

***In situ* Hybridization for the Detection and Localization of the Bitter Taste Receptor *Tas2r108* in the Murine Submandibular Gland**

Su-Young Ki¹, Young-Kyung Cho^{1,2}, Ki-Myung Chung^{1,2} and Kyung-Nyun Kim^{1,2}

¹Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University

²Research Institute of Oral Sciences, Gangneung-Wonju National University

(received May 09, 2016; revised June 17, 2016; accepted June 18, 2016)

Mammals have 3 pairs of major salivary glands i.e., the parotid, submandibular, and sublingual glands. Saliva secretion of these glands is modulated by taste perception. Salivary glands are composed mainly of acinar and ductal cells. Primary saliva is secreted by acinar cells and modified during ductal flow. Recently, of the murine 35 bitter taste receptors, *Tas2r108* was expressed at highest levels in the submandibular gland by qPCR. Further, *Tas2r108*-transfected cells respond to a range of bitter compounds, such as denatonium, quinine, colchicine, diphenidol, caffeine and dapsone. The objective of the present study was to characterize the expression of *Tas2r108* mRNA in acinar and/or ductal cells of the submandibular gland using *in situ* hybridization (ISH).

Male 42-60 days old DBA2 mice were used in the study. Messenger RNAs were extracted from the submandibular gland for generating digoxigenin (DIG) labeled-cRNA probes. These probes were transcribed in anti-sense and sense orientation using T7 RNA polymerase. Dot blot hybridization was performed using DIG labeled-cRNA probes, in order to estimate integrity and optimal diluting concentration of these

probes. Subsequently, ISH was performed on murine submandibular gland to detect *Tas2r108* mRNA.

Dot blot hybridization data demonstrated that *Tas2r108* DIG labeled-cRNA anti-sense probes specifically detected *Tas2r108* cDNA. ISH results showed that the anti-sense probes labeled acinar and ductal cells in the submandibular gland, whereas no staining was visible in sense controls. Interestingly, the *Tas2r108* expression levels were higher in acinar than ductal cells.

These results suggested that *Tas2r108* might be more associated with primary saliva secretion than with ductal modification of saliva composition.

Key words: submandibular gland, *Tas2r108*, acinar cell, ductal cell, *in situ* hybridization

*Correspondence to: Kyung-Nyun Kim, Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, and Research Institute of Oral Sciences, Gangneung-Wonju National University, 7, Jukheongil, Gangneung, 25457, Korea,
Tel : +82-33-640-2450, E-mail : knkim@gwnu.ac.kr
ORCID : 0000-0001-5429-1358

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

미각은 음식물의 적절한 영양소를 탐지하여 섭취하게 하는 반면에 독성물질과 같은 유해물질을 탐지하여 섭취를 차단하게 하는 것 등의 기능을 수행함으로써 동물이 생존하는데 필수적인 감각이다. 미각은 타액 형성에 중요한 자극원이면서 또한 구강 내 타액은 미각 인지에 필수적인 요인이다[1].

포유류는 5가지 유형의 맛인 단맛, 쓴맛, 신맛, 짠맛 그리고 감칠맛을 구별한다[2]. 타액에 용해된 미각물질은 미공을 통해 세포표면에 있는 미각 감수기 또는 이온통로를 통하여 감지된다[3-6]. 타액은 음식 안에 포함되어 있는 미각 물질을 녹여 미각세포까지 운반하는 역

활을 한다[7]. 미각세포는 타액으로 덮여 있어 타액에 포함된 Na^+ 농도 변화와 같은 조성 변화가 미각 역치에 영향을 미칠 수 있다[1]. 또한 타액에 포함된 상피성장인자(epidermal growth factor, EGF)는 맛봉오리의 유지에 매우 중요한 역할을 한다[8]. 이와 같이 미각과 타액은 밀접한 관계를 갖고 있기 때문에 타액 분비의 감소는 미각 장애를 동반할 수 있다[1,9].

타액선은 선포세포와 도관세포로 구성되어 있고 각각의 세포는 혈장성분을 재료로 타액을 생성하며 생성된 타액의 구성성분을 변형시킨다[9].

맛봉오리는 혀의 유두 중 버섯유두, 잎새유두 및 성곽유두에 존재한다[9,10]. 성곽유두는 혀 뒷부분의 V자 모양으로 배열되어 있는 2-8mm 사이의 크기를 갖는 둥근 구조물로 4개에서 18개까지 발견된다. 각각의 성곽유두는 250개 내외의 맛봉오리를 갖고 있는 것으로 알려져 있으며 쓴맛 물질에 예민하게 반응하여 유해물질의 섭취를 차단하는 기능을 수행하는 것으로 생각된다[9].

