

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	Trpm5陽性化学感覚細胞における転写因子Skn-1a/Pou2f3の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	山下純平
Author(English)	Junpei Yamashita
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10819号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:廣田 順二,和地 正明,一瀬 宏,蒲池 利章,鈴木 崇之
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10819号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Trpm5 陽性化学感覚細胞における  
転写因子 Skn-1a/Pou2f3 の機能解析

博士論文

2017 年度

山下 純平  
東京工業大学大学院  
生命理工学研究科  
生物プロセス専攻

## 本研究の要約

近年、味蕾の甘味・苦味・旨味細胞と同様に味覚関連分子を発現する微絨毛細胞が、気道や消化器官をはじめとした様々な器官に存在することが明らかになってきている。これらの細胞は、共通してイオンチャネルである **Trpm5** を有し、そのほとんどが味覚受容体を発現していることから **Trpm5** 陽性化学感覚細胞と呼ばれる。一般に苦味を呈する化学物質は毒物であることが多く、動物は苦味を舌で感じたときに、反射的に吐き出すことで毒物の体内への侵入を防いでいる。最近、気道や尿道といった器官の **Trpm5** 陽性化学感覚細胞が、同様に苦味受容体を介して生体外から侵入してきた有害物質を排除するような機能を有していることがわかってきた。これらのことから **Trpm5** 陽性化学感覚細胞は、化学感覚を介して生体防御反応に関与する可能性が考えられているが、**Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生メカニズムは明らかになっていない。

味蕾の甘味・苦味・旨味細胞や呼吸上皮の孤立化学感覚細胞の産生において転写因子 **Skn-1a** が必須な機能をもつ。発現する遺伝子や形態学的な類似性から、他の器官の **Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生においても **Skn-1a** が重要な機能をもつことが示唆される。本研究では、**Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生メカニズムの解明を目的として、嗅上皮や気管、消化器官、胸腺、尿道などといった様々な器官における **Skn-1a** の発現解析及び **Skn-1a** 機能欠損型マウスにおける **Trpm5** 陽性化学感覚細胞マーカー遺伝子の発現解析をおこなった。その結果、解析したすべての器官において **Skn-1a** が **Trpm5** 陽性化学感覚細胞に発現し、**Skn-1a** 機能欠損変異の導入によって **Trpm5** 陽性化学感覚細胞が消失することがわかった。以上の結果から、**Skn-1a** は **Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生に必須な因子として機能していることが明らかになった。

## 略語一覧

AC3	adenylyl cyclase type 3
AHLs	acyl-homoserine lactones
AP	alkaline phosphatase
ATP	adenosine triphosphate
BAC	bacterial artificial chromosome
CALHM1	calcium homeostasis modulator 1
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCC	cholinergic chemosensory-like cells
ChAT	choline acetyltransferase
CNGC	cyclic nucleotide-gated channel
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAG	diacylglycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride n-hydrate
Delk1	Doublecortin-like kinase 1
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DIG	digoxigenin
DNP	dinitrophenyl
DTA	diphtheria toxin a
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Fast Red TR	4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemi-zinc chloride salt
GAP43	growth associated protein 43
GDP	guanosine diphosphate
eGFP	enhanced green fluorescent protein
Gnat3	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 3
Gnat3	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 3
GPCR	g protein-coupled receptor
GTP	guanosine triphosphate
HNPP	2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate
HRP	horseradish peroxidase
IL25	interleuin-25
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate
IP3R3	IP3 receptor type 3
ISH	<i>in situ</i> hybridization
Mash1	mus musculus achaete-scute complex homolog-like 1
NeuroD	neurogenic differentiation factor
OMP	olfactory marker protein
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKD1L3	polycystic kidney disease 1 like 3
PKD2L1	polycystic kidney disease 2 like 1
PLCB2	phospholipase b2
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SCCs	solitary chemosensory cells
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tasa1r	taste receptor, type 1
Tasa2r	taste receptor, type 2
TRP	transient receptor potential
Trpm5	transient receptor potential cation channel M, member5

## 目次

略語一覧	3
第1章 序論	6
1-1. 化学感覚	7
1-1-1) 嗅覚系	7
1-1-2) 味覚系	8
1-1-3) Trpm5 陽性化学感覚細胞	10
1-2. 転写因子 Skn-1a	11
1-2-1) 転写因子 Skn-1a	11
1-2-2) 甘味・苦味・旨味細胞や孤立化学感覚細胞での Skn-1a の機能	12
1-3. 本研究の目的	12
第2章 嗅上皮 Trpm5 陽性微絨毛細胞における Skn-1a の機能解析	22
2-1. 序論	23
2-2. 実験方法	23
2-2-1) マウス	23
2-2-2) 嗅上皮の凍結試料の作製	23
2-2-3) 嗅上皮組織切片の作製	24
2-2-4) 嗅上皮における <i>in situ</i> hybridization	24
2-2-5) 嗅上皮における二色 <i>in situ</i> hybridization	26
2-2-6) 嗅上皮における免疫組織化学	27
2-2-7) 定量解析	27
2-3. 結果	28
2-3-1) 嗅上皮における Skn-1a 遺伝子発現解析	28
2-3-2) Skn-1a 機能欠損型嗅上皮の表現型解析	28
2-3-3) Skn-1a 機能欠損型嗅上皮における嗅神経細胞分化マーカーの発現解析	30
2-3-4) Trpm5 陽性微絨毛細胞における味覚情報伝達因子の発現解析	31
2-4. 考察	31
2-4-1) 微絨毛細胞産生における Skn-1a の機能	32
2-4-2) Trpm5 陽性微絨毛細胞の生体機能	33
2-4-3) 生体における Skn-1a の示唆される機能	33
第3章 Trpm5 陽性化学感覚細胞の産生における Skn-1a の機能解析	46
3-1. 序論	47
3-2. 実験方法	47
3-2-1) マウス	47
3-2-2) 凍結試料の作製	47
3-2-3) 組織切片の作製	48
3-2-4) <i>in situ</i> hybridization	48
3-2-5) 二色 <i>in situ</i> hybridization	49
3-2-6) 免疫組織化学	49
3-2-7) RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)	50
3-2-8) 定量解析	51
3-3. 結果	52
3-3-1) 気管における Skn-1a の発現及び Skn-1a 機能欠損型気管での発現解析	52
3-3-2) 消化器官における Skn-1a の発現及び Skn-1a 機能欠損型消化器官での発現解析	53
3-3-3) 耳管、胸腺、尿道、膵管における Skn-1a の発現及び Skn-1a 機能欠損型	

器官での発現解析	54
3-3-4) 小腸における味覚情報伝達因子の発現解析	54
3-4. 考察	56
3-4-1) 気管 brush cells における Skn-1a の機能	56
3-4-2) 小腸における味覚受容体やそのシグナル伝達因子の発現	57
3-4-3) Trpm5 陽性化学感覚細胞の生体機能	57
第4章	70
結言	70
参考文献	73

## 第1章

### 序論

## 1-1. 化学感覚

化学感覚とは、匂いやフェロモン、食物に含まれる栄養素や有害物質などの化学物質の情報を感知する感覚であり、主に嗅覚と味覚に分けることができる。嗅覚系では嗅神経細胞が空気中の揮発性化学物質である匂い分子を、味覚系では味細胞が食物中の味分子を検出しており、どちらの化学感覚細胞も生物の適応行動や本能行動に深く関係している。近年、これらの化学感覚細胞に加えて、カルシウムイオン依存性の陽イオンチャネルである Trpm5 (Transient receptor potential cation channel M, member5) を発現する細胞 (以下、Trpm5 陽性化学感覚細胞) が様々な器官において発見されており、化学感覚細胞として機能していることがわかっている。本章では、生物の持つ代表的な化学感覚器官である嗅覚系と味覚系について概説し、その後本研究の対象である Trpm5 陽性化学感覚細胞について詳述する。

### 1-1-1) 嗅覚系

嗅覚は、外界の匂い物質の受容を通じて周囲の情報を認識する化学感覚であり、食物の探索や危険の察知、個体同士のコミュニケーションや繁殖など、動物が生きていくうえで必要な行動に密接に関係している。嗅覚器官である嗅上皮は、主に嗅神経細胞、支持細胞、基底細胞の3種類の細胞から構成されている (Fig1-1)。嗅神経細胞は、樹状突起と軸索を有する双極性神経細胞であり、匂いの受容を担う。嗅神経細胞は樹状突起を嗅上皮表面に伸ばしており、樹状突起の先端の繊毛上に発現する嗅覚受容体が匂い分子を受容する。支持細胞は、嗅神経細胞よりも表層側に位置し、嗅上皮の構造維持や保護といった役割を持つと考えられている。基底細胞は、嗅上皮を構成する細胞の幹細胞や前駆細胞で、基底膜に接する扁平な形状の水平基底細胞とその表層側に位置する球形基底細胞に分類される。これら主要な3つの細胞に加え、新たな細胞種として微絨毛細胞が嗅上皮に存在することが最近明らかになった。微絨毛細胞は、その頂点に微絨毛を持ち、嗅上皮の支持細胞層よりもさらに表層側に散在している。嗅神経細胞や支持細胞と比較するとその数は少ない (Elsaesser *et al.*, 2005; Hansen and Finger, 2008; Weihong Lin *et al.*, 2008; Hegg *et al.*, 2010)。

匂い分子の検出を担う嗅覚受容体は、1991年に初めて発見された化学感覚受容体である (Buck and Axel, 1991)。マウスゲノムは約1100個の嗅覚受容体遺伝子を有すると考えられており、これはマウス遺伝子の約5%に相当する。一つの嗅覚受容体は複数の匂い分子を検出でき、一つの匂い分子は複数の嗅覚受容体で感知される。このような特徴が多種多様な匂い物質を感知・識別することを可能としている。嗅覚受容体はGタンパク質共役受容体 (GPCR, G protein-coupled receptor) であり、嗅神経細胞の繊毛上に発現する

(Fig1-2)。匂い分子が嗅覚受容体に結合すると、Gタンパク質の $\alpha$ サブユニット ( $G_{\alpha olf}$ ) が活性化される。活性型の  $G_{\alpha olf}$  はアデニル酸シクラーゼ (AC3, adenylyl cyclase type 3) を活性化し、ATP (adenosine triphosphate) を cAMP (cyclic adenosine monophosphate) とピロリン酸に変換する。細胞内 cAMP 濃度の上昇に伴い、環状ヌクレオチド作動性チャネル (cyclic nucleotide-gated channel; CNGC) が開口し、細胞外から  $Ca^{2+}$  と  $Na^+$  が流入することによって、嗅神経細胞は脱分極する。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇によって  $Ca^{2+}$  活性化型  $Cl^-$  チャンネルが開口し、細胞内から細胞外へ  $Cl^-$  が流出することで、脱分極がさらに促進される。このように、匂い分子の情報は嗅覚受容体の活性化によって開始される、嗅神経細胞の脱分極という形で軸索を介して主嗅球へと伝達される。

主嗅球は表層側に糸球体という球形の構造体を有する (Fig1-2)。特定の嗅覚受容体を発現した嗅神経細胞群は軸索を単一の糸球体へ投射し、糸球体内の二次神経細胞と神経接続する。二次神経細胞には主に僧坊細胞、房飾細胞、傍糸球体細胞の三種類があり、そのうち僧坊細胞、房飾細胞の軸索は外側嗅索を通過して嗅皮質へと投射している。匂い情報は高次中枢へと伝達される過程で様々な修飾を受け、動物は匂い分子を匂いとして認識することができる。

### 1-1-2) 味覚系

味覚は、嗅覚と並ぶ代表的な化学感覚である。ヒトをはじめとした動物は、味覚系を用いて食品の栄養素 (甘味やうま味)、毒性 (苦味物質)、腐敗度 (酸性度)、塩濃度を評価している。哺乳類は、基本五味と呼ばれる5つの味覚を味覚系によって認識することができると考えられている。炭水化物や糖類、たんぱく質、アミノ酸、塩分など生存に必要な物質は、甘味、旨味、塩味として認識する。一方で、食物に含まれる毒性物質や腐敗度を苦味、酸味として認識する。口腔内に取り込まれた食物中の味物質は、舌上や口蓋に存在する味蕾中の味細胞によって検出される。齧歯類では、味蕾は舌前方に散在する茸状乳頭、舌後方に一つある有郭乳頭、舌後方の側面に存在する葉状乳頭、軟口蓋に集中して存在する (Fig1-3)。一つの味蕾は約 50~100 個の味細胞から形成されており、表層側には味物質が入り込むための味孔が存在する (Chaudhari and Roper, 2010)。

味蕾中の味細胞には、末梢感覚神経である味覚神経が投射しており、味細胞が味物質を検出すると、味覚神経に情報を伝達する (Fig1-4)。舌上の味蕾に投射している味覚神経は、鼓索神経と舌咽神経の2つに分けられる。鼓索神経は舌前方の茸状乳頭や葉状乳頭の味蕾の一部に投射しており、舌咽神経は有郭乳頭や葉状乳頭に投射している。また、口蓋にある味蕾には浅在性大錐体神経が投射している。舌咽神経の細胞体は錐体神経節に、鼓索神経や浅在性大錐体神経の細胞体は膝神経節に位置し、各神経節の味覚神経は延髄の

弧束核へと投射している。弧束核からさらに結合腕傍核、視床、大脳皮質の味覚野へと味覚情報が伝達されることで、動物は味物質を味覚として認知する。

一つの味細胞には、基本五味のうち1種類の味に対する受容体が局在しており、発現する受容体によって検出する味物質が決まる。酸味と塩味はイオンチャネルを介して味覚分子を認識すると考えられている。酸味受容体の候補としては広義の TRP (transient receptor potential) イオンチャネルである PKD2L1 (Polycystic kidney disease 2 like 1) と PKD3L1 (Polycystic kidney disease 1 like 3)が二つの研究グループから報告されている(Huang *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2006)。培養細胞に PKD2L1 と PKD3L1 を共発現させて、酸味物質(クエン酸)で刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することや(Ishimaru *et al.*, 2006)、味蕾の PKD2L1 発現細胞を DTA (diphtheria toxin a) によって死滅させたマウスでは、酸味に対して味神経応答が認められないことから(Huang *et al.*, 2006)、PKD2L1 と PKD3L1 の複合体が酸味受容体として機能していることが強く示唆される。しかしながら、PKD3L1 機能欠損型マウスや PKD2L1 と PKD3L1 の機能を共に欠損したマウスにおいても酸味に対する神経応答が認められたことから(Nelson *et al.*, 2010; Horio *et al.*, 2011)、PKD2L1 と PKD3L1 以外にも酸味受容に関わる分子があることが示唆されている。

哺乳類は甘味・旨味・苦味を呈する物質を GPCR によって認識する (Fig1-5)。GPCR 型味覚受容体遺伝子には *Tas1r1*、*Tas1r2*、*Tas1r3* から構成される *Tas1r* ファミリーと約 35 種類の *Tas2r* 遺伝子から構成される *Tas2r* ファミリーが存在する。*Tas1r1* と *Tas1r2* は最初に発見された味覚受容体であり、ラットの有郭乳頭の cDNA からクローニングされた(Hoon *et al.*, 1999)。続いて、マウスの甘味受容との関連が知られていた *Sac* 遺伝子座近傍から *Tas1r3* が発見された(Max *et al.*, 2001; Montmayeur *et al.*, 2001; Sainz *et al.*, 2001)。培養細胞にラットの *Tas1r2* と *Tas1r3* を発現させて、甘味物質(スクロースやサッカリン、アセスルファムカリウムなど)で刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することから、*Tas1r1* と *Tas1r3* のヘテロ複合体が甘味物質の受容体であることが証明された(Nelson *et al.*, 2001)。同様に、マウスの *Tas1r2* と *Tas1r3* を発現させた培養細胞に旨味物質(アミノ酸)で刺激すると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することから、*Tas1r2* と *Tas1r3* のヘテロ複合体が旨味物質の受容体であることが証明された(Nelson *et al.*, 2002)。

*Tas2r* 遺伝子ファミリーはヒトでは約 25 種類、マウスでは約 35 種類あり、苦味受容体の候補遺伝子として 2000 年に報告された(Adler *et al.*, 2000; Matsunami *et al.*, 2000)。培養細胞にマウス苦味受容体である *Tas2r105* や *Tas2r108* を発現させると、それぞれが

シクロヘキサミドやデナトニウムに応答することや(Chandrashekar *et al.*, 2000)、Tas2r105 機能欠損型マウスはシクロヘキサミドに対する応答性が低下することから(Mueller *et al.*, 2005)、Tas2r が苦味受容体であることが証明されている。

甘味・苦味・旨味細胞は共通のシグナル伝達経路を介して味覚情報を伝達する (Fig1-5)。リガンドが甘味・旨味・苦味受容体に結合すると、G タンパク質に結合した GDP (guanosine diphosphate) が GTP (guanosine triphosphate) と交換する。その結果 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット・GTP 複合体は G タンパク質  $\beta\gamma$  サブユニットと解離し、PLC $\beta$ 2 (phospholipase b2) を活性化する。この PLC $\beta$ 2 が PIP $_2$  (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) を加水分解し、DAG (diacylglycerol) と IP $_3$  (inositol 1,4,5-trisphosphate) を産生する。IP $_3$  が小胞体膜上の IP3R3 (IP $_3$  receptor type 3) に結合すると、小胞体から Ca $^{2+}$  が放出され、細胞内 Ca $^{2+}$  濃度が上昇する。細胞内 Ca $^{2+}$  濃度の上昇により Trpm5 が開口し、細胞外から陽イオンの流入を引き起こし脱分極が起こる。最終的に、ATP 透過性イオンチャネルである CALHM1 (calcium homeostasis modulator 1) を介して神経伝達物質として ATP が細胞外へ放出され、神経接続する神経線維へと情報を伝達していると考えられている(Finger *et al.*, 2005; Taruno *et al.*, 2013)。近年、甘味・苦味・旨味細胞と類似したシグナル経路・細胞形態を持つ化学感覚細胞が気道上皮や尿道、消化器官などで発見され、共通して Trpm5 を発現することがわかっている。この化学感覚細胞の概要について次項で説明する。

### 1-1-3) Trpm5 陽性化学感覚細胞

Trpm5 は、甘味・苦味・旨味受容細胞において同定されたカルシウム依存性の一価の陽イオンチャネルであり(Pérez *et al.*, 2002)、味覚のシグナル伝達において必須の機能を持つ(Hofmann *et al.*, 2003; Liu and Liman, 2003; Prawitt *et al.*, 2003)。興味深いことに Trpm5 を発現する味細胞様の化学感覚細胞が味覚系以外の器官においても発見されている(Kaske *et al.*, 2007)。

例えば、マウス呼吸上皮の孤立化学感覚細胞 (solitary chemosensory cells, SCCs) や気管上皮の brush cells は villin 陽性の微絨毛を細胞頂点に持ち、味覚受容体やそのシグナル伝達に関わる因子、Gnat3 や Plcb2、Trpm5 を発現する(Kaske *et al.*, 2007; Ohmoto *et al.*, 2008; M. Tizzano *et al.*, 2010; Krasteva *et al.*, 2011)。これらの細胞はデナトニウムやシクロヘキサミドといった苦味物質や細菌の分泌物である AHLs (acyl-homoserine lactones) に応答し、マウスの呼吸回数の変化や局所的な炎症反応、鋤鼻器の防御応答を誘導することが報告されている(Finger *et al.*, 2003; M. Tizzano *et al.*, 2010; Ogura *et al.*, 2010; Krasteva *et al.*, 2011; G Krasteva *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2014)。また、ヒト

においても副鼻腔上皮に孤立化学感覚細胞が存在することがヒト組織を用いた RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) や免疫組織化学の結果から判明している(Barham *et al.*, 2013)。ヒト副鼻腔上皮細胞由来の培養細胞を用いた解析から、ヒト副鼻腔の孤立化学感覚細胞はマウス孤立化学感覚細胞と同様に Tas1r3 や Tas2r を発現し、抗菌ペプチドの分泌への関与が考えられている(Lee *et al.*, 2014, 2017; Lee and Cohen, 2015)。

哺乳動物の尿道においても Trpm5 を発現する brush cells が発見されている(Deckmann *et al.*, 2014, 2015)。マウス尿道の brush cells は Tas1r1 や Tasa1r3 を発現しており、尿道を苦味物質(デナトニウム)で刺激すると brush cells が活性化し、アセチルコリンを分泌する。brush cells の活性化は膀胱排尿筋の収縮を誘導することから、brush cells が侵入してきた有害物質や病原菌を感知し、排尿を誘導することでそれらを体外に排出するという生体防御反応への関与が考えられている(Deckmann *et al.*, 2014)。

胃や小腸、大腸など消化管上皮には Trpm5 を発現する細胞として tuft cells が知られている(Kaske *et al.*, 2007)。長い間、tuft cells の機能は未解明のままであったが、近年の研究から小腸 tuft cells が蠕虫や原虫といった寄生虫の感染を検出し、IL-25(interleuin-25)を分泌することで、II型免疫応答が開始することが明らかになっている(von Moltke *et al.*, 2015; Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016)。

他にも胸腺髄質(Panneck *et al.*, 2014; Soultanova *et al.*, 2015)や耳管上皮(Krasteva *et al.*, 2012)、腭管上皮(Delgiorno *et al.*, 2014; Schütz *et al.*, 2015)にも Trpm5 陽性化学感覚細胞が存在することが報告されており、体内に侵入した有害物質に対する生体防御反応に関与すると考えられるが、その機能はわかっていない。Trpm5 陽性化学感覚細胞は Trpm5 に加えて、共通して ChAT (choline acetyltransferase) を発現している(Krasteva *et al.*, 2011; Ogura *et al.*, 2011; Krasteva *et al.*, 2012; Deckmann *et al.*, 2014; Schütz *et al.*, 2015; Soultanova *et al.*, 2015)。呼吸上皮の孤立化学感覚細胞や気管、尿道の brush cells は各器官の神経に接続しているため、アセチルコリンを神経伝達物質として用いて情報を伝達していると考えられる。一方で、tuft cells や嗅上皮の Trpm5 陽性微絨毛細胞、胸腺の Trpm5 陽性化学感覚細胞は神経接続していないことから、アセチルコリンを周囲の細胞へ分泌または自己分泌することで、生体防御反応に関与することが示唆されている。

## 1-2. 転写因子 Skn-1a

### 1-2-1) 転写因子 Skn-1a

本論文の研究対象である Skn-1a は、POU (Pit-Oct-Unc) 型転写因子をコードする遺伝子として同定された Skn-1 遺伝子のスプライシングバリエントの一つである(Andersen

*et al.*, 1992, 1997)。POU 型転写因子は、約 80 アミノ酸残基の POU 特異的ドメインと、約 60 アミノ酸残基の POU 型ホメオドメインの二つの DNA 結合ドメインが繋がった構造をしたタンパク質である(Fig.1-6、Herr *et al.*, 1988)。2つの DNA 結合ドメインは DNA 結合モチーフの一種であるヘリックス・ターン・ヘリックス構造をとり、オクタマー配列と呼ばれる DNA 配列 (ATGCAAAT) に特異的に結合することが結晶構造解析の結果から明らかになっている(Klemm *et al.*, 1994)。二つの DNA 結合ドメインにより特定の遺伝子の上流にあるオクタマー配列に結合し、その遺伝子の転写調節を行っていると考えられている(Ryan and Rosenfeld, 1997)。POU 型転写因子は様々な細胞種の分化に関わっていることが知られている。例えば、POU2F2 に分類される Oct-2 は B 細胞に発現する転写因子として同定され(Clerc *et al.*, 1988)、B 細胞の最終分化に関わることが知られている(Schubart *et al.*, 2001)。POU2F3 に分類される Skn-1a についてはこれまでに、上皮・真皮・毛嚢の発生・分化に関与し、子宮頸癌由来の細胞株の増殖を抑制することが報告されている(Andersen *et al.*, 1992, 1997; Enomoto *et al.*, 2004)。しかしながら、皮膚以外に Skn-1a が発現する器官は最近まで明らかになっていなかった。

#### 1-2-2) 甘味・苦味・旨味細胞や孤立化学感覚細胞での Skn-1a の機能

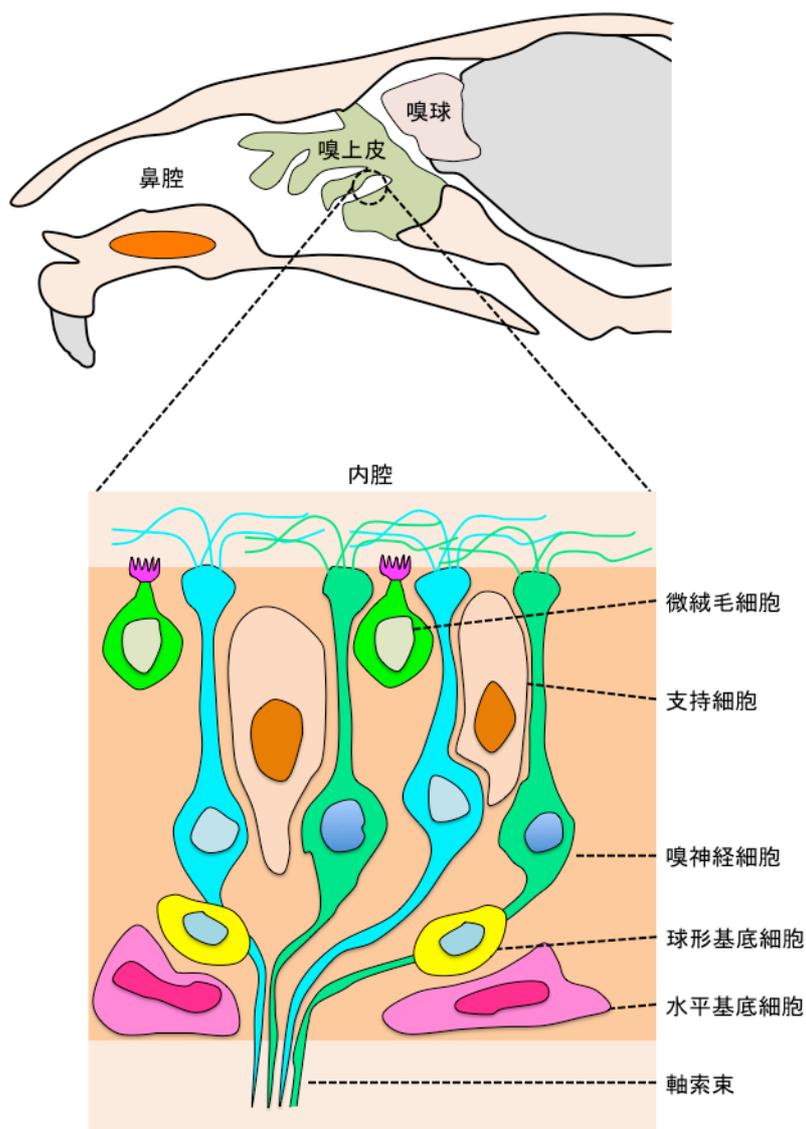
近年、Skn-1a が上皮や真皮、毛嚢以外にも味蕾の Trpm5 陽性化学感覚細胞である甘味・苦味・旨味細胞に発現し、甘味・苦味・旨味細胞への分化に必須であることが明らかになった(Matsumoto *et al.*, 2011)。in situ hybridization による共発現解析の結果から、Skn-1a は甘味・苦味・旨味細胞に特異的に発現しており (Fig1-7 A)、Skn-1a 機能欠損型マウスの味蕾では、甘味・苦味・旨味細胞マーカー遺伝子の発現が消失し、その代わりに酸味細胞マーカー遺伝子の発現の上昇が認められる (Fig1-7 B, C)。このように、甘味・苦味・旨味細胞と酸味細胞は共通の前駆細胞から分化し、甘味・苦味・旨味細胞への運命決定因子として Skn-1a が機能している。

味蕾以外にも、マウス呼吸上皮の Trpm5 陽性化学感覚細胞である孤立化学感覚細胞に Skn-1a は発現する (Fig1-8 A)。Skn-1a 機能欠損型マウスでは孤立化学感覚細胞のマーカー遺伝子の発現が認められなくなることから、孤立化学感覚細胞の産生にも Skn-1a が必須であることがわかっている(Fig1-8 B、Ohmoto *et al.*, 2013)。このように Skn-1a は細胞分化や産生において重要な機能を持っていることが明らかになっているが、Skn-1a が発現する組織・細胞については解析が進んでいない。

