

味覚情報の弁別機構とその分子基盤

宮内, 彩
Faculty of Dental Science, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/19961>

出版情報：九州大学, 2010, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

味覚情報の弁別機構とその分子基盤

宮内 彩

九州大学大学院歯学府歯学専攻

口腔顎顔面病態学講座口腔生体統御学(歯科麻酔学)分野

指導：横山 武志 教授

九州大学大学院歯学研究院

口腔顎顔面病態学講座歯科麻酔学分野

研究指導：二ノ宮 裕三 教授

九州大学大学院歯学研究院

口腔常態制御学講座口腔機能解析学分野

目次

発表論文	1
要旨	2
序論	4
第1章	
Gustducin 発現味細胞と GAD67 発現味細胞の味応答特性解析	
緒言	6
材料と方法	8
結果	12
考察	30
第2章	
Gustducin 発現味細胞、T1R3 発現味細胞および GAD67 発現味細胞の 遺伝子発現解析	
緒言	37
材料と方法	39
結果	43
考察	63
謝辞	69
参考文献	70

発表論文

本研究の一部は下記の論文に報告した。

対象論文:

Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells

Ryuske Yoshida, Aya Miyauchi, Toshiaki Yasuo, Masafumi Jotaki, Yoshihiro Murata,
Keiko Yasumatsu, Noriatsu Shigemura, Yuchio Yanagawa, Kunihiko Obata, Robert F
margolskee and Yuzo Ninomiya

J. Physiol (2009) 587(Pt 18):4425-4439

要旨

末梢の味覚受容器である味蕾は、さまざまな形態的、機能的特徴を持つ 50～100 個の味細胞から成り、これらが味覚(5 基本味:甘味、うま味、苦味、塩味、酸味)の受容に関与する。味細胞は形態的に I～IV型細胞に分類され、そのうち II型細胞は甘味、うま味、または苦味の受容体候補分子を発現し、III型細胞は酸味受容体候補分子を発現することが報告されている。よって II型およびIII型細胞は、味覚受容細胞として機能すると考えられるが、その応答特性や味覚応答に関与する分子群の発現パターンには不明な点も多い。本研究では、II型細胞が発現する *Gustducin*、III型細胞が発現する *GAD67*、甘味・うま味の受容体コンポーネントである *T1R3* を指標として、これらが発現する味細胞の応答特性と味覚応答に関与する分子群の発現パターンを明らかとすることを目的とした。

1) *Gustducin* 発現細胞が緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する遺伝子改変マウス(*Gustducin*-GFP マウス)を用い、*Gustducin*-GFP 細胞の基本味刺激に対する応答を調べたところ、これらの細胞には甘味、うま味、または苦味に対し高い応答特異性を示す 3 群が存在した。一方、*GAD67* 発現細胞が GFP を発現する遺伝子改変マウス(*GAD67*-GFP マウス)を用い、*GAD67*-GFP 細胞の基本味刺激への応答を調べたところ、酸味刺激に特異的応答を示す細胞と多種の味刺激に応答を示す細胞の 2 群が存在した。以上の結果は、*Gustducin* 発現細胞(II型細胞)は、甘味、うま味、または苦味受容細胞として、*GAD67* 発現細胞(III型細胞)は酸味受容細胞として機能し、味特異的な情報を味神経に伝え、多種の味刺激に応答を示す *GAD67* 発現細胞は、味非特異的な情報を味神経線維に伝える可能性を示唆する。

2) *Gustducin*-GFP マウスを用い茸状乳頭(FF)および有郭乳頭(CV)味蕾に存在す

る Gustducin-GFP 細胞(FF: 32 個、CV: 25 個)を採取し、Single Cell RT-PCR により 16 種の $G\alpha$ サブユニットの発現を探索すると、 $G\alpha 11$ (FF: 53%、CV: 73%)、 $G\alpha 14$ (FF: 31%、CV: 73%)、 $G\alpha i2$ (FF: 78%、CV: 96%)、 $G\alpha q$ (FF: 48%、CV: 68%)、 $G\alpha s$ (FF: 72%、CV: 96%)の発現頻度が高かった。また、T1R3-GFP 細胞が GFP を発現する遺伝子改変マウス(T1R3-GFP)を用い、T1R3-GFP 細胞(FF: 9 個、CV: 21 個)におけるこれらの $G\alpha$ の発現を探索した場合にも、発現頻度が高かった [$G\alpha$ -gust(FF: 100%、CV: 19%)、 $G\alpha 11$ (FF: 33.3%、CV: 57.1%)、 $G\alpha 14$ (FF: 11.1%、CV: 81%)、 $G\alpha i2$ (FF: 66.7%、CV: 71.4%)、 $G\alpha q$ (FF: 66.7%、CV: 81%)、 $G\alpha s$ (FF: 88.9%、CV: 85.7%)]。以上の結果は、Gustducin 以外にも $G\alpha 11$ 、 $G\alpha 14$ 、 $G\alpha i2$ 、 $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$ が甘味、うま味、苦味受容細胞における細胞内情報伝達に関与する可能性を示唆する。また、GAD67-GFP マウスから GAD67-GFP 細胞(FF: 28 個、CV: 25 個)を採取し、Single Cell RT-PCR により酸味受容体候補遺伝子(ASICs、HCNs、PKD1L3/2L1、TRPV1) の発現解析を行った結果、PKD2L1(FF: 64%、CV: 28%)、PKD1L3(FF: 0%、100%)、HCN1(FF: 71.4%、CV: 12%)、HCN4(FF: 32.0%、CV: 4%) の発現頻度が高かった。これらの分子が GAD67 発現細胞において酸味受容に関わる分子として機能する可能性を示唆する。

以上、本研究の結果から、味蕾内で II 型細胞が甘味、うま味または苦味の受容を、III 型細胞が酸味の受容を担い、これらの味覚情報の弁別に重要な役割を果たすこと、また、その受容機構には複数の受容体・細胞内情報伝達経路が関与することが示唆された。

序論

味覚は食物に含まれる化学物質を検出する役割をもち、5つの基本味(甘味、苦味、うま味、塩味、酸味)に分類される。それらの情報は味蕾内に存在する味細胞により受容され、味神経を介して中枢へと伝達される。近年の分子生物学的研究の進展により、各基本味の受容機構が明らかとなりつつあり (Lindemann et al., 2001; Chandrashkar et al., 2006; Niki et al., 2010)、甘味、苦味、うま味はGタンパク共役型受容体によって、塩味、酸味はチャンネル型受容体によって受容されると考えられる。これら受容体の味蕾内での発現パターンを調べた研究では、甘味(T1R2+T1R3)、うま味(T1R1+T1R3)、苦味(T2Rs)受容体が異なる細胞に発現すること(Nelson et al., 2001)や酸味受容体候補遺伝子(PKD1L3+PKD2L1)がT1R3やT2Rsと共発現しないこと(Ishimaru et al., 2006; Hung et al., 2006)が示されており、これは味細胞が基本味に対し特異的な応答を示す可能性を示唆する。しかし、マウス味細胞における生理学的研究では、全体の約60%の味細胞が5基本味刺激のいずれか1つに特異的に応答するものの、他の細胞は複数種の味刺激に応答することが示されており(Caicedo et al., 2002; Yoshida et al., 2006; Tomchik et al., 2007)、分子発現検索の結果とは、必ずしも一致しているわけではない。味蕾細胞は形態学的にI~IV型細胞に分類され (Murray et al., 1973)、II型細胞は甘味、うま味、または苦味の受容体を(Max et al., 2001; Miyoshi et al., 2001; Nelson et al., 2001; Zhang et al., 2003)、III型細胞は酸味受容体候補遺伝子(Kataoka et al., 2008)を発現する。これらはII型およびIII型細胞が味覚受容細胞として機能する可能性を示唆するが、II型およびIII型細胞が5基本味に対しどのような応答性を持つのかは明らかとなっていない。

また、甘味、うま味、苦味の受容に関係するG α サブユニットであるGustducin

を欠損したマウスにおいて、これら味刺激に対する神経・行動応答が完全には消失しないこと(Wong et al., 1996; He et al., 2004)から、他の $G\alpha$ サブユニットも甘味、うま味、苦味の細胞内情報伝達機構に関与する可能性が示唆される。さらに酸味の受容体候補遺伝子として ASICs(1~4、Ugawa et al; 1998, 2003)、HCN1、HCN4 (Stevens et al., 2001)、PKD1L3/PKD2L1(Huang et al., 2006; Ihshimaru et al; 2006)、TRPV1(Lyall et al., 2004; Treesukosol et al., 2007)など多数の遺伝子が挙げられているが、酸味受容細胞においてこれらの遺伝子の発現パターンは明らかとなっていない。

そこで、本研究では遺伝子改変マウスや Single Cell RT-PCR を利用し、味細胞の細胞型とその応答特性との関連について解析し (第一章)、さらに、同定味細胞における発現遺伝子を Single Cell RT-PCR により網羅的に解析した(第二章)。

第 1 章

Gustducin 発現味細胞と GAD67 発現味細胞の味応答特性解析

緒言

味覚は、5つの基本味(甘味、うま味、苦味、酸味、塩味)に分類され、味蕾に存在する味細胞はこれらの味情報を検出する役割を持つ。味細胞は形態学的に4つ(I~IV型細胞)に分類される(Murray, 1973)。I型細胞は電子顕微鏡像では暗く見えることから暗調細胞とよばれ、神経伝達物質の分解や取り込みに関与する glutamate-aspartate transporter (GLAST; Lawton et al., 2000)やnucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (ecto-ATPase; Bartel et al., 2006)を発現する。また、他の細胞型を示す細胞を包むように存在する(Pumplin et al., 1997)ことから、神経伝達物質神経系におけるグリア細胞のような特性を持つと考えられている。II型細胞は電子顕微鏡像で明るく見えることから明調細胞とよばれ、甘味(T1R2/T1R3)、うま味(T1R1/T1R3)、苦味(T2Rs)の受容体および共通の伝達分子群であるGustducin、PLC β_2 、IP $_3$ R3、TRPM5を発現することが明らかとなってきた(Clapp et al., 2001, 2004; Max et al., 2001; Perez et al., 2002; Yang et al., 2000; Zhang et al., 2003)。これらの受容体はそれぞれ異なった味細胞に発現すること(Nelson et al., 2001)が報告されており、これらの味質は別々の細胞で受容される可能性が示唆される。III型細胞は中間調細胞とよばれ、味神経線維とシナプス結合することが示されている(Murray 1971; Royer and Kinnamon, 1991; Seta and Toyoshima, 1995; Takeda and Hoshino, 1975)。また、シナプス関連遺伝子であるSNAP25(Yang et al., 2000b)や酸味候補遺伝子に挙げられるPKD2L1(Kataoka et al., 2008)を発現することから、酸味の受容・伝達に関与する可能性が示唆されている。また、PKD2L1はT1Rs、T2Rs、TRPM5、IP $_3$ R3とは共発現せず(Ishimaru et al., 2006; Hung et al., 2006)、酸

味受容味細胞は甘味、うま味、または、苦味受容味細胞とは異なった細胞群に属するものと考えられている。このように、分子生物学的研究では、個々の味細胞はそれぞれ異なった味質を受容することを示唆するが、実際にこれらの細胞が特定の味質に対してのみ応答を示すかは不明である。

一方、マウスの有郭乳頭(舌後方部)、および茸状乳頭(舌前方部)味細胞の電気生理学的研究では、多くの味細胞(60~70%)は味刺激に高い応答特異性を示すが、それ以外の細胞は複数種の味刺激に対し応答することが示されている(Caicedo et al., 2002; Yoshida et al., 2006a; Tomchik et al., 2007)。また、神経線維の味応答記録においても、味質特異的な応答を示す神経線維と、複数種の味刺激に応答する神経線維が存在する(Ninomiya et al., 1982; Ninomiya et al., 1984)。これらは一部の味細胞が複数種の味刺激に応答し、その情報を味神経線維へと伝達している可能性を示唆する。味覚受容体の発現パターンからII型、およびIII型細胞が味覚受容細胞として機能すると考えられるが、これらが味質特異的な応答を示すか、あるいはより広範な味刺激に応答を示すかは明らかとなっていない。

そこで本研究では、II型細胞に発現するGustducin(Yang et al., 2000)、III型細胞に発現するGAD67(Defazio et al., 2006)を指標として、これら発現細胞が緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する遺伝子改変マウス[Gustducin-GFPマウス(Wong et al. 1999)、GAD67-GFPマウス(Tamamaki et al. 2003)]やSingle Cell RT-PCRを利用し、Gustducin発現細胞やGAD67発現細胞を特定し、これらの5基本味刺激に対する応答特性を解析した。

材料と方法

動物

実験動物には週齢 8 週以上の C57BL/6N および Gustducin または GAD67 プロモーター制御下にて GFP が発現するよう遺伝子改変したマウス[Gustducin-GFP マウス(Wong et al., 1999)および GAD67-GFP マウス(Tamamaki et al., 2003)] を用いた。なお、マウスの取り扱いや実験は、九州大学歯学部動物実験委員会の承認を得て、日本動物保護協会のガイドラインに従って行った。

味細胞応答の記録

マウスをジエチルエーテル麻酔下で頸椎脱臼させ舌を摘出した。舌上皮下に 0.2~1mg/ml エラスターゼ(Elastin Products, Owensville, Mo: Tyrode 溶液にて溶解、mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glucose, 10 ピルビン酸ナトリウム、pH7.4)を注入し、室温にて 10~15 分間インキュベートした。その後、ピンセットで素早く舌上皮を剥離し、粘膜側を下にしてシリコンコートした培養皿にピンで止め、Tyrode 溶液で数回洗浄した。この舌上皮より茸状乳頭単一味蕾を採取し、記録チャンバーに移した。残りの茸状乳頭味蕾を含む舌上皮は次の実験を行うまで 4°C にて保存した。採取された味蕾を含んだ記録チャンバーを共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000 および Fluoview、オリンパス、東京) のステージに乗せ、顕微鏡観察下で味蕾の粘膜側(味孔)を刺激ピペットに吸引・保持した。記録チャンバー内は常に Tyrode 溶液を灌流させ、刺激ピペット内は味応答記録時を除き、Tyrode 溶液を灌流させた。共焦点レーザー顕微鏡観察下で単一味蕾中の GFP 発現細胞を同定し、基底膜側より記録電極 ($\phi 1\sim 3\mu\text{m}$ 、1.5~3.5 Ω) を当て、シール抵抗が 3~10 倍になる程度に吸引し、味応答記録を行った。味刺

激には 20mM サッカリン(Sac)、300mM グルタミン酸ナトリウム(MSG)、300mM NaCl、1~10mM HCl、20mM キニーネ(QHCl)、20mM デナトニウム(Den)、0.1mM シクロヘキシミド(CX)、10mM カフェイン、シクロオクタアセテート(SOA)を用いた。また、味刺激後は、最低でも 30 秒以上、蒸留水にて刺激ピペット内を灌流、洗浄した。これらの実験はすべて室温にて行った。

Single Cell RT-PCR

味細胞は応答記録後、Tyrode溶液を直ちにCa²⁺Mg²⁺ free Tyrode溶液(mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 EDTA, 10 HEPES, 10 Glucose:, 10 ピルビン酸ナトリウム、pH7.4)に置き換え、数分間インキュベートし、記録に用いた微小電極により応答記録細胞を回収した。回収した単一味細胞をRNaseインヒビター(RNase OUT: Invitrogen, Carlsbad, CA)とLysis Bufferを各々0.5μlずつ含むPCRチューブに電極の先端を折って移し入れ、直ちに液体窒素で凍結させ、逆転写反応を行うまで-80℃で保存した。

逆転写反応および、cDNAの一次増幅はOneStep RT-PCR kit(Qiagen,Ratingen)を用い、添付のプロトコールに従って行った。50μlの反応液の組成は 10μl Quiagen OneStep RT-PCR Buffer(x5)、2μl Quiagen OneStep RT-PCR enzyme mix、0.4mM dNTP、1μl RNase inhibitor、0.2mM~0.6mMアウトサイドプライマー(表 1)とサンプル(0.5μl RNase inhibitorと 0.5μl Lysis Bufferを含む)からなる。同一チューブ内で、50℃・30 分の逆転写反応と一次増幅(95℃・15 分のプレインキュベーションの後、94℃・30 秒のdenaturation、53℃・60 秒のannealing、72℃・90 秒のamplificationを 30 サイクル)をサーマルサイクラー(TaKaRa PCR thermal cycler: TaKaRa、東京)を使用して行った。続いて、一次増幅で得られた産物と、各遺伝子に対するインサイドプライマーを用い、二次増幅(94℃・30 秒のdenaturation、58℃・30 秒のannealing、72℃・60 秒のamplificationを 40 サイクル)を行った。10μlの二次反応

液には 0.25 UnitsのTaq DNA polymerase(TaKaRa ExTM Taq HS: TaKaRa)、1 μ l 10x PCR buffer (20mM Mg²⁺含有)、0.2mM dNTP、0.6mMインサイドプライマーペア(表 1)と 0.2 μ lの一次PCR産物が含まれる。二次増幅反応の後、反応液はエチウムブロマイドを添加した 2%アガロースゲル上で電気泳動し、cDNAを検出した。ポジティブコントロール反応には単一味蕾からのmRNA精製物を用い、ネガティブコントロール反応には 0.5 μ l Tyrode溶液を用い、サンプルの解析と同時に行った。また、 β -actinは内部コントロールとして用いた。

データ解析

記録したデータは 10 秒ごとのスパイク数をカウントし、味刺激前後の蒸留水を与えた期間の平均スパイク数を自発放電頻度とした。味刺激の投与後 10 秒間のスパイク数から自発放電頻度を差し引いた値を刺激に対する応答値とした。応答発生の基準は以下の 2 条件を満たすこととした：(1) 2 回の同一味刺激に対し発生したスパイク数が、共に自発放電のスパイク数の平均+2SD よりも多いこと、(2)味刺激により少なくとも 3 回以上スパイクが生じることを条件とした。味細胞の応答特異性は、以下のエントロピー方程式(Smith and Travers, 1979; Traveres and Smith, 1979)を利用し、数値化した。

$$H(\text{entropy}) = -K \sum_{i=1}^n p_i \log p_i$$

H はエントロピー値、K は定数(3 種の刺激では 2,096 で、5 種の刺激では 1,431)、 p_i は各々の味刺激の相対応答値で、ログ関数の底は 10 である。エントロピー値は 1 種の刺激に特異的に応答を示す場合 0.0、全ての味刺激で等しく応答をする場合 1.0 となる。

遺伝子	インサイドプライマー (上段:フォワード、下段:リバース)	サイズ	アウトサイドプライマー (上段:フォワード、下段:リバース)	サイズ
SNAP25	AAAAAGCCTGGGGCAATAAT AGCATCTTTGTTGCACGTTG	304bp	AAGGGATGGACCAAATCAAT CAATGGGGGTGACTACTCTG	601bp
Gα gust	TGCTTTGAAGGAGTGACGTG GTAGCGCAGGTCATGTGAGA	341bp	ACGAGATGCAAGAACTGTGA TATCTGTCACGGCATCAAAC	941bp
TIR3	CTACCCTGGCAGCTCCTGGA CAGGTGAAGTCATCTGGATGCTT	343bp	TGCCTGAATTTTCCATTAT AGGACACTGAGGCAGAAGAG	889bp
β-actin	CCTGAAGTACCCCATTTGAAC GTAACAGTCCGCCTAGAAGC	370bp	GGTCCGATGCCCTGAGGCT ACTTGCGGTGCACGATGGAGG	943bp

表 1 Single Cell RT-PCR で用いたプライマーの一覧。すべての配列は 5'→3'で示す。

結果

GFP 発現味細胞における活動電位

活動電位を発生する味細胞は、味覚神経線維へ情報を伝達すると考えられる (Yoshida et al, 2006a,b)。そこで始めに、Gustducin-GFP マウスおよび GAD67-GFP マウスの GFP 発現味細胞が活動電位を発生するかについて調べた。その結果、両遺伝子改変マウスの GFP 発現味細胞が活動電位を発生させることを確認した (図 1 および図 7)。

Gustducin-GFP 発現味細胞の味応答記録

Gustducin は甘味、うま味、苦味の受容に関与する G タンパク質 α サブユニットで (Wong et al., 1996; He et al., 2004)、II 型細胞のマーカーでもある (Yang et al., 2000)。よって Gustducin 発現細胞は甘味、うま味、または苦味を受容する細胞であると考えられる。そこで、Gustducin-GFP マウスを用い、GFP 発現細胞から 5 基本味刺激(300mM NaCl、20mM Sac、10mM HCl、20mM QHCl、300mM MSG) に対する応答を記録したところ、Gustducin-GFP 細胞は甘味、うま味、苦味のいずれかに最も強い応答を示した。図 1 は Gustducin-GFP 細胞からの応答記録例を示す(A:甘味ベスト細胞、B:苦味ベスト細胞、C:うま味ベスト細胞)。応答を記録した 29 個の Gustducin-GFP 細胞のうち、10 個が Sac に、17 個が QHCl に、2 個が MSG に最も強く応答したが、NaCl、HCl に最も強く応答した細胞は見られなかった。

次に、野生型マウス(C57BL/6N)の味細胞を用いて、味刺激による応答記録と Single Cell RT-PCR による発現遺伝子解析(Yoshida et al.,2005)を行った。無作為に選んだマウス茸状乳頭味細胞から 5 基本味に対する応答を記録し、記録後に細胞を回収し、multiplex single cell RT-PCR により、Gustducin(II 型細胞)または

