

令和元年6月4日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08490

研究課題名（和文）PKD2L1カチオンチャネルによる苦味受容機構の解明

研究課題名（英文）PKD2L1 cation channels regulate bitter taste reception

研究代表者

清水 貴浩（SHIMIZU, TAKAHIRO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・准教授

研究者番号：40353437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：マウスから単離したⅢ型味細胞を用いたin vitro解析および二瓶選択嗜好実験やリック解析実験などのin vivo解析により、キニーネ除去後に活性化するPKD2L1チャネルのオフ応答がキニーネに対する苦味の持続性に関与することが示唆された。本研究により、これまで酸味受容に寄与すると考えられていたⅢ型味細胞が、PKD2L1チャネルを介したメカニズムにより苦味も受容する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに複数の味刺激に応答する味細胞が存在することが知られているが、そのメカニズムについては解明されていなかった。本研究において、酸味受容に関わるⅢ型味細胞が、PKD2L1チャネルを介したメカニズムにより苦味刺激にも応答することが明らかになった。これは味覚の受容機構における新たな概念であり、苦味受容における新たな1頁を刻むものと考えられる。本研究で明らかとなったキニーネ除去後に活性化するPKD2L1のオフ応答は、残存する嫌な苦味を生じると考えられることから、この機構の解明が苦味を減弱するためのマスキング剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In vitro experiments using type-III taste cells isolated from mice and in vivo experiments such as two-bottle preference tests and lick tests suggested off responses that PKD2L1 channels are activated after removal of quinine are involved in continuous bitter taste responses to quinine. The present results suggest the possibility that type-III taste cells detecting sour taste may contribute to the bitter taste reception via the PKD2L1-mediated mechanism.

研究分野：生理学

キーワード：PKD2L1 チャネル 味覚受容

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

味覚は、「基本五味」と呼ばれる「塩味」、「甘味」、「酸味」、「苦味」、「うま味」で構成されている。これらの基本味の受容には、味蕾に存在し、型から型に分類される味細胞が重要な役割を果たしている。このうち型味細胞は、7回膜貫通構造をもつG蛋白質共役型味覚受容体 (Taste 1 or 2 receptor: T1R or T2R) を発現しており、甘味・うま味・苦味の受容を担うと考えられている<sup>1</sup>。また型味細胞においては、6回膜貫通構造をもち、transient receptor potential 非選択性カチオンチャネルファミリーに属する polycystic kidney disease 2-like 1 (PKD2L1) と11回膜貫通構造の受容体様蛋白質である PKD1-like 3 (PKD1L3) がイオンチャネル複合体を形成することで酸味受容に寄与することが示唆されている<sup>2</sup>。このように各味細胞の味覚受容には特異性があると考えられていたが、複数の味刺激に応答する味細胞も存在することから<sup>3-5</sup>、味覚受容にはより複雑な制御メカニズムが存在することが示唆されていた。

苦味は有害物を忌避するための味覚であり、他の味覚よりも持続性を示すことが知られているが、これまでに明らかとなっているT2Rを介した苦味受容メカニズムだけでは、刺激除去後も持続する苦味について説明できない。我々がこれまでにに行ったPKD2L1を一過性に発現させたHEK293T細胞を用いたパッチクランプ実験において、ヒトPKD2L1チャネルが苦味標準物質であるキニーネを処理している最中でなく、洗い流した後で活性化するオフ応答を示すことを見出していたことから、型味細胞に発現しているPKD2L1が苦味の持続性に寄与する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、単離味細胞を用いた invitro 実験および二瓶選択嗜好実験やリック解析実験などの in vivo 実験を行い、PKD2L1チャネルのキニーネに対するオフ応答が生体内で苦味受容に寄与しているのかについて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養および遺伝子導入

ヒト胎児腎臓 HEK293T 細胞は、10%牛胎児血清を含む D-MEM 中で培養した。ヒト PKD2L1 をサブクローニングした IRES-GFP ベクターの導入は、リポフェクション法により行い、トランスフェクション 48 時間後の細胞を実験に用いた。遺伝子発現している細胞は、GFP 蛍光により選別した。

#### (2) パッチクランプホールセル記録法

ヒト PKD2L1 を過剰発現させた HEK293T 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、PKD2L1 依存的な非選択性カチオンチャネル電流を観測した。バス溶液の組成は、130 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1 mM EGTA, 40 mM D(-)-mannitol, 10 mM HEPES (pH 7.4) であり、ピペット溶液は 130 mM CsOH · H<sub>2</sub>O, 130 mM L-aspartate, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 2 mM Na<sub>2</sub>ATP, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 7.3) であった。キニーネとデナトニウムはバス溶液に加えた。

