

高濃度の塩の受容に関わる味細胞の分化機構の解析

應本 真

高崎健康福祉大学健康福祉学部健康栄養学科

概要

食物摂取の際に生じる味覚は、食品中に含まれる呈味物質が口腔内に存在する味蕾と呼ばれる組織中の味細胞により受容されることにより生じる感覚である。ヒトが容易に認識、識別できる味として、甘味、うま味、苦味、酸味、塩味の5基本味がある。甘味、うま味、苦味、酸味はそれぞれ異なる味細胞で受容される。塩味に関しては、2つ(低濃度のナトリウムの味、および、高濃度の塩の味)の受容経路があり、前者は、甘味、うま味、苦味、酸味を受容する味細胞とは異なる味細胞により、後者は苦味細胞および酸味細胞により受容されることが明らかになっている。こうした味細胞種の多様性を生み出す分子機構については、*Skn-1a* (*Pou2f3*) という転写因子が、甘味、うま味、苦味細胞および低濃度のナトリウムの味受容細胞に発現し、それらの細胞の発生に必須の因子であることが示されている。本研究では、苦味細胞(つまり、苦味や高濃度の塩を受容する味細胞)および未分化の味蕾細胞に発現する転写因子である *Eya1* に着目し、苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の発生・分化における *Eya1* の関与を解析することを目的とした。

味蕾における *Eya1* の機能を解析するために、味蕾の幹細胞において薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼである *CreERT2* を発現するノックインマウス系統 (*Krt5-CreERT2*) および *Eya1-flox* 系統のマウスを用いて、味蕾特異的に *Eya1* を欠損したマウス (*Eya1 cKO* マウス) を作製した。

Eya1 cKO マウスの有郭乳頭の味蕾における味覚関連遺伝子の発現を調べた結果、苦味受容体のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ大きく減少していた。一方、甘味・うま味受容体のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、*Eya1 cKO* マウスでは増加していた。味蕾における味覚関連遺伝子の発現細胞数を計数し、コントロールマウスと *Eya1 cKO* マウスを比較した結果、甘味、うま味、苦味細胞に共通して発現する *Trpm5* のシグナル陽性細胞数はコントロールマウスおよび *Eya1 cKO* マウスにおいて有意な差は観察されなかったものの、苦味受容体 *Tas2rs* のシグナル陽性細胞数は *Eya1 cKO* マウスにおいて有意に減少し、また、甘味・うま味受容体 *Tas1r3* のシグナル陽性細胞数は *Eya1 cKO* マウスにおいて有意に増大していた。これらのことから、*Eya1 cKO* マウスの味蕾において苦味および高濃度の塩味の受容に関与する味細胞が減少し、甘味・うま味受容細胞が増加することが示され、*Eya1* が苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生・分化に必要な因子であることが明らかとなった。

1. 研究目的

食物摂取の際に生じる味覚は、食品中に含まれる呈味物質が口腔内に存在する味蕾と呼ばれる組織中の味細胞により受容されることにより生じる感覚である。ヒトが容易に認識、識別できる味として、甘味、うま味、苦味、酸味、塩味の5基本味がある。これまでの研究により、味覚受容

体として、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)である甘味・うま味受容体(T1Rファミリー分子)および苦味受容体(T2Rファミリー分子)が同定された^(1,2)。酸味や塩味はこれらのGPCRを発現しない味細胞により受容される。酸味は *Otop1* を発現する味細胞により、ナトリウムの味である塩味は *ENaCa* を発現する味細胞の一部の細胞により受容

