

齧歯類の舌組織における味蕾の分布及び 部位別の味細胞の増殖能

- HE 染色標本と PCR 法および免疫組織化学的解析を用いた検討 -

花村衣咲・城内文吾・柴崎貢志・大澤得二

Morphological and proliferative characteristics of rodent taste cells in
different tongue regions

Isaki HANAMURA,
Bungo SHIROUCHI, Koji SHIBASAKI, Tokuji OSAWA

要 約

味覚は五感の中でも、味の認識、つまり劇毒物の侵入を排除するために必須の機構である。また、自身の嗜好に応じて、美味しいものを効率的に摂取するためにも重要な感覚機構である。味覚感知の閾値は舌の部位ごとに異なる可能性が高いが、その分子基盤は明らかではない。そこで本研究では、味蕾分布を部位ごとに評価した。ラット舌組織の HE 染色により、有郭乳頭周边上皮の凹入は浅く、有郭乳頭側面の上皮内に数個の味蕾が分布していた。葉状乳頭では、舌側面に多数みられ、葉状乳頭の上皮内に多数の味蕾が分布していた。茸状乳頭は、舌背に一様に分布しており、味蕾は各茸状乳頭の上面に単一で存在していた。これらが舌の部位ごとに味覚の感知能力に違いをもたらしている可能性は大いに高いと考えられる。また、マウス舌組織の凍結切片を用いた免疫組織化学的解析より、味蕾内に増殖マーカーである Ki67 陽性細胞が多数存在することを観察した。このため、舌の部位ごとに味細胞の増殖能が異なり、味蕾内の味細胞の構成が日々ダイナミックに変動する可能性がある。これらも舌の部位ごとに味覚の感知能力を変化させる一因となっている可能性がある。

キーワード：味覚、味細胞、味蕾、増殖、免疫組織化学

Abstract

Taste sensation is necessary to avoid the invasion of harmful food into our body, and useful for the selection of food intake depending on the requirement. It is expected that the ability of taste sensation is different among the regions in tongue, however, the molecular mechanisms have not been determined yet. In this study, we evaluated the distribution of taste buds in rat tongue. Circumferential papilla has a few of taste buds in lateral side of epithelium. Leaf papilla has large number of taste buds in the epithelium. Mushroom papilla has the single taste buds in upper side. The distribution of taste buds is quite different depending on the tongue regions. We also analyzed the proliferative properties of taste cells in mouse freezing tongue sections by an immunohistochemical method. Many of Ki67-positive proliferating cells are observed in the taste buds. These results indicate that the composition of taste cells in the taste buds are dynamically changed by the time point. Thus, these might contribute to the sensitivities of taste sensation.

Key words: taste, taste cell, taste buds, proliferation, immunohistochemistry

緒言

味細胞は、電子顕微鏡による形態的特徴から I 型、II 型、III 型、IV 型に分類されている¹⁻²⁾。I 型から IV 型のうち、主に II 型味細胞と III 型味細胞が味覚の神経伝達に関与していると考えられている。なぜなら、この 2 種の味細胞にはシナプスに類似した構造が味細胞と鼓索神経の間に形成されているからである。II 型味細胞上には T1R2/T1R3、T1R1/T1R3、T2RS ファミリー (G タンパク質共役型の 7 回膜貫通型) が存在する³⁻⁴⁾。そして、それぞれ甘味・旨味・苦味物質と結合する。すると、II 型味細胞からは伝達物質として ATP が遊離する⁵⁾。これを三叉神経が受け取り、その情報が脳へ伝達されることで味感覚が感知される。また、III 型味細胞では、ENaC、Otop1 (イオンチャネル) の存在が明らかとなっており、それぞれ塩味・酸味を捉え、シナプスを介してセロトニン・ノルアドレナリンによって味神経に伝達している⁶⁻⁹⁾。このようにヒトでは、味物質を味細胞で受容し、脳へ情報伝達することによって味を認識している。

味の認識に関しては、ヒトの舌組織は部位別に感知する味が異なるといういわゆる味覚地図の概念が存在するが、近年ではこの味覚地図に関する概念は否定的であるとの対抗研究結果が報告されている¹⁰⁾。しかしながら、味覚の感知能力には舌の部位ごとに差がみられる可能性は高く¹¹⁻¹²⁾、それがどのような分子基盤に基づくのかが明らかにされていない。そこで本研究では、ラットの舌組織における味蕾分布を部位ごとに評価した。また、将来、遺伝子欠損マウスを用いた解析を行うことを考慮し、マウスの舌を用いて、味蕾内における味細胞の増殖能についても検証した。

材料と方法

1. 形態学的観察

1-1. 実験動物および舌の摘出

本研究では、7 週齢雄性 SD (Sprague Dawley) 系ラット (日本クレア株式会社)、あるいは、8 週齢雄性 C57/BL6J マウスを使用した。実験動物は、イソフルランによる麻酔後に解剖し、舌を Fig.1-a の手順で摘出し、生理食塩水で洗浄後、直ちに凍結して分析に供するまで -80℃

