

味蕾細胞種特異的な化学感覚刺激応答の定量的可視化法の開発

加 塩 麻 紀 子

京都府立医科大学細胞生理研究部門 助教

緒 言

食べ物の味は栄養素・毒素の知覚を通じて生存に、さらに食の愉楽を通じて生活の質にも重要な役割を果たす。現代の食品開発において、我々が食品の「味」を如何に受容し識別するかを科学的に理解することは、味覚として感じる食品の「味」を自在にコントロールするための重要課題の1つである。現在までにT1Rs・T2Rsをはじめとする味細胞に発現する味受容体遺伝子が同定され、さらに5基本味（甘・苦・塩・酸・旨味）が味蕾でそれぞれ異なる細胞種により受容されるといった末梢味覚の分子・細胞基盤の理解が飛躍的に向上してきた。しかし、受容体不明の味覚受容機構（例えばグルコースポリマー Polycose®の甘味）・味認識のチューニングを担う味細胞内の味覚情報処理機構・味細胞間の複数味覚の統合機構についての解明が遅滞しており、現在の末梢味覚研究の重要課題である。本研究では、これらの課題に取り組むための新しい技術的基盤の開発と、これによる塩味の受容・処理・統合機構の体系的解析を提案する。

Na⁺は細胞外液の主要陽イオンとして体液量調節に必須の物質である。Na⁺摂取量制御のため、塩味受容機構の解明は特に先進国で深刻な高血圧の予防など社会的希求がある。実際、我が国で高血圧患者は4,000万人と推定され、脳心血管障害に深く関与しており、食塩過剰摂取が高血圧の誘因であることはよく知られている。ENaCaのKOマウス解析によりENaCが塩味受容に必須であることがわかったが¹⁾、ENaC発現味細胞の塩味情報処理機構は全く不明のままである。

本研究は、蛍光Ca²⁺バイオセンサー GCaMP3を用いた味細胞の細胞種特異的味刺激応答記録法の確立と、その応用による塩味受容・処理・統合機構の体系的解析を目的とした。

実験方法

ENaCa発現細胞に蛍光Ca²⁺バイオセンサー GCaMP3を発現する遺伝子改変マウスの作出

ENaCaプロモータ制御下でCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニック (Tg) マウス (ENaCa-Cre Tgマウス)¹⁾と、Creリコンビナーゼ活性によりGCaMP3を発現するAi38マウス²⁾の交配により、ENaCa発現細胞特異的にGCaMP3を発現するマウス (ENaCa-GCaMP3マウス)の作出を行った。

ENaCa-GCaMP3マウスの味蕾におけるGCaMP3発現細胞種の確認

ENaCa-GCaMP3マウス (5週齢以上)を麻酔下で灌流固定後、茸状乳頭および有郭乳頭を含む舌上皮組織を採取し、薄切切片を作製した。得られた組織切片の免疫組織染色により、GCaMP3発現細胞種を検討した。GCaMP3の発現は抗GFP抗体、II型味細胞の同定は抗PLCβ2抗体、III型味細胞の同定は抗AADC抗体を用いることで、各味細胞種におけるGCaMP3発現を検討した。

ENaCa-GCaMP3マウスの茸状乳頭味蕾におけるGCaMP3シグナルのライブセルイメージング

ENaCa-GCaMP3マウス (6~10週齢)の舌組織から、茸状乳頭を含む舌上皮を酵素処理により単離し、共焦点レーザー顕微鏡観察下に酸味刺激 (50 mMクエン酸)を行い、GCaMP3の蛍光輝度変化を記録した。

結 果

ENaCa発現味細胞に蛍光Ca²⁺バイオセンサー GCaMP3を発現する遺伝子改変マウスの作出

ENaCa-Cre Tgマウス¹⁾と、Ai38マウス²⁾(図1)を交配し、ENaCa-GCaMP3マウスの作出を行った(図2)。交配にはENaCa-Cre Tgマウス(ヘテロ接合体)とAi38マウス(ホモ接合体)を用いた。Ai38マウスについては、ホモ接合体の外見上の目立った異常はなく、生

