

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18974

研究課題名(和文)ヘテロメリックCALHM1/CALHM3チャネルによる味覚神経伝達

研究課題名(英文)Heteromeric CALHM1/3 in neurotransmission of taste cells

研究代表者

加塩 麻紀子(Kashio, Makiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20631394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：味細胞へのIn vivoでの遺伝子導入は非常に困難であり、これまで効果的な手法は報告されていなかった。

研究代表者グループと生理学研究所との共同研究により、リコンビナントアデノウイルス数種を用いたマウス茸状乳頭味細胞へのIn vivo遺伝子導入を試みた。その結果、アデノウイルスのセロタイプのうち、AAV-DJにおいて最も効果的な遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。また、味細胞のうちI型～III型の細胞腫全てに遺伝子発現が確認されたことから、これらの細胞種のすべてに本手法が適用可能であることが証明された。

研究成果の概要(英文)：This study has been clarified that recombinant adeno virus vector (AAV-DJ) is an effective gene transfer method to apply in all kinds of taste cell types (type I, II, III) in vivo. The result is expected to largely contribute to the reserch of taste function.

研究分野：生理学

キーワード：味覚 ATP イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

飲食物の味は栄養素・毒素の知覚、さらには食の愉楽を通じ生存・生活の質に重要な役割を果たし、動物は「味覚」を発達させてきた。味は味蕾を構成する味細胞で受容されるが、味細胞は G 型細胞に分類される。型味細胞が受容する甘味・苦味・うま味の末梢味覚の分子的理解は G タンパク Gustducin の発見に始まり (Nature 357:563,1992)、その後味受容に関わる遺伝子が次々と同定され (Nature 444:288,2006)、細胞内シグナル伝達系が明らかとなってきた。さらに、活動電位によって非シナプス性に放出される ATP が、求心性味神経へ味覚情報を伝える神経伝達物質であると突きとめられた (Science 310:1495,2005)。Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) は遅発性アルツハイマー病発症関連遺伝子の 1 つとして近年発見され、ホモ 6 量体で非選択性電位依存性イオンチャネルとして機能する (Cell 133:1149,2008; PNAS 109:E1963, 2012)。CALHM1 チャンネルは大きなポア (直径 14.2 Å) をもつ新規 ATP 透過性チャネルであり、味蕾において甘味・苦味・うま味受容を担う型味細胞に選択的に発現し、ATP 放出チャネルとして味覚神経伝達に必須の分子である事が報告された (Taruno et al. Nature 495:223, 2013)。しかし、特に塩味と酸味の受容に寄与する受容体や、細胞内シグナル伝達に関わる分子など、未解明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

味覚機能の分子基盤は、いまだ不明な点が多い。当研究分野の進展を困難としている問題点として、In vivo にて味蕾という構造および味蕾への味神経の走行を保ったままで外来遺伝子を導入し、味覚応答さらには味への嗜好性を評価する手法が確立されていないことがあげられる。そこで本研究では、ウイルスベクターを用いた外来遺伝子導入法を確立することを目的として、検討を行った。

## 3. 研究の方法

各種セロタイプのアデノウイルス (AAV-1, -2, -5, -6, -DJ, DJ/8) およびレンチウイルスを用い、GFP 発現を指標とした導入効率を評価した。マウスを十分な麻酔下で背臥位に固定し、茸状乳頭が存在する舌前部領域の上皮下に微小ガラスキャピラリーを用いて GFP 発現ウイルスベクターを注入、刺入部位を縫合のちマウスを回復させた。感染後に、麻酔下にて灌流固定により舌組織を採取し、抗 GFP および抗味細胞マーカー抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

いずれのウイルスベクターにおいて最も高率にマウス茸状乳頭味細胞への遺伝子導入が可能かを検討した結果、AAV-DJ において KCNQ1 陽性の味細胞に最も高効率の GFP 発現が認められた (図 1)。なお、遺伝子導入後初期では GFP 陽性味細胞はおもに味蕾の基底部に認められたが、感染後の日数を経て次第に頂端部に認められるようになったことから、遺伝子導入された前駆細胞が味細胞へと分化することで GFP 発現 KCNQ1 陽性味細胞が増加すると考えられた。さらに GFP 発現 KCNQ1 陽性味細胞は、感染後 7 日をピークに次第に減少していったことから、味細胞のターンオーバーを反映していることが示唆された。

