

**京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書**

2019年 4月10日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 農学研究科

職 名 准教授

氏 名 林 由佳子

助 成 の 種 類	<b>平成30 年度 ・ 研究活動推進助成</b>			
申請時の科研費 研究 課 題 名	味応答精査に関わるⅢ型味細胞の役割と情報変換機序			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 発表予定： 味と匂い学会(9月)			
成 果 の 概 要	<b>研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)</b>			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		設備備品費	467,640	
		実験動物関連費	102,383	
		消耗品費	250,393	
	人件費	179,584		
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 使途に関しても柔軟な対応をありがとうございました。科研費ではストップしていた研究もおかげで進めることができました。			

### 【緒論】

味細胞は現在、I型～IV型の4つに分類されている。I型細胞は味蕾内の支持細胞、II型は甘味、うまみ、苦味を認識する細胞、III型細胞は酸味を認識する細胞、IV型細胞はそれらの前駆細胞であると考えられている。上記の細胞のうち味物質を認識するのはII型とIII型細胞であり、II型細胞は甘味、うまみ、苦味を受容し、III型細胞は酸味を受容すると考えられている。

動物が味覚を認識する際には、味物質が味細胞の受容体に結合し、それが味神経を通して脳へと伝えられる必要がある。受容体に関しては明らかになってきたことが多いが、味細胞から味神経へどのようにして伝わるかについてはわかっていないことが多かった。しかし、先行研究によりIII型細胞が機能的にATP受容型と酸味受容型の二つに分類されることが明らかになった。また、酸味受容に関わっていると考えられる分子とセロトニンに対して行った2重組織免疫染色の結果から、大部分の酸味受容細胞がセロトニンを有していないことが分かった。そこで、以下の二つの応答経路が候補として考えられた。一つは、酸味受容型III型細胞がATP受容型III型細胞に神経伝達物質(ATPだと考えられている)を放出し、II型細胞のATPと同様に味神経を介して味を伝える経路、もう一つは、酸味受容型III型細胞がセロトニン以外の神経伝達物質(ATPだと考えられている)を介して味神経に味を伝え、ATP受容型III型細胞もII型細胞からの味情報を、味神経を通して伝える経路である。そこで本研究では、この酸味受容の応答経路をさらに探究し、明らかにすることを目的とする。本研究で行う実験方法としては、先行研究同様、細胞内カルシウムの濃度変化を見ることで酸味応答やATP応答を中心に味物質に反応している事を確認する手法、カルシウムイメージングを用いる。反応した細胞に対して免疫染色を行う免疫細胞染色を行い、この組み合わせによって味物質に対して反応している細胞における物質探究を行う。また、免疫組織染色によってそれぞれの味細胞における神経伝達物質の有無を比較し、上記の二つの説の中で有力だと考えられる前者の説を証明することを試みた。

### 【研究成果】

#### III型細胞が酸味受容型とATP受容型に分かれることの確認

これまでの研究から、III型細胞はATP受容型と酸味受容型の二種類に分かれることが発見された。したがって、実際に分かれるかを分子的観点から確認するためにIII型細胞マーカーのNCAMと酸味受容型III型細胞マーカーのCar-4を用いて免疫組織二重染色を行った。

#### NCAM×Car-4の二重染色

NCAMとCar-4を二重染色したところ、Car-4はNCAMに内包され、NCAM発現細胞207個中、159個がCar-4と共発現を示した。これはIII型細胞中69.8%が酸味受容型III型細胞であることを示している。つまり、III型細胞には酸味を受容するものが約7割、しないもの(ATP受容型)が約3割だという事が分かった。

NCAM と Car-4 の二重染色の結果、III型細胞が酸味受容型とそうでないもの（ATP 受容型）とに従来通り分かれることが確認されたため、今後は、III型細胞は二種類に分かれることを前提に話を進める。

#### 酸味受容型III型細胞が味細胞とシナプスを形成するかの検討

これまでの研究の結果、酸味受容型細胞は味神経とシナプスを形成しておらず、神経伝達物質を ATP 受容型III型細胞へ伝え、そこから 5-HT がシナプス放出され、味情報が伝えられている可能性が示唆された。従って、まず II 型細胞と味神経の二重染色を行い、次に III 型細胞と味神経の二重染色を確認することで、シナプス形成していない場合の染色の様子を確認した後に、シナプスを形成することが報告されている III 型細胞の染色の様子の違いを調べた。それらと比べて酸味受容型III型細胞がどちらの様に発現しているかを見ることで、味神経とシナプスを形成しているかを確認することにした。