SNAP25(III型細胞)の発現を調べた(図 2)。この方法を用い 40 個の細胞について解析を行った結果、20 個の細胞で *Gustducin* の mRNA を検出し、3 個の細胞で SNAP25 の mRNA を検出した。残りの 17 個は、ポジティブコントロール(味蕾から精製した mRNA をサンプルとして用いた)で *Gustducin* および SNAP25 の mRNA を検出したにも関わらず、どちらの mRNA も検出できなかった細胞であった。これは、味応答記録の後に RT-PCR を行うことで、mRNA の分解が進み、検出困難となった可能性がある。技術的に限界はあるものの、*Gustducin* と SNAP25 が共発現している細胞はなかった。*Gustducin* mRNA 陽性細胞は甘味ベスト細胞(図 2A)、苦味ベスト細胞または(図 2B)、うま味ベスト細胞(図 2C)のいずれかであった。20 個の *Gustducin* 陽性細胞のうち 15 個の細胞は Sac に、3 個の細胞がキニーネに、2 個の細胞が MSG に最も強い応答を示した。*Gustducin*-GFP 味細胞の結果と同様、*Gustducin* mRNA 陽性細胞で NaCl または HCl に最も強く応答する細胞はなかった。一方、SNAP25 mRNA 陽性味細胞は HCl に最も強い応答を示した。

さらに、甘味感受性細胞の T1R3 (甘味とうま味の受容体のコンポーネント) の mRNA 発現を調べた。その結果、15 個の甘味感受性 *Gustducin* mRNA 陽性細胞のうち 8 個の細胞で T1R3 の mRNA 発現が検出された。2 個の MSG ベスト細胞と 3 個のキニーネベスト細胞からは T1R3 mRNA は検出されなかった。T1R3 の発現が検出できなかった甘味応答細胞が存在したことは、長時間の味応答記録により mRNA 量が減少し検出できなかった可能性、偽陰性の結果である可能性、これらの細胞に T1R3 非依存性の伝達経路が存在する可能性が考えられる。

Gustducin-GFP 細胞と *Gustducin* mRNA 陽性細胞の結果を *Gustducin* 発現細胞としてまとめた。その結果、25 個の細胞が Sac(甘味)ベスト細胞、20 個の細胞が QHCl(苦味)ベスト細胞、4 個の細胞が MSG(うま味)ベスト細胞であった。これら

49 個の細胞のうち 28 個(78%)が 1 種の、10 個(20%)が 2 種の、2 個(4%)が 3 種の味刺激に対し応答を示した(図 3)。49 個の **Gustducin** 発現細胞の平均エントロピー値は 0.087 ± 0.024 (平均 \pm SE)であった。これはマウス有郭乳頭の受容細胞 (II 型細胞) のエントロピー値(0.07 ± 0.02 、Tomchik et al., 2007)と類似している。このことから、**Gustducin** 発現細胞は特定の基本味に対し、高い応答特異性を示すと考えられる。

クラスター解析により **Gustducin** 陽性細胞を分類したところ(図 4)、甘味ベスト(Sac 群と名付ける)、苦味ベスト(QHCl 群)、うま味ベスト(MSG 群)の 3 つの群に分けることができた。甘味ベスト群はさらに甘味特異的な群(S 群と名付ける)、甘味とうま味に応答する群(Sm 群)、甘味と塩味に応答する群(Sn 群)に分類できた。甘味ベスト細胞の平均エントロピー値(0.153 ± 0.039 、n=25)は苦味ベスト細胞の値(0.021 ± 0.021 、n=20)と比べ非常に大きく、苦味感受性細胞は、甘味感受性細胞よりも特異的に苦味に応答する可能性を示唆する。

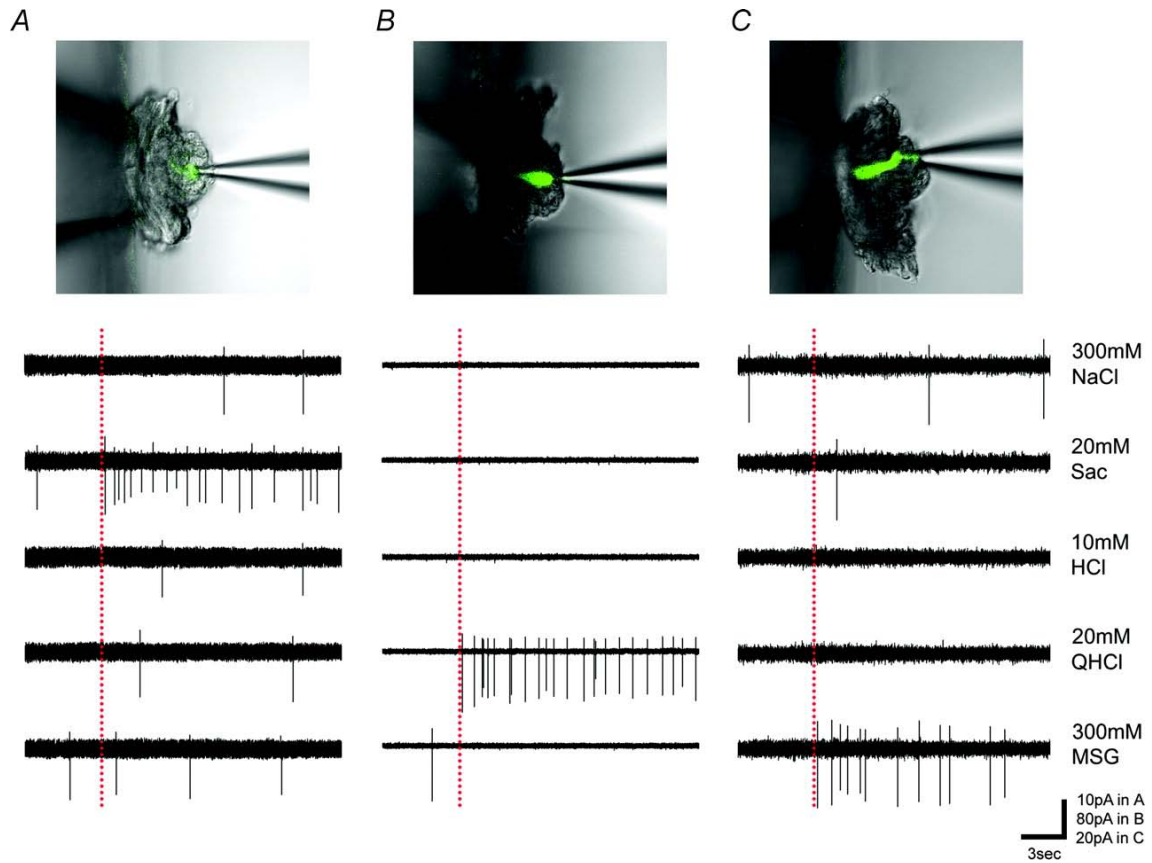


図 1 Gustducin-GFP マウスにおける GFP 発現細胞の味応答記録例。味溶液には 300mM NaCl、20mM Sac、10mM HCl、20mM QHCl、300mM MSG を用いた。

A:甘味に最も強く応答する細胞、B:苦味に最も強く応答する細胞、C:うま味に最も強く応答する細胞。点線は刺激開始を示す。

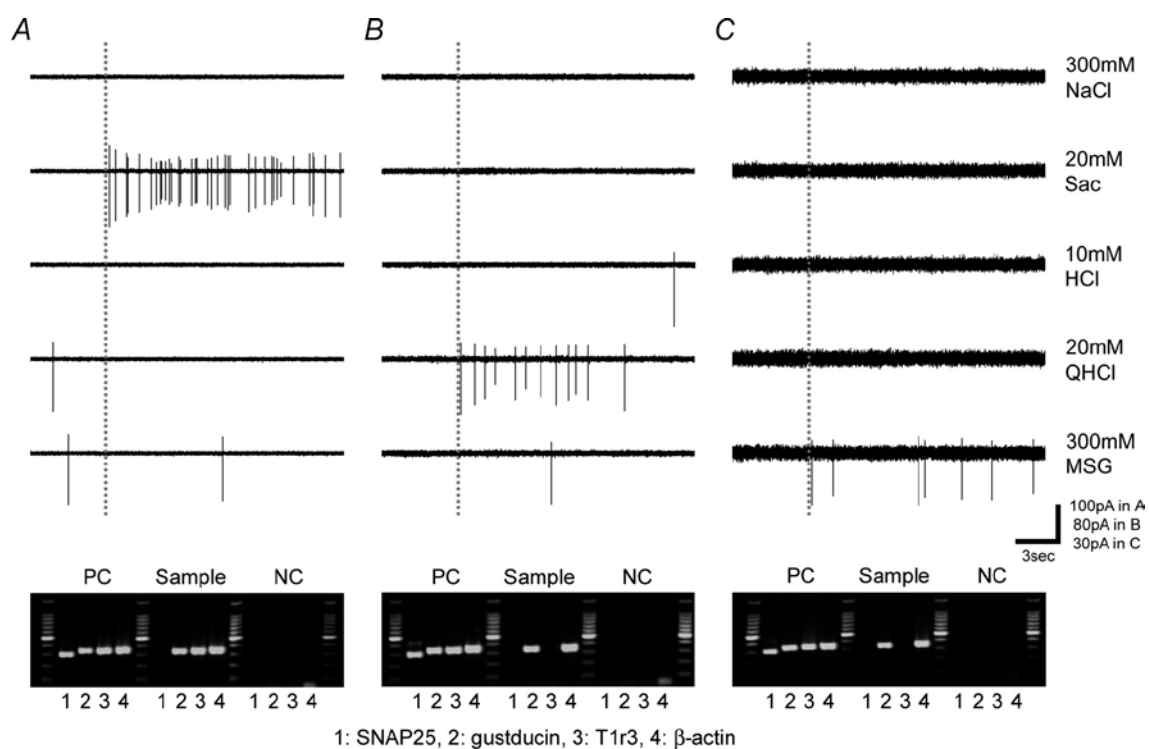


図2 Single Cell RT-PCRにより Gustducin の発現が検出された野生型マウス味細胞の応答記録例。A: 甘味ベスト細胞、B: 苦味ベスト細胞、C: うま味ベスト細胞。点線は味刺激開始を示す。PC: ポジティブコントロール NC: ネガティブコントロール。PCR産物のサイズはそれぞれ 304bp(SNAP25)、341bp(Gustducin)、343bp(T1R3)、370bp(β -actin)である。

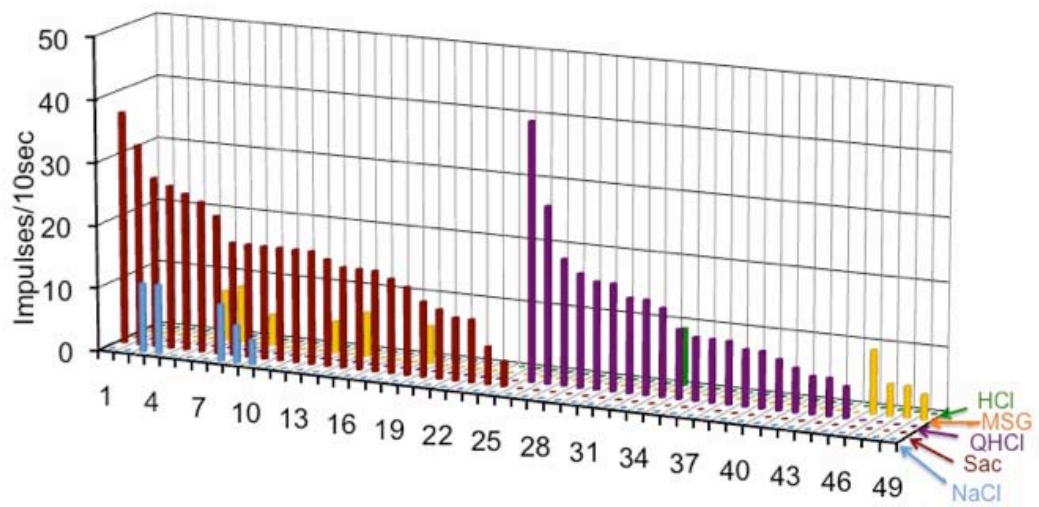


図 3 Gustducin 発現細胞の 5 基本味に対する味応答記録のプロファイル。味刺激には 300mM NaCl、20mM Sac、10mM QHCl、300mM MSG、10mM HCl を用いた。1~25 は甘味ベスト細胞、26~45 は苦味ベスト細胞、46~49 はうま味ベスト細胞を示す。縦軸は応答の大きさ（10 秒間の刺激で生じるインパルス数）を示す。

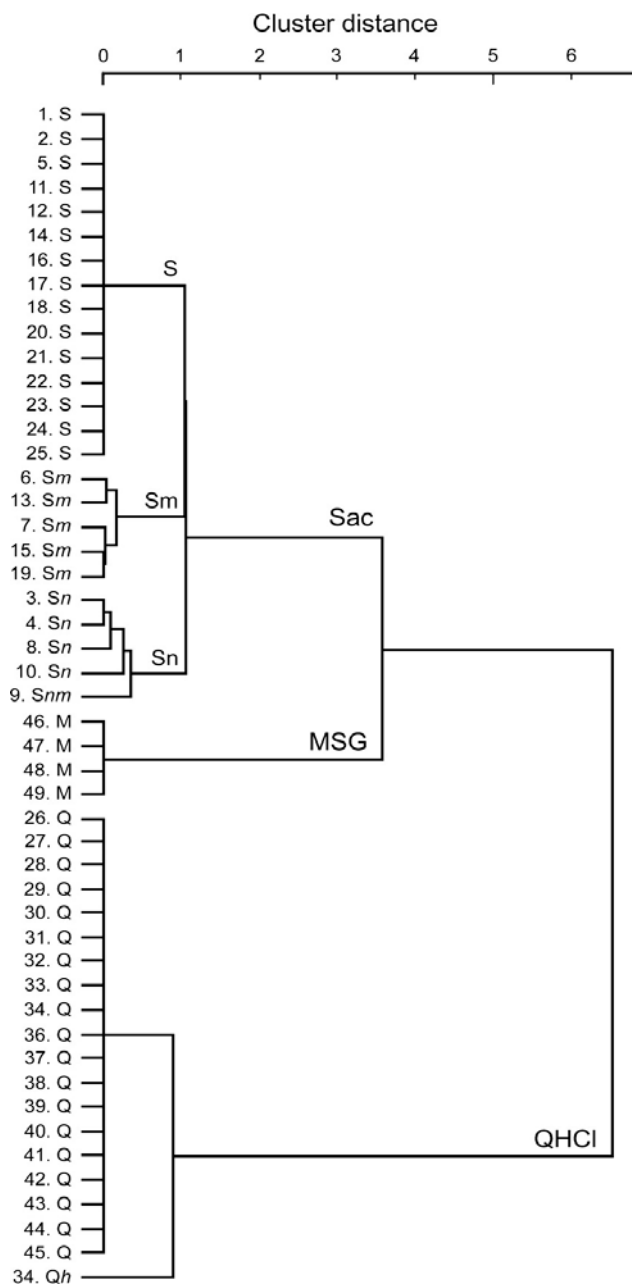


図4 Gustducin 発現細胞の応答プロファイルをもとにしたクラスター解析結果。細胞の番号(図3と同様)と各細胞の応答プロファイルを左に示す。大文字は最大応答値の50%以上の応答が見られた味刺激、小文字は最大応答値の50%以下の応答を示した刺激を示す。文字順は応答の強さの順を示す(一番初めの文字は最大応答を示した味刺激を示す)。Sまたはs: Sac、Nまたはn: NaCl、Hまたはh: HCl、Qまたはq: QHCl、Mまたはm: MSGとする。最大応答により Sac 群、MSG 群、QHCl 群の3つの群に分類することができる。Sac 群はさらに S 群(甘味特異的の応答)、Sn 群(甘味と塩味にの応答)、Sm 群(甘味とうま味にの応答)の3群に分類された。

キニーネ感受性細胞の応答特性

次にマウス茸状乳頭のキニーネ感受性 Gustducin-GFP 細胞における様々な苦味物質に対する応答を調べた。20mM キニーネ(QHCl)、0.1mM シクロヘキシミド(CX)、20mM デナトニウム(Den)、0.5mM シュクロースオクタアセテート(SOA)、10mM カフェインの5つの苦味物質に対する応答を14個のキニーネ感受性細胞で調べると、ほとんどの細胞が QHCl、Den、CX の3つの苦味物質に対して応答を示したが、SOA およびカフェインには応答を示さなかった(図 5)。クラスター解析により、苦味感受性細胞は2つに大別される(図 6)。一方は、苦味物質に対する応答特異性が若干高い群で、その平均エントロピー値は 0.577 ± 0.1 (n=5、SE) であり、他方の群は、苦味物質に対する応答特異性が低く、平均エントロピー値は 0.907 ± 0.053 (n=9) であった。この両者の間には有意な差が認められた ($P < 0.01$ 、*t-test*)。これらの結果は、マウス茸状乳頭の苦味感受性 Gustducin 発現細胞は複数の苦味物質を検出できることを示唆する。

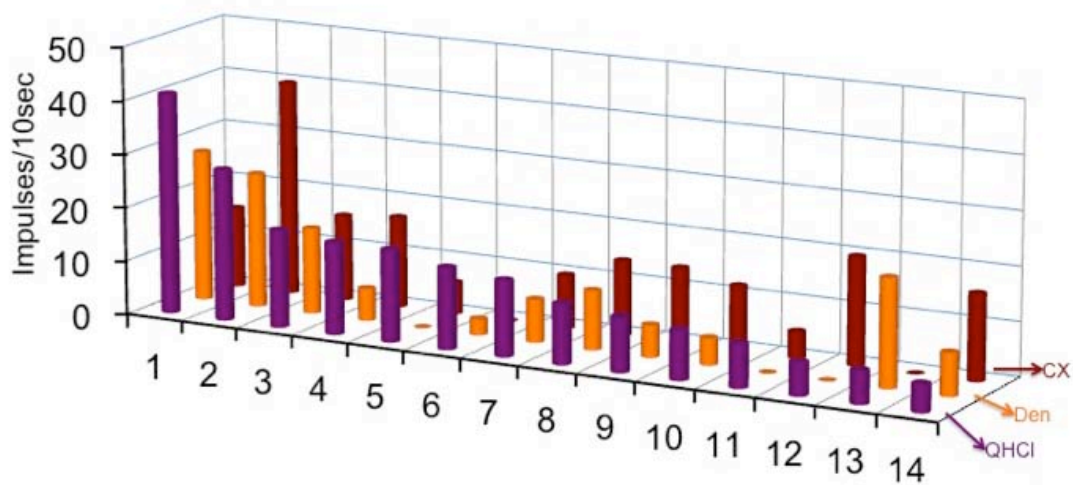


図 5 14 個の QHCl 応答細胞における苦味物質に対する応答プロファイル。味溶液は 20mM キニーネ(QHCl)、20mM デナトニウム(Den)、0.1mM シクロヘキシミド(CX)を示す。QHCl の応答の大きさ順に細胞を並べた。なお、0.5mM シュクロースオクアセテート(SOA)と 10mM カフェインに反応する細胞は見られなかった。

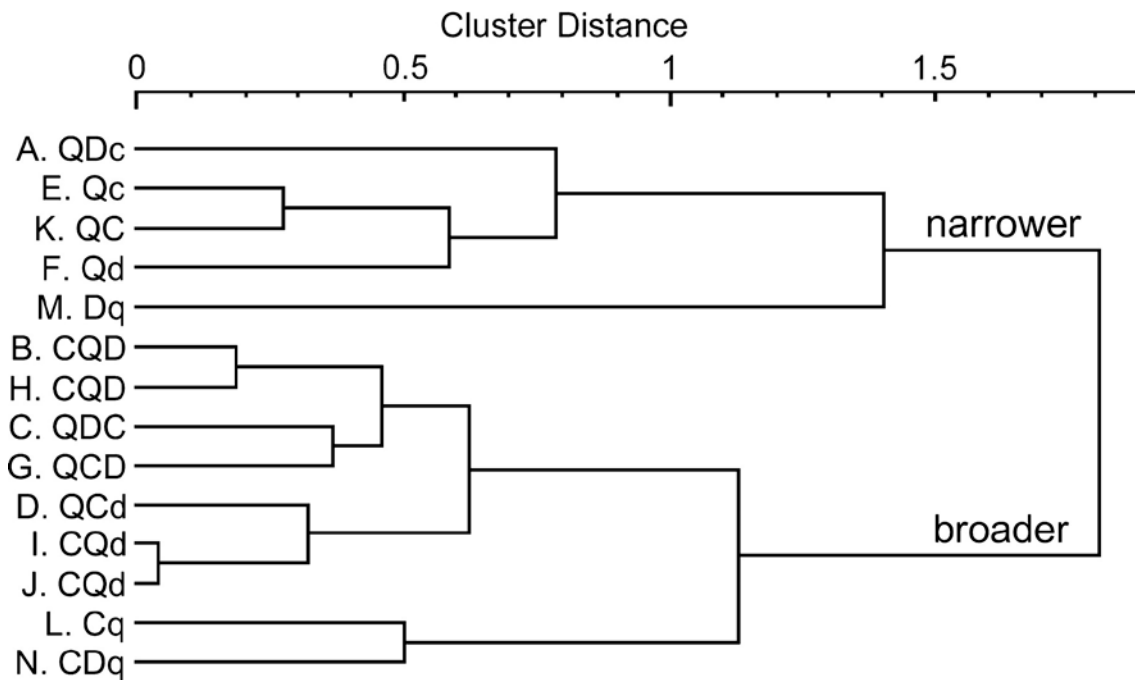


図 6 3 つ苦味物質に対する応答性で分類した 14 個の QHCl 応答細胞のクラスター解析結果。細胞番号 (図 5 と同様) と各々の細胞の応答プロファイルは左端に示す(Q または q: キニーネ、D または d: デナトニウム、C または c: シクロヘキサミド)。3 種の味刺激に対する応答特異性の違いにより 2 群 (narrower と broader) に細胞を分類することができる。broader 群の平均エントロピー値は 0.907 ± 0.053 ($n=9$) で narrower 群の平均エントロピー値は 0.577 ± 0.1 ($n=5$) であり、両者の間に有意差が見られた ($P < 0.01$, t 検定)。