される^(3,4)。これらの基本味は互いに異なる味細胞により受容されることから、味覚の多様性は味細胞の種類が多様性と関連する。塩味に関しては、2 つ(低濃度のナトリウムの味、および、高濃度の塩の味)の受容経路があり、前者は、甘味、うま味、苦味、酸味を受容する味細胞とは異なる味細胞により、後者は苦味細胞および酸味細胞により受容されることが明らかになっている^(4,5)。我々は、味蕾中の味細胞の発生・分化に関する研究を進めてきており、これまで *Skn-1a*(*Pou2f3*)という転写因子が、甘味、うま味、苦味細胞および低濃度のナトリウムの味受容細胞に発現し、それらの細胞の発生に必須の因子であることなどを明らかにしてきた^(6,7)。近年、別の転写因子である *Eya1* が苦味細胞(つまり、苦味や高濃度の塩を受容する味細胞)に特異的に発現していることを見出し⁽⁸⁾、*Eya1* が苦味や高濃度の塩を受容する味細胞の分化に関与するという仮説を立て、その検証を進めている。昨年度の報告では、味蕾特異的に *Eya1* 遺伝子を欠損するマウス(*Eya1* conditional knockout(cKO)マウス)を作出し、味蕾における味覚受容体の発現を行い、苦味受容体の発現頻度が大きく減少していることを見出した(2022 年度ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2237)。また、行動学的な解析により、*Eya1* cKO マウスでは、苦味に対する応答がコントロールマウスに比べ減少していること、高濃度の塩化ナトリウムに対する忌避がコントロールマウスに比べ部分的に減少していることを見出した。これらのことから、*Eya1* は高濃度の塩の受容に関わることが示唆され、*Eya1* が苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生や分化において重要な役割を担っていると考えられる(2022 年度ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2237)。本研究では、味蕾特異的に転写因子 *Eya1* を欠損したマウスを作製し、より詳細に組織学的な解析を行うことにより、味細胞分化における *Eya1* の機能や味細胞の分化機構の詳細を明らかにすることを目的とする。

2. 研究方法

2.1 *Eya1* cKO の作製

Eya1 遺伝子のエクソン 10 を挟むようにして loxP 配列を導入したアリル(*Eya1*-floxアリル)を持つノックインマウス *Eya1*(flox/+)マウスは、Cyagen 社より購入した。*Krt5* 遺伝子の終始コドン直後に *ires-CreERT2* 配列が導入されたアリル(*Krt5*-*CreERT2* アリル)をもつノックインマウス

Krt5(*CreERT2*/+)は、Jackson Laboratory より購入した。*Krt5*(*CreERT2*/+)マウスと *Eya1*(flox/+)マウスの掛け合わせにより、*Krt5*(*CreERT2*/+);*Eya1*(flox/+)マウスを作出した。また、*Eya1*(flox/+)マウスどうしの掛け合わせにより、*Eya1*(flox/flox)マウスを作出した。得られた *Krt5*(*CreERT2*/+);*Eya1*(flox/+)マウスと *Eya1*(flox/flox)マウスの掛け合わせにより、*Krt5*(*CreERT2*/+);*Eya1*(flox/flox)マウスを作出した。*Krt5*(*CreERT2*/+);*Eya1*(flox/flox)マウスに対し、10 mg/ml となるようにコーン油に溶解したタモキシフェンを、100 mg/体重 1 kg あたりとなるように、マウスの腹腔に投与した。タモキシフェンの投与後、6 ヶ月経過したマウスを実験に使用した。対照群としてタモキシフェンを投与していないマウスを用いた。遺伝子組換え実験および動物実験は、高崎健康福祉大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を受けた上で実施した。

2.2 *in situ* hybridization

2.2.1 組織サンプルとプローブの調整

マウスを頸椎脱臼後、速やかに舌を摘出し、有郭乳頭を摘出した後、O.C.T.コンパウンド(Sakura)中で凍結した。凍結ブロックは使用時まで-80°Cで保存した。凍結ブロックはクライオスタット CM1860(Leica)を用いて 8 μm に薄切し、MAS コートスライドグラス(Matsunami Glass)に貼りつけた。切片は使用時まで-80°Cで保存した。

in situ hybridization で用いる Digoxigenin (DIG)あるいは Fluorescein (FLU)で標識したアンチセンス RNA プローブは、DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)あるいは FLU RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics)、および、T3 または T7 RNA polymerase (Roche Diagnostics)で *in vitro* transcription を行うことにより、合成した。合成したアンチセンスプローブは、アルカリ溶液(42 mM NaHCO₃, 63 mM Na₂CO₃, 5 mM dithiothreitol (DTT))中で 60°Cで処理することにより、断片化を行い、約 150 塩基の長さにして用いた。

2.2.2 Single *in situ* hybridization

マウス有郭乳頭の新鮮凍結切片は 4%パラホルムアルデヒド(PFA)/PBS 溶液中室温で 10 分間固定した後、0.1%ジエチルピロカルボナート(DEPC)/PBSで 15 分間の処理を 2 回行い、5×SSC に buffer を置換した。その後、プレハイブリダイゼーション溶液(40 μg/ml Herring sperm

