

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18458

研究課題名(和文) アミノ酸輸送体を介した新規アミノ酸味覚受容機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of amino acids sensing via amino acid transporters as T1R-independent mechanisms in mouse gustatory tissues

研究代表者

岩田 周介 (Shusuke, Iwata)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60780062

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)：RT-PCR及び、qPCRの結果、本来腸管で機能する複数のアミノ酸輸送体が、マウス舌前方の味覚受容に關与する茸状乳頭、および舌後方における味覚受容に關与する有郭乳頭にも発現していることが明らかになった。野生型マウスを用いたマウス鼓索神経(舌前方部を支配)応答解析の結果、マウス舌のアミノ酸輸送体阻害薬前処理により、輸送体と親和性の高いアミノ酸に得意的な応答の減少が認められた。また10mM NaClの添加により、これらのアミノ酸では応答の増強が認められ、阻害薬処理により消失したことから、Na共輸送体の関与が示唆された。さらに舌咽神経(舌後方部)、うま味受容体欠損マウスでも同様の結果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸は生体を形作るタンパク質の構成成分として必要不可欠な物質であり、現時点でうま味受容体T1R1/T1R3が唯一のアミノ酸の味覚受容体として報告されている。その一方で、うま味情報はアミノ酸要求を生じる情報として重要性は低く、T1R1/T1R3の必須アミノ酸に対する親和性は低いことが報告されており、未知の味覚受容体が關与している可能性が示唆されていた。本研究により、アミノ酸輸送体が新規のアミノ酸味覚受容体として機能しており、さらに我々が先に報告した糖輸送体と同様にメタボリックセンサーKATPチャネルを介したカロリー受容系シグナル経路として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that T1R1/T1R3 plays an important role in umami taste detection, but T1R3- or its downstream molecules TRPM5- knockout (KO) mice shows residual responses of gustatory nerve to Amino acids. It suggests there are multiple receptors and transduction pathways for amino acids responses. We found a neutral amino acid transporters localized in the plasma membrane of several body districts also expressed in mouse taste buds. Moreover, its inhibitor reduced gustatory nerve responses to several amino acids both in C57BL6J mice and T1R3-KO mice. Taken together, not only T1R1/T1R3 but also a neutral amino acid transporters may also function as taste receptor of amino acids.

研究分野：味覚

キーワード：アミノ酸トランスポーター 味覚 神経 うま味 甘味

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸は、生体の約 20%をしめるタンパク質の構成成分として必要不可欠な物質である。その中でも、特に必須アミノ酸(Essential amino acid; EAA)と呼ばれる 9 種類のアミノ酸に関しては、体内で合成不可、あるいははわずかにしか合成されないため、生体を維持するために絶えず外環境から摂取する必要性がある。

外環境から物質を摂取する際に、味覚は極めて重要な役割を果たす。体に取り入れるべき物質である炭水化物やアミノ酸に対して、それぞれ甘味受容体やうま味受容体を介して嗜好性行動(摂食)を、逆に毒物や腐敗に伴う苦味や酸味に対しては受容体を介して忌避性の行動を生じる。さらには、味覚の受容によって、唾液や消化液の分泌や、ホルモンなどの調節系による生体恒常性の維持が行われている(Iwata S et al., 2014)。アミノ酸の受容体として、うま味受容体 T1R1/T1R3 が舌味蕾上に発現しており、主にうま味物質と呼ばれるグルタミン酸やイノシン酸、グアニル酸などを受容すること(Nelson G et al., 2002)が報告されている。特に、グルタミン酸とイノシン酸の混合により生じるうま味の相乗効果は、T1R1/T1R3 とグルタミン酸の結合を、イノシン酸が安定化させることにより引き起こされると考えられている(Zhang F et al., 2008)。また、甘味を呈するアミノ酸は、甘味受容体 T1R2/T1R3 で受容されることがわかっている(Nelson G et al., 2002)。一方で、甘味・うま味受容体に低親和性を示すアミノ酸に関しては、その味覚受容機構が存在するののかについて明らかになっていない。特に、先述した必須アミノ酸などの T1Rs に対する親和性は決して高くない(Toda Y et al., 2013)ことが報告されている。

