

助成研究タイトル

ヒト茸状乳頭味蕾細胞を用いたうま味受容体の機能解析

氏名 豊野 孝

所属 九州歯科大学 歯学部 歯学科 健康増進学講座 解剖学分野

要旨

ヒトにおける味蕾でのうま味受容体の転写制御機構、および細胞内情報伝達機構の詳細に関しては明らかになっていない。そこで本研究ではヒト初代茸状乳頭味蕾細胞を用いて、うま味受容体 *TAS1R1* 遺伝子の転写開始点の決定およびプロモーター領域の解析を行った。

ヒト初代茸状乳頭味蕾細胞(Applied Biological Materials 社)を Ozdener(2011)らの培養方法に基づき培養後、*TAS1R1* 遺伝子の転写開始点の決定を 5'-RACE 法により行った。本方法により得られた 18 クローンについて転写開始点の解析を行った結果、エクソン 1 の開始コドン上流 35bp(1 個)、37bp(6 個)、57bp(1 個)、61bp(3 個)、65bp(5 個)、および 67bp(2 個)の 6 カ所の転写開始点を同定した。これらの転写開始点において、開始コドン上流 37bp の転写開始点の近傍、およびその下流 30bp 近辺の領域には、それぞれイニシエーター配列および下流プロモーター配列と相同性が高い配列が認められた。そこで、開始コドン上流 37bp の転写開始点を+1 とした。

TAS1R1 遺伝子のプロモーター領域の決定をレポーターアッセイにより行った。その結果、*TAS1R1* 遺伝子上流領域の-697bp から+37bp を含むレポータープラスミドにおいて、コントロールプラスミド pGL4.10 をトランスフェクションした場合と比較して 7.7 倍のルシフェラーゼ活性が検出された。次に *TAS1R1* 遺伝子上流領域の転写の活性化に関わる配列の検索を行った。-697bp から-627bp の領域を欠失させたところ、41.6%のルシフェラーゼ活性の減少が認められた。さらに-164bp から-71bp を欠失させたところ、92.0%のルシフェラーゼ活性の減少が認められた。-164bp から+37bp の領域中には、転写因子 Sp/KLF ファミリーが結合する GT box (CCCACCC)、および 2 カ所の bHLH 型転写因子が結合する E-box (CANNTG) (E-box-a および -b)が存在していた。さらに、GT box および E-box-a においてはヒト以外の多くの動物種においてもその配列が保存されていた。そこで、GT box および、2 カ所の E-box に変異を導入したレポータープラスミドを作成し、レポーターアッセイを行った結果、GT box に変異を導入した場合にレポーター活性の低下が認められた。これらの結果から、GT box が *TAS1R1* 遺伝子の転写を正に制御する配列であることが明らかになった。

TAS1R1 遺伝子は味蕾以外の細胞でも発現が認められており、本遺伝子プロモーター中の GT box については、これまでに以下のような報告を行っている。マウス骨格筋細胞の分化過程において、*Tas1r1* 遺伝子の発現が著しく上昇し、その転写調節に Sp/KLF ファミリーに属する転写因子 Klf5 が関わっていることを報告している(Hirata *et al.*, 2019)。さらに、ヒト胆管上皮細胞株においては、*TAS1R1* 遺伝子の転写調節に Sp/KLF ファミリーに属する転写因子 SP1 が関わっていることを報告している(豊野他, 2007)。そこで、RNAi 発現阻害法、および mRNA を用いた過剰発現法により、味蕾細胞での *TAS1R1* 遺伝子の発現活性化における Klf5 および SP1 の機能解析を行った。その結果、SP1 において RNAi 発現阻害により *TAS1R1* 遺伝子の発現が減少し、過剰発現により *TAS1R1* 遺伝子の発現が増加したことから、SP1 が *TAS1R1* 遺伝子の発現活性化に関わっていることが明らかになった。

以上の結果から、*TAS1R1* 遺伝子上流領域の-698bp から+37bp にはプロモーター領域が存在し、その配列中には、転写を正に制御する GT box の配列が認められた。さらに、GT box においては転写因子 SP1 が結合し、転写を正に制御することが明らかになった。今後は、転写を正に制御する-697bp から-627bp の領域についても、その領域に結合し転写活性化に関わる転写因子の同定を行っていく予定である。