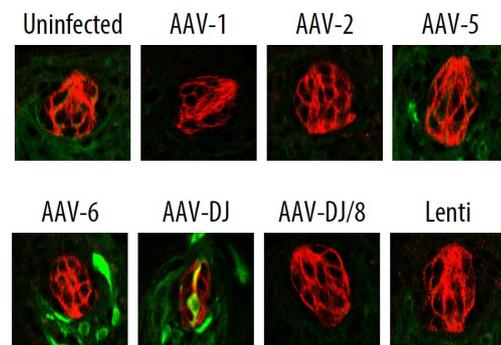


図 1 アデノウイルスおよびレンチウイルスベクターを用いたマウス茸状乳頭への遺伝子導入 (緑; GFP; 赤; KCNQ1 (味細胞マーカー))

さらに、G 型味細胞それぞれへの遺伝子導入効率を、AADC 型味細胞マーカー (phospholipase C $\beta$ 2, PLC $\beta$ 2)、AADC 型味細胞マーカー (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) および両者を発現しない味細胞を G 型味細胞として評価した結果、G 型いずれの味細胞にも GFP 発現が認められた (図 2)。

本研究の成果より、マウス味細胞への遺伝子導入法として、アデノウイルスベクター (AAV-DJ) を用いた手法が有効であること、G 型いずれの味細胞種に対しても遺伝子導入が可能であることを明らかにすることができた。これらの成果は、味覚研究に大きな技術的進歩をもたらすと期待される。今後はさらに、AADC 型味細胞において ATP 遊離チャネルとして機能する CALHM チャンネルを遺伝子導入する系を確立することで、味覚受容における CALHM チャンネル機能の In vivo 評価に展開する予定である。

