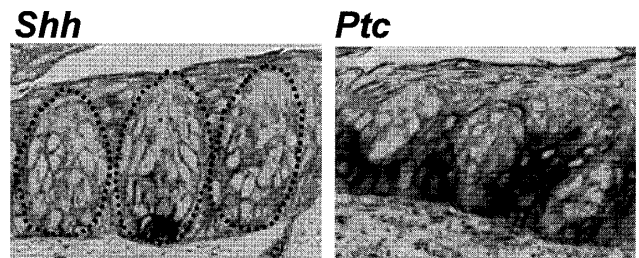


図4 成体マウスの有郭乳頭の味蕾における Shh と Ptc の発現

各遺伝子の発現を *in situ hybridization* により検出した。点線は味蕾の輪郭を示す。

(Miura et al., 2001²³⁾から)

役割を果たしていることが知られている。Shh の受容体である Patched1 (Ptc) は、Shh によって発現が誘導されることから、その発現は Shh シグナルが作用していることを示すと考えられており、実際、胚発生では Shh 発現領域の殆ど全てで、Shh を囲むように Ptc の発現が観察される²⁴⁾。味蕾基底部の周囲の上皮にも、この Ptc の発現が検出され、さらに Shh シグナル系の下流で発現する Zn フィンガー因子である Gli1 の発現も認められることから、この領域で Shh シグナルが作用していることが強く示唆された²⁵⁾。

味蕾に細胞を供給する味蕾前駆細胞については殆ど明らかではないが、味蕾の中には増殖する細胞は見られず、味蕾の周囲および味蕾の基底部付近に増殖する細胞が分布していることから、それらの増殖細胞の中に味蕾の前駆細胞が含まれていると考えられている^{26, 27)}。Ptc および Gli1 を発現する領域は、細胞増殖が活発で味蕾の前駆細胞を含むと考えられている領域と重なっており、BrdU を腹腔に投与して増殖細胞をラベルすると、BrdU 投与後 1 時間では BrdU シグナルは Ptc 発現細胞を中心に検出された。これは Shh シグナルが味蕾の前駆細胞の増殖に関与する可能性を示していると考えられる。そこで、味神経を切断して、Shh と Ptc の発現の変化を解析した。味神経切断によって味蕾が消失する過程では、まず、味蕾前駆細胞の増

殖が止まり味蕾への細胞供給が停止すると考えられるが、Shh と Ptc の発現は味神経の切断によって味蕾の消失に先行して失われた²³⁾。この結果は、Shh シグナルが味蕾前駆細胞の増殖に関与している可能性を支持していると考えられる。

C. 味蕾で発現する転写因子

味蕾は、周囲の細胞と同様に上皮性の細胞であるが、細胞分化の過程で興奮性や神経伝達性など神経細胞様の性質を獲得する。そのため、味蕾の細胞分化にも神経分化に関与する分子が何らかの役割を果たすことが予想される。そこで、神経細胞の分化に関与する様々な転写因子について味蕾における発現の解析を行った。その結果、神経細胞分化の初期段階に重要な bHLH 転写因子である Mash1 が味蕾の一部の細胞で発現することを見いだした (図 5)²⁸⁾。二重蛍光 in situ hybridization で解析したところ、味蕾における Mash1 の発現は、味覚受容体および甘味と苦味の情報伝達を担う G タンパク質 gustducin の発現とは重ならなかった。さらに、マウスの有郭乳頭の味蕾が形成される過程を解析したところ、Mash1 が味覚受容に関与する遺伝子よりも先に発現し始めることが明らかになった (図 6)。これらの結果は、Mash1 が味細胞の分化において、味覚受容体や G タンパク質を発現する前の分化段階で