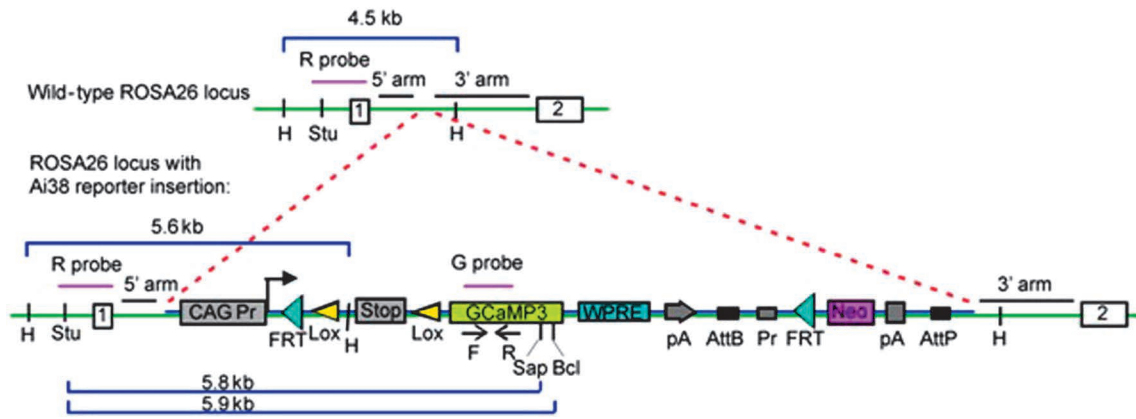


図1 GCaMP3レポーターマウス (*Ai38*) の *Rosa26* 遺伝子座

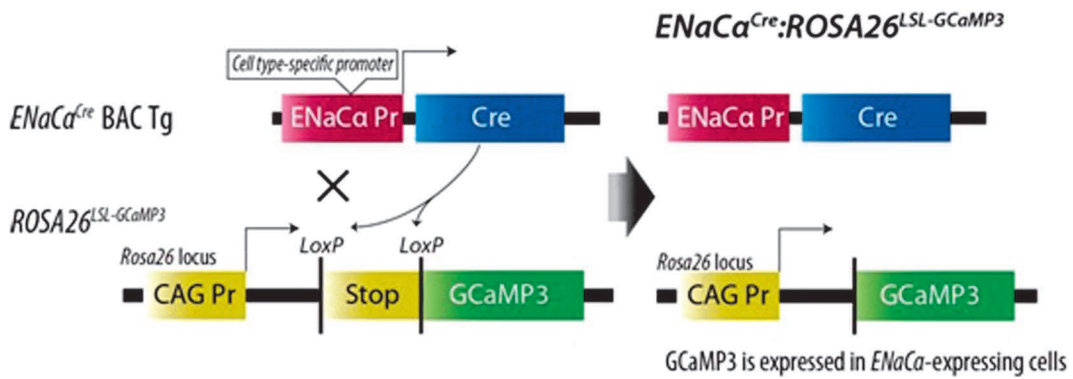


図2 *ENaCa-GCaMP3* マウス作出の概要

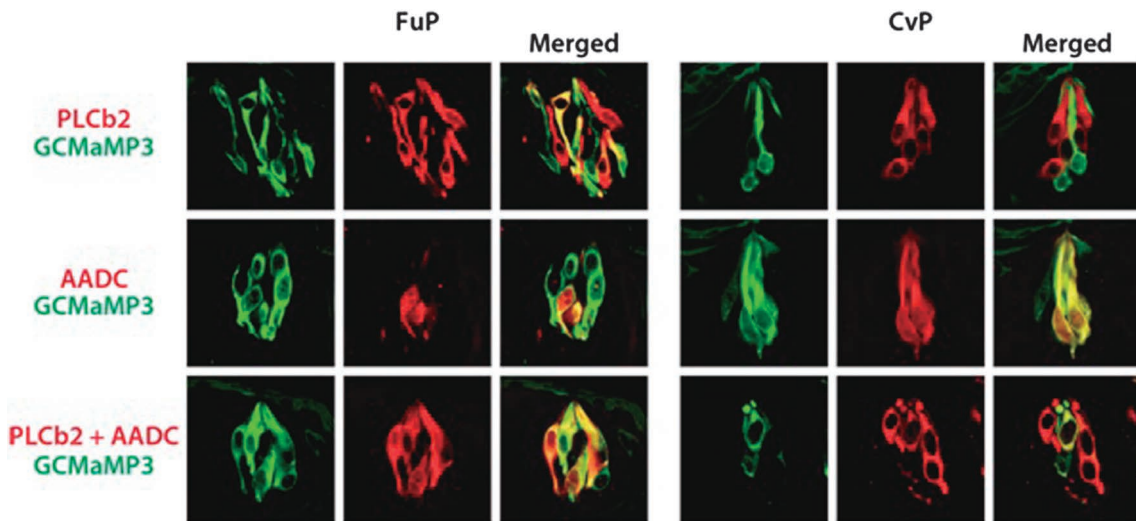


図3 *ENaCa-GCaMP3* マウスの茸状乳頭 (FuP) および有郭乳頭 (CvP) における GCaMP3 の発現
 PLCβ2 (II型味細胞マーカー)、AADC (III型味細胞マーカー) と GCaMP3 の共局在を示す。

殖機能も正常であったため、ホモ接合体としてコロニーを維持できることがわかった。上記交配によって生まれた仔のジェノタイピングによって *ENaCa-GCaMP3* マウスの選別を行った。*ENaCa-GCaMP3* マウスは発達お

