

## 嗜好性味覚シグナルの多様性の検証

東京大学大学院 農学生命科学研究科  
成川 真隆

## 1. 研究の目的と背景

食物の味は甘、酸、塩、苦、旨味の5基本味から構成される。これらの味質は口腔内において味蕾で検出される。味蕾はI、II、III型味細胞と基底細胞の4種類に分類される。近年の研究により、それぞれの味細胞が異なる味受容体や味関連分子を発現し、5基本味がそれぞれ異なる味細胞型によって受容されることが明らかになってきている；I型とII型味細胞がそれぞれ塩味と甘味、旨味、苦味を受容し、III型味細胞が主に酸味を受容する。一方で、基底細胞はそれぞれの味細胞に分化する機能を有する<sup>1)</sup>。

味はそれぞれ栄養学的な意味を持つと考えられている。甘味は食物に含まれるエネルギー源を意味し、塩味はミネラル、旨味はタンパク質の存在を示す。一方で、苦味や酸味は毒物の存在や未熟あるいは腐敗のシグナルを意味する<sup>1)</sup>。甘味や旨味のような嗜好性味質は食べ物のおいしさに強く寄与するが、脂肪も強い嗜好性を引き起こす。脂肪酸を検出するセンサー分子の発現が味細胞で観察されている<sup>2,3)</sup>。このことから、第六の味質候補として「脂肪の味」が示唆されている。しかしながら、5基本味に比べ脂肪味の受容に関する情報は充分ではない。

脂肪の味は脂肪自身から生じるのではなく、脂肪が唾液リパーゼにより分解され、生成した脂肪酸がその主体を担うと考えられている<sup>4)</sup>。これまでに脂肪酸センサーとして多くの分子が報告されているが、口腔内における脂肪酸検出には脂肪酸トランスポーターCD36及び脂肪酸受容体GPR40, GPR120が関与すると考えられている<sup>5,6)</sup>。しかし、口腔内における脂肪酸の受容メカニズムの詳細に関する知見は多くない。そこで本研究では脂肪味の認識メカニズム

を解明するための一環として、脂肪酸を受容する味細胞タイプの同定を試みた。まず、味蕾における脂肪酸受容体の発現を観察した。さらに、電気生理学的・行動学的測定により脂肪酸に対する味応答を測定した。このとき、味覚欠損マウスであるSkn-1a KO系統を実験に供した。Skn-1a KOマウスはII型細胞が欠損するため、甘・苦・旨味を検出することができない<sup>7)</sup>。したがって、Skn-1a KOマウスで脂肪酸受容体の発現や、脂肪酸に対する味応答が観察されない場合、脂肪酸の味はII型細胞により受容されると判断することができる。

## 2. 研究の方法

**実験動物** 動物実験は東京大学農学部実験動物委員会の許可を得て行った。Skn-1a KOマウスは当研究グループで作製した個体を用いた<sup>7)</sup>。ヘテロ個体同士を交配させ、Wild-type (WT; Skn-1a<sup>+/+</sup>)とKnockoutマウス(KO; Skn-1a<sup>-/-</sup>)のオスを実験に供した。市販固形食を飼料として与え、飼料と水は*Ad lib*で与えた。

**RT-PCR** 麻酔下のマウスを頸椎脱臼し、絶命したマウスから舌を採取した。酵素処理により舌上皮を剥離し、有郭乳頭および茸状乳頭を含む上皮組織を採取した。比較サンプルとして、味蕾を含まない舌上皮および十二指腸も採取した。得られた各組織サンプルをホモジナイズし、RNA easy mini kitを用いてtotal RNAを抽出した。SuperScript III逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをテンプレートにPCRを行った。PCRに用いたプライマーを表1に示した。

表1 プライマーリスト

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
Cd36	ATCTACGCTGTGTTCCGGATCTG	ATGGTCCCAGTCTCATTAGCC
Gpr40	GGCTGCTCTGATCTCCTACTG	CCCAGGGAAGTGGTACTGTTG
Gpr120	CCACCTGCTCTCTACGTGAT	GATCTGGTGGCTCTCAGAGTATG
Trpm5	CTGATCGCCATGTTCCAGCTA	GGAGCCAGTGTATCCGTCAT
β-actin	TGTTACCAACTGGGACGACA	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG

**免疫組織染色** 麻酔下のマウスを頸椎脱臼し、絶命したマウスから舌を摘出した。有郭乳頭を切り出し、O.C.T compoundで包埋したのち、液体窒素にて凍結した。クリオスタットを用いて、6  $\mu$ mの薄切切片を作成した。4% PFAで固定しPBSで洗浄後、ブロッッキングを行っ

た。一次抗体は4°Cで1晩反応させた。PBSで洗浄後、Alexa Fluor 488もしくはAlexa Fluor 555標識した2次抗体を室温で1時間反応させた。その後PBSで洗浄し、Fluoromountで封入した。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡で取得した。使用した一次抗体を表2に示した。

表2 一次抗体リスト

Antigen	Host	Vender	Dilution
CD36	goat	R&D system	1:500
GPR120	rabbit	MBL	1:1500
KCNQ1	goat	Santa Cruz	1:1000
	rabbit	Millipore	1:1000
IP <sub>3</sub> R3	mouse	BD Biosciences	1:300
PKD2L1	rabbit	Millipore	1:500
CAR4	goat	R&D system	1:500

**味覚神経応答記録** 麻酔下のマウスから鼓索神経を露出させた。鼓索神経は舌前方部の味を中枢に伝達する。露出した神経束を白金電極にのせ、脂肪酸刺激に対する神経活動を記録した(各群 n=6)。応答値は100 mM NH<sub>4</sub>Clに対する応答を1.0としたときの相対値として示した。脂肪酸刺激として、100 mM オレイン酸を用いた。なお、脂肪酸は水に溶解しないため、0.3% xanthan gum 溶液に溶解させた<sup>6)</sup>。

**48時間二瓶選択試験** 48時間を1セットとし、各マウスに2本の飲水瓶を提示し、一方には水、もう一方に脂肪酸溶液を入れ24時間自由飲水させた。24時間後、飲水瓶の位置による偏りを防ぐため、左右を入れ替え、さらに24時間自由飲水させた。脂肪酸溶液の飲水量を全体の飲水量で割ることで、脂肪酸に対する嗜好性を求めた。脂肪酸溶液として、3-100 mM オレイン酸溶液を用いた(WT: n=7, KO: n=5)。

### 3. 研究内容

脂肪酸受容に関わる味細胞タイプを明らかにするために、II型味細胞が欠損したSkn-1a KOマウスを用いて、脂肪酸センサー(CD36, GPR40およびGPR120)の味蕾における発現をRT-PCR法により調査した(図1)。続いて、これらが発現する味細胞タイプを同定するために、味細胞マーカーと二重免疫染色法を行った(図2, 3)。また、味覚神経応答記録および行動学試験により、II型味細胞の欠損が脂肪酸応答をどのように変化させるのかを測定した(図4)。

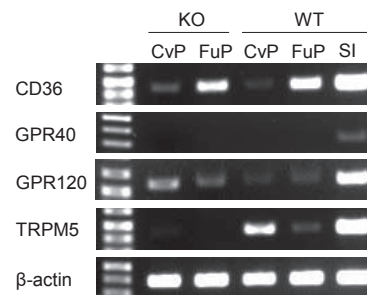


図1 脂肪酸受容に関わる分子の発現

CvP:有郭乳頭, FuP:茸状乳頭, SI:小腸. Trpm5はII型味細胞マーカーであり、小腸においても発現する。小腸ではCD36, GPR40およびGPR120のいずれも発現する。