#### (3) 動物

本研究において、野生型マウスと PKD2L1 ノックアウトマウスを用いた。すべての動物実験は、富山大学の遺伝子組換え生物等使用実験安全管理委員会および動物実験委員会の審議を経て、富山大学学長から承認を受けて行った。

#### (4) マウス味細胞の単離

各マウスから舌を摘出した後、有郭乳頭近傍の粘膜下組織を酵素処理した後、有郭乳頭を含む上皮を剥離した。剥離した上皮上の有郭乳頭からマイクロピペットを用いて味雷を回収した。トリプシン処理した後、ピペッティングにより味雷は味細胞へ単離した。

#### (5) Ca<sup>2+</sup>イメージング法

マウス単離味細胞に Fura-2 を導入し、AQUACOSMOS/RATIO システムを用いて Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った。コントロール溶液 (regular Tyrode 's solution) の組成は、135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM D(+)-glucose, 10 mM Na-pyruvate (pH 7.3) であった。キニーネとデナトニウムはコントロール溶液に加えた。PKD2L1 を発現している型味細胞は電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルを有するため、high-K<sup>+</sup>溶液による脱分極性細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇を観測し、選別した。high-K<sup>+</sup>溶液の組成は、90 mM NaCl, 50 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM D(+)-glucose, 10 mM Na-pyruvate (pH 7.3) であった。

#### (6) 二瓶選択嗜好実験

野生型マウスと PKD2L1 ノックアウトマウスにおいて、2種類の溶液を提示し、選択的に摂取させる二瓶選択嗜好実験を行った。予め、左右両方の試料瓶から均等に飲むようにトレーニングしたマウスにおいて、15分間あるいは48時間における飲水量を観測した。試料としては、水、キニーネ溶液、デナトニウム溶液を用いた。

#### (7) リック解析実験

野生型マウスと PKD2L1 ノックアウトマウスに溶液を提示した後、10 秒間における総舐め回数と総舐め時間を測定し、味溶液に対する嗜好性を比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト PKD2L1 チャネルの苦味物質感受性

ヒト PKD2L1 を過剰発現させた HEK293T 細胞にホールセルパッチクランプ記録法を適用し、PKD2L1 チャネル電流に対する各種苦味物質（キニーネ、カフェイン、デナトニウム、ベルベリン）の効果について検討した。PKD2L1 チャネル電流はキニーネを作用させても変化しなかったが、キニーネを除去した際に一過性の電流亢進が観測された。またカフェインを除去した際にも PKD2L1 チャネル電流は亢進したが、デナトニウムやベルベリンでは、作用後の電流亢進が観測されなかった。以上の結果から、ヒト PKD2L1 チャネルは、デナトニウムやベルベリンではなく、キニーネやカフェインに対してオフ応答（除去後の活性化）を示すことが明らかとなった。

#### (2) マウス 型味細胞の苦味物質感受性

マウスから単離した味細胞に Fura-2 を用いた  $Ca^{2+}$  イメージング法を適用し、PKD2L1 が発現している 型味細胞の苦味物質感受性について検討した。型味細胞は、脱分極刺激時の  $Ca^{2+}$  応答により選別した。興味深いことに、野生型マウスから単離した 型味細胞において、キニーネ処理中ではなく除去後に緩やかな  $Ca^{2+}$  応答が観測された。一方、PKD2L1 ノックアウトマウス由来の 型味細胞においては、キニーネを除去しても緩やかな細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇は生じなかった。この結果から、キニーネ除去後の  $Ca^{2+}$  応答が PKD2L1 依存性であると考えられた。またデナトニウムを作用させた場合においては、野生型マウスや PKD2L1 ノックアウトマウスから単離した 型味細胞のどちらも緩やかな  $Ca^{2+}$  応答を示さなかった。これらの苦味物質感受性は、PKD2L1 チャネル電流の感受性と一致していたことから、型味細胞に発現している PKD2L1 チャネルが、これら苦味物質による  $Ca^{2+}$  応答を担っていることが示唆された。

