

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14801

研究課題名（和文）新規な味蕾細胞亜集団による塩味感知メカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism of salt taste perception by a novel subpopulation of taste bud cells

研究代表者

小菌 拓馬（KOZONO, Takuma）

東京農工大学・学内共同利用施設等・特任助教

研究者番号：20876180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：味覚を構成する基本五大味の内、塩味の感知を担う味蕾細胞とその分子メカニズムの詳細は不明な点が多い。本研究では、特定の味蕾細胞に特異的な発現を示すJaw1とIII型イノシトール三リン酸受容体（ITPR3）との相互作用が、GPCR刺激時のカルシウムシグナリングに増強効果をもたらすことを、培養細胞を用いて明らかにした。また、マウス舌から単離した味蕾細胞のカルシウムアッセイにより、Jaw1陽性の味蕾細胞が塩味の感知を担う細胞の1つである可能性が示唆された。一方で、味蕾細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析により、Jaw1陽性味蕾細胞に特異的な発現を示す遺伝子も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、塩味の感知を担う細胞集団とそのメカニズムの一端を明らかにしたことは、複雑な味覚機能の理解を進める上で学術的貢献度が高く、この理解の更なる深化は塩分の過剰摂取を防ぐための食事方法の提案や味覚障害の治療法の開発等に寄与する可能性があり社会的意義も大きい。また、シングルセルレベルでの網羅的な遺伝子発現解析により得られた知見も元になると、味蕾細胞集団の分類を従来よりもさらに細分化させた視点も踏まえながら、味覚機能に関する研究を進めることが今後期待される。

研究成果の概要（英文）：Of the five basic tastes: sweet, bitter, umami, sour, and salty, the details of the taste bud cell responsible for the salt taste perception and their molecular mechanisms are not yet completely understood. In this study, we demonstrated that the interaction of Jaw1, which is specifically expressed in the subpopulation of taste bud cells, with the type III inositol trisphosphate receptor (ITPR3) enhances the calcium release from the endoplasmic reticulum upon G protein-coupled receptor stimulation. In addition, the calcium assay using taste bud cells isolated from the mouse tongue suggests that Jaw1-positive taste bud cells are one of the cells responsible for salt taste perception. Single-cell transcriptomics of taste bud cells also revealed several genes specifically expressed in Jaw1-positive taste bud cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Jaw1 イノシトール三リン酸受容体 カルシウムシグナリング 味蕾細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

味覚は、甘味及び苦味、旨味、酸味、塩味の基本五大味から構成されるが、味物質が舌上皮に存在する味蕾で受容され、そのシグナルが脳へと送られることで感知される。1つの味蕾には、50 - 150個程度の味蕾細胞が含まれている。味蕾細胞はI - IV型の4種類の細胞に分類され、I - III型の分化した細胞と、味蕾の基底部分に存在するIV型の前駆細胞から構成される。甘味及び苦味、旨味はII型味蕾細胞により、酸味はIII型味蕾細胞により感知されることが明らかになっている。塩味の感知を担う細胞としてはいくつか報告があるものの、未だ明確にされておらず、塩味感知の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。

Jaw1は、II型味蕾細胞に特異的な発現を示す膜タンパク質である。我々は、Jaw1が小胞体と核外膜に局在を示し、核内膜のSUNタンパク質と相互作用しながら核の形状維持に関与することを明らかにしている。一方で、小胞体に存在しカルシウムポンプとして機能するイノシトール三リン酸受容体(ITPRs)とも相互作用することが知られている。ITPRsにはITPR1、ITPR2、ITPR3の3種類のサブタイプが存在するが、II型味蕾細胞ではITPR3が特異的に発現することが知られている。II型味蕾細胞では、Gタンパク質共役受容体(GPCR)である味覚受容体で味物質を受容すると、ホスホリパーゼC $\beta$ 2が活性化され、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)が産生される。IP<sub>3</sub>がITPR3に結合すると、小胞体から細胞質へとカルシウムイオンが放出される。細胞質のカルシウムイオンの上昇に続いて、細胞膜に存在する陽イオンチャネルTRPM5が活性化され、細胞の脱分極が起こる。このように、ITPR3を介したカルシウムシグナリングは、II型味蕾細胞の味覚感知において重要な役割を果たす。しかし、その相互作用タンパク質であるJaw1がITPRsを介したカルシウムシグナリングに対してどのような役割を有するのかは明らかにされていない。興味深いことに、我々が作製したJaw1遺伝子欠損(Jaw1 KO)マウスは、味覚感知試験において、野生型マウスと比較して、塩味(NaCl)を好意的に摂取する傾向があることを見出している。以上より、Jaw1の分子機能を明らかにしながら、味覚におけるその生理機能を明らかにすることで、塩味の感知を担う細胞やその分子メカニズムの一端を理解できると考えた。一方で、I - III型の3種類の分化した味蕾細胞という従来の分類では説明しきれない味蕾細胞集団の報告もある。特に、我々が抗Jaw1抗体を用いて行った組織染色では、Jaw1がII型味蕾細胞の亜集団に発現することを確認している。本研究では、味蕾細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析を行うことで、味蕾細胞集団の多様性について再度考察し、複雑な味覚システムの理解に寄与するようなデータを生み出すことも目的とした。

