The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Receptor that leaves a sour taste in the mouth
Author(s)	鵜川, 眞也
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41825
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

氏　　名	鵜川眞也（うかわしんや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15206　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Receptor that leaves a sour taste in the mouth （酸味受容体遺伝子の同定）
論文審査委員	（主査） 教　授　遠山　正彌 （副査） 教　授　岡田伸太郎　　教　授　米田　悦啓

論文内容の要旨

【目的】

味覚（酸味／塩味）の受容体遺伝子を単離・解析する。

【方法ならびに成績】

味覚には、塩味、酸味、苦味、甘味、旨味の5種類の基本的な構成要素がある。しかしながら、味覚の受容体及びそれをコードする遺伝子はこれまで単離・同定されていなかった。一方、酸味および塩味受容体の一部に関しては電気生理学的にアミロライド感受性ナトリウムチャネルの特性を有することが電気生理学的に証明されていた。そこで、味蕾が豊富に分布するラット舌有郭乳頭よりcDNA libraryを作製し、EST（expressed sequence tags）クローンの中からアミロライド感受性陽イオンチャネル遺伝子ファミリーと相同性を有する断片を探し出し、これをプローブとして酸味あるいは塩味受容体候補遺伝子のスクリーニングをlow stringencyで行った。その結果、18個のクローンが得られ、これらの全てのcDNAから*in vitro* transcriptionによりcRNAを製作し、アフリカツメガエル卵母細胞に微量注入しそれぞれの蛋白を強制発現させ、two-electrode voltage clamp法を用いて電気生理学的にその特性を解析した。これらのcDNAの中で、一つのクローンがpHが酸性になると開くアミロライド感受性陽イオンチャネルの特性を有していた。さらに、このクローンの詳しい分布を*in situ* hybridization法を用いて解析したところ、味蕾にのみ限局して発現していたため、このクローンが酸味受容体遺伝子ではないかと考えられた。このクローンの全塩基配列を明らかにしたところ、open reading frame 1536bp、512個のアミノ酸をコードしており、非翻訳領域の塩基配列は3カ所異なっていたが、最近、脳から単離されたアミロライド感受性ナトリウムチャンネルであるMDEG 1（mammalian degenerin－1）と同じ蛋白をコードしていた。単離したこの酸味受容体候補遺伝子は水素イオンをリガンドに持ち、水素イオン自身も通過させるが、ナトリウムイオンに最もイオン選択性が高く、電気生理学的特性もメッセンジャーRNAの発現部位も酸味受容体としてふさわしいものであった。そこで詳細な蛋白レベルでの発現部位を検討するため、ウサギを用いて特異的な抗体を作製し、免疫組織化学法を行ったところ、味蕾の細胞の先端から側面にかけての細胞膜を中心に免疫陽性構造が認められた。さらにこの抗体を用いて免疫電顕法を行ったところ、免疫陽性細胞の底部で有芯小胞を含むシナプス小胞が観察され、神経の樹状突起と接しているⅢ型味細胞の特徴的な像が得られた。このクローン（MDEG 1）は少なくとも味覚受容細胞であるⅢ型細胞には発現しており、生理学的にも、薬理学的にも、形態学的にも以前から想定されていた酸味受容体の一つであると結論した。

古くから我々人類は酸味の調味料として酢を用いてきた。その主成分である酢酸は、塩酸などの無機酸よりも酸っぱいことが知られており、電気生理学的にも同じpHでは塩酸に比べ酢酸の方が酸味応答が強いという知見が得られていた。そこで、酢酸の酸味受容体に対する効果を解析した。酢酸あるいは塩酸を使って同じ pH に調整したナトリウム溶液を酸味受容体遺伝子を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に投与することによりその応答性を電気生理学的に比較した。同じpH溶液の場合、水素イオン濃度は同じはずであるが、酢酸の方が塩酸よりも強い応答を示した。この結果は、酸味受容体分子が、水素イオンをリガンドとして開くチャンネルであると同時に、酢酸が何らかの機序で酸味受容体分子のチャンネルの活性を増強しているということの証明になり、“塩酸に比べ酢酸の方が酸味が強い”というヒトの感覚に一致するものであった。

【総括】

cDNA library のスクリーニングと機能発現を組み合わせることで、酸味受容体遺伝子を単離した。塩基配列を明らかにしたところ、MDEG 1 と同じアミノ酸をコードしていた。このクローンは、電気生理学的に酸味受容体として想定されていたアミロライド感受性ナトリウムチャンネルの特性を有し、味覚受容細胞であるⅢ型味細胞の味孔側細胞膜を中心に強く発現していた。このチャンネルは、水素イオンによって活性化され、pHの低さに応じて陽イオン電流を流すが、同じpHでも塩酸よりも酢酸に対してより強く反応し、このことは“塩酸に比べ酢酸の方が酸味が強い”というヒトの味覚の特性によく一致するものであった。以上の結果より、今回、単離した酸味受容体遺伝子は、生理学的にも、薬理学的にも、形態学的にも以前から考えられていた酸味受容体の機能的特性を単一クローンで兼ね備えるものであった。

論文審査の結果の要旨

視覚や嗅覚の受容体が既にクローニングされていて、それぞれの感覚器における分子メカニズムが明らかになりつつあるのに対して、味覚受容の分子機構は未だ不明な点が多く、これまで味覚受容体遺伝子は同定されていなかった。本論文は、味覚受容体遺伝子を初めて明らかにした点で学術的な価値が極めて高いと考えられる。従来から生理学的に想定されていた酸味受容体遺伝子をcDNAライブラリーのスクリーニングと機能発現を組み合わせることで単離し、この遺伝子が水素イオンをリガンドに持つアミロライド感受性ナトリウムチャンネル mammalian degenerin－1（MDEG 1）と同一のものであることを証明した。さらに、免疫組織化学法を用いてこの遺伝子が味蕾の中でも味覚受容細胞（3型細胞）に発現していることを確認した。この酸味受容体は水素イオンによって活性化されるが、同じpHでも塩酸よりも酢酸に対して強く反応し、“塩酸に比べ酢酸の方が酸味が強い”というヒトの感覚に一致するものであった。分子生物学的手法、生理学的・薬理学的手法、解剖学的手法をすべて組み合わせることで酸味受容体遺伝子の同定に成功しており、本論文は、博士（学位）の授与に値すると考えられる。