포유류의 맛봉오리 세포는 형태적 특징에 의하여 4가지로 분류된다[11]. 종과 유두의 종류에 따라 차이가 있지만 맛봉오리의 1-3형 세포는 각각 50-60%, 20-30%, 10-20%를 차지한다[12-14]. 그 중 2형 맛봉오리 세포는 구조적으로 G-단백질 연계 수용체(G-protein coupled receptor; GPCR)에 속하는 1형 미각 감수기와 2형 미각 감수기를 통하여 단맛, 감칠맛, 쓴맛을 감지하는 역할을 한다[6].

단량체로 기능하여 쓴맛을 감지하는 2형 미각 감수기(T2Rs)는 유전자가 종에 따라 다르지만 포유류에서는 20-35가지의 종류가 발견되었다[15-17]. 다양한 유전자를 보유한 2형 미각 감수기는 구강 조직에서 두드러지게 발현되지만, 위장[18]과 호흡상피[19]등과 같은 구강 외의 조직에서도 발현된다는 것이 보고되고 있다. 아직까지 뚜렷한 증거는 부족하지만 이러한 구강 외의 2형 미각 감수기는 미각에 관련된 기능을 수행하기 보다는 소화나 호흡과 관련하여 독성물질과 같은 화학물질을 감지하는 기능을 담당할 가능성이 있다. 흰쥐의 위장에 쓴맛 물질인 denatonium 투여 시 위장 내 음식물의 배출이 지연되었으며, 이는 위장에서 발현되는 2형 미각 감수기가 유해한 물질일 가능성이 있는 화학물질을 감지하여 소화를 지연시켜 생명체를 보호하는 기능을 담당할 것으로 생각된다[20]. 또한 흰쥐의 기도에서도 2형 미각 감수기와 이의 신호전달에 필수적인 요소인 α -gustducin이 발현되며, 이들은 자극적인 물질과 병원균의 흡입을 감지하여 기도가 손상되지 않도록 보호반사의 기능에 관여할 것으로 추측된다[21]. 권[22]은 악하선, 설하선, 누선 및 혀장 조직과 같이 외분비선에서 2형 미각 감수

기가 발현되는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 외분비선에서 쓴맛 물질에 반응하여 분비액의 분비가 일어날 수 있다는 가능성을 시사한다.

2형 미각 감수기 중 denatonium, quinine, colchicine, diphenidol, caffeine, dapsone과 같이 다양한 쓴맛 물질에 반응하는 쓴맛 감수기인 *Tas2r108*[23,24]은 qPCR 실험을 통하여 버섯유두, 잎새유두 및 성곽유두에서 높은 수치로 발현하는 것이 확인되었으며[25] 또한 RT-PCR 실험을 통하여 미각과 밀접한 관련이 있는 악하선에서도 발현하는 것이 확인되었다[22]. 이와 같이 타액선과 미각 감수기와의 관계는 악하선과 설하선에서 미각 감수기의 유전자 발현을 확인한 것이 알려져 있으나 정확한 발현 위치에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

본 연구는 안정 시나 수면 시 가장 분비가 활발하여 혼합타액의 성분에 가장 큰 영향을 주고 있는 악하선에서 *in situ* hybridization을 이용하여 *Tas2r108* mRNA의 존재 여부 및 발현 위치를 확인하여 그 생리적 역할을 추정하는 단서를 얻기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구의 실험계획은 강릉원주대학교 실험동물윤리위원회의 승인(GWNU-2013-12)을 얻은 후, 위원회의 감독을 받으며 수행하였다. 실험동물은 쓴맛에 예민하다고 [26] 보고된 생후 42-60일령의 수컷 DBA/2 생쥐(오리엔트 바이오, 대한민국)를 강릉원주대학교 동물실에서 실험동물용 고히사료와 물을 자유롭게 공급하며 일정 기간 사육한 뒤 실험에 사용하였다.

Digoxigenin (DIG)으로 표지된 cRNA probe 제작

실험동물을 경추탈구로 희생시킨 후 즉시 악하선을 절제하였다. 절제한 조직은 얼음으로 냉각시킨 HEPES 완충-Tyrode-용액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 5 mM glucose, 10 mM HEPES, 5 mM pyruvate, pH 7.4)에 보관하였다.