#### 1-3. 本研究の目的

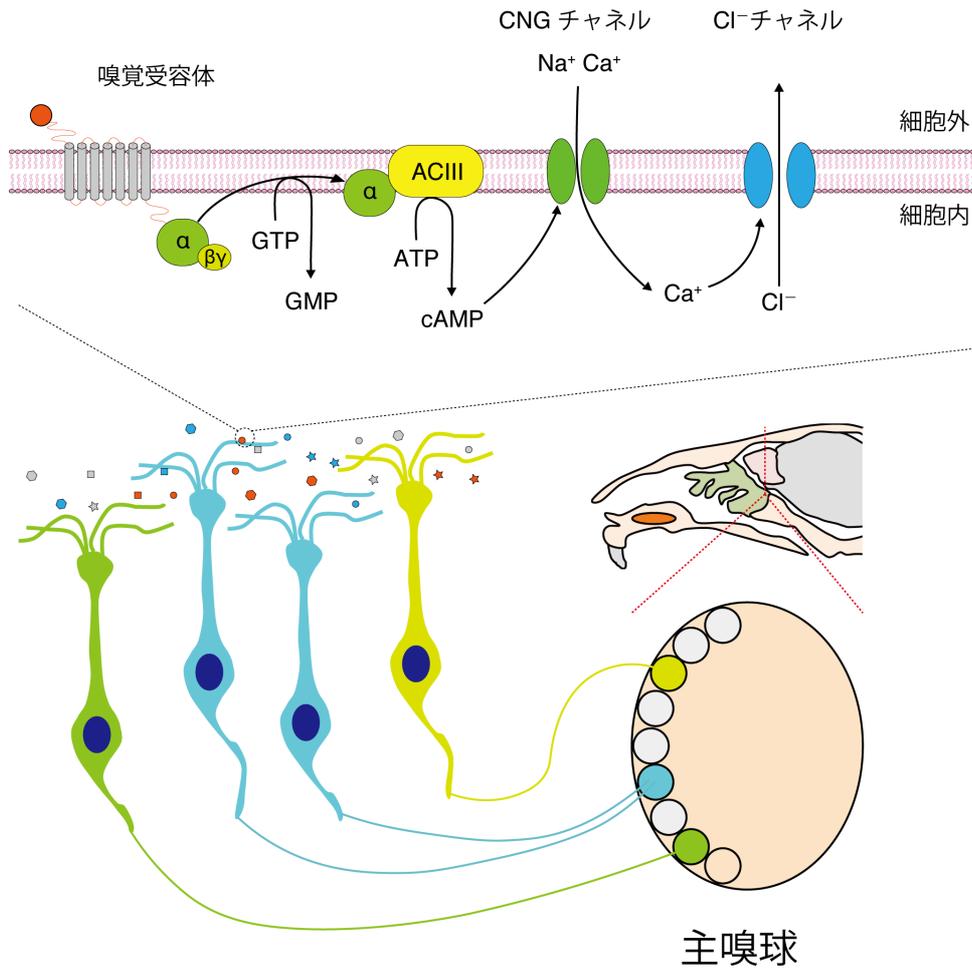
転写因子 Skn-1a が味蕾の味細胞や呼吸上皮の孤立化学感覚細胞といった化学感覚細

胞の産生に重要な機能を持つことが明らかになっている。一方で、皮膚や味覚系、呼吸上皮以外に **Skn-1a** の発現する器官についての詳細な解析は行われていない。産生に **Skn-1a** が必要な二種類の化学感覚細胞には共通して **Trpm5** を発現するという特徴があり、**Skn-1a** が **Trpm5** を発現する細胞の産生に重要な機能を持つことが示唆される。近年、**Trpm5** 陽性化学感覚細胞は様々な器官において見つかり、形態学的解析や生理学的解析は徐々に進められているが、産生メカニズムに関する知見はほとんど得られていない。本研究では、**Trpm5** 陽性化学感覚細胞における **Skn-1a** の発現解析及び **Skn-1a** 機能欠損型マウスにおける **Trpm5** 陽性化学感覚細胞マーカー遺伝子の発現解析によって、**Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生メカニズムを解明することを目的とした。



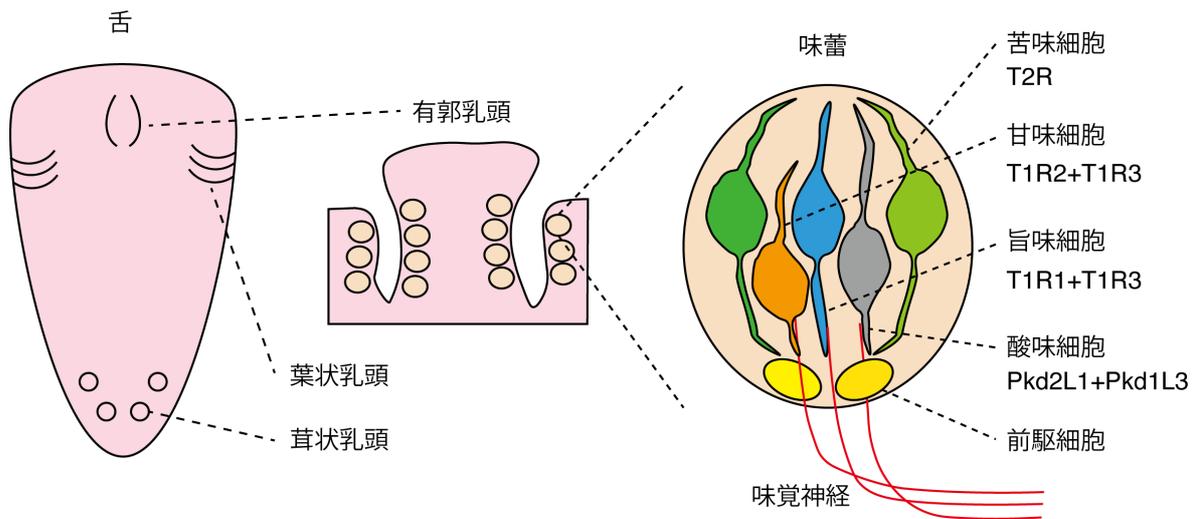
**Fig.1-1 嗅上皮の細胞構成**

マウス頭部の矢状断面と嗅上皮断面の模式図を示す。鼻腔を通り、嗅上皮に到達した匂い分子は、嗅神経細胞の繊毛に局在する嗅覚受容体によって検出される。嗅上皮は嗅神経細胞以外にも支持細胞、微絨毛細胞、基底細胞から構成される。支持細胞は嗅神経細胞層よりも表層側に位置し、嗅上皮の構造維持や嗅神経細胞の保護をする機能がある。微絨毛細胞は支持細胞よりもさらに表層側に存在し、他の細胞種よりも比較的数が少ない。基底細胞は嗅上皮を構成する細胞の幹細胞であり、形や機能によって球形基底細胞と水平基底細胞に分類できる。Mombaerts, *Nature Rev.* 2004 を参考に作成した。



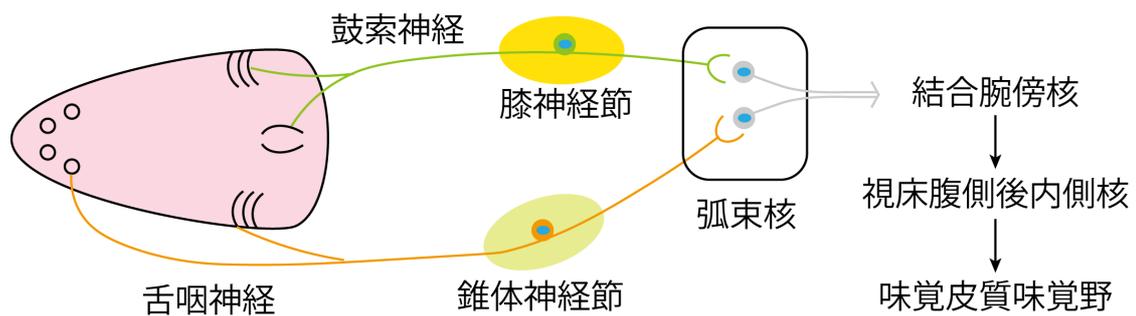
**Fig.1-2 嗅覚シグナル伝達メカニズムと嗅神経細胞の糸球体への投射**

嗅覚受容体に匂い分子が結合すると  $G_{\alpha_{olf}}$  の活性化によって AC3 が cAMP を合成する。細胞内 cAMP 濃度の上昇によって CNG チャンネルが開き、続いて  $\text{Cl}^-$  チャンネルが開くことによって嗅神経細胞が脱分極する。嗅神経細胞は匂い情報を軸索を介して主嗅球の糸球体に伝達し、さらに高次中枢に情報が伝達されることで、動物は匂いを認知することができる。また、一つの嗅神経細胞は一種類の嗅覚受容体のみを発現しており、同じ嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の集団は同じ糸球体に軸索を伸ばしている。Mombaerts, *Nature Rev.* 2004 を参考に作成した。



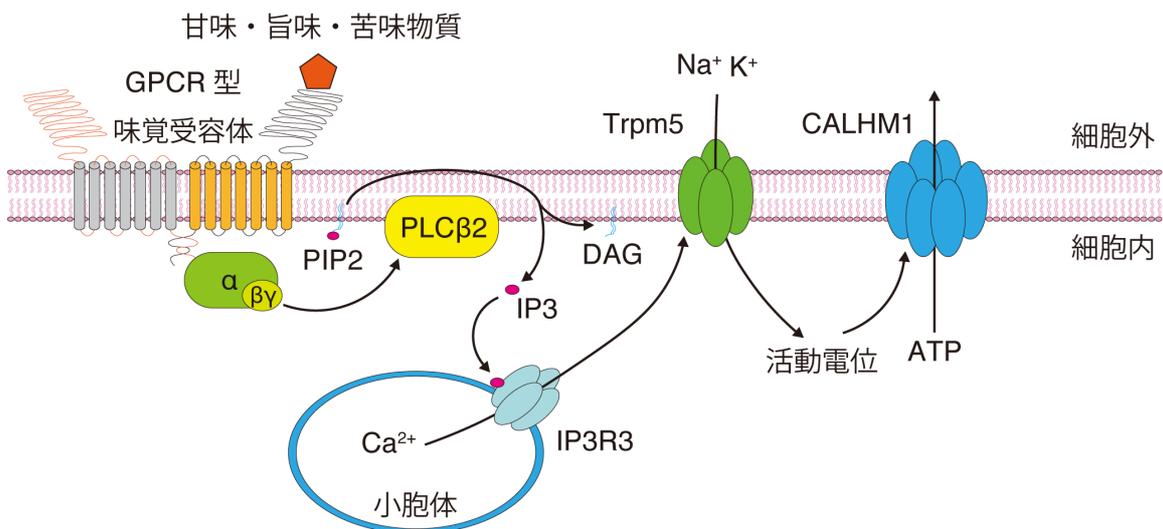
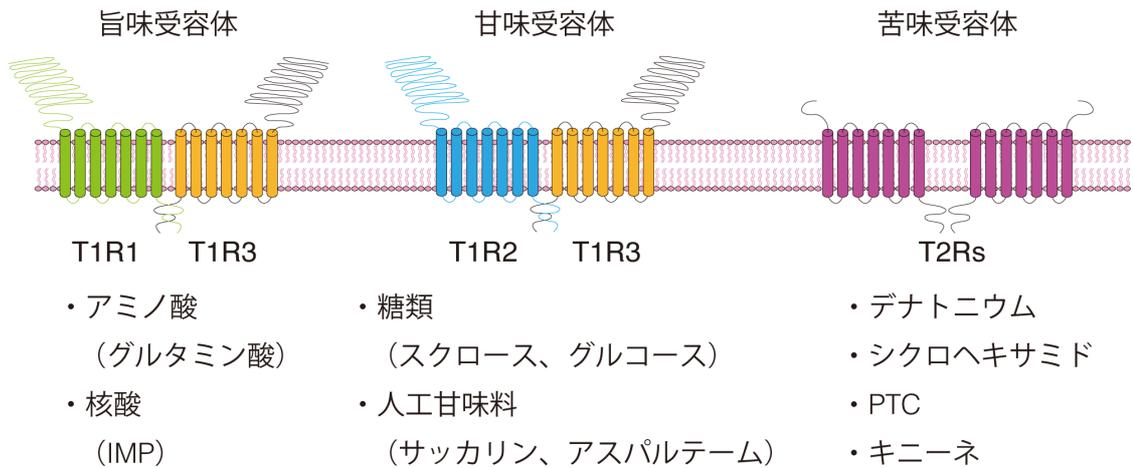
**Fig.1-3 マウス舌の構造**

味蕾は50-100個の味細胞からなり、舌上では乳頭構造に局在する。舌前方には茸状乳頭が点在しており、一つの茸状乳頭は一つの味蕾を有する。舌の左右の側方に位置する葉状乳頭は、複数の味蕾を有する。齧歯類では舌の後方に有郭乳頭を一つ持ち、複数の味蕾が存在している。味蕾は、旨味、甘味、苦味、酸味に応答する味細胞の他に、味蕾基底部の味細胞前駆細胞や支持細胞から構成される。旨味細胞にはTas1r1とTas1r3、甘味細胞にはTas1r2とTas1r3、苦味細胞にはTas2r、酸味細胞にはPkd2L1とPkd1L3が発現しており、各味分子の受容体として機能していると考えられている。



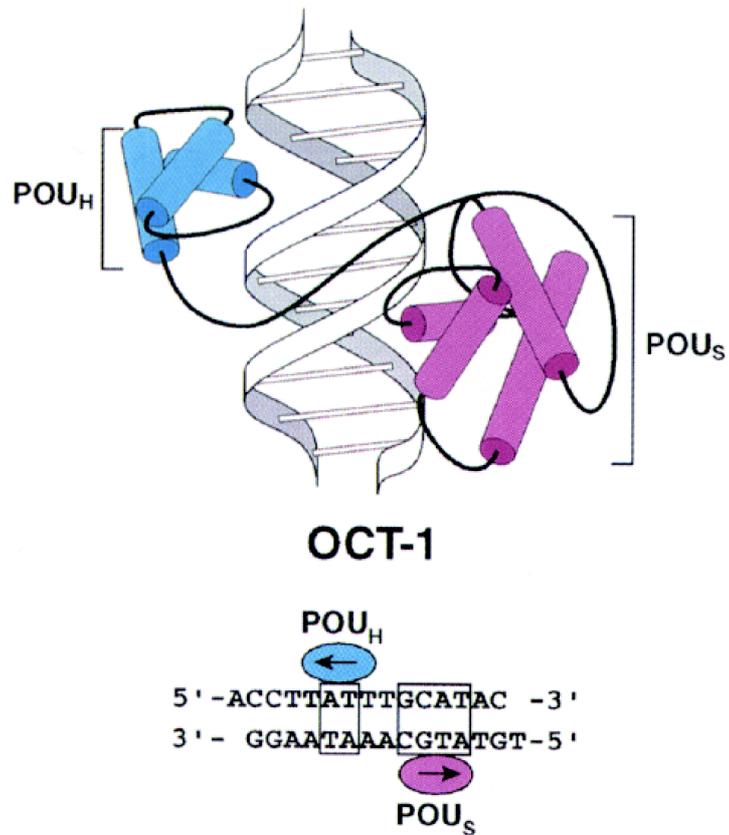
**Fig.1-4 マウス味覚系**

各乳頭に存在する味蕾には味覚神経が投射している。茸状乳頭や舌前方側の葉状乳頭には舌咽神経が、舌後方側の葉状乳頭や有郭乳頭には鼓索神経が投射している。舌咽神経の細胞核は膝神経節に、舌咽神経の細胞体は錐体神経節に存在し、各味覚神経は弧束核へと軸索を伸ばしている。味覚情報は弧束核から結合腕傍核、視床を介して大脳皮質味覚野に伝達され、生物は味覚を認識する。



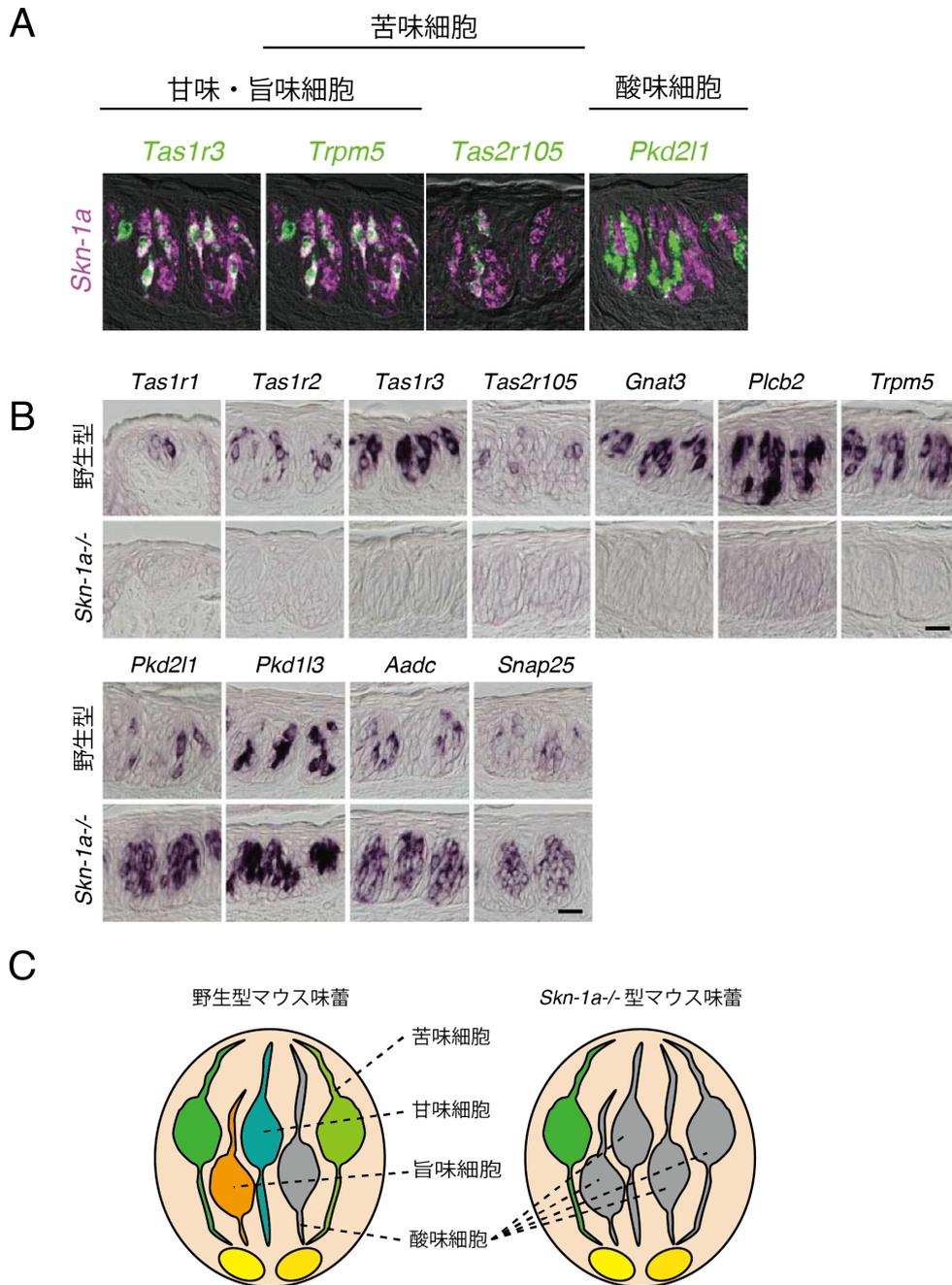
**Fig.1-5 GPCR 型味覚受容体とそのシグナル伝達経路**

旨味・甘味・苦味受容体は GPCR 型味覚受容体である。T1R1 と T1R3 のヘテロダイマーが旨味受容体として機能し、マウスではアミノ酸や核酸の検出を担っている。T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーは甘味受容体として機能し、スクロースやグルコースなどの糖類、人工甘味料を検出する。T2Rs は苦味受容体として機能し、各 T2Rs 特異的に応答するリガンドが存在する。例えば、T2R105 はシクロヘキサミド、T2R108 はデナトニウムに応答する。GPCR 型味覚受容体は共通のシグナル伝達経路を有する。味覚受容体にリガンドが結合すると G タンパク質の βγ サブユニットが PLCβ<sub>2</sub> を活性化し、PIP<sub>2</sub> を DAG と IP<sub>3</sub> に加水分解する。IP<sub>3</sub> は小胞体膜状の IP3R3 を開口し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇する。続いて、Trpm5 が開口し、一価の陽イオンが細胞内に流入し、活動電位が発生する。その結果、CALHM1 から ATP が放出され、接続する神経に情報が伝達される。



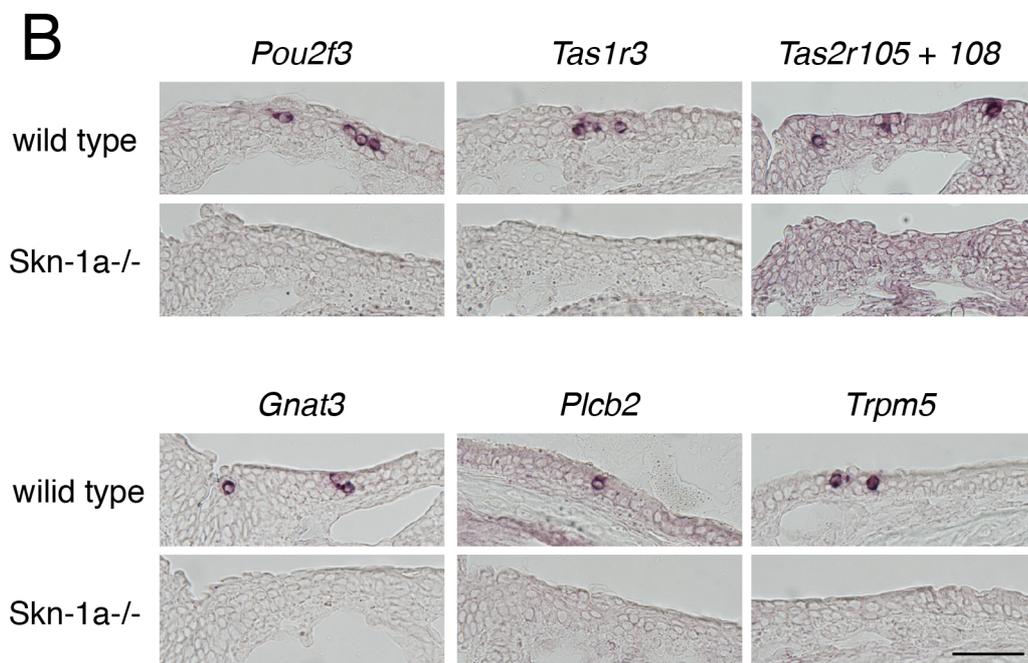
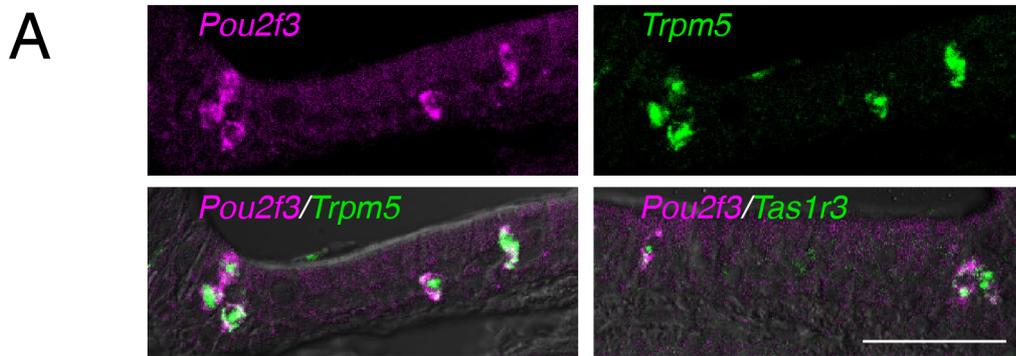
**Fig.1-6 POU 型転写因子の構造**

Skn-1a は POU 型転写因子の一つである。POU 型転写因子は、POU ホメオドメインと POU 特異的ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを持っている。二つの結合ドメインがオクタマー配列と呼ばれる塩基配列に結合することで、転写の制御を行っていると考えられている(Ryan and Rosenfeld, 1997)。



**Fig.1-7 味蕾における *Skn-1a* の機能**

(A) *Skn-1a* は甘味・旨味・苦味細胞のマーカー遺伝子である *Tas1r3*、*Tas2r105*、*Trpm5* と共発現するが、酸味細胞マーカーである *Pkd211* とは共発現しない。このことから、*Skn-1a* は甘味・苦味・旨味細胞に発現していることがわかる。(B、C) *Skn-1a* 機能欠損型マウス味蕾では甘味・苦味・旨味細胞のマーカー遺伝子の発現が認められなくなる。一方で、酸味細胞のマーカー遺伝子の発現が増加する。*Skn-1a* の機能欠損によって甘味・苦味・旨味細胞が消失し、代わりに酸味細胞数が増加したためである。このように *Skn-1a* は甘味・旨味・苦味細胞への運命決定に必要である(Matsumoto *et al.*, 2011)。



**Fig.1-8 マウス呼吸上皮における Skn-1a の発現解析及び Skn-1a 機能欠損型マウスにおける孤立化学感覚細胞マーカー遺伝子の発現解析**

(A)マウス呼吸上皮における *in situ* hybridization の結果から、*Skn-1a* と *Trpm5* や *Tas1r3* といった孤立化学感覚細胞マーカー遺伝子が共発現していた。この結果から孤立化学感覚細胞に *Skn-1a* が発現していることがわかる。(B)野生型マウス呼吸上皮において認められた孤立化学感覚細胞のマーカー遺伝子 (*Tas1r3*、*Tas2r105+108*、*Gnat3*、*Plcb2*、*Trpm5*) の発現が *Skn-1a* 機能欠損型マウスでは認められなかった。孤立化学感覚細胞の産生に *Skn-1a* が必要であることがわかる(Ohmoto et al., 2013)。

## 第2章

### 嗅上皮 Trpm5 陽性微絨毛細胞における Skn-1a の機能解析

## 2-1. 序論

嗅上皮は、主に嗅神経細胞、支持細胞、基底細胞の3種類の細胞から構成されている。近年、新たな細胞種として微絨毛細胞が発見された(Hansen and Finger, 2008; Lin *et al.*, 2008)。微絨毛細胞は、Trpm5の発現の有無によってTrpm5陽性微絨毛細胞とTrpm5陰性微絨毛細胞に大別され、Trpm5陽性微絨毛細胞はさらに細胞体や微絨毛の大きさによってTrpm5aとTrpm5b微絨毛細胞に分けられる(Hansen and Finger, 2008)。Trpm5が、甘味・苦味・旨味細胞や孤立化学感覚細胞の化学感覚機能に必要なイオンチャネルであること(Zhang *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Tizzano *et al.*, 2010; Ogura *et al.*, 2010)、また温度感受性を有することから(Talavera *et al.*, 2005)、嗅上皮のTrpm5陽性微絨毛細胞は化学刺激や温度刺激の感覚に関与していると考えられている。実際、Trpm5陽性微絨毛細胞はChATを発現し、微生物溶解液やATP刺激などの化学刺激や熱刺激に応答してアセチルコリンを放出し、周囲の嗅神経細胞や支持細胞を活性化することが示されている(Ogura *et al.*, 2011)。このようにTrpm5陽性微絨毛細胞は化学・熱感覚細胞として機能し、嗅覚応答を修飾するような機能を持つことが示唆されているが、その細胞産生メカニズムは明らかになっていない。Trpm5陽性化学感覚細胞である味蕾の甘味・苦味・旨味細胞や呼吸上皮の孤立化学感覚細胞の産生には転写因子Skn-1aが必須であることが明らかになっており、同様に嗅上皮のTrpm5陽性微絨毛細胞の産生にも転写因子Skn-1aが関与している可能性が考えられた。そこで本章では、嗅上皮のTrpm5陽性微絨毛細胞の産生における転写因子Skn-1aの関与を明らかにすることを目的とし、嗅上皮におけるSkn-1aの発現解析及びSkn-1a機能欠損型マウス嗅上皮におけるTrpm5陽性微絨毛細胞マーカー遺伝子の発現解析をおこなった。

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1) マウス

マウスの飼養環境ならびに実験操作は動物実験に関するガイドラインに従った。解析に用いたSkn-1a機能欠損型マウス(Matsumoto *et al.*, 2011)は、Skn-1a遺伝子ヘテロ欠損型マウス同士の交配により得た。遺伝子型はPCR (polymerase chain reaction) により確認した。ChAT<sup>(BAC)</sup>-eGFPマウス(Tallini *et al.*, 2006)はコーネル大学、Kotlikoff博士から提供して頂いた。

### 2-2-2) 嗅上皮の凍結試料の作製

マウスをイソフルランによって麻酔し、約2 mLのPBS緩衝液(phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)と