DNA (Promega), 5× SSC, 50%ホルムアミド溶液)で 58°C 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション溶液(5× SSC, 50%ホルムアミド溶液, 5× Denhardt's solution, 500 µg/ml Herring sperm DNA, 250 µg/ml yeast tRNA (Roche Diagnostics), 1 mM DTT, 20~200 ng/ml DIG 標識アンチセンス RNA プローブ)を切片上に乗せ, 58°Cで 16 時間行った。ハイブリダイゼーション後, 58°Cで, 5× SSC による 5 分間の洗浄を 2 回, 0.2× SSC による 30 分間の洗浄を 2 回行った。室温において TBS で 5 分間洗浄した後, ブロッキング溶液 (0.5% blocking reagent (Roche Diagnostics)/TBS) で 1 時間ブロッキングを行った。アルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体 (AP-anti-DIG Ab, Roche Diagnostics) をブロッキング溶液で 500 倍に希釈し, 室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。TBS による 15 分間の洗浄を室温で 3 回行い, NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, Roche Diagnostics) と BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, Roche Diagnostics) を基質として用い, 室温で 16 時間発色反応を行った。着色シグナルは, 顕微鏡 (BX-53, Olympus) および顕微鏡用デジタルカメラ (DP74, Olympus) を用いて観察, 記録した。

2. 2. 3 Double-label *in situ* hybridization

上記と同様に, マウス有郭乳頭の新鮮凍結切片を用いてプレハイブリダイゼーションを行った後, DIG 標識アンチセンス RNA プローブおよび FLU 標識アンチセンス RNA プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を切片上に乗せ, 58°Cで 16 時間の反応を行った。ハイブリダイゼーション後, 58°Cで, 5× SSC による 5 分間の洗浄を 2 回, 0.2× SSC による 30 分間の洗浄を 2 回行った。室温において TBS で 5 分間洗浄した後, ブロッキング溶液 (0.5% blocking reagent (Roche Diagnostics)/TBS) で 1 時間ブロッキングを行った。ビオチン結合抗フルオレセイン抗体 (Biotin-anti-FLU Ab, Vector laboratory) をブロッキング溶液で 500 倍に希釈し, 室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。TBS による 15 分間の洗浄を室温で 3 回行い, Avidin-Biotin Complex (VECTASTAIN Elite ABC-HRP Kit, Vector laboratory) と 30 分間反応させた。洗浄後, TSA Biotin Plus System (PerkinElmer) を用いて 10 分間のビオチン化チラミド反応を行った。洗浄後, 3%過酸化水素水溶液と 60 分間反応させた。その後, HRP 結合

抗ジゴキシゲニン抗体 (HRP-anti-DIG Ab, Roche Diagnostics) をブロッキング溶液で 500 倍に希釈し, 室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。洗浄後, TSA Plus Cy5 System (PerkinElmer) を用いて 10 分間の Cy5 化チラミド反応をした。ビオチン化チラミドは, Alexa 488 標識された Streptavidin (ThermoFisher) と反応させて蛍光標識した。洗浄後, DAPI 染色を行った。蛍光シグナルは, 共焦点レーザー顕微鏡システム (Ti2, Nikon) を用いて観察, 記録した。

蛍光シグナルを有する細胞の計数は, Photoshop (Adobe) を用いて行った。有郭乳頭切片の 1 つのトレンチ (溝) に含まれる全味蕾を対象に, 蛍光シグナルを有する細胞の計数を行った。Eya1 cKO マウス (n=3) とコントロールマウス (n=3) のトレンチあたりの各陽性細胞数を計数し, t-test により比較した。

2. 3 マイクロアレイ解析

Eya1 cKO マウスとコントロールマウスの有郭乳頭上皮から, 以下の方法により total RNA を抽出した。摘出したマウスの舌の有郭乳頭直下に 2 mg/ml コラゲナーゼ (Sigma) 溶液を約 50 µl 注入し, 舌を 5 分間, 37°C の PBS 中に静置した。ピンセットで有郭乳頭上皮層を剥離し, RNAlater (Sigma) へ移した。RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出, 精製した。

DNA マイクロアレイデータは, 株式会社マクロジェンジャパンに委託して取得した。取得したマイクロアレイデータは, Affymetrix Power Tools (APT) 中にある Robust Multi-Average (RMA) 法を用いて正規化した。