### 2. 研究の目的

(1) Jaw1がITPRsとの相互作用を介して、そのカルシウムシグナリングにどのように関与するかという着眼点で、Jaw1の分子機能を明らかにする。また、Jaw1を発現する味蕾細胞がどの味の感知を担うのか、その分子メカニズムにも焦点を当てながら明らかにする。

(2) 味蕾細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析を行うことで、味蕾細胞の構成について再度考察する。特にJaw1発現細胞における遺伝子発現プロファイルに着目し、Jaw1を発現する味蕾細胞が味覚においてどのような役割を果たすのかについての手掛かりを得る。

### 3. 研究の方法

(1) Jaw1とITPRsの相互作用がもたらすカルシウムシグナリングへの影響の評価

Jaw1とITPRsの相互作用が、ITPRsを介したカルシウムシグナリングにおいてどのような役割を有するののかについて検証するべく、カルシウムインジケータ(Fluo-4)を培養細胞に導入し、蛍光顕微鏡によるカルシウムイメージングを行った。特に、ドキシサイクリンの添加によってJaw1の発現を誘導できるHEK293細胞をFlp-Inシステムにより確立し、ATPでGPCRを刺激した際のカルシウムの動態が、Jaw1の発現の有無によりどのように異なるのかを検証した。また、ITPRsとの相互作用に重要な領域であるJaw1のコイルドコイルドメインを欠損した変異体(coil)を発現するHEK293細胞も用意し、同様の実験を行うことで、Jaw1とITPRsの相互作用がカルシウムシグナリングに与える影響を評価するためのネガティブコントロールとして利用した。なお、Flp-InシステムによるJaw1遺伝子の導入に先立ち、CRISPR/Cas9システムによりJaw1遺伝子を欠損するJaw1 KO HEK293細胞を確立した。

(2) ITPRsの各サブタイプのカルシウム放出活性に対するJaw1の影響の評価

CRISPR/Cas9システムによりITPRsの各サブタイプのみを発現するJaw1 KO HEK293細胞(R1SE - R3 SE)を作製し、さらにドキシサイクリンの添加によりJaw1の発現を誘導できるHEK293細胞株をFlp-Inシステムにより確立した。この細胞を用いて、Jaw1の発現の有無によるカルシウムシグナリングへの影響が、ITPR1 - 3のサブタイプ毎にどのように異なるのか、上記同様にカルシウムイメージングにより検証した。これにより、ITPRsやJaw1といったカルシウムシグナル関連因子の発現様式が細胞種毎に異なる生物学的意義の理解を試みた。

### (3) Jaw1 陽性味蕾細胞における塩味感知能の検証

Jaw1 遺伝子の下流で EGFP を発現する (Jaw1 IRES EGFP) レポーターマウスを作製し、そのマウスの舌から味蕾細胞を単離した。この単離細胞にカルシウムインジケーター (Rhod-4) を導入し、各種味物質で刺激した際のカルシウムシグナルの応答性について、蛍光顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより評価した。なお、EGFP の蛍光を観察することで、Jaw1 陽性細胞の位置を同定した。

### (4) 味蕾細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析の試み

マウスの舌から味蕾細胞をディスペラーゼ/コラゲナーゼ処理によって単離し、抗 KCNQ1 (味蕾細胞マーカー) 抗体と 7-AAD、抗 EpCAM 抗体、抗 CD45 抗体での染色後、セルソーティングにより KCNQ1 陽性 EpCAM 陽性 CD45 陰性細胞を採取した。採取細胞は、BD Rhapsody システムを用いてシングルセルトランスクリプトーム解析に供し、その後得られたデータを解析した。

