

〔研究ノート〕

健常者と味覚異常者における 味覚受容体発現

森 明子・山田 直子・吉田 知加子・高尾 恭一・
小池 文彦・風間 宏美・須賀 比奈子・高尾 哲也

Gene Expression of Taste Receptor
in Normal Persons and Taste Disorder Persons

Akiko MORI, Naoko YAMADA, Chikako YOSHIDA, Kyoichi TAKAO,
Fumihiko KOIKE, Hiromi KAZAMA, Hinako SUGA and Tetsuya TAKAO

Tongue tissue from foliate papillae of 22 subjects was scraped and used. The expression of THTR family (THTRs) and T2R family (T2Rs) that are the candidate taste receptors were measured by RT-PCR and micro-capillary electrophoresis. The expression of taste receptors in the foliate papillae was measured using this scraping RT-PCR method. Normal persons over 40 years old expressed many THTRs and T2Rs. In contrast, for people under 30 years old there were some THTRs and T2Rs expressions without typical patterns. The taste disordered persons expressed few kinds of THTRs and T2Rs, and there were no or almost no expressions.

These results suggested that in young adults of about 20 years old the taste receptors are not yet developed. We suggest that expression of taste receptors don't decrease in a person of advanced years because taste receptors development peaks in late middle age.

With further assay and analyzation of expression of THTRs and T2Rs, it maybe possible to clear up factors of disturbance in taste.

Key words: taste receptor (味覚受容体), RT-PCR (RT-PCR法), taste disorder (味覚異常)

実験目的

生物は甘味, 苦味, 塩味, 酸味, 旨味の五味¹⁻⁴⁾を基本とする味覚を通じて, 糖などのエネルギー源やミネラルを摂取してきた。味の感知は, 味蕾組織に存在する味細胞により行われ, 味蕾組織基底部の神経により脳に伝達されていると考えられている。ヒトの場合, 味蕾は舌の糸状乳頭を除く, 茸状乳頭, 有郭乳頭, 葉状乳頭の上皮内に2/3が存在し, そのほか軟口蓋, 咽頭, 咽頭蓋の上皮内に分布しているとされている⁵⁾。また老齢期には味蕾の数が減少し, 味覚の機能, 味の感受性が低下するといわれている⁶⁾。一方, 味蕾の数は老人になっても有意

に減少することなく⁷⁾, 加齢に伴う疾病や入れ歯との関係が深いという報告もある⁸⁻¹⁰⁾。さらに一般成人健常者の茸状乳頭では約60%の人が味蕾を消失しており, また味蕾の存在しない舌粘膜部でも味を感知することが知られている¹¹⁾。このようなことから, 味覚には味蕾だけでなく舌上皮表層部に存在する受容体が深く関与していると考えられる。また, 近年では味覚異常の発生率が増加の傾向にあり, 味覚の減退または消失を訴える例が最も多い。各年代別の味覚障害の発生頻度を人口構成比でみると, 男女とも加齢とともに増加している¹²⁾。味覚障害は高齢者に生じやすいので, 日本社会の急速な高齢化によるものと考えられる¹²⁾。

味覚の状態や変容を被験者の感覚に依存せず、定性的・定量的な判断が可能であれば、味覚異常の診断が容易になるとともに、味覚の形成過程を検討することが可能となり、味覚異常治療薬の開発、呈味改善食の開発などの強力な指標となる。このことは高齢化や疾病による投薬などにより味覚異常を呈した人々のQOLの向上につながるとともに、味覚と食生活や社会的な関係を明らかにすることも可能であろう。

そこで本研究では味覚受容体の口腔内での発現とその分布を明らかにするため、ヒト舌組織を取得後、総RNAを採取し、さらに逆転写によりcDNAを作製した。味覚受容体候補であるTHTRsおよびT2Rsを遺伝子プライマーとしPCR法により遺伝子発現量を測定した。そしてヒトの舌で味覚受容体が健常者と味覚異常者では発現にどのような差があるかを検討した。

実験方法

1. 被験者

本研究では昭和女子大学において募集に応じた者、および日本大学板橋病院に味覚異常を訴えて来院した者を被験者とした。また本研究を行うにあたり、昭和女子大学および日本大学の倫理委員会に研究実施要項を提出し許可を得た。