で保存した。ラット舌組織の部位別による味覚受容体の発現量の差を検討するため、凍結ブロックから①舌尖部、②舌中部、③葉状乳頭部位、④有郭乳頭周辺部位の計 4 か所を各 0.1 g ずつ採取した (Fig.1-b)。動物実験は長崎県立大学動物実験委員会による動物実験計画書の審査を経て、長崎県立大学学長の承認を得て実施した (承認番号: R03-12)。

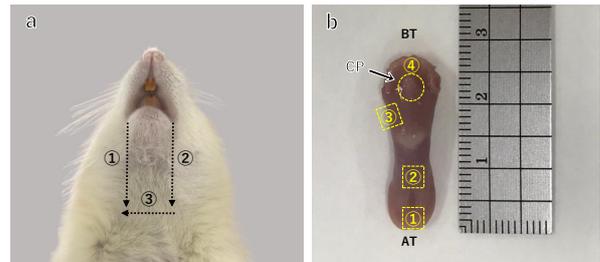


Fig. 1 ラット舌の摘出方法 (a) および摘出後の舌 (b)

a ラットの口腔を①から③の順序にて開口し、舌小帯を切開後に舌根部を切断して摘出した。b 摘出直後の舌は○の部位にて有郭乳頭 (circumferential papilla: CP) が観察される。下方が舌尖 (apical consonant: AT), 上方が舌根 (base of tongue: BT) を示している。なお、Total RNA 抽出では各黄色の枠内の①舌尖部、②舌中部、③葉状乳頭部位、④有郭乳頭周辺部位を採取した。

1-2. パラフィン切片の作製

ラットの舌組織を摘出後、10% ホルマリン溶液にて固定した。その後、以下の手順を実施した。

1) 脱水処理

70%、80%、90%、95%、100% の各アルコール (I)、100% アルコール (II)、キシロアルコール、キシロール (I)、キシロール (II) キシロパラフィン、パラフィン (I) (Leica Paraplast Plus)、パラフィン (II) の順で各溶液に 6 時間間隔で脱水処理を行った。なお、キシロパラフィンおよびパラフィンでの脱水処理は、48℃ に設定したインキュベーター UI-50 (株式会社アズワン) 内で実施した。

2) パラフィン包埋・切片作製

Thermo Scientific ヒトスター TM にてパラフィンを 64℃ で溶解し包埋した。冷却後のパラフィンブロックをマイクロトーム HM 400R (株式会社カールツァイス) にて 10 μm で縦断および横断の方向で裁断して切片を作製し (Fig.2)、蒸留水を滴下したスライドガラスに貼付し、43 ~ 45℃ に設定したパラフィン伸展機にて伸展した。

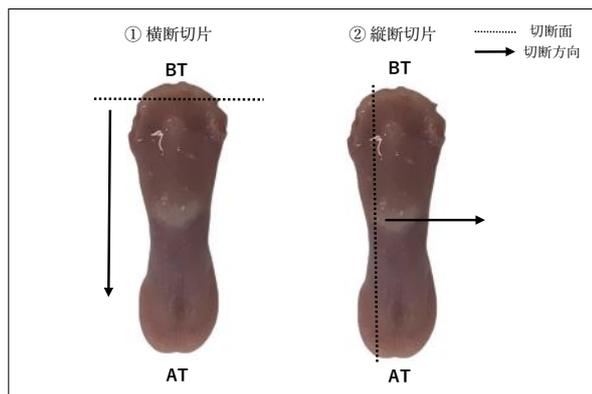


Fig. 2 ラット舌のパラフィン切片作製

摘出した舌の全体像。左が横断、右が縦断切片の裁断方向を示す。下方が舌尖 (Apical conus: AT), 上方が舌根 (Base of Tongue: BT) である。舌後方には直径 2mm 程度の有郭乳頭がみられる。

1-3. HE 染色

Hematoxylin Eosin 染色 (HE 染色) は以下の手順にて実施した。キシロール (10 min) → キシレン (10 min) → 100% エタノール (10 min) → 90% エタノール (10 min) → 70% エタノール (10 min) → 50% エタノール (10 min) → ヘマトキシリン染色液 (30 min) → 蒸留水 (2 min) → エオジン染色液 (20 min) → 蒸留水 (30 sec) → 70% エタノール (1 min) → 95% エタノール (1 min) → 100% エタノール (I) (2 min) → 100% エタノール (II) (2 min) → キシレン (I) (3 min) → キシレン (II) (3 min) とした。