10~15 mL の 4% PFA (paraformaldehyde)/PBS による灌流固定後に嗅上皮を摘出した。摘出後、免疫組織化学に用いる試料は 30 分間、*in situ* hybridization に用いる試料は一晩、4% PFA/PBS に浸して後固定した。PFA による固定後、450 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) /PBS (pH 8.0) を用いて 3 日間以上 4°C で脱灰処理をした。脱灰後、30% スクロース/PBS に一晩以上浸した。アルミホイルの包埋カップに Frozen Section Compound (Leica) を注入し、試料を Frozen Section Compound に沈め、液体窒素でカップの底から徐々に凍結した。

### 2-2-3) 嗅上皮組織切片の作製

嗅上皮の薄切片 (厚さ 10  $\mu\text{m}$ ) は、クライオスタット (Leica, CM3050S III) を用いて作成した。切片は MAS コートスライドガラス (松波硝子工業) に貼り付け、-80°C で保存もしくは直ちに免疫組織化学や *in situ* hybridization に使用した。

### 2-2-4) 嗅上皮における *in situ* hybridization

組織中の mRNA を検出するために *in situ* hybridization (以下 ISH) をおこなった。ハイブリダイゼーションまでの実験操作は、RNase free の条件下でおこなった。使用前に十分に風乾させた組織切片を 4% PFA/PBS で 15 分間再固定後、PBS で 3 分間洗浄した。RNA プローブの細胞内への浸透性を上昇させるために、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinase K/TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA) に 12 分間、37°C で反応させ、再び 4% PFA/PBS で 10 分間固定をおこない、Proteinase K の反応を止めた。PBS で洗浄後に、0.2 M HCl に 10 分間反応させた。PBS で洗浄後、150mL のトリエタノール・塩酸溶液 (0.1M triethanol amine, 0.2 M HCl) に 1 分間浸し、0.38 mL の無水酢酸 (最終濃度 3.7 mM) を加えてから 10 分間、スターラーで攪拌しながらアセチル化処理をおこなった。PBS で洗浄後、60%, 80%, 95%, 100%, 100% エタノールの順にそれぞれ 90 秒ずつ浸して脱水処理をした後、常温でスライドを風乾させた。DIG (digoxigenin) ラベルされた RNA プロローブを 200 倍希釈になるようにハイブリダイゼーションバッファー (50% deionized formamide, 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  yeast tRNA, 10% dextran sulfate, 1x Denhardt's solution, 600 mM NaCl, 0.25% SDS, 1mM EDTA (pH 8.0)) に添加し、このプローブ希釈溶液をスライドに滴下した。乾燥防止のために DURA SEAL (BMBio, L-2012) をスライドガラスにかぶせた。これらのスライドは 50% ホルムアミドで保湿されたチャンバー内で 65°C、14 時間のハイブリダイゼーション反応をおこなった。反応後、65°C の 5xSSC 緩衝液 (saline sodium citrate ; 750 mM NaCl, 85 mM sodium citrate) 中でパラフィルムを除去し、2xSSC/50% ホルムアミド溶液で 30 分間、65°C で洗浄した。

続いて、37°Cの TNE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中で RNase A (2 µg/mL) 処理をおこなった。37°Cの TNE 緩衝液で洗浄後、2xSSC で 20 分間、0.2xSSC で 20 分間、さらに 0.1xSSC で 20 分間、いずれの溶液も 65°Cで洗浄した。洗浄後、スライドを DIG1 緩衝液(100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.01% tween 20) 中に 5 分間浸し、DIG blocking reagent (Roche、11096176001) を DIG1 緩衝液に 1.0%で溶かしたブロッキング溶液をスライドにかけ、常温で 1 時間ブロッキングをおこなった。ブロッキング溶液で AP (alkaline phosphatase) 結合抗 DIG ヒツジ抗体 (Roche、11093274910) を 1000 倍希釈し、スライド上で一次抗体反応をおこなった。DIG1 緩衝液で 10 分の洗浄を三回おこなった後、DIG3 緩衝液(100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% tween 20) で 5 分間洗浄し、NBT/BCIP Stock Solution (Roche、11681451001) を DIG3 緩衝液で 50 倍に希釈した溶液を用いて常温で一晩発色させた。TE 緩衝液中で発色反応を止めた後、10%グリセロール水溶液で封入し、光学顕微鏡 (Olympus、BX51) を用いて観察した。本章で使用した RNA プローブのうち *Skn-1a* 及び *Trpm5*, *Gnat3*, *Plcb2*, *Tas1r3*, *Tas2r105*, *Tas2r108*, *IP3R3* (*Itpr3*) はモネル化学感覚研究所の松本先生から提供していただいた(Matsumoto *et al.*, 2011)。*Ngn1* 及び *GAP43*, *OMP* のプローブ情報は以下の論文に記載してある(Hirota and Mombaerts, 2004)。*Mash1* 及び *NeuroD*, *SCG10* はフランシスクリック研究所の Guillemot 博士から提供していただいた。

Table 2-1. ISH に使用した RNA プローブ情報

Gene	GeneBank accession No.	size	reference
<i>Skn-1a</i>	NM_011139.2	nucleotides 72–2363	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Trpm5</i>	NM_020277.2	nucleotide 310–3491	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Plcb2</i>	NM_177568.2	2.5 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Gnat3</i>	NM_001081143.1	1 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Tas1r3</i>	NM_031872.2	2.2 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Tas2r105</i>	NM_020501.1	1 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Tas2r108</i>	NM_020502.1	1 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>IP3R3</i>	NM_080553.3	3.4 kb	
<i>Mash1</i>	NM_008553.4		
<i>Ngn1</i>	NM_010896.2	nucleotides 111–811	Hirota <i>et al.</i> , 2004
<i>NeuroD</i>	NM_010894.2		
<i>SCG10</i>	NM_025285.2		
<i>GAP43</i>	NM_008083.2	nucleotides 147–860	Hirota <i>et al.</i> , 2004

OMP	NM_011010.2	nucleotides 820–2891	Hirota <i>et al.</i> , 2004
-----	-------------	----------------------	-----------------------------

### 2-2-5) 嗅上皮における二色 *in situ* hybridization

組織中での遺伝子の共発現解析のために蛍光標識の二色 *in situ* hybridization (以下二色 ISH)をおこなった。4% PFA/PBS による再固定の後に 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS で 30 分間処理することを除いて、ハイブリダイゼーションまでの操作は、通常の ISH (前項 2-2-4) の操作と同様である。DIG 標識 RNA プローブと DNP (dinitrophenyl) 標識の RNA プローブをそれぞれ 200 倍希釈になるようにハイブリダイゼーションバッファーに添加し、スライド上で 65°C、14 時間のハイブリダイゼーション反応をおこなった。反応の後に、通常の ISH と同様の操作で洗浄をおこなった。次に TNT 緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% tween 20) で 10 分間、常温で洗浄した。DNP 標識 RNA プローブ由来のシグナルの増幅のために、TSA Plus DNP System (PerkinElmer, NEL747B) を用いた。TSA Plus DNP System に付属されている TSA blocking reagent を TNT 緩衝液に 0.5% で溶かしたブロッキング溶液をスライドにかけ、常温で 1 時間ブロッキングをおこなった。ブロッキング溶液に、AP 結合抗 DIG ヒツジ抗体と HRP (horseradish peroxidase) 結合抗 DNP ラット抗体 (PerkinElmer, FP1129) をそれぞれ 1000 倍で希釈し、4°C で一晩反応させた。TNT 緩衝液で 10 分間の洗浄を三回おこなった後、TSA Plus DNP System に付属している TSA-DNP を用いて、シグナル増幅反応を 4°C で 10 分間おこなった。TNT 緩衝液での洗浄後、抗 DNP ウサギ抗体 (Molecular Probes, A-6430) をブロッキング溶液に 300 倍希釈で溶かし、二次抗体反応を常温で 30 分間おこなった。TNT 緩衝液での洗浄後、Alexa488 結合抗ウサギ IgG ロバ抗体 (Molecular Probes, A-11070) をブロッキング溶液に 500 倍希釈で溶かし、抗体反応を常温で 30 分間おこなった。TNT 緩衝液での洗浄後、さらに AP detection 緩衝液 (100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% tween 20) で洗浄した。DIG 標識した RNA プローブの検出反応は HNPP Fluorecent Detection set (Roche, 11 758 888 001) を用いておこなった。HNPP Fluorecent Detection set に含まれる HNPP (2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate) と Fast Red TR (4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemi-zinc chloride salt) を AP detection 緩衝液に 100 倍希釈で溶解し、スライド上で一時間、常温で発色反応をおこなった。反応後、PBST で三回洗浄し、polyvinyl alcohol mounting medium (DABCO, 10981) を用いて封入した。蛍光の観察には、共焦点顕微鏡 (Leica, TCS-SPE) を用いた。

### 2-2-6) 嗅上皮における免疫組織化学

嗅上皮におけるタンパク質の局在を観察するために、蛍光免疫組織化学をおこなった。スライドを PBS に 10 分間以上つけ、組織切片の周囲の Frozen Section Compound を流した後、4% PFA/PBS に常温で 5 分間反応させることにより再固定をおこなった。PBS で洗浄後、0.1% TritonX-100/PBS で 3 分間処理した。PBS で洗浄後、Target Retrieval Solution (Dako, S2367) を用いて抗原の賦活化を 80°C、20 分間おこなった。PBST (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% tween 20) で二回洗浄した後にブロッキングを 1 時間、常温でおこなった。抗 Trpm5 ウサギ抗体と抗 villin ヤギ抗体、抗 IP3R3 マウス抗体で染色する場合は 5% スキムミルク (雪印) /PBST を用いて、抗 Trpm5 ウサギ抗体と抗 ChAT ヤギ抗体で染色する場合は 2% normal horse serum, 0.3% TritonX-100, 1% bovine serum albumin/PBS を用いて、ブロッキングをおこなった。ブロッキング溶液に一次抗体を適切な濃度で希釈し、4°C で一晩以上抗体反応を行った。1 次抗体反応後、PBST で洗浄し、PBST で 500 倍に希釈した Alexa546 結合抗ヤギ IgG ロバ抗体もしくは Alexa546 結合抗マウス IgG ロバ抗体を常温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、抗 Trpm5 ウサギ抗体のシグナルを増幅するために、1.5% normal goat serum /PBST で再度ブロッキングした。PBST で洗浄後、1.5% normal goat serum /PBST で 200 倍希釈したビオチン結合抗ウサギ IgG ロバ抗体を常温で 30 分間反応させた。PBST で洗浄後、PBST で 500 倍希釈した Alexa488 結合ストレプトアビジンを常温で 30 分間反応させた。最後に、2 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride n-hydrate, Wako, 049-18801) /PBST を 3 分間反応させ、細胞核を染色した。Fluoromount (Diagnostic Biosystems, K 024) を用いて封入し、共焦点顕微鏡 (Leica, TCS-SPE) を用いて観察した。

本章で用いた抗体及び希釈率は次の通りである。抗 Trpm5 ウサギ抗体 (1:500、ACC-045、Alomone Labs)、抗 villin ヤギ抗体 (1:100、sc-7672、Santa Cruz Biotechnology)、抗 ChAT ヤギ抗体 (1:200、AB144P、Chemicon)、抗 IP3R3 抗体 (1:500、610312、BD Bioscience)、Alexa546 結合抗ヤギ IgG ロバ抗体 (1:500、A11056、Invitrogen)、Alexa546 結合抗マウス IgG ロバ抗体 (1:500、A10036、Invitrogen)、ビオチン結合抗ウサギ IgG ロバ抗体 (1:500、BA-1000、Vector Laboratories)、Alexa488 結合ストレプトアビジン (1:500、S11223、Invitrogen)。

### 2-2-7) 定量解析

*Skn-1a*、*Mash*、*Trpm5* 発現細胞数を定量するために、ISH 用に調整した嗅上皮試料を 10 µm の厚さに切り、10 切片ごとに一枚のスライドに貼り付けた。二色 ISH による染

色後、嗅上皮全体の各遺伝子の発現細胞数及び共発現細胞数を定量した。定量には、生後 30 日齢の野生型マウスを 3 個体用いた。

微絨毛細胞の細胞核の定量解析には ChAT<sup>(BAC)</sup>-eGFP マウスと Skn-1a 機能欠損型マウスを用いた。嗅上皮切片を 14  $\mu\text{m}$  の厚さで 20 枚毎にスライドに貼り付け、DAPI によって核染色をおこなった。嗅上皮の背側と正中線の領域の写真を取得し、写真を再構築した。支持細胞層よりも表層側にある細胞核の数を定量し、定量した領域の嗅上皮の長さを計測することで、細胞核の密度を算出した。

## 2-3. 結果

### 2-3-1) 嗅上皮における Skn-1a 遺伝子発現解析

マウス嗅上皮における *Skn-1a* と *Trpm5* の発現解析は、*Skn-1a* および *Trpm5* 特異的 RNA プロブを用いた ISH によってそれぞれ解析した。その結果、*Skn-1a* は嗅上皮の表層側と基底側で、*Trpm5* は嗅上皮表層側のみで発現が認められた (Fig.2-1)。嗅上皮の表層側における *Skn-1a* 及び *Trpm5* の発現パターンから、甘味・苦味・旨味細胞や孤立化学感覚細胞の結果と同様に *Skn-1a* が *Trpm5* 陽性微絨毛細胞に発現している可能性が考えられた。

そこで *Trpm5* 陽性微絨毛細胞に *Skn-1a* が発現しているかどうかを明らかにするために、*Trpm5* と *Skn-1a* それぞれに対する RNA プロブを用いた二色 ISH をおこなった。その結果、嗅上皮表層側の *Trpm5* 発現細胞の一部で *Skn-1a* の共発現が認められた (Fig.2-2A 矢印)。一方、基底側の *Skn-1a* 発現細胞は *Trpm5* を発現していなかった (Fig.2-2A 矢尻)。次に *Trpm5* と *Skn-1a* の共発現細胞数を定量し、共発現率を算出した。嗅上皮において *Trpm5* 発現細胞のうち  $36.9\pm 8.7\%$  は *Skn-1a* を、*Skn-1a* 発現細胞のうち  $77.7\pm 6.0\%$  は *Trpm5* を共発現していた (Fig.2-2B, C)。嗅上皮表層側において *Skn-1a* 発現細胞の大多数が *Trpm5* を共発現していたため、*Trpm5* 陽性微絨毛細胞に *Skn-1a* が発現することが明らかになった。基底側の *Skn-1a* 発現細胞には *Trpm5* の発現が認められなかったことから、*Trpm5* 陽性微絨毛細胞以外の細胞種や *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の前駆細胞に *Skn-1a* が発現している可能性が示唆された。

### 2-3-2) Skn-1a 機能欠損型嗅上皮の表現型解析

嗅上皮の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞における *Skn-1a* の機能を調べるために、*Skn-1a* 機能欠損型マウスの表現型の解析をおこなった。ISH によって *Trpm5* の発現を解析したところ、野生型マウス嗅上皮表層側に認められていた *Trpm5* の発現が、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは消失していた (Fig.2-3)。この結果から、*Skn-1a* は *Trpm5* の遺伝子発現もし

くは *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生に関与している 2 つの可能性が考えられた。

この可能性を検証するため、*Trpm5* 以外の微絨毛細胞マーカーである villin 及び ChAT の発現を *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいて解析した。villin は *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の微絨毛を構成し、ChAT は細胞体に局在する。抗 villin 抗体、抗 *Trpm5* 抗体を用いた免疫組織化学の結果から、野生型マウス嗅上皮の表層側では、微絨毛に villin、細胞体に *Trpm5* のシグナルを持つ細胞が観察された (Fig.2-4 A)。一方、*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮では、これらのシグナルは認められなかった (Fig.2-4 A)。抗 ChAT 抗体、抗 *Trpm5* 抗体を用いた免疫組織化学においても同様に、野生型マウスでは *Trpm5* 及び ChAT のシグナルを持つ細胞が観察されたが、*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮においては認められなかった (Fig.2-4 B)。これらの結果から、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは *Trpm5* 陽性微絨毛細胞自体が消失していると考えられた。

微絨毛細胞は嗅上皮の最も表層側に位置し、その細胞核は嗅神経細胞や支持細胞の細胞核よりも表層側に位置する。そのため、細胞核の位置で微絨毛細胞と支持細胞や嗅神経細胞との区別が可能である。*Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいて *Trpm5* 陽性微絨毛細胞が消失しているのであれば、*Skn-1a* 機能欠損型マウスの嗅上皮の最も表層側の細胞核の数が減少することが予想される。*Skn-1a* の欠損による *Trpm5* 陽性微絨毛細胞産生への影響を定量的に調べるために、*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮表層側の細胞核密度を測定した。実験には *Trpm5* 陽性微絨毛細胞特異的に eGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現する、ChAT<sup>(BAC)</sup>-eGFP トランスジェニックマウス(ChAT-eGFP)をコントロールとして用いた (Fig.2-5)。ChAT-eGFP マウス嗅上皮の最も表層側に GFP 陽性の細胞核 (DAPI 陽性) が認められた (Fig.2-6A 矢尻)。一方で、GFP 陰性の細胞核も認められた (Fig.2-6A 矢印)。細胞核密度の測定結果から、ChAT-eGFP マウスの嗅上皮背側内側領域の表層側における DAPI 陽性細胞核の密度は  $915 \pm 67.6$  nuclei/mm<sup>2</sup>、GFP 陽性細胞は  $733 \pm 38.2$  cells/mm<sup>2</sup> であった。すなわち最も表層側における DAPI 陽性細胞核の約 80% が ChAT/*Trpm5* 陽性微絨毛細胞由来の細胞核であると考えられる (Fig.2-7)。

次に *Skn-1a* 機能欠損型マウスの細胞核密度を測定した。*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮の最も表層側に DAPI 陽性の細胞核が認められた (Fig.2-6B 矢印)。また DAPI 陽性細胞核の密度は  $244 \pm 49.5$  nuclei/mm<sup>2</sup> であった。ChAT-eGFP マウスと比較して *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮表層側における DAPI 陽性細胞核数は 73% 減少していることがわかった (Fig.2-7)。この減少量は、野生型マウスにおいて認められた *Trpm5* 陽性微絨毛細胞由来の細胞核密度と同程度であるため、*Trpm5* 陽性微絨毛細胞の消失に起因すると考えられた。この結果から、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは *Trpm5* 陽性微絨毛細胞自体が消失

しており、*Skn-1a* は *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生において必須な機能を持つことが強く支持された。一方、*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮表層側において DAPI 陽性細胞核が野生型と比較して約 27%残っていた。これは *ChAT-eGFP* マウスの嗅上皮表層側の DAPI 陽性細胞核の約 20%を占める *Trpm5* 陰性微絨毛細胞が *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいても残っているためであると考えられる。つまり、*Skn-1a* の機能欠損は *Trpm5* 陰性微絨毛細胞の産生に対して大きな影響は持たないと予想される。

先行研究において、*IP3R3-tauGFP* マウス嗅上皮を電子顕微鏡で観察した結果、細胞頂点に villin 陰性の微絨毛を持つ *IP3R3* 陽性の微絨毛細胞が存在することが報告されている(Hegg *et al.*, 2010)。*ChAT-eGFP* マウス嗅上皮表層側の GFP 陰性の細胞核および *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮表層側の細胞核は、*IP3R3* 陽性微絨毛細胞由来である可能性が考えられるため、*IP3R3* 微絨毛細胞における *Skn-1a* の発現と *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおける *IP3R3* の局在を調べた。

二色 ISH により *IP3R3* 陽性微絨毛細胞における *Skn-1a* の発現を解析した。*IP3R3*, *Skn-1a* プローブのシグナルはどちらも嗅上皮の表層側に認められたが、共発現する細胞は認められなかった (Fig.2-8 A)。次に、免疫組織化学により、野生型マウスと *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおける *Trpm5* と *IP3R3* の共局在を解析した。野生型マウスでは *Trpm5* と *IP3R3* のシグナルは嗅上皮の表層側において認められたが、共局在する細胞は認められなかった (Fig.2-8 B)。*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは、*Trpm5* のシグナルは認められなかったが、*IP3R3* のシグナルは認められ (Fig.2-8 B)、その局在は野生型マウスと大きな差は認められなかった。以上の結果から、*Skn-1a* は *IP3R3* 陽性微絨毛細胞に発現せず、*Skn-1a* の機能欠損は *IP3R3* 陽性微絨毛細胞の分化に影響しないことが明らかになった。このことから、*ChAT-eGFP* マウスの嗅上皮表層側における GFP 陰性の DAPI 細胞核及び *Skn-1a* 機能欠損型マウスの嗅上皮表層側の DAPI 陽性細胞核は *IP3R3* 陽性微絨毛細胞由来の細胞核であることが推察される。

### 2-3-3) *Skn-1a* 機能欠損型嗅上皮における嗅神経細胞分化マーカーの発現解析

二色 ISH による *Skn-1a* 遺伝子発現解析の結果、嗅上皮表層側の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞に加えて、基底側に *Skn-1a* を発現する細胞が認められた (Fig.2-2 A)。嗅上皮の基底側には嗅神経細胞の前駆細胞が存在することから、基底側の *Skn-1a* が嗅神経細胞系譜にある細胞に発現している可能性が考えられた。そこで基底側で発現する *Skn-1a* と嗅神経細胞系譜の関係を明らかにするために、嗅神経細胞系譜初期の分化マーカーである *Mash1*、*Ngn1*、*NeuroD* および成熟嗅神経細胞マーカーである *OMP* と *Skn-1a* の共発現を二色 ISH により解析した。その結果、嗅上皮基底側の一部の *Mash1* 発現細胞において *Skn-1a*

の発現が認められた (Fig.2-9 A)。一方で、*Ngn1*, *NeuroD* の発現は嗅上皮の基底側に認められたが、*Skn-1a* との共発現は認められなかった (Fig.2-9 B,C)。また、*OMP* は嗅上皮の中間層に強く発現していたが、*Skn-1a* との共発現は認められなかった (Fig.2-9 D)。以上の結果から、*Skn-1a* は *Ngn1*, *NeuroD*, *OMP* と共発現せず、一部の *Mash1* 発現細胞において発現することが明らかとなった。

次にマウス嗅上皮において *Mash1* と *Skn-1a* の共発現細胞数を定量し、共発現率を算出した。*Mash1* 発現細胞のうち  $1.4 \pm 0.3\%$  は *Skn-1a* を発現していた (Fig.2-10)。嗅神経細胞分化への運命決定因子である *Mash1* と *Skn-1a* が共発現していることから、*Skn-1a* の嗅神経細胞系譜への影響を解析した。*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮において、嗅神経細胞分化マーカーである *Mash1*, *Ngn1*, *NeuroD*, *SCG10*, *GAP43*, *OMP* の発現を、ISH を用いて解析した。その結果、野生型と *Skn-1a* 欠損型マウス嗅上皮において、嗅神経細胞分化マーカーの発現に異常はほぼ認められなかった (Fig.2-12)。*Mash1* 発現細胞のうち *Skn-1a* を共発現する細胞はごくわずか ( $1.4 \pm 0.3\%$ ) であり、*Skn-1a* の嗅神経細胞系譜への寄与はほとんどないものと考えられる。

#### 2-3-4) *Trpm5* 陽性微絨毛細胞における味覚情報伝達因子の発現解析

味蕾や呼吸上皮における *Trpm5* 陽性細胞は、苦味受容体遺伝子 *Tas2rs* や甘味うま味受容体遺伝子 *Tas1r3*, ホスホリパーゼ C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2) 遺伝子 *Plcb2*, G タンパク質 ( $\alpha$ -gustducin) 遺伝子 *Gnat3* などの味覚情報伝達分子を発現する。そこで嗅上皮の *Trpm5* 陽性細胞にも味覚受容体などの味覚情報伝達因子を発現しているかどうかを解析することにした。*Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas1r3*, *Plcb2*, *Gnat3* 特異的 RNA プローブを用いた ISH の結果、嗅上皮において *Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas1r3*, *Plcb2*, *Gnat3* の発現は認められなかった (Fig.2-12)。嗅上皮の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞は味覚情報伝達分子を発現しないことから、味蕾甘味・苦味・旨味細胞や孤立化学感覚細胞とは異なる分子的特徴を持った、新種の細胞であることが明らかとなった。

#### 2-4. 考察

本研究では、嗅上皮の新たな細胞種である *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生に転写因子 *Skn-1a* が必須であることを明らかにした。先行研究から、*Skn-1a* は *Trpm5* 陽性細胞である甘味・苦味・旨味細胞や呼吸上皮の孤立化学感覚細胞の産生に重要であることが示されてきたが、これらの細胞種とは異なり嗅上皮 *Trpm5* 陽性微絨毛細胞は味覚情報伝達分子を発現していなかった。このことから嗅上皮の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞はこれまで知られている *Trpm5* 陽性細胞とは異なる新しいタイプの細胞であると考えられる。

嗅上皮には *Trpm5* 陽性微絨毛細胞のほかに *IP3R3* 陽性微絨毛細胞が存在する。*Skn-1a* は *IP3R3* 陽性微絨毛細胞には発現しないこと、*Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいて *IP3R3* 陽性微絨毛細胞が消失しないことから、*Skn-1a* は *IP3R3* 陽性微絨毛細胞の分化にはほとんど影響しないことがわかった。また、ごく一部の *Mash1* 発現嗅神経細胞前駆細胞に *Skn-1a* が発現していたが、*Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいて嗅神経細胞系譜に異常は認められなかった。このことから、*Skn-1a* は嗅神経細胞系譜への寄与はほとんどないと考えられる。つまり、*Skn-1a* は嗅上皮 *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生に重要であり、嗅神経細胞や *IP3R3* 陽性微絨毛細胞の分化には影響をほとんど持たないと言える。

#### 2-4-1) 微絨毛細胞産生における *Skn-1a* の機能

味蕾の甘味・苦味・旨味細胞と酸味細胞は共通の前駆細胞から分化する。その分化過程において *Skn-1a* は、*Trpm5* 陽性細胞である甘味・苦味・旨味細胞への分化を決定する重要な機能を有する(Matsumoto *et al.*, 2011)。*Skn-1a* 機能欠損型マウスの味蕾では、前駆細胞は *Trpm5* 陽性甘味・苦味・旨味細胞に分化することができず、その代わりに酸味細胞が産生され、その結果酸味細胞の数は増加する。*Trpm5* 陽性微絨毛細胞と *IP3R3* 陽性微絨毛細胞の形態学的特徴の類似性から、嗅上皮においても *Skn-1a* が2つの異なる微絨毛細胞 (*Trpm5* 陽性微絨毛細胞と *IP3R3* 陽性微絨毛細胞) の運命決定に関与している可能性が考えられた。つまり、二種類の微絨毛細胞は共通の前駆細胞から分化し、*Trpm5* 陽性微絨毛細胞への運命決定因子として *Skn-1a* が必要である可能性である。この仮説が正しい場合、*Skn-1a* 機能欠損型マウスで消失した *Trpm5* 陽性微絨毛細胞は *IP3R3* 陽性微絨毛細胞へと分化し、*ChAT-GFP* マウスと *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮表層側の細胞核密度は変わらないと考えられる。今回の実験結果から、*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮表層側において、微絨毛細胞由来の細胞核が認められたが、細胞核は減少していた。また、*ChAT-eGFP* マウスの *IP3R3* 陽性微絨毛細胞由来と考えられる細胞核の密度と *Skn-1a* 機能欠損型マウスの微絨毛細胞の細胞核密度に大きな変化は認められなかった。以上の結果から、*Skn-1a* が2つの異なる微絨毛細胞への運命選択に関与しないといえる。このことは、野生型マウスと *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおける免疫組織化学では、*IP3R3* のシグナルに大きな変化が認められなかったことから支持される。嗅上皮表層側においては *Trpm5* 陽性微絨毛細胞数が消失していることがわかったが、*Skn-1a* の機能欠損によって *Trpm5* 陽性微絨毛細胞が正常に分化できずに嗅上皮の中間層に留まっている可能性が考えられる。今後は *Trpm5* 陽性微絨毛細胞が分化初期の段階で発現する遺伝子を明らかにし、*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮において発現解析をおこなうことで、この可能性を検証したいと考えている。