#### 味神経と II 型細胞の免疫組織染色

味神経とシナプスを形成しない II 型細胞との二重染色を行ったところ、シナプスを形成しない味細胞と味神経については、共発現する場所を持たないことが確認された。

#### 味神経と III 型細胞の免疫組織染色

次に、味神経とシナプスを形成している III 型細胞がどのような染色の様子をとるかを確認するために、NCAM と P2X<sub>2</sub> の二重染色を行った。その結果、III 型細胞は味神経と共発現を示したため、シナプスを形成する味細胞は味神経と共発現をすることが判明した。このことから、酸味受容型III型細胞が味神経とシナプスを形成するかどうかを共発現するかどうかを確認することで調べることにした。

#### 味神経と酸味受容型III型細胞の免疫組織染色

Car-4 と P2X<sub>2</sub> の二重染色の結果、酸味受容型III型細胞においても味神経と共発現し、シナプス様の集合が確認された。III 型細胞と酸味受容型III型細胞との間の様子には特に違いは観察されなかった。酸味受容型III型細胞もシナプスを形成していると考えられるが、シナプス形成確定に関しては、電子顕微鏡による微細な構造解析を待つ必要がある。また、シナプスでの情報伝達に使われる物質に関しては未だに判明していないので、神経伝達物質に関しては今後も分子的な観点や生理的な観点から調べる必要がある。

#### GABA を有する味細胞の検討

III 型細胞は神経伝達物質を放出して味情報を伝えるが、未だにどの神経伝達物質が用いられているかはわかっていない。従って、その神経伝達物質を特定するために 5-HT の III 型細胞における局在を確認し、わずかの酸味受容型III型細胞しか 5-HT を有しておらず、ATP 受容型III型細胞は 5-HT を有している割合が高いことが確認された。そこで III 型細胞に存在するとされる GABA の存在割合を調べた。

## GABA と III 型細胞との二重染色

二種類の III 型細胞における GABA の局在を確認するため、酸味受容型 III 型細胞マーカー (Car-4) と III 型細胞マーカー (NCAM) それぞれと二重染色を行った。

### ①酸味受容型 III 型細胞 (Car-4)

酸味受容型 III 型細胞と GABA を二重染色したところ、酸味受容型 III 型細胞 (n=81) の内のほとんどが GABA と共発現している (n=74)、つまり GABA を有していることが判明した。

### ②III 型細胞 (NCAM)

III 型細胞 (ATP 受容型+酸味受容型) と GABA を二重染色したところ、III 型細胞 (n=58) のうちのほとんどが GABA と共発現しない (n=8)、つまり GABA を有していないことが判明した。

今回、免疫組織染色の結果、酸味受容型は GABA を有したが、III 型は GABA を有しないという結果になった。酸味受容型 III 型細胞というのは III 型細胞に内包され、その内の 7 割を占める細胞であるため、酸味受容型が GABA を有するという事は III 型細胞全体が GABA を有しないことに矛盾した。先行研究では、III 型細胞の内の 8 割近くがもつことが報告されている GAD67 と GABA は共発現することが報告されている。この報告は上記の酸味受容型細胞の実験結果を支持している。また、酸味応答細胞で GABA が放出されたという研究報告からも酸味受容型細胞の実験結果を支持している。III 型細胞全体が GABA を持たないという結果の理由に関しては不明である。

### 【まとめ】

- ① III 型細胞が酸味受容型 III 型細胞とそうでないものに分かれることが確認された
- ② 酸味受容型 III 型細胞がシナプスを形成する可能性が高いことが確認された
- ③ ほとんどの酸味受容型 III 型細胞は GABA を有した。

### 【今後の見通し】

神経伝達物質による味神経への情報伝達に関しては様々な推測がされているが、実際にどの伝達物質によって味神経へと情報が伝達されているかを直接的に明らかにすることはできていない。したがって、今後は今回行った分子的な観点からの研究だけではなく、実際に酸や ATP に応答したなどの、生理的な観点と組み合わせた実験手法を用いて酸味受容機構における神経伝達物質の働きを調べていこうと考えている。