Mash1

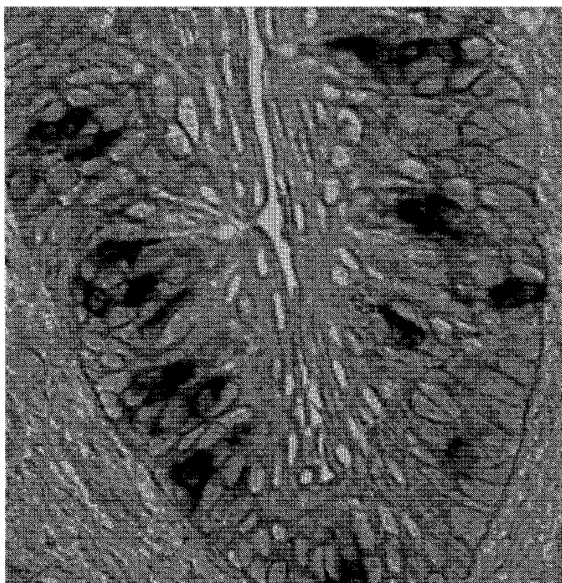


図 5 成体マウスの有郭乳頭の味蕾における Mash1 の発現

Mash1 の発現を in situ hybridization により検出した。
(Miura et al., 2003³¹⁾ から)

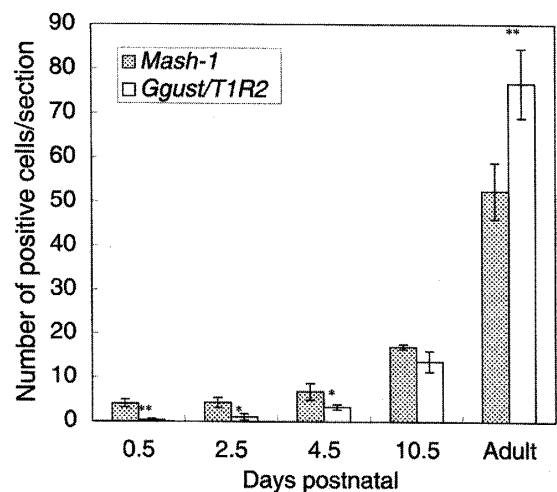


図 6 マウス有郭乳頭の生後の味蕾形成過程における転写因子 Mash 1, と味覚受容関連遺伝子 (gustducin (Ggust), T1r2) を発現する細胞数の経時変化

in situ hybridization で遺伝子発現を検出し、各遺伝子を発現する細胞数を計数して解析した。味覚受容関連遺伝子を発現する細胞は、gustducin と T1r2 の混合プローブを用いて検出した。

(Kusakabe et al., 2002²⁸⁾ から)

一過性に発現している可能性を示している。一方、鈴木ら²⁹⁾は免疫組織化学解析によって、嗅上皮の神経細胞分化において Mash1 に続いて発現する bHLH 転写因子である NeuroD が味蕾で発現しており、その発現の一部が gustducin 発現細胞に見られることを報告した。これらの結果は、味蕾の細胞分化に、bHLH 転写因子が段階的に発現する神経細胞分化の分子メカニズム³⁰⁾が関与している可能性を支持している。

また、筆者らは味蕾で Mash1 を発現する細胞に Nkx 2.2 が発現することを見いだした。Nkx2.2 は、神経管の腹側の床板から分泌される Shh によって発現が誘導されるホメオボックス転写因子で、腹側神経の分化に重要な役割を持つ。味蕾内に見られるこの Nkx 2.2 の発現は、Shh シグナルが細胞の増殖ばかりでなく、味細胞の分化にまで影響している可能性を示している³¹⁾。

D. 味蕾の細胞系譜

味蕾における転写因子の解析は、Mash1 を発現する未分化な細胞が味覚受容体を発現する味細胞へと分化する可能性を示していた。そこで、増殖中の細胞に BrdU を取り込ませて、BrdU シグナルの局在を経時的に追跡することにより、味蕾における Mash1、gustducin および T1r3 の各遺伝子を発現する細胞の分