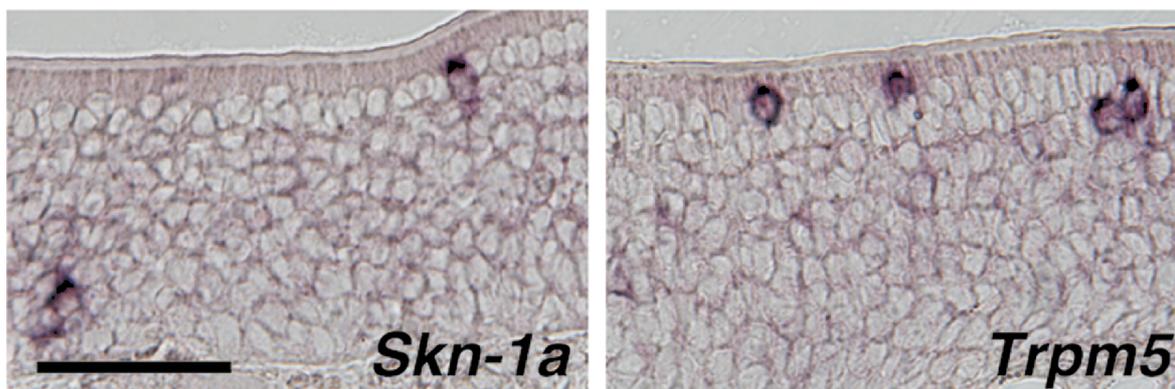
#### 2-4-2) Trpm5 陽性微絨毛細胞の生体機能

嗅上皮の Trpm5 陽性微絨毛細胞は Trpm5、ChAT を発現することや、villin 陽性の微絨毛を有するという形態学的類似性から、孤立化学感覚細胞や brush cells と Trpm5 陽性微絨毛細胞は同種の細胞であるのではないかと考えられた。しかしながら、味覚情報伝達分子は、Trpm5 陽性微絨毛細胞では発現していなかった。さらに先行研究から、孤立化学感覚細胞や Brush cells とは異なり、Trpm5 陽性微絨毛細胞は嗅上皮の三叉神経とは神経接続していないことが報告されている(Hansen and Finger, 2008; Weihong Lin *et al.*, 2008)。このように、Trpm5 陽性微絨毛細胞は孤立化学感覚細胞や brush cells とは別の機能を持っていることが示唆される。

嗅上皮から単離した Trpm5 陽性微絨毛細胞は高濃度の匂い物質や微生物溶解液に応答することが報告されているため(Ogura *et al.*, 2011)、嗅上皮に侵入してきた刺激物や生体異物を検出して防御応答を誘導することが示唆される。実際に、高濃度匂い物質の混合物の存在下で二週間飼育し、さらに1日に10分間、真菌の細胞骨格の主成分であるキチンの粉末を暴露した Skn-1a 機能欠損型マウスでは、野生型マウスと比較して匂い応答が低下し、それに伴い餌の探索行動などに支障が出ることがわかっている(Lemons *et al.*, 2017)。この結果は、Trpm5 陽性微絨毛細胞が、高濃度の匂い物質のような過剰な化学刺激や有害な化学物質から嗅上皮を保護する機能があることを示唆している。今後は Trpm5 陽性微絨毛細胞に発現する受容体やそのリガンドを明らかにすることで、嗅覚系における詳細な機能が解明されることが期待される。

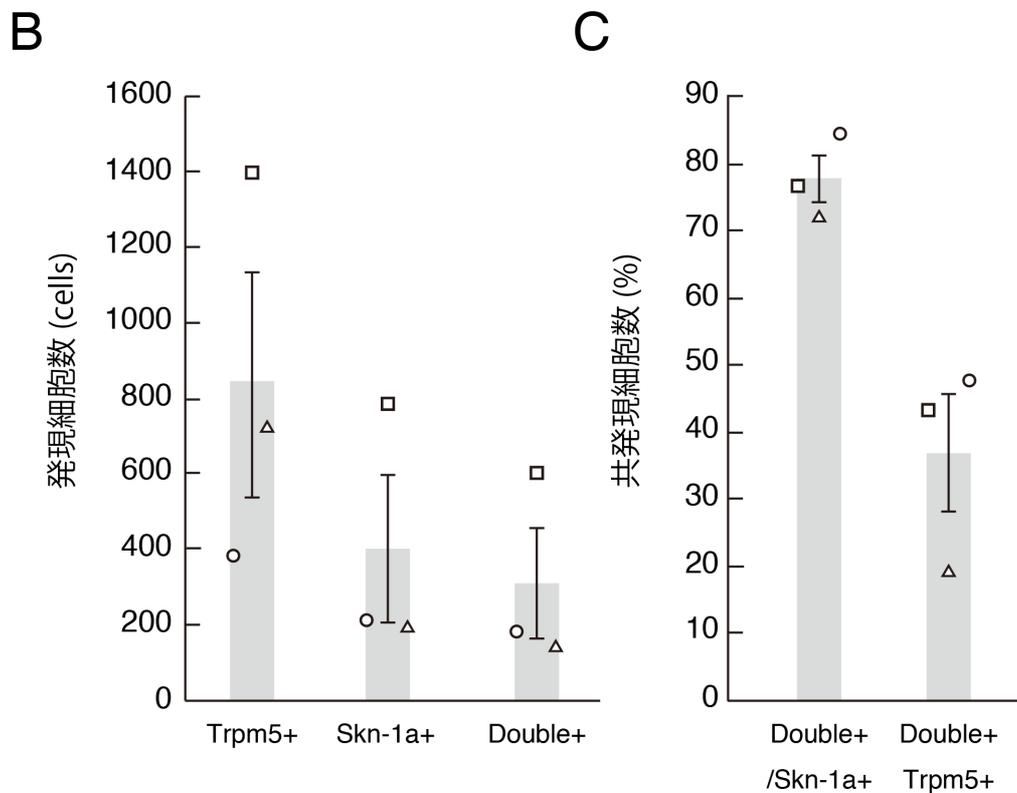
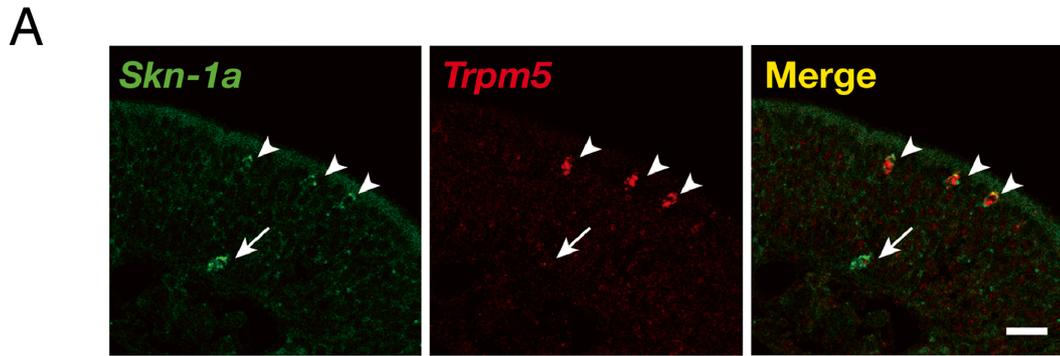
#### 2-4-3) 生体における Skn-1a の示唆される機能

先行研究及び本研究結果から、嗅上皮や味蕾、呼吸上皮における Trpm5 陽性細胞産生を Skn-1a が共通して制御していることが明らかになった。Trpm5 陽性細胞は、消化器官や気管、胸腺、尿道、耳管、膝管、結膜など体の様々な器官にも存在することが明らかになってきており、他の器官においても Skn-1a が Trpm5 陽性微絨毛細胞の産生に必須な機能を持つことが予想される。次章では、この仮説を検証するために、Skn-1a 機能欠損型マウスの様々な器官における Trpm5 陽性細胞マーカー遺伝子の発現解析をおこなった。



**Fig.2-1 嗅上皮における *Skn-1a* と *Trpm5* の発現**

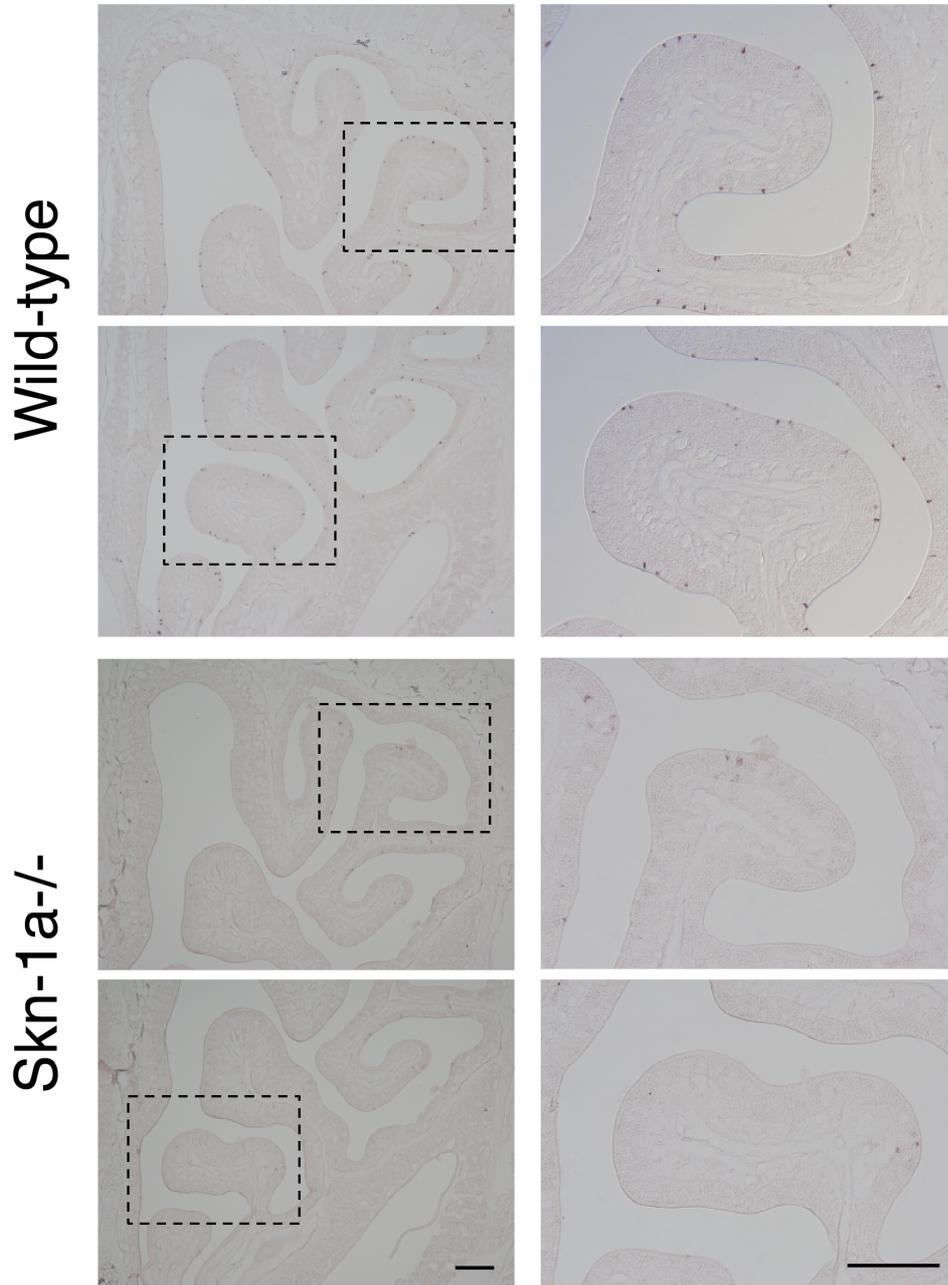
野生型マウス嗅上皮における *Skn-1a*, *Trpm5* の発現を ISH により解析した。*Skn-1a* 及び *Trpm5* の発現は主に嗅上皮表層側において認められた。*Skn-1a* の発現は嗅上皮の基底側においても認められた。スケールバー:50  $\mu\text{m}$



**Fig.2-2 嗅上皮表層側における *Skn-1a* と *Trpm5* の共発現**

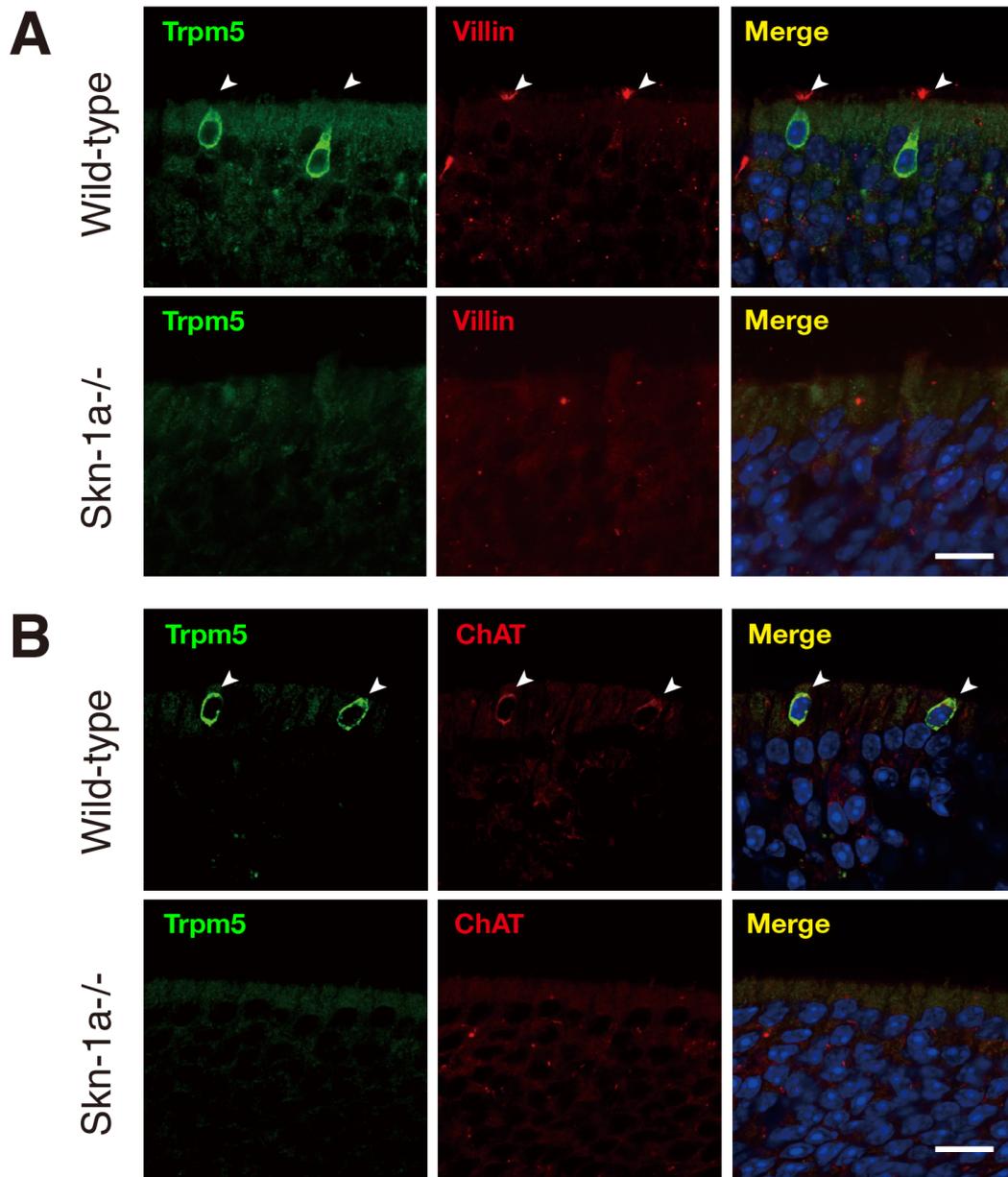
(A)野生型生後 30 日のマウス嗅上皮における *Trpm5* と *Skn-1a* の共発現を、二色 ISH を用いて解析した。*Skn-1a* と *Trpm5* を共発現する細胞が嗅上皮表層側に認められた(矢尻)。基底側 *Skn-1a* 発現細胞は *Trpm5* を発現していなかった(矢印)。スケールバー:25  $\mu$ m (B)生後 30 日の野生型マウス嗅上皮における *Trpm5* と *Skn-1a* 発現細胞数及び共発現細胞数を定量した。嗅上皮において *Trpm5* 発現細胞は  $843 \pm 298$  cells、*Skn-1a* 発現細胞は  $400 \pm 194$  cells、共発現細胞は  $309 \pm 147$  cells 認められた。(C) 生後 30 日の野生型マウス嗅上皮における *Trpm5* と *Skn-1a* の共発現率を示す。*Trpm5* 発現細胞のうち  $36.9 \pm 8.7\%$  は *Skn-1a* を、*Skn-1a* 発現細胞のうち  $77.7 \pm 6.0\%$  は *Trpm5* を共発現していた。

## *Trpm5*



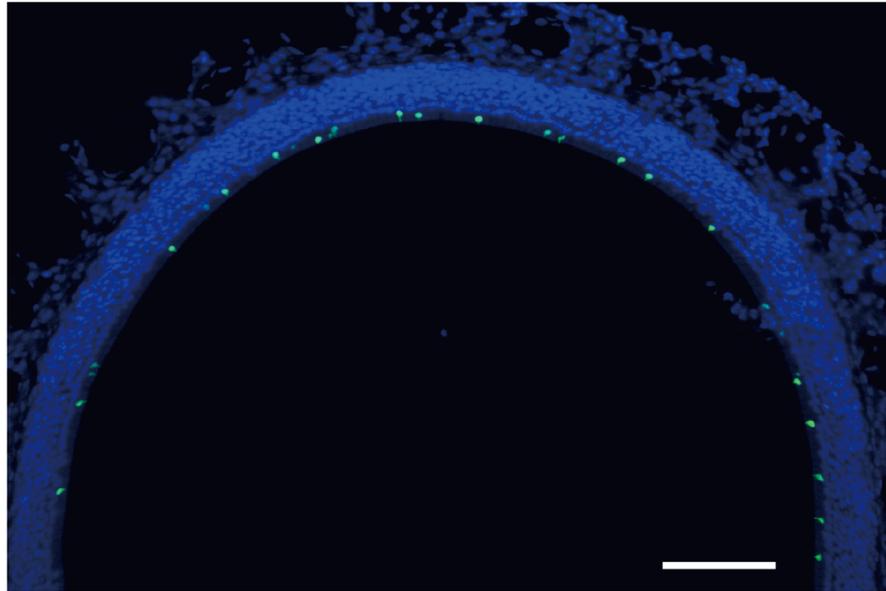
**Fig.2-3 *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮における *Trpm5* の発現**

生後 30 日の野生型マウス及び *Skn-1a* 機能欠損型マウスの嗅上皮において、*Trpm5* の発現を ISH によって解析した。野生型マウスでは嗅上皮全体において *Trpm5* の発現が認められたのに対して、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは *Trpm5* の発現が認められなかった。スケールバー：200  $\mu$ m



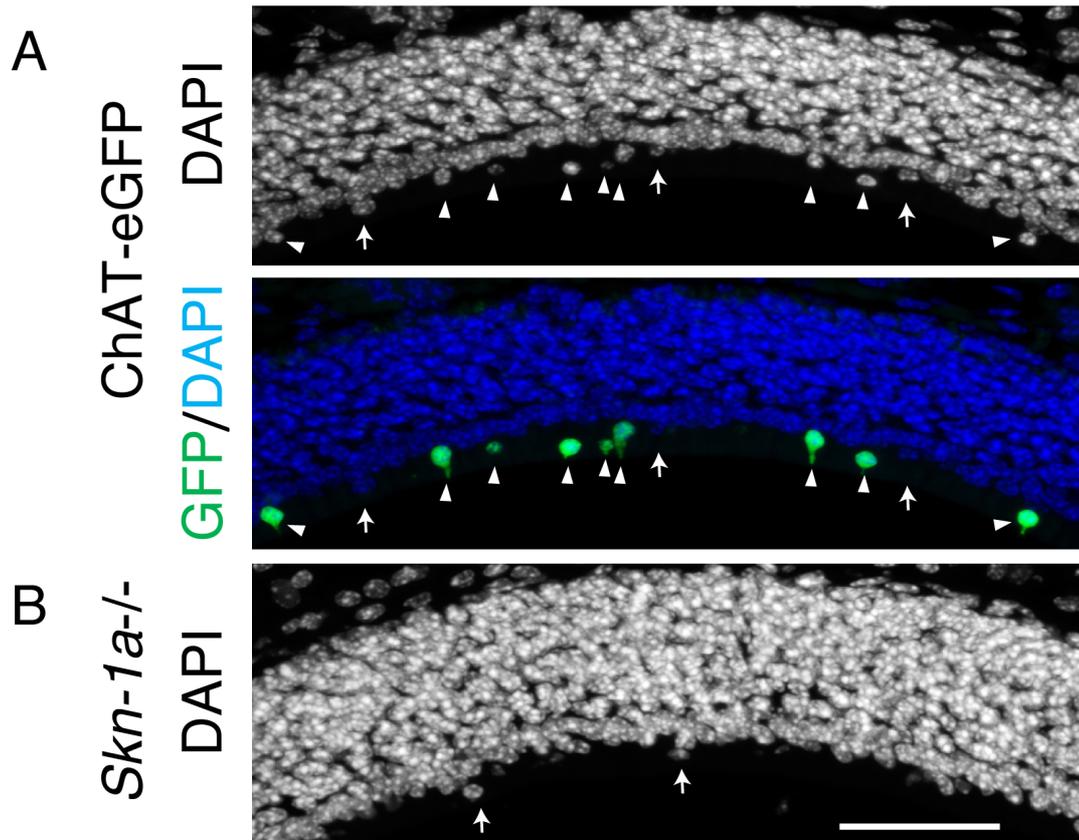
**Fig.2-4 Skn-1a 欠損型マウス嗅上皮における微絨毛細胞マーカーの局在**  
 生後2ヶ月の野生型とSkn-1a欠損型マウス嗅上皮において、微絨毛細胞マーカーである villin と Trpm5, ChAT の局在を、免疫組織化学を用いて解析した。(A)野生型マウス嗅上皮では微絨毛に villin、細胞体に Trpm5 のシグナルを持つ細胞が観察された(矢尻)。一方で Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮では villin, Trpm5 のシグナルは認められなかった。(B)野生型マウス嗅上皮では細胞体に Trpm5, ChAT のシグナルを持つ細胞が観察された(矢尻)。一方で Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮では ChAT, Trpm5 のシグナルは認められなかった。スケールバー: 10  $\mu$ m

ChAT-eGFP

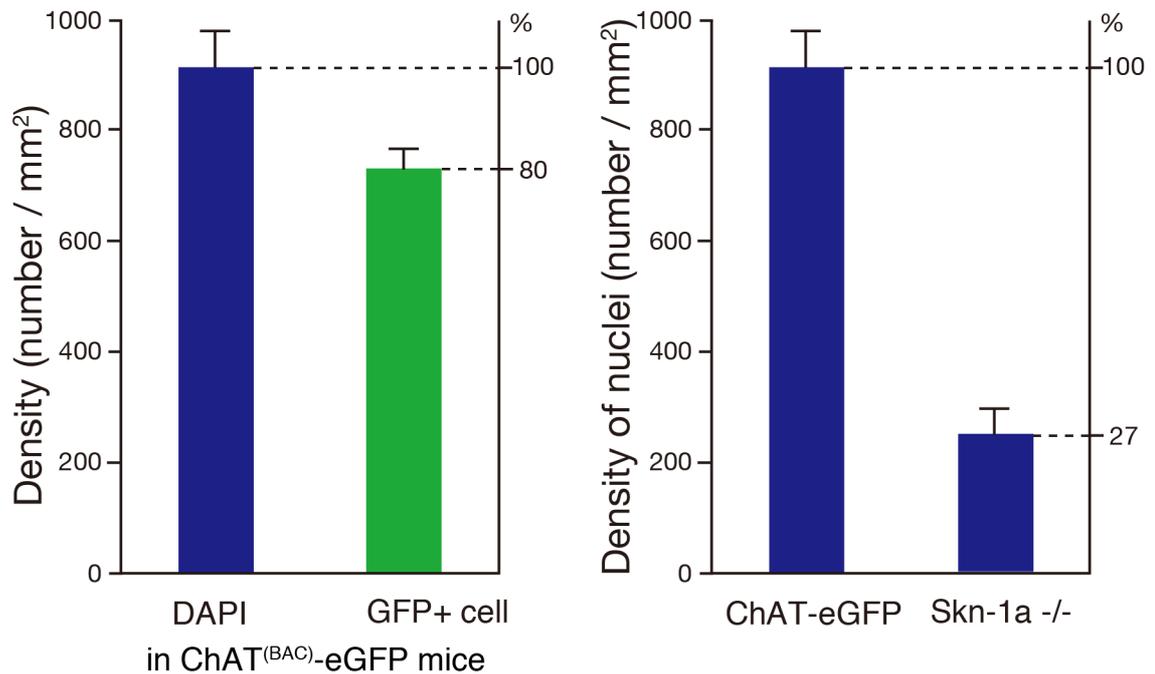


**Fig.2-5 ChAT-eGFP マウス嗅上皮における GFP の局在**

Trpm5 陽性微絨毛細胞において *GFP* を発現する ChAT-eGFP マウスの嗅上皮での、*GFP* の局在を解析した。*GFP* のシグナルは嗅上皮の最も表層側に認められることが確認できた。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$

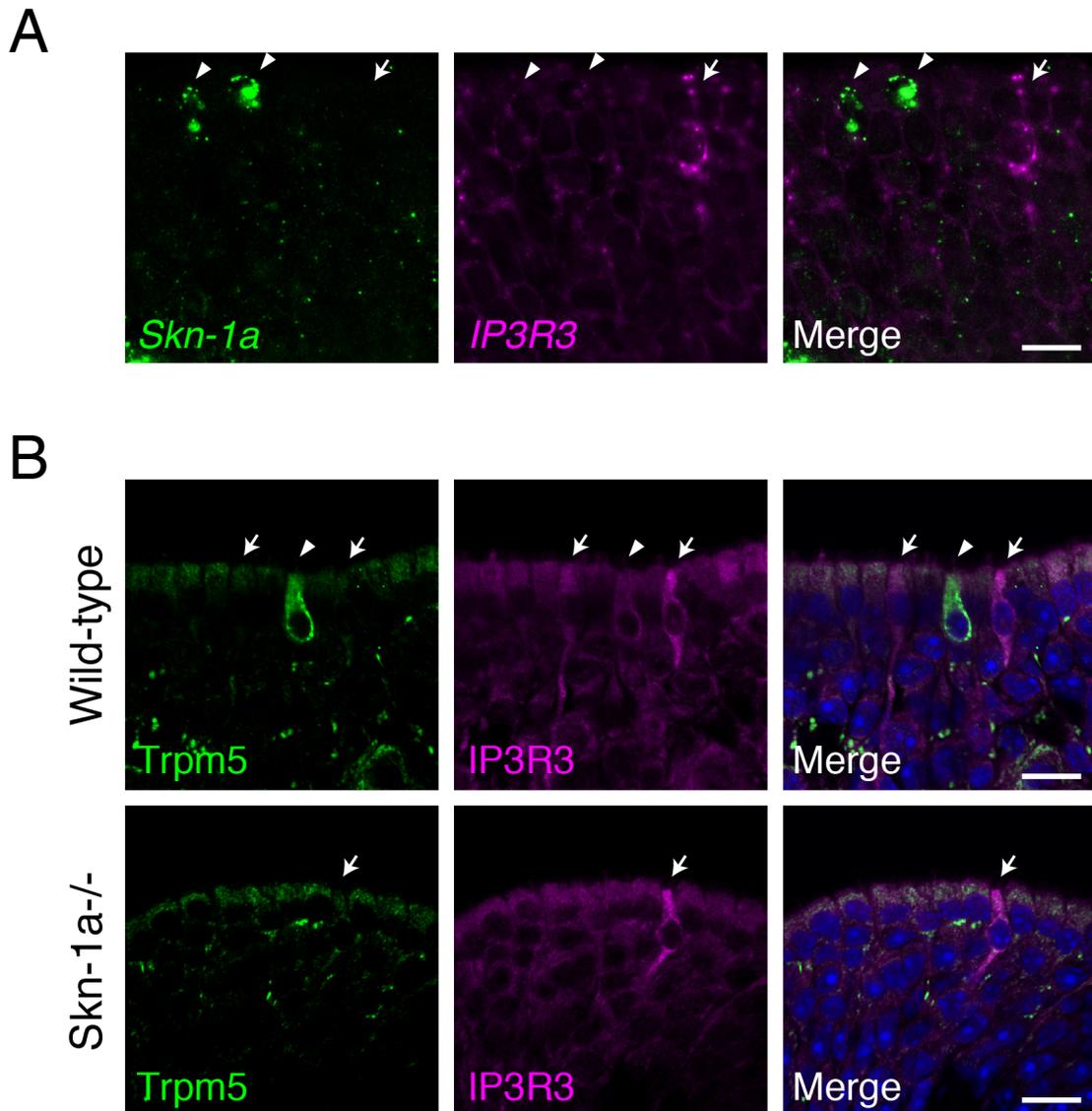


**Fig.2-6 Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮表層側における DAPI 陽性細胞核の局在**  
 ChAT-eGFP 及び Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮において、DAPI 陽性細胞核と GFP の局在を解析した。黄色及び白色の点線は嗅上皮表層側の境界を示す。(A)GFP のシグナルは嗅上皮の表層側の Trpm5 陽性微絨毛細胞に認められ、GFP 陽性細胞の細胞核は嗅上皮の最も表層側に位置していた(矢尻)。一方で、表層側の DAPI 陽性細胞核の中には GFP 陰性のものも存在した(矢印)。(B)嗅上皮表層側に局在する DAPI 陽性細胞核が認められたが(矢印)、コントロールである ChAT-eGFP と比較して少なかった。スケールバー: 20  $\mu$ m



