

化学感覚刺激応答を観察・定量化する遺伝子改変マウスの作製

松本 一朗

モネル化学感覚研究所 Research Associate
(現 Assistant Member)

緒言

味覚は食品の属性として最も重要な三大機能の一つである感覚機能の主要因であり、食物の味をどのように受容、認知、識別するのかわかることは、食品科学的に非常に重要である。近年の分子遺伝学的研究により味覚受容機構に関する理解が大きく進み、様々な味覚受容体が同定されたほか、味覚識別の第一段階は味覚ごとに異なる受容細胞を活性化することであることが明らかとなった^{1,2)}。しかし、既知の味覚受容体だけでは説明出来ない事象も報告されている。例えば、甘味旨味受容体 T1R3 の遺伝子破壊マウス（ノックアウトマウス）は甘味物質や旨味物質に対する応答が著しく減少するものの、完全には消失しない³⁾。特に、複合多糖類の受容は T1R3 とは全く異なる受容機構である⁴⁾。このように、既知味覚受容体を用いた解析のみでは味覚受容機構の詳細・全容を知ることが困難であるというのが現状である。

新たに味覚受容体の探索を行い網羅的に味覚受容体を同定することは、以降の研究への直接的な解決策のひとつである。しかし、受容体が異なる複数の呈味物質に対して、異なる受容体を介して呈味物質を受容する一つの味細胞がどのように活性化されるのかを明らかにするためには、個別の受容分子を対象とした解析より、それらを共発現する細胞自体を対象とする方が適している。本申請研究では、既知の分子知見を利用し、食品成分の呈味性を *in vivo* および *ex vivo* で定量的に観察・計測する実験系の構築を目指した。

方法、結果、および考察

T1R3 発現細胞の活性化は細胞内カルシウム濃度の上昇で検出することが可能である^{5,6)}。したがって、細胞内カルシウム濃度の上昇を高感度で検出し得る組み換えタンパク質 G-CaMP2 をレポータータンパク質として選択した。G-CaMP2 は GFP をベースに作製された人

為的なカルシウム結合タンパク質 G-CaMP の改良型であり、カルシウム結合依存的に GFP 蛍光を発するだけでなく、G-CaMP2 発現細胞を活性化しない状態においても弱い GFP の蛍光を観察することが可能である^{7,8)}。最も重要な改良点は、G-CaMP とは異なり、37 °C で活性化型の構造が安定であるため、哺乳類での解析が可能となった点である^{7,8)}。

G-CaMP2 を甘味旨味細胞特異的に発現させるため、T1R3 遺伝子プロモーター／エンハンサーを用い、トランスジーン t1r3-GCaMP2 を作製した。トランスジーン断片をマウス前核期受精卵に注入し、仮親マウスの卵管へと胚移植を行い、得られた産仔の尾部から抽出した DNA を用いて PCR を行い、トランスジーンの有無を解析した。トランスジーン導入が確認されたファウンダーマウスは C57BL/6J と交配させ、産仔のジェノタイプピングを行った。これまでにトランスジェニックマウス系統を 3 系統確立した。

トランスジェニック個体が十分に得られた #19 系統の成体マウスを深麻酔下で還流固定後、有郭乳頭を含む組織塊を摘出し、包埋剤を用いて凍結ブロックを作製した。クライオスタットを用いて凍結切片を作製し、抗 GFP 抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、GFP に対するシグナルが味蕾の一部の細胞で観察された。G-CaMP2 を発現するトランスジェニックマウスが得られたことが明らかとなった。

次に、G-CaMP2 の発現が T1R3 発現細胞に観察されるかどうかを調べるため、抗 GFP 抗体および抗 T1R3 抗体を用いて蛍光免疫二重染色を行った。その結果、GFP のシグナルは T1R3 のシグナルと一切重ならず、t1r3-GCaMP2 #19 系統が G-CaMP2 を異所的に発現するトランスジェニックマウスであることが判明した。

トランスジェニック動物を作製する場合には、細胞種特異的発現を誘導するプロモーター／エンハンサーを用

いた場合でも、今回のような異所的発現が観察されることは珍しくない。T1R3 promoter/enhancer を用いて我々がこれまでに作製したトランスジェニックマウスでは、レポータータンパク質の発現は T1R3 発現細胞限定的に観察されている⁹⁾。#19 系統には、トランスジェンが挿入された場所による位置効果など、トランスジェニック動物作製に際して研究遂行者が制御出来ない影響が現れたと考えられる。

#19 系統以外の 2 系統は現在繁殖中である。十分な数のトランスジェニック個体得られた時、上述と同様の解析を行う。T1R3 発現細胞特異的に G-CaMP2 を発現する系統が得られることを期待している。

要 約

食品成分の呈味性を *in vivo* および *ex vivo* で定量的に観察・計測するため、甘味旨味受容体遺伝子 T1R3 の遺伝子発現制御領域を用いて、細胞内カルシウム濃度依存的に GFP 蛍光を呈する組み換えタンパク質 G-CaMP2 を発現するトランスジェニックマウスの作製を試みた。現時点では、目的としたマウスは得られていない。未だ解析していない繁殖中の系統に期待したい。

謝 辞

本研究は公益財団法人三島海雲記念財団の平成 24 年度学術研究奨励金によって行われたものです。助成して

頂きました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝致します。また、貴重な G-CaMP2 レポーターをご供与下さいました理化学研究所脳科学総合研究センター研究員／埼玉大学総合研究機構脳科学融合研究センター教授中井淳一博士に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Matsumoto I, Ohmoto M, and Abe K, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 24, 210-214 (2013).
- 2) Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP, and Zuker CS, *Nature*, 444, 288-294 (2006).
- 3) Damak S, Rong M, Yatsumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, and Margolskee RF, *Science*, 301, 850-853 (2003).
- 4) Treesukosol Y, Smith KR, and Spector AC, *Physiol. Behav.*, 105, 14-26 (2011).
- 5) Maruyama Y, Pereira E, Margolskee RF, Chaudhari N, and Roper SD, *J Neurosci*, 26, 2227-2234 (2006).
- 6) Taruno A, Vingtdoux V, Ohmoto M, Ma Z, Dvoryanchikov G, Li A, Adrien L, Zhao H, Leung S, Abernethy M, Koppel J, Davies P, Civan MM, Chaudhari N, Matsumoto I, Hellekant G, Tordoff MG, Marambaud P, and Foskett JK, *Nature*, 495, 223-226 (2013).
- 7) He J, Ma L, Kim S, Nakai J, and Yu CR, *Science*, 320, 535-538 (2008).
- 8) Nakai J, Ohkura M, and Imoto K, *Nat Biotechnol*, 19, 137-141 (2001).
- 9) Ohmoto M, Matsumoto I, Yasuoka A, Yoshihara Y, and Abe K, *Mol. Cell. Neurosci.*, 38, 505-517 (2008).