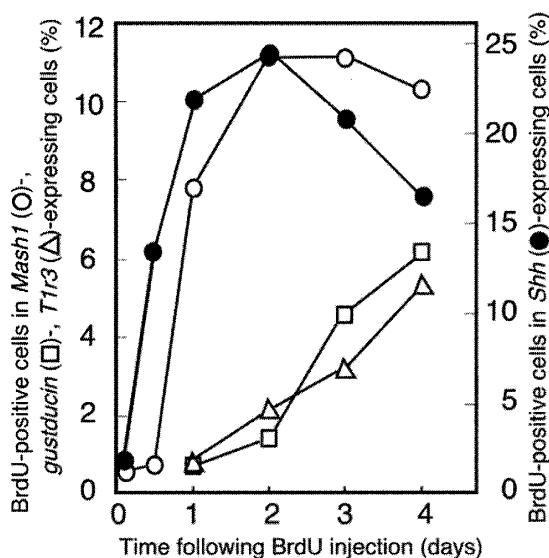


図7 成体マウスの有郭乳頭で Shh, Mash1, gustducin および T1r3 を発現する細胞のうち BrdU シグナルを含む細胞の割合の経時変化

BrdU を腹腔に投与し、BrdU 免疫染色と各遺伝子の in situ hybridization との二重蛍光検出を行って解析した。

(Miura et al., 2005³²⁾から)

化がどのような順序で行われているか解析した (図7)。その結果、Mash1 を発現する細胞では、BrdU 投与後1日目に BrdU が顕著に検出され、2日目にはピークに達して、その後4日目までは BrdU 陽性細胞が高い割合で維持された。それに対して、gustducin や T1r3 を発現する細胞では Mash1 発現細胞に遅れて、投与後2日から BrdU が検出されはじめ、投与後4日まで BrdU 陽性細胞の割合が徐々に増加した³²⁾。この BrdU が取り込まれる順序は、Mash1 や Nkx2.2 などの転写因子を発現する細胞から味覚受容体を発現する細胞が分化する可能性を支持していた。ただし、Mash1 発現細胞の中には、味覚受容体を発現する細胞とはならず Mash1 を発現し続ける細胞が存在すると考えられる。なぜなら、もし、Mash1 発現細胞の全てが味覚受容体を発現する細胞となるのであれば、BrdU シグナルが味覚受容体を発現する細胞に顕著に増加する段階では、それに対応して Mash1 発現細胞中の BrdU 陽性細胞の割合が減少すると期待されるが、そのような変化が観察されなかったからである。一方、前述のように BrdU 投与直後には BrdU は Ptc 発現細胞を中心に検出されるものの、それに続いて、味蕾基底部分で Shh を発現する細胞で一過性に BrdU のシグナルが検出されることが明らかになった。これは、Shh を発現する味蕾基底細胞が味蕾の前駆細胞の増殖や細胞分化のシグナルセンターとしての機能を持つばかりでなく、それ自身が味蕾の未分化な細胞としての性質を有することを示唆している。

Mash1 や味覚受容体などの発現と BrdU の取り込みの解析から味蕾の細胞分化における細胞系譜の手がかりが得られる一方で、電子顕微鏡で観察される形態的特徴から I, II, III型細胞および基底細胞 (IV型) の4種類に分類されている味蕾細胞の細胞分化における相互関係については、不明なまま残されていた。免疫電顕による解析からは、gustducin³³⁾やその他の味覚受容に関連する遺伝子³⁴⁾はII型細胞で発現するとされている。また、I型細胞はグルタミン酸トランスポーター GLAST³⁵⁾を発現するなどグリア細胞様の性質を持つと考えられている。一方、III型細胞には、神経細胞接着分子 NCAM が発現するとされていた。

そこで、Mash1 発現細胞の細胞種の解析を行った³²⁾。Mash1 の発現が gustducin と重ならないこと、また、Mash1 はグリアではなくニューロンの分化に関与する転写因子であることから、Mash1 発現細胞はIII型細胞である可能性が高い。そこで、まず、Mash1 発現細胞における NCAM の発現解析を行った。Mash1 in situ