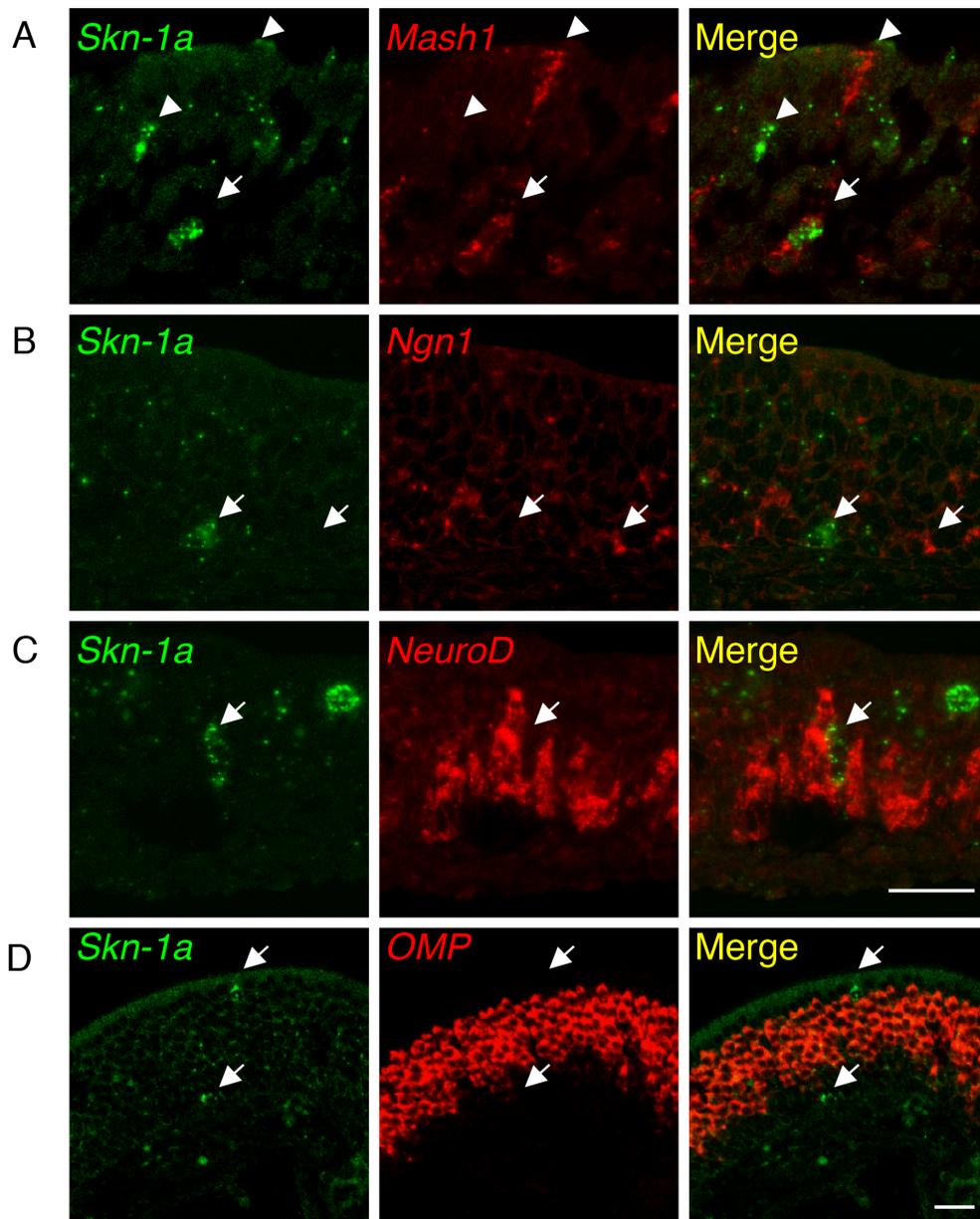
**Fig.2-7 Skn-1a 機能欠損による嗅上皮表層側 DAPI 陽性細胞核数への影響**

(A)ChAT-eGFP マウス嗅上皮表層側において、DAPI 陽性細胞核数と GFP 陽性細胞数を定量した。ChAT-eGFP マウスの嗅上皮背側内側領域の表層側における DAPI 陽性細胞核の密度は  $915 \pm 67.6$  nuclei/mm<sup>2</sup>、GFP 陽性細胞密度は  $733 \pm 38.2$  cells/mm<sup>2</sup>であった。(B)Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮表層側において、DAPI 陽性細胞核数を定量した。Skn-1a 機能欠損型マウスの嗅上皮背側内側領域の表層側における DAPI 陽性細胞核の密度は  $244 \pm 46.5$  nuclei/mm<sup>2</sup>であった。コントロール(ChAT-eGFP)と比較して、表層側の DAPI 陽性細胞核の密度は約 73%減少していた。



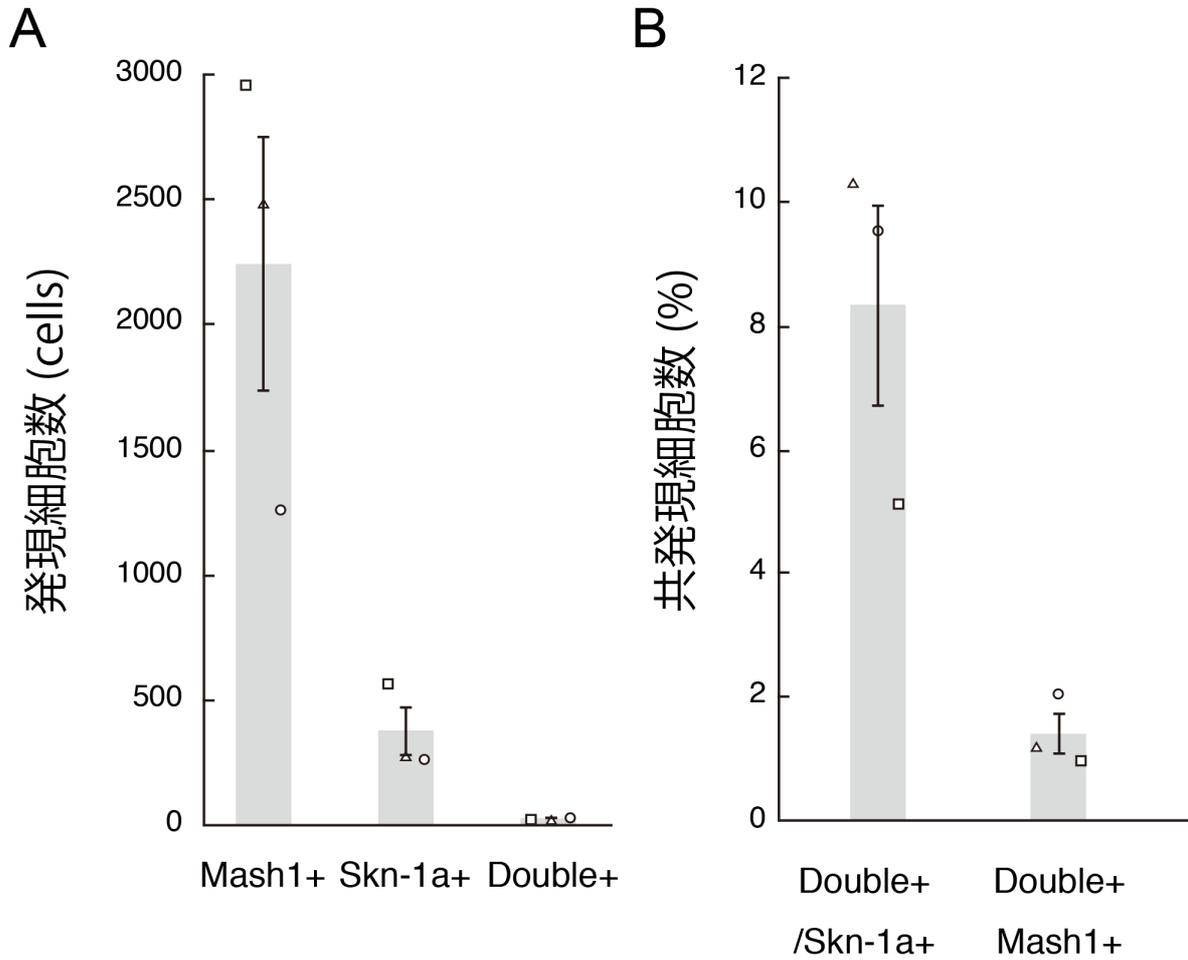
**Fig.2-8** 嗅上皮における *IP3R3* と *Skn-1a* の共発現及び *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮における *Trpm5* と *IP3R3* の局在

(A)野生型生後 30 日のマウス嗅上皮における *IP3R3* と *Skn-1a* の共発現を、二色 ISH を用いて解析した。*IP3R3* 発現細胞(矢印)、*Skn-1a* 発現細胞(矢尻)が嗅上皮表層側に認められた。しかしながら、*IP3R3* と *Skn-1a* を共発現する細胞は認められなかった。スケールバー: 10  $\mu$ m  
 (B)生後 30 日の野生型マウス及び *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮における *Trpm5*, *IP3R3* の局在を免疫組織化学により解析した。野生型マウスでは *Trpm5*(矢尻)及び *IP3R3*(矢印)のシグナルが表層側に認められた。*Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮においては *Trpm5* のシグナルが認められなかったが、*IP3R3* のシグナルは認められた(矢印)。*IP3R3* の局在は野生型マウスと比較して大きな差は認められなかった。スケールバー: 10  $\mu$ m



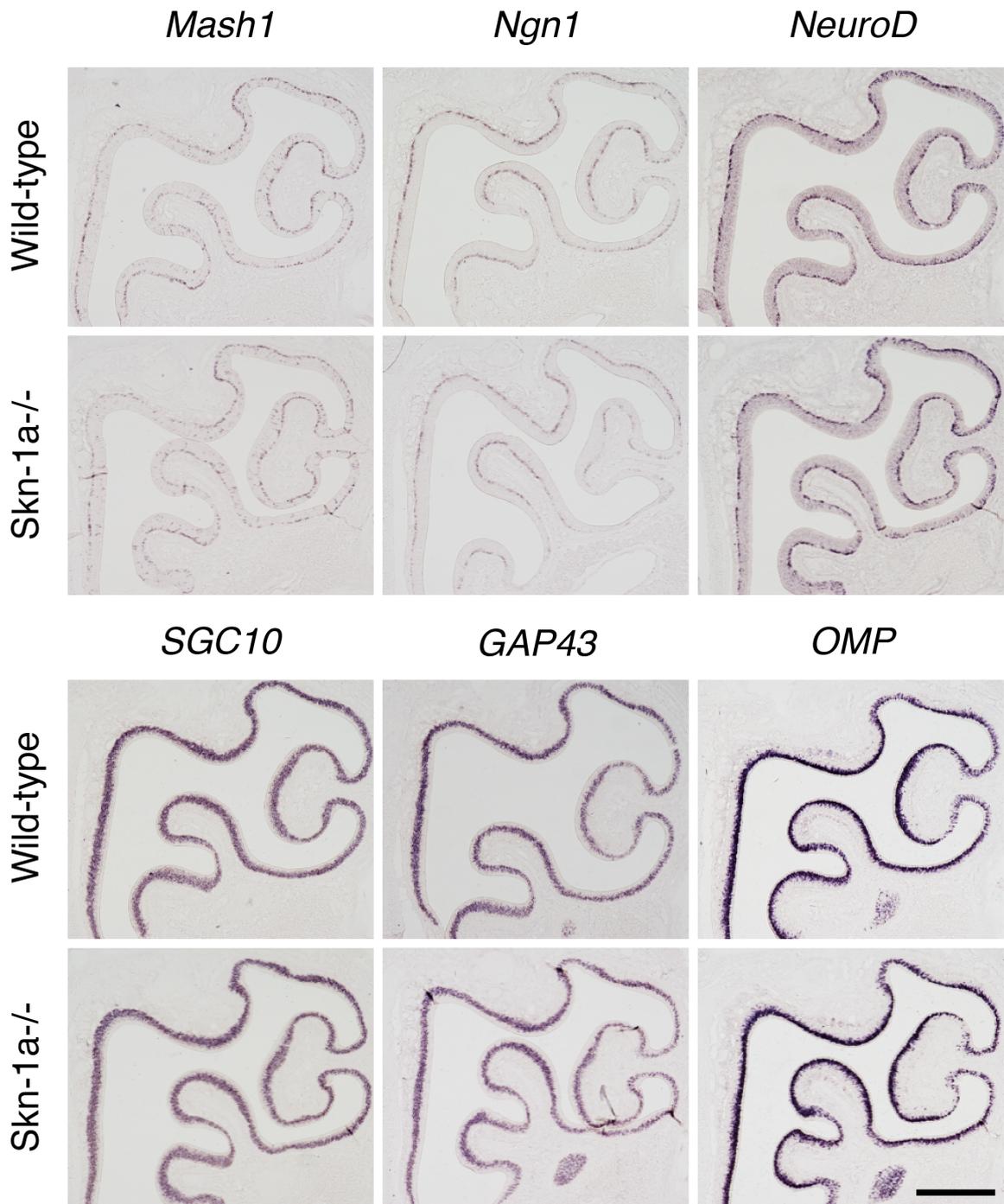
**Fig.2-9 嗅上皮における嗅神経細胞分化マーカーと *Skn-1a* の共発現**

(A,B,C)野生型生後0日のマウス嗅上皮において、神経前駆細胞マーカーである *Mash1*, *Ngn1*, *NeuroD* と *Skn-1a* の共発現を、二色 ISH を用いて解析した。(A) *Mash1* 発現細胞の一部で、*Skn-1a* の共発現が認められた(矢印)。*Skn-1a*, *Mash1* のみを発現する細胞も認められた(矢尻)。(B) *Skn-1a*, *Ngn1* 発現細胞は認められたが(矢印)、*Skn-1a* と *Ngn1* の共発現は認められなかった。(C) *Skn-1a*, *NeuroD* 発現細胞は認められたが(矢印)、*Skn-1a* と *NeuroD* の共発現は認められなかった。(D)野生型生後30日のマウス嗅上皮において、成熟嗅神経細胞マーカーである *OMP* と *Skn-1a* の共発現を、二色 ISH を用いて解析した。嗅上皮の中間層全体に *OMP* 由来の強いシグナルが認められた。一方で、*Skn-1a* のシグナルは表層側及び基底層側に認められた(矢印)。*OMP* と *Skn-1a* を共発現する細胞は認められなかった。スケールバー: 25  $\mu$ m



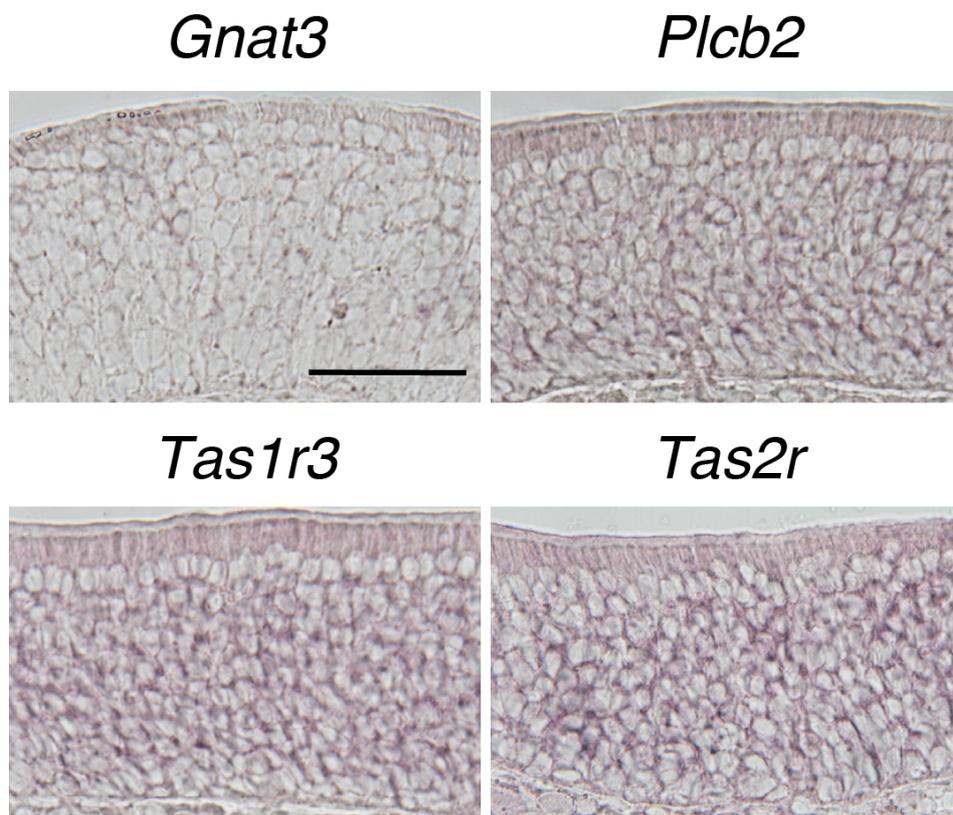
**Fig.2-10** 嗅上皮における *Mash1* と *Skn-1a* の発現細胞数及び共発現率

(A)生後 30 日の野生型マウス嗅上皮における *Mash1* と *Skn-1a* 発現細胞数及び共発現細胞数を定量した。嗅上皮において *Mash1* 発現細胞は  $2241 \pm 504.9$  個、*Skn-1a* 発現細胞は  $376 \pm 95.1$  個、共発現細胞は  $28 \pm 1.2$  個認められた。(B) 生後 30 日の野生型マウス嗅上皮における *Mash1* と *Skn-1a* の共発現率を示す。*Skn-1a* 発現細胞のうち  $8.3 \pm 1.6\%$  は *Mash1* を、*Mash1* 発現細胞のうち  $1.4 \pm 0.3\%$  は *Skn-1a* を共発現していた。



**Fig.2-11 Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮における嗅神経細胞分化マーカーの発現**

生後 7 日の野生型と Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮における嗅神経細胞分化マーカー *Mash1*、*Ngn1*、*NeuroD*、*SGC10*、*GAP43*、*OMP* の発現を ISH により解析した。野生型と Skn-1a 機能欠損型マウス嗅上皮において、嗅神経細胞分化マーカーの発現に異常はほぼ認められなかった。スケールバー：500  $\mu$ m



**Fig.2-12 嗅上皮における味覚情報伝達因子の発現**

生後30日の野生型マウス嗅上皮における *Plcb2*, *Gnat3*, *Tas1r3*, *Tas2r* (*Tas2r105+T2r108*) の発現をISHにより解析した。*Plcb2*, *Gnat3*, *Tas1r3*, *Tas2r* (*Tas2r105+T2r108*) の発現は嗅上皮において認められなかった。スケールバー: 50  $\mu$ m

## 第3章

### Trpm5 陽性化学感覚細胞の 産生における Skn-1a の機能解析

### 3-1. 序論

Trpm5 陽性化学感覚細胞が、味蕾・呼吸上皮・嗅上皮だけでなく気管・胸腺・尿道・耳管・腭管・消化器官などにも存在することが、近年明らかになっている。気管上皮の Trpm5 陽性化学感覚細胞は brush cells と呼ばれ、孤立化学感覚細胞と同様に味覚受容体 (Tas1r3 や Tas2rs) と味覚情報シグナル伝達因子 (Gnat3 や Plcb2、Trpm5) を発現する。ほとんどの孤立化学感覚細胞は三叉神経に神経接続しているが、気管では神経接続する brush cells の数は多くなく、細胞頂点の微絨毛の構造も孤立化学感覚細胞とは異なる (Tizzano *et al.*, 2010; Krasteva *et al.*, 2011; Tizzano and Finger, 2013)。尿道上皮にも Trpm5 陽性の brush cells が存在する。尿道の brush cells は、気管の brush cells に似た形態学的特徴を有し、味覚情報シグナル伝達因子を発現する。また気管の brush cells で発現する *Tas1r3* に加え、*Tas1r1* を発現する (Deckmann *et al.*, 2014)。胸腺の Trpm5 陽性化学感覚細胞は thymic CCC (cholinergic chemosensory-like cells) と呼ばれ、味覚受容体や味覚情報シグナル伝達因子を発現する (Panneck *et al.*, 2014)。消化器官上皮の tuft cells も同様に Trpm5 を発現し、細胞頂点に villin 陽性の微絨毛を有するが、どのタイプの味覚受容体が発現しているのかは明らかになっていない。このように、Trpm5 陽性細胞は局在する器官によって発現遺伝子や組織学的特徴に多少の差異を有しているが、共通して Trpm5、ChAT を発現し、villin 陽性の微絨毛を持つという類似した細胞形態を持つ。

先行研究と第2章までにおいて、味蕾の甘味・苦味・旨味細胞、呼吸上皮の孤立化学感覚細胞、そして嗅上皮の Trpm5 陽性微絨毛細胞の産生に Skn-1a が重要であることが明らかになった。このことから、Skn-1a が他の器官の Trpm5 陽性化学感覚細胞の産生にも必須な機能を有する可能性が考えられた。本章では、この仮説を検証するために、気管や消化器官、胸腺、尿道、耳管、腭管における Skn-1a の発現解析及び Skn-1a 機能欠損型マウス器官における Trpm5 陽性細胞マーカー遺伝子の発現解析をおこなった。

### 3-2. 実験方法

#### 3-2-1) マウス

使用したマウス (野生型マウス及びSkn-1a機能欠損型マウス) やその飼育方法は第2章に記載した通りである。

#### 3-2-2) 凍結試料の作製

ISH 用の試料は、二酸化炭素によって安楽死処理したマウスから組織を摘出し、速やかに Frozen Section Compound (Leica) に包埋して、液体窒素でカップの底から凍結し

た。免疫組織化学または二色 ISH に使用する試料は、マウスをイソフルランによって麻酔し、灌流固定後に摘出した。免疫組織化学に用いる試料は 15 分間、二色 ISH に用いる試料は一晩、4% PFA/PBS を用いて固定した。PFA による固定後、耳管は 450 mM EDTA/PBS (pH 8.0)を用いて 3 日間以上 4°Cで脱灰処理をし、30% スクロース/PBS に一晩以上浸した。耳管以外の組織は脱灰処理をせずに、30% スクロース/PBS に一晩以上浸した。Frozen Section Compound をプラスチック包埋皿(サクラファインテックジャパン、4565) もしくはアルミホイルの包埋カップに注入し、試料を Frozen Section Compound に沈め、液体窒素でカップの底から凍結した。

### 3-2-3) 組織切片の作製

凍結試料をクライオスタット (Leica、CM3050S III) を用いて、厚さ 8-12  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成した。切片は MAS コートスライドガラス (松波硝子工業) に貼り付け、-80°Cで保存もしくは免疫組織化学や ISH に使用した。

### 3-2-4) *in situ* hybridization

本章では、PFA 固定をおこなわずに新鮮凍結試料を用いた ISH をおこなった。実験方法を以下に示す。ハイブリダイゼーションまでの実験操作は、RNase-free の条件下でおこなった。まず、凍結切片を貼り付けたスライドガラスを 4% PFA/PBS で 10 分間固定した。PFA 固定後に、0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate) /PBS に 15 分間攪拌しながら浸漬した。新しく調整した 0.1% DEPC/PBS を用いて、同様の操作をおこなった後、5xSSC 中で 15 分間以上洗浄した。洗浄後に、プレハイブリダイゼーションバッファー (50% deionized formamide、5xSSC、40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ssDNA) を用いてプレハイブリダイゼーションを 58°Cで 1~2 時間おこなった。プレハイブリダイゼーション後に、ハイブリダイゼーションバッファー (50% deionized formamide、5xSSC、1x Denhardt's solution、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$  yeast tRNA、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ssDNA、0.25 M DTT) に DIG ラベルされた RNA プローブを 200 倍希釈で添加した溶液をスライドに滴下し、乾燥防止のために DURA SEAL (BMBio、L-2012) をスライドガラスにかぶせた。これらのスライドは 50% ホルムアミドで保湿されたチャンバー内で 58°C、40 時間のハイブリダイゼーション反応をおこなった。反応後、58°Cの 5xSSC 溶液中でパラフィルムを除去し、5xSSC 溶液で 5 分間、0.2xSSC 溶液で 30 分間、さらに 0.2xSSC で 30 分間、58°Cで洗浄した。SSC による洗浄から発色反応までの操作は第 2 章 (2-2-5) に記載した方法と同様にしておこなった。本章で使用した一部の RNA プローブ (*Skn-1a*、*Trpm5*、*Plcb2*、*Gnat3*、*Tas1r3*、*Tas2r105*、*Tas2r108*) については第 2 章で使用したものと同一である。*Tas1r1* と *Tas1r2*、*Dclk1*、*Tas2r131*

の RNA プローブ情報は Table 3-1 にまとめた。

Table 3-1. ISH に使用した RNA プローブ情報

Gene	GeneBank accession No.	size	Reference
<i>Tas1r1</i>	NM_031867.2	2 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Tas1r2</i>	NM_031873.1	1.8 kb	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011
<i>Tas2r131</i>	NM_207030.1	nucleotide 1–933	Miura <i>et al.</i> , 2012
<i>Dclk1</i>	NM_001111053.2	nucleotide 1–2750	Gerbe <i>et al.</i> , 2016

### 3-2-5) 二色 *in situ* hybridization

蛍光標識での二色 ISH の方法は、第 2 章 (2-2-5) に記載した方法と同様にしておこなった。

### 3-2-6) 免疫組織化学

各組織におけるタンパク質の局在を観察するために、蛍光免疫組織化学をおこなった。凍結切片を貼り付けたスライドを PBS に 10 分以上つけ、切片の周囲の Frozen Section Compound を洗い流した後、4% PFA/PBS に常温で 5 分間反応させることにより再固定をおこなった。PBS で洗浄後、0.1% Triton X100/PBS で 3 分間処理した。PBS で洗浄後、Target Retrieval Solution を用いて抗原の賦活化を 80°C、20 分間おこなった。PBST で二回洗浄した後に 5% スキムミルク/PBST でブロッキングを 1 時間、常温でおこなった。5% スキムミルク/PBST に一次抗体を適切な濃度で希釈し、4°C で一晩以上抗体反応を行った。PBST で十分に洗浄したあとに、5% スキムミルク/PBST に Alexa 結合 2 次抗体を 500 倍希釈で添加し、2 次抗体反応を常温で 1 時間おこなった。最後に、2 µg/ml DAPI/PBST を 3 分間反応させ、細胞核を染色した。Fluoromount (Diagnostic Biosystems, K 024) を用いて封入し、共焦点顕微鏡 (Leica, TCS-SPE) を用いて観察した。

気管や尿道、胸腺における *Trpm5* と *Villin* のシグナル数を定量するために、3,3'-diaminobenzidine (DAB) 発色による免疫組織化学をおこなった。一次抗体反応までの操作は蛍光標識による免疫組織化学と同様である。一次抗体反応後に、PBST によって切片を洗浄し、ビオチン結合二次抗体を PBST 中で一時間、常温で反応させた。発色には Vectastain ABC elite kit (Vector Laboratories, PK-6100) を用いた。キットに付属している溶液 A (アビジン溶液) と溶液 B (ビオチン結合 HRP 溶液) を PBS に 100 倍希釈で溶かし、常温で 30 分間静置することで、アビジン-ビオチンの複合体を形成させた。2 次抗体反応後、スライド上にアビジン-ビオチン溶液をかけ、常温で 30 分間静置した。DAB

と過酸化水素水をそれぞれ 0.05%、0.01%の濃度になるように PBST に希釈した基質溶液を調整し、常温で 5 分間反応させることでシグナルを検出した。スライドを風乾後に、10% グリセロール水溶液で封入し、光学顕微鏡 (Olympus、BX51) 下で細胞数を定量した。

本章で用いた抗体及び希釈率は次の通りである。抗 POU2F3 ウサギ抗体 (1:500、sc-7672、Santa Cruz Biotechnology)、抗 Trpm5 ウサギ抗体 (1:5000、ACC-045、Alomone Labs)、抗 villin ヤギ抗体 (1:500、sc-7672、Santa Cruz Biotechnology)、抗 ChAT ヤギ抗体 (1:200、AB144P、Chemicon)、Alexa488 結合抗ウサギ IgG ロバ抗体 (1:500、A21206、Invitrogen)、Alexa546 結合抗ヤギ抗体 (1:500、A11056、Invitrogen)、ビオチン結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:500、BA-1000、Vector Laboratories)、ビオチン結合抗ヤギ IgG ロバ抗体 (1:500、605-706-125、Rockland)。