GAD67-GFP 発現味細胞の応答記録

II型細胞と考えられる Gustducin 発現細胞は甘味、うま味、苦味に特異的な応答を示したが、塩味や酸味に最も強く応答する細胞は存在しなかった。よって塩味や酸味が他の細胞型の味細胞により受容される可能性を示唆する。味蕾内ではIII型細胞の一部が GAD67 を発現する (DeFazio et al., 2006; Nakamura et al., 2007; Tomchik et al., 2007) ことから、これをマーカーとしてIII型細胞の応答特性を調べた。その細胞の同定には GAD67-GFP マウス (Tamamaki et al., 2003) を利用した。図7に GAD67-GFP 細胞の5基本味刺激に対する応答例を示す。この応答例では、一方は酸味特異的な応答を示し(図7A)、他方は多種の味刺激に対し応答を示した(図7B)。全部で44個の GAD-67-GFP 発現味細胞の5基本味に対する応答を調べたところ、そのすべてが 10mM HCl(酸味)に応答し、44個のうち33個は 10mM HCl に特異的に応答する細胞で、11個は 10mM HCl 以外の味刺激に対しても応答する細胞であった(図8)。これら茸状乳頭の GAD67 発現味細胞の平均エントロピー値は 0.123 ± 0.034 であり、この値は有郭乳頭の“シナプス前”細胞(III型細胞に相当)の平均エントロピー値(0.47 ± 0.04 , Tomchik et al. 2007)と比較し有意に小さい。よって、マウス茸状乳頭のIII型細胞は有郭乳頭のIII型細胞と異なる応答特性を持つ可能性が示唆される。

GAD67 発現細胞を5基本味刺激による応答によってクラスター解析を行ったところ、3群に分類することができた(図9)。electrolytes 1 と electrolytes 2 の2つの群は他種の味刺激に応答する群で、残り1群は、HCl と NaCl に応答を示した2細胞(図9の細胞番号9および11)を除き、HCl に特異的に応答を示した群である。2つの electrolytes 群における味細胞の平均エントロピー値(0.473 ± 0.04 , $n=8$)は、マウス有郭乳頭“シナプス前”(III型細胞に相当)の平均エントロピー値(0.47 ± 0.04 , Tomchik et al., 2007)と近似している。これは、これら多種の味刺激

に応答するⅢ型細胞は、有郭乳頭と茸状乳頭において同様の応答特性を持つ可能性を示唆する。

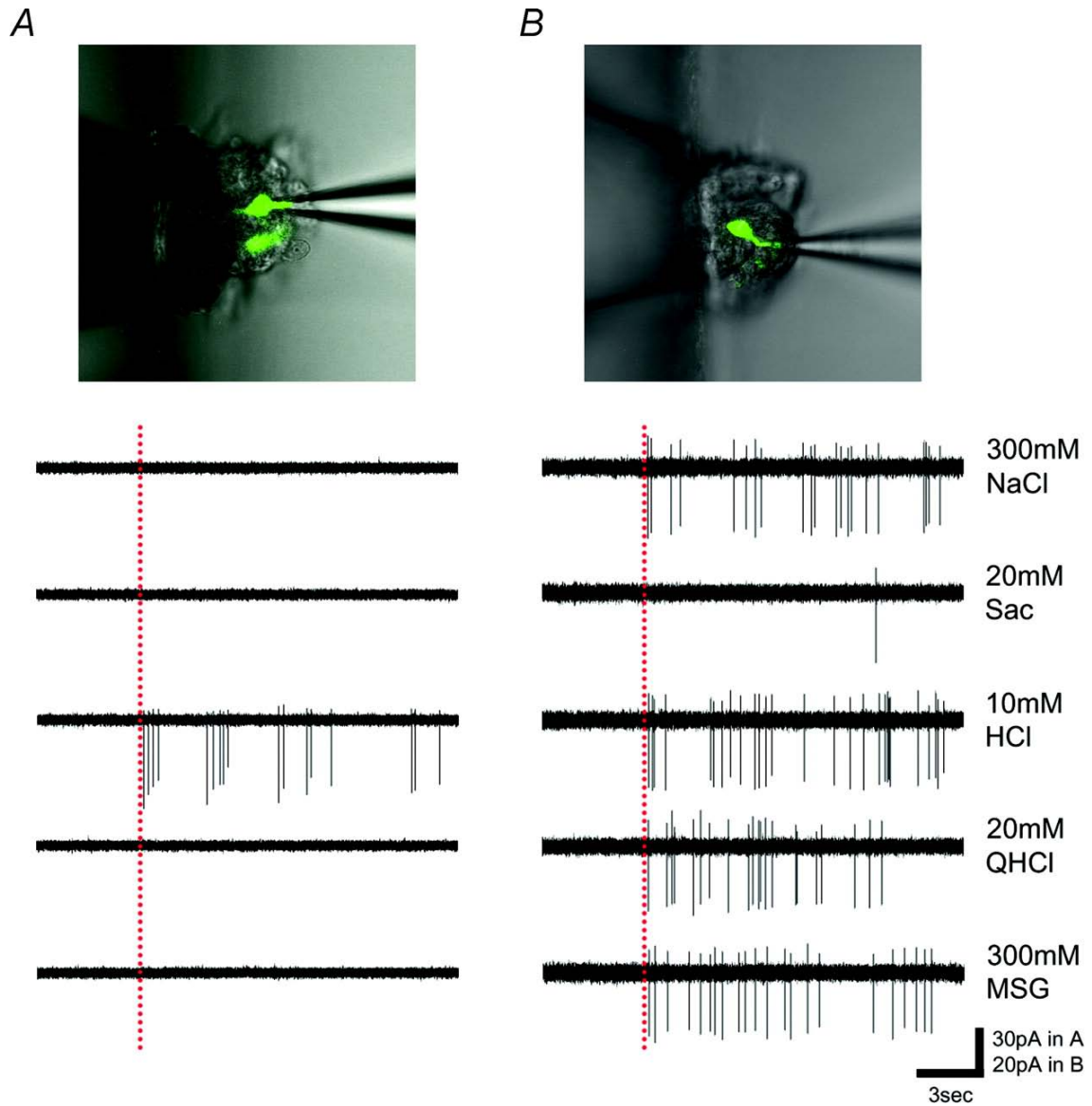


図7 GAD67-GFP細胞の味応答記録例。味刺激には300mM NaCl、20mM Sac、10mM HCl、20mM QHCl、300mM MSGを用いた。A: 10mM HClにのみ応答する細胞、B: 多種の味刺激に応答する細胞。点線は刺激開始を示す。

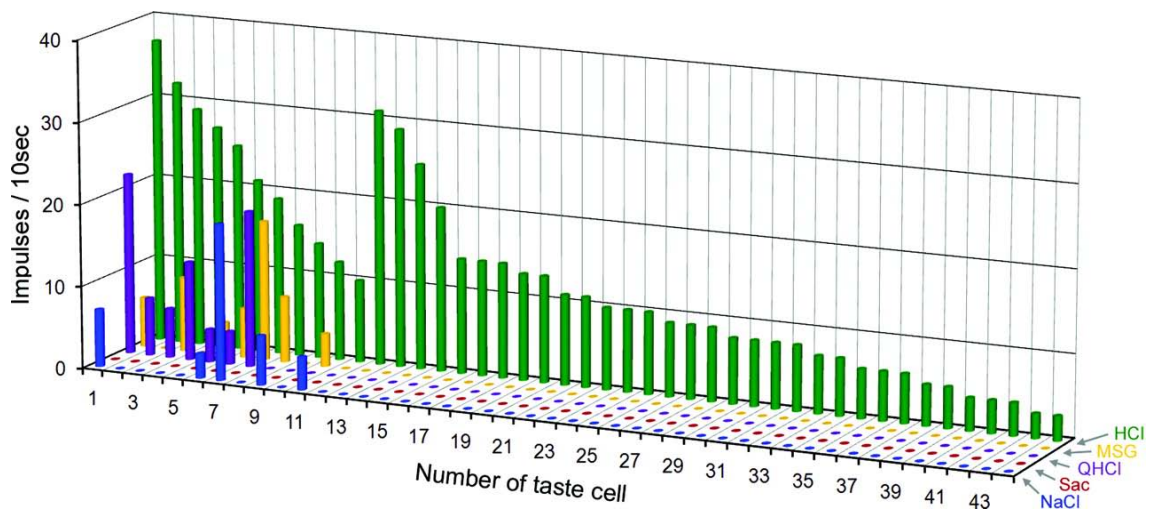


図 8 44 個の GAD67 発現細胞の 5 基本味に対する応答プロフィール。全ての細胞が HCl に応答した。1~11: 他種の味刺激に対しても応答する細胞、12~44: HCl に特異的に応答する細胞。味刺激には 300mM NaCl、20mM Sac、10mM QHCl、300mM MSG、10mM HCl を用いた。

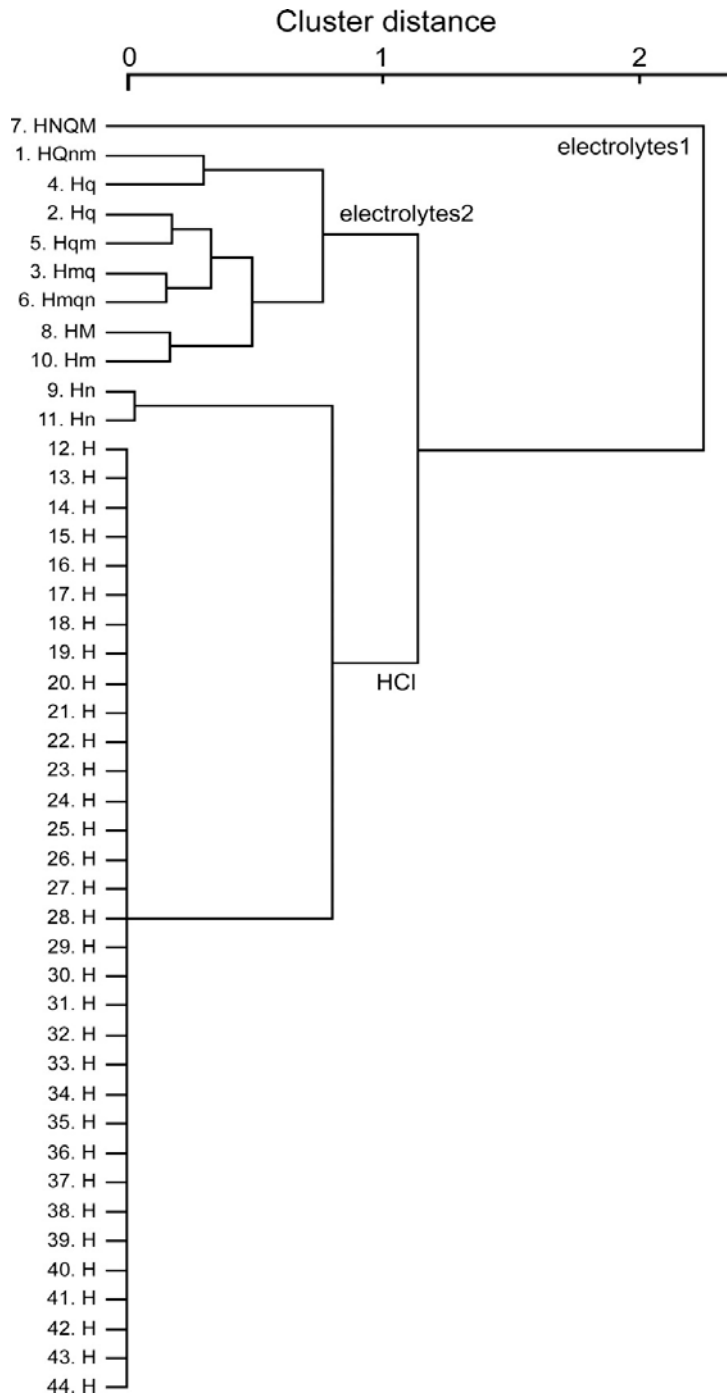


図9 GAD67 発現細胞の応答プロファイルによるクラスター解析結果。細胞番号(図8と同様)と各々の応答プロファイルを左端に示す(S または s: Sac、N また n: NaCl、H または h: HCl、Q または q: QHCl、M または m: MSG)。GAD67 発現細胞は大きく3群に分類され、Electrolytes1 群と Electrolytes2 群は電解質に対し応答を示し、HCl 群は HCl に特異的応答を示した。(ただし9番と11番の細胞を除く)。

HCl 感受性細胞の応答記録

GAD67 発現細胞はすべて HCl に応答したことから、他の酸味刺激に対する応答も調べた。10mM 酢酸(pH3.4)、10mM クエン酸(pH2.6)、10mM 塩酸(pH2.0) の 3 種の酸味物質に対する応答を 14 個の酸味感受性細胞で調べた結果、ほとんどの細胞が 3 種類の酸味刺激に対し応答を示した(図 10)。これら味細胞の味細胞の応答特異性を示す平均エントロピー値は 0.894 ± 0.026 (n=14) と非常に高く、HCl に感受性のある細胞は酸味刺激に対して広く応答することを示唆する。クラスター解析では、酸味感受性味細胞は 3 種の酸味刺激に対して比較的等しく応答する ACH 群、酢酸への応答が小さい CH 群、酢酸とクエン酸への応答が小さい H 群の 3 群に分類できる(図 11)。

また、3 種の酸味物質に対する濃度応答を調べたところ(図 12)、同濃度であれば、クエン酸に対する応答と塩酸に対する応答は有意差がなく(1~10mM 間、ANOVA、 $F=1.13$ 、 $P>0.1$)、酢酸に対する応答はクエン酸(3~10mM 間、 $F=9.65$ 、 $P<0.01$)、や塩酸(3~10mM 間、 $F=9.00$ 、 $P<0.01$)に対する応答より有意に小さかった。さらに、濃度応答曲線を pH 応答曲線に変換すると、同じ pH であれば、酢酸に対する応答が一番大きく、塩酸に対する応答が最も小さかった。これは以前の研究結果と一致する (Beidler, 1967; Lyall et al., 2001., Huang et al., 2008)。

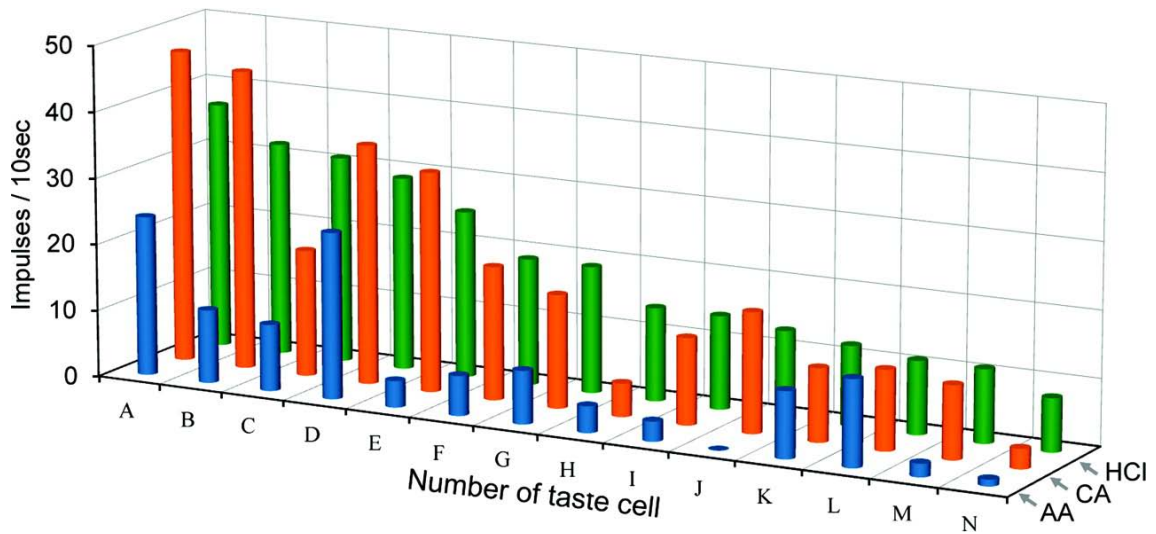


図 10 14 個の HCl 応答細胞の 3 種の酸味物質に対する応答記録プロフィールを示す。HCl に対する応答の大きさにより細胞を並べた。味刺激には 10mM 酢酸(AA)、10mM クエン酸(CA)、10mM 塩酸(HCl) を用いた。

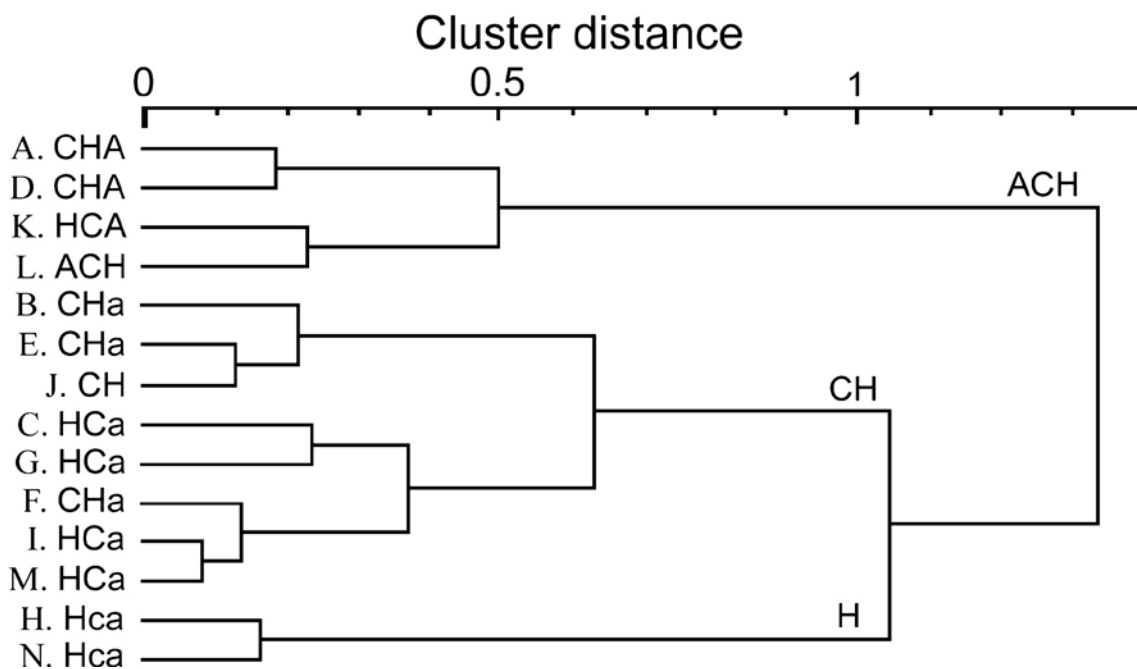


図 11 HCl 応答細胞の酸味物質に対する応答プロフィールによるクラスター分析結果。細胞番号(図 10 と同様)と応答プロフィールを左端に示す(A または a: 酢酸、C または c: クエン酸、H または h: 塩酸)。酸味刺激への応答により 3 つの群に分類できた(ACH 群、CH 群、H 群)。