3. 研究結果

3. 1 Eya1 cKO マウスの味蕾における味覚関連遺伝子の発現

Eya1 遺伝子を欠損したマウスは, 生後直後に死んでしまうため⁹⁾, 成体での解析を行うためには, 組織特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作製・解析が必要である。そのために, Eya1 遺伝子の flox マウス (Eya1 遺伝子のエキソン 10 を挟むようにして 2 つの loxP 配列が挿入された遺伝子を持つマウス) を導入した (2022 年度ソルトサイエンス研究助成 助成番号 2237)。Eya1-flox アリルをホモに持つマウスにおいて, Cre リコンビナーゼにより 2 つの loxP 配列の間で組換えが生じると, エキソン 10 が切り離され, 以降の配列でフレームシフトが生じ, 機能的な Eya1 タンパク質が作られなくなるため, 組織特異的な

Eya1 遺伝子欠損マウスが作製される。味蕾特異的に Eya1 遺伝子を欠損するための Cre driver マウスとして、味蕾を産生する幹細胞において薬剤誘導型 Cre リコンビナーゼである CreERT2 を発現する Krt5-CreERT2 ノックインマウスを用いた⁽¹⁰⁾。Eya1-flox マウスおよび Krt5-CreERT2 ノックインマウスを用いて、Krt5(CreERT2+); Eya1(flox/flox)マウスを作製し、タモキシフェンの投与により、味蕾幹細胞において組換えを誘導したマウス (Eya1 cKO マウス)を用いて以下の解析を行った。

まず、Eya1 cKO マウスの有郭乳頭の味蕾における味覚関連遺伝子の発現の様子を *in situ* hybridization により調べた。その結果、苦味受容体である *Tas2rs* のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは大きく減少していた (Fig. 1)。一方、甘味・うま味受容体である *Tas1r3* のシグナル頻度は、コントロールマウスに比べ、Eya1 cKO マウスでは増加していた (Fig. 1)。甘味、うま味、苦味細胞に共通して発現する *Trpm5* のシグナルは、コントロールマウスと Eya1 cKO マウスで大きな差は見られなかった (Fig. 1)。

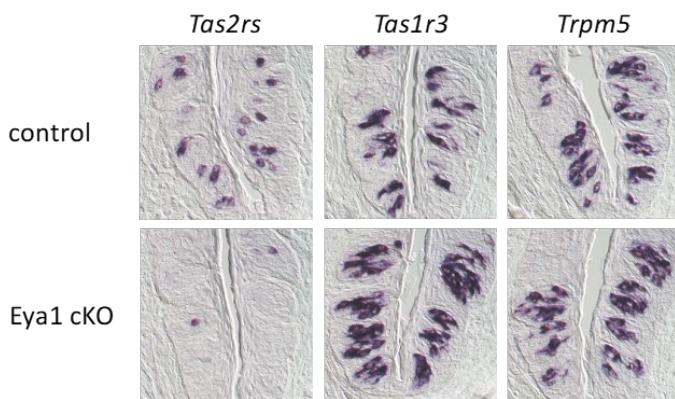


Fig. 1 Expression of taste-related genes by *in situ* hybridization analysis.

Gene expression was examined in the circumvallate papillae of control mice (top) and Eya1 conditional knockout (cKO) mice (bottom). A mixture of *Tas2r104*, *Tas2r105*, *Tas2r118*, and *Tas2r126* probes was used to detect *Tas2r* genes.

3. 2 Eya1 cKO マウスの味蕾における味覚受容細胞の定量

次に、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスを用いて、Double-label *in situ* hybridization を行った。*Trpm5* と苦味受容体である *Tas2rs* の発現相関を解析した結果、コントロールマウスでは、*Trpm5* シグナルが観察された細胞の一部の細胞において *Tas2rs* のシグナルが観察され (Fig. 2A), *Trpm5* 陽性細胞の約 42%の細胞が *Tas2rs* を発現していた。Eya1 cKO マウスでは、*Trpm5* シグナルが観察されるものの、*Tas2rs* のシグナルはほとんど観察されず (Fig. 2A), *Trpm5* 陽性細胞の約 2%の細胞においてのみ *Tas2rs* のシグナルが観察された。トレンチあたりの細胞の数を計数した結果、*Trpm5* 陽性細胞数は、コントロールマウスでは 43.7 ± 1.4 個 ($n = 3$), Eya1 cKO マウスでは 42.0 ± 2.3 個 ($n = 3$)であり、両者の間で有意な差はなかった ($p = 0.5776$) (Fig. 3A)。トレンチあたりの *Tas2rs* 陽性細胞数を計数したところ、コントロールマウスでは 18.2 ± 1.4 個 ($n = 3$), Eya1 cKO マウスでは 0.7 ± 2.3 個 ($n = 3$)であり、両者の間で有意な差が観察された ($p = 0.0049$) (Fig. 3A)。*Trpm5* と甘味・うま味受容体である *Tas1r3* の発現相関を解析した結果、コントロールマウスでは、*Trpm5* シグナルが観察された細胞の一部の細胞において *Tas1r3* のシグナルが観察され (Fig. 2B), *Trpm5* 陽性細胞の約 50%の細胞が *Tas1r3* を発現していた。Eya1 cKO マウスでは、多くの細胞において *Tas1r3* のシグナルが観察され (Fig. 2B), *Trpm5* 陽性細胞の約 96%の細胞で *Tas1r3* のシグナルが観察された。トレンチあたりの *Tas1r3* 陽性細胞数を計数したところ、コントロールマウスでは 19.4 ± 1.2 個 ($n = 3$), Eya1 cKO マウスでは 39.5 ± 1.9 個 ($n = 3$)であり、両者の間で有意な差が観察された ($p = 0.0016$) (Fig. 3B)。

