

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713008

研究課題名(和文) 味覚情報の抽出・処理・統合機構の解析

研究課題名(英文) Sensing, processing and neurotransmission of taste in the taste buds

研究代表者

樽野 陽幸 (TARUNO, Akiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20706824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：味覚は食物摂取を制御する特殊感覚であり、味覚受容機構の理解は食生活が発症に深く関与する高血圧・糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防の観点からも重要である。先行研究でCALHM1イオンチャンネルが味蕾細胞から求心性神経への神経伝達に必須であると報告したが、生体内でのCALHM1機能修飾機構が示唆されていた。本研究で、CALHM1が生体内でS-パルミトイル化修飾を受けること、さらにCALHM1のパートナー分子CALHM3を発見し、CALHM1/3チャンネルが甘味・苦味・旨味・一部の塩味の神経伝達を担うことを解明した。これらの研究成果は味覚の神経伝達機構の分子理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The sense of taste controls our eating behaviors. Full understanding of the taste mechanisms is invaluable for preventing lifestyle diseases such as diabetes and hypertension. We previously reported that CALHM1, a subunit of a voltage-gated plasma membrane ion channel, is an essential portion of the neurotransmitter release channel in taste bud cells. However, rigorous regulation of CALHM1 channel function by unknown mechanisms has been implicated in vivo. In this study, we discovered two regulatory mechanisms of CALHM1 channel: (1) CALHM1 gating and submembrane distribution is post-translationally regulated by S-palmitoylation, and (2) a CALHM1 paralog, CALHM3, forms a novel oligomeric ion channel with CALHM1 and the CALHM1/3 channel mediates neurotransmission of sweet, bitter, umami and amiloride-insensitive salt tastes. These findings significantly advance our molecular understanding of taste mechanisms.

研究分野：生理学

キーワード：味覚 イオンチャンネル 神経伝達 ATP CALHM

1. 研究開始当初の背景

味覚は食物摂取を制御する特殊感覚であり、味覚受容機構の理解は食生活が発症に深く関与する高血圧・糖尿病をはじめとする生活習慣病の予防の観点からも重要である。これまで、味受容体 (*TAS1Rs*・*TAS2Rs*) のクローニングをはじめ、味細胞における味覚受容の分子生物学的研究にはめざましい発展があったが、まだ多くの未解明かつ重要な謎が残されている。これまでの研究から、味覚は5つの modality (甘味・苦味・旨味・塩味・酸味) に大別することができる。塩味についてはさらに2つに分類される。閾値が低く Na^+ 選択性が高いアミロライド感受性 (AS) 塩味、および、閾値が高くイオン非選択性のアミロライド非感受性 (AI) 塩味である。味蕾細胞 (以下、味細胞) による各味 modality のセンシングの分子機構は酸味・AI 塩味を除きその受容体が明らかになっているが、味細胞から求心性味神経終末への神経伝達の分子機構は大部分が未解明である。

甘味・苦味・旨味・一部の AI 塩味は II 型味細胞により受容され、この細胞は ATP を神経伝達物質として非シナプス性に放出することが知られていた (Finger *et al.* Science 2005) が、その分子機構は不明であった。我々は先行研究において (Taruno *et al.* Nature 2013)、Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) が II 型味細胞における ATP 放出チャンネルの必須分子であることを明らかにした。しかし、培養細胞に発現させた CALHM1 チャンネルと味細胞から記録される ATP 放出チャンネル電流の間には電気生理学および薬理的な性質に齟齬があり、未知の CALHM1 チャンネル機能調節因子の存在が示唆されていた。例えば、活性化速度が CALHM1 チャンネル ($\tau \sim 3$ s) よりも味細胞における ATP チャンネル電流 ($\tau \sim 10$ ms) の方が圧倒的に早く (Ma *et al.* 2012; Romanov *et al.* 2008)、carbenoxolone は味細胞 ATP チャンネルを阻害するが CALHM1 チャンネルは阻害しない (Huang and Roper 2010; Huang *et al.* 2007; Ma *et al.* 2012; Murata *et al.* 2010)。このように、このプリン作動性味覚神経伝達の分子機構の全容解明にはいたっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では II 型味細胞における CALHM1 チャンネルの機能修飾メカニズムの探索を行い、味覚におけるプリン作動性神経伝達の分子機構の全容解明を目指した。本目的達成のために二つのアプローチをとった。一つ目は CALHM1 チャンネルの翻訳後修飾による機能制御機構の探索、もう一つは CALHM1 チャンネルの機能修飾サブユニットの探索である。