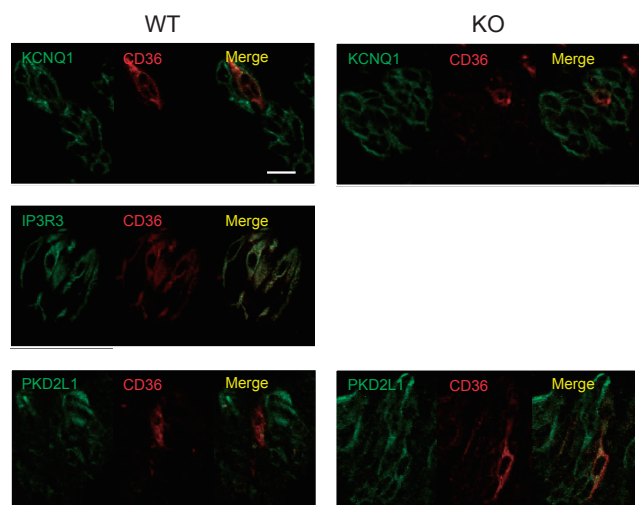


図2 マウス有郭乳頭におけるCD36の発現

CD36とKCNQ1(味蕾マーカー), IP<sub>3</sub>R3(II型味細胞マーカー), PKD2L1(III型味細胞マーカー)の二重染色像。Scale bar: 20  $\mu$ m

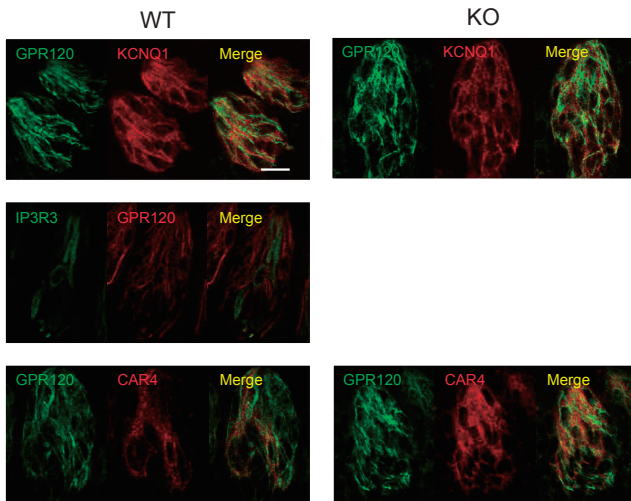


図3 マウス有郭乳頭における GPR120 の発現

GPR120 と KCNQ1 (味蕾マーカー), IP<sub>3</sub>R3 (II 型味細胞マーカー), CAR4 (III 型味細胞マーカー) の二重染色像。Scale bar : 20 μm

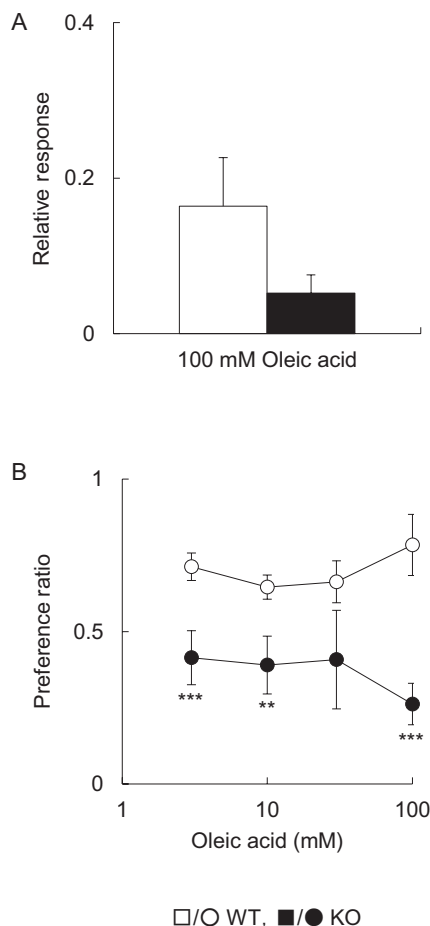


図4 脂肪酸に対する味応答

A) オレイン酸に対する味覚神経応答を記録した。応答強度は 100 mM NH<sub>4</sub>Cl に対する相対値で示した (n=6)。

B) オレイン酸に対する嗜好性変化を 48 時間二瓶選択法で測定した (n=5-7)。

\*\**p* < 0.03, \*\*\**p* < 0.01 (*t*-test)