2. 舌組織の擦過法による取得

被験者の葉状乳頭部をプラスチック製器具を用いて2-3回擦過し、舌表層部の組織を取得した。取得した組織は直ちにTrizol Reagent 0.5mlを加え攪拌した。直ちに使用しない場合は-80℃で保存し、解凍後実験に供した。

3. 味覚受容体発現量の測定

a. 逆転写

擦過法により取得した組織を含むTrizol Reagentにクロロホルム100 μ lを加えよく攪拌し室温で2~3分間静置した後10,000Gで15分間4℃にて遠心分離を行った。得られた上清にイソプロパノール250 μ lを加えて5~10分間室温で静置した後

10,000Gで10分間4℃にて遠心分離し総RNAを沈殿物として取得した。これをさらにエタノールで洗浄した後RNase free water 10 μ lを加えRNAを溶解した。このうち1.0 μ lを分取して50倍希釈後、分光光度計により260nmの吸光度を測定した。この測定値から1.0 μ lあたりのRNA量を $10D_{260} = 40\mu\text{g/mlRNA}$ という方法で算出した。逆転写は1.0 μ gを含む総RNA溶液をTemplate RNAとし、2.5mM dNTP Mixture 4.0 μ l, 250ng/ μ lのRandom Primer 1.0 μ l, RNase free waterを加え総量を13 μ lとした。これを65℃で5分間恒温処理し、0℃で1分間静置した。続いて5×First-strand Buffer RT(250mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂) 4.0 μ l, 40U/ μ lRNase阻害剤(RNase OUT) 1.0 μ l, 0.1M DTT1.0 μ l, 200U/1 μ lの逆転写酵素(Superscript III) 1.0 μ lを添加し、25℃で5分間、次いで50℃で60分間、さらに70℃で15分間恒温処理しcDNAを合成した。合成後2U/ μ lのRNase H 1.0 μ lを加え、37℃で20分間恒温処理しRNAを分解しcDNAを取得した。取得したcDNAは直ちにPCRを行うか、直ちに使用しない場合は-20℃で保存し、解凍後実験に供した。

b. PCR および測定

逆転写により取得したcDNAをテンプレートとし、味覚受容体候補であるTHTR1,2,3,4,5,6,7,9,11,12,14 (THTRs)¹³⁾, T2R1,3,4,5,7,8,9,10,13,14,16 (T2Rs)¹⁴⁾ および β -アクチンをプライマーとして、PCRを行った。まず20pMのTHTRsまたはT2Rsのプライマー1.0 μ lそれぞれに、PCR用water (Invitrogen社) 18.4 μ l, 20mM10×Ex Taq Buffer 2.5 μ l, 2.5mM dNTP Mixture 2.0 μ l, 5U/ μ lのTaqポリメラーゼ (Ex-Taq) 0.125 μ l, 試料のcDNA 0.8 μ lを添加した。PCRの条件はまず94℃で5分間加熱し、その後94℃で60秒間熱変性させ、次に57℃で30秒間プライマーのアニーリングを行い、最後に72℃で60秒間ポリメラーゼによる相補鎖を合成させるという過程を1サイクルとし、それを35サイクル行った。さらに72℃で7分間反応させた。PCR法による増幅産物はマイクロキャピラリー電気泳動 (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent Technologies社) により分子量および蛍光強度を測

定した。発現率はRT-PCR法により検出された〈受容体数/総試験受容体数〉で算出した。

結果および考察

本実験で使用したプライマーは、THTRs および T2Rs では複製する cDNA の分子量が約1,000bp になるように設計されたものである。そのため、1,000bp 付近にバンドが現れている場合、目的とする受容体は発現していると確認することができる。バンドの色の濃淡は発現量を示している。