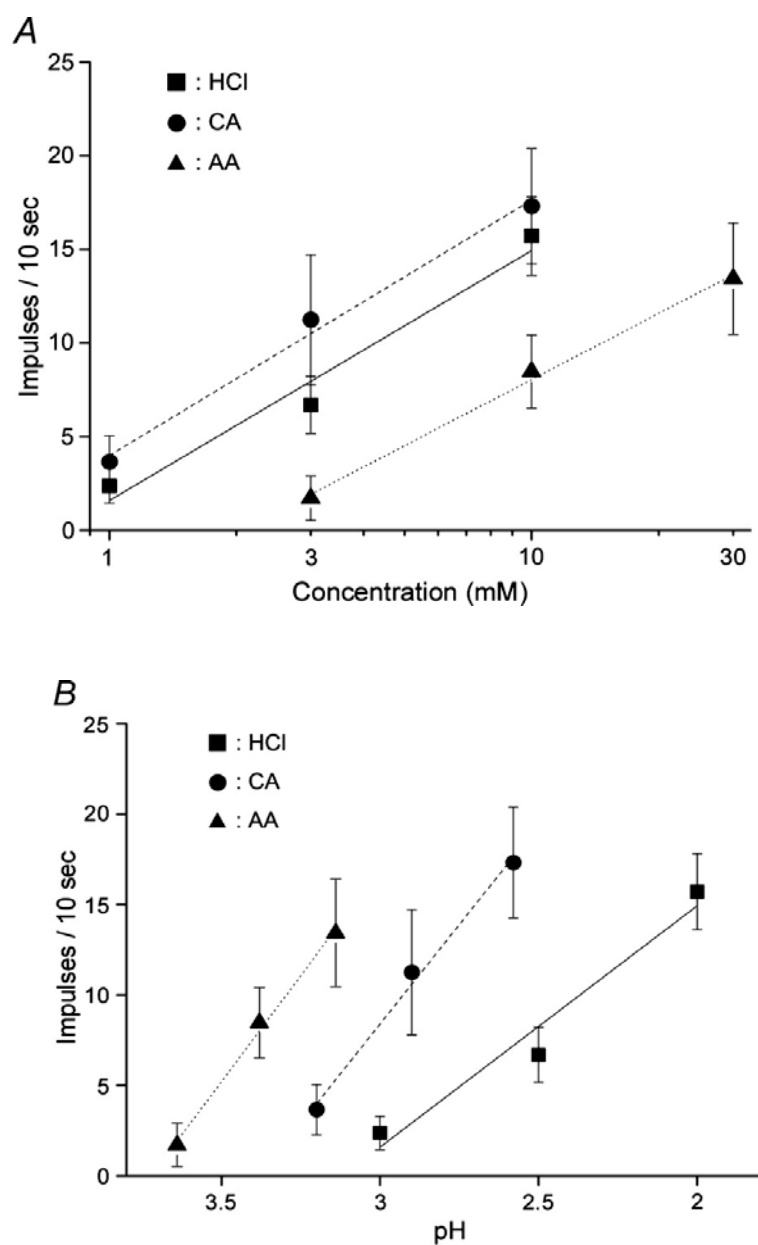


図 12 HCl 応答細胞の 3 種の酸味物質に対する(A)濃度応答曲線と(B) pH 応答曲線 (n=6~21)。値は平均±標準誤差で示す。■:塩酸(HCl)、●:クエン酸(CA)、▲:酢酸(AA)を示す。

考察

本研究では、マウス茸状乳頭味蕾に存在する *Gustducin* 発現細胞(Ⅱ型細胞)および *GAD67* 発現細胞(Ⅲ型細胞)の 5 基本味刺激に対する応答を調べた。その結果、*Gustducin* 発現細胞は、甘味、うま味、または、苦味の各刺激種に高い応答特異性を示し、*GAD67* 発現細胞は酸味特異的な応答を示すものと多種の味刺激に応答を示すものが存在することが明らかとなった。このような応答特性は以前より知られているⅡ型細胞およびⅢ型細胞の受容体や他の味覚関連遺伝子の発現様式とよく対応しており、本研究では、これらマーカーによる味細胞の分類がその細胞機能の分類と対応することを確認できた。加えて、カルシウムイメージングを用いたマウス有郭乳頭味細胞の報告(Tomchik et al., 2007; Huang et al.,2008)ともおおよそ一致した結果が得られた。49 個の *Gustducin* 発現細胞のうち 28 個の細胞(78%)と、44 個の *GAD67* 陽性細胞のうちの 33 個の細胞(75%)が、5 基本味のうち 1 種の味刺激に対し特異的に応答を示したことから、大部分の *Gustducin* 発現細胞および *GAD67* 発現細胞は特定の味質に限定し応答することが示唆された。Ⅱ型細胞もⅢ型細胞も活動電位を発生させることから、これらの細胞は味覚情報を味神経線維に伝えているのではないかと考えられる(Yoshida et al.,2006)。

Gustducin は甘味、うま味、苦味の細胞内情報伝達に寄与する。行動学および、神経生理学的実験において、*Gustducin* ノックアウトマウスの甘味、うま味、苦味に対する応答は大幅に減少するが、完全には消失しないことが報告されており(Wong et al., 1996; He et al.,2004)、*Gustducin* はこれらの味質の伝達において重要な役割を果たすが、*Gustducin* 非依存的な経路も別に存在すると考えられる。

本研究では、Gustducin 発現細胞は甘味、うま味、また苦味に最も強く応答したが、HCl や NaCl に最も強く応答するものは存在しなかった。また、これらの細胞の応答特異性も高かった(平均エントロピーは 0.087 ± 0.024 、 $n=49$)。このことから Gustducin 発現細胞は、甘味、うま味、または苦味に特異的に応答し、Gustducin ノックアウトマウスでは Gustducin を介する味情報が消失することから、味神経や行動レベルにおける甘味、うま味、苦味応答の顕著な減少をもたらしているものと考えられる。しかし、Gustducin ノックアウトマウスにおける甘味、苦味、うま味応答の弱く残存する成分については、(1)Gustducin 発現細胞における Gustducin 非依存性経路を介する応答、(2)Gustducin を発現しない細胞からの応答による可能性が考えられるが、これについてはまだ明らかではない。

マウス有郭乳頭味細胞では、GAD67(GAD1)はSNAP25 やNCAM、AADCと共発現するが、TRPM5 やPLC β_2 と共発現しないことが示されている(Defazio et al., 2006)。またSNAP25 はT1R3 やTRPM5 を発現している細胞群とは別のグループに発現することが示されている(Clapp et al., 2006)。さらに、マウス有郭乳頭のGAD67 発現味細胞のほとんどがセロトニンまたはSNAP25 を発現しているが、PLC β_2 は発現していないことが報告されている(Tomchik et al., 2007)。第2章に示すように、Single Cell RT-PCRによるマウス茸状乳頭味細胞の遺伝子発現解析でも同様の結果が得られた(第二章表5、図20)。これらの事実は、マウスではGAD67 発現細胞はシナプスを持つIII型細胞であり、II型細胞ではないことを示唆する。しかし、ラットではSNAP25 発現細胞がGustducinやPLC β_2 発現しているとの報告(Oike et al., 2006; Ueda et al., 2006)や、免疫組織学的研究でGAD67 発現細胞は、Gustducinの免疫活性が陽性であったとの報告(Cao et al., 2009)があり、ラットではSNAP25 やGAD67 はIII型細胞の特異的マーカーとならない可能性が考えられる。このようなマーカー分子の発現パターンの相違は、マウスとラットの種差

によるものと考えられる。Ⅲ型細胞は酸味受容体候補分子であるPKD2L1を発現し(Kataoka et al., 2008)、酸味に対する感受性を示す(Huang et al., 2008)。本研究でもすべてのGAD67発現細胞が酸味刺激に応答を示した(図8)。同じpHならば酢酸のような有機酸は、塩酸に代表される無機酸よりも強い酸味を呈することが知られている(Harvey, 1920)。本研究では、酸味感受性GAD67発現細胞は様々な酸味(酢酸、クエン酸、塩酸)に応答し、同じpHであれば、無機酸よりも有機酸に大きく応答することを示した(図12)。第2章で示すように、マウス茸状乳頭味細胞においてSingle Cell RT-PCRによりGAD67発現細胞におけるPKD2L1の発現を確認している(図20)。よって、PKD2L1発現細胞を遺伝学的に欠損させた遺伝子改変マウスで酸味の応答が減少する(Huang et al., 2006)ことは、これらⅢ型細胞(GAD67発現細胞)からの味情報が消失するために生じる可能性が考えられる。

本研究、および以前の報告(Yoshida et al., 2006)から、様々な味質に応答する細胞と特定の味質に応答する細胞が存在することが確認された。しかし、本研究で示したGustducin発現細胞やGAD67発現細胞の応答特異性は、以前の報告で行った特定の分子マーカーを標的としないランダムな味細胞からの記録と比較し、応答特異性が高い傾向が見られた。このことは、今回記録したGustducin発現細胞やGAD67発現細胞以外の味細胞が複数の味質に対する感受性を示す可能性がある。例えば、SNAP25陽性でGAD67を発現しないような細胞が、細胞間コミュニケーション(Roper, 2006)によって多種の味刺激に対し応答を示す可能性がある。

本研究で得られた結果は、カルシウムイメージング法による有郭乳頭味細胞の結果(Tomchik et al., 2007; Huang et al., 2008)と近似していたが、いくつか異なる点も見られた。マウス有郭乳頭味細胞では、“受容細胞”(Ⅱ型細胞)は、甘味、うま味、苦味刺激に対し特異的に応答するものが多く存在した(Tomchik et al.,

2007)。またその平均エントロピー値は 0.07 ± 0.02 であり、これは本研究で得られた茸状乳頭味蕾の Gustducin 発現細胞の値 (0.087 ± 0.024) と近似していた。これらのことから、II型細胞は甘味、うま味、苦味情報の受容と伝達に寄与すると考えられる。しかし、Gustducin と甘味、うま味の味覚受容体(T1Rs)の発現パターンは茸状乳頭と有郭乳頭で異なり(Kim et al., 2003; Shigemura et al., 2008; 第二章 図 14、15)、これが甘味応答に対するグルマリン感受性の舌部位差(Ninomiya and Imoto, 1995; Ninomiya et al., 1997)に寄与する可能性が考えられる。しかし、このような差異は、味細胞の生理学的研究ではまだ証明されていない。また、Huang ら(2008)は、マウス有郭乳頭の“シナプス前細胞”(III型細胞)は顕著に酸味刺激に応答を示し、セロトニンを放出することを報告している。これは、本研究でマウス茸状乳頭GAD67発現味細胞が酸味刺激に応答したことと一致する。また、Tomchik ら(2007)は、有郭乳頭“シナプス前細胞”(III型細胞)は多種の味刺激に応答することを示している。本研究では一部の茸状乳頭GAD67発現細胞は多種の味刺激に応答し、その平均エントロピー値は 0.473 ± 0.053 で有郭乳頭の値 (0.47 ± 0.04) と近似していた。このことから、茸状乳頭ではIII型細胞は2つの群に分かれることが示唆される。1つの群は、酸味特異的な細胞群であり、もう1つの群は多種の味刺激に応答する群である。全体として、茸状乳頭III型細胞は有郭乳頭III型細胞よりも特異的に酸味に応答を示した。これは、茸状乳頭と有郭乳頭味蕾でIII型細胞の数が違うことに起因する可能性が考えられる。マウス有郭乳頭味蕾におけるIII型細胞の数は、茸状乳頭に比べ3~5倍多いことが報告されている。(Yoshida & Ninomiya, 2010)。他の可能性として、GAD67を発現していないIII型細胞が存在することが考えられる。多くのGAD発現細胞がSNAP25またはセロトニンを共発現するが、SNAP25やセロトニンを発現している細胞の20~30%はGADを発現していないことが報告されている(DeFazio et al.,

2006; Tomchik et al.,2007)。また、有郭乳頭味細胞では高カリウム溶液によって脱分極した細胞をⅢ型細胞として同定しているのに対し、本研究では GAD67-GFP 細胞のみを用いたことで差異が生じている可能性が考えられる。すなわち、本研究で用いた GAD67-GFP 細胞はⅢ型細胞群のなかの一部である可能性が考えられ、それゆえ多種の味刺激に応答するⅢ型味細胞から記録出来なかった可能性もある。このような多種の味刺激への感受性は細胞間コミュニケーション(Roper, 2006)や多種の味刺激に応答するような受容体を介し生じる可能性があり、その解明にはさらなる研究が必要である。

さらに、苦味感受性も茸状乳頭と有郭乳頭で差がある。苦味物質は約 30 種類からなる T2R ファミリー(G タンパク 共役型受容体、Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000)によって受容される。ラットの遺伝子発現解析では、単一味細胞が膨大なレパートリーの T2Rs を共発現することが報告されており(Adler et al., 2000)、各々の苦味受容細胞は多様な苦味物質を認識できることを示唆している。マウスおよびヒトの味覚組織の遺伝子発現解析では、単一味細胞は限られた種類の T2Rs しか発現せず(Matsunami et al., 2000; Behrens et al., 2007)、様々な異なった応答特性を持つ苦味受容細胞が存在することを示唆している。マウス有郭乳頭の生理学的研究では、多くの苦味感受性細胞は 5 つの苦味刺激(QHCl、CX、Den、SOA、フェニルチオカルバミド)のうち 1 種または 2 種の苦味刺激に特異的に応答を示すことが報告されている(Caicedo and Roper, 2001)。本研究では、茸状乳頭の多くの苦味感受性細胞は多様な苦味物質(QHCl、CX、Den)への応答を示し、他の 2 種の苦味複合体(0.5mM SOA、10mM カフェイン)には応答を示さなかった。これは、T2Rs の発現パターンが茸状乳頭味細胞と有郭乳頭味細胞で異なることに起因する可能性が考えられる。しかし、マウス茸状乳頭での T2Rs の発現パターンは不明であり、さらなる解析を要する。いずれにせよ、有郭乳頭

と茸状乳頭で味細胞の様々な苦味物質への応答性が異なることは、それらを支配する舌咽神経と鼓索神経の様々な苦味物質に対する応答性の違い(Danilova and Hellekant, 2003; Damak et al., 2006) を生じさせる要因であると考えられる。デナトニウムとシクロヘキシミドは舌咽神経で大きな応答を示すが、鼓索神経ではわずかな応答しか示さない。カフェインとシュクロースオクタアセテートは鼓索神経ではほとんど応答しないが、舌咽神経ではわずかに応答を示す。キニーネは鼓索神経、舌咽神経ともに大きな応答を示す。有郭乳頭では多くの苦味感受性細胞がデナトニウムまたはシクロヘキシミドに特異的に応答しており(Caicedo and Roper, 2001)、これが舌咽神経におけるこれらの物質に対する応答の大きさを反映する可能性が考えられる。69 個の有郭乳頭苦味感受性細胞のうち 23 個の細胞は、多種の苦味物質に対し応答を示す(Caicedo and Roper, 2001)。これらの細胞は茸状乳頭の **Gustducin** を発現する苦味感受性味細胞に相当するのではないかと考えられる。鼓索神経における研究では、キニーネはシクロヘキシミドやデナトニウムよりも応答が大きいものに対して、**Gustducin** を発現する苦味感受性細胞では、3 種類どの苦味物質に対しても同程度の応答を示した(図 5)。**Gustducin** ノックアウトマウスでは、キニーネに対する鼓索神経の応答がかなり残存する(Wong et al., 1996)ことが報告されている。以上の事実から、茸状乳頭味蕾では **Gustducin** を発現していないキニーネ感受性細胞が存在し、それらはよりキニーネに特異的に応答する可能性が考えられる。

本研究にもとづき、甘味、うま味、苦味は **Gustducin** 発現Ⅱ型味細胞に、酸味は **GAD67** 発現Ⅲ型細胞により受容され、これらの味質は味細胞レベルで分別されると考えられる。しかし、これらの細胞の中に塩味感受性細胞は見られず、**Gustducin** 発現細胞や **GAD67** 発現細胞ではない味細胞が塩味(NaCl)の受容を担うと考えられる。NaCl 感受性細胞は上皮性 Na チャネル阻害剤であるアミロライ

ドの感受性により 2 つの群に分類することができる(Ninomiya and Funakoshi, 1998; Ninomiya, 1996; Yoshida et al., 2009)。アミロライド感受性(AS)細胞は NaCl にのみ応答するが、アミロライド非感受性(AI)細胞は NaCl だけでなく KCl や HCl にも応答する。AI 細胞は、多種の味刺激に応答を示す GAD67 発現味細胞と類似した応答を示すことから、AI 細胞の一部はⅢ型細胞であると考えられる。AS 細胞は Gustducin や GAD67 を発現していない細胞群に存在すると考えられる。アミロライド感受性 NaCl 応答の受容体候補であるアミロライド感受性チャンネルが茸状乳頭 I 型味細胞に存在する(Vandenbeuch et al., 2008)との報告から、I 型細胞が塩味受容細胞の候補として挙げられる。他にも Gustducin を発現していない II 型細胞や GAD67 を発現していないⅢ型細胞も候補に挙げられる。いずれにしても、マウス茸状乳頭味細胞には塩味特異的な細胞が存在する。以上の結果より、5 基本味にはそれぞれ味細胞から中枢へ至る特定のコーディングチャンネルが存在することが示唆される。

第 2 章

Gustducin 発現味細胞、T1R3 発現味細胞 および GAD67 発現味細胞の遺伝子発現解析

緒言

第 1 章で示したように、Gustducin発現細胞（II型細胞）は甘味、うま味、苦味の受容を担うと考えられる。甘味、うま味、苦味はそれぞれ、Gタンパク質結合型受容体(GPCR)であるT1R2/T1R3(Bachmanov et al., 2001; Hoon et al., 1999; Kitagawa et al., 2001; Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Nelson et al., 2001; Sainz et al., 2001)、T1R1/T1R3(Li et al., 2002; Nelson et al., 2002)、T2Rs(Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000)により受容される。これらGPCRと結合するGタンパク質は、 α 、 β 、 γ サブユニットからなるヘテロ三量体を形成し(Stryer and Bourne, 1986; Neer, 1995; Offermanns, 2003; Engelhardt and Rochais, 2007)、このうち α サブユニットがGタンパク質の多様性をもたらすと考えられる。甘味、うま味、または苦味の受容に関与するG α としてGustducinが関与することが明らかであるが (McLaughlin et al., 1992; Wong et al., 1996; Ruiz-Avila et al., 2001)、そのノックアウトマウスにおいて甘味、うま味、苦味に対する応答が完全には消失しない (Wong et al., 1996; He et al., 2004)ことからGustducin非依存的な伝達経路も存在する可能性が示唆される。また近年、レプチンや内因性カンナビノイドが味細胞に発現する受容体を介し甘味応答を抑制・増強することが明らかとなった (Kawai et al., 2000; Nakamura et al., 2008; Shigemura et al., 2004; Yoshida et al., 2010)。このうち、内因性カンナビノイドの受容体であるCB₁はGPCRであり (Matsuda et al., 1990; Howlett, 2004; Bosier et al., 2010)、細胞内情報伝達に関与する

Gαサブユニットを必要とする。これらの事実は、Gustducin以外のGαサブユニット(Gα11、Gα12、Gα13、Gα14、Gα15、Gαi1、Gαi2、Gαi3、Gαt1、Gαt2、Gαz、Gαq、Gαolf、Gαs、Gαo)が甘味、うま味、苦味受容細胞で細胞内情報伝達に關与する可能性を示唆する。しかし、甘味、うま味、苦味受容細胞におけるこれらGαサブユニットの発現パターンは不明である。

酸味の受容には ASICs、HCNs、PKD1L3/PKD2L1、TRPV1 などの多数のチャネル分子が候補受容体として挙げられている(Ugawa et al., 1998, 2003; Stevens et al., 2001; Lyall et al., 2004; Huang et al., 2006; Ishimaru et al; 2006; Treesukosol et al., 2007)。このうち PKD2L1 は、その発現細胞を遺伝的に消失させた遺伝子改変マウスにおいて酸味に対する神経応答が消失することから(Huang et al., 2006)、酸味受容体として機能する可能性が最も高いと考えられる。PKD2L1 はⅢ型細胞に発現し (Kataoka et al., 2008)、GAD67 発現細胞 (Ⅲ型細胞) は酸味刺激に応答したことから、GAD67 発現細胞が酸味受容細胞として機能すると考えられる。しかし GAD67 発現細胞における PKD2L1 以外の酸味受容体候補遺伝子の発現パターンは不明である。

そこで、本研究では3種の遺伝子改変マウス(gustducin-GFP マウス、T1R3-GFP マウス、GAD67-GFP マウス)を用い、各遺伝子を発現する味細胞を同定し、同定細胞における複数の Gα サブユニットや酸味受容体候補遺伝子の発現パターンを Single Cell RT-PCR を用い解析した。

材料と方法

実験動物

実験動物は第一章と同じく Gust-GFP マウスおよび、GAD67-GFP 発現マウス、および甘味・うま味受容体コンポーネントである T1R3 を発現する細胞が GFP を発現する遺伝子改変マウス (T1R3-GFP マウス ; Damak et al., 2008) を用いた。

Single Cell RT-PCR

サンプルは、第 1 章と同様の酵素処理により、舌前方 2/3 の茸状乳頭、および舌後方 1/3 の有郭乳頭の舌上皮を剥離した。舌上皮剥離後は直ちに Ca^{2+} - Mg^{2+} free Tyrode 溶液 (mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 EDTA, 10 HEPES, 10 Glucose、10 ピルビン酸ナトリウム pH7.4) の入ったチャンバーで数分間、室温でインキュベートし、その後微小ピペット (内径 100~150 μm) を用いて味蕾を回収し、Tyrode 溶液で満たした培養皿 [Cell Tack (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) により処理] に移した。レーザー顕微鏡観察下で GFP 発現味細胞を探索し、ガラス微小電極 (内径 ~5 μm) を用い単一 GFP 発現細胞を回収した。回収した細胞は RNase インヒビター (RNase OUT: Invitrogen, Carlsbad, CA) と Lysis Buffer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) を各々 0.5 μl ずつ含む PCR チューブに電極の先端を折って移し入れ、直ちに液体窒素で凍結させ、逆転写反応を行うまで -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

Single Cell RT-PCR のプロトコールは第 1 章と同様である。逆転写反応および、cDNA の一次増幅は OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Ratingen) を用い、付属のプロトコールに従って行った。50 μl の反応液の組成は、10 μl Quiagen OneStep RT-PCR Buffer (x5)、2 μl Quiagen OneStep RT-PCR enzyme mix、0.4mM dNTP、1 μl RNase inhibitor、0.2mM~0.6mM 各アウトサイドプライマー (第 2 章表 2-1 および表 2-2)