hybridization と NCAM 免疫染色を組み合わせるマウスの有郭乳頭の味蕾の解析を行った結果、Mash1 を発現する細胞の98%が NCAM 陽性であることが明らかになった。この結果は、Mash1 発現細胞がⅢ型細胞であることを示すと考えられた。しかし、興味深いことに、Ⅱ型細胞に発現すると考えられている味覚受容体 T1r3 や G タンパク質 gustducin を発現する細胞のそれぞれ約10%にも、Ⅲ型細胞のマーカーとされる NCAM の発現が検出された。ここで、この NCAM の発現が細胞分化の過程で Mash1 を発現する段階から続いていると仮定すれば、gustducin や T1r3 を発現する細胞のうち NCAM を発現しているのは、分化したばかりの若い細胞であり、味細胞の成熟過程で NCAM の発現が減少すると考えられる。そこで、有郭乳頭の味蕾の形成過程について解析を行った (図8)。その結果、味蕾の形成が開始した直後の生後0.5日では gustducin および T1r3 を発現する細胞の約90%が NCAM 陽性であり、味蕾の成熟に従って NCAM 陽性細胞の割合が減少していくことが明らかになった。この味蕾成熟過程における NCAM 陽性細胞の割合の変化もまた、Mash1 発現細胞から T1r3 や gustducin を発

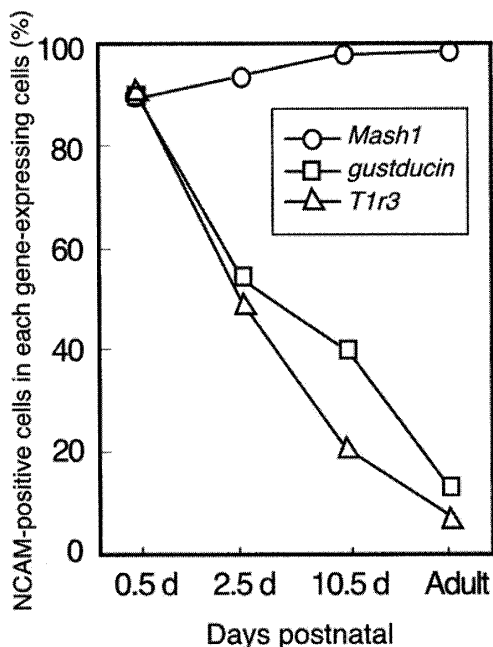


図8 マウス有郭乳頭の味蕾形成過程における Mash1, gustducin および T1r3 発現細胞に占める NCAM 陽性細胞の割合の変化

生後0.5日から10.5日、および成体マウスの有郭乳頭について、NCAM 免疫染色と各遺伝子の in situ hybridization との二重蛍光検出を行って解析した。

(Miura et al., 2005³²⁾から)

現する細胞が分化するという仮説を支持していた。一方、これまで、gustducin 発現細胞では NCAM の発現は報告されておらず、筆者らの解析結果はそれらの報告とは異なっていた。この相違は、解析した手法と動物種の違いによると思われる。これまでの味蕾における NCAM の発現解析はラットを中心とする免疫染色で行われていたのに対して、筆者らはマウスを用いて各分子の in situ hybridization と NCAM 免疫染色を組み合わせる解析を進めた。免疫染色ではなく in situ hybridization で gustducin を検出したために、gustducin の発現を細胞分化のより早い段階で検出しており、gustducin 発現細胞に Mash1 発現細胞の分化段階から続く NCAM の発現が残っていた可能性がある。あるいは、マウスとラットでは、味細胞分化における NCAM の発現のタイミングに差があることも考えられる。

これまでの電子顕微鏡観察では、味蕾を構成する細胞のうちⅢ型細胞にだけシナプスが認められ、Ⅱ型細胞にはシナプスがないとされている。筆者らの NCAM の解析結果からは、Mash1 を発現する細胞はⅢ型細胞を中心とした細胞集団であり、gustducin や T1r3 を発現するⅡ型細胞は Mash1 発現細胞から分化すると推測される。その一方で、シナプスを持つⅢ型細胞からシナプスを持たないⅡ型細胞が分化するとは考えにくい。おそらく、Mash1 発現細胞の一部の細胞集団がⅡ型細胞に分化し、別の細胞集団は Mash1 および NCAM を発現し続けて、いわゆるⅢ型の形態を持つ細胞となるのではないかと考えられる。先に述べた BrdU の取り込みの解析からもこの可能性が支持されている。

