

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月10日現在

機関番号：34315
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K18991
研究課題名(和文) 味蕾における塩味コーディング様式の解明

研究課題名(英文) Salty taste coding in the taste bud

研究代表者

孫 紅キン (Sun, Hongxin)

立命館大学・総合科学技術研究機構・研究員

研究者番号：20773542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧症の誘因として過剰摂取が問題となる食塩のおいしさを司るENaC依存性塩味受容の細胞分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。発現解析では、ENaCのポア形成サブユニットが従来から知られている味細胞集団とは異なる細胞集団に発現していること、さらにはENaC発現細胞において興奮性を司るタンパク質群の発現を見出し、機能解析でこれらの分子機能を観察することに成功し、塩味受容細胞の細胞内シグナル・神経伝達のメカニズムを示唆する結果を得た。また、細胞種選択的なENaCノックアウトマウスの作出にも成功し、味覚行動実験・神経応答記録などを用いて同定した塩味細胞の役割を個体レベルで検証を始めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚は我々の食行動を調節するため、高血圧・肥満・糖尿病・脂質異常症などの多くの生活習慣病の発症や進行に深く関わる。本研究は、高血圧症に関わる食塩摂取量を調節する塩味感覚についての現在の最重要課題『味蕾における塩味受容の細胞基盤の解明』に資する結果を得た。今後、本研究成果を足がかりに塩味受容の細胞分子メカニズムが明らかになれば、塩味感覚のコントロールのための分子標的が与えられ、創薬や食品科学など多分野の研究開発の促進につながり、ひいては高血圧症予防によって国民の健康増進に資することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We studied to elucidate the molecular mechanism of ENaC-dependent salty taste acceptance, which determines the taste of salt, leads to excessive salt intake and induces hypertension. In expression analysis, we found that the pore-forming subunit of ENaC is expressed in a cell type different from the conventionally known taste cell, and furthermore, the expression of a group of proteins responsible for excitability in ENaC-expressing cells. We succeeded in observing these molecular functions in functional analysis, and obtained results suggesting the mechanism of intracellular signaling and neurotransmission of salty taste receptor cells. We have also succeeded in creating ENaC knockout mice that are selective for cell types, and have begun to verify the role of salty taste cells identified using taste behavior experiments, neural response recording, etc. on an individual level.

研究分野：生理学

キーワード：味覚 塩味 イオンチャネル ENaC

1. 研究開始当初の背景

我が国の高血圧症患者数は900万人に登り、成人の死因上位を占める脳心血管障害の発症と進展に深く関与している。また毎年、高血圧性疾患治療が国民医療費の約5%、1.9兆円を占めている。食塩(NaCl)の摂取過多が高血圧の牽引であることがよく知られるが、これは我々が食塩を「おいしい」と感じることに原因がある。実際、日本人の平均塩分摂取量(10.7g)は日本高血圧学会の減塩目標値(6g)を大きく上回る。したがって、食塩摂取に深く関わる舌で塩味を受容するメカニズムの全容解明には予防医学的観点からも社会的希求がある。

味蕾における塩味受容にはアミロライド感受性機構が関与することが知られていたが、近年その分子実体が上皮型Na⁺チャンネル(ENaC)であることが突き止められた。しかしながら、味蕾細胞(味細胞)中での塩味情報の処理メカニズムおよび求心性味神経への神経伝達メカニズムは未解明であった。まず、異なる細胞内シグナル分子を発現するヘテロな細胞集団である味蕾において塩味受容を担う細胞の特徴が未解明であり、塩味受容の細胞基盤の解明が当時の塩味研究の最重要課題であった。

それまで、塩味受容の細胞基盤に関しては幾つかの矛盾した結果が報告されていた。塩味受容細胞は塩味刺激に応答して活動電位を発生させるという報告の一方、味蕾細胞はI・II・III型の3種類に分類されるが、活動電位を発生しないグリア細胞様の形態と機能をもつI型細胞が塩味受容細胞であるという報告があり、未解決であった。