とサンプル(0.5 μ l RNase inhibitorと 0.5 μ l Lysis Bufferを含む)が混合されている。50 $^{\circ}$ C・30分の逆転写反応の後、続いて一次増幅(95 $^{\circ}$ C・15分プレインキュベーション後、94 $^{\circ}$ C・30秒のdenaturation、53 $^{\circ}$ C・60秒のannealing、72 $^{\circ}$ C・90秒のamplificationを30サイクル)を同一チューブ内で行った。続いて、一次増幅で得られた産生物と、各遺伝子対するインサイドプライマー(表2)を用い、二次増幅(94 $^{\circ}$ C・30秒のdenaturation、58 $^{\circ}$ C・30秒のannealing、72 $^{\circ}$ C・60秒のamplificationを40サイクル)を行った。10 μ lの二次反応液には0.25 UnitsのTaq DNA polymerase(TaKaRa ExTM Taq HS: TaKaRa)、1 μ l 10x PCR buffer (20mM Mg²⁺含有)、0.2mM dNTP、0.6mMインサイドプライマーペア(表2)と0.2 μ lの一次PCR産生物が含まれている。二次増幅反応の後、反応液はエチウムブロマイドを添加した2%アガロースゲル上で電気泳動し、cDNAを検出した。ポジティブコントロール反応には単一味蕾からのmRNA精製物を用い、ネガティブコントロール反応には0.5 μ l Tyrode溶液を用い、サンプル解析と同時に解析した。また、 β -actinを内部コントロールとして用いた。

データ解析

Single Cell RT-PCRによる遺伝子発現解析は、(1)各実験の陰性コントロールでいずれのmRNAも検出されないこと、(2) β -actin(内部コントロール)が検出されていること、(3)各GFPマウスから回収した細胞で確実に発現すると考えられるmRNA(Gust、T1R3、またはGAD67)発現が検出されることを条件とし、これらを満たすデータを有効とみなした。

遺伝子	インサイドプライマー (上段:フォワード、下段:リバース)	サイズ	アウトサイドプライマー (上段:フォワード、下段:リバース)	サイズ
Ga 11	GTACCCGTTTGACCTGGAGA GTGATGATTGTGCGGAACAG	207bp	5GTCGATGTGGAGAAGGTCAC TCAGGGAAGTAATCGACCAA	536bp
Ga 12	AAGGGTTCGAGGGTTCTTGT CGGTCCAAGTTATCCAGGAA	257bp	5'-TGGTCAAGATCCTGCTGCT ATACTCGCTCGAGGACACC	602bp,
Ga 13	CTGGTGAAGATCCTGCTGCT CCATGGAGCTGGTTTTTGT	215bp	AGTCCAAGGAGATCGACAAA CCGATCGTAGGCATTCTGTA	404bp
Ga 14	CCATTGACCTGGAAAACAT CAGAAACCAGGGGTAGGTGA	219bp	ACAGGAGGAGGGAGTACCAG TCTCGGTGTCTGTAGCACAA	570bp
Ga15	CTCCGCGGTGATTACCTGT CGTTCTCTCTAGGCACTGG	263bp	ATTCGAGAAGCCATATGCAG CGCATACATGTCCAAGATGA	574bp
Ga i1	GGCTGCAGAAGAAGGCTTTA ATCCACTTCTCCGCTCTGA	300bp	AGGCAGTGGTCTACAGCAAC TTGAGGAAAAGGATGATGGA	588bp
Ga i2	AGGGGCAGTGGACCTGGCAGG GCCTCCAAGCGGCAGAGAGTG	321bp	ATCATCTTCTGTGTCGCCTTG CCACAGTCCTTCAGGTTGTT	963bp
Ga i3	TTTTGAGGGAGTGACAGCAA GTAAGCAGCTGCCTCTTCGT	265bp	TGATGTAGGTGGCCAAAGAT CTGCTGACCCAAGAGACAGT	545bp
Ga t1	GACGTGCATCATTTTCATCG TCACGTCGCATGTTAAGCTC	291bp	GGTGA CTCCAGGATATGTGC GAATCTCAGGGCAAGAGACA	618bp
Ga t2	AACAACCTGGCTGACTCCAC TCCCACATCAAACATCCTGA	285bp	ACCCGAAGAGTGCC TAGAGT ATCACTTCGTCATCCTCCA	538bp
Ga z	GGGCATTGTGGAGAACAAGT GATACGCCGATCTTCTCTG	298bp	GCAGCCTACTACCTGAACGA CTCCTTGGTCTCCTTGTTG	502bp
Ga q	ATGACTTGGACCGTGTAGCC CATGCGGTTCTCATTGTCTG	260bp	ATCCAGGAGTGCTACGACAG TCCACGAACATTTTCAGGAT	524bp
Ga olf	TACACACCCACAGACCAGGA GGTTCGCAACCACCTGTTAT	285bp	CAAGAGCATAGCCCCTATCA GGCATACTCCGGGAAATAGT	556bp
Ga s	TACGAGCGCTCCAATGAGTA CAGGCGGTTAGTCTGGTTGT	310bp	GATGGTGAGAAGGCCACTAAAG GAGGGGTTTTTCAGAATCACTG	1078bp
Gao	GTGTGACGTGGTGAGTCGTA AGGAAAAGCAGATGGTGAGTG	245bp	GGAGTGCTTCAACCGATCTC TGACATCCTCAAAGCAGTGG	547bp

表 2-1 Single Cell RT-PCR で用いたプライマー配列(第一章に掲載したものは省く)。左にインサイドプライマー、右にアウトサイドプライマーを示す。サイズは PCR 産物の大きさを示す。すべての配列は 5'→3'で記す。

遺伝子	インサイドプライマー (上段:フォワード、下段:リバース)	サイズ	アウトサイドプライマー (上段:フォワード、下段:リバース)	サイズ
T1R1	GGTTCTGCCTCACTGTCTCC GCAGCAGCAATAGCGTGTA	339bp	AGGGGGACCCCTCTAGGTTAT ATGATGACCAGTTGGAAGGA	651bp
T1R2	CAAAGCATCGCCTCTACTC AGAATGGCCAGCGTACTGAT	365bp	TGAACATCACCGAGTCCTTT GTGGTAACGCATCCAGAAAC	929bp
PLCβ2	GGTGGAAGAGGAGGAAGAGG CTGACATCCAGCATTCCAGA	352bp	TTTGGAGAGACCTTGCTCAC CCATTGTCTGAAAATTGAGG	628bp
TRPM5	CTGATCGCCATGTTTCAGCTA ACTCTGTGTGCCGTTTTCTCT	335bp	TTCCTGTTTCATTGTGGGAGT GACTCCTGCAACCACAGTTC	971bp
ASIC1	GCCTATGAGATCGCAGGG AAAGTCCTCAAACGTGCCTC	305bp	CGGAGCAGTACAAGGAGTGT CACAGACAAGAGGGAACCAC	699bp
ASIC2	GAAGAGGAAGGGAGCCATGAT GGCAGAAGTTCGCAATGTGT	275bp	GCGCTCAATTACGAGACAAT GCGCTGTAAGAAGTCTGAGC	614bp
ASIC3	CCCAGCTCTGGACGCTATG TCTTCTGGAGCAGAGTGTG	414bp	TCCAGCCCTCCTTATAGCTT GGTCTAGAGCCTTGTCACGA	684bp
ASIC4	GAGTTCACTGCCAGTAGGG AAGGCTGGGGCAGATAAGTT	248bp	GCCTGACATGGTAGACATCC TCTCTTTGCCGTAACGAGTC	674bp
HCN1	CACCGATACCAAGGCAAGAT TGTCCACCGAAAGGGAGTAA	394bp	CTGCTACGCAATGTTTGTG CGAGTCGGTCAATAGCAACT	623bp
HCN4	TGGGGGAAGCAGTATTCCTA CCAGCTTTCGGCAGTTAAAG	388bp	GGCATGGTGAATAACTCCTG TCCAAAATAGGAGCCATCAG	615bp
TRPV1	GTGACCCCTCTTGGTGGAGAA CTTCAGTGTGGGGTGGAGTT	324bp	GCATTACACATTGCCATTGA CAAATCTGTCCCCTTGTC	679bp
PKD1L3	AAAAGGAACCTCCTGGACAC CCAAAACAGCAGGTTGAAAGT	347bp	ACGGTCTTCAATGCTAATGT ATAACCTCCTTGCTCTTGA	671bp
PKD2L1	CTTACCAGGTTTGATCAGG TTCCTCTCCAGCATCTTCAG	300bp	CCCTGTGTACTIONTGTACCT GTGACACCTAGGACGGATTA	680bp
GLAST	GGTAAAATCGTGCAGGTCAC' CCACACCATTGTTCTCTTCC	362bp	ACATGTTCCCTCCCAATCTG CAAGAAGAGGATGCCAGAG	673bp
GAD67	-CATTCTGGTCAAGGAAAAGG CAGCTCTAGCAGGGAGGTAG	240bp	AGATAGCCCTGAGCGACGAG ATGGCCGATGATTCTGGTTC	986bp

表 2-2 Single Cell RT-PCR で用いたプライマー配列(第一章に掲載したものは省く)。左にインサイドプライマー、右にアウトサイドプライマーを示す。サイズは PCR 産物の大きさを示す。すべての配列は 5'→3'で記す。

結果

Gustducin 発現細胞の遺伝子発現

はじめに、Gustducin-GFP 細胞における Gαgustducin 以外の 15 種の G 蛋白 α サブユニット(Gα11、Gα12、Gα13、Gα14、Gα15、Gαi1、Gαi2、Gαi3、Gαt1、Gαt2、Gαz、Gαq、Gαolf、Gαs、Gαo)の発現探索を行った。本研究で用いた Single Cell-RT-PCR 法では、多種の mRNA の検出を同時に行うことができるが、その種類を増やすことにより各 mRNA 発現の検出効率が減少すると考えられる。そのため、これら Gαサブユニットを2つのセット(Gα11、Gα12、Gα13、Gα14、Gα15、Gαi1、Gαi2、Gαi3、GαGust のセットと Gαt1、Gαt2、Gαz、Gαq、Gαolf、Gαs、Gαo、GαGust のセット)に分け発現解析を行った。その結果、茸状乳頭の Gust-GFP 味細胞では、Gαi2 の発現頻度が高く(78%、25/32)、次いで Gαs(72%、24/33)、Gα11(53%、17/32)、Gαq(48%、16/33)、Gαi1(37.5%、12/32)、Gαi3(37.5%、12/32)の順に発現頻度が高かった。また、Gα14(31%、10/32)、Gα12(25%、2/32)、Gα13(9.3%、3/32)、Gαo(9.0%、3/33)、Gα15(6.25%、2/32)、Gαolf(6.0%、2/33)、Gαz(3.0%、1/32)の発現も見られたが、発現頻度は低かった。一方、有郭乳頭の Gust-GFP 味細胞では、Gαi2(96%、25/26)、Gαs(96%、24/25)の発現率が最も高く、次いで、Gα11(73%、19/26)と Gα14(73%、19/26)、Gαq(68%、17/25)の発現頻度が高かった。Gαi3(53.8%、14/26)、Gα13(38.4%、10/26)、Gαz(20%、5/25)、Gαi1(19.2%、5/26)、Gαo(12%、3/25)、Gα12(11.5%、3/26)の発現も認められた。茸状乳頭、有郭乳頭いずれにおいても Gαt1、Gαt2 の発現は検出できなかった(図 13)。茸状乳頭と有郭乳頭の Gustducin-GFP 味細胞で発現頻度に有意差が見られたものは Gα13(9.3%対 38.4%)および Gα14(31%対 73%)の2種類のみで、他の Gα サブユニットの発現頻度には有意差は見られなかった。

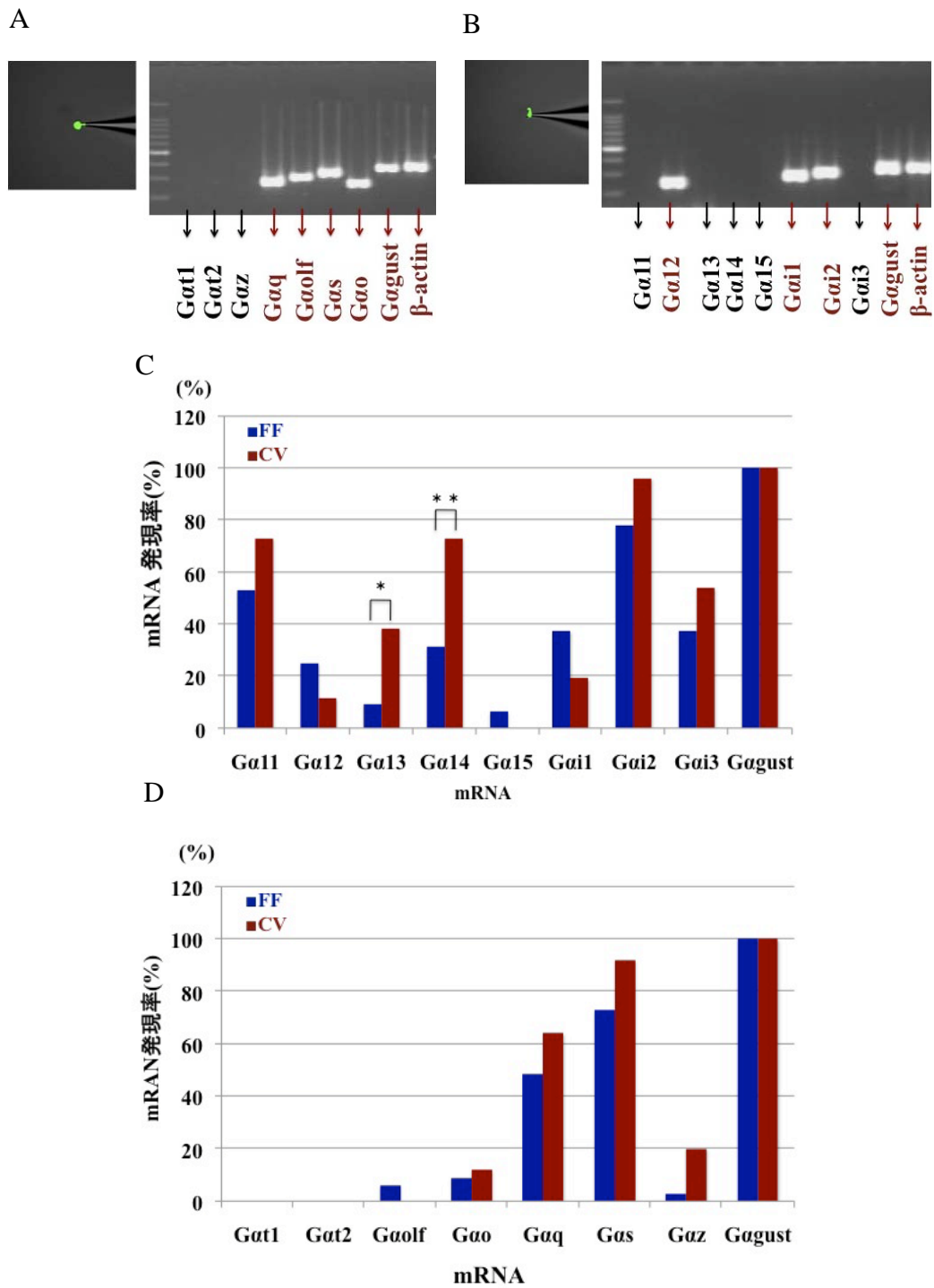


図 13 Single Cell RT-PCR による Gustducin-GFP 細胞における各 $G\alpha$ サブユニットの発現解析。茸状乳頭(A)、および有郭乳頭(B)の Gustducin-GFP 細胞における $G\alpha$ サブユニット発現解析の例。C,D: Gustducin-GFP 細胞における各 $G\alpha$ サブユニットの発現頻度。FF:茸状乳頭、CV:有郭乳頭を示す。茸状-有郭乳頭間で $Ga13$ および $Ga14$ の発現頻度に有意差が見られた。(*: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 、z-test for proportion)

次に両乳頭で発現頻度の高かったGα11、Gα14、Gαi2、Gαq、Gαsの5種類のGαサブユニットに加え、甘味、うま味の受容体であるT1R1、T1R2、T1R3、甘味、苦味、うま味の細胞内情報伝達に關与するPLCβ₂、TRPM5、I型細胞のマーカであるGLAST (Lawton et al., 2000)、III型細胞のマーカであるGAD67 (Defazio et al., 2006)、およびSNAP25 (Clapp et al., 2006) について発現解析を行った。その結果、15個の茸状乳頭Gustducin-GFP細胞において、I型細胞やIII型細胞のマーカであるGLAST、SNAP25は検出されなかった(図14、表3)。Gαサブユニットの中ではGαs(53.3%、8/15)の発現頻度が最も高く、次いでGαi2(40%、6/15)、Gα11(26.7%、4/15)、Gαq(26.7%、4/15)の順で発現頻度が高かった。Gα14は検出されなかった。甘味・うま味の受容に關する分子群では、PLCβ₂(80%、12/15)やTRPM5(46.7%、7/15)を発現する細胞が多かった。また、T1R1(20%、3/15)やT1R3(13%、2/15)を発現する細胞も存在し、1個の細胞でこれら遺伝子の共発現が見られ、3個の細胞では単独で検出された(表3)。T1R2は検出されなかった。発現が見られなかったGα14を除くGαサブユニットの発現パターンをもとにクラスター解析を行った結果、Gustducin-GFP細胞は3つの群(Gαi2とGαsを共発現する群、Gαi2を発現せずGαsを発現する群、Gαsを発現しない群)に大別された(図15)。

一方、有郭乳頭Gustducin-GFP細胞でもGLAST、GAD67、SNAP25は検出されなかった。Gαサブユニットでは、Gαq(50%、9/18)を発現する細胞が最も多く、次いで、Gαs(44.4%、8/18)、Gα11(33.3%、6/18)、Gα14(33.3%、6/18)、Gαi2(28.6%、2/7)を発現する細胞が見られた。PLCβ₂(61.1%、11/18)やTRPM5(44.4%、8/18)の発現頻度も高かった。また、T1Rsはほとんど検出することができず、T1R1が4細胞(22.2%)に単独で検出されるのみであった(図14、表3)。データ数の少ないGαi2を除く4つのGαサブユニット発現パターンをもとにクラスター解析を行っ

たところ、Gustducin-GFP味細胞は2つの群（Gas/qを共発現する群としない群、ただし2番の細胞を除く）に大別された（図16）。

有郭乳頭、茸状乳頭間で発現頻度の差を検索したところ、Gα14の発現頻度で有意差が見られ（図14）、これはGαサブユニットの発現だけを調べた結果と一致する（図13）。また、Gαサブユニット間およびGαとT1Rs間の相関関係を χ^2 検定により解析したところ、どのサブユニットの共発現率も期待値にほぼ近く、有意差は見られないことから、特定のGα間またはGα-T1Rs間で発現の偏りはないと考えられる。

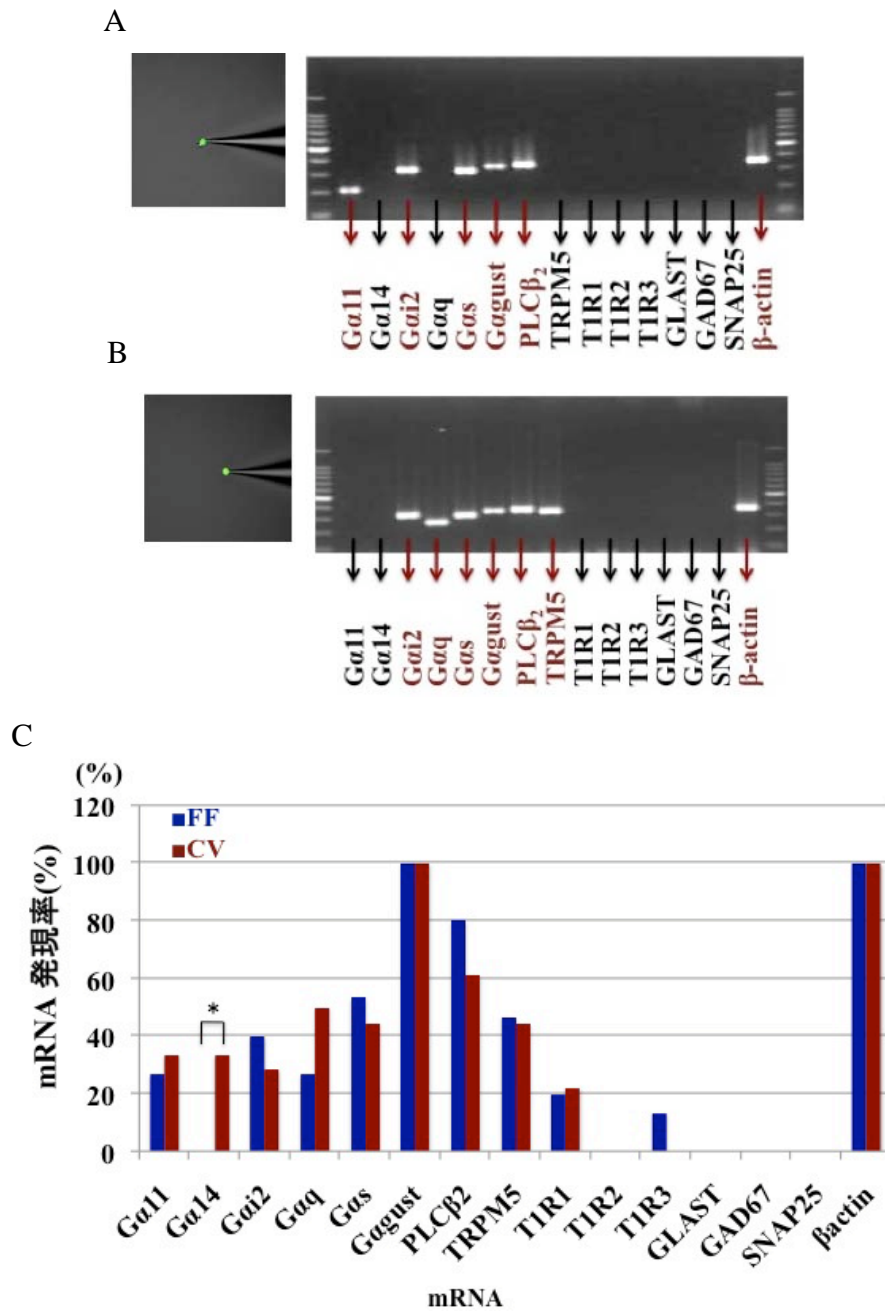


図 14 Single Cell RT-PCR による Gustducin-GFP 細胞における $G\alpha$ サブユニットおよび味覚関連遺伝子の発現解析。茸状乳頭(A)、および有郭乳頭(B)の Gustducin-GFP 細胞における発現解析例。C: Gustducin-GFP 細胞における各 $G\alpha$ サブユニットおよび味覚関連遺伝子の発現頻度。FF: 茸状乳頭 CV: 有郭乳頭を示す。Gα14 の発現のみ茸状乳頭—有郭乳頭間で発現頻度に有意差が見られた。 (* : $p < 0.05$, z-test for proportion)