10歳未満の被験者 (n=2) では THTRs は11種類の受容体のうち平均で40.9%, T2Rs は11種類の受容体のうち平均45.5%の受容体の発現を認めた (表1, 2)。20代の被験者 (n=11) では THTRs は11種類の受容体のうち平均27.3%, T2Rs は11種類の受容体のうち平均38.8%で発現が認められた (表1, 2)。40代 (n=8) では THTRs は11種類の受容体のうち平均で64.8%, T2Rs は11種類の受容体のうち平均で72.7%と多数を発現していることが認められた (図1)。とくにTHTR2,3, T2R7,8, 9,10の受容体では被験者の100%, またTHTR11, T2R3,16では被験者の87.5%と多くの受容体が発現していた (表1, 2)。70歳代の高齢者 (n=1) では40歳代と同じように多種の受容体が発現していた (表1, 2)。20歳代と比べて10歳未満の方が THTRs および T2Rs の発現率が高かったのは被験者数が少なかったためと考えられる。また THTR2 の受容体においては10歳未満では被験者の100%, 20歳代では被験者の72.7%と発現率は高かったものの、その他の受容体では類似性は低く、傾向を見出すことはできなかった。40歳代被験者の THTRs, T2Rs は、10歳未満と20歳代よりも数多く発現し、70歳代の高齢になってもその発現性は大きく変化していなかった (図1)。以上のようなことから、味覚受容体の存在および発現量は、成長とともに増加し、高齢者になっても失われない可能性が示唆された。

薬服用者の例を図2および表3, 4に示した。被験者は47歳男性と55歳女性であり、THTRs は45.5%, T2Rs では18.2%と、40歳代の健常者と比べると明

らかに発現率が減少していた。

味覚異常の高齢者の例を図3, 表3に示した。被験者は64歳と73歳の女性であり、高齢の味覚異常者では、THTRs は11種類の受容体のうち40.9%しか発現しておらず、T2Rs は11種類の受容体のうち発現しているのは0.0%であった (表3, 4および図3)。薬服用者や高齢の味覚異常者においては、健常者に比べて THTRs, T2Rs とともに発現していない受容体が多かった。高齢者の味覚機能の低下は唾液量の低下などの口腔内環境の変化¹⁵⁾、食生活の偏りによっても引き起こされるといわれている。さらに味覚障害の基本的な背景には必須微量元素のひとつである亜鉛の欠乏が関係しているといわれている¹⁶⁾。ただ特殊な食生活でなく普通に食事を摂る場合は、亜鉛が体内に欠乏することはほとんどないとされている。薬剤味覚障害者は亜鉛を細胞に取り込むとき、薬剤に含まれる化合物が作用するため、亜鉛キレート化合物を形成し、亜鉛を吸収できなくなるともいわれている。亜鉛キレート化合物は五員環、六員環をつくと安定である。ドナー原子としては酸素、窒素、硫黄が重要であり、水酸化物イオン、硫化水素イオン、チオシアンイオンなどが2座以上ある薬剤は亜鉛をキレートする可能性がある。配位基としては特にチオール基、カルボキシル基、アミノ基を持っていて五員環、六員環キレートをつくる構造を持っている薬剤が亜鉛キレート化合物をつくりやすい¹⁷⁾。一部の降圧剤や利尿剤、さらに抗うつ剤に含まれるキレーターが亜鉛に作用し、味覚障害を引き起こすことが知られている¹⁷⁾。また全身性疾患に味覚障害が伴う場合 (肝臓障害や腎臓障害など) は亜鉛代謝異常によるものと考えられている¹⁶⁾。そのため亜鉛の投与が行われているが、回復するのは30%程度と報告されている¹⁸⁾。このため亜鉛投与で回復しない味覚異常には味覚受容体が大きく関与しているのではないかと考えられる。

以上のことから、青年期では味覚受容体がまだ成長段階にあり、20歳の成人になっても味覚の成長は十分ではないことが考えられた。壮年期になると味覚受容体が十分発達し、高齢者になってもその味覚受容体の発現数は減少しない可能性が示唆された。

表1 健常者における THTRs 受容体の発現率

| 年齢層(歳) | 被験者数 | THTRs | | | | | | | | | | | 発現率(%) |
|--------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 12 | 14 | |
| 0-9 | 2 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 50.0 | 0.0 | 40.9 |
| 20-29 | 11 | 18.2 | 72.3 | 27.3 | 27.3 | 36.4 | 27.3 | 9.1 | 9.1 | 54.5 | 9.1 | 9.1 | 27.3 |
| 40-49 | 8 | 50.0 | 100.0 | 100.0 | 62.5 | 62.5 | 75.0 | 12.5 | 37.5 | 87.5 | 62.5 | 62.5 | 64.8 |
| 70- | 1 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 72.7 |