분리된 조직을 액체 질소에 얼려 잘게 부순 후, RNeasy Mini kit (Qiagen, 미국)로 RNA를 추출하였다. RNA 추출 과정은 잘게 부순 악하선을 guanidine thiocyanate이 포함된 RLT 완충용액과 β -mercaptoethanol을 100:1 비율로 섞은 혼합액에 넣어 원심분리 한 후, 70% 에탄올과 1:1로 섞었다. 준비한 컬럼에 넣어 부착시킨 후, 에탄올이 포함된 RW1 완충용액으로 2번 세척한 후에 RPE 완충용액으로 다시 한 번 세척하였다. 원심분리로 건조한 후, RNase-free

Table 1. DNA sequences of specific primer, expected products sizes (PS) for DIG-labeled cRNA probes construction

Gene/Gene bank number		Primer sequence (forward/reverse)	PS (bp)
Tas2r108/ NM_020502	anti-sense	<u>TTATACGACTCATAGGGT</u> TGTGTTGGAAGTTTCTGGA/GGAGGGTAAGC AGCAGTAAT	583
	sense	TTGTGTTGGAAGTTTCTG <u>GATTATACGACTCATAGGG</u> /GGAGGGTAAGC AGCAGTAAT	

*The underlined part is a T7 promoter sequence.

water를 넣어 RNA를 추출하였다.

추출한 RNA 1 μ g와 T7 promoter 염기서열과 생쥐 *Tas2r108* mRNA를 암호화하는 염기서열이 결합된 프라이머(Table 1)를 역전사와 증합효소연쇄반응을 동시에 수행하는 Accupower RT-PCR Premix (Bioneer, 대한민국)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 최종 반응액의 부피를 20 μ l로 조정하여 Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, 미국)을 사용하여 42°C에서 60분, 4°C에서 30초, 94°C에서 5분으로 역전사 반응을 한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 과정을 50회 반복하고 최종 extension 과정으로 72°C에서 10분 동안 반응시켰다. 얻어진 cDNA는 20 μ l씩, DNA marker (Bioneer, 대한민국)는 5 μ l를 loading하고 1.5% 아가로오스 겔을 만든 후에 1X TEA 전개용 완충용액에서 100V로 일정하게 전개하였다. 전기영동이 끝난 겔은 CCD 카메라가 부착된 겔 기록 시스템(iMax2000, 코아바이오 시스템, 대한민국)을 이용하여 사진을 얻어 컴퓨터에 저장하여 분석하였다.

전기영동이 끝난 겔에서 관심있는 겔 부분을 잘라내어 겔 정제 kit (Bioneer, 대한민국)를 사용하여 cDNA를 추출하였다. cDNA의 추출은 자른 겔과 겔 무게의 약 3배 정도 되는 양의 완충용액1(gel binding buffer)을 혼합하여 60°C에서 12분 동안 녹이고 컬럼에 용액을 넣어 부착시킨 후 에탄올이 포함된 완충용액2(washing buffer)로 2번 세척하였다. 이후 원심분리로 건조시키고 완충용액3(elution buffer)을 넣어 cDNA를 추출하였다.

생쥐의 *Tas2r108*의 암호화 부분에 상응하는 digoxigenin (DIG)로 표지된 anti-sense와 sense의 cRNA probe를 DIG RNA labeling kit (SP6/T7, Roche, 독일)를 이용하여 제작하였다. 보다 상세한 cRNA probe 제작 과정은 10X concentrated transcription buffer 2 μ l, protector RNase inhibitor 1 μ l, 10X concentrated DIG RNA labeling mix 3 μ l, T7 RNA polymerase 2 μ l, DNA 1 μ g, 그리고 최종 반응액의 부피를 20 μ l를 만들고자 증류수를 추가하여 잘 혼합하였다. 37°C에 2시간 둔 후, DNase I, RNase-free 2 μ l를 첨가하여 37°C에서 15분 동안 처리한 후에 0.2M EDTA 2 μ l,

4M LiCl 2.5 μ l, 100% 에탄올 75 μ l를 첨가하여 4°C 냉각고에서 24시간 처리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 37°C에서 60분 동안 건조시킨 후에 DEPC로 처리된 증류수를 첨가하여 cRNA를 녹였다.

Dot blot hybridization

겔 정제 kit를 사용하여 추출한 cDNA를 변성시키고자 80°C에서 5분간 가열한 후에 재빨리 얼음에 넣어 10분 동안 식혔다. 변성된 cDNA는 700, 70, 7, 그리고 0.7 ng 순서대로 희석하여 3 μ l씩 나일론 막에 점적하여 건조시킨 후에 UV 중합기 (UVC 500, Hoefler, 미국)로 2초 동안 반응시켰다. 나일론 막은 cRNA probe가 빠진 prehybridization용액(50% deionized formamide, 10% dextran sulfate, 1X Denhardt's solution, 2X SSC (Bioneer, 대한민국), 0.5 mg/ml yeast t-RNA, 0.5 mg/ml salmon sperm DNA)으로 채워진 hybridization chamber에서 68°C에서 2시간 동안 천천히 회전시키면서 반응시킨 다음 DIG으로 표지된 cRNA probe를 prehybridization 용액에 넣고 47°C에서 하룻밤 동안 회전시키면서 반응시켰다. 다음날 나일론 막은 2X SSC로 15분씩 2번, 1X SSC로 15분, 0.1X SSC로 42°C에서 15분, 그리고 완충용액1 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl)에서 10분씩 2번 세척하였다. 이 나일론 막은 50 ml의 blocking solution에서 30분과 완충용액1에 anti-DIG-alkaline phosphatase (AP; Roche, 독일)를 첨가하여 희석한 30 ml에서 2시간 각각 반응시킨 후에 10분씩 2번 완충용액1로 세척하였다. 이 나일론 막은 30 ml의 완충용액2(100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)에 넣어 10분 동안 반응시키고 호일로 씌운 어두운 공간에서 완충용액2에 1:50으로 NBT와 BCIP (Roche, 독일)를 희석한 발색용액에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