#### 4. 研究の実施経過

##### 味蕾における脂肪酸センサー分子の発現

まず、味蕾における CD36, GPR40 と GPR120 の発現を調べた (図 1)。WT の有郭・茸状乳頭上皮を用いた RT-PCR の結果、CD36 と GPR120 のバンドが観察された。しかし、GPR40 のバンドは観察されなかった。KO マウスでも同様に、CD36 と GPR120 のバンドが観察されたが、GPR40 のバンドは観察されなかった。続いて、味蕾における CD36, GPR40 と GPR120 タンパク質の発現を免疫染色法により観察した (図 2, 3)。その結果、WT, KO マウスともに CD36 と GPR120 の味蕾特異的な発現が観察された。GPR40 タンパク質の発現は観察されなかった (データ示さず)。

味蕾における CD36 と GPR120 の発現が観察されたことから、これら分子がどの味細胞に発現するのかを味細胞マーカーを用いて二重免疫染色を行った (図 2, 3)。WT において、CD36 の発現は II 型味細胞マーカー IP<sub>3</sub>R3 と III 型味細胞マーカー PKD2L1 の発現と重なることが確認された (図 2)。CD36 の発現と同様に、GPR120 の発現も II 型細胞マーカー IP<sub>3</sub>R3 と III 型細胞マーカー CAR の発現と重なることが確認された (図 3)。II 型味細胞が欠損した KO マウスでも、CD36 と GPR120 が共に III 型味細胞マーカーの発現と重なったことから、これら分子は II 型味細胞だけではなく、III 型味細胞でも発現する可能性が考えられた。

##### II 型味細胞の脂肪酸受容における関与

続いて、II 型味細胞の欠損が脂肪酸応答に与える影響を観察した。まず、味覚神経応答を記録した (図 4A)。WT マウスにおいてオレイン酸に対する応答が観察された。しかし、その応答は KO マウスで減少する傾向が見られた。さらに、2 瓶選択試験により嗜好性を調査した (図 4B)。WT マウスはオレイン酸に対して高い嗜好性を見せたが、KO マウスでは嗜好性の大幅な低下が見られた。特に、100 mM オレイン酸に対して、KO マウスでは明確な忌避行動を示すことがわかった。したがって、これらの結果は II 型味細胞が脂肪酸応答に関与すること、特に脂肪酸に対する嗜好行動に関与する可能性が考えられた。

#### 5. 研究から得られた結論・考察

脂肪酸センサーとして複数の分子が報告されている<sup>8)</sup>。その中で口腔内における脂肪酸検出には脂肪酸トランスポーター CD36 及び脂肪酸受容体 GPR40, GPR120 が関与すると考えられている<sup>5, 6)</sup>。CD36 KO マウスでは長鎖脂肪酸に対する嗜好性が消失する<sup>5)</sup>。GPR40 および GPR120 KO マウスも長鎖脂肪酸に対する味応答が減少することが報告されている<sup>6)</sup>。

CD36, GPR120 はマウスの茸状、葉状乳頭で発現することが報告されている<sup>9)</sup>。本研究でも CD36 と GPR120 は

茸状・有郭乳頭での発現が観察された。一方で、GPR40はmRNAおよびタンパク質レベルでも検出されなかった。GPR40 KO マウスでは長鎖脂肪酸に対する味応答が減少するとは報告されているものの、その発現についての見解は分かっている<sup>9,10)</sup>。