表2 健常者における T2Rs 受容体の発現率

| 年齢層(歳) | 被験者数 | T2Rs | | | | | | | | | | | 発現率(%) |
|--------|------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | | 1 | 3 | 4 | 5 | 7 | 8 | 9 | 10 | 13 | 14 | 16 | |
| 0-9 | 2 | 50.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 50.0 | 100.0 | 50.0 | 100.0 | 0.0 | 50.0 | 45.5 |
| 20-29 | 11 | 36.4 | 54.5 | 0.0 | 27.3 | 63.6 | 81.8 | 72.7 | 63.6 | 18.2 | 9.1 | 36.4 | 38.8 |
| 40-49 | 8 | 50.0 | 87.5 | 25.0 | 62.5 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 75.0 | 12.5 | 87.5 | 72.7 |
| 70- | 1 | 100.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 72.7 |

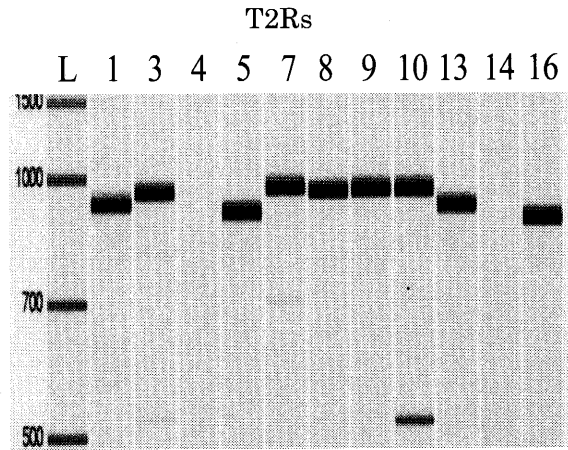
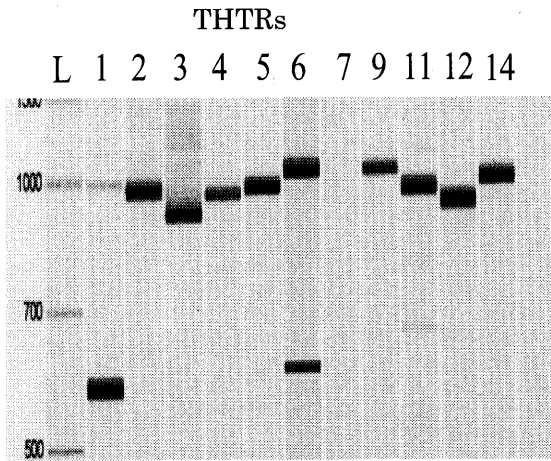
表3 薬服用者および味覚異常者における THTRs 受容体の発現率

| 状態 | 被験者数 | THTRs | | | | | | | | | | | 発現率(%) |
|-------|------|-------|-------|-------|-----|-------|------|-----|-----|-------|-----|-----|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 12 | 14 | |
| 薬服用者 | 2 | 50.0 | 50.0 | 100.0 | 0.0 | 50.0 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 45.5 |
| 味覚異常者 | 2 | 50.0 | 100.0 | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 40.9 |

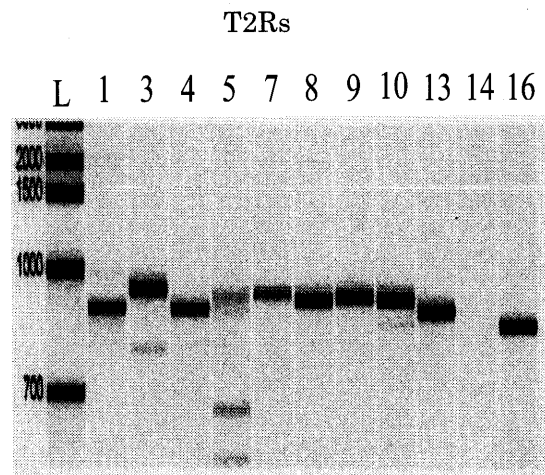
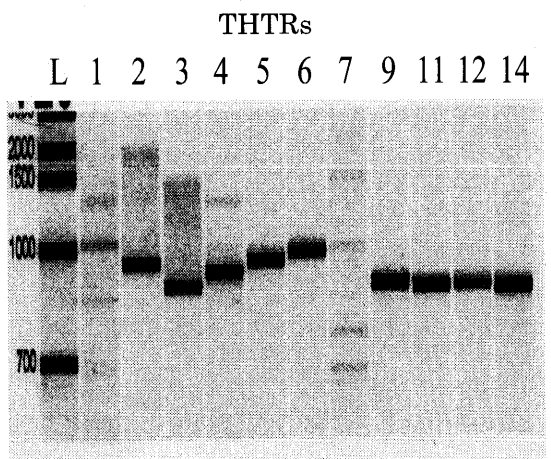
表4 薬服用者および味覚異常者における T2Rs 受容体の発現率