### 3-2-7) RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

野生型もしくは Skn-1a 機能欠損型マウス (約 7~10 週齢) を二酸化炭素によって安楽死処理をおこなった。気管、胸腺、尿道、耳管、膝管、胃、小腸、大腸を摘出後、すぐに液体窒素で冷凍した。total RNA の抽出は RNeasy mini kit (QIAGEN、74104) または RNeasy micro kit (QIAGEN、74004) を用いておこなった。キットに付属されている試薬中で、凍結試料をホモジナイザー (KINEMATICA、POLYTRON1200E) を用いて破碎し、カラム抽出をおこなった。また、カラム中で DNase 処理をキットのプロトコルに従っておこなった。抽出した total RNA の品質を電気泳動で確認した後に、分光光度計で収量測定をおこなった。cDNA 合成には、逆転写酵素として ThermoScript Reverse Transcriptase (Invitrogen、12236)、プライマーとして Oligo(dT)<sub>20</sub> (Invitrogen、18418020) を用いた。10 µL の反応系に 1 µg の total RNA を加えて、50°C で 2 時間の逆転写反応をおこない、85°C で 5 分間加熱処理をすることで反応を停止した。また、逆転写酵素を加えずに処理をおこなったものをネガティブコントロールとした。合成した cDNA は蒸留水で 5 倍希釈し、-20°C で保存した。PCR は Taq DNA polymerase (TaKaRa、R001A) を用いて増幅をおこなった。使用したプライマーは Table 3-2 に示す。PCR の条件は、98°C で 1 分間処理した後に、98°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間の反応を 25~40 サイクルおこない、最後に 72°C で 5 分間処理した。1~3%アガロースゲルを用いた電気泳動により、各プライマーによって目的の領域が増幅されているかどうかを確認した。また、DNA サイズの確認のために、1 kb DNA ladder (Promega、G5711) または、100 bp DNA パーソナルマーカ (Eurofins、CB09) を用いた。

Table 3-2. RT-PCR に使用したプライマー

Gene	GeneBank accession No.	primer sequence (5' to 3')		product size	reference
<i>Tas1r3</i>	NM_031872.2	Forward	catcccggtgcaacaggttc	333	
	nucleotide 196-528	Reverse	ctggcactatagctgacctg		
<i>Tas2r105</i>	NM_020501.1	Forward	gactggcttccttctcatcg	284	Krasteva et al., 2011
	nucleotide 129-412	Reverse	gcaaacaccccaagagaaaa		
<i>Tas2r108</i>	NM_020502.1	Forward	tgatgcaaacagtctctgg	158	Krasteva et al., 2011
	nucleotide 269-426	Reverse	ggtgagggctgaaatcagaa		
<i>Tas2r131</i>	NM_207030.1	Forward	gcagtattataactggaatgctgg	177	Aichurek et al., 2015
	nucleotide 22-198	Reverse	aggcgctagtctgtatggt		
<i>Gnat3</i>	NM_001081143	Forward	gtttgagcaaatcaactgccc	773	Simone et al., 2013
	nucleotide 71-843	Reverse	tcatgcatctgttcacctcc		
<i>Plcb2</i>	NM_177568.2	Forward	aaagaagtgcagagccacag	716	Simone et al., 2013
	nucleotide 2755-3470	Reverse	ttctcctggaactgctttcc		
<i>Trpm5</i>	NM_020277	Forward	tctgttcattgtgggagtcac	483	Crowder et al., 2007
	nucleotide 2444-2926	Reverse	tggcgatcagaagggtcatg		
<i>GAPDH</i>	NM_008084	Forward	accacagtcctatgccatcac	467	Crowder et al., 2007
	nucleotide 520-986	Reverse	atgtaggccatgagggtccac		

### 3-2-8) 定量解析

DAB 発色による免疫組織化学により villin、Trpm5 陽性細胞数を定量した。気管試料を気管喉頭から気管支まで 10  $\mu\text{m}$  の厚さで横断面方向に切り、20 切片ごとに 1 切片をスライドに貼り付け、計 24 枚の切片を得た。尿道試料は膀胱側から 10  $\mu\text{m}$  の厚さに横断面方向に切り、20 切片ごとに 1 切片をスライドに貼り付け、計 10 枚の切片を得た。小腸、大腸試料は 10  $\mu\text{m}$  の厚さで横断面切片を作成し、一個体毎に計 8 枚の切片を得た。胸腺試料は 10  $\mu\text{m}$  の厚さで切片を作成し、一個体毎に計 8 枚の切片を得た。さらに、NIH Image J を用いて胸腺切片の面積を測定し、算出した面積で細胞数を割ることで細胞密度を算出した。解析には、生後 50 から 64 日齢の野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウスをそれぞれ三個体用いた。定量結果は、標準誤差を含めた平均値で示した。また、*t* 検定によって *p* 値を算出した。

胃、腭管、耳管では、蛍光発色による免疫組織化学によって Trpm5 陽性細胞数を定量した。胃の切片は一個体につき 3 枚の切片における細胞数を数えた（野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウスをそれぞれ 4 個体使用）。耳管の切片は一個体につき 8 枚の切片における細胞数を数えた（野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウスをそれぞれ 4 個体と 3 個体使用）。腭管の切片は一個体につき 4 枚の切片における細胞数を数えた（野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウスをそれぞれ 3 個体と 4 個体使用）。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1) 気管における Skn-1a の発現及び Skn-1a 機能欠損型気管での発現解析

気管の Trpm5 陽性化学感覚細胞である brush cells に Skn-1a が発現するかを調べるために、Skn-1a と brush cells の微絨毛のマーカーである villin に対する抗体を用いた免疫組織化学を行った。ほとんどの Skn-1a 陽性細胞は villin 陽性であったが、一部の villin 陽性細胞は Skn-1a 陰性であった (Fig3-1 A)。先行研究から、気管 brush cells は ChAT の発現の有無によって二つの細胞種に分類できることが報告されており、ChAT 陽性細胞は Trpm5 を発現している (Krasteva *et al.*, 2011)。Skn-1a がどの brush cells に発現しているかを確認するために、Trpm5 と Skn-1a 特異的 RNA プローブを用いた二色 ISH をおこなった。Skn-1a の mRNA 由来のシグナルが気管上皮において認められ、ほとんどの Trpm5 の mRNA 由来のシグナルと共局在が認められた (Fig3-1 B)。以上の結果から、Trpm5 陽性 brush cells に Skn-1a は発現すると考えられる。

Trpm5 陽性 brush cells における Skn-1a の機能を明らかにするため、Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮における Trpm5 陽性 brush cells マーカー遺伝子 (*Tas1r3*, *Tas2r*, *Gnat3*, *Plcb2*, *Trpm5*) の発現解析をおこなった。*Tas1r3*, *Tas2rs* (*Tas2r105* と *Tas2r108*, *Tas2r131*)、*Gnat3*, *Plcb2*, *Trpm5* の発現が野生型マウス気管において観察されたが、Skn-1a 機能欠損型マウスでは認められなかった (Fig3-1 C)。また RT-PCR による発現解析においても、*Tas1r3*, *Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas2r131*, *Gnat3*, *Plcb2*, *Trpm5* の発現は認められなかった (Fig3-1 D)。以上の結果から、Trpm5 陽性 brush cells の産生に Skn-1a が必要であることがわかった。

気管の brush cells は、Trpm5 の発現の有無によって二種類の brush cells に分類でき、Skn-1a は Trpm5 陽性 brush cells に発現している。味蕾において Skn-1a は甘味・苦味・旨味細胞と酸味細胞の運命決定に必要であるように、気管においても二種類の brush cells の運命決定に関与している可能性が考えられる。免疫組織化学の結果から、野生型マウス気管で認められた Trpm5 と ChAT のシグナルが、Skn-1a 機能欠損型マウス気管では認められなかった (Fig3-2 A)。一方、villin のシグナルは Skn-1a 機能欠損型マウス気管においても認められた (Fig3-2 B)。上記の仮説が正しい場合、Skn-1a 機能欠損型マウス気管では Trpm5/ChAT 陽性細胞が産生されない分、Trpm5/ChAT 陰性細胞が増加し、結果として villin 陽性細胞数が野生型マウス気管のそれと比較して変わらないことが予想される。そこで、野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス気管における Trpm5 と villin 陽性細胞数を定量した。定量解析の結果から、野生型マウス気管における Trpm5 及び villin 陽性細胞はそれぞれ  $180 \pm 41$  cells、 $476 \pm 35$  cells (mean  $\pm$  SEM、3 個体) 認められた (Fig3-3)。brush cells のうち Trpm5 陽性 brush cells は約 38% を占め、残りの約 62% は Trpm5 陰性

brush cells であると考えられる。次に Skn-1a 機能欠損型マウス気管における Trpm5 と villin 陽性細胞数を定量した。Skn-1a 機能欠損型マウス気管では、Trpm5 陽性細胞は認められず、villin 陽性細胞は  $323 \pm 43$  cells (mean  $\pm$  SEM, 3 個体) 認められた (Fig3-3)。野生型マウスと比較すると、villin 陽性細胞数は優位に減少し (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ )、減少率は約 32%であった。この villin 陽性細胞の減少率は、野生型マウス気管における Trpm5 陽性 brush cells 数の割合 (約 38%) と同程度であるため、Skn-1a の機能欠損によって気管における Trpm5 陽性 brush cells が消失したと考えられる。一方で、Skn-1a 機能欠損型マウス気管において villin 陽性細胞は野生型マウスと比較して約 68%残っていた。これは野生型マウス気管 brush cells の約 62%をしめる Trpm5 陰性 brush cells が Skn-1a 機能欠損型マウス気管においても残存しているためであると考えられる。つまり、Skn-1a の欠損は Trpm5 陰性 brush cells の産生には影響しないと考えられる。

### 3-3-2) 消化器官における Skn-1a の発現及び Skn-1a 機能欠損型消化器官での発現解析

消化器官の上皮には tuft cells と呼ばれる Trpm5 陽性化学感覚細胞が散在している。tuft cells に Skn1a が発現するかを調べるために、*Skn-1a* と *Trpm5* に対するプローブを用いた二色 ISH により解析したところ、*Skn-1a* は胃、小腸、大腸の *Trpm5* 発現細胞に発現していた (Fig3-4 A)。さらに、免疫組織化学の結果から、*Skn-1a* は villin 陽性細胞に発現していた (Fig3-4 B)。以上の結果から、消化器官の tuft cells にも *Skn-1a* が発現していることがわかった。

消化器官の tuft cells における Skn-1a の機能を解析するために、Skn-1a 機能欠損型マウス消化器官の表現型の解析をおこなった。まず Trpm5 と villin に対する抗体を用いた免疫組織化学をおこなった。Trpm5 及び villin 陽性細胞が野生型マウス胃や小腸、大腸上皮において認められたが、Skn-1a 機能欠損型マウスにおいては認められなかった (Fig3-4 C)。Trpm5 陽性細胞は、野生型マウスの胃では  $30 \pm 4.2$  cells、小腸では  $563 \pm 18.9$  cells、大腸では  $199 \pm 2.72$  cells であり、Skn-1a 機能欠損マウスではいずれの器官も 0 であった。この結果から、Skn-1a が tuft cells における Trpm5 や villin の発現を制御している、もしくは tuft cells の産生に関与しているという 2つの可能性が考えられた。この可能性を検証するために、消化器官 tuft cells の Trpm5 や villin 以外のマーカー遺伝子 (Gerbe *et al.*, 2009, 2011; Saqui-Salces *et al.*, 2011) である *Dclk1* (*Doublecortin-like kinase 1*) の発現を ISH によって解析した。野生型マウスにおいて認められた *Dclk1* のシグナルは Skn-1a 機能欠損型マウスにおいて認められなかった (Fig3-5)。以上の結果から、小腸の Trpm5 陽性化学感覚細胞である tuft cells の産生においても Skn-1a は重要な機能を持つことがわ

かった。

### 3-3-3) 耳管、胸腺、尿道、腭管における Skn-1a の発現及び Skn-1a 機能欠損型器官での発現解析

Skn-1a がこれまでに報告があった耳管・胸腺・尿道・腭管の Trpm5 陽性化学感覚細胞の産生にも関与しているかどうかを検証するために、まずこれらの器官の Trpm5 陽性化学感覚細胞における Skn-1a の発現解析をおこなった。二色 ISH の結果、いずれの器官においてもほとんどの Trpm5 発現細胞に Skn-1a の発現が確認できた (Fig3-6 A)。また、Trpm5 陽性化学感覚細胞の微絨毛のマーカである villin と Skn-1a の共局在を免疫組織化学によって調べた結果、ほとんどの Skn-1a 陽性細胞が villin 陽性であった (Fig3-6 B)。また気管と同様に、胸腺と尿道では Skn-1a 陰性の villin 陽性細胞が認められた (Fig3-6 B)。

次に Skn-1a の機能欠損による Trpm5 陽性化学感覚細胞の産生への影響を免疫組織化学及び定量解析により調べた。免疫組織化学の結果から、Trpm5 及び villin 陽性細胞が野生型マウスの耳管や腭管、尿道、胸腺において認められたのに対し、Skn-1a 機能欠損型マウスでは認められなかった (Fig3-6 C)。定量解析の結果から、Trpm5 陽性細胞は、野生型マウスの耳管では  $9.3 \pm 4.3$  cells、腭管では  $47 \pm 2.6$  cells、尿道では  $8.0 \pm 0.6$  cells、胸腺では  $59 \pm 1.8$  cells/mm<sup>2</sup> 認められたのに対し、Skn-1a 機能欠損型マウス組織では観察されなかった (Fig3-7)。また、尿道と胸腺では、villin 陽性細胞が Skn-1a 機能欠損型マウスにおいて認められたが (Fig3-6 C)、野生型マウスと比較して減少傾向にあった (Fig3-7)。

最後に Skn-1a 機能欠損マウスにおいて、Trpm5 陽性化学感覚細胞が消失しているかどうかを確認するために、Trpm5 や villin 以外のマーカ一遺伝子 (味覚受容体や味覚情報シグナル伝達因子) の発現を RT-PCR によって解析した。その結果、*Tas1r3* 及び *Tas2r105*、*Tas2r108*、*Tas2r131*、*Gnat3*、*Plcb2*、*Trpm5* の発現が野生型マウス耳管、胸腺、尿道、腭管において認められたが、Skn-1a 機能欠損型マウスでは認められなかった (Fig3-8)。以上の結果から、Skn-1a は、耳管や腭管・尿道・胸腺の Trpm5 陽性化学感覚細胞に発現し、その細胞産生に必須であることが明らかになった。

### 3-3-4) 小腸における味覚情報伝達因子の発現解析

小腸の Trpm5 陽性化学感覚細胞である tuft cells は寄生虫を検出し、II 型免疫応答を誘導する (Moltke *et al.*, 2015; Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016)。しかしながら、小腸 tuft cells が寄生虫を検出するために必要な受容体やシグナル伝達経路は明らかではない。味蕾の甘味・苦味・旨味細胞や呼吸上皮の孤立化学感覚細胞、気管の Trpm5 陽性 brush

cells は、GPCR 型味覚受容体や味覚シグナル伝達因子である  $\alpha$ -Gustducin (*Gnat3*) や *PLC $\beta$ 2* を発現する。そこで小腸の tuft cells にも同様に味覚受容体やその下流のシグナル伝達因子が発現するかどうかを ISH によって解析した。実験には、*Tas1r*、*Tas2r*、*Gnat3*、*Plcb2* に対する RNA プローブを用いた。ポジティブコントロールとして用いた茸状乳頭と有郭乳頭の味蕾において、*Tas1r1* と *Tas1r2* の発現が認められたが、先行研究(Krasteva *et al.*, 2011)と同様に気管では認められなかった (Fig3-9)。また、小腸においても *Tas1r1* と *Tas1r2* の発現は認められなかった (Fig3-9)。*Tas1r3* や *Tas2rs*(*Tas2r105*、*Tas2r108*、*Tas2r131*) の発現は味蕾や気管において認められたが、小腸においては認められなかった (Fig3-9)。以上の結果から、小腸 tuft cells には少なくとも解析した味覚受容体は発現しないと考えられる。

今回、小腸 tuft cells において味覚受容体の発現は確認できなかったが、先行研究では *Gnat3* や *Plcb2* の発現が報告されている (Bezençon *et al.*, 2007, 2008; Howitt *et al.*, 2016)。ISH によって *Gnat3* や *Plcb2*、*Trpm5* の発現を野生型マウス味蕾や小腸において解析した。ポジティブコントロールの有郭乳頭の味蕾において *Gnat3* や *Plcb2*、*Trpm5* の強い発現が認められた (Fig3-10)。小腸では *Gnat3* のシグナルは微絨毛上皮において少数認められた (Fig3-10)。また、小腸の陰窩上皮において *Plcb2* の弱いシグナルが少数認められた (Fig3-10)。*Trpm5* の発現は小腸上皮全体で認められた (Fig3-10)。Skn-1a 機能欠損型マウス小腸において *Gnat3* や *Plcb2* の発現を調べた結果、*Trpm5* に加え *Gnat3* や *Plcb2* のシグナルも認められなかった (Fig3-10)。このことから、消失した tuft cells に *Gnat3* や *Plcb2* が発現することが示唆される。この可能性を検証するために、小腸において *Trpm5* と *Gnat3* または *Plcb2* のプローブを用いた二色 ISH をおこなった。*Gnat3* のシグナルは小腸の微絨毛上皮の一部の *Trpm5* 発現細胞において認められた (Fig3-11 A 矢尻)。また、小腸の微絨毛上皮には *Gnat3* 陰性の *Trpm5* 発現細胞も認められた (Fig3-11 A 矢印)。この結果から、微絨毛上皮に局在する tuft cells の一部に *Gnat3* が発現することがわかった。*Plcb2* のシグナルは小腸の陰窩上皮の一部の *Trpm5* 発現細胞において認められた (Fig3-11 B 矢尻)。また、小腸微絨毛上皮の *Trpm5* 発現細胞は *Plcb2* 陰性であった (Fig3-11 B 矢印)。この結果から、陰窩上皮に局在する tuft cells の一部が *Plcb2* を発現することがわかった。小腸の微絨毛上皮の一部の tuft cells に *Gnat3* の発現が、小腸の陰窩上皮の一部の tuft cells に *Plcb2* の発現が認められることから、tuft cells は発現する遺伝子によって数種類に分類できる、もしくは分化の段階で遺伝子の発現パターンが異なることがわかった。

### 3-4. 考察

本章では、様々な組織の *Trpm5* 陽性化学感覚細胞における *Skn-1a* の発現解析と *Skn-1a* 機能欠損型マウスの表現型の解析をおこなった。その結果、味蕾の甘味・苦味・旨味細胞や呼吸上皮の孤立化学感覚細胞、嗅上皮の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞と同様に、*Skn-1a* が気管及び胸腺、尿道、膀胱、耳管、消化器官の *Trpm5* 陽性化学感覚細胞に発現していることが明らかになった。さらに、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは *Trpm5* 陽性化学感覚細胞マーカー遺伝子の発現が消失しており、*Skn-1a* が *Trpm5* 陽性化学感覚細胞の産生に必須な転写因子であることが明らかになった。

#### 3-4-1) 気管 brush cells における *Skn-1a* の機能

先行研究の結果と一致して(Krasteva *et al.*, 2011)、気管上皮には *Trpm5* 陽性 brush cells と *Trpm5* 陰性 brush cells が認められた。*Trpm5* 及び *Skn-1a* 陽性 brush cells は味細胞様の特徴を持ち、化学感覚細胞として機能していると考えられる(Krasteva *et al.*, 2011)。一方で、*Trpm5* 及び *Skn-1a* 陰性 brush cells は発現する遺伝子や機能は明らかになっていない。二種類の brush cells は villin 陽性の微絨毛を細胞頂点に持っており、細胞形態に類似した特徴があるため、同じ前駆細胞から分化していることが予想された。しかしながら、*Skn-1a* の機能欠損によって、*Trpm5* 陽性 brush cells は消失するが、*Trpm5* 陰性 brush cells の細胞数にはほとんど影響が認められなかったため、*Skn-1a* は *Trpm5* 陽性 brush cells の産生には必要であるが、*Trpm5* 陰性 brush cells の産生には関与しない。二つの brush cells は別の前駆細胞から産生する、もしくは *Skn-1a* が *Trpm5* 陽性 brush cells への分化を促進する前にそれぞれの細胞系譜へと分岐している可能性が考えられる。この結果は、嗅上皮では *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生に *Skn-1a* は必須であるが、*Trpm5* 陰性の微絨毛細胞の産生には関与しないという第2章での結果と同じである。*Trpm5* 陽性及び *Trpm5* 陰性 villin 陽性細胞は尿道や胸腺でも認められ(Deckmann *et al.*, 2014; Soultanova *et al.*, 2015)、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは *Trpm5* 陰性 villin 陽性細胞のみ残っていた。尿道や胸腺における villin 陽性細胞は *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいて減少していたが、その減少量は野生型マウスにおいて認められた *Trpm5* 陽性細胞数に匹敵する量ではなかった。このことは、*Skn-1a* が胸腺、尿道における *Trpm5* 陰性 villin 陽性細胞系譜に関与することを示唆する。今後は、*Trpm5* 陽性化学感覚細胞の前駆細胞を同定し、その細胞系譜解析を行うことで、*Skn-1a* 依存的な *Trpm5* 陽性化学感覚細胞の分化メカニズムや気管や胸腺、尿道、嗅上皮の villin 陽性細胞の細胞系譜についての詳しい知見が得られると考えられる。また、前駆細胞を明らかにすることができれば、*Skn-1a* を強制発現させることで *Trpm5* 陽性化学感覚細胞の産生における *Skn-1a* の十分性についても

検証することができ、Trpm5 陽性化学感覚細胞の産生における Skn-1a のより詳細な機能が明らかになると考えられる。

### 3-4-2) 小腸における味覚受容体やそのシグナル伝達因子の発現

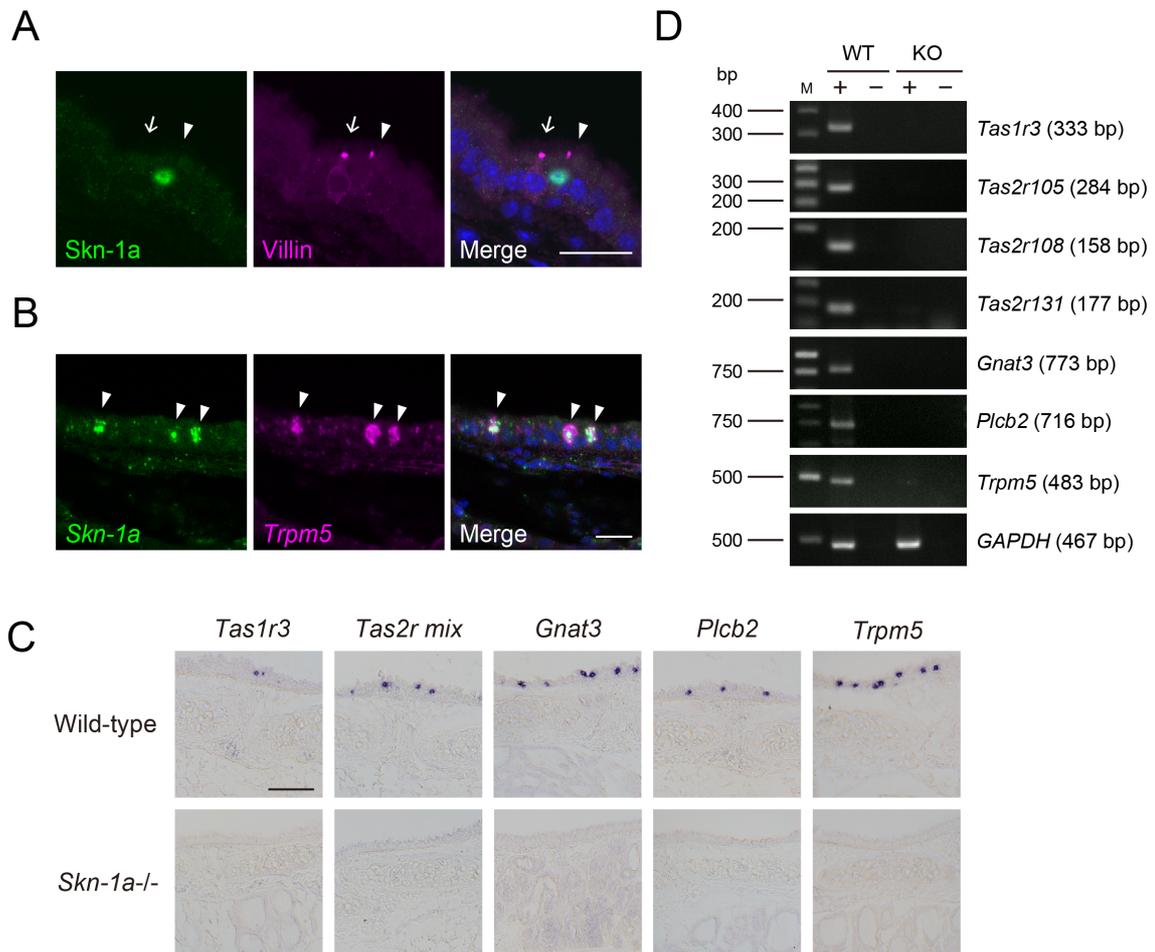
小腸 tuft cells は化学受容体によって体内に侵入してきた寄生虫を検出していると考えられているが、tuft cells に発現する化学受容体は明らかになっていない。他の Trpm5 陽性化学感覚細胞との類似性から、tuft cells にも味覚受容体が発現し、寄生虫の検出に関与することが示唆されたが、本研究で解析した結果、小腸において *Tas1r* (*Tas1r1*, *Tas1r2*, *Tas1r3*) や *Tas2r* (*Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas2r131*) の発現は認められなかった。このことから、味覚受容体以外の化学受容体もしくは他の味覚受容体が tuft cells に発現し、寄生虫の検出に関与している可能性が考えられる。化学受容体の候補分子としては GPCR が挙げられることや、今回解析した遺伝子以外の苦味受容体が tuft cells に発現している可能性が考えられることから、今後は、*Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas2r131* 以外の苦味受容体遺伝子を含めた GPCR 遺伝子の発現解析によって tuft cells に発現する化学受容体遺伝子の同定を目指す。

小腸における *Gnat3* や *Plcb2* の遺伝子発現解析の結果から、tuft cells は数種類のサブタイプに分類できることがわかった。小腸陰窩上皮では、*Plcb2* 発現 tuft cells と *Plcb2* 陰性の tuft cells が認められた。小腸陰窩には小腸上皮細胞の幹細胞や前駆細胞が存在することから、*Plcb2* 発現 tuft cells は tuft cells 前駆細胞の一部である可能性が考えられる。今後、*Plcb2* を発現した細胞の細胞系譜追跡実験によって、この可能性を検証できると考えられる。また、小腸の微絨毛上皮では *Gnat3* 発現 tuft cells と *Gnat3* 陰性 tuft cells が認められた。小腸の微絨毛上皮には成熟した tuft cells が存在すると考えられるため、機能的な tuft cells は *Gnat3* の発現によって 2 種類に分類できることが予想される。実際に、小腸上皮細胞の single-cell RNA-seq の解析結果から、成熟 tuft cells は発現する遺伝子によって Tuft-1 と Tuft-2 の 2 種類に分類できることが明らかになっている (Haber *et al.*, 2017)。このような発現遺伝子の違いは、2 種類の tuft cells がそれぞれ別の機能を持つことを示唆する。今後は、2 種類の tuft cells に発現する遺伝子を詳細に明らかにすることで、2 種類の tuft cells が持つ機能が明らかにできると考えられる。