## 4. 研究成果

(1) まず、Jaw1 と ITPRs の相互作用により、GPCR を ATP で刺激した際のカルシウムの動態がどのように変化するかを評価した。Jaw1 を発現した細胞では、Jaw1 を発現していない細胞 (Jaw1 KO) に対して、100  $\mu$ M ATP で刺激した際のカルシウムの動態を示すカーブが上方に移行した (図 1)。この上昇は、ITPRs との結合領域であるコイルドコイルドメインを欠損した Jaw1 の変異体 ( $\Delta$ coil) を発現する細胞では見られず、Jaw1 KO 細胞と同様になったことから、Jaw1 と ITPRs の相互作用が、ITPRs のカルシウム放出活性を増強させることが示唆された。なお、1  $\mu$ M ATP 及び 10  $\mu$ M ATP、100  $\mu$ M カルバコールで刺激した際にも、同様の結果が得られている。

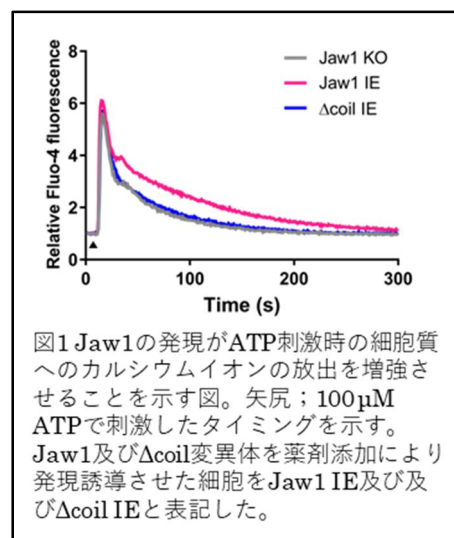


図1 Jaw1の発現がATP刺激時の細胞質へのカルシウムイオンの放出を増強させることを示す図。矢尻; 100  $\mu$ M ATPで刺激したタイミングを示す。Jaw1及び $\Delta$ coil変異体を薬剤添加により発現誘導させた細胞をJaw1 IE及び及び $\Delta$ coil IEと表記した。

(2) ITPRs の各サブタイプのカルシウム放出活性に対して、Jaw1 の発現による効果がどのように異なるのかについて評価した。図 2 に示すように、R1 SE - R3 SE 細胞のいずれにおいても、Jaw1 の発現によるカルシウム放出活性の増強効果が見られた。一方で、カーブの最大値は、R1 細胞と R3 SE 細胞では R2 SE 細胞に比べて、Jaw1 発現下で大きく増加した。さらに、R1 SE 細胞と R2 SE 細胞では R3 SE 細胞に比べて、Jaw1 の発現下で持続的に高い値が維持された。以上より、Jaw1 は ITPRs のいずれのサブタイプに対しても、そのカルシウム放出活性の増強効果をもたらすが、最大強度や持続時間といった点で効果が異なることが示された。ITPRs は、細胞種毎に発現しているサブタイプが異なることが知られており、各種発現する細胞が担う機能に応じて、必要とするカルシウムシグナリングの動態に差異があることが考えられる。

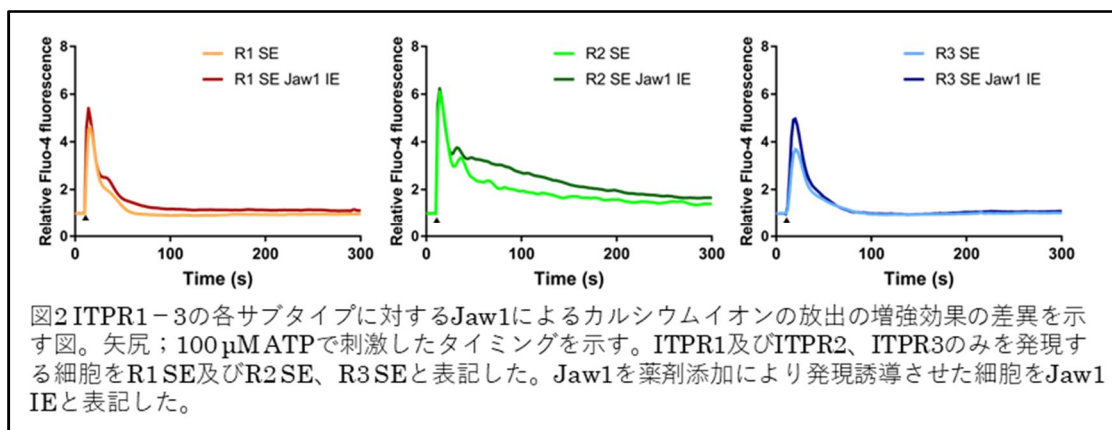


図2 ITPR1-3の各サブタイプに対するJaw1によるカルシウムイオンの放出の増強効果の差異を示す図。矢尻; 100  $\mu$ M ATPで刺激したタイミングを示す。ITPR1及びITPR2、ITPR3のみを発現する細胞をR1 SE及びR2 SE、R3 SEと表記した。Jaw1を薬剤添加により発現誘導させた細胞をJaw1 IEと表記した。