2. 研究の目的

本研究では、II型味細胞の一部が塩味受容の細胞基盤を形成しているという仮説のもと、コンディショナル・ターゲティングを用いたリバース・ジェネティクス的手法を駆使して味蕾における塩味受容の細胞基盤を明らかにし、さらに我々が日常的に経験する塩味が惹き起こす味覚現象の分子メカニズムの解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変動物の作出

ENaC α -floxed および ENaC β -floxed マウス胚を EMMA mouse repository より購入し、別に購入した偽妊娠マウスに移植を行い個体の作出を行った。2系統のうち、ENaC α -floxed 系統のみ個体化に成功し続くコンディショナルマウス作出のため、味細胞に発現する遺伝子 X のプロモーターによる Cre リコンビナーゼドライバーマウスとの交配を行った。

また、ENaC のポア形成 α サブユニット発現味細胞の機能解析を行うため、ENaC α プロモータの下流で Cre を発現する ENaC α -Cre マウスと、Jackson Laboratory から購入した Cre-loxP システムによる GCaMP3 ドライバーマウス系統 Ai38 を交配し、ENaC α プロモータの下流で GCaMP3 を発現する ENaC α -GCaMP3 マウスの作出を行った。

(2) 電気生理実験

急性単離した味細胞におけるパッチクランプ法による全細胞電流測定を行った。

(3) 組織免疫蛍光染色

4% paraformaldehyde で固定した舌組織切片を用いて、蛍光抗体法を用いて、目的タンパク質の染色をおこなった。

4. 研究成果

まず、ENaC コンディショナルノックアウトマウスの作出については、胚からの個体作出に成功した ENaC α サブユニットについてのみ行った。入手した ENaC α -floxed マウスと保有している味細胞に発現する遺伝子 X の Cre ドライバー系統 X-Cre マウスと交配を繰り返し、ENaC α ^{flox/flox};X^{+/-Cre} マウスおよび対照群として使用する ENaC α ^{flox/flox};X^{+/+} マウスの作出に成功した。それぞれ10匹以上のマウスの作出が完了したので、今後の味覚嗜好性に関する行動実験や味神経応答記録実験を行う準備ができた。マウスの個体化にトラブルがあり大幅に遅れてしまったため、この点は計画通り遂行できなかった部分であるが、今後計画通りの内容の解析ができる状況である。

一方、発現解析であるが、ENaC α -GCaMP3 マウスから単離した GCaMP3 陽性味細胞で全細胞電流記録を行ったところ、電位依存性 Na⁺チャンネル電流を記録することができた。これは塩味受容細胞が興奮性を有するという先行研究を支持する結果であった。さらに、これまで ENaC は既知の味細胞種である I 型・II 型・III 型細胞のうち、I 型味細胞に発現すると考えられてきた。しかし、組織免疫蛍光染色によってこれまでの細胞分類に収まらない遺伝子 X を発現する細胞集団を特定し、ここに ENaC α が発現し、さらには ENaC 電流が記録できることを明らかに

した。

以上の結果から、塩味受容を担うと考えられる新しい味細胞集団を特定することに成功した。作出に成功した ENaC α コンディショナルノックアウトマウスを用いて、将来この新しい味細胞集団の塩味受容における詳細な寄与を解析することができる。本研究成果を足がかりに今後塩味受容細胞内におけるシグナル伝達メカニズムの解明が進むと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 8 件)

Bioconjugation strategy for cell surface labelling with gold nanostructures designed for highly localized pH measurement. Puppulin L, Hosogi S, Sun H, ... Marunaka Y; *Nature Communications*; 2018 11;9(1):5278. DOI: 10.1038/s41467-018-07726-5