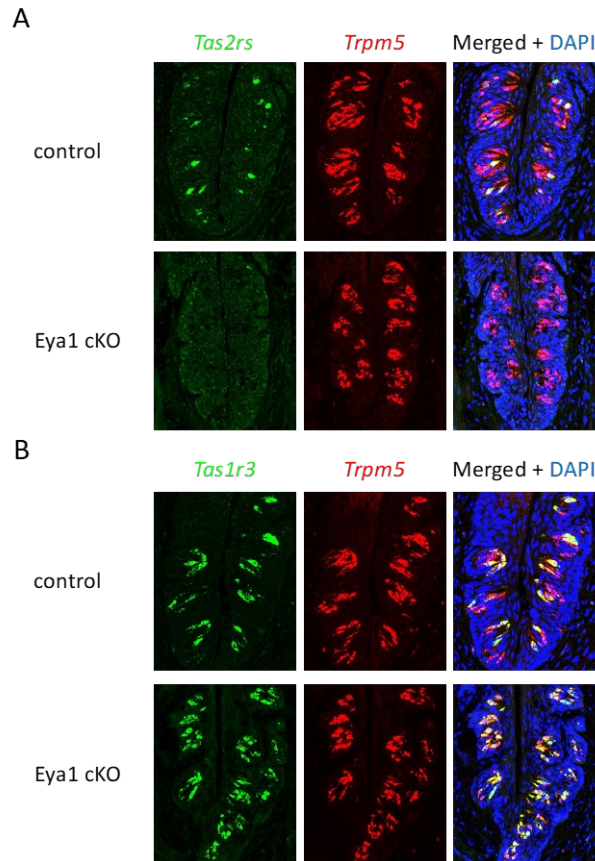


Fig. 2 Expression correlation of taste-related genes by double-label in situ hybridization analysis

- A. Expression of *Tas2rs* (green) and *Trpm5* (red) was examined in the circumvallate papillae of control mice (top) and *Eya1* conditional knockout (cKO) mice (bottom). Merged images with DAPI stain are shown on the right. A mixture of *Tas2r104*, *Tas2r105*, *Tas2r118*, and *Tas2r126* probes was used to detect *Tas2r* genes.
- B. Expression of *Tas1r3* (green) and *Trpm5* (red) was examined in the circumvallate papillae of control mice (top) and *Eya1* conditional knockout (cKO) mice (bottom). Merged images with DAPI stain are shown on the right.