以上の作業後、封入剤にてマイクロカバークラスを接着し、364 枚の横断切片、123 枚の縦断切片を作製した。

1-4. HE 染色標本の形態学的観察

味蕾の観察には、倒立顕微鏡 (EVOS) を用い、 $\times 10$ または $\times 20$ の対物レンズにて観察および記録を行った。

2. 味覚受容体発現の部位別比較

2-1. ラット舌組織からの Total RNA 抽出、cDNA の合成

各舌組織 0.1 g に 1 mL の RNAzol[®] RT Reagent (Molecular Research Center, Inc.) を加えてホモジナイズし、Total RNA を抽出した。その過程で 4-Bromoanisole (Molecular Research Center, Inc.) 処理を加えることで、ゲノム DNA、タンパク質および多糖類の持ち込みを極力抑制した。抽出した Total RNA は

DEPC water (株式会社ニッポンジーン) に溶解させ、微量分光光度計 NanoVue (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて濃度を測定した。濃度測定の結果をもとに DEPC water を添加し、一定濃度に調整した。濃度調整をした溶液中の mRNA を鋳型とし、完全プレミックス試薬である PrimeScript[™] RT master Mix (タカラバイオ株式会社) を混合し、サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700) を用いて以下の条件で逆転写反応を行った。

37°C, 15 min (逆転写反応)

85°C, 5 sec (逆転写酵素の熱失活)

4°C, ∞

2-2. ラット舌組織における味覚受容体の mRNA 発現量解析

ラットの各種味覚受容体 (Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3, Pkd21l, Scnn1a, Tas2r144, Tas2r107) の mRNA 発現量測定にあたり、プライマーの配列情報を調べたところ、Tas1r1 のみ配列情報を先行研究より取得できた¹³⁾。その他については、NCBI データベースに登録されている配列情報をもとにした Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いてターゲット遺伝子に特異的なプライマーを設計し (Tas2r144 および Tas2r107 については Exon-Exon ジャンクションがなく、ジャンクション上に設計ができなかった)、株式会社ファスマックに合成を依頼した。各種味覚受容体を Table 1 に示す。mRNA 発現量の解析は、THUNDERBIRD[®] SYBR[®] qPCR Mix (東洋紡株式会社) を用い、分析装置は LightCycler[®] 96 (日本ジェネティクス株式会社) を使用した。mRNA 発現量は $\Delta\Delta$ Ct 法¹⁴⁾ を用い、 β -actin (遺伝子名 Actb) の発現量にて標準化することにした。

3. マウスの味細胞増殖能に関する比較

中性ホルマリン溶液を用いて、灌流固定し、その後、舌組織を摘出した。摘出した舌組織は、4°C にて 10% ホルマリン溶液にて 1 晩浸漬後に固定した。これを PBS で洗浄した後、25% スクロース / PBS 液で置換し、OTC コンパウンドに封入後、 -80°C で急速凍結した。この凍結サンプルからクライオスタット (ライカ CM3050S) にて、14 μm 厚の凍結切片を作製し、以下の実

Table 1. ラット味覚受容体およびハウスキーピング遺伝子のプライマー配列

Gene name	Symbol	Accession no.	Direction	Primer sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
β-Actin	<i>Actb</i>	NM_031144.3	Forward	TCAGGTCATCACTATCGGCA	93
			Reverse	TCATGGATGCCACAGGATTC	
Taste 1 receptor member 1	<i>Tas1r1</i>	NM_053305.1	Forward	TGGTGACTGTCTGCAGGTGAG	95
			Reverse	TGGCTTGAAGAGGTGGTAG	
Taste 1 receptor member 2	<i>Tas1r2</i>	NM_001271266.1	Forward	GTGCCCAAGTGCAATGAGTTC	82
			Reverse	TGATCTCCTCCACAGCGAAC	
Taste 1 receptor member 3	<i>Tas1r3</i>	NM_130818.1	Forward	TCTTCTCATGCCACAGGTCA	84
			Reverse	CTGTGCGGAAGAAGGATGGAA	
Polycystin 2 like 1, transient receptor potential cation channel	<i>Pkd2ll</i>	NM_001106352.1	Forward	TGAGGAAAGAGCGGGTTTCAG	106
			Reverse	ACTCTCTTGTGAGCTCCCTC	
Sodium channel epithelial 1 subunit alpha (also known as <i>ENaCa</i>)	<i>Scnn1a</i>	NM_031548.2	Forward	AGTGTGCGGAAGCCTTGTAGTG	91
			Reverse	TCGAAGATCCAATCTGGGAC	
Taste receptor, type 2, member 144 (also known as <i>Tas2r40</i>)	<i>Tas2r144</i>	NM_001025150.1	Forward	GACCAATGTACTCAACCTGGC	105
			Reverse	TGCCCTTGAGTGGAGGTGATG	
Taste receptor, type 2, member 107	<i>Tas2r107</i>	NM_023995.1	Forward	CCTGATTACTGCTTCTGTGTGA	97
			Reverse	AGCTTCTGTGTTGAGGTCCTCTG	