E. 味蕾における遺伝子発現の味神経依存性

先に、味神経切断による味蕾の消失に先駆けて Shh と Ptc の発現が失われることを述べた。しかし、味蕾内の味覚受容体や転写因子の発現の味神経への依存性については、不明のままであった。そこで、味蕾における各遺伝子発現の味神経依存性を明らかにするために、味神経を切断して生じる遺伝子発現の変化についてより詳細な解析を行った (図9)³⁶⁾。その結果、まず、味蕾基底部分で発現する Shh の発現は、神経切断後約6時間で消失し、極めて強く味神経に依存していることが明らかになった。また、味蕾周囲で発現する Ptc の発現は、Shh に続いて神経切断後12時間までに消失し、Shh シグナルの枯渇の結果として Ptc の発現が消失することを示していた。その一方で、味蕾の中で発現する味覚受容体や gustducin などの味覚受容関

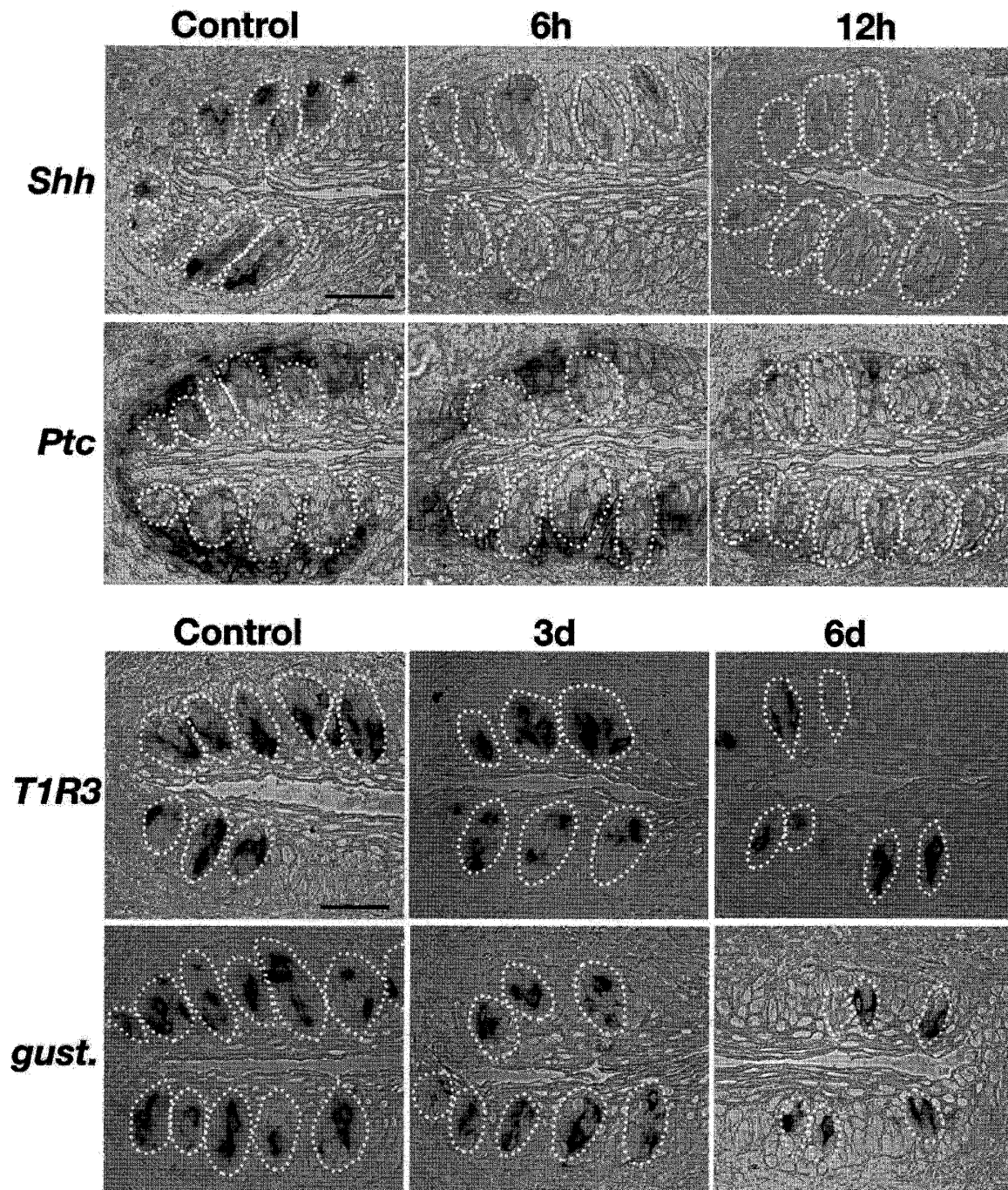


図9 舌咽神経切断後のマウス有郭乳頭の味蕾における *Shh*, *Ptc*, *T1r3*, *gustducin* の発現の経時変化

各遺伝子の発現を *in situ hybridization* により検出した。点線は味蕾の輪郭を示す。スケールバーは50 μ m を示す。

(Miura et al., 2004³⁶⁾ から)

連分子や *Mash1* や *Nkx 2.2* など未分化な味蕾細胞で発現すると予想される転写因子の発現は、神経切断後も切断前とほぼ同様の強度で検出され、味神経には殆ど依存していないことが明らかになった。味蕾の消失にともないこれらの遺伝子を発現する細胞の数は減少したが、神経切断後8日でもこれらを強く発現する細胞が観察された。