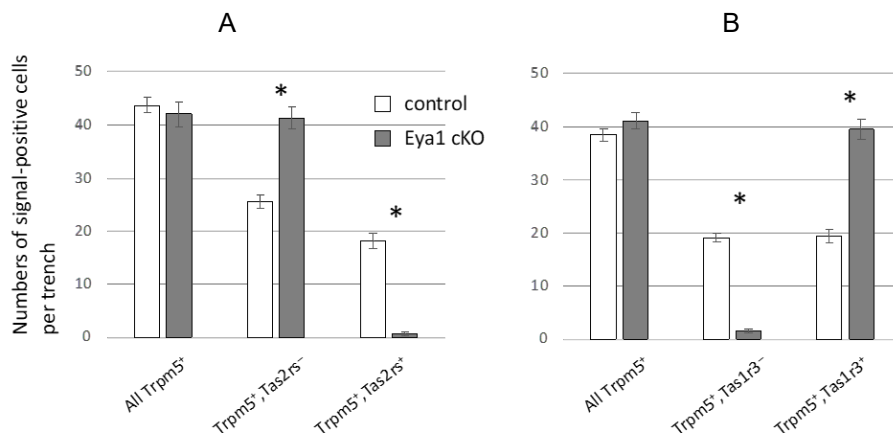


Fig. 3 Comparison of signal-positive cell numbers

- A. Signal-positive cell numbers per trench in the circumvallate papillae of control mice (white) and *Eya1* conditional knockout (cKO) mice (gray) assessed by double-label in situ hybridization analyses of *Trpm5* and *Tas2rs*.
- B. Signal-positive cell numbers per trench in the circumvallate papillae of control (white) and *Eya1* cKO (gray) mice assessed by double-label in situ hybridization analyses of *Trpm5* and *Tas1r3*.
- Symbols depict means, error bars represent \pm s.e.m. (n = 3 control (white) and *Eya1* cKO (gray) mice); * P < 0.05.

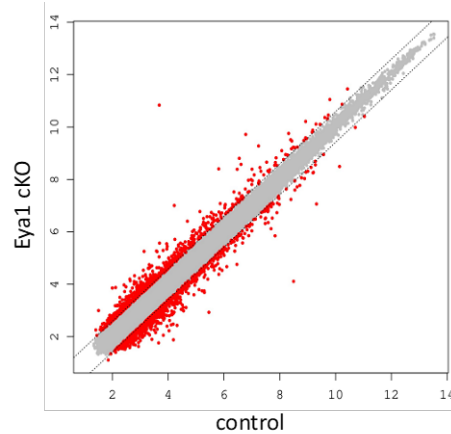


Fig. 4 Comparison of gene expression between control and Eya1 cKO mice

Transcriptome analysis of the circumvallate papillae of control mice and Eya1 conditional knockout (cKO) mice was performed. A scatter plot of gene expression is shown. Red dots indicate the genes with 1.5-fold or greater expression in either group of mice.

3. 3 Eya1 cKO マウスの味蕾を用いたマイクロアレイ解析

次に、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスの味蕾を多く含む有郭乳頭上皮を用いて、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行い、マウス間での遺伝子発現の比較を行った。取得した遺伝子発現量のデータ cKO マウスの有郭乳頭上皮で発現量の高い、あるタを用いて散布図 (**Fig. 4**)を作成したところ、Eya1 は、コントロールマウスの有郭乳頭上皮で発現量の高い遺伝子が多く抽出された。

4. 考察

本研究では、味蕾中の一部の味細胞(苦味および高濃度の塩味の受容に関与)および未分化の細胞に発現する Eya1 遺伝子の機能を明らかにするために、味蕾特異的な Eya1 欠損マウスを作製し、解析した。組織学的な解析を行ったところ、味蕾において、苦味受容体の発現が大きく減少する一方、甘味・うま味受容体の発現は増加していることを見出した。細胞数の定量を行ったところ、甘味、うま味、苦味細胞に共通して発現する Trpm5 のシグナル陽性細胞数はコントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスにおいて有意な差は観察されなかったものの、苦味受容体 Tas2rs のシグナル陽性細胞数は Eya1 cKO マウスにおいて有意に減少し、また、甘味・うま味受容体 Tas1r3 のシグナル陽性細胞数は Eya1 cKO マウスにおいて有意に増大していた。これらのことから、Eya1 cKO マウスの味蕾において苦味および高濃度の塩味の受容に関与する味細胞が減少し、甘

味・うま味受容細胞が増加することが示され、Eya1 が苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生・分化に必要な因子であることが明らかとなった。さらに、コントロールマウスおよび Eya1 cKO マウスの味蕾のトランスクリプトーム解析を行うことにより、両マウス間で発現量に差のある遺伝子が多く見出され、これらの遺伝子の解析を行うことによって、Eya1 と協調して機能する転写因子の探索だけでなく、苦味および高濃度の塩味の受容細胞に特異的に発現する遺伝子の同定を行うことも可能となる。