験に用いた。

凍結切片を 100℃ のクエン酸バッファーで 15 分処理した。そして、3% BSA/PBS でブロッキング処理を行った後、細胞増殖マーカーである Ki67 抗原を検出した。切片に 500 倍希釈した抗 Ki67 抗体 (マウス) を処理し、2 時間反応させた。余分な抗体を洗浄した後、切片に Alexa488 標識抗マウス IgG (1500 倍希釈) を処理し、1 時間反応させた。余分な抗体を洗浄した後、切片を封入し、正立顕微鏡 (オリンパス BX51) で観察し、冷却 CD カメラ (オリンパス DP80) で記録を行った。

結果

1. ラット舌組織の特徴

摘出したラットの舌は、前後長約 2.5 cm であった。舌の舌根部に接し直径約 2 mm の有郭乳頭が観察された (Fig.1-b)。

2. 味蕾の細胞の観察

各乳頭に分布する味蕾の形態的特徴を部位別に観察した (Fig.3-a)。有郭乳頭周辺上皮の凹入は浅く、有郭乳頭側面の上皮内に数個の味蕾が分布していた (Fig.3-b)。葉状乳頭では、舌側面に多数みられ、葉状乳頭の上皮内に多数の味蕾が分布していた (Fig.3-c)。また、葉状乳頭の重層扁平上皮は厚く、粘膜固有層との境界は深い入り組みをみせていたが、味蕾は存在しなかった。茸状乳頭は、舌背に一様に分布しており、味蕾は各茸状乳頭の上面に単一で存在していた

(Fig.3-d)。また、横断および縦断切片を作製したが、味蕾の分布を観察する上では、横断切片と比して縦断切片でより確認できた。

3. 部位別の味覚受容体発現量

ラット舌組織の 4 部位から total RNA を抽出、逆転写反応により cDNA を合成し、味覚受容体の *Tas1r1*, *Tas1r2* および *Tas1r3*、ハウスキーピング遺伝子として *Actb* についてリアルタイム PCR を行った。PCR の増幅効率 は 90 ~ 110% となる必要があり、この際の検量線の傾きは - 3.6

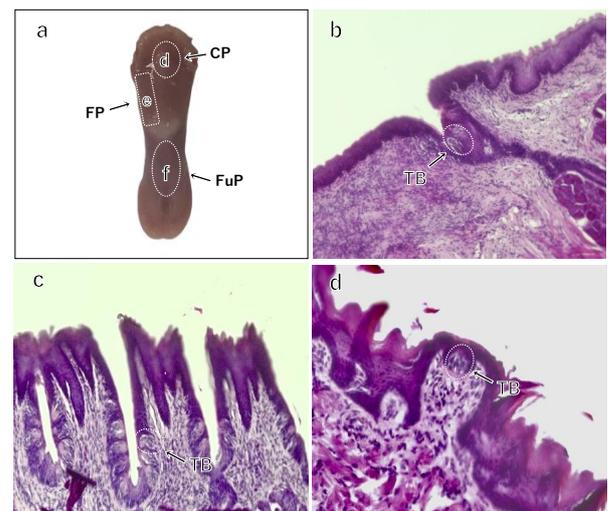


Fig. 3 ラット舌の部位別における味蕾の形態学的特徴

a ラット舌の味蕾を観察した乳頭部位 (有郭乳頭: circumferential papilla: CP, 葉状乳頭: foliate papilla: FP, 茸状乳頭: fungiform papillae: Fup) を示している。b 有郭乳頭の味蕾 (taste buds: TB) は、周辺部の上皮内に存在している。c 葉状乳頭では舌側面の上皮中に味蕾が分布している。d 舌背にみられる茸状乳頭では、味蕾が茸状乳頭の上面に存在している。

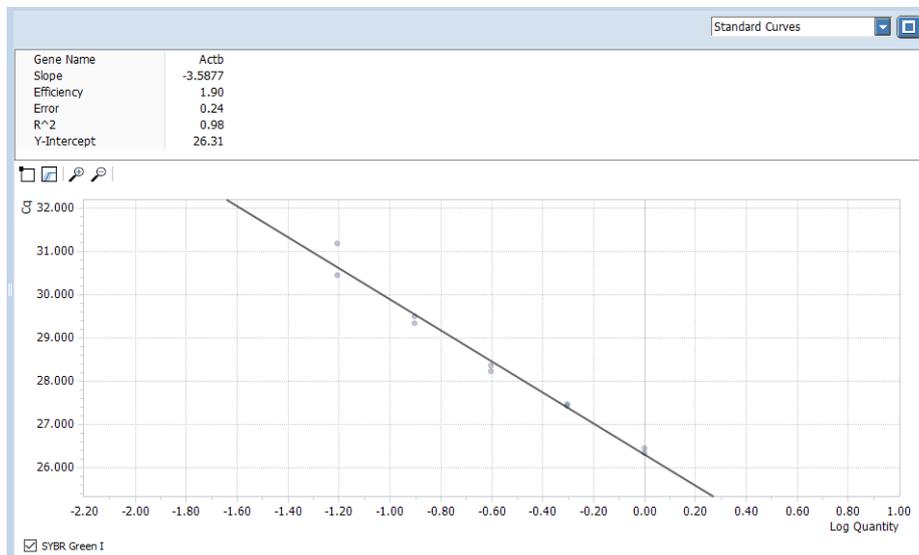
から-3.1の間をとるが、測定した3つの味覚受容体はいずれの検量線の傾きはその範囲内を取らず、検量線の直線性も低く ($R^2 = 0.80$)、増幅効率は不十分であった (Fig.4-a: *Tas1r1* mRNA 測定の結果のみ表示)。また、PCR産物が均一であれば、1種類の融解曲線 (単一ピーク) が確認されるが、測定した3つの味覚受容体の測定ではいずれも複数の融解曲線が認められ (Fig.4-b: *Tas1r1* mRNA 測定の結果のみ表示)、ターゲット以外の領域が増幅していることが示された。一方、ハウスキーピング遺伝子として同サンプル中の *Actb* mRNA の測定における検量線の傾