茸状乳頭

Cell#	β -actin	Gagust	PLC β 2	Gaq	Gos	TRPM5	Gai2	Gai1	Gaq	TIR1	TIR3	Gai14	TIR2	GLAST	GAD67	SNAP25
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	N.E.	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	N.E.	-
4	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N.E.	-
8	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	N.E.	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

有郭乳頭

Cell#	β -actin	Gagust	PLC β 2	Gaq	Gos	TRPM5	Gai1	Gai14	TIR1	Gai2	TIR2	TIR3	GLAST	GAD67	SNAP25	
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	N.E.	-	
2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	N.E.	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	-	-	+	-	N.E.	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	+	+	-	+	-	+	N.E.	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	+	+	-	-	-	N.E.	-	-	-	N.E.	-	-
10	+	+	+	-	-	-	+	+	-	N.E.	-	-	-	N.E.	-	-
11	+	+	+	-	-	-	+	-	-	N.E.	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	+	-	+	-	-	+	N.E.	-	-	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-	+	+	-	N.E.	-	-	-	N.E.	-	-
14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	N.E.	-	-	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	+	-	-	-	N.E.	-	-	-	N.E.	-	-
16	+	+	-	+	-	-	-	-	-	N.E.	-	-	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	-	-	+	-	N.E.	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	+	-	N.E.	-	-	-	-	-	-

表 3 茸状乳頭（上）および有郭乳頭（下）の Gustducin-GFP 発現細胞の遺伝子発現プロファイル。+は発現あり、-は発現なし、N.E.は No Examination を示す。

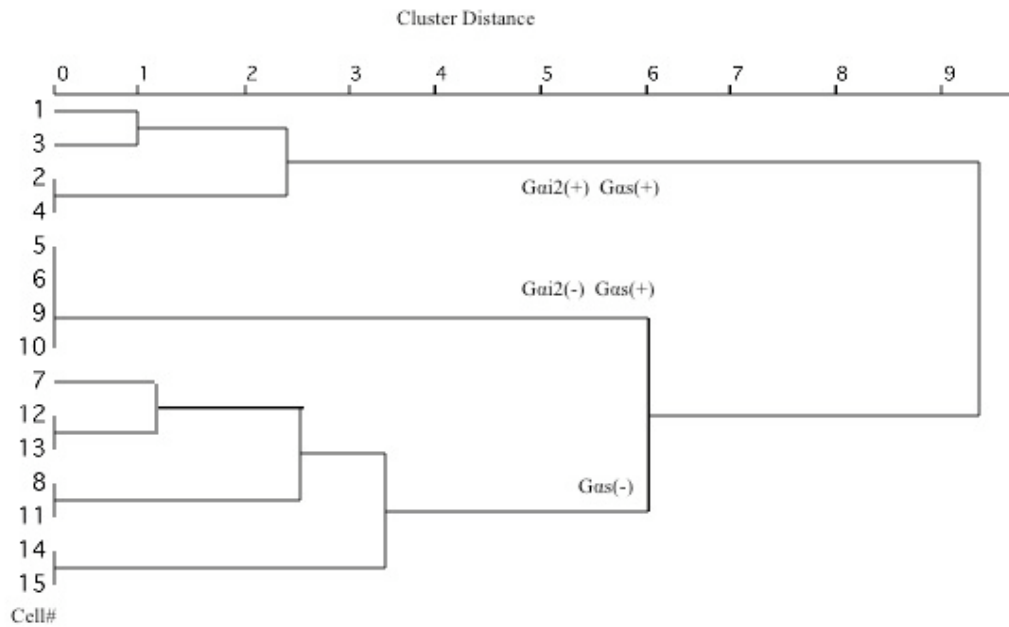


図 15 $G\alpha$ サブユニットの mRNA の発現パターンをもとにした茸状乳頭 Gustducin-GFP 味細胞のクラスター分析結果。左は細胞番号(表 3 と同様)を示す。 $G\alpha 14$ の mRNA の発現はみられなかったため、4 種の $G\alpha$ サブユニットの発現パターンにより解析した。 $Gai2$ と Gas を発現する群、 $Gai2$ を発現せず Gas を発現する群、 Gas を発現しない群に大別される。

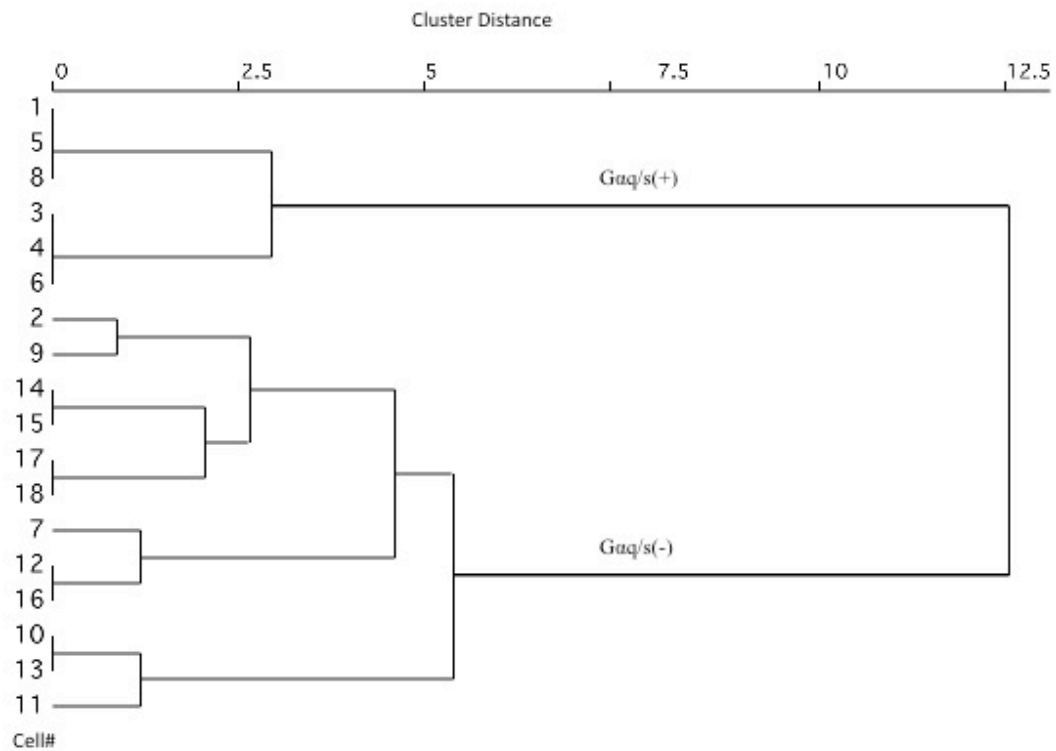


図 16 $G\alpha$ サブユニットの mRNA 発現パターンをもとにした有郭乳頭 Gustduin-GFP 細胞のクラスター分析結果。左は細胞番号(表 3 と同様)を示す。データ数の少ない $Gai2$ を除く 4 種の $G\alpha$ サブユニットの発現パターンにより解析を行った。細胞は 2 つの群 (Gaq/s を共発現する群と Gaq/s の共発現がない群) に大別された。

T1R3 発現味細胞の遺伝子発現

T1R3 は甘味、うま味の受容体コンポーネントであり (Bachmanov et al., 2001; Hoon et al., 1999; Kitagawa et al., 2001; Max et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Nelson et al., 2001; Sainz et al., 2001)、その発現細胞は甘味刺激に応答することが報告されている(Yoshida et al., 2010)。甘味応答細胞での各種遺伝子の発現を調べるため、T1R3 発現細胞がGFPを発現するT1R3-GFPマウスを用い、T1R3-GFP細胞における各種mRNA発現(*Gα11*、*Gα14*、*Gai2*、*Gαq*、*Gas*、*Gagust*、*PLCβ₂*、*TRPM5*、*T1R1*、*T1R2*、*T1R3*、*GLAST*、*GAD67*、*SNAP25*、*β-actin*)をSingle Cell RT-PCRにより解析した。その結果、茸状乳頭T1R3-GFP細胞では*Gas*(88.9%、8/9)を発現する細胞が最も多く、次いで*Gagust*(77.8%、7/9)、*Gai2*(66.7%、6/9)、*Gαq*(66.7%、6/9)、*Gα11*(33.3%、3/9)、*Gα14*(11.1%、1/9)の順で発現頻度が高かった。*PLCβ₂*(100%、9/9)や*TRPM5*(66.7%、6/9)の発現は多くの細胞で見られ、*T1R1* と *T1R2* の発現頻度は同程度(44.4%、4/9)であった。また、そのうち 1 個の細胞は*T1R1*、*T1R2*、*T1R3* すべてを共発現していた(図 17、表 4)。*Gα*サブユニットのmRNAの発現パターンをもとにクラスター解析を行ったところ、これらの細胞は、*Gagust*の発現により 2 群に分けられた(図 18)。一方、有郭乳頭T1R3-GFP細胞でも茸状乳頭と同様、*PLCβ₂* (100%、21/21)や*TRPM5*(90.5%、19/21)の発現頻度は高かった。*Gα*サブユニットでは、*Gas*(85.7%、18/21)を発現する細胞が最も多く、次いで*Gαq*(81%、17/21)、*Gα14*(81%、17/21)、*Gai2*(71.4%、15/21)、*Gagust*(19%、4/21)の順で発現頻度が高かった。*T1R1*(66.7%、14/21)、*T1R2*(57.1%、12/21)の発現頻度は同程度であり、調べた細胞の半数近く (42.9%、9/21)で*T1R1/T1R2/T1R3* が共発現していた(図 17、表 4)。*Gα*サブユニットの発現パターンによるクラスター解析を行ったところ、*Gas*、*Gα11*、*Gαq*、*Gagust*、*Gai2* の発現の有無の順に分類された(図 19)。茸状乳頭と有郭乳頭のT1R3-GFP細胞で発現頻度に有意差が見ら

れたものはGα14 とGαgustで、Gα14 は有郭乳頭で、Gαgustは茸状乳頭で有意に発現頻度が高かった(z-test for propotion、図 17)。また、各遺伝子間の相関関係を χ^2 検定により解析したところ、どのサブユニットの共発現率も期待値にほぼ近く、有意差は見られず、特定遺伝子間で発現の偏りはないと考えられる。

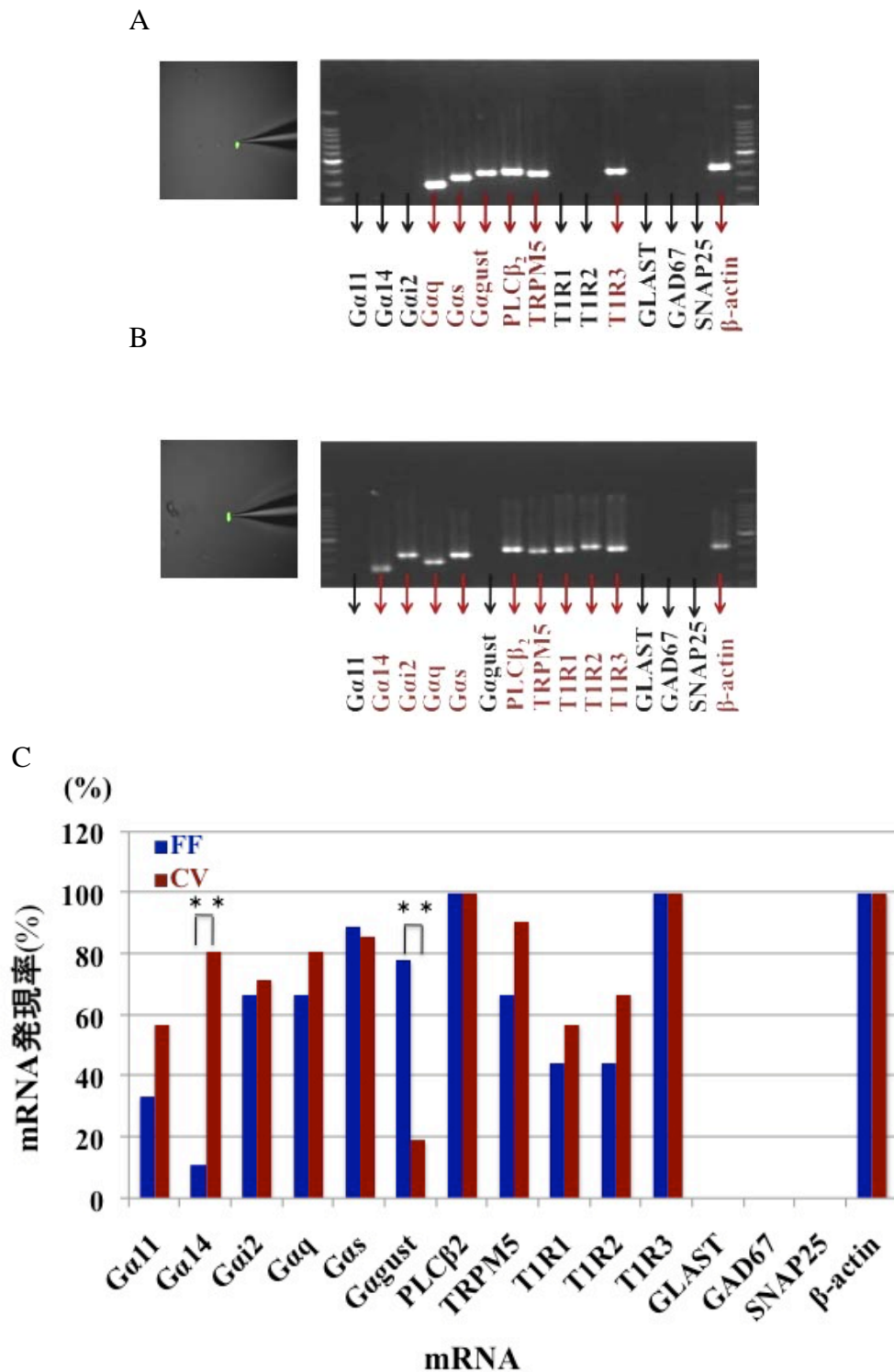


図 17 Single Cell RT-PCR による T1R3-GFP 細胞における遺伝子発現解析。茸状乳頭 (A)、および有郭乳頭(B)の T1R3-GFP 細胞の遺伝子発現解析例。C: T1R3-GFP 細胞における各 $G\alpha$ サブユニットおよび味覚関連遺伝子の発現頻度。FF:茸状乳頭 CV:有郭乳頭を示す。Ga14 は有郭乳頭で、Gagust は茸状乳頭で有意に発現頻度が高かった。 (* * : $p < 0.01$ 、z-test for proportion)

茸状乳頭

Cell#	β -actin	T1R3	PLC β 2	Gas	Gagust	Gai2	Gaq	TRPM5	T1R1	T1R2	Ga11	Ga14	GLAST	SNAP25	GAD67
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	N.E.
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	N.E.
3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	N.E.
4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	N.E.
5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	N.E.
6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	N.E.
7	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	N.E.
8	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	N.E.
9	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	N.E.

有郭乳頭

Cell#	β -actin	T1R3	PLC β 2	TRPM5	Gas	Gaq	Ga14	Gai2	T1R2	T1R1	Ga11	Gagust	GLAST	SNAP25	GAD67
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
17	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 4 茸状乳頭（上）および有郭乳頭（下）の T1R3-GFP 細胞の遺伝子発現プロファイル。+は発現あり、-は発現なし、N.E.は No Examination を示す。

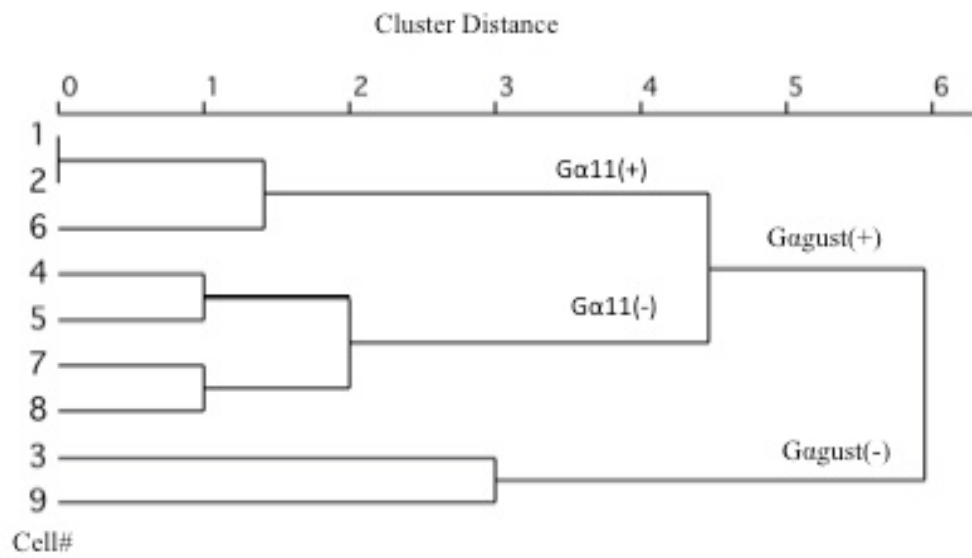


図 18 $G\alpha$ サブユニットの発現パターンを基にした茸状乳頭 T1R3-GFP 細胞のクラスター解析結果。左は細胞番号（表 4 と同様）を示す。細胞は *gustducin* の有無で 2 群に大別される。

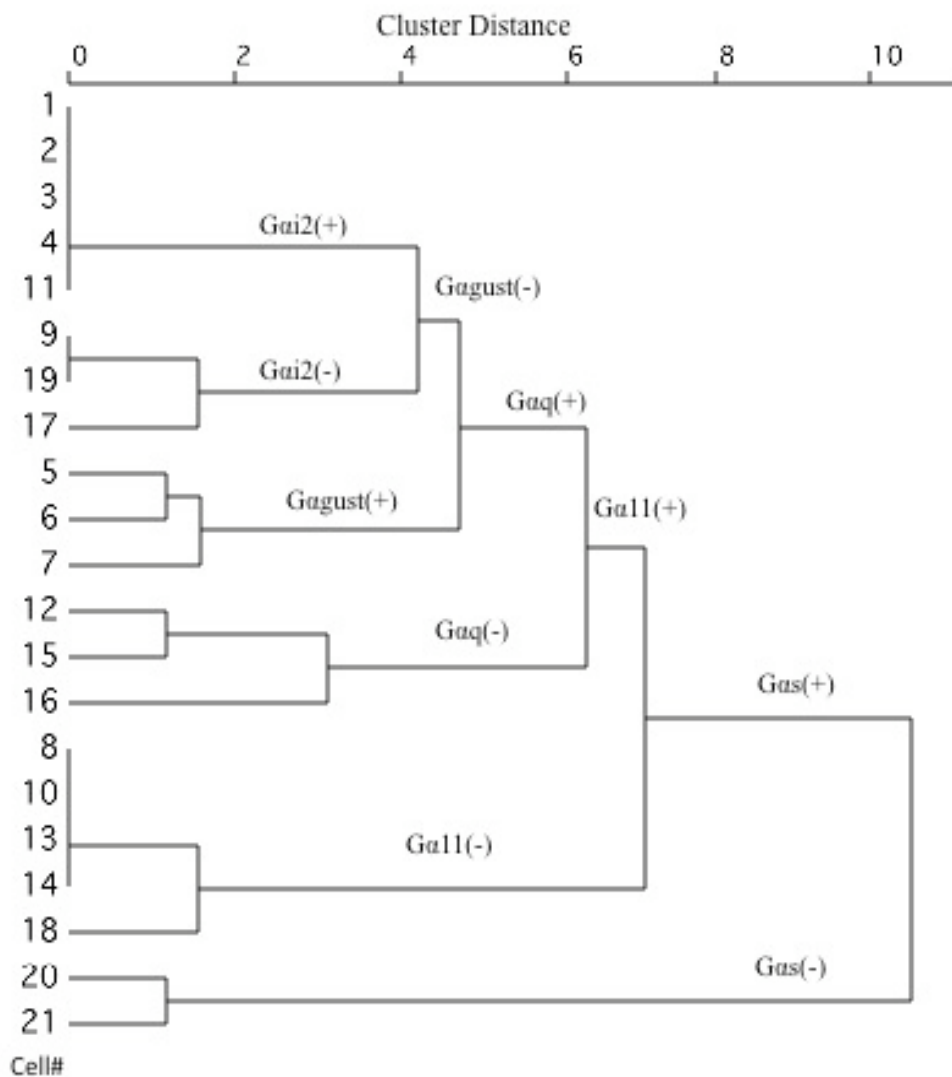


図 19 $G\alpha$ サブユニットの発現パターンをもとにした有郭乳頭 T1R3-GFP 味細胞のクラスター解析結果。左は細胞番号（表 4 と同様）を示す。細胞は *Gas*、*Ga11*、*Gaq*、*Gagust*、*Gai2* の発現の有無の順で分類された。