4. 1 味細胞分化における Eya1 の機能

Eya1 は、味蕾中の苦味細胞および未分化の細胞に発現する転写因子として同定された⁽⁸⁾。Eya1 が Skn-1a 系譜の味細胞(甘味、うま味、苦味、低濃度の塩味を受容する味細胞)の一部において分化段階の比較的早い時期から発現すること、また、Skn-1a 欠損マウスにおいて Eya1 の発現が消失することから、Eya1 は、Skn-1a 系譜の味細胞の分化に関与していることが考えられていたが、その機能に関しては不明であった。そこで、味蕾特異的に Eya1 を欠損するマウスを作製し、解析したところ、味蕾において、苦味受容体遺伝子である Tas2rs の発現頻度が大きく減少していた (**Fig. 1**)。一方、甘味・うま味受容体 Tas1r3 遺伝子の発現頻度が増大していた (**Fig. 1**)。苦味受容体 Tas2rs 遺伝子の発現が減少したことで、以下の2つの可能性が考えられる。一つは、苦味受容体の発現制御に関与すること、もう一つは、苦味細胞(高濃度の塩味の受容にも関わる細

胞)自体の発生・分化に関与することである。これらの可能性を検証するため、味蕾における *Double-label in situ hybridization* を行い、細胞数を計数したところ、甘味、うま味、苦味細胞に発現する *Trpm5* 遺伝子の発現頻度はコントロールマウスと *Eya1* cKO において同程度であったこと (Fig. 2, Fig. 3), *Eya1* cKO マウスの味蕾では甘味・うま味受容体である *Tas1r3* の発現が増大し (Fig. 2, Fig. 3), また, *Trpm5* 発現細胞の約 96%の細胞において *Tas1r3* のシグナルが観察されたことから, *Eya1* cKO マウスの味蕾では, 苦味細胞 (つまり苦味および高濃度の塩味を受容する細胞) が大きく減少し, 代わりに甘味, うま味細胞が増加していると考えられる。これらのことから, *Eya1* は *Trpm5* などの甘味, うま味, 苦味細胞に共通して発現する遺伝子の発現制御に関与する可能性や甘味, うま味, 苦味細胞に共通した細胞数の制御に関与する可能性は低く, *Eya1* は苦味および高濃度の塩味を受容する細胞の発生・分化に必要な因子であることが示唆された。

味細胞の発生・分化過程において, *Skn-1a* は, 甘味細胞, うま味細胞, 苦味 (および高濃度の塩味) 細胞, 低濃度の塩味細胞の分化に必要な因子である^(6, 7)。これらの *Skn-1a* 系譜の味細胞の分化過程において, *Eya1* は分化段階の初期に発現すること⁽⁸⁾, *Eya1* を欠損した味蕾では, *Tas2rs* 発現細胞が消失し, その代わりに *Tas1r3* 発現細胞ができることから, *Eya1* は未分化の前駆細胞から苦味および高濃度の塩味を受容する細胞への運命決定に関与することが示唆される。本研究で解析した有郭乳頭の味蕾では, *Skn-1a* 系譜の味細胞は, *Tas1r3* 発現細胞と *Tas2rs* 発現細胞に二分されることから, 少なくとも有郭乳頭の味蕾において, *Skn-1a* 系譜の味細胞のデフォルトは *Tas1r3* を発現する細胞である可能性がある。

5. 今後の課題

Skn-1a は, 前駆細胞から甘味, うま味, 苦味, 塩味細胞への分化に必要であることが示されていたが, これらの *Skn-1a* 系譜の味細胞の細分化機構は不明であった。本研究では, *Skn-1a* 系譜の味細胞の一種である苦味および高濃度の塩味を受容細胞に発現する転写因子 *Eya1* の機能を解析することにより, *Eya1* がこれらの味受容細胞の分化に関与することが示された。一方で, いくつか検討すべき課題もある。本研究では, *Skn-1a* 系譜の味細胞が主に甘味・うま味細胞 (マーカーとして *Tas1r3* を用いた) と苦味細

胞 (マーカーとして *Tas2rs* を用いた) である有郭乳頭の味蕾を対象とし, 低濃度の塩味受容細胞が存在する茸状乳頭の味蕾の解析は未だ行っていない。*Eya1* は低濃度の塩味受容細胞には発現していないもの⁽⁸⁾, *Eya1* cKO マウスにおける低濃度の塩味受容細胞の細胞数の増減やそれらの細胞に発現する遺伝子の解析は行っていない。今後はこれらの解析を行うことにより, 低濃度の塩味受容細胞の発生・分化過程における *Eya1* の関与を明らかにする必要がある。