きは-3.5877、検量線の直線性は $R^2 = 0.98$ 、増幅効率は90% (Fig.5-a)、単一ピークの融解曲線 (Fig.5-b) を示し、前述した3つの味覚受容体よりは良好であった。

4. マウス舌組織を用いた舌の部位ごとの味細胞増殖能に関する比較

ここまでの解析は齧歯類の代表例としてラットを用いて行った。ラットは組織 (舌) が大きく、解析しやすいメリットがあるが、遺伝子欠損動物やトランスジェニック動物を用いる際に、リソース数が限られてしまい、非常に不利である。

(a) 本研究の味覚受容体測定に用いたサンプルでの *Actb* mRNA 測定の検量線



(b) 本研究の味覚受容体測定に用いたサンプルでの *Actb* mRNA 測定の融解曲線

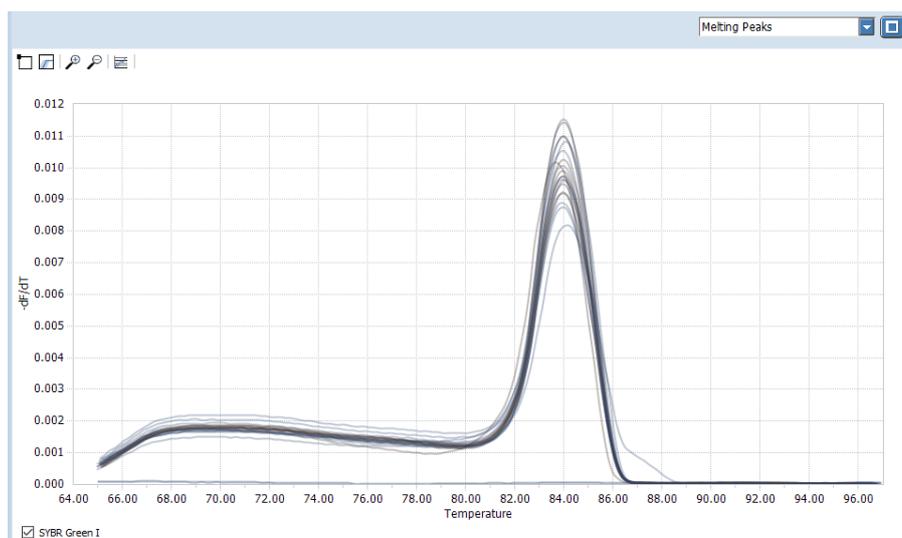
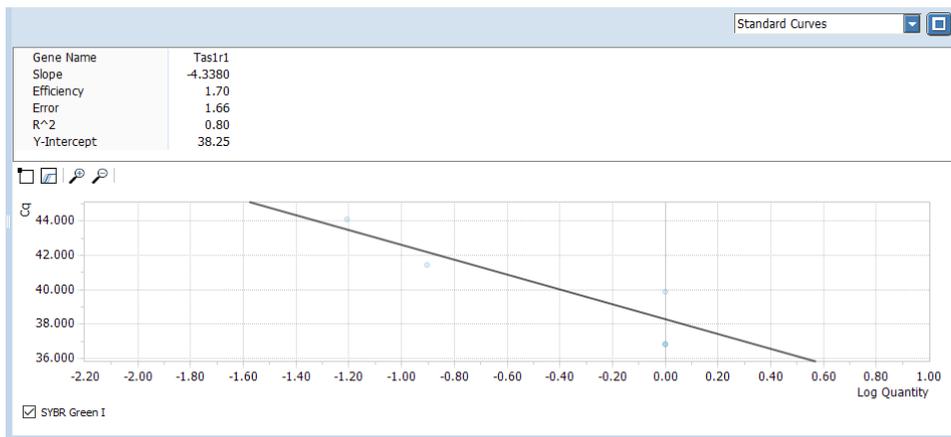