また、各遺伝子を発現する細胞数の減少の過程には、遺伝子間で殆ど差がなく、すべてが同調的に減少した(図10)。各転写因子を発現する細胞から味覚受容体を発現する味細胞が分化しており、神経切断後もその分化過程が進行しているのであれば、神経切断後には、転写因子を発現する細胞が先に減少すると予想していたが、そのような現象は見られなかった。この結果は、味神経の切断によって味細胞の分化の進行が停止すること、また、味神経は味蕾内の各細胞の生存維持に重要であることを示していると考えられる。味神経による味蕾の細胞分化の誘導については未だ不明であるが、筆者らは味蕾における味覚受容に関連する分子の発現パターンが茸状乳頭と有郭乳頭で

異なっていることを見いだしている³⁷⁾。茸状乳頭は鼓索神経、有郭乳頭は舌咽神経とそれぞれ異なる味神経に支配されていることから、味蕾におけるこの遺伝子発現パターンの差は味神経からの誘導による可能性がある。しかし、舌における位置情報として味蕾の細胞分化パターンがあらかじめ決められている可能性もあり、味神経による味蕾の細胞分化の誘導については今後のさらなる解析が必要である。

IV. 終わりに

これまでご紹介したように、味覚受容および情報伝達に関与する分子の機能解析が急速に進んでいる一方で、味蕾の細胞分化の分子メカニズムには未だ不明な点が多い。筆者らは、発生過程や神経切断後の味蕾における遺伝子発現の変化に着目して、味蕾の細胞分化に関与する分子の解析を進めてきたが、各分子の味蕾の細胞分化における機能の実証的解析には至っていない。今後は、培養系や遺伝子組換え動物などをも利用することによって、味蕾の細胞分化の分子メカニズムを解析し、生体における味覚機能の解明に貢献したいと考えている。