| 状態 | 被験者数 | T2Rs | | | | | | | | | | | 発現率(%) |
|-------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|--------|
| | | 1 | 3 | 4 | 5 | 7 | 8 | 9 | 10 | 13 | 14 | 16 | |
| 薬服用者 | 2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 18.2 |
| 味覚異常者 | 2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

○ 43 歳男性



○ 42 歳男性



○ 73 歳男性

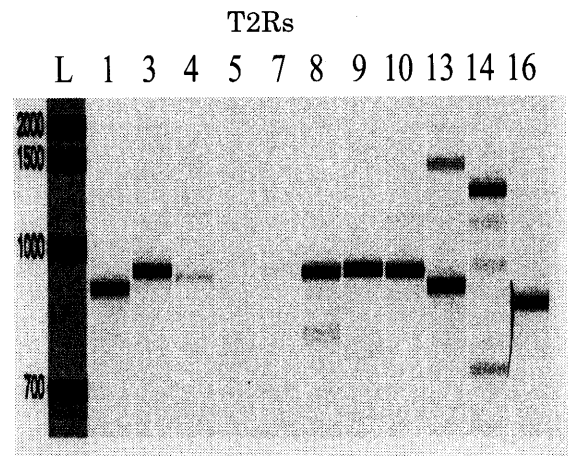
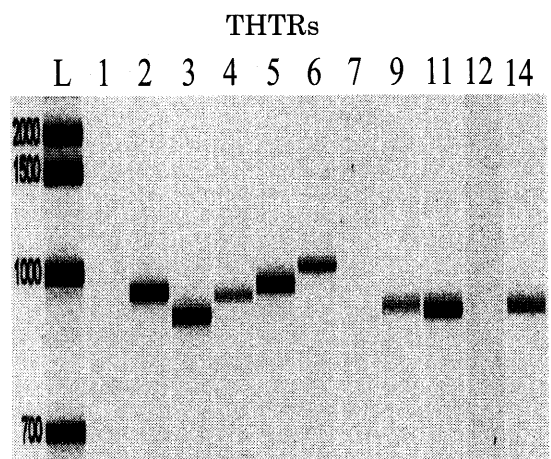