조직 표본 제작

실험동물에 30% urethane (0.4 ml/100g)을 복강 주사하여 마취시킨 후 심장관류하여 희생시켰다. 펌프(Gilson, 미국)를 통해 좌심실로 헤파린으로 처리된 식염수를 150 ml를 관류시킨 후, 4% PFA 용액 80 ml를 관류시켰다. 충분히 관류, 고정이 된 후 생쥐의 악하선과 양성

대조군으로 사용할 성곽유두를 손상되지 않도록 절제하였다. 조직들은 4°C에서 4% PFA 용액으로 24 시간 후 고정을 거친 뒤, 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.4)에서 10분 간씩 2번 세척 후에 30% 자당 용액에 담겨 조직이 가라앉을 때까지 24시간, 4°C 냉장고에서 보관하였다. 가라앉은 조직들은 OCT compound (Surgipath FSC 22, Leica, 독일)로 block을 만들어 -75°C에 보관하였다. 얼린 조직은 동결조직절편기(Jung Frigocut 2800N, Leica, 독일)를 사용하여 10 μ m로 자르고 RNase-free glass slide에 부착시킨 다음 37°C hot-plate에서 1시간 동안 건조시켜 사용하였다.

In situ hybridization

준비된 조직표본을 DEPC로 처리된 인산완충생리식염수에서 10분 동안 2회 세척하고, 성곽유두 조직표본은 0.2 M HCl, 악하선 조직표본은 0.1 M HCl로 8분 동안 처리하였다. 그 다음 10 μ g/ml RNase가 없는 단백질분해효소 K를 포함한 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 성곽유두 조직표본은 10분, 악하선 조직표본은 5분 동안 처리한 후, 1% Triton X-100을 DEPC-PBS에 녹인 후 10분 동안 처리하였다. 그 후 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)으로 5분씩 2회 세척하였다. 이어서 0.1 M tetriethanolamine용액(pH 8.0)에 2분 동안 담근 후, probe의 비특이적 hybridization을 줄이기 위해 10분 동안 acetylation 반응을 시켰다. 이후 2X SSC로 45°C에서 10분 동안 세척하고 60°C hot plate에서 건조시켰다. DIG로 표지된 cRNA probe를 5 ng/ μ l이 되게 hybridization용액에 첨가하여 47°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이어서 37°C의 진탕 온수 배양기에서 2X SSC로 15분씩 2번 세척하고 STL용액(20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 2분 동안 담근 후, 10 μ g/ml RNase A를 포함한 STL용액으로 실온에서 30분 동안 처리하였다. 다시 한 번 37°C의 진탕 온수 배양기에서 STL용액으로 세척 직후, NTE용액(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 1mM EDTA)으로 30분, 1X SSC로 15분씩 2번, 0.1X SSC로 30분씩 2번 세척하였다. 다시 실온에서 흔들면서 완충용액 1에서 10분씩 2번 수세하고 0.1% Triton X-100, 2% sheep serum, 2% blocking reagent (Roche, 독일)를 완충용액1에 녹인 blocking 용액에서 30분 동안 배양한 뒤 blocking 용액을 버리고 0.1% Triton X-100, 1% sheep serum를 완충용액1(100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl)에 첨가한 후, sheep anti-DIG-AP를 1:500으로 녹인 용액에 2시간 동안 반응시켰다. 다시 흔들면서 완충용액1에 10분씩 2번 세척한 후에 완충용액 2(100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM

NaCl, 50 mM MgCl₂)에서 10분 동안 배양하였다. 최종적으로 발색을 위해서 DIG 발색 kit (Roche, 독일)를 이용하였다. 발색반응은 NBT와 BCIP를 포함한 완충용액2에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 발색후의 조직절편들은 TE완충용액(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA)에서 10분 동안 세척한 후, xylene으로 투명화하여 광학현미경으로 관찰하고 디지털가메라로 사진촬영을 하였다.