以下に、それぞれのアプローチにおいて得られた研究結果を報告する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

Neuro2a、HeLa、HEK293 細胞 (ATCC[®]) を 37°C の 5% CO_2 /95% O_2 インキュベータ内にて培養し、プラスミド DNA の導入には Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いた。

(2) 電気生理実験

パッチクランプ全細胞電流測定法により単離した味細胞および培養細胞における膜電流測定を行った。また、*Xenopus* oocyte を用いた二電極膜電圧固定法により強制発現させた CALHM 電流を測定した。

(4) ATP 放出アッセイ

単離した味蕾および CALHM チャンネルを発現させた培養細胞から放出される ATP 量をルシフェラーゼアッセイによって測定した。

(5) 組織・細胞染色

4% paraformaldehyde で固定した培養細胞および動物組織切片を用いて、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。また、*in situ* hybridizationn を用いて目的遺伝子の mRNA 発現部位を可視化した。

(6) 生化学実験

BN-PAGE・SDS-PAGE・表面ビオチン化法・共免疫沈降法・acyl-biotin exchange (ABE) アッセイ・17-ODYA 代謝ラベル法を用いた。

(7) 分子生物学実験

定量 RT-PCR、siRNA による遺伝子ノックダウン、CRISPR/Cas9 法によるノックアウト・ノックインマウスの作製など

(8) 味覚嗜好試験

2 瓶法およびリックテストによってマウスの味溶液への嗜好性を定量化した。

4. 研究成果

(1) パルミトイル化による CALHM1 チャンネル機能制御機構の発見

CALHM1 のパルミトイル化の発見

CALHM1 の細胞内システイン残基をセリン残基に置換した変異体の作製および ABE アッセイ・17-ODYA 代謝ラベル法を駆使して、CALHM1 がパルミトイル化修飾を受けること、TM3 および TM4 近傍の Cys100 および Cys207 がパルミトイル化部位であるこ

と、DHHC3・DHHC7・DHHC20がCALHM1のパルミトイル化酵素であることを見出した。

パルミトイル化によるCALHM1の機能修飾の解析

ATP アッセイ・電気生理学実験により、CALHM1がパルミトイル化によって負に機能制御されていることが明らかとなった。パルミトイル化不全変異体では野生型に比べておよそ-20 mVの $V_{1/2}$ のシフトおよび活性化速度の増大が見られ、チャンネルゲーティングへの直接的な関与が示唆された。

さらに、パルミトイル化不全変異体が野生型チャンネルに比べ、脂質ラフトへの局在が減少していることも見出した。このことはCALHM1がパルミトイル化によって脂質ラフトへの局在が制御されていることを示唆している。

味細胞CALHM1のパルミトイル化の検出

内在性に発現するCALHM1にV5エピトープタグが付加されるCALHM1-V5ノックアウトマウスを作出した。このマウスによって内在性CALHM1タンパク質の生化学的解析が可能になり、ABEアッセイによって味細胞に発現するCALHM1がパルミトイル化修飾を受けていることが確認された。

(2) 味細胞ATPチャンネルの同定

機能修飾サブユニットCALHM3の発見

CALHMファミリーは6つの遺伝子で構成される。生化学的手法および電気生理学的手法を駆使してCALHM1と相互作用して機能修飾するパラログを探した。CALHM1以外で、単独でイオンチャンネル機能を持つパラログはなかった。まず、5つのCALHM1パラログの中から、共免疫沈降法・細胞内共局在・BN-PAGE解析によってCALHM3がCALHM1と最も強く相互作用することを見出した。イオンチャンネル機能に関し、CALHM3単独では膜コンダクタンスを発生させなかったがCALHM1と共発現させることでCALHM1電流が増大することを見出し、CALHM1とCALHM3が複合体を形成してオリゴメリックチャンネルとして機能していることを示唆している。