### 3-4-3) Trpm5 陽性化学感覚細胞の生体機能

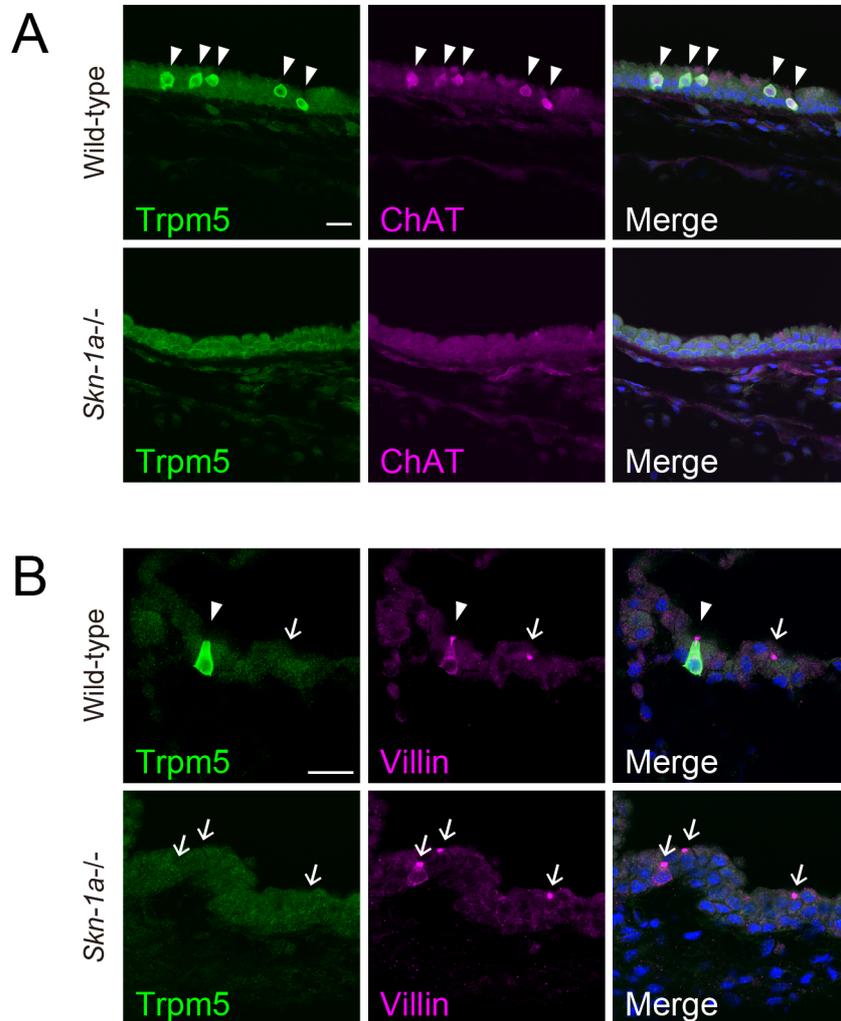
味蕾の甘味・苦味・旨味細胞以外にも様々な器官において Trpm5 陽性化学感覚細胞は発見されており、徐々にその機能も明らかになっている。例えば、呼吸上皮や気管、尿道の Trpm5 陽性化学感覚細胞は味覚受容体を介して有害物質（苦味物質）や細菌の分泌物

を検出し、生体防御応答を誘導する(Finger *et al.*, 2003; Marco Tizzano *et al.*, 2010; Ogura *et al.*, 2010; Krasteva *et al.*, 2011; G Krasteva *et al.*, 2012; Deckmann *et al.*, 2014; Saunders *et al.*, 2014)。また、小腸 tuft cells も寄生虫（蠕虫や原虫）に対する生体防御応答に関わる(Moltke *et al.*, 2015; Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016)。さらに、嗅上皮の Trpm5 陽性微絨毛細胞は有害な刺激物質から嗅上皮を保護する役割があることが示唆されている（2-4-2を参照）。耳管や胸腺、腭管、胃、大腸の Trpm5 陽性細胞の機能は明らかになっていないが、発現する遺伝子や細胞形態の特徴が類似していることから、有害物質に対する生体防御反応に関与することが示唆される。Skn-1a 機能欠損型マウスは Trpm5 陽性細胞が消失するため、Skn-1a 機能欠損型マウスの生理学的な解析により耳管や胸腺、腭管、胃、大腸の Trpm5 陽性化学感覚細胞の生体機能が明らかになることが期待される。



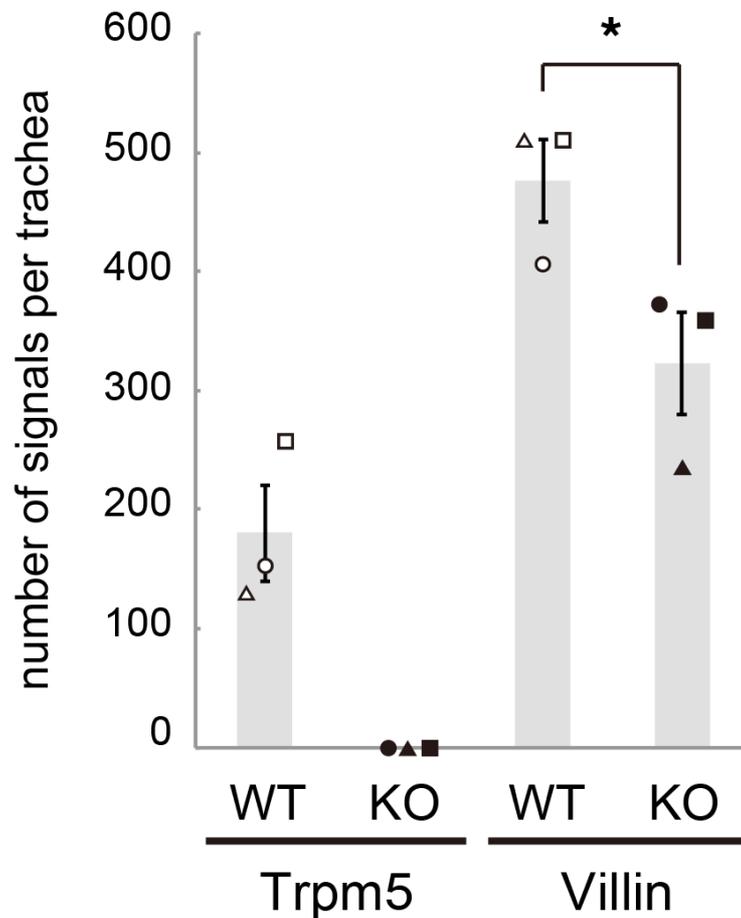
**Fig.3-1 気管上皮の brush cells における Skn-1a の発現解析及び Skn-1a 機能欠損型マウスにおける Trpm5 陽性 brush cells マーカー遺伝子の発現解析**

(A) Skn-1a の気管上皮 brush cells での発現を Skn-1a と brush cells の微絨毛マーカーである villin に対する抗体を用いた免疫組織化学によって解析した。ほとんどの Skn-1a 陽性細胞は villin 陽性であった(矢尻)。一方で、Skn-1a 陰性 brush cells も認められた(矢印)。スケールバー: 20  $\mu$ m (B)気管上皮において Skn-1a と Trpm5 の共発現を調べるために二色 ISH によって解析した。Skn-1a の発現がほとんどの Trpm5 発現細胞において認められた。スケールバー: 20  $\mu$ m (C)Skn-1a の機能欠損による Trpm5 陽性 brush cells の産生への影響を、Trpm5 陽性 brush cells のマーカー遺伝子に対する RNAプローブを用いた ISH によって解析した。野生型マウス気管上皮において認められた *Tas1r3*, *Tas2rs* (*Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas2r131*), *Gnat3*, *Plcb2*, *Trpm5* の発現は、Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮では認められなかった。スケールバー: 100  $\mu$ m (D)Skn-1a 機能欠損型マウス気管における Trpm5 陽性 brush cells のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。ISH の結果と同様に、*Tas1r3*, *Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas2r131*, *Gnat3*, *Plcb2*, *Trpm5* の発現は Skn-1a 機能欠損型マウス気管では検出できなかった。一方で、コントロールである GAPDH の発現は野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス気管において認められた。



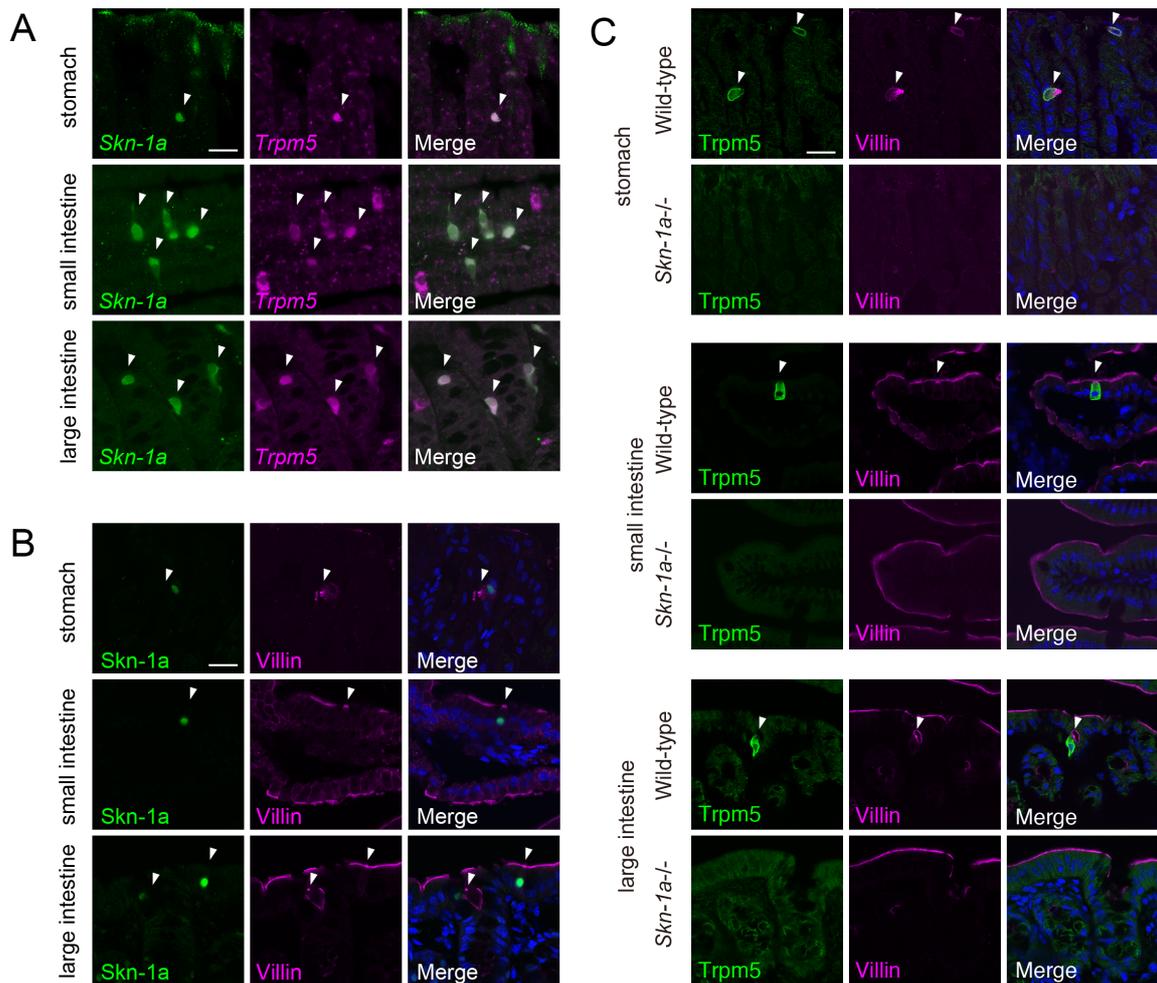
**Fig.3-2 Skn-1a 機能欠損型マウス気管における Trpm5、ChAT、villin の発現解析**

(A)野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮における Trpm5 及び ChAT の局在を免疫染色によって解析した。野生型マウス気管では Trpm5 と ChAT の共局在が認められた(矢尻)。一方で、Skn-1a 機能欠損型マウス気管では Trpm5 及び ChAT の発現は認められなかった。スケールバー: 20  $\mu$ m (B) 野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮における Trpm5 及び villin の局在を免疫染色によって解析した。野生型マウス気管では Trpm5 陽性 brush cells(矢尻)と Trpm5 陰性 brush cells(矢印)が認められた。Skn-1a 機能欠損型マウス気管では、Trpm5 陽性 brush cells は認められなかったが、Trpm5 陰性 brush cells は認められた(矢印)。スケールバー: 20  $\mu$ m



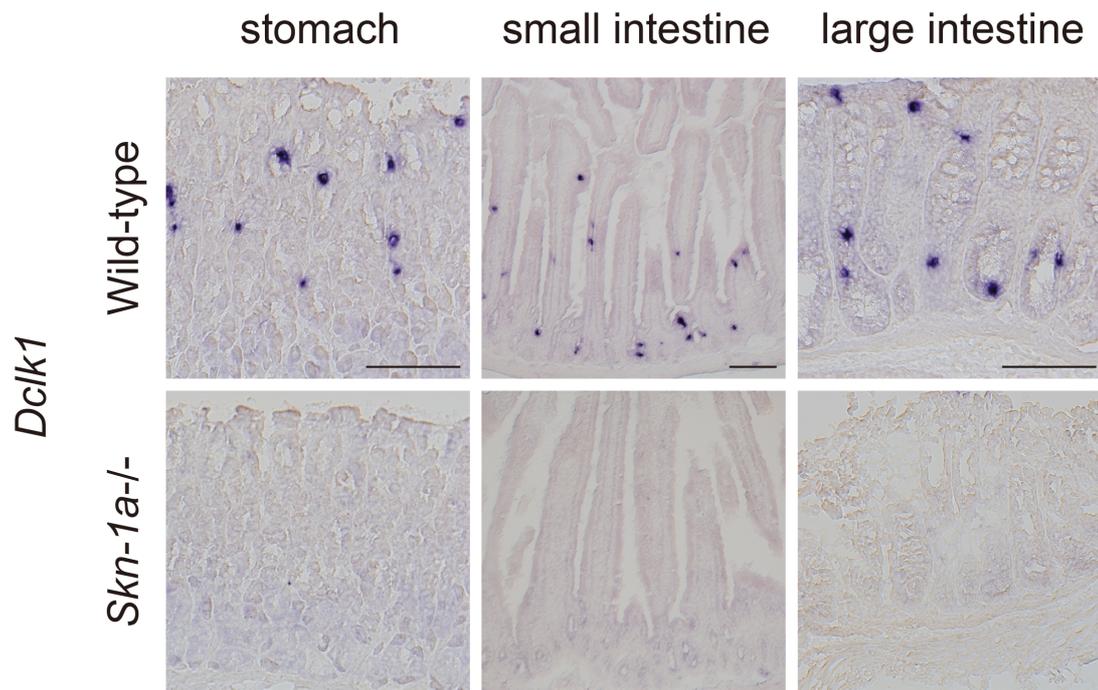
**Fig.3-3 Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮における Trpm5 と villin 陽性細胞の定量解析**

野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮における villin と Trpm5 陽性細胞数を定量した。Skn-1a 機能欠損型マウス気管上皮では Trpm5 発現細胞は認められなかった。野生型マウスと比較して、Skn-1a 機能欠損型マウスでは villin 陽性細胞数が優位に減少した。プロットは各マウス個体で認められた細胞数を、棒グラフは3個体の平均値を、エラーバーは標準誤差を示している。*t* 検定によって *p* 値を算出した (\**p*<0.05)。



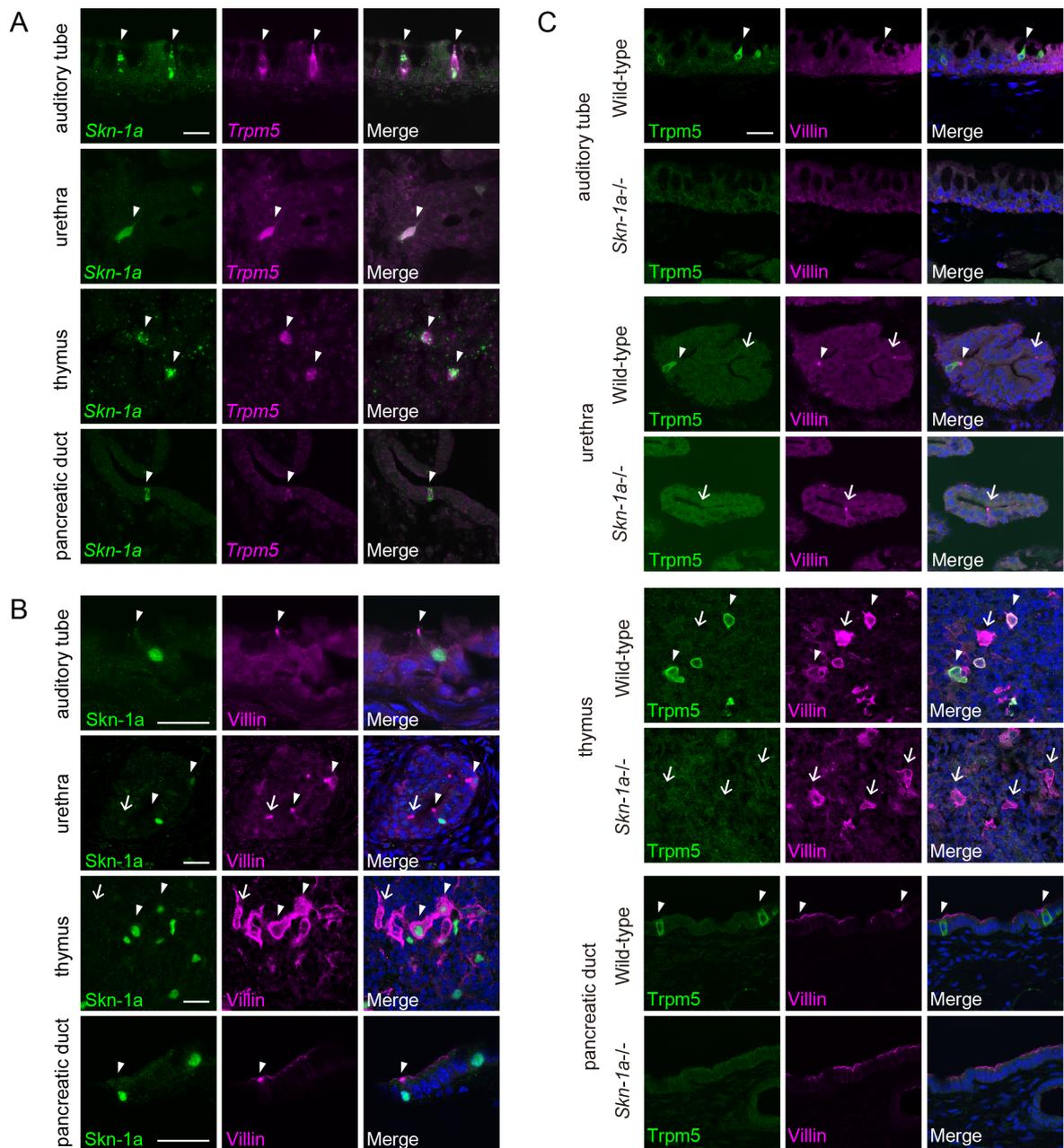
**Fig.3-4 消化器官の tuft cells における *Skn-1a* の発現解析及び *Skn-1a* 機能欠損型マウスにおける *Trpm5* と villin の発現解析**

(A)消化器官において *Skn-1a* と *Trpm5* の共発現を二色 ISH によって解析した。*Skn-1a* は *Trpm5* 発現細胞である tuft cells に発現していることがわかった(矢尻)。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$   
 (B)消化器官の tuft cells に *Skn-1a* が発現しているかどうかを tuft cells の微絨毛のマーカである villin と *Skn-1a* の抗体を用いた免疫組織化学をおこなうことで調べた。胃では *Skn-1a* は villin 陽性細胞に発現していた(矢印)。全ての小腸、大腸上皮細胞は villin 陽性であるが、*Skn-1a* 陽性細胞の細胞頂点において特に強い villin のシグナルが認められた(矢尻)。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$   
 (C)*Skn-1a* の機能欠損による tuft cells 産生への影響を *Trpm5* と villin に対する抗体を用いた免疫組織化学によって解析した。野生型マウス消化器官において *Trpm5* は villin と共発現していたが(矢尻)、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは *Trpm5* の発現は認められなかった。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$



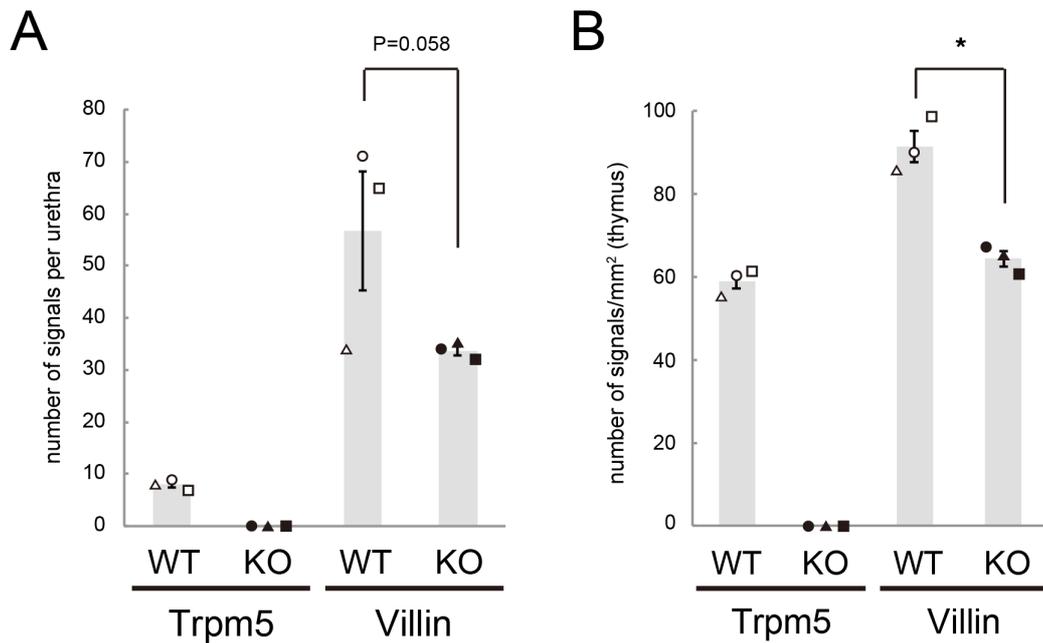
**Fig.3-5 *Skn-1a* 機能欠損型マウス消化器官における *Dclk1* の発現**

消化器官 tuft cells には *Dclk1* が発現することがわかっている。*Skn-1a* の機能欠損による、villin や *Trpm5* 以外の tuft cells マーカー遺伝子の発現への影響を調べるために、ISH によって *Dclk1* の発現を *Skn-1a* 機能欠損型マウス消化器官において解析した。野生型マウス消化器官において認められた *Dclk1* の発現が *Skn-1a* 機能欠損型マウスでは消失していた。スケールバー: 100  $\mu$ m



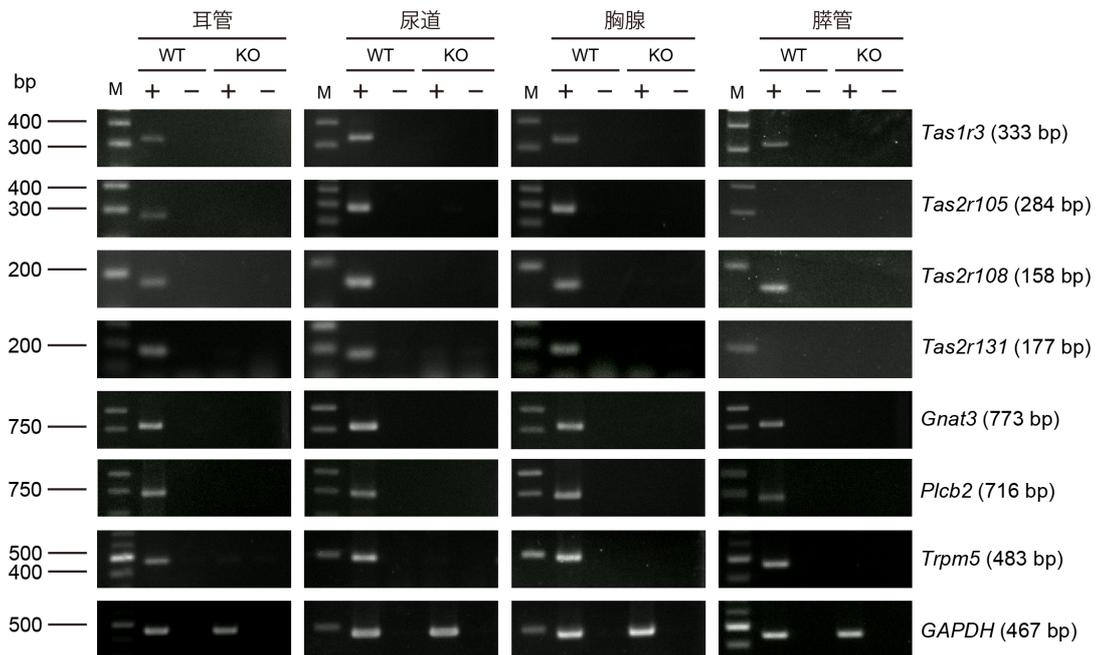
**Fig.3-6 様々な器官の Trpm5 陽性化学感覚細胞における Skn-1a の発現解析及び Skn-1a 機能欠損型マウスにおける Trpm5 と villin の発現解析**

(A) 耳管、尿道、胸腺、膵管において *Skn-1a* と *Trpm5* の発現を二色 ISH によって解析した。*Skn-1a* は *Trpm5* 発現細胞に発現していることがわかった(矢尻)。スケールバー: 20  $\mu$ m (B) 耳管、尿道、胸腺、膵管において villin と *Skn-1a* の共発現を免疫組織化学によって解析した。*Skn-1a* 発現細胞は villin 陽性の微絨毛を細胞頂点に有することがわかった(矢尻)。尿道や胸腺には *Skn-1a* 陰性の villin 陽性細胞も認められた(矢印)。スケールバー: 20  $\mu$ m (C) *Skn-1a* の機能欠損による *Trpm5* 陽性細胞の産生への影響を免疫組織化学によって調べた。野生型マウス耳管、尿道、胸腺、膵管において認められた *Trpm5* 及び villin 陽性細胞(矢尻)が、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは認められなかった。野生型マウス尿道、胸腺では *Trpm5* 陰性の villin 陽性細胞が認められ(矢印)、*Skn-1a* 機能欠損型マウスにおいても観察された(矢印)。スケールバー: 20  $\mu$ m



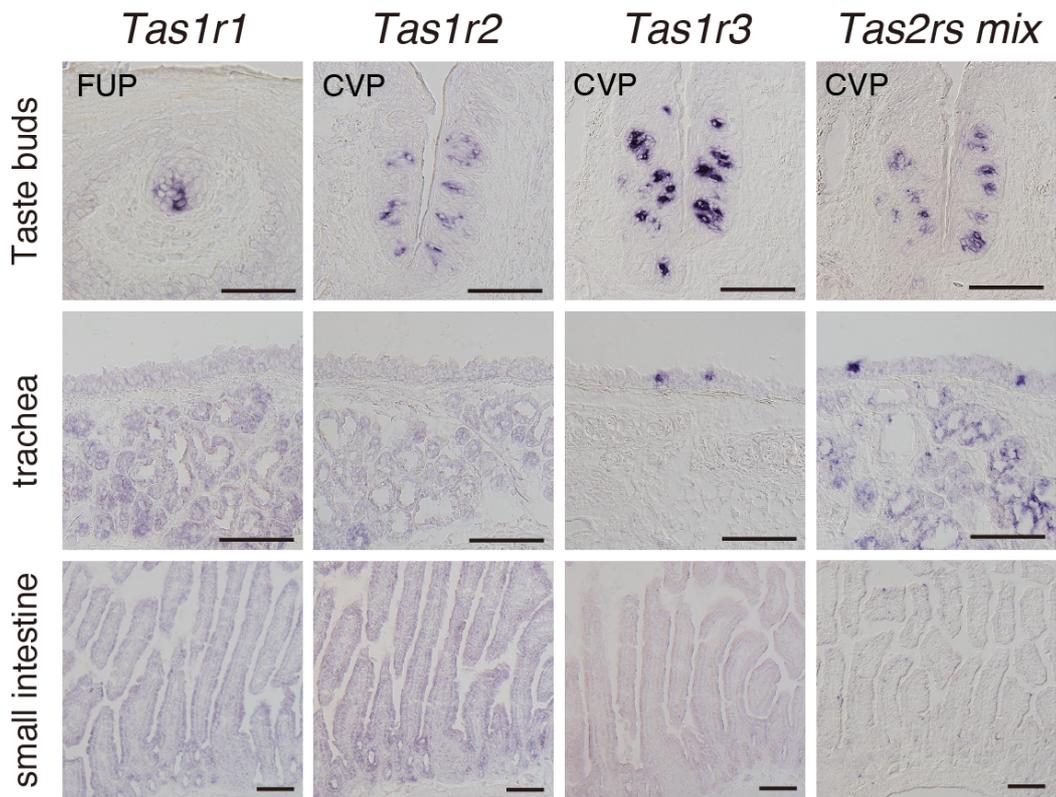
**Fig.3-7 Skn-1a 機能欠損型マウス尿道、胸腺における Trpm5 と villin 陽性細胞数**