시약

본 연구에서 사용된 시약은 특별히 명시한 경우를 제외하고는 미국 Sigma사의 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

연구 결과

RT-PCR과 PCR 실험

DIG으로 표지된 cRNA probe 제작을 위하여 실험동물의 악하선에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행하였다. Anti-sense와 sense probe의 RT-PCR 생성물이 583 bp에서 나타났으며 cRNA probe 제작에 악하선 mRNA의 사용가능성을 확인하였다(Fig 1A). 전기영동이 끝난 겔에서 anti-sense와 sense probe의 해당 크기의 부분을 잘라 겔 정제 kit로 cDNA를 추출하여 PCR을 시행하였다. 이 실험

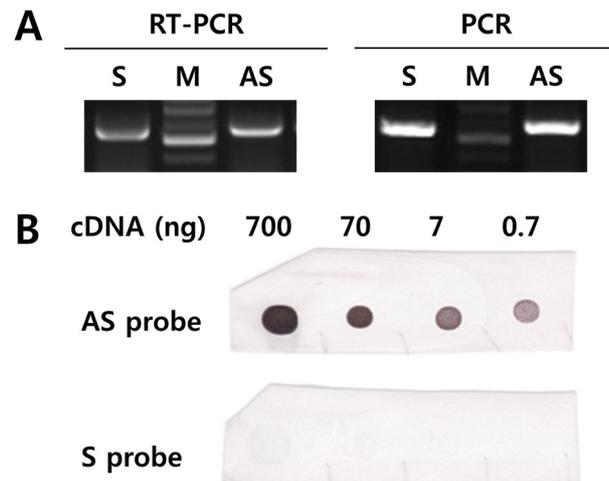


Fig 1. Detection of *Tas2r108* amplification in the submandibular gland by RT-PCR, PCR (A) and dot blot hybridization with digoxigenin-labeled specific cRNA probe from *Tas2r108* cDNA at doses of 700-0.7 ng (B). Samples electrophoresed in 1.5% agarose gel show the amplification of a 583 bp fragment of the *Tas2r108* mRNA (A). 3 μ l of cDNA was spotted onto a nylon membrane according to the amounts indicated above and hybridized with freshly prepared cRNA probe (B). S, sense; M, marker; AS, anti-sense.

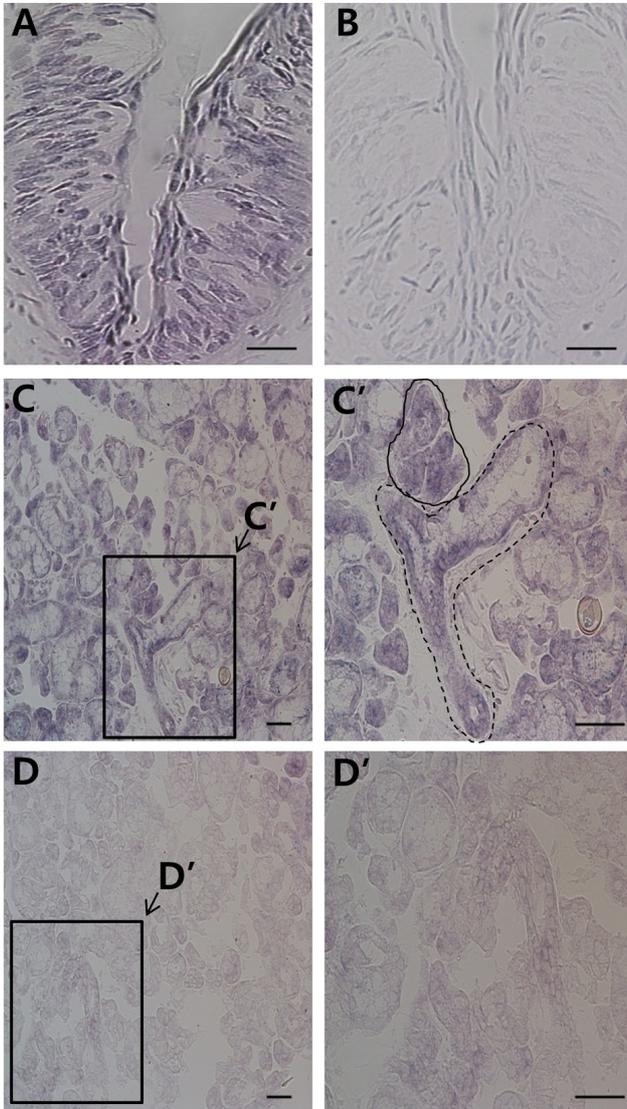


Fig 2. Microscopic images of *in situ* hybridization showed mRNA expression of *Tas2r108* in acinar and ductal cells of the submandibular gland. Circumvallate papillae was used as a positive control (A and B). Both acinar and ductal cells in the submandibular gland were labeled with anti-sense probes (C and C'). The expression levels of *Tas2r108* were higher in acinar than in ductal cells. No staining was visible in a sense control (D and D'). full line, acinar cells; dotted line, ductal cell. Scale bar = 50 μ m

험 결과로 다시 한 번 anti-sense와 sense probe가 583 bp 에 나타나며 추출한 cDNA를 cRNA probe 제작에 사용 가능함을 확인하였다(Fig 1A).