図1 擦過法により取得した健常者の舌組織における THTRs および T2Rs の発現例

○ 55歳女性（薬服用者）

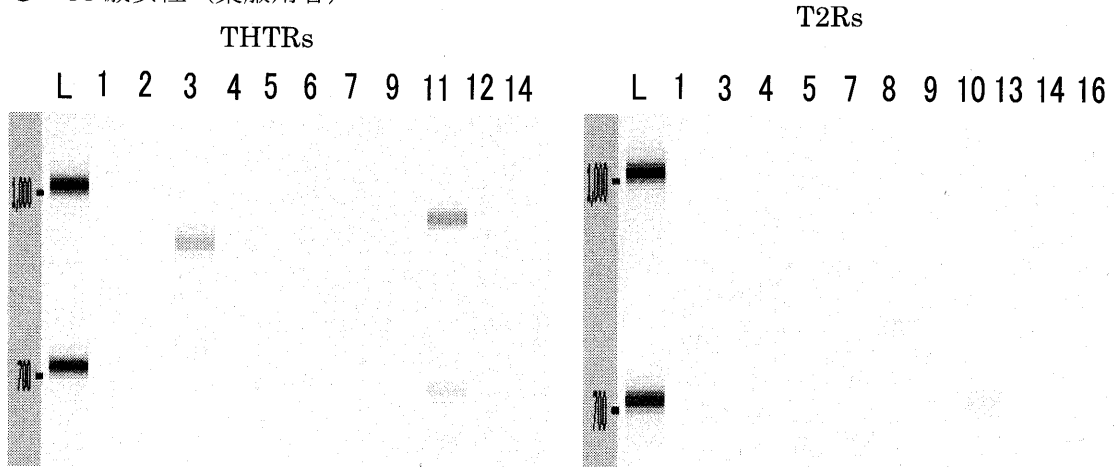
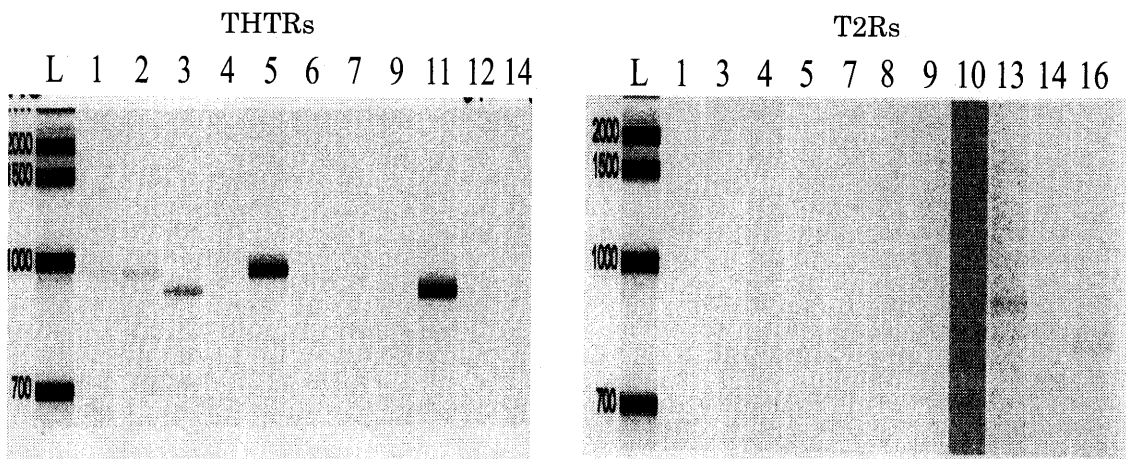


図2 擦過法により取得した薬服用者の舌組織における THTRs および T2Rs の発現例

○ 64歳女性（味覚異常者）



○ 73歳女性（味覚異常者）

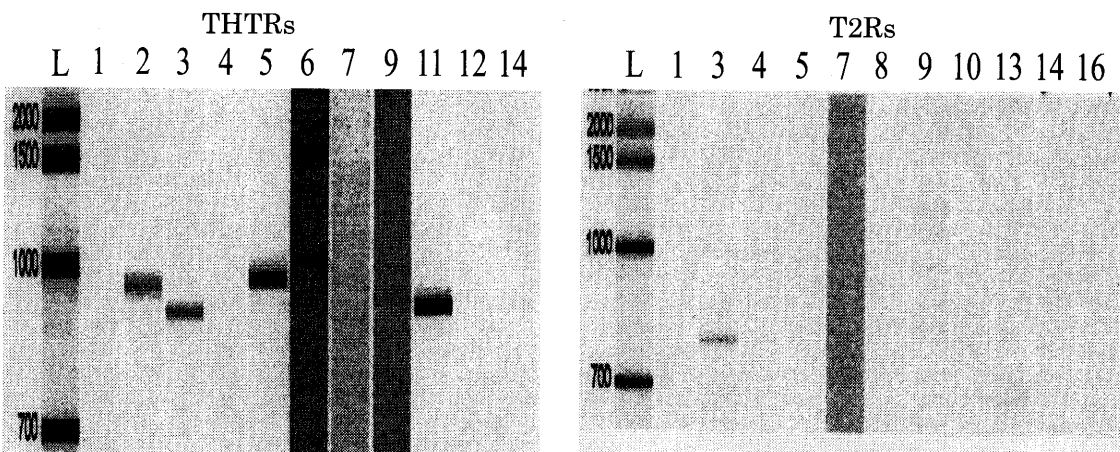


図3 擦過法により取得した味覚異常者の舌組織における THTRs および T2Rs の発現例

しかし薬を服用していたり味覚異常を引き起こしている場合は、味覚受容体にも何らかの異常が生じている可能性が示唆された。

今後さらに年齢・地域・食経験による THTRs および T2Rs の発現の状態を測定、解析することにより、味覚の形成過程の解析や味覚異常の原因を明らかにできるのではないかと考えられる。