CALHM1チャンネルの $V_{1/2}$ は+71.7 mVで活性化速度は3.5 s at +80 mVであるのに対して、味細胞ATPチャンネルの $V_{1/2}$ は+31 mVで活性化速度は~10 ms at +80 mVである。このようにCALHM1単独では、活性化するのに味細胞ATPチャンネルに比較してより強い脱分極を必要とし、さらにその活性化速度もはるかに遅いことが分かる。CALHM1/3チャンネル電流の性質を解析したところ、 $V_{1/2}$ は+23.2

mV、活性化速度は9.58 ms at +80 mVであった。このように、CALHM1/3チャンネルと味細胞ATPチャンネルのゲーティングの性質は酷似していた。

また、CALHM1チャンネルと味細胞ATPチャンネルはcarbenoxoloneに対する感受性が異なっている。carbenoxoloneに対してCALHM1は非感受性であるが、味細胞ATPチャンネルは感受性がある。CALHM1/3チャンネル電流は10 μ M carbenoxoloneによって90%以上阻害された。このように、CALHM1/3チャンネルと味細胞ATPチャンネルは薬理学的特性も似ている。

II型味細胞選択的CALHM3発現

味蕾において、CALHM1とCALHM3がII型味細胞特異的に共発現していることを、in situ hybridizationにより見出した。

味覚受容におけるCALHM3の役割

CALHM3の味覚受容における役割を行動実験によって調べた。CALHM3ノックアウトマウスにおいて甘味、旨味、苦味、AI塩味に対する応答が野生型に比べて優位に減弱していた。一方で、III型細胞によって受容される酸味応答は野生型とCALHM3ノックアウトマウスで違いは見られなかった。この味覚表現型はCALHM1ノックアウトマウスでみられたものと酷似していた。さらに、CALHM3ノックアウトマウスから単離した味蕾から味刺激によるATP放出が消失していた。以上の結果から、新規に発見したオリゴメリックCALHM1/3チャンネルが甘味・苦味・旨味・一部のAI塩味のII型細胞からのATP放出チャンネルの実体であると結論付けた。

(3) 結論

本研究により、(1)味覚神経伝達を担うCALHM1チャンネルのパルミトイル化によるチャンネルゲーティング・細胞内局在の新規制御機構、および(2)CALHM1/3ヘテロオリゴマーがII型味細胞ATPチャンネルの分子実体であること、を明らかにした。本研究結果は味覚のプリン作動性神経伝達分子機構・調節機構を明らかにするものであり、学術雑誌へ投稿中である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計12件)

- 1 Sasamoto, K. [#], Marunaka, R. [#], Niisato, N. [#], Sun, H. [#], Taruno, A. [#], Pezzotti, G. [#], Yamamoto, T., Kanamura, N., Zhu, W.,