Fig. 5 ラット舌組織の *Tas1r1* 等の *Actb* mRNA 解析

- (a) 検量線の傾き (Slope) は-4.3380となり、PCRの増幅効率は70%程度と不十分であった。
 (b) 2つの融解曲線ピークが観察され、ターゲット以外の領域の増幅が疑われる結果となった。

(a) ラット舌組織の *Tas1r1* mRNA測定における検量線



(b) ラット舌組織の *Tas1r1* mRNA測定における融解曲線

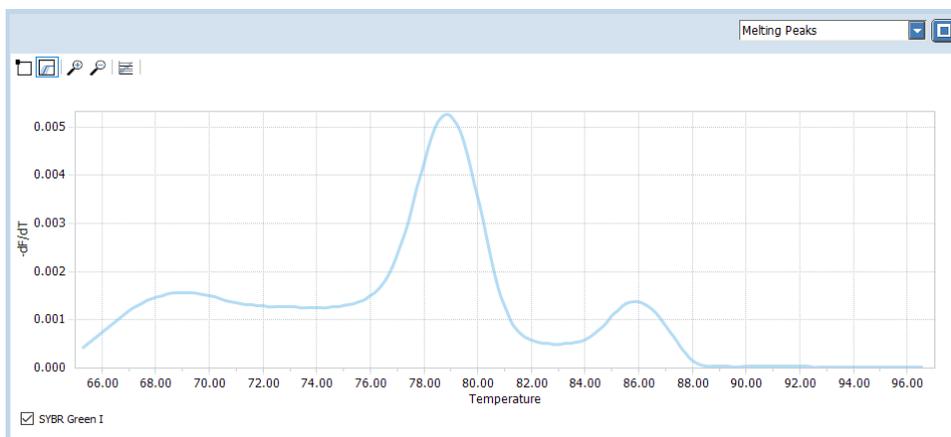


Fig. 4 ラット舌組織の *Tas1r1* mRNA解析

- (a) 検量線の傾き (Slope) は-4.3380となり、PCRの増幅効率は70%程度と不十分であった。
 (b) 2つの融解曲線ピークが観察され、ターゲット以外の領域の増幅が疑われる結果となった。

一方、マウスの場合、味覚に関与する味受容体やシナプス伝達に関与する遺伝子のほとんどについて、遺伝子欠損マウス、トランスジェニックマウスが作製されている。このため、分子生物学的・生理学的な解析をする場合には、マウスを用いた方が圧倒的にアドバンテージは大きい。

このため、これ以降の解析では、齧歯類の代表として、マウスを用いた。マウス舌(縦断)の凍結切片を用いて、増殖マーカーである Ki67 の免疫染色を行った。各領域の味蕾内の味細胞の中で、一部に Ki67 の発現を認めた。茸状乳頭では、表層に存在する味蕾内で、5 個の Ki67 陽性増殖細胞を観察した (Fig.6)。これらの結果より、味蕾内の味細胞のごく一部が増殖し、味細胞を再生していることが可視化された (Fig.6)。

考察

味蕾は、複数の味細胞が集合しており花のつぼみのような形態をしている。本研究においても、舌などにある疣状の乳頭の表面に味蕾の分布を確認した。味蕾の大部分は舌にあるのだが、口蓋、咽頭、喉頭にも分布する¹⁵⁻¹⁶⁾。ヒトの舌には約 5,000 個、口全体で約 6,000 個の味蕾が存在するとされる。今回の実験結果から、葉状乳頭で、味蕾の密度が高いことが観察された。

マウスを用いた先行研究では味蕾の中に味細胞があり、味細胞の底部で味神経線維とシナプスを形成して接合している¹⁷⁾。味細胞は基底細胞の成熟によって生まれる。その寿命は約 10.5 日と比較的短く、味蕾の味細胞は次々と新しい細胞に入れ替わる¹⁸⁾。今回の実験結果からも、味蕾内に増殖細胞が存在する様子が確認された。