よび外見上の目立った異常を認めなかった。

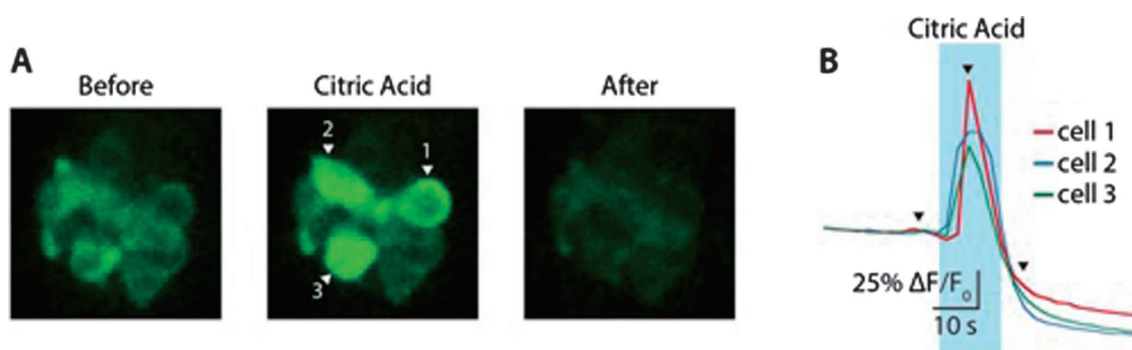


図4 *ENaCa-GCaMP3*マウス茸状乳頭味蕾における酸刺激 (50 mM クエン酸) に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答

(A) クエン酸処置前 (Before)、処置時 (Citric acid) および washout 後 (After) の茸状乳頭味細胞における GCaMP3 蛍光輝度変化を示す。(B) (A) に示した味細胞 (cell 1~3) それぞれの蛍光輝度の Baseline (F_0) からの変化率 ($\Delta F/F_0$)。