CD36 および GPR120 はⅡ型、Ⅲ型味細胞マーカーの発現と重なった。KO マウスでもそれらの発現が観察されたことから、Ⅱ型味細胞以外にも脂肪酸センサーが発現すると考えられた。一方、KO マウスでオレイン酸に対する味覚神経応答が減少する傾向が見られた。また、オレイン酸に対する嗜好性行動がKO マウスでキャンセルされた。GPR120 の発現はⅡ型味細胞マーカーと重なり、Ⅲ型マーカー分子とほとんど重ならないことが報告されていることから<sup>10)</sup>、脂肪酸に対する嗜好性の形成にはⅡ型味細胞を介したシグナルが重要な役割を果たしているのかもしれない。GPR120 は G タンパク質共役型受容体である<sup>11)</sup>。各味細胞のうち、G タンパク質がⅡ型味細胞でのみ発現するという知見も上述の仮説を支持するだろう<sup>1)</sup>。口腔内の脂肪酸受容に関して、CD36 と GPR120 の機能が異なることが示唆されている<sup>12)</sup>。Ⅱ型味細胞以外の細胞で発現が見られた意義に関しては今後の検討課題と言える。

本研究では脂肪酸受容に関わる味細胞タイプを明らかにするために、Skn-1a KO マウスを用いて、脂肪酸センサーの味蕾における発現を観察した。その結果、脂肪酸センサーがⅡ型味細胞だけではなく、Ⅲ型味細胞でも発現することを明らかにした。さらに、脂肪酸に対する味応答解析から、Ⅱ型味細胞が脂肪酸応答に関与すること、特に脂肪酸に対する嗜好行動に関与する可能性を明らかにした。

## 6. 残された問題、今後の課題

本研究でⅡ型、Ⅲ型味細胞マーカーと脂肪酸センサー分子との発現が重なることが観察された。基本味の受容にはⅡ、Ⅲ型と共にⅠ型味細胞も関与することから、今後はⅠ型味細胞における脂肪酸センサーの発現を調べる必要がある。また、苦、甘、旨味はⅡ型味細胞で受容されるが、対応する味覚受容体はそれぞれ排他的に発現する<sup>1)</sup>。脂肪酸センサーがⅡ型味細胞の中でも、苦味受容細胞、甘味受容細胞、旨味受容細胞のどの細胞に発現するのか、興味を持たれる。

これまで食物の味は甘、酸、苦、酸、塩味の五基本味から成り立つと考えられてきた。近年、脂肪酸受容体が口腔内で観察され、「脂肪の味」が第六の味質候補として考えられている。しかし、基本味に比べ脂肪味に関する研究はほとんど進んでいない。マグロの赤身とトロのように、脂肪の有無はおいしさを変える。おいしい食事は人生を豊かにし、QOLの向上につながる。しかし、過剰なエネルギーの摂取は高脂血症や糖尿病などの生活習慣病の増加を招く原因となる。食物摂取は味覚によって制御されることから、脂肪酸受容を明らかにすることは食のおいしさの解明だけでなく、生活習慣病予防に有益な情報を与えると考えられる。

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係の皆様には厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Yarmolinsky DA, Zuker CS, and Ryba NJP, *Cell*, **139**, 234-244 (2009).
- 2) Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E, and Fushiki T, *FEBS Lett.*, **414**, 461-464 (1997).
- 3) Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, and Fushiki T, *Biomed Res*, **28**, 49-55 (2007).
- 4) Fushiki T, and Kawai T, *Chem. Senses*, **30 Suppl 1**, i184-185 (2005).
- 5) Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, and Besnard P, *J. Clin. Invest.*, **115**, 3177-3184 (2005).
- 6) Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, and Damak S, *J. Neurosci.*, **30**, 8376-8382 (2010).
- 7) Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, and Abe K, *Nat. Neurosci.*, **14**, 685-687 (2011).
- 8) Reimann F, Tolhurst G, and Gribble FM, *Cell Metab.*, **15**, 421-431 (2012).
- 9) Gilbertson T, Yu T, and Shah B, "Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects," ed. Montmayeur JP and le Coutre J. Boca Raton, CRC Press (2010).
- 10) Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, and Fushiki T, *Neurosci. Lett.*, **450**, 186-190 (2009).
- 11) Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, and Tsujimoto G, *Nat. Med.*, **11**, 90-94 (2005).
- 12) Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin J-F, Chevrot M, and Besnard P, *Plos One*, **6**, e24014 (2011).