

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11201
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K06735
研究課題名(和文)"Too Much Salty"を感じる新規味覚受容体遺伝子の同定

研究課題名(英文)Gastatory receptor for aversive high salt

研究代表者

若林 篤光(Wakabayashi, Tokumitsu)

岩手大学・理工学部・助教

研究者番号：30332498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々が見いだした、高濃度塩類溶液に対する不快な塩味の受容体候補遺伝子の味蕾における発現を検討したところ、受容体候補遺伝子は味蕾内の特定のタイプの味細胞に発現していた。マウスの味蕾を用いてカルシウムイメージングによって味物質への応答を解析したところ一部の候補遺伝子発現味細胞は高濃度塩味に反応したが、その頻度は低く、さらなる検討を要する結果となった。マウスの高濃度塩味受容体候補分子の機能を、線虫発現系を用いて調べたところ、受容体候補遺伝子を導入した線虫において、候補分子依存的な塩味反応が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれヒトを含む高等動物は、基本五味と呼ばれる5つの味、すなわち、甘味、うま味、苦味、酸味、塩味を感じるとされている。これらのうち、塩味を除く4種の味については味覚受容の分子機構が明らかになっているが、塩味、とりわけ高濃度の塩類溶液を口にした時に感じる不快な塩味の受容機構については不明である。本研究では、我々が見出した高濃度塩味受容体の候補分子が味蕾中の味細胞に発現することを示し、また候補分子が塩類溶液に反応する分子であることを示した。本研究は味覚受容機構の未解明の領域を明らかにする基礎研究である。

研究成果の概要(英文)： We examined the expression of candidate gustatory receptor involved in aversive high salt perception and observed that the candidate receptor was expressed in the taste receptor cells. In our physiological studies using mouse taste bud, taste receptor cells expressing our candidate receptor rarely respond taste stimuli including high salt. It should be examined further.

We conducted exogenous expression experiments using *Caenorhabditis elegans* as a host animal. The transgenic *C. elegans* harboring mouse candidate receptor revealed that the molecule can respond to salt stimulus.

研究分野：感覚受容

キーワード：化学感覚 味覚 味細胞 線虫発現系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物にとって味覚は、食物の栄養価、毒性等の性質を評価し、摂取すべきかどうかを判断する、きわめて重要な感覚である。ヒトをはじめとする哺乳類の味覚は、基本五味と呼ばれる5つの味(甘味、苦味、うま味、酸味、塩味)の組み合わせによって生じるとされる。基本五味の受容機構のうち、甘味、苦味、うま味の受容体がGPCR(Gタンパク質共役型受容体)であることは2000年代の初頭に相次いで明らかになっている。また最近になって、酸味の受容体であるイオンチャンネルが明らかとなった。一方、塩味の受容機構に関しては有力な候補分子はあるものの、確定的な結論は出ていない。

塩味は、調理に使用する程度の低濃度では好ましい味として感じられ、一方で海水レベルの高濃度では、口に含んだ際には不快な味として感じられる。これまでの研究により、低濃度塩味と高濃度塩味は、それぞれ異なる味細胞が受容すると考えられている。このとき、好ましい低濃度塩味の受容には上皮型ナトリウムイオンチャンネル(ENaC)が受容体として中心的な役割を果たすことが強く示唆されているが、高濃度の食塩に対する不快な塩味の分子レベルの受容機構については全くわかっていない。

最近我々は、マウスの高濃度塩味の受容に関与する可能性の高い、受容体候補分子を見出し、当該遺伝子の変異マウスが味覚応答行動に異常を示すことを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が独自に見出した味覚受容体候補遺伝子が、(1)味覚受容細胞(味細胞)に発現しているか、(2)またその味細胞が塩味に対し応答するか、(3)候補遺伝子産物が分子レベルで生理学的に塩味に応答する能力を持つかなどを検討し、当該遺伝子が味覚受容体であるかどうかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Cre ノックイン(KI)マウスとレポーターマウスを用いた発現部位の検討

本研究に先立って我々は、ゲノム編集によって目的遺伝子の終止コドンを Cre リコンビナーゼで置換したノックインマウス系統を作製した(ゲノム編集は外部委託)。本研究では、このマウスを Iox-GCaMP3 レポーターマウス系統(Cre 依存的にカルシウムセンサー型組換えタンパク質を発現する)と交配して得られたマウスから舌を摘出・固定し、凍結切片を作製したうえで、免疫組織化学的手法を用いて味蕾における目的遺伝子の発現を検討した。

(2) CreKI x GCaMP3 マウスを用いた候補遺伝子発現味細胞の味覚応答の直接計測

上記の交配後のマウスから舌を摘出し、酵素処理を行うことで舌上皮を剥離した。剥離した舌上皮に含まれる味蕾に対し、吉田らが開発した味蕾の直接刺激、記録法を用いて、種々の味刺激に対する目的遺伝子を発現する味細胞の味応答をカルシウムイメージングによって解析した。