Eya1 は, *Six* などの他の DNA 結合能を持つ転写因子と結合して転写を活性化する補助因子であり, *Eya1* 単独では DNA 結合能を持たないため, *Eya1* と他の因子との複合体が協働して転写を制御し, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生や分化に関与すると考えられる。*Eya1* と協働して味細胞の分化に関連する転写因子の候補因子の探索には, 本研究で取得した *Eya1* cKO およびコントロールマウスの味蕾のトランスクリプトームデータが非常に有用である。これらのデータを解析することにより, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞に特異的に発現する遺伝子を取得し, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞の発生や分化に関与する分子機構の詳細を明らかにすることを目指したい。さらには, トランスクリプトームデータを用いて, 苦味および高濃度の塩味の受容細胞に特異的に発現する遺伝子を取得することにより, 特に, 高濃度の塩味の受容に関与する新たな分子知見が得られることが期待される。

6. 文献

- 1) Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288–294.
- 2) Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. 2009. Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell* 139:234–244.
- 3) Tu, Y.-H., Cooper, A.J., Teng, B., Chang, R.B., Artiga, D.J., Turner, H.N., Mulhall, E.M., Ye, W., Smith, A.D., and Liman, E.R. 2018. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* 359:1047–1050.
- 4) Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2010.

- The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297–301.
- 5) Oka, Y., Butnaru, M., Buchholtz, L. Von, Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. 2013. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494:472–475.
- 6) Matsumoto, I., Ohmoto, M., Narukawa, M., Yoshihara, Y., and Abe, K. 2011. Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci* 14:685–687.
- 7) Ohmoto, M., Jyotaki, M., Foskett, J.K., and Matsumoto, I. 2020. Sodium-Taste Cells Require Skn-1a for Generation and Share Molecular Features with Sweet, Umami, and Bitter Taste Cells. *ENeuro* 7.
- 8) Ohmoto, M., Kitamoto, S., and Hirota, J. 2021. Expression of Eya1 in mouse taste buds. *Cell Tissue Res* 383:979–986.
- 9) Xu, P.X., Adams, J., Peters, H., Brown, M.C., Heaney, S., and Maas, R. 1999. Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23:113–7.
- 10) Ohmoto, M., Lei, W., Yamashita, J., Hirota, J., Jiang, P., and Matsumoto, I. 2020. SOX2 regulates homeostasis of taste bud cells and lingual epithelial cells in posterior tongue. *PLoS One* 15.

Molecular Mechanisms Underlying Differentiation of High Salt Taste Cells

Makoto Ohmoto

Takasaki University of Health and Welfare

Summary

The sense of taste occurs when chemical substances in food are detected by taste cells in the taste buds located in the epithelium of the oral cavity. The five basic tastes that humans can recognize are sweet, umami, bitter, salty, and sour. Sweet, umami, bitter, and sour tastes are each detected by different taste cells. It has been shown that salty tastes have two different detection pathways: low-concentration sodium taste and high-concentration salt taste. The former is detected by different taste cells from those that detect sweet, umami, bitter, and sour tastes, while the latter is detected by bitter and sour taste cells. As for the molecular mechanism that generates this diversity of taste cell types, the transcription factor *Skn-1a* (*Pou2f3*) is an essential factor in the differentiation of sweet, umami, bitter, and low sodium taste cells. This study focuses on *Eya1*, a transcription factor expressed in bitter taste cells (i.e., taste cells that detect bitter taste and high-concentration salt taste) and undifferentiated taste bud cells, to analyze the involvement of *Eya1* in the differentiation of taste cells that detect bitter taste and high-concentration salt taste.

To analyze the function of *Eya1* in taste buds, we used a knock-in mouse line expressing CreERT2, a drug-inducible Cre recombinase, in the stem cells of taste buds (*Krt5-CreERT2*) and an *Eya1*-flox mouse line, and generated taste bud-specific mice lacking *Eya1* (*Eya1* cKO mice). The expression study in the circumvallate papillae showed that the signal frequency of bitter taste receptors (*Tas2rs*) was greatly reduced compared to that of control mice. The number of signal-positive cells was counted and compared between control mice and *Eya1* cKO mice. Although no significant difference was observed in the number of signal-positive cells for *Trpm5*, which is commonly expressed in sweet, umami, and bitter taste cells, the number of signal-positive cells for *Tas2rs* was significantly decreased in *Eya1* cKO mice, and the number of signal-positive cells for *Tas1r3* was significantly increased in *Eya1* cKO mice. These results indicate that the number of taste cells involved in the detection of bitter and high salt tastes in the taste buds of *Eya1* cKO mice is decreased, while the number of sweet and umami cells is increased, suggesting that *Eya1* is a necessary factor for the differentiation of bitter and high salt taste receptor cells.