(3) Jaw1 陽性の味蕾細胞に塩味感知能があるのかについて検証するべく、Jaw1 IRES EGFP レポーターマウスの舌から味蕾細胞を単離し、カルシウムインジケーター (Rhod-4) を導入し、カルシウムイメージングを行った。Jaw1 陽性の味蕾細胞は、EGFP の蛍光を確認することで、位置を同定した。結果として、Jaw1 陽性の味蕾細胞を 250 mM NaCl で刺激した際にカルシウムシグナルの応答が確認されたことから、Jaw1 陽性の味蕾細胞は塩味感知能を有する細胞であることが示唆された。Jaw1 陽性の味蕾細胞の他の味物質に対する応答性や Jaw1 陰性の味蕾細胞との応答性比較については、現在進めているところである。

(4) マウスの舌から単離した味蕾細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析では、従来の味蕾細胞の分類を超えてより詳細なクラスタリング解析を行うために必要な細胞数を確保する

に至らなかった。一方で、II 型味蕾細胞の集団で、Jaw1 高発現細胞と低発現細胞の間で発現量に有意な差が認められた 46 遺伝子を抽出することができた。この 46 遺伝子から有意性の高い 3 遺伝子をピックアップし、各種抗体を用いた免疫組織染色を行った。結果として、CAP1 が Jaw1 陽性の II 型味蕾細胞で特異的に発現していることが確認された。以上のように、当初目的としていたシングルセルトランスクリプトーム解析による味蕾細胞集団の多様性を再度考察するには至らなかったが、II 型味蕾細胞も多様な集団から構成されていることを示唆するデータが得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okumura Wataru, Tadahira Kazuko, Kozono Takuma, Tamura-Nakano Miwa, Sato Hiroyuki, Matsui Hitomi, Dohi Taeko, Rohrer Jack, Tonozuka Takashi, Nishikawa Atsushi	4. 巻 173
2. 論文標題 Jaw1/LRMP is associated with the maintenance of Golgi ribbon structure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 383 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad004	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kozono Takuma, Jogano Chifuyu, Okumura Wataru, Sato Hiroyuki, Matsui Hitomi, Takagi Tsubasa, Okumura Nobuaki, Takao Toshifumi, Tonozuka Takashi, Nishikawa Atsushi	4. 巻 136
2. 論文標題 Cleavage of the Jaw1 C-terminal region enhances its augmentative effect on the Ca <sup>2+</sup> release via IP3 receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs260439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.260439	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 -
1. 著者名 Okumura Wataru, Kozono Takuma, Sato Hiroyuki, Matsui Hitomi, Takagi Tsubasa, Tonozuka Takashi, Nishikawa Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Jaw1/LRMP increases Ca <sup>2+</sup> influx upon GPCR stimulation with heterogeneous effect on the activity of each ITPR subtype	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-13620-4	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 -
1. 著者名 Kozono Takuma, Tamura-Nakano Miwa, Kawamura Yuki I., Tonozuka Takashi, Nishikawa Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel protocol to observe the intestinal tuft cell using transmission electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio059007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.059007	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 -

1. 著者名 Kubota Arisa, Kawai Reika, Li Ding, Kozono Takuma, Sasaki Nobumitsu, Nishikawa Atsushi, Fujii Tadashi, Tochio Takumi, Tonozuka Takashi	4. 巻 106
2. 論文標題 Enzymatic and structural characterization of $\alpha$ -fructofuranosidase from the honeybee gut bacterium <i>Frischella perrara</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-022-11863-9	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小園 拓馬、佐藤 展之、中野(田村)美和、岡村 匡史、中野 堅太、奥村 航、石渡 賢治、河村 由紀、殿塚 隆史、西河 淳
2. 発表標題 小腸上皮タフト細胞におけるJaw1の機能解析と寄生虫感染応答機構の理解の深化
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小園 拓馬、城ヶ野 千冬、奥村 航、佐藤 展之、奥村 宣明、高尾 敏文、殿塚 隆史、西河 淳
2. 発表標題 Jaw1のC末端切断修飾の切断部位と酵素の同定
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村 航、松井 仁美、小園 拓馬、佐藤 展之、高木 翼、殿塚 隆史、西河 淳
2. 発表標題 Jaw1はITPRsとの相互作用を介して細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナルの振幅を制御する
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022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
連携研究者	西河 淳  (NISHIKAWA ATSUSHI)  (30218127)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授   (12605)	
連携研究者	河村 由紀  (KAWAMURA YUKI)  (10392391)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長   (82610)	

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			
スイス	チューリッヒ応用科学大学			