

論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 288 号	氏名	別府 香名
題 目	Development of a screening system for agents that modulate taste receptor expression with the CRISPR-Cas9 system in medaka (CRISPR-Cas9システムを用いた味覚受容体発現調節物質のスクリーニング系の開発)		
<p>【背景及び目的】味覚は味細胞に発現する味覚受容体に呈味物質が結合することで認識され、味覚障害は食欲不振やQOLの低下を招く。化学療法中のがん患者では副作用として高頻度に味覚障害をきたし、味覚受容体の発現変動がその一因である。しかしながら、その機序や治療法については詳細に解明できておらず、その理由のひとつに齧歯類の味蕾細胞が少ないため、味覚受容体の機能解析が十分に検討できないことが挙げられる。本研究では、メダカは味蕾の数がマウスの約5倍多いため味覚研究に適していることに注目し、CRISPR/Cas9システムを利用し味覚受容体発現を可視化した遺伝子改変メダカを作製する。これにより味覚障害を治療する候補物質同定のためのスクリーニングシステムを開発し、新しい治療ターゲットを探索することを目的とした。</p> <p>【方法】メダカ(OK-Cab^{1f})の1細胞期の受精卵にCRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集を行い、味覚受容体 T1R3(Taste Receptor Type1 member3)遺伝子領域にGFPを導入した味覚受容体可視化ノックインメダカ (T1R3-GFP KIメダカ) を作製した。T1R3の発現を抑制する抗がん剤のフルオロウラシル (5-FU) と、発現を促進するグルタミン酸ナトリウム(MSG) による曝露を行い、T1R3の発現変化をリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析と蛍光顕微鏡画像による蛍光強度により評価した。</p> <p>【結果】T1R3-GFP KIシステムを樹立した。本システムは、味蕾発現部位である口唇、鰓耙、咽頭部にGFP蛍光を認め、内在性T1R3の遺伝子発現パターンと一致していた。スクリーニング評価における条件検討より、表出している口唇部分の蛍光変化を定量解析することで、スクリーニング評価が可能であった。5-FU曝露によりT1R3遺伝子発現量の減少と蛍光強度の減弱が確認された一方で、MSG曝露ではT1R3発現の増加と蛍光強度の増強が認められた。さらにトリプトファンがT1R3発現を増加させ蛍光強度を増強することを新たに見出した。</p> <p>【結論】味覚障害に有効な新規成分のスクリーニング系として利用可能なT1R3-GFP KIメダカを作製した。本モデルは味覚研究のモデル動物として有用であり、創薬スクリーニングを含め、様々な実験の可能性を広げるツールとなることが期待される。</p>			

報告番号	甲 栄 第 288 号	氏名	別府 香名
審査委員	主査 竹谷 豊 副査 高橋 章 副査 瀬川 博子		
題目	Development of a screening system for agents that modulate taste receptor expression with the CRISPR-Cas9 system in medaka (CRISPR-Cas9システムを用いた味覚受容体発現調節物質のスクリーニング系の開発)		
著者	Kana Beppu, Rie Tsutsumi, Satoshi Ansai, Nana Ochiai, Mai Terakawa, Marie Mori, Masashi Kuroda, Kazuki Horikawa, Takumi Tomoi, Joe Sakamoto, Yasuhiro Kamei, Kiyoshi Naruse, Hiroshi Sakaue		
	令和4年2月21日 Biochemical and Biophysical Research Communications に受理済		
要旨	<p>味覚は味細胞に発現する味覚受容体に呈味物質が結合することで認識される。化学療法中のがん患者では高頻度に味覚障害をきたすが、味覚受容体数の減少がその一因である。しかしながら受容体数減少の発症機序は未だ十分に解明されておらず、治療法も確立されてはいない。その理由のひとつに齧歯類においては味蕾細胞が少ないため、味覚受容体の発現解析や治療法の探索が十分に検討できないことが挙げられる。そこで、本研究では味蕾の数がマウスの約5倍多いメダカに注目した。味覚受容体発現を可視化した遺伝子改変メダカを作製し、味覚障害を治療する候補物質同定のためのスクリーニング系の開発を目的とした。</p> <p>CRISPR-Cas9システムを利用して、メダカ (OK-Cab^hlf系統) の1から4細胞期の受精卵にゲノム編集をおこない、味覚受容体 Taste Receptor Type 1 member 3 (T1R3) 遺伝子領域にGreen Fluorescent Protein (GFP) を導入した味覚受容体可視化ノックインメダカ (T1R3-GFP KIメダカ) を作製した。T1R3-GFP KIメダカにT1R3発現を抑制する抗がん剤フルオロウラシル (5-FU)、及びT1R3発現を促進するグルタミン酸ナトリウム (MSG) に曝露させ、T1R3の発現変化をリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析と蛍光顕微鏡画像による蛍光強度測定により評価した。</p> <p>作製したT1R3-GFP KIメダカでは、味蕾発現部位である口唇、鰓耙、咽頭部にGFP蛍光を認め、内在性T1R3の遺伝子発現パターンと一致していた。5-FUの曝露によりT1R3遺伝子発現量の減少と蛍光強度が減弱した一方で、MSG曝露ではT1R3発現の増加と蛍光強度の増強が認められた。さらにトリプトファンがT1R3発現を増加させ、蛍光強度も増強させることを新たに見出した。</p> <p>以上より、味覚障害に有効な新規成分のスクリーニング系として利用可能なT1R3-GFP KIメダカを作製した。本モデルは味覚研究のモデル動物として有用であり、創薬スクリーニングを含め、様々な実験の可能性を広げるツールとなることが期待される。</p> <p>本研究は、味覚障害に対する新しい治療法の探索に貢献するものであることから、博士 (栄養学) の学位授与に値するものと判定した。</p>		