本検討で得られた成果は、以下の通り本年度に論文発表済みである。

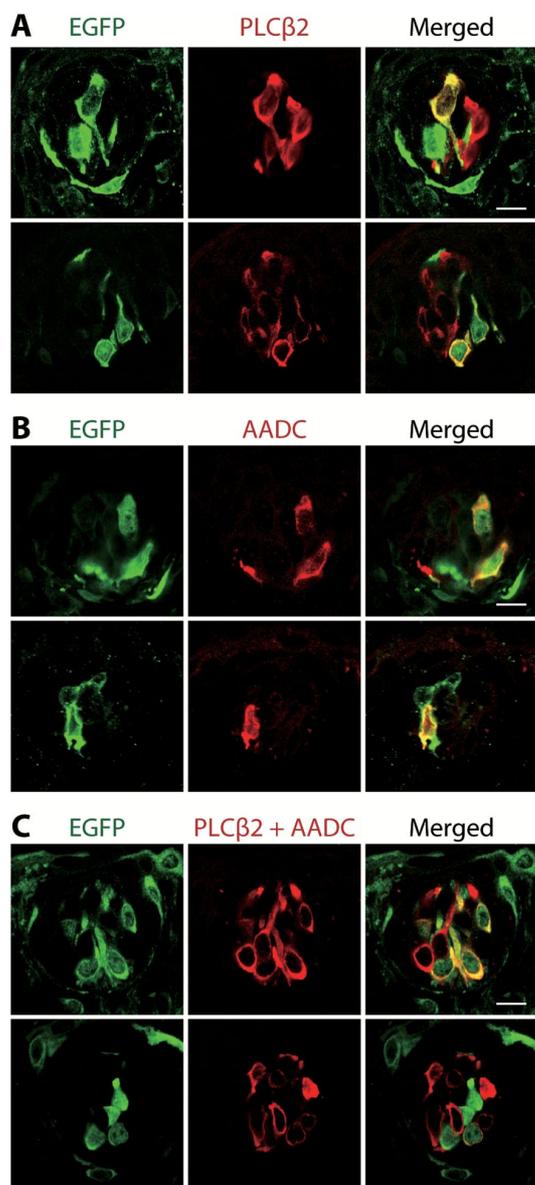


図2 ~ 型味細胞へのアデノウイルス (AAV-DJ) を用いた遺伝子導入  
 遺伝子導入は GFP シグナル (緑) で、PLCβ2 陽性の型味細胞、AADC 陽性の型味細胞及び両者 (いずれも赤シグナル) を発現しない型味細胞のいずれにおいても GFP シグナルが認められた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1) Makiko Kashio and Makoto Tominaga (2017) Corresponding author.

Subcellular localization of TRPM2 determines the fate of cancer cells, apoptosis or survival.

Translational Cancer Research 6(1):S409-S411, Editorial 査読無

2) Akiyuki Taruno\*, Makiko Kashio\*, Hongxin Sun, Kenta Kobayashi, Hiromi Sano, Atsushi Nambu and Yoshinori Marunaka (2016) \*Equally contributed.

Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer into Taste Cells In Vivo. Chemical Senses 42(1):69-78 査読有

3) Guangda Peng\*, Makiko Kashio\*, Tianbang Li, Xiaofeng Dong, Makoto Tominaga and Tatsuhiko Kadowaki (2016) \*Equally contributed.

TRPA1 Channels in Drosophila and Honey Bee Ectoparasitic Mites Share Heat Sensitivity and Temperature-Related Physiological Functions.

Frontiers in Physiology 7:447 査読有

4) Xiaofeng Dong\*, Makiko Kashio\*, Guangda Peng, Yixuan Lin, Chang Liu<sup>1</sup>, Sijing Wang, Li Shen, Tiange Li, Makoto Tominaga and Tatsuhiko Kadowaki (2016) \*Equally contributed.

Isoform-specific modulation of chemical sensitivity of conserved TRPA1 channel in a major honey bee ectoparasitic mite, *Tropilaelaps mercedesae*.

Open Biol. 6(6): 160042 査読有

5) Guangda Peng\*, Makiko Kashio\*, Tomomi Morimoto, Tianbang Li, Jingting Zhu, Makoto Tominaga, and Tatsuhiko Kadowaki (2015) \*Equally contributed.

Plant-Derived Tick Repellents Activate the Honey Bee Ectoparasitic Mite TRPA1. Cell Reports. 12(2):190-202 査読有

[学会発表](計 5 件)

1) 第 94 回日本生理学会大会「CALHM チャネル極性ソーティングの分子基盤解析」加塩麻紀子、樽野陽幸、丸中良典 ポスター発表 (2017 年 3 月 30 日、浜松、浜松アクトシティ)

2) 平成 28 年度 生理研研究会・上皮膜輸送調節蛋白の異常と病態生理学の融合 「上皮細胞における CALHM チャネル非対称性ソーティング機構」加塩麻紀子 口頭発表 (2016 年 11 月 25 日、岡崎、生理学研究所)

3) International Symposium on Olfaction and Taste, JASTS 50th Annual Meeting 「Adeno-associated virus-mediated gene transduction of taste cells in vivo」Akiyuki Taruno<sup>1</sup>\*, Makiko Kashio\*, Hongxin Sun, Kenta Kobayashi, Hiromi Sano, Atsushi Nambu, Yoshinori Marunaka \*Equally contributed. ポスター発表 (2016 年 6 月 8 日、横浜、パシフィコ横浜)

4) International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction.

「Polarized sorting of CALHM channels in epithelial cells」Makiko Kashio, Akiyuki Taruno, Yoshinori Marunaka ポスター発表 (2016年5月21日、京都、京都ホテルオークラ)

5) 第93回日本生理学会大会「CALHM1チャネルの細胞内局在解析」加塩麻紀子、樽野陽幸、丸中良典 ポスター発表 (2016年3月22-24日、札幌、札幌コンベンションセンター)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加塩 麻紀子 ( KASHIO, Makiko )  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20631394

### (2) 研究協力者

樽野 陽幸 ( Akiyuki Taruno )  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：20706824