

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12334

研究課題名(和文) 塩味受容・応答機構の探究

研究課題名(英文) Investing the Mechanism of Salty Taste Reception and Response

研究代表者

阿部 啓子 (ABE, Keiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授

研究者番号：10151094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：塩味増強化合物の開発を目指し、塩の受容機構に関わる分子の探索を実施した。別々に存在する甘・苦・旨味受容細胞が消失し、その分酸味受容細胞が3倍に増加したSkn-1a(S-KO)マウスを作成した。このマウスを用いてRNA-seq解析を行い、Type I細胞特異的に発現するイオンチャネル候補遺伝子(数十個)を見出した。これらの遺伝子の中でS-KOマウスと味蕾の組織染色からType I細胞にも発現するイオンチャネル(X-チャネル)を特定した。X-チャネルはマウスのみならずヒトにも存在した。現在、X-チャネルをHEKに発現させ、電気生理実験を実施している。その表現型を模索中である。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to develop some salt taste-enhancing compounds. We constructed Skn-1a knocked-out mice (S-KO mice) in which sweet, bitter and umami taste receiving cells disappeared and sour taste receiving cell activity was enhanced 3 times. The RNA-seq analysis of this mouse made us find several copies of a candidate ion channel expressed specifically in Type I cells. These genes included an ion channel (X-channel) which stained the taste buds of S-KO mice. This channel was expressed in humans as well. Also, this X-channel was a sodium channel. To know the physiological property of this channel, this was introduced into HEK 293 cell, which was then submitted to electrophysiological experiment. However, the HEK 293 cell did not respond to sodium ion. This proposes the possibility that the cell is associated with the transport of some other ions. To analyze the phenotype of X-channel, we constructed the KO mice to design the target sequence.

研究分野：味覚受容システム

キーワード：塩味受容機構 味細胞 イオンチャネル 電気生理 ゲノム編集 食と栄養

## 1. 研究開始当初の背景

味蕾の味細胞には甘・うま・苦・酸・塩味にそれぞれ応答する別々の細胞がある。このうち、甘・うま・苦味は II 型細胞、酸味は III 型細胞、塩味は I 型細胞と分類されている。甘味は T1R2/T1R3、うま味は T1R1/T1R3、苦味は T2Rs、酸味は PKD1K3/PKD2L1 の受容体が明らかになっているが、塩味の受容体は不明である。ナトリウム依存的な ENaC チャネルが塩味受容を担っていることが報告されているが、NaCl の生理応答の事象をすべて説明することはできない。

本研究では、I 型味細胞に発現する膜貫通トポロジーを持つ受容体・チャネル等の遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に探索し、組織学的、神経応答解析から候補分子を解明する研究デザインを考えた。これには筆者自らが開発した、II 型細胞が消失した *Skn-1a* KO マウス (*Nature Neurosci.* 2011) を利用する。*Skn-1a* KO マウスと野生型マウスの味細胞の発現遺伝子を比較し、膜結合で、しかも両方で発現量が同等である遺伝子、すなわち塩味受容細胞に発現する遺伝子群を究明する。

## 2. 研究の目的

食塩は食品の調味にかけがえのない重要因子の 1 つである。甘・うま・苦・酸味と相乗効果・相殺効果を示す。たとえば、甘・うま味の増強効果や酸味による塩味減縮が知られている。食品の嗜好性を高める上で、塩味を制御することは必要不可欠である一方、過剰摂取は高血圧、腎臓病などの生活習慣病の発症を招く。これまで、塩味代替化合物や塩味増強物質の開発が世界的に行われ始めているが未踏である。これは、塩味受容・応答機構が不明だからであり、その探索の糸口すらない状態である。本研究では、塩味増強化合物の開発を目指し、塩の受容機構に関わる分子の探究に挑戦することを目的として実施する。