Post-translational palmitoylation controls the voltage gating and lipid raft association of the CALHM1 channel. Taruno A, Sun H, Nakajo K, Murakami T, Ohsaki Y, Kido MA, Ono F, Marunaka Y; *Physiol (London)* 595(18):6121-6145, 2017. DOI: 10.1113/JP274164

Actions of quercetin, a polyphenol, on blood Pressure. Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Inui T, Taruno A; *Molecules* 22(2). pii: E209, 2017. DOI: 10.3390/molecules22020209

Raman micro-spectroscopy as a viable tool to monitor and estimate the ionic transport in epithelial cells. Puppulin L, Pezzotti G, Sun H, Hosogi S, Nakahari T, Inui T, Kumamoto Y, Tanaka H, Marunaka Y; *Scientific Reports* 7(1):3395, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-03595-y

Adeno-associated virus-mediated gene transfer into taste cells in vivo. Taruno A, Kashio M, Sun H, Kobayashi K, Sano H, Nambu A, Marunaka Y; *Chemical Senses* 42(1):69-78, 2017. DOI: 10.1093/chemse/bjw101

Analysis of aprotinin, a protease Inhibitor, Action on the Trafficking of Epithelial Na⁺ Channels (ENaC) in Renal Epithelial Cells Using a Mathematical Model. Sasamoto K, Marunaka R, Niisato N, Sun H, Taruno A... Marunaka Y; *Cell Physiol Biochem* 41:1865-1880, 2017. DOI: 10.1159/000471934.

Quercetin is a useful medicinal compound showing various actions including control of blood pressure, neurite elongation and epithelial ion transport. Marunaka Y, Niisato N, Miyazaki H, Nakajima KI, Taruno A, Sun H, Marunaka R, Okui M, Yamamoto T, Kanamura N, Kogiso H, Ikeuchi Y, Kashio M, Hosogi S, Nakahari T; *Current Med Chem* 23:1-12, 2016. DOI: 10.2174/0929867323666160919095043

Na⁺ homeostasis by epithelial Na⁺ channel (ENaC) and Nax channel (Nax): cooperation of ENaC and Nax. Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Taruno A; *Annals of Translational Medicine* 4 (Suppl 1):S11, 2016. DOI: 10.21037/atm.2016.10.42

〔学会発表〕 (計 8 件)

Involvement of EP receptors in the regulation of Short circuit current by prostaglandins in A6 cells. Sun H ; Marunaka Y ; Asano S. The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2019.

Regulation of CALHM1 channel gating and association with lipid microdomains by protein S-palmitoylation. Sun H, Taruno A, Nakajo K, Ono F, Marunaka Y. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2018.

S-Palmitoylation of CALHM3 positively controls activity of the CALHM1/3 channel. Okui M, Sun H, Taruno A, Marunaka Y. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2018.

S-Palmitoylation of CALHM3 positively controls activity of the CALHM1/3 channel. Okui M, Sun H, Taruno A, Marunaka Y. 第 110 回近畿生理学談話会. 2017.

The cytosolic ionic concentration gradients in the cytosolic space of aldosterone-treated renal epithelial cells detected by Raman Spectroscopy. Puppulin L, Sun H, Marunaka Y. 第 110 回近畿生理学談話会. 2017.

Raman spectroscopy as a viable tool to monitor the effect of aldosterone on A6 renal epithelial cell. Puppulin L, Pezzotti G, Sun H, Hosogi S, Nakahari T, Kumamoto Y, Tanaka H, Marunaka Y. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.

Palmitoylation regulates gating and lipid raft association of CALHM1 channel. Sun H, Taruno A, Nakajo K, Ono F, Marunaka Y. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.

Insulin is involved in transcriptional regulation of NKCC and the CFTR Cl⁻ channel through PI3K activation and ERK inactivation in renal epithelial cells. Sun H, Niisato N, Marunaka Y. International Symposium on Ion Channels, Transporters and Signal Transduction. 2016

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。