要 約

RT-PCR 法を用いて、葉状乳頭における味覚受容体の発現を検討した。すなわち葉状乳頭部から擦過法により取得した組織を使用し、味覚受容体候補である THTR ファミリー (THTRs) および T2R ファミリー (T2Rs) の発現を RT-PCR 後、マイクロキャピラリー電気泳動により測定した。40歳以上の健常者では THTRs, T2Rs の受容体において、多数を発現していることが認められた。これに対し30歳以下の被験者ではいくつかの THTRs および T2Rs で発現を認めたが、典型的な発現パターンはなかった。さらに薬服用者や高齢の味覚異常者においては、健常者に比べて THTRs, T2Rs とともに発現していない受容体が多かった。

これらのことから、まず青年期では味覚受容体が成長段階にあり、20歳の成人になっても味覚の成長は十分ではないことが考えられた。壮年期になると味覚受容体が十分発達し、高齢者になってもその味覚受容体の発現数は減少しないことが示唆された。また薬剤の服用者や味覚異常者も、味覚受容体の欠落の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり舌組織を提供していただいた東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科、ホリスティックセラピストスクール、昭和女子大学生活科学部生活科学科、昭和女子大学短期大学部食物科学科の方々に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) B. Lindemann: *Physiological Rev.*, **76**, 718, 1996
- 2) R. E. Stewart, J. A. Desimone and D. L. Hill: *Am. J. Physiol.*, **272**, 1, 1997
- 3) B. Lindemann: *Nature Neurosci.*, **3**, 99, 2000
- 4) M. S. Herness and T. A. Gilbertson: *Annu. Rev. Physiol.*, **61**, 873, 1999
- 5) 佐藤昌康, 小川尚: 味覚の科学, p.91, 朝倉書店, 1997
- 6) Mistretta, C. M.: *J. Gerodontology*, **3**, 131-136, 1984
- 7) Miller, I. J. Jr.: *J. Gerontology*, **43**, 26-30, 1988
- 8) Bartoshuk, L. M., and Ann, N. Y.: *Acad. Sci.*, **561**, 87-93, 1989
- 9) Weiffenbach, J. M., Baum, B. J. and Burghauer, R.: *J. Gerontology*, **37**, 372-377, 1982
- 10) 小谷暢子ら: 日本味と匂学会第37回大会プログラム・予稿集, 90, 2003
- 11) 藤田恒太郎: 人体解剖学, 改訂41版, p.194, 南江堂, 1993
- 12) 佐藤昌康, 小川尚: 味覚の科学, p.228, 229, 朝倉書店, 1997
- 13) Takeda, S., et al.: *FEBS Letters*, **520**, 97-101, 2002
- 14) E. Adler, et al.: *Cell*, **100**, 693-702, 2000
- 15) 佐藤昌康, 小川尚: 味覚の科学, p.60, 朝倉書店, 1997
- 16) <http://homepage1.nifty.com/jibiaka50/mikakusyogaipamento.htm>, 2005年9月3日アクセス
- 17) 佐藤昌康, 小川尚: 味覚の科学, pp.237-239, 朝倉書店, 1997
- 18) 都甲潔: 味覚を科学する, p.63, 角川書店, 2002

(もり あきこ 生活機構研究科生活科学研究専攻2年)
(やまだ なおこ 平成16年度生活科学科卒業生)
(よしだ ちかこ 平成16年度生活科学科卒業生)
(たかお きょういち 日本大学医学部)
(こいけ ふみひこ 日本大学医学部)
(かざま ひろみ 日本大学医学部)
(すが ひなこ テキサスサウスウエストメディカル大学)
(たかお てつや 生活機構研究科)