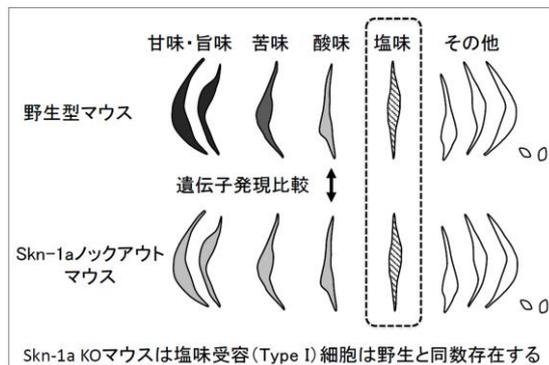
## 3. 研究の方法

### (1) 塩味受容体候補分子の探索

①野生型および *Skn-1a* KO マウスの味蕾細胞に発現する遺伝子群の解析：野生型マウスの有郭乳頭上皮 (WT-CvP)、野生型マウスの乳頭外の舌上皮 (WT-Np)、*Skn-1a* KO マウスの有郭乳頭上皮 (KO-CvP) の 3 種のサンプルについて、DNA マイクロアレイおよび次世代シーケンクス解析を行い、WT-Np に対して WT-CvP と KO-CvP において有意に発現量が up する遺伝子で、かつ WT-CvP と KO-CvP での発現量がほぼ一致する遺伝子 (塩味細胞やその他細胞に発現する遺伝子群) を抽出する。

②味蕾の Type I 細胞に発現する分子群の

抽出：味蕾細胞特異的に発現する既知遺伝子群に注目し、WT-CvP と KO-CvP の間の遺伝子発現変動と細胞種との関連を解析する。*Skn-1a* KO マウスにおいては Type II 細胞が消失し、Type III 細胞が増加しているため、遺伝子発現プロファイルにおいてもその特徴が反映されている。Type I または味蕾全体に発現する遺伝子群は KO と WT で差が見られない。Type I 細胞および味蕾全体に発現する遺伝子候補として、WT-CvP と KO-CvP の間に発現量の有意差がなく、fold change が 0.7 より大きく 1.5 より小さい遺伝子を抽出し、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) による発現解析を実施する。



③上記結果から、野生型および *Skn-1a* KO マウスの味蕾細胞で発現量が同じ遺伝子群 (Type II・III 特異的ではなく、Type I を含む味細胞に発現する遺伝子) を抽出し、塩味受容体候補分子を絞り込む。

### (2) 塩味受容体候補分子の電気生理学的手法による機能解析

培養細胞 (HEK293 および CHO) を用いた機能解析：HEK293 細胞に候補遺伝子を導入し、培養液の NaCl 濃度依存的な IV カーブを電気生理学的手法により計測する。

### (3) 塩味受容体分子の Knock out マウスの作製

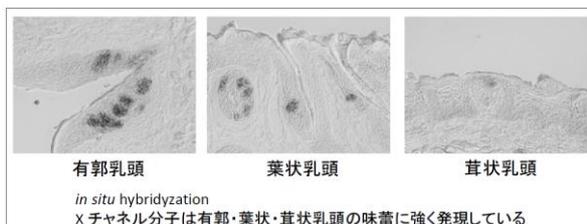
TALEN 法により作出し、KO マウスの塩味嗜好性・神経応答を解析する。

## 4. 研究成果

本研究において、我々が作製した甘・旨・苦味受容細胞が完全消失の *Skn-1a*<sup>-/-</sup> (KO) マウスを用いて解析した点が研究進捗の大きなアドバンテージである。すなわち、KO マウスと WT マウスの有郭乳頭味蕾を RNA-seq (次世代シーケンクス) 法で比較解析し、候補遺伝子群を抽出した。

これらの遺伝子群の中で①膜貫通ドメインを持つトポロジーがあること、②in situ ハイブリダイゼーションにより一部の味細胞に発現していること、KO と WT マウスでの発現状態がほぼ同じであることなどから、塩味受容に関する候補分子 (X-チャネル) を絞

り込むことに成功した。この分子はげっ歯類のみならずヒトおよびサルなどにも発現していることがデータベース情報から明らかである。しかし、本分子が塩味受容機能分子かどうかについては報告がない。これまで、甘・旨・苦・酸味受容分子はいずれもその mRNA の発現が *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察されている。



生理機能を解析するため HEK293T 細胞に X-チャンネル遺伝子を導入し、電気生理実験を行った。その結果、ナトリウムイオンには応答しなかったことから、他のイオンの流入に関与する可能性を解析している。

X-チャンネルの表現系解析のため、KO マウスの作成に着手した。CISPER/Cas9 と TALEN 法を用いて標的配列の決定などをデザインし作出中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 28 件) すべて査読 有り