#### (3) PKD2L1 を介した苦味受容解析

*In vitro* 実験において観察された PKD2L1 チャネルの苦味応答が、生体における苦味受容に寄与しているかを検討するため、*In vivo* 実験を行った。48 時間で観察した二瓶選択嗜好実験において、野生型マウスと PKD2L1 ノックアウトマウスの両方がキニーネに対して同等な忌避応答を示した。次に短時間二瓶選択嗜好実験を行い、15 分間での飲水量を比較した。この実験条件において、野生型マウスはキニーネ摂取後に水を忌避したが、PKD2L1 ノックアウトマウスはキニーネ摂取後においてもキニーネを忌避した。さらにリック解析実験を行い、10 秒間における舐め回数と舐め時間を測定した。野生型マウスにおいて、キニーネを提示した後に水を提示すると、水の舐め回数と舐め時間が共に減少した。一方、PKD2L1 ノックアウトマウスにおいては、キニーネの後に水を提示すると、水の舐め回数と舐め時間が増加した。これらの結果から、短時間の溶液提示においては、野生型マウスは水を忌避するが、PKD2L1 ノックアウトマウスはキニーネを忌避することが明らかとなった。したがって、これらの忌避応答の違いが PKD2L1 チャネルのキニーネに対するオフ応答の有無に起因する可能性が示唆された。

またデナトニウムを用いた 48 時間の二瓶選択嗜好実験においては、キニーネの場合と同様、野生型マウスと PKD2L1 ノックアウトマウスの両方がデナトニウムを同等に忌避した。一方、短時間二瓶選択嗜好実験やリック解析実験では、キニーネの場合と異なり、野生型マウスと PKD2L1 ノックアウトマウスの両方がデナトニウムを忌避した。これらの結果から、PKD2L1 チャネルはデナトニウムに対する忌避応答には寄与しない可能性が示唆された。

#### (4) 総括

本研究において、パッチクランプホールセル記録法により、PKD2L1 が苦味物質の中でもキニーネとカフェインに対してオフ応答を示すカチオンチャネルであることが明らかとなった。またマウス単離 型味細胞を用いた  $Ca^{2+}$  イメージング実験、短時間二瓶選択嗜好実験やリック解析実験など *in vivo* 実験から、キニーネ除去後に生じる PKD2L1 のオフ応答によりキニーネの苦味が持続する可能性が示唆された。この結果は、PKD2L1 を発現している 型味細胞が苦味受容を担うといった新たな概念の創出につながることを期待される。

#### < 引用文献 >

1. Niki et al., Biol Pharm Bull. 33:1772-1777, 2010
2. Ishimaru, Biosci Biotechnol Biochem. 79:171-176, 2015
3. Caisedo et al., J Physiol. 544:501-509, 2002
4. Yoshida et al., J Neurophysiol. 96:3088-3095, 2006
5. Tomchik et al., J Neurosci. 27:10840-10848, 2007

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Okada Y, Okada T, Sato-Numata K, Islam MR, Ando-Akatsuka Y, Numata T, Kubo M, Shimizu T, Kurbannazarova RS, Marunaka Y, Sabirov RZ. (2019) Cell Volume-Activated and Volume-Correlated Anion Channels in Mammalian Cells: Their Biophysical, Molecular, and Pharmacological Properties. *Pharmacol Rev.* 71: 49-88. 査読有 doi: 10.1124/pr.118.015917.
2. Fujii T, Shimizu T, Yamamoto S, Funayama K, Fujita K, Tabuchi Y, Ikari A, Takeshima H, Sakai H. (2018) Crosstalk between Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and a volume-regulated anion channel in membrane microdomains of human cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1864: 3792-3804. 査読有 doi: 10.1016/j.bbadis.2018.09.014.
3. Shimizu T, Higuchi T, Toba T, Ohno C, Fujii T, Nilius B, Sakai H. (2017) The asparagine 533 residue in the outer pore loop region of the mouse PKD2L1 channel is essential for its voltage-dependent inactivation. *FEBS Open Bio.* 7: 1392-1401. 査読有 doi: 10.1002/2211-5463.12273.