GAD67 発現味細胞の遺伝子発現

第1章で示したように GAD67-GFP 細胞は酸味刺激に応答を示す。酸味受容体候補分子としては ASICs(1~4、Ugawa et al; 1998, 2003)、HCN1、4 (Stevens et al., 2001)、PKD1L3/2L1(Huang et al., 2006; Ishimaru et al; 2006)、TRPV1(Lyall et al., 2004; Treesukosol et al., 2007)が挙げられる。そこで、GAD67-GFP 細胞におけるこれら受容体候補遺伝子の発現パターンを Single Cell RT-PCR により調べた。茸状乳頭 GAD67-GFP 細胞では、I 型および II 型のマーカーである GLAST および Gαgust を発現する細胞はなかった。また多くの細胞は SNAP25(91%、21/23)を発現し、これは以前の Single cell RT-PCR による結果 (DeFazio et al., 2006) と一致する。酸味受容体候補遺伝子の発現は、HCN1(71.4%、20/28)の発現頻度高く、HCN4(32%、9/28)の発現も検出された。また、14%(4 個)の細胞で HCN1 と HCN4 の共発現が見られた。PKD2L1(64%、18/28)の発現頻度も高かったが、PKD1L3 を発現する細胞はなく、これは茸状乳頭領域で PKD1L3 の発現が検出されなかった以前の報告 (Ishimaru et al., 2006; Huang et al., 2006) と一致する。21 個の PKD2L1 発現細胞のうち、ほぼ半数近く(47.6%、10/21)が HCN1 を共発現し、33.3%(7/21)が HCN4 を共発現していた。さらに 19%(4/21)の細胞は PKD2L1/HCN1/HCN4 を共発現していた。しかし、ASICs と TRPV1 の mRNA の発現は検出できなかった(図 20、表 5)。酸味受容体候補遺伝子 mRNA の発現パターンをもとにクラスター分析を行ったところ、GAD67-GFP 細胞は 1 つの細胞 (No.22)を除き、3 群に大別された。第一群は PKD2L1 と HCN1 が共発現する群で、第 2 群は、PKD2L1 を発現せず、HCN1 や HCN4 を発現する群、第 3 群が PKD2L1 を発現するが、HCN1 との共発現が見られない群である(図 21)。一方、25 個の有郭乳頭 GAD67-GFP 細胞は、すべて PKD1L3 を発現していた。PKD2L1(28%、7/25)、HCN1(12%、3/25)、HCN4(4%、1/25)、ASIC1(4%、1/25)

を発現する細胞も存在した。7個の PKD2L1 発現細胞のうち2個 (28.5%)が HCN1 を共発現し、HCN4 を共発現する細胞は見られなかった。また、他の ASICs および TRPV1 の発現は見られなかった(図 20、表 5)。この発現パターンをもとにしたクラスター分析では、これらの細胞は PKD2L1 の発現の有無で 2 群に大別された (図 22)。茸状乳頭と有郭乳頭の GAD67-GFP 発現細胞では、HCN1、HCN4、PKD2L1、PKD1L3 の発現頻度に有意差があり、PKD1L3 は有郭乳頭で、それ以外は茸状乳頭で有意に発現頻度が高かった(z-test for proportion、図 20)。

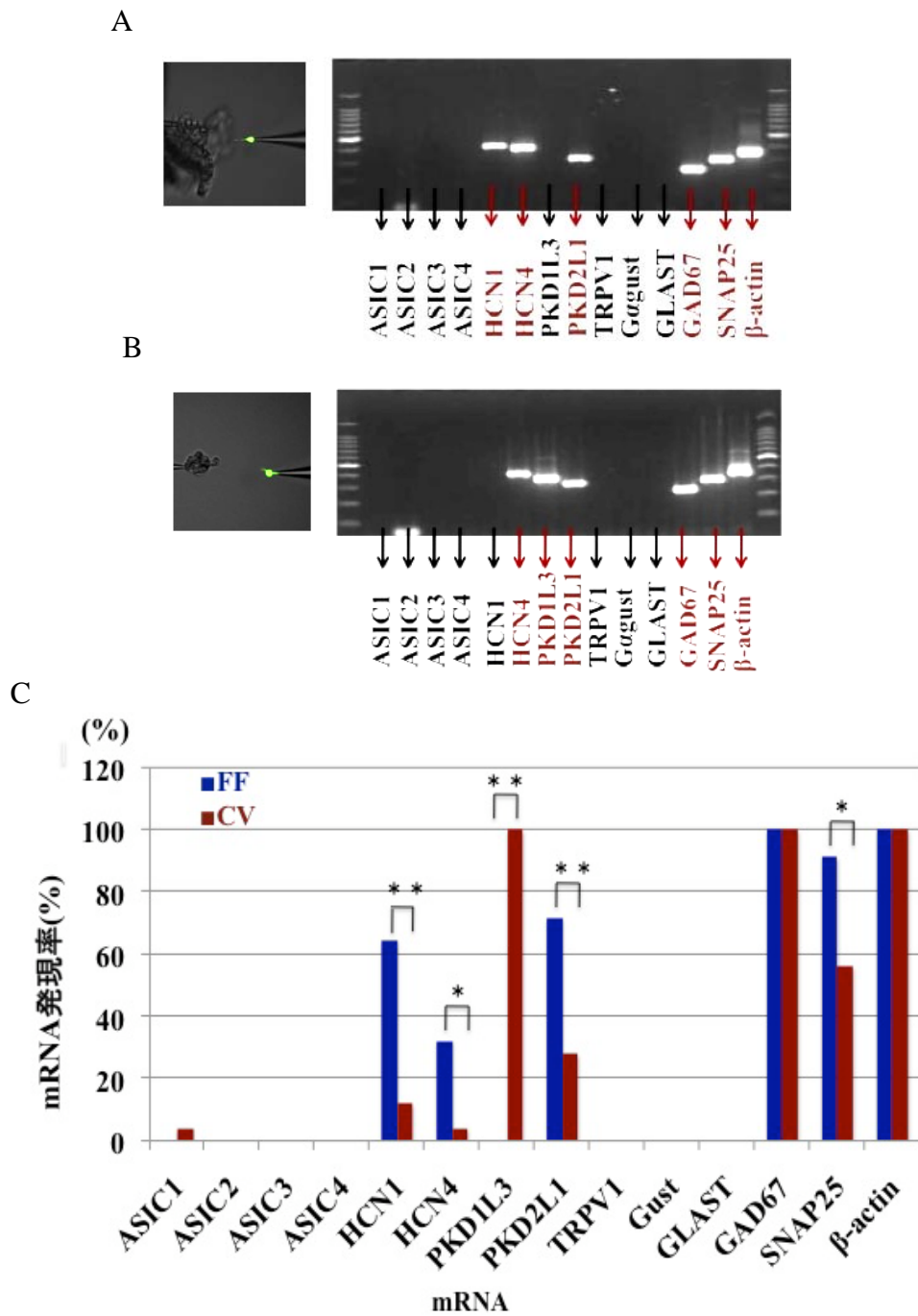


図 20 Single cell RT-PCR による GAD67-GFP 細胞における酸味受容体候補遺伝子の発現解析。茸状乳頭(A)、および有郭乳頭(B)の GAD67-GFP 細胞における発現解析例。C: GAD67-GFP 細胞における各酸味受容体候補遺伝子の発現頻度。FF:茸状乳頭 CV:有郭乳頭を示す。HCN1、PKD2L1、HCN4、SNAP25 の発現頻度は茸状乳頭で、PKD2L1 をの発現頻度は有郭乳頭で、有意に高かった (*: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, z-test proportion)

茸状乳頭

Cell#	β -actin	GAD67	SNAP25	PKD2L1	HCN1	HCN4	PKD1L3	ASIC1	ASIC2	ASIC3	ASIC4	TRPV1	GLAST	Gcgust
1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	N.E.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	N.E.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	N.E.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	N.E.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	+	+	N.E.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

有郭乳頭

Cell#	β -actin	GAD67	PKD1L3	SNAP25	PKD2L1	HCN1	HCN4	ASIC1	ASIC2	ASIC3	ASIC4	TRPV1	GLAST	Gcgust
1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 5 茸状乳頭（上）および有郭乳頭（下）の GAD-GFP 細胞の遺伝子発現プロファイル。+は発現あり、-は発現なし、N.E.は No Examination を示す。

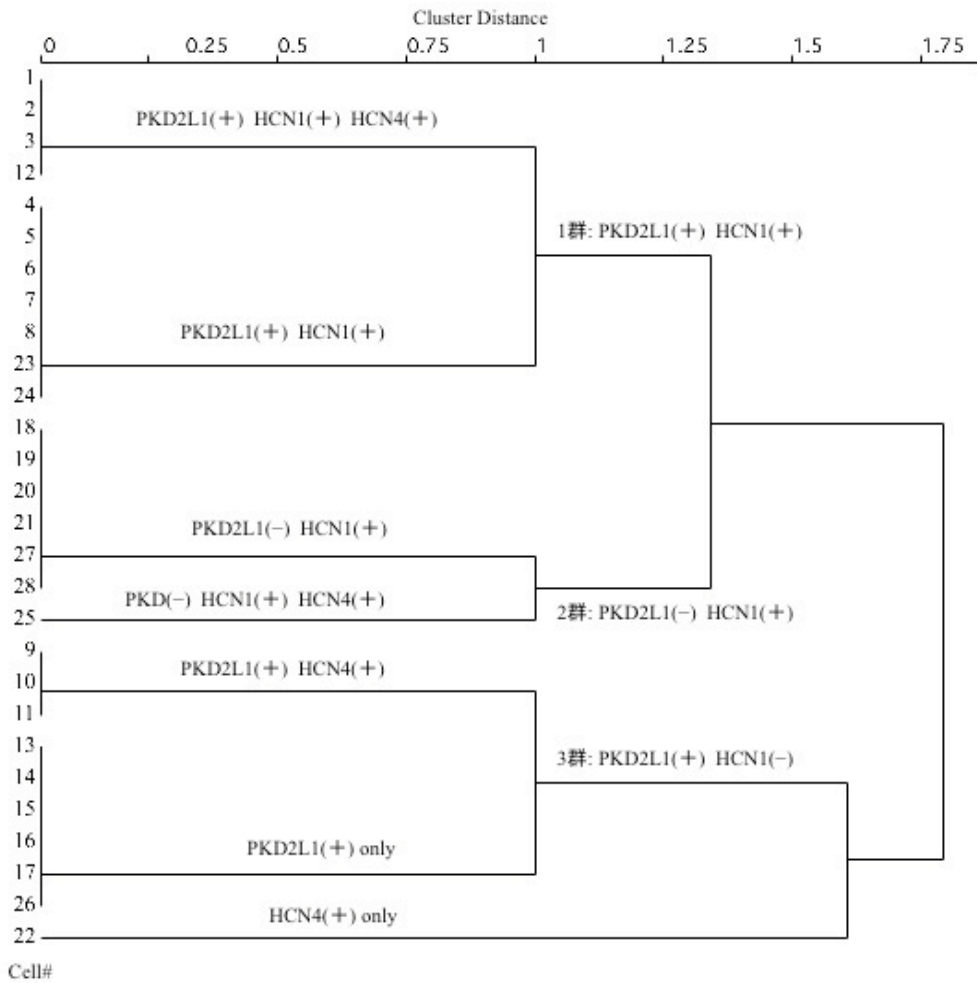


図 21 酸味受容体候補遺伝子の発現パターンをもとにした茸状乳頭 GAD67-GFP 味細胞のクラスター解析結果。左端には細胞番号(表 5 と同じ)を示す。茸状乳頭 GAD67-GFP 味細胞は遺伝子発現パターンにより 3 つの群(22 番の細胞を除く)に分類できる。1 群: PKD2L1、HCN1 とともに発現する群、2 群: HCN1 は発現するが、PKD2L1 は発現しない群、3 群: PKD2L1 は発現するが、HCN1 は発現しない群。

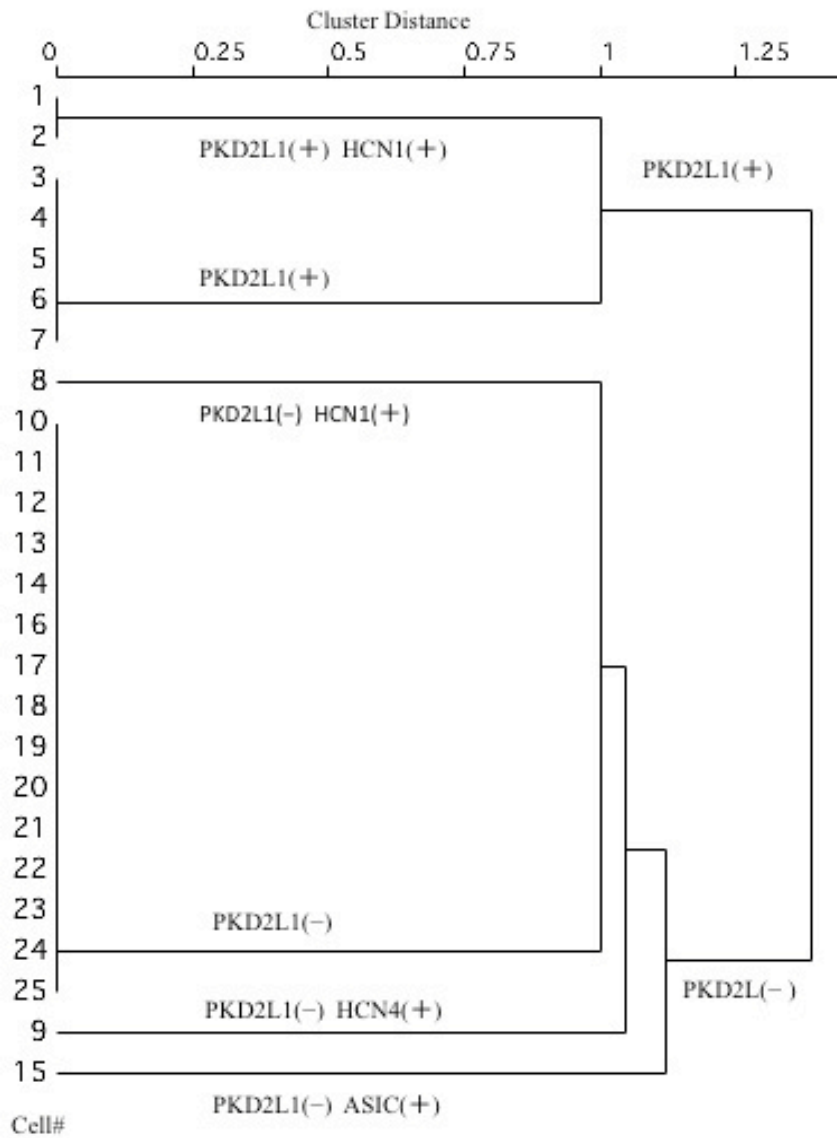


図 22 酸味受容体候補遺伝子の発現パターンをもとにした有郭乳頭 GAD67-GFP 味細胞のクラスター解析結果。左端に細胞番号（表 5 と同じ）を示す。PKD2L1 の発現の有無により 2 つの群に大別できる。

考察

本研究では3種の遺伝子改変マウス(Gustducin-GFPマウス、T1R3-GFPマウス、GAD67-GFPマウス)を用い、各GFP発現細胞におけるG α サブユニットや酸味受容体候補遺伝子の発現パターンをSingle cell RT-PCR法により解析した。その結果、Gustducin-GFP細胞やT1R3-GFP細胞でG α 11、G α 14、G α i2、G α q、G α sの発現頻度が高く、これらのG α がGustducin非依存性の甘味、うま味、苦味の受容経路に関与する可能性が考えられる。また、茸状乳頭と有郭乳頭の間でG α 14(Gustducin-GFP細胞およびT1R3-GFP細胞)とGustducin(T1R3-GFP細胞)の発現頻度に有意差が見られた。この発現頻度の差はG α 14やG α gustが舌部位による味覚感受性の差に関与する可能性が考えられる。また茸状乳頭GAD67-GFP発現細胞ではPKD2L1の他にHCN1やHCN4の発現が見られたことから、舌前方部ではPKD2L1以外にHCNも酸味受容に重要な役割を果たす可能性が考えられる。

Single Cell RT-PCRの実験において、ある細胞に発現していないmRNAを誤って検出する偽陽性や、逆に発現しているにもかかわらずmRNAの発現を検出できない偽陰性の結果が生じる可能性が考えられる。本研究では、Gustducin-GFP細胞に他の細胞型マーカーであるGLAST、GAD67、SNAP25の発現が見られず(図13、14)、GAD67-GFP細胞にはGLASTやGustducinの発現が見られなかった(図20)ことから、Single Cell RT-PCRによる遺伝子発現解析において偽陽性の結果が得られた可能性は低いと考えられる。しかし、偽陰性の結果が得られた可能性は十分に考えられる。例えば、Gustducin-GFP細胞においてG α サブユニットの発現を網羅的に探索した場合(図13)と比較し、5種のG α サブユニットとそれ

以外の遺伝子(PLC β_2 、TRPM5、T1R1、T1R2、T1R3、GLAST、GAD67、SNAP25)の発現を解析した場合(図14)、G α サブユニットの検出率がそれぞれ20~30%程度低下した。前者の実験で同時検出を試みた遺伝子数(8~9種)よりも後者の実験で同時検出を試みた遺伝子数(15種)の方が多いことから、より多くの遺伝子の発現を同時に解析した場合に各遺伝子の検出率が低下する可能性が考えられる。また、以前の研究で発現が確認されているASICs(Ugawa et al., 1998, 2003)やTRPV1(Lyall et al., 2004; Treesukosol et al., 2007)は味蕾から精製したmRNAを用いたポジティブコントロールの実験においても検出されない場合があり、本研究で用いた発現検出用のプライマーの設定が悪いか、あるいはこれらのmRNAの発現が非常に少なく、検出できなかった可能性が考えられる。これらを検出するためにはプライマー設定を変更することや、同時検出する遺伝子の数を減らすなどの条件を変更する必要がある。

味蕾において、II型細胞はGタンパク共役型受容体(GPCR)である甘味(T1R2/T1R3)、苦味(T2Rs)、またはうま味受容体(T1R1/T1R3)を発現している。GPCRに結合するGタンパク質は、 α 、 β 、 γ サブユニットからなる三量体を形成し、 $\beta\gamma$ ユニットは限られた組み合わせのみでしか結合できず、また両者は強く結合している。 α サブユニットは現在16種の遺伝子(G α 11、G α 12、G α 13、G α 14、G α 15、G α q、G α i1、G α i2、G α i3、G α ust、G α s、G α olf、G α o、G α t1、G α t2、G α z; Gilman, 1987; Simon et al., 1991; Neer et al., 1995)が知られており、これらがシグナル伝達において多様性をもたらすと考えられている。G α -gustducinは味覚受容細胞に特異的に発現するG α サブユニットとしてクローニングされ(McLaughlin et al., 1992)、主にII型細胞に発現し(Yang et al., 2000)、甘味、苦味、うま味の受容に関与する(Wong et al., 1996; He et al., 2004)。しかしGustducinノックアウトマウスにおいて甘味、苦味、うま味に対する神経・行動応答は大幅に減少するが、

完全には消失しないことが報告されており (Wong et al., 1996; He et al., 2004)、甘味、苦味、うま味の受容に *Gustducin* 非依存的な経路が存在することを示唆している。本研究では、*Gustducin*-GFP 細胞において $G\alpha$ サブユニットのうち $G\alpha 11$ 、 $G\alpha 14$ 、 $G\alpha q$ 、 $G\alpha s$ 、 $G\alpha i 2$ の発現頻度が高いことを示した(図 13、14)。これは、*Gustducin* 発現細胞において、これらのサブユニットを介し *Gustducin* 非依存性の応答を生じさせる可能性を示唆する。以前の研究で、シクロヘキシミドに応答した細胞に $G\alpha i 2$ が発現することが免疫組織化学的手法を用い示されており (Caicedo et al., 2003)、 $G\alpha i 2$ は苦味応答に関与する可能性が考えられる。また $G\alpha 14$ の発現は、茸状乳頭領域よりも有郭乳頭領域に強いとの報告 (Tizzano et al., 2008) があり、これは本研究で見られた茸状乳頭と有郭乳頭領域における *Gustducin*-GFP 細胞の $G\alpha 14$ 発現率の差と一致する (図 13)。一方、 $G\alpha 14$ は有郭乳頭領域で *Gustducin* とは共発現せず、 $T1R3$ と共発現する (Shindo et al., 2008) という報告があり、この結果とは一部矛盾する。本研究においても、有郭乳頭の $T1R3$ -GFP 細胞において $G\alpha 14$ の発現頻度は非常に高かったが、有郭乳頭の *Gustducin*-GFP 細胞においても $G\alpha 14$ の発現率は高かった。これは用いた実験手法 (*in situ hybridization* と *Single Cell-RT PCR*) の違いにより生じる可能性が考えられる。いずれにせよ、有郭乳頭領域では $T1R3$ -GFP 発現細胞にて $G\alpha 14$ が高頻度で発現することから、これが甘味・うま味の受容に関与する可能性を示唆する。