1. Ushiyama, S., Ishimaru, Y., Narukawa, M., Yoshioka, M., Kozuka, C., Watanabe, N., Tsunoda, M., Osakabe, N., Asakura, T., Masuzaki, H., and Abe, K. Catecholamines facilitate fuel expenditure and protect against obesity via a novel network of the gut-brain axis in transcription factor *Skn-1*-deficient mice. *EBioMedicine* 8, 60-71 (2016). [https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.04.031]
2. Soulika, M., Kaushik, A-L., Mathieu, B., Lourenco, R., Komisarczuk, A.Z., Romano, S.A., Jouary, A., Lardennois, A., Tissot, N., Okada, S., Abe, K., Becker, T.S., and Kapsimali, M. Diversity in cell motility reveals the dynamic nature of the formation of zebrafish taste sensory organs. *Development* 143, 2012-2024 (2016). [doi: 10.1242/dev.134817]
3. Maeda, N., Ohmoto, M., Yamamoto, K., Kurokawa, A., Narukawa, M., Ishimaru, Y., Misaka, T., Matsumoto, I., And Abe, K. Expression of serotonin receptor genes in cranial ganglia. *Neuroscience Lett.* 617, 46-51 (2016). [doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.050]
4. Ogasawara, Y., Mochimaru, S., Ueda, R., Ban, M., Kabuto, S., and Abe, K. Preparation of an Aroma Fraction from Dried Bonito by Steam Distillation and Its Effect on Modification of Salty and Umami Taste Qualities. *J. Food Sci.* 81(2), C308-316 (2016). [DOI:10.1111/1750-3841.13194]
5. Oda, Y., Ueda, F., Utsuyama, M., Kamei, A., Kakinuma, C., Abe, K., and Hirokawa, K. Improvement in human immune function with changes in intestinal microbiota by *Salacia reticulata* extract ingestion: a randomized placebo-controlled trial. *PLoS ONE* 10(12), e0142909 (2015). [doi: 10.1371/journal.pone.0142909]
6. Ogi, K., Yamashita, H., Terada, T., Homma, R., Shimizu-Ibuka, A., Yoshimura, E., Ishimaru, Y., Abe, K., and Asakura, T. Long-Chain Fatty Acids Elicit a Bitterness-Masking Effect on Quinine and Other Nitrogenous Bitter Substances by Formation of Insoluble Binary Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 63(38), 8493-8500 (2015). [DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03193]
7. Abe, K. Functional food science in Japan: Present state and perspectives. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 61, S201 (2015). [doi: 10.3177/jnsv.61.S201]
8. Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Matsui, A., Go, Y., Ishimaru, Y., Misaka, T., Abe, K., Hirai, H., Satta, Y., and Imai, H. Rapid expansion of phenylthiocarbamide non-tasters among Japanese macaques. *PLoS ONE* 22, e0132016 (2015). [DOI: 10.1371/journal.pone.0132016]
9. Koizumi, T., Terada, T., Nakajima, K., Kojima, M., Koshihara, S., Matsumura, Y., Kaneda, K., Asakura, T., Shimizu, A., Abe, K., and Misaka, T. Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Sci. Rep.* 5:12947 (2015). [doi:10.1038/srep12947]
10. Ohkubo, T., Tamiya, M., Abe, K., and Ishiguro, M. Structural basis of pH dependence of Neoculin, a sweet taste-modifying protein. *PLoS ONE* 10(5): e0126921 (2015). [doi:10.1371/journal.pone.0126921]
11. Kurokawa, A., Narukawa, M., Ohmoto, M., Yoshimoto, J., Abe, K., and Misaka, T. Expression of the synaptic exocytosis-regulating molecule complexin 2 in taste buds and its participation in peripheral taste transduction. *J. Neurochem.* 133, 806-814 (2015). [doi: 10.1111/jnc.13073].
12. Nekohashi, M., Ogawa, M., Ogihara, T., Nakazawa, K., Kato, H., Misaka, T., Abe, K., and Kobayashi, S. Luteolin and Quercetin affect the

cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann–Pick C1 Like 1 in Caco-2 cells and rats. *PLoS ONE* 9, e97901 (2014). [DOI: 10.1371/journal.pone.0097901]