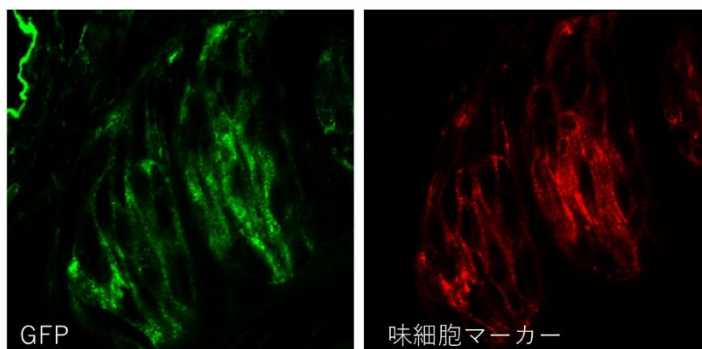
(3) 線虫発現系を用いた分子機能の解析

外来発現系として線虫を使用し、線虫の化学感覚神経細胞のうち、本来であれば、塩類溶液に対して応答しない細胞に特異的にマウスの高濃度塩味受容体候補遺伝子を発現する組換え遺伝子を構築し、カルシウムセンサー型組換えタンパク質(jGCaMP7s)発現プラスミドと共に線虫に導入した。得られたトランスジェニック線虫に対して高濃度塩刺激を行い、神経細胞の応答を観察した。

4. 研究成果

(1) Cre ノックイン(KI)マウスとレポーターマウスを用いた発現部位の検討

哺乳類の舌に存在する味覚受容器である味蕾の一つ一つには、約100個の細胞が含まれ、それら細胞は形態学的特徴からI型味細胞



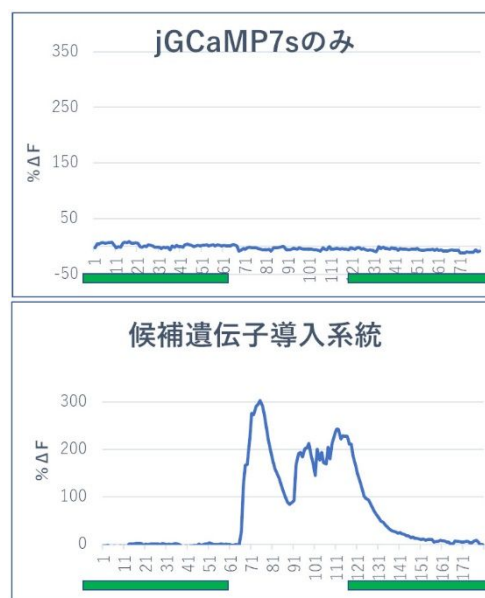
~ IV 型味細胞の 4 種類に分類される。我々は標記マウスの舌の茸状乳頭、有郭乳頭切片に対し、GCaMP3 に反応する GFP 抗体および各タイプの細胞のマーカー抗体を用いた 2 重染色実験を行うことで、我々の注目する味覚受容体候補遺伝子が、味細胞に発現するかどうかについて検討した。この結果、候補遺伝子は茸状乳頭、有郭乳頭の両方で特定のタイプの味細胞に発現することが示された。この結果は目的遺伝子が味覚受容に関与することを示唆する結果であるといえる。

(2) CreKI × GCaMP3 マウスを用いた候補遺伝子発現味細胞の味覚応答の直接計測

標記のマウスから剥離舌上皮サンプルを得て、味孔側からのみ味物質を投与する方法で味蕾を刺激し、GCaMP3 を用いたカルシウムイメージング法によって候補遺伝子陽性細胞の味応答について検討した。実験を行ったいくつかの味蕾の陽性細胞において 300mM NaCl 刺激に対する応答は観察されたが、その頻度は必ずしも高くはなかった。ただし、現在の測定条件下では目的遺伝子の陽性細胞は比較的不安定な(壊れやすい)傾向が認められたため、測定条件には改善の余地があるかもしれない。

(3) 線虫発現系を用いた分子機能の解析

遺伝子導入により、線虫の化学感覚神経のうち、本来は塩類溶液に反応しない細胞において、マウス由来の高濃度塩受容体候補分子とカルシウムセンサー型組換えタンパク質 jGCaMP7s を共発現するトランスジェニック線虫系統を作製した。この線虫に対し 300mM NaCl 刺激を行ったところ、線虫の感覚神経は塩味刺激の除去時に興奮性の応答を示した。このような応答は jGCaMP7s のみを導入した線虫では観察されず、候補分子の導入に依存적であった。このことは本分子が細胞外からの塩味刺激に反応し得る分子であることを強く示唆している。今後は、塩刺激の投与時ではなく除去時に反応した点に関し、線虫の神経細胞内の情報処理機構の問題であるのか、受容体候補遺伝子自身の性質であるのかについて検討していく必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 欣郎 (Yamamoto Yoshio) (10252123)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	
研究分担者	吉田 竜介 (Yoshida Ryusuke) (60380705)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関