### 2. 研究の目的

そこで、申請者は[1]甘味・うま味シグナル伝達経路以外にも、必要時に摂取を促すアミノ酸シグナル伝達経路が存在するのではないかという疑問を抱いた。T1R3 の遺伝子欠損 (T1R3-KO) マウスでは、糖やアミノ酸に対する応答が完全には消失せず、ある程度残存すること(Damak S et al., 2003; Inoue M et al., 2007; Lemon CH and Margolskee RF., 2009)が報告されている。さらに近年になり甘味受容経路では、腸や膵臓で機能する糖輸送体、KATP チャネル、消化管ペプチドが甘味受容細胞にも発現すること (Yee K et al., 2011)や、腸で二糖類の分解に働く - グルコシダーゼが甘味受容細胞にも発現し、単糖への分解と、その受容に関与すること (Sukumaran SK, Yee K, Iwata S et al., 2016) が明らかになっている。申請者らの最新の研究から、ナトリウムとグルコースの共輸送に働くナトリウム・グルコース共役輸送体(SGLT) 1 が、主に単糖類の甘味受容に関与し、0.01M NaCl の添加により甘味応答の増強を生じること (Yasumatsu L., 2020)がわかった。そこで、アミノ酸でも同様に、腸でアミノ酸の吸収を行うアミノ酸輸送体(Pochini L et al., 2014)が味蕾にも発現しているのではないかと予想した。次に、この[2]新規アミノ酸シグナル伝達経路が味細胞で機能しているとするならば、どのような役割を担っているのかが疑問として浮かび上がった。摂食抑制ホルモン：レプチン(Lep)の甘味抑制効果は KATP チャネルを介して引き起こされること (Yoshida R et al., 2015)が報告されており、先述した T1Rs 非依存性の糖輸送体経路では、全身のエネルギー要求に応じて Lep などにより感度が調節されることによりカロリー摂取調節系の情報伝達経路として機能することと考えられる。一方、アミノ酸輸送体は、膵臓 細胞で、糖輸送体と代謝経路を共有していること (Newsholme P and Krause M., 2012)や、ラット小腸でアミノ酸輸送体を介したアミノ酸の吸収が、Lep により抑制されること(Ducroc R et al., 2010)などが報告されている。このことから、アミノ酸シグナル伝達経路も、T1Rs 非依存性甘味受容経路と同様にカロリー受容系のシグナル経路として機能している可能性が予想された。そこで、さらに [3] アミノ酸輸送体を介した味覚受容経路に KATP チャネルは関与するのか、またしているのであれば[4] T1Rs 非依存性甘味受容経路で認められたような独立したカロリー摂取調節系の情報伝達機構が存在するののかという疑問が生じた。本研究では、これらの疑問点を、RT-PCR、鼓索神経・舌咽神経応答解析を駆使し解明をおこなった。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1: アミノ酸輸送体の味蕾内発現分布様式の検索

野生型マウス(C57BL6J; B6J)を用い、RT-PCR および qPCR によりアミノ酸輸送体のマウス味蕾内における発現を調べる。

各種緑色蛍光蛋白質遺伝子導入マウス(GFP マウス) [Ggustducin-GFP, TRPM5-GFP(II 型味細胞:甘・苦・うま味受容細胞マーカー)、T1R3-GFP(甘・うま味受容細胞マーカー)、GAD67-GFP(III 型味細胞:酸味受容細胞マーカー)]を用い、アミノ酸輸送体の各種味細胞における発現様式を調べる。各 GFP マウスで舌凍結切片を作成し、免疫組織化学的手法により GFP とアミノ酸輸送体の共発現を観察する。

#### 実験 2: 鼓索神経・舌咽神経全線維束応答解析による検討

ペントバルビタールナトリウム (50-60mg/kg) 腹腔内投与にて麻酔処理を行なった B6J、及び T1R3-KO マウスを用い、鼓索神経応答解析を行う。0.3M L-アラニン、0.3M グリシン、0.3M L-ブ