Dot blot hybridization

DIG으로 표지된 cRNA probe의 완전성과 실험에서 사용할 적정 희석 배율을 확인하기 위하여 시행하였다. 겔 정제 kit를 사용하여 추출한 cDNA를 700, 70, 7, 그리고

0.7 ng 순서대로 10배씩 희석하여 나일론 막에 점적한 후 DIG으로 표지된 cRNA anti-sense probe를 사용한 결과, cDNA 농도에 비례하여 강한 양성 반응을 보였다 (Fig 1B). Sense probe를 사용한 결과, 고농도인 700 ng cDNA 농도에서 비특이적 반응으로 추측되는 약한 양성 반응을 보인 것 이외에 다른 농도에서는 반응이 나타나지 않았다(Fig 1B).

In situ hybridization

Dot blot hybridization을 통하여 완전성과 실험에서 사용할 적정 희석 배율이 확인된 probe를 사용하여 *in situ* hybridization을 시행한 결과, 성곽유두의 일부 맛봉오리 내 미각세포, 악하선의 선포세포와 도관세포에서 *Tas2r108* mRNA의 발현을 확인하였다(Fig 2). 그 발현 수준이 도관 세포보다 선포세포에서 더 높았다(Fig 2C,D).

고찰

타액은 음식 안에 포함되어 있는 미각 물질을 녹여 미각세포까지 운반하는 역할을 하며[7] 구강 건조나 세균 감염 등에 의해 발생할 수 있는 손상으로부터 미각 감수기를 보호한다. 타액의 일부 구성성분은 미각 감수기를 계속 자극하여 미각 역치의 변화를 일으킬 수 있다. 예를 들어, 짠맛 역치는 타액에 포함된 Na^+ 의 농도에 따라 달라진다. 이와 같이 미각과 타액은 밀접한 관계를 갖고 있기 때문에 타액 분비의 감소는 미각 장애를 동반할 수 있다[1,9].

포유류는 5가지 유형의 맛인 단맛, 감칠맛, 짠맛, 신맛 및 쓴맛을 구별한다[2]. 이 중 쓴맛은 질소를 함유한 긴 사슬의 유기물 또는 알칼로이드가 내는 맛으로 생물체가 유해물질의 섭취를 차단하는 기능을 수행하는 것으로 생각된다[9,27].

미각은 주로 혀 유두에 있는 맛봉오리의 미각세포를 통해서 전달된다. 쓴맛을 감지하는 2형 미각 감수기는 단량체로 기능을 하며[3,16] 4가지(1-4형) 맛봉오리 세포 중 2형 맛봉오리 세포에서 발현한다. 2형 미각 감수기의 유전자는 종에 따라 다르며 사람에서는 25가지, 생쥐에서는 35가지가 각각 존재한다고 알려져 있다[3,28]. 이처럼 다양한 유전자를 보유한 2형 미각 감수기는 다양한 조직에서 발견된다. 흰쥐의 위장에서 발현하는 2형 미각 감수기는 위장에 쓴맛 물질 투여 시, 유해한 물질인 가능성이 있는 화학물질을 감지하여 소화를 지연시켜 생명체를 보호하는 기능을 담당할 것으로 생각된다[20]. 또한 흰쥐의 기도에서 발현하는 2형 미각 감수기와 a

-gustducin는 자극적인 물질과 병원균의 흡입 시 감지하여 기도가 손상되지 않도록 보호반사의 기능에 관여할 것으로 추측된다[21]. 취장 내분비선에서 2형 미각 감수기 중 일부 및 α -gustducin의 존재가 확인되는데[18], 이는 취장 내분비선이 혈중 쓴맛 물질에 반응하여 호르몬의 분비를 일으킬 수 있다고 제안하고 있다. 외분비선에서도 2형 미각 감수기가 발견되는 것이 확인되었으며 이는 섭취한 음식 중 독성을 지닌 쓴맛 물질이 포함되었을 경우, 외분비선을 자극하여 분비액의 분비가 일어날 수 있는 가능성을 시사한다[22].