*ENaCa-GCaMP3*マウス味蕾における GCaMP3 発現細胞種の確認

図3に示すように、茸状乳頭・有郭乳頭とも AADC 発現細胞のほとんどに GCaMP3 の発現が確認された。一方 PLC β 2 発現細胞については、有郭乳頭の PLC β 2 発現細胞には GCaMP3 発現がほとんど認められないが、茸状乳頭の PLC β 2 発現細胞のおよそ半数が GCaMP3 を発現していた。さらに茸状乳頭および有郭乳頭において AADC・PLC β 2 非発現細胞への GCaMP3 の発現もわずかに確認された。アミロイド感受性塩味受容は茸状乳頭を介すると考えられていることから、茸状乳頭の II 型細胞の約半数、III 型細胞のほぼ全て、および非 II/III 型細胞の少数がアミロイド感受性塩味受容細胞の候補と考えられた。

*ENaCa-GCaMP3*マウスの茸状乳頭味蕾における $[Ca^{2+}]_i$ 応答記録

図3で示した通り、GCaMP3 は酸味受容細胞でもある III 型細胞にも発現することから、まずは電位依存性 Ca^{2+} チャネルを発現しカルシウム応答が大きいと予想された III 型細胞の酸味応答記録を塩味刺激に先んじて行い、測定系の稼働性を確認した。図4に示すように、酸味刺激であるクエン酸の処置に応答して GCaMP3 発現細胞中の一部で、蛍光輝度が 50~100% 一過性に増大する $[Ca^{2+}]_i$ 応答を観察した。この結果から、GCaMP3 は味細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 応答記録に適用可能であることが確認できた。一方で、酸味刺激の後に GCaMP3 の蛍光輝度は基線以下に減少したが、これは酸味刺激に伴う細胞内の酸性化によって GCaMP3 の蛍光が褪色したことに起因すると考えられ、酸味に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答記録への GCaMP3 適用上の注意すべき点と考えられた。

考 察

得られた *ENaCa-GCaMP3* マウスの味蕾において酸味刺激に対する味細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 応答が確認でき、本システムは味刺激応答記録に適用可能であることが確認できた。さらに、茸状乳頭の II 型細胞の約半数、III 型細胞のほぼ全て、および非 II/III 型細胞の少数で GCaMP3 発現が確認され、これらの細胞群にアミロイド感受性塩味受容に関わる味細胞が含まれると考えられた。今後はこれらの細胞群に注目した塩味応答記録を行うことで、塩味情報処理機構の解明に迫れるものと期待する。さらには、全味細胞あるいは味細胞種特異的に GCaMP3 を発現させることで塩味以外の味質の応答記録へと本システムの応用範囲を拡大し、種々の味覚研究が可能となると期待する。塩味刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答記録には、酸味応答と比較して高い感度での測定系が求められると予測され、GCaMP3 で感度不十分である場合には現在最高感度を誇る GCaMP6f を GCaMP3 に替わって使用することでより高感度な記録ができると考え、現在システムのアップデートを進行中である。

要 約

塩味受容に必須の分子である *ENaCa* を発現する味細胞に、選択的に蛍光 Ca^{2+} バイオセンサー GCaMP3 を発現する遺伝子改変マウスを作出した。得られたマウスの味蕾を用いた免疫組織学解析により各味細胞種への GCaMP3 発現を検討した結果、茸状乳頭の II 型細胞の約半数、III 型細胞のほぼ全て、および非 II/III 型細胞の少数に GCaMP3 が発現しており、これら細胞群にアミロイド感受性塩味受容に関わる味細胞が含まれると考えられた。さらに *ENaCa-GCaMP3* マウス茸状乳頭から単離した味蕾を用いて、酸味刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 応答を

記録することに成功した。本システムを適用することで、今後さらに塩味情報受容機構の解析が可能となると期待される。

謝 辞

援助いただきました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に、深く感謝致します。*ENaCa-Cre Tg*マウスはColumbia大学Charles Zuker教授より供与

いただいたものであり、本研究は京都府立医科大学細胞生理学の樽野陽幸講師、孫紅昕博士、丸中良典教授と共同で行ったもので、この場を借りて皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) J. Chandrashekar, et al.: *Nature*, **464**, 297–301, 2010.
- 2) H. A. Zariwala, et al.: *J. Neurosci.*, **32**, 3131–3141, 2012.