マウスの甘味応答はインド原産の植物 *Gymnema sylvestre* に含まれるペプチドであるグルマリンにより抑制を受ける (Ninomiya and Imoto, 1995)。グルマリンの甘味抑制効果は舌前方の鼓索神経領域 (茸状乳頭部) では見られるが舌後方の舌咽神経領域 (有郭乳頭部) では見られない (Ninomiya et al., 1997)。このグルマリン感受性の違いは $T1R2$ 、 $T1R3$ 、*gustducin* の発現パターンの違いにより生じることが示唆される (Shigemura et al., 2008)。本研究においても有郭乳頭領域では

T1R3-GFP 細胞の Gustducin 発現頻度は有郭乳頭領域と比較し有意に低く、また有郭乳頭 Gustducin-GFP 細胞で T1R3 の発現が見られなかった (図 14、17)。茸状乳頭領域において T1R2、T1R3、Gustducin を共発現する細胞が多く、有郭乳頭では見られないことから、これらのコンポーネントがグルマリン感受性に関連する可能性が示唆される。

近年、レプチンや内因性カンナビノイドが甘味感受性細胞に存在する受容体を介し、味細胞の甘味物質に対する応答を調節することが明らかとなった (Kawai et al., 2000; Nakamura et al., 2004; Shigemura et al., 2003, 2004; Yoshida et al., 2010)。レプチンの受容体である Ob-Rb は酵素型受容体として機能するため (Darnell et al., 1997; Goiot et al., 2001; Rosenblum et al., 1996; Shigemura et al., 2003) 三量体 G タンパク質とは共役しないが、内因性カンナビノイドの受容体である CB₁ は GPCR であり (Matsuda et al., 1990; Howlett, 2004; Bosier et al., 2010)、その下流の情報伝達には三量体 G タンパク質を要する。CB₁ に共役する G α として Gai/o (cAMP の減少)、Gas (cAMP の増加)、Gaq (細胞内 Ca²⁺ の上昇) が関与する (Matsuda et al., 1990; Howlett, 2004; Bosier et al., 2010)。本研究では T1R3-GFP 細胞で Gas、Gaq、Gai2 のサブユニットの発現が見られたことから、これらが内因性カンナビノイドによる甘味感受性味細胞の応答増強に関与する可能性が考えられる。味細胞における甘味の細胞内情報伝達には細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加が関与することや、細胞内 cAMP 濃度の低下が Ca²⁺ 伝達系に重要である可能性が示唆されること (Clapp et al., 2008; Trubey et al., 2006) から、特に Gai2 または Gaq の関与が疑われる。しかし、これを解明するには更なる研究が必要である。

第 1 章で示したように酸味は GAD67 発現味細胞 (III 型細胞) で受容されると考えられ、その受容には ASICs、HCNs、PKDs、TRPV1 といったチャネル型受容体が関与すると考えられる (Ugawa et al., 1998, 2003; Stevens et al., 2001; Huang et

al., 2006; Ishimaru et al.; 2006; Lyall et al., 2004; Treesukosol et al., 2007)。これらのうち PKD2L1 はその発現細胞を遺伝的に消失させた遺伝子改変マウスにおいて酸味刺激に対する神経応答が消失することから (Huang et al., 2006)、PKD チャンネルが酸味受容体として機能する可能性が最も高いと考えられる。PKD2L1 はマウス茸状乳頭および有郭乳頭で発現するが、PKD1L3 は有郭乳頭味細胞でしか発現せず PKD2L1 と共発現する(Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006)。これらと一致し、本研究でも有郭乳頭 GAD67-GFP 細胞は PKD2L1 と PKD1L3 を共発現し、茸状乳頭 GAD67-GFP 発現細胞は PKD2L1 のみ発現が見られた。PKD2L1 は PKD1L3 とヘテロダイマーを形成し酸刺激に対するオフ応答を生じさせる (Inada et al., 2008; Kawaguchi et al., 2010)。しかし PKD2L1 のみで酸味受容体として機能しない (Ishimaru et al, 2006; Inada et al., 2008; Ishii et al., 2009)。よって、有郭乳頭では PKD1L3 と PKD2L1 により機能的チャンネルが形成されるが、茸状乳頭では PKD2L1 は他のパートナーが必要であると予想される。本研究では、28 個中 20 個(71.4%)の茸状乳頭 GAD67-GFP 細胞が PKD2L1 を発現し、そのうち 55%(11 個)の細胞が HCN1 を、30%(6 個)の細胞が HCN4 を発現した(表 5)。また、このうち 4 個の細胞は HCN1 と HCN4 を同時に発現した(表 5)。マウス有郭乳頭での免疫組織学的研究では、92.1%の HCN4 発現細胞が PKD2L1 を発現することが報告されている(Gao et al., 2009)。両研究において共発現の割合は異なるが、いずれも PKD2L1 が HCN と共発現することを示す。これは茸状乳頭味蕾における酸味受容に HCN が関与する可能性を示唆する。PKD2L1 と HCN 分子との間に何らかの相互作用がある可能性も考えられるが、これを明らかにするためにはさらなる研究を要する。また本研究において、酸味候補受容体として挙げられている TRPV1 や ASICs の mRNA 発現はほとんど検出されなかった。これは(1)プライマーの設計に問題があった可能性、(2) mRNA の発現量が少なく、

検出できなかった可能性、(3)GAD67 発現細胞以外の細胞に ASIC や TRPV1 が発現する可能性などが考えられる。これらの分子が GAD67 発現細胞において酸味受容に寄与するかについてはさらなる解析が必要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なご指導とご高配を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野・教授 二ノ宮裕三先生に心より厚く御礼申し上げます。また、このような研究を行う機会を与えて頂きました九州大学大学院歯学研究院歯科麻酔学分野・教授 横山武志先生、前教授 池本清海先生に衷心より感謝申し上げます。

本研究を通して、直接ご指導を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野・助教 吉田竜介先生に深く感謝申し上げます。また、多くのご助言、ご指導を頂きました、准教授 重村憲徳先生、助教 實松敬介先生に感謝いたします。口腔機能解析学分野の教室員の皆様からは、多くの刺激や示唆を得ることができました。心より御礼申し上げます。歯科麻酔学分野の皆様には、いつも温かく励ましていただきました。心より感謝いたします。

参考文献

- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJP, & Fucker CS (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693-702
- Bachmanov AA, Li X, Reed DR, Ohmen JD, Li S, Chen Z, Tordoff MG, de Jong PJ, Wu C, West DB, Chatterjee A, Ross DA & Beauchamp GK (2001) Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chem. Senses* 26: 925-933
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE(2006) nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2. *J Comp Neurol.* 497: 1-12
- Behrens M, Foerster S, Staehler F, Raguse JD, & Meyerhof W (2007) Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* 27: 12630-12640
- Beidler LM (1967) Anion influences on taste receptor response. In: *olfaction and Taste II.* Ed. Hayashi T. 8: 509-534 Oxford, UK.
- Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM(2010) Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1-12
- Breza JM, Curtis KS, & Contreras RJ (2006) Temperature modulates taste responsiveness and stimulates gustatory neurons in the rat geniculate ganglion. *J. Neurophysiol.* 95: 674-685
- Caicedo A & Roper SD (2001) Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science* 291: 1557-1560
- Caicedo A, Kim K, & Roper SD (2002) Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *J. Physiol.* 544: 501-509

Caicedo A, Pereira E, Margolskee RF, Roper SD(2003) Role of the G-protein subunit alpha-gustducin in taste cell responses to bitter stimuli. *J Neurosci.* 23: 9947-9952

Cao Y, Zhao FL, Kolli T, Hivley R, & Herness S (2009) GABA expression in the mammalian taste bud functions as a route of inhibitory cell-to-cell communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106: 4006-4011

Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, & Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288-294

Clapp TR, Yang R, Stoick CL, Kinnamon SC, & Kinnamon JC (2004) Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J. Comp. Neurol.* 468: 311-321

Clapp TR, Medler KF, Damak S, Margolskee RF, & Kinnamon SC (2006) Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol.* 4:7

Clapp TR, Trubey KR, Vandenbeuch A, Stone LM, Margolskee RF, Chaudhari N, Kinnamon SC(2008) Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsivity. *FEBS Lett.* 582:3783-3787.

Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, Margolskee RF(2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301:850-853

Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Perez CA, Shigemura N, Yoshida R, Mosinger B, Glendinning JI, Ninomiya Y, & Margolskee RF (2006) Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem. Senses* 31: 253-264

Damak S, Mosinger B, Margolskee RF(2008) Transsynaptic transport of wheat germ agglutinin expressed in a subset of type II taste cells of transgenic mice. *BMC Neurosci.*9:96.

Danilova V & Hellekant G (2003) Comparison of the responses of the chorda tympani and glossopharyngeal nerves to taste stimuli in C57BL/6J mice. *BMC Neurosci.* 24: 5

Darnell JE Jr(1997) Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J. Interferon Cytokine Res.*18: 549-554

DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, & Chaudhari N (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J. Neurosci.* 26: 3971-3980

Engelhardt S, Rochais F(2007) G proteins: more than transducers of receptor-generated signals? *Circ. Res.* 100: 1109-1911

Gao N, Lu M, Echeverri F, Laita B, Kalabat D, Williams ME, Hevezi P, Zlotnik A, Moyer BD(2009) Voltage-gated sodium channels in taste bud cells. *BMC Neurosci.* 10:20.

Gilman AG(1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56:615-649

Goïot H, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Lardeux B, Lehy T, Lewin MJ, Bado A(2001) Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat. *Gastroenterology* 121: 1417-1427

Harvey RB (1920) The relation between the total acidity, the concentration of the hydrogen ion, and the taste of acid solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 42: 712-714

He W, Yasumatsu K, Varadarajan V, Yamada A, Lem J, Ninomiya Y, Margolskee RF, & Damak S (2004) Umami taste responses are mediated by alpha-transducin and alpha-gustducin. *J. Neurosci.* 24: 7674-7680

Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS(1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96: 541-551

Howlett(2004) Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br. J. Pharmacol.* 142: 1209-1218

Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M, Margolskee RF(1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* 2: 1055-1062

Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, & Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442: 934-938

Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, & Roper SD (2008) Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J. Physiol.* 586: 2903-2912

Inada H, Kawabata F, Ishimaru Y, Fushiki T, Matsunami H, Tominaga M(2008) Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1. *EMBO Rep.* 9: 690-697.

Ishii S, Misaka T, Kishi M, Kaga T, Ishimaru Y, Abe K(2009) Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel--a candidate sour taste receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 385: 346-350

Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, & Matsunami H (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 12569-12574

Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Seigny J, Kinnamon JC, & Finger TE (2008) The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem. Senses* 33: 243-254

Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Maruyama Y, Yanagawa Y, Murakami S, Tominaga M(2010) Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J. Biol. Chem.* 285: 17277-17281.

Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y(2000) Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 11044-11049

Kim MR, Kusakabe Y, Miura H, Shindo Y, Ninomiya Y, & Hino A (2003) Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 312: 500-506

Kitagawa M, Kusakabe Y, Miura H, Ninomiya Y, & Hino A (2001) Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283: 236-242

Lawton DM, Furness DN, Lindemann B, & Hackney CM (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3163-3171

Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E, Lindemann B (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219-225

Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 4692-4696

Lyll V, Alam RI, Phan DQ, Ereso GL, Phan TH, Malik SA, Montrose MH, Chu S, Heck GL, Feldman GM, & DeSimone JA (2001) Decrease in rat taste receptor cell intracellular pH is the proximate stimulus in sour taste transduction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C1005-1013

Lyll V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan TH, Alam RI, Russell OF, Malik SA, Bigbee JW, DeSimone JA (2004) The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J. Physiol.* 558: 147-159

Marco Tizzano, Gennady Dvoryanchikov, Jennell K Barrows, Soochong Kim, Nirupa Chaudhari, and Thomas E Finger (2008) Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci.* 9: 110

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564

Matsunami H, Montmayeur JP, & Buck LB (2000) A candidate of taste receptors in human and mouse. *Nature* 404: 601-604

Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S, Margolskee RF(2001) *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nat. Genet.* 28: 58-63

McLaughlin SK, McKinnon PJ, Margolskee RF. (1992) *Gustducin* is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357: 563-569

Miyamoto T, Fujiyama R, Okada Y, Sato T(2000) Acid and salt responses in mouse taste cells. *Prog. Neurobiol.* 62: 135-157

Miyoshi MA, Abe K, Emori Y(2001) *IP(3)* receptor type 3 and *PLCbeta2* are co-expressed with taste receptors *T1R* and *T2R* in rat taste bud cells. *Chem. Senses* 26: 259-265

Montmayeur JP, Liberles SD, Matsunami H, Buck LB(2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nat. Neurosci.* 4: 492-498

Murray R (1973) The ultrastructure of taste buds. In: *The ultrastructure of sensory organs*. Ed. Friedemann I, p 1–81, Amsterdam, North Holland.

Neer EJ, Clapham DE.(1988) Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 33: 129-134

Yuki Nakamura, Keisuke Sanematsu, Rie Ohta, Shinya Shirosaki, Kiyoshi Koyano, Kazuaki Nonaka, Noriatsu Shigemura and Yuzo Ninomiya(2008) Diurnal Variation of Human Sweet Taste Recognition Thresholds Is Correlated With Plasma Leptin Levels. *Diabetes* 57: 2661–2665

Nakamura Y, Yanagawa Y, Obata K, Watanabe M, & Ueno H (2007) GABA is produced in taste bud. *Chem. Senses* 32: J19

Neer EJ(1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJP, & Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA(2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416: 199–202

Niki M, Yoshida R, Takai S, Ninomiya Y(2010) Gustatory signaling in the periphery: detection, transmission, and modulation of taste information. *Biol. Pharm. Bull.* 33: 1772-1777

Ninomiya Y (1996) Salt taste responses of mouse chorda tympani neurons: Evidence for existence of two different amiloride-sensitive receptor components for NaCl with different temperature dependencies. *J. Neurophysiol.* 76: 3550-3554

Ninomiya Y (1998) Reinnervation of cross-regenerated gustatory nerve fibers into amiloride-sensitive and amiloride-insensitive taste receptor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5347-5350

Ninomiya Y & Funakoshi M (1988) Amiloride inhibition of responses of rat single chorda tympani nerve fibers to chemical and electrical tongue stimuli. *Brain Res.* 451: 319-325

Ninomiya Y & Imoto T (1995) Gurmarin inhibition of sweet taste responses in mice. *Am. J. Physiol.* 268: R1029-1025

Ninomiya Y, Tonosaki K, & Funakoshi M (1982) Gustatory neural response in the mouse. *Brain Res.* 244: 370-373

Ninomiya Y, Mizukoshi T, Higashi T, Katsukawa H, & Funakoshi M (1984) Gustatory neural responses in three different strains of mice. *Brain Res.* 302: 305-314

Ninomiya Y, Tanimukai T, Yoshida S, & Funakoshi M (1991) Gustatory nerve responses in preweanling mice. *Physiol. Behav.* 49: 927-934

Ninomiya Y, Inoue M, Imoto T, & Nakashima K (1997) Lack of gurmarin sensitivity of sweet taste receptors innervated by the glossopharyngeal nerve in C57BL mice. *Am. J. Physiol.* 272: R1002-1006

Offermanns S(2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83: 101-130

Oike H, Matsumoto I, & Abe K (2006) Group IIA phospholipase A2 is coexpressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J. Comp. Neurol.* 494: 876-886

Pérez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat. Neurosci.* 5: 1169-1176

Pumplin DW, Yu C, Smith DV(1997) Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *J. Comp. Neurol.* 378: 389-410

Richter TA, Dvoryanchikov GA, Roper SD, Chaudhari N(2004) Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J. Neurosci.* 24: 4088-4091

Rosenblum CI, Tota M, Cully D, Smith T, Collum R, Qureshi S, Hess JF, Phillips MS, Hey PJ, Vongs A, Fong TM, Xu L, Chen HY, Smith RG, Schindler C, Van der Ploeg LH(1996) Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells. *Endocrinology* 137: 5178-5181

Roper SD (2006) Cell communication in taste bud. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 1494-1500

Royer SM & Kinnamon JC (1988) Ultrastructure of mouse foliate taste buds: synaptic and nonsynaptic interactions between taste cells and nerve fibers. *J. Comp. Neurol.* 270: 11-24

Ruiz-Avila L, Wong GT, Damak S, Margolskee RF(2001) Dominant loss of responsiveness to sweet and bitter compounds caused by a single mutation in alpha-gustducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98: 8868-8873.

Sainz E, Korley JN, Battey JF, & Sullivan SL (2001) Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *J. Neurochem.* 77: 896-903

Seta Y, Toyoshima K(1995) Three-dimensional structure of the gustatory cell in the mouse fungiform taste buds: a computer-assisted reconstruction from serial ultrathin sections. *Anat. Embryol (Berl).* 191: 83-88.

Shigemura N, Ohta R, Kusakabe Y, Miura H, Hino A, Koyano K, Nakashima K, Ninomiya Y(2004) Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology* 145: 839-847

Shigemura N, Nakao K, Yasuo T, Murata Y, Yasumatsu K, Nakashima A, Katsukawa H, Sako N, & Ninomiya Y (2008) Gurmarin sensitivity of sweet taste responses is associated with co-expression patterns of T1r2, T1r3, and gustducin. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 367: 356-363

Shindo Y, Miura H, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ninomiya Y, Hino A, Kanda T, Kusakabe Y(2008) G alpha14 is a candidate mediator of sweet/umami signal transduction in the posterior region of the mouse tongue. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 213: 573-582

Simon MI, Strathmann MP, Gautam N(1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-808

Stevens DR, Seifert R, Bufe B, Müller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W, Kaupp UB, Lindemann B(2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 412: 631-625.

Smith DV & Travers JB (1979) A metric for the breadth of tuning of gustatory neurons. *Chem. Senses Flav.* 4: 215-229

Stryer L, Bourne HR(1986) G proteins: a family of signal transducers. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2: 391-419.

Takeda M, Hoshino T(1975) Fine structure of taste buds in the rat. *Arch. Histol. Jpn.* 37: 395-413

Tizzano M, Dvoryanchikov G, Barrows JK, Kim S, Chaudhari N, Finger TE(2008) Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neurosci.* 9:110

Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, & Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocaliation with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467: 60-79

Tomchik SM, Berg S, Kim JW, Chaudhari N, & Roper SD (2007) Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J. Neurosci.* 27: 10840-10848

Travers JB & Smith DV (1979) Gustatory sensitivities in neurons of the hamster nucleus tractus solitarius. *Sens. Processes* 3: 1-6

Treesukosol Y, Lyall V, Heck GL, DeSimone JA, Spector AC(2007) A psychophysical and electrophysiological analysis of salt taste in Trpv1 null mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R1799-1809.

Trubey KR, Culpepper S, Maruyama Y, Kinnamon SC, Chaudhari N(2006) Tastants evoke cAMP signal in taste buds that is independent of calcium signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291: C237-244.

Ueda K, Ichimori Y, Okada H, Honma S, & Wakisaka S (2006) Immunolocalization of SNARE proteins in both type II and type III cells of rat taste buds. *Arch. Histol. Cytol.* 69: 289-296

Ugawa S, Minami Y, Guo W, Saishin Y, Takatsuji K, Yamamoto T, Tohyama M, Shimada S(1998) Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature* 395: 555-556.

Ugawa S, Yamamoto T, Ueda T, Ishida Y, Inagaki A, Nishigaki M, Shimada S(2003) Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci.* 23: 3616-3622.

Vandenbeuch A, Clapp TR, & Kinnamon SC (2008) Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* 9: 1

Wong GT, Gannon KS, & Margolskee RF (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381: 796-800

Wong GT, Ruiz-Avila L, & Margolskee RF (1999) Directing gene expression to gustducin-positive taste receptor cells. *J. Neurosci.* 19: 5802-5809

Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, Li X(2004) Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 14258-1463

Yang R, Tabata S, Crowley HH, Margolskee RF, & Kinnamon JC (2000a) Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J. Comp. Neurol.* 425: 139-151

Yang R, Crowley HH, Rock ME, & Kinnamon JC (2000b) Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 424: 205-215

Yoshida R, Sanematsu K, Shigemura N, Yasumatsu K, & Ninomiya Y (2005) Taste receptor cells responding with action potentials to taste stimuli and their molecular expression of taste related genes. *Chem. Senses* 30: i19-i20

Yoshida R, Shigemura N, Sanematsu K, Yasumatsu K, Ishizuka S, & Ninomiya Y (2006a) Taste responsiveness of fungiform taste cells with action potentials. *J. Neurophysiol.* 96: 3088-3095

Yoshida R, Yasumatsu K, Shigemura N, & Ninomiya Y (2006b) Coding channels for taste perception: information transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. *Arch. Histol. Cytol.* 69: 233-242

Yoshida R, Horio N, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, & Ninomiya Y (2009) NaCl responsive taste cells in the mouse fungiform taste buds. *Neuroscience* 159: 795-803

Yoshida R, Ninomiya Y (2010) New insights into the signal transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. *Int. Rev. Cell Mol Biol.* 279: 101-134

Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF, Ninomiya Y (2010) Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107: 935-939

Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-266

Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ(2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112: 293-301

Zhang Z, Zhao Z, Margolskee R, Liman E(2007) The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci.* 27: 5777-5786