In situ hybridization의 표적 mRNA인 *Tas2r108*은 생쥐에서 발견되는 2형 미각 감수기로 사람의 2형 미각 감수기인 *TAS2R4*와 상동의 관계에 있다[23]. *Tas2r108*은 HEK293T 세포를 사용하여 Ca^{2+} 의 활성도를 측정하는 연구에서 denatonium, quinine, colchicine, diphenidol, caffeine, dapsone과 같이 다양한 쓴맛 물질에 반응한다고 보고되었다[24]. 또한 RT-PCR을 이용한 실험 결과에서 외분비선 중 미각과 밀접한 관련이 있는 악하선과 설하선에서도 *Tas2r108*이 발견되는 것을 확인하였으며[22] qPCR을 이용하여 버섯유두, 잇새유두 및 성곽유두에서 유전자의 양을 측정하는 결과, 35가지 2형 미각 감수기 유전자 중 *Tas2r108* 유전자가 가장 높은 수치로 발현하였다[25].

앞선 연구에서 이용된 RT-PCR과 qPCR 실험은 시료에 있는 확인하고자 하는 DNA 주형을 증폭시켜 DNA를 검출하고 DNA의 양을 측정하는 방법이다. 이러한 방법은 DNA의 증폭 중 오독에 의하여 잘못된 염기서열이 증폭되어 검출되고 그 양이 측정될 수 있는 단점이 있다. 또한 유전자가 시료의 어떤 위치에서 발견되는지 정확한 위치를 알 수 없다. 이러한 단점과 한계점을 보완하는 좀 더 상세한 실험 방법으로 *in situ* hybridization을 이용하여 본 연구를 수행하였다. *In situ* hybridization은 형태적으로 보존되어 있는 생체의 세포 또는 조직 단편에서 특정 mRNA의 존재와 위치를 현미경을 통하여 직접 육안으로 확인할 수 있는 방법으로 특정 mRNA와 상보적으로 결합이 가능한 probe를 이용한다. probe는 40-50 bp로 상대적으로 길이가 짧은 oligonucleotide probe와 300-400 bp 길이로 사용되는 cDNA 혹은 cRNA probe로 분류할 수 있다. probe의 길이가 짧을수록 세포나 조직에 쉽게 침투할 수 있는 장점이 있는 반면에 비특이적 반응이 나타날 가능성이 높아진다. 반면에 길이가 길수록 세포나 조직에 침투하기는 어렵지만 특이적 반응이 증대하여 보다 정확한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다[29,30].

본 연구에서 사용한 583 bp cRNA probe는 T7 RNA 중합효소를 사용한 *Tas2r108* mRNA에 대한 anti-sense와 sense probe이다. 제작한 probe의 완전성과 실험에 사용할 적정 희석 배율을 확인하기 위하여 dot-blot hybridization을 먼저 시행

하였다(Fig 1B). Anti-sense probe를 사용한 결과, cDNA 농도에 비례하여 강한 양성 반응을 보였다.

Dot blot hybridization으로 완전성과 적정 희석 배율이 확인된 anti-sense와 sense probe로 *in situ* hybridization을 수행하였다(Fig 2). 양성 대조군으로 사용한 성곽유두의 일부 맛봉오리 내 미각세포에서 *Tas2r108* mRNA이 발현하였다. 악하선의 선포세포와 도관세포에서도 *Tas2r108* mRNA가 발현하였고, 그 발현 수준이 도관세포보다 선포세포에서 더 높았다. 따라서 악하선에서 발현되는 쓴맛 감수기는 타액을 생성하는 선포세포와 그 구성성분을 조절하는 도관세포 모두와 관련이 있지만 타액 생성에 더 큰 기여를 할 것이라고 제안된다. 또한 앞선 전[31]의 연구 결과와 종합하여 추측해 보면, 선포세포의 *Tas2r108*이 쓴맛을 감지하여 세포 내 Ca^{2+} 신호를 활성화시켜 자체적으로 타액을 생성하고 분비를 조절하는 기전을 갖추고 있을 가능성이 있다. 생체로 들어오는 화학물질 중 유해한 물질을 보다 민감하게 감지하기 위하여 선포세포가 자체적으로 미각을 감지하는 기능을 발달시켰을 가능성을 시사한다. 그러나 정확한 생리적 기능에 대하여는 보다 지속적인 연구가 필요하다.

Acknowledgements

The work is supported by Basic science Research Program through the National Research Foundation in Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning (2013R1A1A2008424)

Conflict of interest

None of the authors have any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the work. The study supporters did not have any involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