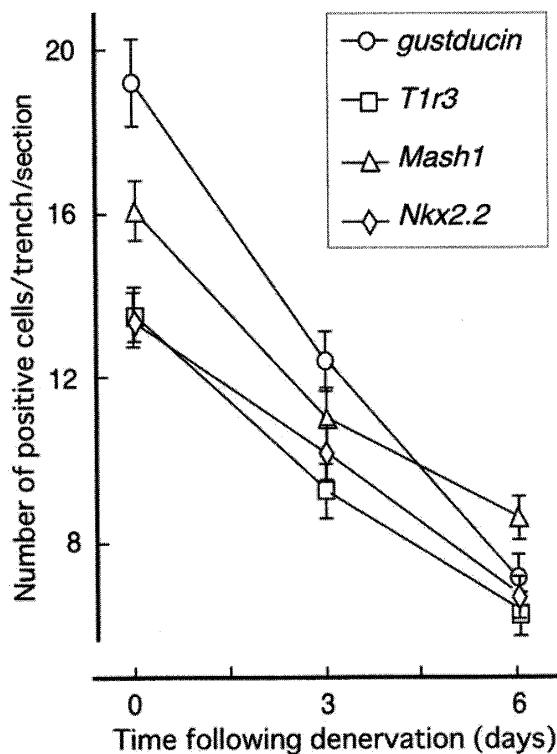


図10 舌咽神経切断後のマウス有郭乳頭の味蕾における遺伝子発現の変化

in situ hybridization により遺伝子発現を検出し(図9)、各遺伝子を発現する細胞数を計数した。

(Miura et al., 2004³⁶⁾から)

参考文献

- 1) McLaughlin, S. K., McKinnon, P. J. and Margolskee, R. F.: Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducin. *Nature*, 357, 563-569, 1992
- 2) Wong, G. T., Gannon, K. S. and Margolskee, R. F.: Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, 381, 796-800, 1996
- 3) Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J. and Zuker, C. S.: Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, 96, 541-551, 1999
- 4) Li, X., Inoue, M., Reed, D. R., Huque, T., Puchalski, R. B., Tordoff, M. G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G. K. and Bachmanov, A. A.: High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (*Sac*) and the putative sweet taste receptor (*T1R1*) gene (*Gpr70*) to mouse distal chromosome 4. *Mamm. Genome*, 12, 13-16, 2001
- 5) Kitagawa, M., Kusakabe, Y., Miura, H., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun., 283, 236-242, 2001
- 6) Max, M., Shanker, Y. G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. and Margolskee, R. F.: *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat. Genet.*, 28, 58-63, 2001
 - 7) Nelson, G., Hoon., M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. and Zuker, C. S.: Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106, 381-390, 2001
 - 8) Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H. and Buck, L. B.: A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.*, 4, 492-498, 2001
 - 9) Sainz, E., Korley, J. N., Battey, J. F. and Sullivan, S. L.: Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J Neurochem*, 77, 896-903, 2001
 - 10) Bachmanov, A. A., Li, X., Reed., D. R., Ohmen., J. D., Li., S., Chen, Z., Tordoff, M. G., de Jong, P. J., Wu, C., West, D. B., Chatterjee., A., Ross, D. A. and Beauchamp, G. K.: Positional cloning of the mouse saccharin preference (*Sac*) locus. *Chem. Senses*, 26, 925-933, 2001
 - 11) Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba., N. J. and Zuker, C. S.: An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416, 199-202, 2002
 - 12) Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E.: Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 4692-4696, 2002
 - 13) Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E., Zoller, M and Li, X.: Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 14258-14263, 2004
 - 14) Jiang, P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M.J., Margolskee, R. F. and Max, M.: The Cysteine-Rich Region of T1R3 Determines Responses to Intensely Sweet Protein. *J. Biol. Chem.*, 279, 45068-45075, 2004
 - 15) Jiang P, Cui M, Zhao B, Liu Z, Snyder LA, Benard LM, Osman R, Margolskee RF, Max M.: Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T1R3 to inhibit sweet taste. *J. Biol. Chem.*, 280, 15238-15246, 2005
 - 16) Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. P. and Zuker, C. S.: Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, 100, 693-702, 2000
 - 17) Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng L., Guo, W., Zuker, C. S. and Ryba, N. J. P.: T2rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell*, 100, 703-711, 2000
 - 18) Caicedo, A. and Roper, S. D.: Taste Receptor Cells That Discriminate Between Bitter Stimuli. *Science*, 291, 1557-1760, 2001
 - 19) Herness S, Zhao FL, Lu SG, Kaya N, Shen T.: Expression and physiological actions of cholecystokinin in rat taste receptor cells. *J. Neurosci.*, 22, 10018-10029, 2002
 - 20) Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura., H. and Ninomiya, Y.: Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97: 11044-11049, 2000
 - 21) Shigemura, N., Ohta, R., Kusakabe, Y., Miura, H., Hino, A., Koyano, K., Nakashima, K., and Ninomiya, Y.: Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology*. 145: 839-847, 2004
 - 22) Nosrat, C. A., Blomlof, J., ElShamy, W. M., Ernfors, P. and Olson, L.: Lingual deficits in BDNF and NT3 mutant mice leading to gustatory and somatosensory disturbances, respectively. *Development* 124, 1333-1342, 1997
 - 23) Miura, H., Kusakabe, Y., Sugiyama, C., Kawamatsu, M., Ninomiya, Y., Motoyama, J. and Hino, A.: *Shh* and *Ptc* are associated with taste bud maintenance in the adult mouse. *Mech. Dev.*, 106, 143-145, 2001
 - 24) Goodrich, L. V., Johnson, R. L., Milenkovic, L., McMahon, J. A. and Scott, M. P.: Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice -induction of a mouse patched gene by hedgehog. *Genes Dev.*, 10, 301-312, 1996
 - 25) Miura, H., Kato, H., Kusakabe, Y., Tamami, M., Miura-Ohnuma, J., Ookura, T., Shindo, Y., Ninomiya, Y. and Hino, A.: *Shh* signaling and regulatory gene expression in the mouse taste buds. *Chem. Senses*, 30, i50-i51, 2005
 - 26) Beidler, L. M. and Smallman, R. L.: Renewal of cells within taste buds. *J. Cell. Biol.*, 27, 263-272, 1965
 - 27) Delay, R. J., Kinnamon, J. C. and Roper, S. D.: Ultrastructure of mouse vallate taste buds: II. Cell types and cell lineage. *J. Comp. Neurol.* 253, 242-252,