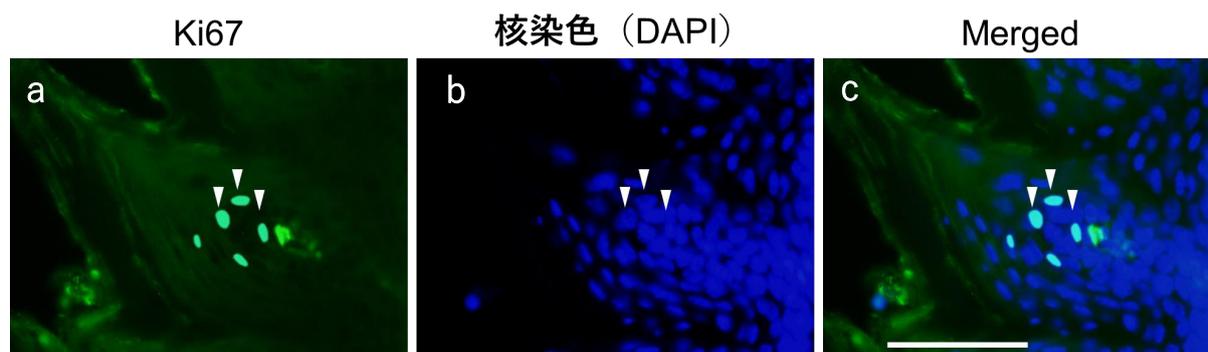


Fig. 6 マウス茸状乳頭の表層部におけるKi67染色像

MergedはKi67(緑), DAPI(青)を重ね合わせた画像を示してある。核にKi67染色が認められる代表例に矢頭をつけてある。スケールバー 100 μm 。

これらの新たな味細胞がどのような味覚感知を担うのかにより、味蕾内の味受容特性が決定する。このため、味蕾の密度と味細胞の再構成の両方の要素により、味覚の感受性が決定されると考察された。

味を感じるには、食べ物が唾液と混じって水溶液になる必要がある。水溶液になった物質が味蕾に到達する。味蕾では、味細胞にある受容体が、味物質と結合することで活動電位が生じ、味細胞の細胞膜の内外の電位差が生じる¹⁹⁾。この電気的な変化が味蕾の底部にある神経線維に伝えられ脳に送られる。味蕾から情報を受け取る味神経線維は、5基本味のうちの2種以上の味質に応答することが多く、その応答の大きさもまちまちである。脳はこうした混合した情報を味蕾から受け取っており、脳は混合した情報から味情報を抽出し、識別、判断する仕組みを持っていると考えられる。このため、今回の我々の解析で得られた味蕾の密度と味細胞の再構成という要素に加え、脳の可塑性も味覚の感受性に大きく影響するといえる。

本研究では、ラット舌組織部位別における各種味覚受容体のリアルタイムPCRを実施したが、遺伝子発現量を捉えることができなかった。ターゲット遺伝子(各種味覚受容体)の検量線の傾きはハウスキーピング遺伝子よりも小さかったことから(テンプレートが少なく増幅曲線の立ち上がりが遅いため)、非常に発現量が少ない可能性が示唆された。よって、測定に至るまでのサンプル調製において、以下の①~③の項目で改善が必要と考えられる。

① 舌組織採取後の検体中の核酸の安定性

本研究では採取した舌組織を凍結し、 -80°C

で保存したが、そもそもの検体におけるターゲット遺伝子の発現量が少ない可能性があるため、RNAlater™などの核酸安定試薬に組織を浸漬させてTotal RNA抽出まで -80°C で凍結保存することが望ましいと考えられる。

② 組織からのTotal RNA抽出効率・収量の向上

組織中のゲノムDNAの混入を抑制するために4-Bromoanisole処理を行ったが、複数の融解曲線が認められ、特異的反応産物と非特異的反応産物が混在していることが示された。プライマーダイマーの形成が疑われ、プライマーの設計・濃度、アニーリング温度の最適化などPCRの条件検討が必要である。

抽出したRNAの精製過程において従来使用されるホームメイド法では、下層・フェノールのコンタミ、不純物の洗浄・除去時に核酸ペレットのロスのリスクがある。よって、ターゲット遺伝子の発現量が少ない可能性のある舌組織では、スピнкаラム法を使用することが望ましいと考えられる。スピнкаラム法は、沈殿操作がないため核酸の紛失がなく、フェノールのコンタミも生じないというメリットがある。フェノールのコンタミは、RNAの吸収極大である260 nmからピークが(280 nm方向に)シフトする可能性があるとともに、濃度算出時にRNA量を多く見積もる可能性が出てくる。したがって、この点を鑑みてもスピнкаラム法でのRNA精製が望ましいと考えられる。

③ 使用するハウスキーピング遺伝子の選定

ハウスキーピング遺伝子は、実験条件、条件の異なる組織等で発現レベルが変動しないことに加え、ターゲット遺伝子と同レベルの発現量のものが望ましい。よって、Actbに加

え、Glucuronidase, beta (Gusb)、TATA box binding protein (Tbp) など複数のハウスキーピング遺伝子を測定して、上記の条件を満たすものを見出す必要がある。

上述したように、舌組織部位別における各種味覚受容体のリアルタイム PCR による解析には解決すべき問題点があり、大幅な実験の改良とトライアルが必要となる。このため、凍結舌切片を用いた in situ hybridization 法による味受容体 mRNA の検出と部位間の発現量・分布比較、免疫染色法を用いた味受容体タンパク質の検出と部位間の発現量・分布比較を行うことが最も効率的であり、有用な結果が得られる手法であると結論づけられた。