ロリン、0.1M L-ロイシン、0.2M L-グルタミン、0.1M L-セリン、0.1M L-ヒスチジン、0.1M L-アルギニンなどで検討を行い、必要に応じ他のアミノ酸やD体アミノ酸を追加する。他の基本味溶液には甘味(0.5M グルコース、0.5M スクロース、0.001M SC45647 ; 人工甘味料)・塩味 (0.1M 塩化ナトリウム、0.1M 塩化カリウム)・酸味(0.01M 塩酸)・苦味(0.02M 塩酸キニーネ)・うま味 (0.1M グルタミン酸カリウム)を用いる。さらに、これらの応答に対するアミノ酸輸送体阻害薬の影響を検証する。その後、アミノ酸輸送体の下流でKATPチャンネルが機能している可能性を検証するため、KATPチャンネル阻害薬であるジアゾキシド処理下における、0.01M NaCl 添加の影響を調べる。また舌咽神経応答解析でも、同様の検証を行う。

#### 4 . 研究成果

RT-PCR 及び、qPCR の結果、本来腸管で機能する複数のアミノ酸輸送体が、マウス舌前方で鼓索神経を介した味覚受容に関与する茸状乳頭、および舌後方において舌咽神経を介した味覚受容に関与する有郭乳頭に発現していることが明らかになった。免疫染色については、検証進行中に使用していた抗体の生産が中止となってしまったため、現在他社が販売している抗体を用いた検証を進めている。野生型マウスを用いたマウス鼓索神経応答解析の結果、マウス舌のアミノ酸輸送体阻害薬前処理により、輸送体と親和性の高いアミノ酸に得意的な応答の減少が認められた。さらに10mM NaCl の添加により、これらのアミノ酸では特異的な応答の増強が認められ、阻害薬処理により消失したことから、候補アミノ酸輸送体のNa共輸送体の関与が示唆された。さらに舌咽神経(舌後方部)や、T1R3-KO マウスでも同様の結果が認められた。KATPチャンネル阻害薬による影響に関しては鼓索神経、舌咽神経の双方で現在検証を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yu Yamada, Shingo Takai, Yu Watanabe, Ayana Osaki, Yuko Kawabata, Asami Oike, Ayaka Hirayama, Shusuke Iwata, Keisuke Sanematsu, Shoji Tabata, Noriatsu Shigemura	4. 巻 557
2. 論文標題 Gene expression profiling of <i>gustducin</i> -expressing taste cells in mouse fungiform and circumvallate papillae.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 206-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keiko Yasumatsu, Tadahiro Ohkuri, Ryusuke Yoshida, Shusuke Iwata, Robert F Margolskee, Yuzo Ninomiya	4. 巻 230
2. 論文標題 Sodium-glucose cotransporter 1 as a sugar taste sensor in mouse tongue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta physiologica (Oxford, England)	6. 最初と最後の頁 e13529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apha.13529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ayana Osaki, Keisuke Sanematsu, Junichi Yamazoe, Fumie Hirose, Yu Watanabe, Yuko Kawabata, Asami Oike, Ayaka Hirayama, Yu Yamada, Shusuke Iwata, Shingo Takai, Naohisa Wada, Noriatsu Shigemura	4. 巻 21
2. 論文標題 Drinking Ice-Cold Water Reduces the Severity of Anticancer Drug-Induced Taste Dysfunction in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21238958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shusuke Iwata, Ryusuke Yoshida, Shingo Takai, Keisuke Sanematsu, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Adrenomedullin increases mouse chorda tympani nerve responses to sugars via T1R-independent mechanisms
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shusuke Iwata, Ryusuke Yoshida, Shingo Takai, Keisuke Sanematsu, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 Adrenomedullin enhances mouse chorda tympani nerve responses to sugars via T1R-independent mechanisms
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shusuke Iwata, Mayuko Inoue, Ryusuke Yoshida, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 アドレノメデュリンによるT1Rs非依存性甘味受容機構を介したマウス鼓索神経応答の増強
3. 学会等名 日本味と匂学会第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shusuke Iwata, Mayuko Inoue, Ryusuke Yoshida, Noriatsu Shigemura, Yuzo Ninomiya
2. 発表標題 アドレノメデュリンによるT1Rs非依存性経路を介するマウス鼓索神経応答増強効果
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------