〔学会発表〕(計20件)

1. Shimizu T, Yanase N, Fujii T, Sakakibara H, Sakai H. The regulation of TRPV1 channel gating by intracellular ATP. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (9th FAOPS Congress). 2019年3月28-31日. 神戸
2. 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀. 生体界面における TMEM16F 蛋白質の機能. 第10回生体界面研究会. 2019年2月28日-3月1日. 東京
3. Shimizu T, Fujii T, Sakai H.. An asparagine residue in the outer pore loop regulates the voltage-dependent inactivation of PKD2L1 channels. The 49th NIPS International Symposium (Ion channels: looking back, seeing ahead). 2018年12月5-8日. 岡崎
4. 埴田佳佑, 清水貴浩, 篠崎稜, 藤井拓人, 酒井秀紀. PKD2L1 チャネルの細胞内 Ca<sup>2+</sup>上昇を介した苦味受容機構. 日本薬学会北陸支部第130回例会. 2018年11月18日. 富山
5. 篠崎稜, 清水貴浩, 藤井拓人, 高村雄策, 西条寿夫, 酒井秀紀. PKD2L1 ノックアウトマウスを用いた苦味受容の *in vivo* 解析. 日本薬学会北陸支部第130回例会. 2018年11月18日. 富山
6. Kawashima K, Shimizu T, Fujii T, Sakai H. The functional regulation of volume-sensitive anion channels by LRRC8E. The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (3rd TAA-Pharm Symposium). 2018年9月10-12日. 富山
7. 清水貴浩, 鍋島彰太, 小澤茂喜, 藤井拓人, 酒井秀紀. TMEM16F のチャネルゲーティングによるリン脂質輸送の制御. 2018年度生理研研究会「体内環境の維持機構における上皮膜輸送の多角的・統合的理解」. 2018年9月6-7日. 岡崎
8. 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀. Transmembrane channel-like protein (TMC) 4 の電気生理学的解析. 第95回日本生理学会大会. 2018年3月28-30日. 高松
9. 川島健太郎, 大野智恵, 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀. 細胞容積調節性アニオンチャネルの構成因子 LRRC8E の機能. 日本薬学会北陸支部第129回例会. 2017年11月26日. 金沢
10. 柳瀬宣広, 清水貴浩, 藤井拓人, 榊原陽香, 酒井秀紀. TRPV1 チャネルの外向き電流に対する細胞内 ATP の効果. 日本薬学会北陸支部第129回例会. 2017年11月26日. 金沢
11. 松田夏穂, 清水貴浩, 藤井拓人, 富井寿詠, 酒井秀紀. 細胞容積調節機構に關与するアニオンチャネルの機能制御分子. 日本薬学会北陸支部第129回例会. 2017年11月26日. 金沢
12. 鍋島彰太, 清水貴浩, 藤井拓人, 小澤茂喜, 酒井秀紀. TMEM16F 変異体のリン脂質スクランブラーゼ活性とアニオンチャネル機能の解析. 第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2017年10月26-27日. 金沢
13. 清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 酒井秀紀. TMEM16F の機能的多様性の連関機構の解析. 第64回中部日本生理学会. 2017年10月6-7日. 甲府
14. 清水貴浩, 樋口大河, 藤井拓人, Bernd Nilius, 酒井秀紀. PKD2L1 チャネルのポア外側領域が電位依存的不活性化に寄与する. 第94回日本生理学会大会. 2017年3月28-30日. 浜松
15. 清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 酒井秀紀. ヒト TMEM16F 蛋白質のイオン・リン脂質輸送機能における連関. 第6回生体界面研究会. 2017年2月9-10日. 金沢
16. 鍋島彰太, 清水貴浩, 藤井拓人, 小澤茂喜, 酒井秀紀. TMEM16F のイオンチャネル開閉によるリン脂質スクランブラーゼ機能の制御. 日本薬学会北陸支部第128回例会. 2016年11月27日. 金沢
17. 鳥羽俊弘, 清水貴浩, 藤井拓人, 酒井秀紀. PKD2L1 チャネルに対する香辛料成分の効果. 日本薬学会北陸支部第128回例会. 2016年11月27日. 金沢

18. 清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 酒井秀紀. TMEM16F におけるイオンチャンネル機能とリン脂質スクランブラーゼ機能の相関性. 2016 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」. 2016 年 11 月 24-25 日. 岡崎
19. 清水貴浩, 鍋島彰太, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 酒井秀紀. TMEM16F が有するイオンチャンネル機能/リン脂質スクランブラーゼ機能. 第 63 回中部日本生理学会大会. 2016 年 11 月 4-5 日. 岡崎
20. Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, Tabuchi Y, Sakai H. Butyrate induces apoptosis via activation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in mouse colonic epithelial MCE301 cells. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (1st TAA-Pharm Symposium). 2016 年 9 月 12-13 日. 富山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

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

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-tooyama.ac.jp/phaphy1/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。