- 1986
- 28) Kusakabe, Y., Miura, H., Hashimoto, R., Sugiyama, C., Ninomiya, Y. and Hino, A.: The neural differentiation gene Mash-1 has a distinct pattern of expression from the taste reception-related genes gustducin and T1R2 in the taste buds. *Chem. Senses*, 27, 445-451, 2002
- 29) Suzuki, Y., Takeda, M. and Obara, N.: Expression of NeuroD in the mouse taste buds. *Cell. Tissue. Res.*, 307, 423-428, 2002
- 30) Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F.: Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development*, 124, 1611-1621, 1997
- 31) Miura, H., Kusakabe, Y., Kato, H., Miura-Ohnuma, J., Tagami, M., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Co-expression pattern of Shh with Prox1 and that of Nkx2.2 with Mash1 in mouse taste bud. *Gene. Expr. Patterns.*, 3, 427-430, 2003
- 32) Miura, H., Kato, H., Kusakabe, Y., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Temporal changes in NCAM-immunoreactivity during taste cell differentiation and cell lineage relationships in taste buds. *Chem. Senses*, 30, 367-375, 2005
- 33) Yang, R. B., Tabata, S., Crowley, H. H., Margolskee, R. F. and Kinnamon, J. C.: Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 425, 139-151, 2000
- 34) Clapp, T. R., Yang, R., Stoick, C., Kinnamon, S. C. and Kinnamon, J. C.: Morphologic Characterization of Rat Taste Receptor Cells That Express Components of the Phospholipase C Signaling Pathway *J. Comp. Neurol.*, 468, 311-321, 2004
- 35) Lawton, D. M., Furness, D. N., Lindemann, B. and Hackney, C. M.: Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 3163-3171, 2000
- 36) Miura, H., Kato, H., Kusakabe, Y., Tagami, M., Miura-Ohnuma, J., Ninomiya, Y. and Hino, A.: A strong nerve dependence of Sonic hedgehog expression in basal cells in mouse taste bud and an autonomous transcriptional control of genes in differentiated taste cells. *Chem. Senses*, 29, 823-831, 2004
- 37) Kim, M. -R., Kusakabe, Y., Miura, H., Shindo, Y., Ninomiya, Y. and Hino, A.: Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 500-506, 2003