今回我々は、マウス舌凍結切片において、細胞増殖マーカーの検出を行った (Fig.6)。これらの点から、味受容体 KO マウスの凍結舌切片をネガティブコントロールに用いて実験を行うことで、確実な味受容体の発現を解析することが可能である。今後、様々な遺伝子改変マウスを用いて、このような実験を行い、味受容体の部位間の発現量・分布について、比較・解析を行う予定である。

結語

齧歯類では、舌の部位ごとに味蕾の分布・密度が大きく異なり、味覚の感知能力に違いをもたらしている可能性が大いに高いと考えられる。また、舌の部位ごとに味細胞の増殖能が異なり、味蕾内の味細胞の構成が日々ダイナミックに変動する可能性がある。これらも舌の部位ごとに味覚の感知能力を変化させる一因となっている可能性がある。

利益相反の開示

本研究における利益相反は存在しない。

著者貢献度

すべての著者は、研究の構想およびデザイン、データ収集・分析および解釈に寄与し、論文の作成に関与し、最終原稿を確認した。

引用文献

- 1) Paran N, Mattern CF, Henkin RI: Ultrastructure of the taste bud of the human fungiform papilla, *Cell Tissue Res*, 161 (1) , 1-10, 1975.
- 2) Yang R, Dzowo YK, Wilson CE, Russell RL, Kidd GJ, Salcedo E, Lasher RS, Kinnamon JC, Finger TE: Three-dimensional reconstructions of mouse circumvallate taste buds using serial blockface scanning electron microscopy: I. Cell types and the apical region of the taste bud, *J Comp Neurol*, 528 (5) , 756-771, 2020.
- 3) Misaki M, Keiko A, Yasufumi E: IP3 receptor type 3 and PLC β 2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells, *Chemical Senses*, 26 (3) , 259-265, 2001.
- 4) Chaudhari N, Roper SD: The cell biology of taste, *J Cell Biol*, 190 (3) , 285-296, 2010.
- 5) Taruno A, Vingtdeux V, Ohmoto M, Ma Z, Dvoryanchikov G, Li A, Adrien L, Zhao H, Leung S, Abernethy M, Koppel J, Davies P, Civan MM, Chaudhari N, Matsumoto I, Hellekant G, Tordoff MG, Marambaud P, Foskett JK: CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes, *Nature*, 495 (7440) , 223-226, 2013.
- 6) Lewandowski BC, Sukumaran SK, Margolskee RF, Bachmanov AA: Amiloride-insensitive salt taste is mediated by two populations of Type III taste cells with distinct transduction mechanisms, *J Neurosci*, 36 (6) , 1942-1953, 2016.
- 7) Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, Roper SD: Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste, *J Physiol*, 586(12) , 2903-2912, 2008.
- 8) Takeda M: An electron microscopic study on the innervation in the taste buds of the mouse circumvallate papillae, *Arch Histol Jpn*, 39 (4) , 257-269, 1976.
- 9) Teng B, Wilson CE, Tu YH, Joshi NR, Kinnamon SC, Liman ER: Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otop1, *Curr Biol*, 29 (21) , 3647-3656, 2019.

- 10) 佐藤かおる, 遠藤壮平, 富田寛: いわゆる舌の味覚地図の再検討, 日本味と匂誌, 1 (3), 316-319, 1994.
- 11) 小林三智子: 味覚感受性の評価と測定法~若年女性の味覚感受性を中心として~, 日本調理科学会誌, 43 (4), 221-227, 2010.
- 12) Sawada M: A study of measurements of and factors influencing threshold levels of taste perception, J. Stomatol. Soc. Jpn, 72, 28-41, 2004 (in Japanese) .
- 13) Ohishi A, Nishida K, Yamanaka Y, Ai Miyata A, Ikukawa A, Yabu M, Miyamoto K, Bansho S, Nagasawa K: Oxaliplatin Alters Expression of T1R2 Receptor and Sensitivity to Sweet Taste in Rats, Biol Pharm Bull, 39 (4), 578-586, 2016.
- 14) Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method, Methods, 25 (4), 402-408, 2001.
- 15) Kikut-Ligaj D, Trzcielińska-Lorych J. How taste works: cells, receptors and gustatory perception., Cell Mol Biol Lett, 20 (5), 699-716, 2015.
- 16) Jowett A, Shrestha R. Mucosa and taste buds of the human epiglottis, J Anat, 193 (4), 617-618, 1998.
- 17) Murray RG, Murray A, Fujimoto S: Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds, J Ultrastruct Res, 27 (5), 444-461, 1969.
- 18) Beidler LM, Smallman RL: Renewal of cells within taste buds, J Cell Biol, 27 (2), 263-272, 1965.
- 19) Furue H, Yoshii K: In situ tight-seal recordings of taste substance-elicited action currents and voltage-gated Ba currents from single taste bud cells in the peeled epithelium of mouse tongue, Brain Res, 21 (776), 133-139, 1997.