〔学会発表〕（計 122 件）

1. 高橋健、阿部啓子、岡田晋治「小型魚類メダカを用いた苦味受容機構解析系の構築」日本農芸化学会 2017 大会、2017. 03. 18、ウエスティン都ホテル京都（京都府、京都市）
2. 谷下道大、成川真隆、石渡賢治、吉岡美紗子、朝倉富子、嘉糠洋陸、阿部啓子、石丸喜朗「小腸刷子細胞に発現する遺伝子の生体内機能の検証」日本農芸化学会 2017 大会、2017. 03. 18、ウエスティン都ホテル京都（京都府、京都市）
3. 阿部啓子「“食による生体恒常性維持の指標となる未病マーカーの探索戦略” 委員会の目指すところ」JSPS 先導的研究開発委員会・第 1 回委員会、2017. 03. 07、中島董一郎記念ホール（東京都、文京区）
4. 阿部啓子「消化管刷子細胞を介するエネルギー代謝」第 20 回日本病態栄養学会年次学術集会-シンポジウム 16：食欲に関連するシグナル、2017. 01. 15、京都国際会館（京都府、京都市）
5. 阿部啓子「美味しさと味覚の本質をさぐる」静岡フーズ・サイエンスリーディング・アドバイザー会議：おいしいフーズ・サイエンスフォーラム、2016. 11. 24、静岡県男女共同参画センター（静岡県、静岡市）
6. 阿部啓子「味覚シグナルと消化管機能は連動してエネルギー代謝を調節する」日本栄養・食糧学会中部支部、2016.11.19、岐阜大学（岐阜県、岐阜市）
7. 阿部啓子「統合食品科学の新たな息吹-とくに味覚研究を例として “A new breath of integrated food science in special reference to taste research”、健康と食品に関する新潟国際会議、2016.11.11、新潟コンベンションセンター（新潟県、新潟市）
8. 阿部啓子「おいしさと健康機能の研究」東京大学フードサイエンス棟と中島董商店・キューピ-交流会、2016. 08. 17、中島董一郎記念ホール（東京都、文京区）
9. 阿部啓子「シンポジウム 10 味のサイエンス[味のサイエンス]について」第 19 回日本病態栄養学会、2016.01.10、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）
10. Abe, K. “Functional Foods— History and Perspective” ICoFF 2015, 2015.11.22-25, Seoul (Korea)
11. 阿部啓子「甘味認知とエネルギー代謝」第 36 回 日本肥満学会、2015.10.02、名古屋国際会議場（愛知県、名古屋市）

12. 阿部啓子「次世代機能性食品の主軸は味覚・嗅覚の基礎研究」第 9 回食香粧研究会シンポジウム、2015. 09. 12、東京農業大学（東京都、世田谷区）
13. 阿部啓子「味覚シグナルとエネルギー代謝」和歌山県立医科大学学術講演会、2015.08.29、和歌山県立医科大学（和歌山県、和歌山市）
14. Abe, K. “Functional Food Science in Japan: Present State and Perspectives” ACN 2015: 12th Asian Congress of Nutrition, 2015.05.14, パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

〔図書〕（計 6 件）

1. 阿部啓子：日本における“食と健康”研究-味覚科学の位置づけ (New Wave of the science of Food and Health in Japan: Position of Taste Research) 総説特集 味覚に関する ISOT サテライトシンポジウム：日本味と匂学会誌 23, No. 2 pp. 89-94 (総頁数 139p) (2016 11 月)
2. 阿部啓子：食品の味と味覚 日本醸造協会誌 111, p569 (総頁数 636p) (2016 年 9 月号)
3. Abe, K.: Kanagawa Prefectural Government, Promoting health through ME-BYO: “Spotlight on -Food Science in Japan” p10-11, Nature Publishing group (総頁数 24p) (2016).
4. 阿部啓子：SIP 次世代農林水産業創造技術② 機能性農林水産物・食品開発の主要分野とは Agrio 時事通信社 第 0105 号, p15 (総頁数 27p) (2016 年 4 月 12 日)
5. 櫻井敬展、阿部啓子：培養細胞評価系を用いた食味評価 (Evaluation of Taste Using Cell-Based Assay) BIO INDUSTRY シーエムシー出版 32, No.16, 17-24 (総頁数 58p) (2015).
6. 安岡顕人、荒井綜一、阿部啓子：食の三次機能とニュートリゲノミクス PharmaMedica メディカルレビュー社 32, 15-20 (総頁数 135p) (2014. 8 月号).

〔産業財産権〕

- 取得状況（計 1 件）  
名称：生体内の鉄量に関する状態を予測する方法  
発明者：亀井飛鳥、阿部啓子  
権利者：(公財) 神奈川科学技術アカデミー  
種類：公開特許公報 (A)  
番号：特開 2015-228843 (P2015-228843A)  
取得年月日：平成 27 年 12 月 21 日 (2015. 12. 21)  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/member.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 啓子 (ABE, Keiko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授

研究者番号：10151094

### (2) 研究分担者：なし

### (3) 連携研究者

石丸 喜朗 (ISHIMARU, Yoshiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10451840

### (4) 研究協力者：なし