(A)野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス尿道上皮における villin と Trpm5 陽性細胞数を定量した。野生型マウス尿道上皮では  $8.0 \pm 0.6$  cells の Trpm5 陽性細胞が認められたが、Skn-1a 機能欠損型マウス尿道上皮では Trpm5 陽性細胞は認められなかった。また、野生型マウス尿道上皮では  $57 \pm 11$  cells、Skn-1a 機能欠損型マウスでは  $34 \pm 0.9$  cells の villin 陽性細胞が認められた。野生型マウスと比較して、Skn-1a 機能欠損型マウスでは villin 陽性細胞数が減少傾向にあった。プロットは各マウス個体で認められた細胞数を、棒グラフは3個体の平均値を、エラーバーは標準誤差を示している。*t* 検定によって p 値を算出した(\* $p=0.058$ )。(B) 野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス胸腺における単位面積当たりの villin と Trpm5 陽性細胞数を定量した。野生型マウス胸腺では  $59 \pm 1.8$  cells/mm<sup>2</sup> の Trpm5 陽性細胞が認められたが、Skn-1a 機能欠損型マウスでは Trpm5 陽性細胞は認められなかった。また、野生型マウス胸腺では  $91 \pm 3.8$  cells/mm<sup>2</sup>、Skn-1a 機能欠損型マウスでは  $64 \pm 1.9$  cells/mm<sup>2</sup> の villin 陽性細胞が認められた。野生型マウスと比較して、Skn-1a 機能欠損型マウスでは villin 陽性細胞密度が優位に減少していた。プロットは各マウス個体で認められた細胞密度を、棒グラフは3個体の平均値を、エラーバーは標準誤差を示している。*t* 検定によって p 値を算出した(\* $p<0.05$ )。



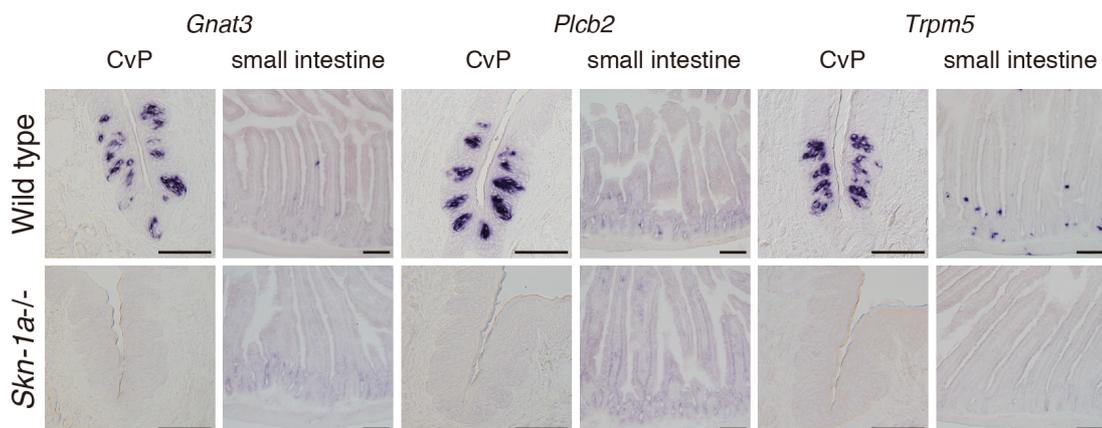
**Fig.3-8 Skn-1a 機能欠損型マウス器官における味覚情報伝達因子の RT-PCR による発現解析**

Skn-1a 機能欠損型マウス耳管、尿道、胸腺、腭管における *Trpm5* 陽性化学感覚細胞のマーカ一遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。野生型マウスにおいて発現が認められた *Tas1r3*, *Tas2r105*, *Tas2r108*, *Tas2r131*, *Gnat3*, *Plcb2*, *Trpm5* の発現は、Skn-1a 機能欠損型マウス組織では検出できなかった。一方で、コントロールである *GAPDH* の発現は野生型及び Skn-1a 機能欠損型マウス組織においてに認められた。



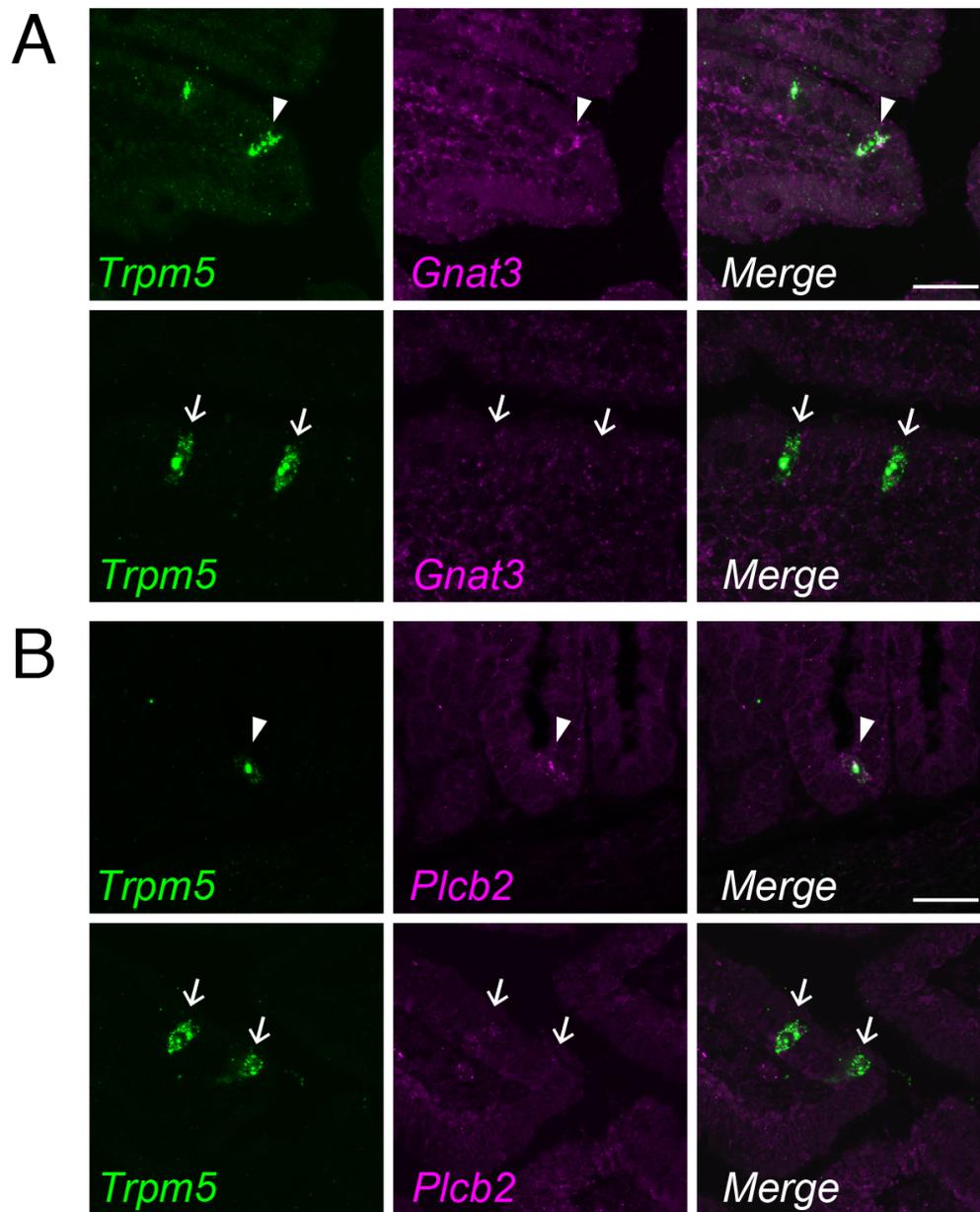
**Fig.3-9 小腸における味覚受容体の発現解析**

小腸 tuft cells に味覚受容体が発現するかどうかを調べるために、*Tas1r1*、*Tas1r2*、*Tas1r3*、*Tas2rs* (*Tas2r105*、*Tas2r108*、*Tas2r131*)の発現をISHによって解析した。味蕾や気管上皮において味覚受容体の発現が認められた。一方で、小腸において味覚受容体の発現は認められなかった。FUP は茸状乳頭、CVP は有郭乳頭を示す。スケールバー: 100 μm



**Fig.3-10 野生型及び *Skn-1a* 機能欠損型マウス小腸における味覚情報伝達因子の発現解析**

有郭乳頭の味蕾と小腸において、味覚情報伝達因子である *Gnat3*、*Plcb2*、*Trpm5* の発現をISHによって解析した。*Gnat3*、*Plcb2*、*Trpm5* は有郭乳頭の味蕾において強い発現が認められた一方で、*Skn-1a* 機能欠損型マウスでは発現が認められなかった。野生型マウス小腸の絨毛上皮に *Gnat3*、陰窩において *Plcb2* の弱い発現、上皮全体において *Trpm5* 発現細胞が認められた。*Gnat3* や *Plcb2* の発現細胞数は *Trpm5* と比較すると少ない傾向にあった。*Skn-1a* 機能欠損型マウス小腸では、*Gnat3*、*Plcb2*、*Trpm5* の発現は認められなかったことから、*Gnat3* や *Plcb2* を発現する細胞は tuft cells であることが示唆される。スケールバー: 100  $\mu$ m



**Fig.3-11 小腸 tuft cells における *Gnat3*、*Plcb2* の発現解析**

消化器官 tuft cells に *Gnat3* や *Plcb2* が発現しているかどうかを調べるために、*Trpm5* と *Gnat3* または *Plcb2* の共発現を二色 ISH によって解析した。(A)小腸上皮の絨毛において *Gnat3* 発現 tuft cells が認められた(矢尻)。一方で、*Gnat3* を発現していない tuft cells も認められた(矢印)。(B)小腸上皮の陰窩において *Plcb2* 発現 tuft cells が認められた(矢尻)。一方で、*Plcb2* を発現していない tuft cells も認められた(矢印)。以上の結果から、*Gnat3* や *Plcb2* は一部の tuft cells に発現することが示唆される。スケールバー: 20  $\mu$ m

## 第4章

### 結言

本研究では、様々な器官に存在し、初期生体防御反応に関与すると考えられている *Trpm5* 陽性化学感覚細胞における *Skn-1a* の機能を明らかにすることを目的として、*Skn-1a* の発現解析と *Skn-1a* 機能欠損型マウスを用いた解析をおこなった。

第2章では、嗅上皮の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞における *Skn-1a* の発現解析及び *Skn-1a* 機能欠損型マウス嗅上皮の表現型解析をおこなった。まず *Skn-1a* と *Trpm5* の遺伝子発現解析の結果、嗅上皮表層側において *Trpm5* 陽性微絨毛細胞に *Skn-1a* が発現していることがわかった (Fig.2-1, 2)。さらに *Skn-1a* 機能欠損変異導入の結果、*Trpm5* 陽性微絨毛細胞が消失したことから、*Skn-1a* が *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生に必須な転写因子であることが明らかとなった。また嗅上皮基底側にも *Skn-1a* 発現細胞が認められたが、*Trpm5* との共発現は認められなかった (Fig.2-2)。基底側で *Skn-1a* を発現する細胞のごく一部は嗅神経細胞への運命決定因子である *Mash1* と共発現していたことから、基底側の *Skn-1a* 発現細胞は嗅神経細胞系譜にあり、嗅神経細胞の分化に関与する可能性が考えられた (Fig.2-9)。しかしながら、*Skn-1a* の機能欠損変異は嗅神経細胞分化マーカー遺伝子の発現にほとんど影響しなかったため (Fig.2-11)、*Skn-1a* は嗅神経細胞の分化に関与しないと見える。これらのことから、基底側の *Skn-1a* は *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の前駆細胞に発現しているものと考えられる。

嗅上皮の *Trpm5* 陽性微絨毛細胞に発現する化学受容体は明らかになっていない。嗅上皮において味覚受容体やその味覚シグナル伝達因子の発現は認められなかったため (Fig.2-12)、孤立化学感覚細胞などとは別の機能を持った細胞であると考えられる。今後、単一細胞 RNAseq 解析などの網羅的な遺伝子発現解析をおこなうことによって、どのような受容体やシグナル伝達因子が発現しているのかを明らかにすることで、嗅上皮 *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の生理機能の解明をおこないたい。

第3章では、*Skn-1a* が *Trpm5* 陽性微絨毛細胞の産生に必須な因子として機能していることを検証するために、様々な器官 (気管・胸腺・尿道・耳管・膝管・消化器官) に存在する *Trpm5* 陽性化学感覚細胞における *Skn-1a* の発現解析と *Skn-1a* 機能欠損型マウス器官の表現型解析をおこなった。気管上皮では、二種類の brush cells (*Trpm5* 陽性と *Trpm5* 陰性 brush cells) のうち *Trpm5* 陽性 brush cells に *Skn-1a* が発現し、*Trpm5* 陽性 brush cells の産生に *Skn-1a* が重要であることがわかった。さらに *Skn-1a* の発現は、胃や小腸、大腸、耳管、胸腺、尿道、膝管の *Trpm5* 陽性化学感覚細胞にも認められた (Fig.3-4 A, B, Fig.3-6 A, B)。 *Skn-1a* の機能欠損変異導入による機能解析の結果から (Fig.3-4 C, Fig.3-5, Fig.3-6 C, Fig.3-8)、解析した器官の *Trpm5* 陽性化学感覚細胞の産生に *Skn-1a* が必要であることが明らかになった。以上の結果から、*Skn-1a* は味蕾の甘味・苦味・旨

味細胞や孤立化学感覚細胞、嗅上皮の **Trpm5** 陽性微絨毛細胞に加え、様々な器官（気管・胸腺・尿道・耳管・腭管・消化器官）の **Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生に必須な因子として機能していることが明らかになった。

本研究をまとめると、**Skn-1a** が **Trpm5** 陽性化学感覚細胞の産生に必須な因子として機能していることが明らかになった。全身で **Trpm5** 陽性化学感覚細胞が消失する **Skn-1a** 機能欠損マウスは、各器官における化学感覚細胞の生理機能の全容を明らかにするための有用なモデルマウスになると考えられる。今後、**Skn-1a** 機能欠損型マウスを用いた **Trpm5** 陽性化学感覚細胞の機能解析を行いたいと考えている。特に胸腺や耳管、腭管、胃、大腸の **Trpm5** 陽性化学感覚細胞は生体機能が明らかになっていない。また、他の器官とは異なり、直接外部環境と接していない胸腺髄質に存在する **Trpm5** 陽性化学感覚細胞が持つ生体機能は興味深く、生体内に侵入してきた有害物質に対する生体防御反応とは別の機能を持つ可能性が考えられる。さらに化学感覚細胞に発現する化学感覚受容体を同定することによって、これら **Trpm5** 陽性化学感覚細胞が関与する生体防御反応のメカニズムの解明や感染症などの疾病の治療にむけた創薬研究への発展が期待できると考えている。

## 参考文献

- Adler, E. *et al.* (2000) “A Novel Family of Mammalian Taste Receptors,” *Cell*, 100(6), pp. 693–702. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80705-9.
- Andersen, B. *et al.* (1992) “Oct-2-Related Factors Expressed in Epidermis,” *Science*, 260(5104), pp. 78–82. 10.1126/science.7682011
- Andersen, B. *et al.* (1997) “Functions of the POU domain genes *skn-1a/i* and *Tst-1/Oct-6/SCIP* in epidermal differentiation,” *Genes and Development*, 11(14), pp. 1873–1884. doi: 10.1101/gad.11.14.1873.
- Barham, H. P. *et al.* (2013) “Solitary chemosensory cells and bitter taste receptor signaling in human sinonasal mucosa,” *International Forum of Allergy and Rhinology*, 3(6), pp. 450–457. doi: 10.1002/alr.21149.
- Bezençon, C. *et al.* (2008) “Murine intestinal cells expressing *Trpm5* are mostly brush cells and express markers of neuronal and inflammatory cells,” *Journal of Comparative Neurology*, 509(5), pp. 514–525. doi: 10.1002/cne.21768.
- Bezençon, C., le Coutre, J. and Damak, S. (2007) “Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells,” *Chemical Senses*, 32(1), pp. 41–49. doi: 10.1093/chemse/bjl034.
- Buck, L. and Axel, R. (1991) “A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition,” *Cell*, 65(1), pp. 175–187. doi: 10.1016/0092-8674(91)90418-X.
- Chandrashekar, J. *et al.* (2000) “T2Rs Function as Bitter Taste Receptors,” *Cell*, 100(6), pp. 703–711. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80706-0.
- Chaudhari, N. and Roper, S. D. (2010) “The cell biology of taste,” *Journal of Cell Biology*, 190(3), pp. 285–296. doi: 10.1083/jcb.201003144.
- Clerc, R. G. *et al.* (1988) “The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains.” *Genes & development*, 2(12 A), pp. 1570–1581. doi: 10.1101/gad.2.12a.1570.
- Deckmann, K. *et al.* (2014) “Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), pp. 8287–92. doi: 10.1073/pnas.1402436111.
- Deckmann, K. *et al.* (2015) “Cholinergic urethral brush cells are widespread throughout placental mammals,” *International Immunopharmacology*, 29(1), pp. 51–56. doi: 10.1016/j.intimp.2015.05.038.
- Delgiorno, K. E. *et al.* (2014) “Identification and manipulation of biliary metaplasia in pancreatic tumors,” *Gastroenterology*, 146(1), p. 233–244.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.053.
- Elsaesser, R. *et al.* (2005) “Phosphatidylinositol signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium,” *European Journal of Neuroscience*, 21(10), pp. 2692–2700. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04108.x.
- Enomoto, Y. *et al.* (2004) “Keratinocyte-specific POU transcription factor *hSkn-1a* represses the growth of cervical cancer cell lines.” *Oncogene*, 23(29), pp. 5014–22. doi: 10.1038/sj.onc.1207653.
- Finger, T. E. *et al.* (2003) “Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 100(15), pp. 8981–6. doi: 10.1073/pnas.1531172100.
- Finger, T. E. *et al.* (2005) “ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves,” *Science*, 310(5753), pp. 1495–1499. doi: 10.1126/science.1118435.
- Gerbe, F. *et al.* (2009) “DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium,” *Gastroenterology*, 137(6), pp. 2179–2180. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.072.
- Gerbe, F. *et al.* (2011) “Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium,” *Journal of Cell Biology*, 192(5), pp. 767–780. doi: 10.1083/jcb.201010127.
- Gerbe, F. *et al.* (2016) “Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites,” *Nature*, 529(7585), pp. 226–30. doi: 10.1038/nature16527.
- Haber, A. L. *et al.* (2017) “A single-cell survey of the small intestinal epithelium,” *Nature*. Nature Publishing Group, 551(7680), pp. 333–339. doi: 10.1038/nature24489.
- Hansen, A. and Finger, T. E. (2008) “Is TrpM5 a reliable marker for chemosensory cells? Multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice,” *BMC neuroscience*, 9, p. 115. doi: 10.1186/1471-2202-9-115.
- Hegg, C. C. *et al.* (2010) “Microvillous cells expressing IP3 receptor type 3 in the olfactory epithelium of mice,” *European Journal of Neuroscience*, 32(10), pp. 1632–1645. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07449.x.
- Herr, W. *et al.* (1988) “The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products,” *Genes & development*, 2(12 A), pp. 1513–1516. doi: 10.1101/gad.2.12a.1513.
- Hirota, J. and Mombaerts, P. (2004) “The LIM-homeodomain protein Lhx2 is required for complete development of mouse olfactory sensory neurons,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), pp. 8751–8755. doi: 10.1073/pnas.0400940101.
- Hofmann, T. *et al.* (2003) “TRPM5 Is a Voltage-Modulated and Ca<sup>2+</sup>-Activated Monovalent Selective Cation Channel,” *Current Biology*, 13(13), pp. 1153–1158. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00431-7.
- Hoon, M. A. *et al.* (1999) “Putative Mammalian Taste Receptors,” *Cell*, 96(4), pp. 541–551. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80658-3.
- Horio, N. *et al.* (2011) “Sour taste responses in mice lacking pkd channels,” *PLoS ONE*, 6(5), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0020007.
- Howitt, M. R. *et al.* (2016) “Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut,” *Science*, 351(6279), pp. 1329–1333. doi: 10.1126/science.aaf1648.
- Huang, A. L. *et al.* (2006) “The cells and logic for mammalian sour taste detection,” *Nature*, 442(7105), pp. 934–938. doi: 10.1038/nature05084.
- Ishimaru, Y. *et al.* (2006) “Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), pp. 12569–12574. doi: 10.1073/pnas.0602702103.
- Kaske, S. *et al.* (2007) “TRPM5, a taste-signaling transient receptor potential ion-channel, is a ubiquitous signaling component in chemosensory cells,” *BMC neuroscience*, 8, p. 49. doi: 10.1186/1471-2202-8-49.
- Klemm, J. D. *et al.* (1994) “Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules,” *Cell*, 77(1), pp. 21–

32. doi: 10.1016/0092-8674(94)90231-3.

Krasteva, G. *et al.* (2011) “Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), pp. 9478–9483. doi: 10.1073/pnas.1019418108.

Krasteva, G. *et al.* (2012) “Cholinergic brush cells in the trachea mediate respiratory responses to quorum sensing molecules,” *Life sciences*, 91(21–22), pp. 992–6. doi: 10.1016/j.lfs.2012.06.014.

Krasteva, G. *et al.* (2012) “Cholinergic chemosensory cells in the auditory tube,” *Histochemistry and Cell Biology*, 137(4), pp. 483–497. doi: 10.1007/s00418-012-0911-x.

Lee, R. J. *et al.* (2014) “Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity,” *J Clin Invest*, 124(3), pp. 1393–1405. doi: 10.1172/JCI72094.recently.

Lee, R. J. *et al.* (2017) “Bacterial d-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells,” *Science Signaling*, 10(495), p. eaam7703. doi: 10.1126/scisignal.aam7703.

Lee, R. J. and Cohen, N. A. (2015) “Taste receptors in innate immunity,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(2), pp. 217–236. doi: 10.1007/s00018-014-1736-7.

Lemons, K. *et al.* (2017) “Lack of TRPM5-Expressing Microvillous Cells in Mouse Main Olfactory Epithelium Leads to Impaired Odor-Evoked Responses and Olfactory-Guided Behavior in a Challenging Chemical Environment,” *eNeuro*, 4(3). doi: 10.1523/ENEURO.0135-17.2017

Lin, W. *et al.* (2008) “TRPM5-expressing microvillous cells in the main olfactory epithelium,” *BMC neuroscience*, 9, p. 114. doi: 10.1186/1471-2202-9-114.

Lin, W. *et al.* (2008) “TRPM5-Expressing Solitary Chemosensory Cells Respond to Odorous Irritants,” *Journal of Neurophysiology*, 99(3), pp. 1451–1460. doi: 10.1152/jn.01195.2007.

Liu, D. and Liman, E. R. (2003) “Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), pp. 15160–5. doi: 10.1073/pnas.2334159100.

Matsumoto, I. *et al.* (2011) “Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage,” *Nature Neuroscience*, 14(6), pp. 685–687. doi: 10.1038/nn.2820.

Matsunami, H., Montmayeur, J. P. and Buck, L. B. (2000) “A family of candidate taste receptors in human and mouse,” *Nature*, 404(6778), pp. 601–4. doi: 10.1038/35007072.

Max, M. *et al.* (2001) “Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac,” *Nature Genetics*, 28(1), pp. 58–63. doi: 10.1038/88270.

von Moltke, J. *et al.* (2015) “Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit,” *Nature*, 529(7585), pp. 221–225. doi: 10.1038/nature16161.

Montmayeur, J. P. *et al.* (2001) “A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus,” *Nature neuroscience*, 4(5), pp. 492–498. doi: 10.1038/87440.

Mueller, K. L. *et al.* (2005) “The receptors and coding logic for bitter taste,” *Nature*, 434(7030), pp. 225–9. doi: 10.1038/nature03352.

Nelson, G. *et al.* (2001) “Mammalian Sweet Taste Receptors” *Cell*, 106(3), pp. 381–390. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00451-2.

Nelson, G. *et al.* (2002) “An amino-acid taste receptor,” *Nature*, 416(6877), pp. 199–202. doi: 10.1038/nature726.

- Nelson, T. M. *et al.* (2010) “Taste function in mice with a targeted mutation of the Pkd113 gene,” *Chemical Senses*, 35(7), pp. 565–577. doi: 10.1093/chemse/bjq070.
- Ogura, T. *et al.* (2010) “Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: Role of solitary chemosensory cells,” *PLoS ONE*, 5(7). doi: 10.1371/journal.pone.0011924.
- Ogura, T. *et al.* (2011) “Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells,” *Journal of Neurophysiology*, 106(3), pp. 1274–1287. doi: 10.1152/jn.00186.2011.
- Ogura, T. *et al.* (2011) “Cholinergic microvillous cells in the mouse main olfactory epithelium and effect of acetylcholine on olfactory sensory neurons and supporting cells,” *Journal of neurophysiology*, 106(3), pp. 1274–1287. doi: 10.1152/jn.00186.2011.
- Ohmoto, M. *et al.* (2008) “Genetic tracing of the gustatory and trigeminal neural pathways originating from T1R3-expressing taste receptor cells and solitary chemoreceptor cells,” *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38(4), pp. 505–517. doi: 10.1016/j.mcn.2008.04.011.
- Ohmoto, M. *et al.* (2013) “Pou2f3/Skn-1a is necessary for the generation or differentiation of solitary chemosensory cells in the anterior nasal cavity.,” *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(10), pp. 2154–6. doi: 10.1271/bbb.130454.
- Panneck, A. R. *et al.* (2014) “Cholinergic epithelial cell with chemosensory traits in murine thymic medulla,” *Cell and Tissue Research*, 358(3), pp. 737–748. doi: 10.1007/s00441-014-2002-x.
- Pérez, C. A. *et al.* (2002) “A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells,” *Nature Neuroscienc*, 5(11), pp. 1169–1176. doi: 10.1038/nn952.
- Prawitt, D. *et al.* (2003) “TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), pp. 15166–71. doi: 10.1073/pnas.2334624100.
- Ryan, A. K. and Rosenfeld, M. G. (1997) “POU domain family values: Flexibility, partnerships, and developmental codes,” *Genes and Development*, 11(10), pp. 1207–1225. doi: 10.1101/gad.11.10.1207.
- Saqui-Salces, M. *et al.* (2011) “Gastric tuft cells express DCLK1 and are expanded in hyperplasia,” *Histochemistry and Cell Biology*, 136(2), pp. 191–204. doi: 10.1007/s00418-011-0831-1.
- Saunders, C. J. *et al.* (2014) “Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(16), pp. 6075–80. doi: 10.1073/pnas.1402251111.
- Schubart, K. *et al.* (2001) “B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1.,” *Nature immunology*, 2(1), pp. 69–74. doi: 10.1038/83190.
- Schütz, B. *et al.* (2015) “Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract,” *Frontiers in Physiology*, 6(87), pp. 1–14. doi: 10.3389/fphys.2015.00087.
- Soultanova, A. *et al.* (2015) “Cholinergic chemosensory cells of the thymic medulla express the bitter receptor Tas2r131,” *International Immunopharmacology*, 29(1), pp. 143–147. doi: 10.1016/j.intimp.2015.06.005.
- Talavera, K. *et al.* (2005) “Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of

- sweet taste.," *Nature*, 438(7070), pp. 1022–5. doi: 10.1038/nature04248.
- Tallini, Y. N. *et al.* (2006) "BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons," *Physiological Genomics*, 27(3), pp. 391–397. doi: 10.1152/physiolgenomics.00092.2006.
- Taruno, A. *et al.* (2013) "CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes," *Nature*, 495(7440), pp. 223–226. doi: 10.1038/nature11906.
- Tizzano, M. *et al.* (2010) "Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), pp. 3210–3215. doi: 10.1073/pnas.0911934107.
- Tizzano, M. and Finger, T. E. (2013) "Chemosensors in the Nose: Guardians of the Airways," *Physiology*, 28(1), pp. 51–60. doi: 10.1152/physiol.00035.2012.
- Zhang, Z. *et al.* (2007) "The Transduction Channel TRPM5 Is Gated by Intracellular Calcium in Taste Cells," *Journal of Neuroscience*, 27(21), pp. 5777–5786. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4973-06.2007.

## 謝辞

本研究に取り組むにあたり、自由な研究の場を与えてくださり、ご指導頂いた指導教官の廣田順二先生に心より感謝を申し上げます。Skn-1a 機能欠損型マウスや、RNA プローブを提供していただいた、モネル化学感覚研究所の松本一朗先生ならびに應本真先生に深く感謝致します。ChAT-eGFP マウスを用いて嗅上皮表層側における細胞核密度を測定していただいたメリーランド大学の Weihong Lin 先生に感謝致します。6年間の楽しい研究生活を共にした廣田研究室の皆様に感謝いたします。特に、博士課程の先輩として様々な実験を教えてくださった榎本孝幸博士、岩田哲郎博士、西口優吾博士に感謝いたします。