1. Matsuo R. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):216-229. doi:10.1177/

- 10454411000110020501
2. Yarmolinsky DA, Zuker CS, Ryba NJ. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* 2009;139:234-244. doi:10.1016/j.cell.2009.10.001
 3. Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 2000;100: 693-702. doi:10.1016/S0092-8674(00)80705-9
 4. Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS. An amino-acid taste receptor. *Nature* 2002;416:199-202. doi:10.1038/nature726
 5. Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 2003;115:255 - 266. doi:10.1016/S0092-8674(03)00844-4
 6. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 2003;112:293-301. doi:10.1016/S0092-8674(03)00071-0
 7. Bradely RM, Beidler LM. Saliva: its role in taste function. In: Doty, RL, editors. *Handbook of olfaction and gustation*. New York: Marcel Dekker; 2003. p. 639-650.
 8. Morris-Wiman J, Sego R, Brinkley L, Dolce C. The effect of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chem Senses* 2000;25:9-19. doi:10.1093/chemse/25.1.9
 9. Kim KN, and Chun SW. *Special Senses*. in *Physiology for dentistry*. 3rd ed. Seoul: DaehanNarae Publishing; 2016. p. 266-292, 588-599.
 10. Royer SM, Kinnamon JC. Ultrastructure of mouse foliate taste buds: Synaptic and nonsynaptic interactions between taste cells and nerve fibers. *J Comp Neurol*. 1988;270:11-24. doi:10.1002/cne.902700103
 11. Chaudhari N, Roper SD. The cell biology of taste. *J Cell Biol*. 2010;190:285-296. doi:10.1083/jcb.201003144
 12. Ma H, Yang R, Thomas SM, Kinnamon JC. Qualitative and quantitative differences between taste buds of the rat and mouse. *BMC Neurosci*. 2007;8:5. doi:10.1186/1471-2202-8-5
 13. Yoshida R, Ninomiya Y. New insights into the signal transmission from taste cells to gustatory nerve fiber. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2010;279C:101-134. doi:10.1016/S1937-6448(10)79004-3
 14. Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K. Skn-1a (*Pou2f3*) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci*. 2011;14:685-687. doi:10.1038/nn.2820
 15. Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Aler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ. T2Rs function as bitter taste receptor. *Cell* 2000;100:703-711. doi:10.1016/S0092-8674(00)80706-0
 16. Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 2000;404:601-604. doi:10.1038/35007072
 17. Shi P, Zhang J. Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol. Biol. Evol*. 2006;23:292-300. doi:10.1093/molbev/msj028
 18. Höfer D, Drenckhahn D. Identification of taste cell G-protein α -gustducin in brush cells of rat pancreatic duct system. *Histochem Cell Biol*. 1998;110:303-309. doi:10.1007/s004180050292
 19. Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi HM, Silver WL. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8981-8986. doi:10.1073/pnas.1531172100
 20. Glendinning JI, Yiin Ym, Ackroff K, Sclafani A. Intragastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents. *Physiol Behav*. 2008;93:757-765. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.029
 21. Tizzano M, Cristoforetti M, Sbarbati A, Finger TE. Expression of taste receptor in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med*. 2011;11(1):3. doi:10.1186/1471-2466-11-3
 22. Kwoen SB. *Physiology of Taste Receptors in Exocrine Glands*. Ph.D. Dissertation, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Korea, 2012
 23. Foster SR, Porrello ER, Purdue B, Chan HW, Voigt A, Frenzel S, Hannan RD, Moritz KM, Simmons DG, Molenaar P, Roura E, Boehm U, Meyerhof W, Thomas WG. Expression, Regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS ONE*. 2013;8:e64579. doi:10.1371/journal.pone.0064579
 24. Foster SR, Blank K, See Hoe LE, Behrens M, Meyerhof W, Peart JN, Tomas WG. Bitter taste receptors agonists elicit G-protein-dependent negative inotropy in the murine heart. *The FASEB J*. 2014;28:4497-4508. doi:10.1096/fj.14-256305
 25. Choi HJ, Cho YK, Chung KM, Kim KN. Differential expression of taste receptors in tongue papillae of DBA mouse. *Int J Oral Biol*. 2016;41:25-32. doi:10.11620/IJOB.2016.41.1.025
 26. Boughter JD, Raghov S, Nelson TM, Munger SD. Inbred mouse strains C57BL/6J and DBA/2J vary in sensitivity to a subset of bitter stimuli. *BMC Genet*. 2005;6:36. doi:10.1186/1471-2156-6-36
 27. Behrens M, Meyerhof W. Gustatory and extragustatory function of mammalian taste receptors. *Physiol Behav*. 2011;105:4-13. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.010
 28. Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 2010;35:157-170. doi:10.1093/chemse/bjp092
 29. Yand H, Wanner I, Roper SD, Chaudhari N. An optimized method for in situ hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *J Histochem Cytochem*. 1990;47(4) ;431-445. doi:10.1177/002215549904700402
 30. Kruchen B, Eisel D, Grünwald-Jango S. *DIG application manual for nonradioactive in situ hybridization*. 3rd ed. Germany. 2002. p. 41-72.
 31. Jun YK, Kim SN, Lee CH, Cho YK, Chung KM, Roper SD, Kim KN. Distribution of Taste Receptors in Submandibular and von Ebner Salivary Glands. *Int J Oral Biol*. 2008 33: 13-23.