- Nishio, K., Inui, T., Eaton, D.C., & Marunaka, Y. Analysis of aprotinin, a protease inhibitor, action on the trafficking of epithelial Na⁺ channels (ENaC) in renal epithelial cells using a mathematical model. *Cell Physiol Biochem* **41**, 1865-1880, (2017). #contributed equally. 査読有
- 2 Taruno, A. & Marunaka, Y. Hypotonicity activates a voltage-dependent membrane conductance in N2a neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **482**, 331-335, (2017). 査読有
- 3 Taruno, A., Kashio, M., Sun, H., Kobayashi, K., Sano, H., Nambu, A. & Marunaka, Y. Adeno-associated virus-mediated gene transfer into taste cells in vivo. *Chemical Senses* **42**, 69-78, (2017). 査読有
- 4 Marunaka, Y., Marunaka, R., Sun, H., Yamamoto, T., Kanamura, N., Inui, T. & Taruno, A. Actions of quercetin, a polyphenol, on blood pressure. *Molecules*. **22**, 209, (2017). 査読有
- 5 Marunaka, Y., Marunaka, R., Sun, H., Yamamoto, T., Kanamura, N. & Taruno, A. Na⁺ homeostasis by epithelial Na⁺ channel (ENaC) and Na_x channel (Na_x): cooperation of ENaC and Na_x. *Ann Transl Med*. **4**, S11, (2016). 査読有
- 6 Marunaka, Y., Niisato, N., Miyazaki, H., Nakajima, K., Taruno, A., Sun, H., Marunaka, R., Okui, M., Yamamoto, T., Kanamura, N., Kogiso, H., Ikeuchi, Y., Kashio, M., Hosogi, S. & Nakahari, T. Quercetin is a useful medicinal compound showing various actions including control of blood pressure, neurite elongation and epithelial ion transport. *Curr Med Chem*. **23**, 1-12, (2016). 査読有
- 7 Ma, Z., Tanis, J.E., Taruno, A. & Foskett J.K. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Arch*. **468**, 395-403, (2016). 査読有
- 8 Sasamoto, K., Niisato, N., Taruno, A., & Marunaka, Y. Simulation of Cl⁻ secretion in epithelial tissues: new methodology estimating activity of electro-neutral Cl⁻ transporter. *Front Physiol* **10.3389/fphys.2015.00370** (2015). 査読有
- 9 丸中良典, 中張隆司, 新里直美, 宮崎裕明, 樽野陽幸. 短絡電流測定法. *呼吸* **34(7)**, 683-688, (2015). 査読有
- 10 樽野陽幸, 丸中良典. 分子レベルで明らかになってきた下で甘さを感じるしくみ. *砂糖類・でん粉情報(農畜産業振興機構) 2015年1月号*, p41-45 (2015). 査読無
- 11 Foskett J.K., Ma, Z., Siebert, A.P., Lamitina, T., Marambaud, P., Tanis, J.E. & Taruno, A. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels: structure, functions and physiological roles. *Membrane*. **39**, 41-47, (2014) 査読無
- 12 樽野陽幸, Foskett, J. K., 丸中良典. 明らかになってきた CALHM チャネルの構造と機能. *実験医学* **32**, 3109-3114, (2014). 査読無
- [学会発表](計 26 件)
- 1 Taruno A., Marunaka Y. Neurotransmission of taste mediated by calcium homeostasis modulator ion channels. 第 94 回日本生理学会大会. 2017 年 3 月 28-30 日; アクトシティ浜松(静岡県・浜松市), 口頭.
- 2 Sun H, Taruno A., Nakajo K, Ono F, Marunaka Y. Palmitoylation regulates gating and lipid raft association of CALHM1 channel. 第 94 回日本生理学会大会. 2017 年 3 月 28-30 日; アクトシティ浜松(静岡県・浜松市), ポスター.
- 3 Kashio M, Taruno A., Marunaka Y. Molecular basis of polarized sorting of CALHM channels in epithelial cells. 第 94 回日本生理学会大会. 2017 年 3 月 28-30 日; アクトシティ浜松(静岡県・浜松市), ポスター.
- 4 Shiraishi M, Nomura T, Taruno A., Marunaka Y. Current-direction/amplitude-dependent single channel gating kinetics of Pannexin 1 channel. 第 94 回日本生理学会大会. 2017 年 3 月 28-30 日; アクトシティ浜松(静岡県・浜松市), ポスター.
- 5 Taruno A., Miyazaki H, Niisato N, Marunaka Y. Homologous CALHM subunits assemble to form a novel voltage-gated ATP channel. 4 大学連携フォーラム. 2016 年 12 月 7 日; 京都薬科大学(京都府・京都市), ポスター.
- 6 Kashio M, Taruno A., Marunaka Y. 上皮細胞における CALHM チャネル極性ソーティングの分子基盤解析. 4 大学連携フォーラム. 2016 年 12 月 7 日; 京都薬科大学(京都府・京都市), ポスター.
- 7 Shiraishi M, Nomura T, Taruno A., Marunaka Y. Current-direction/amplitude-dependent single channel gating kinetics of Pannexin 1 channel. 4 大学連携フォーラム. 2016 年 12 月 7 日; 京都薬科大学(京都府・京都市), ポスター.
- 8 Taruno A. Induction of foreign genes in taste cells *in vivo*. The 15th international symposium on molecular and neural mechanisms of taste and olfactory perception. 2016 年 12 月 3 日- 4 日; 九州大学(福岡県・博多市), 口頭.
- 9 Taruno A. Molecular machinery for taste neurotransmission from the tongue to the brain. the 2nd UK-Japan Frontiers of

- Science Symposium. 2016年11月7-9日; Chicheley Hall(Milton Keynes, UK), ポスター.
- 10 Taruno A, Hiroaki Miyazaki, Naomi Niisato, Hongxin Sun, Makiko Kashio, Marunaka Y. Homologous CALHM subunits assemble to form a novel voltage-gated ATP channel. 第39回日本神経科学学会大会. 2016年7月20-22日; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 口演.
 - 11 Taruno A, Marunaka Y. Purinergic neurotransmission of taste by CALHM channel. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. 2016年6月5-9日; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 口演.
 - 12 Taruno A, Hongxin Sun, Makiko Kashio, Marunaka Y. Regulation of CALHM1 channel by protein S-palmitoylation. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. 2016年6月5-9日; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), ポスター.
 - 13 Taruno A, Hongxin Sun, Makiko Kashio, Marunaka Y. S-パルミトイル化修飾による CALHM1 チャンネル機能制御. 日本膜学会第39年会. 2016年5月10日;早稲田大学(東京都), 口演.
 - 14 Taruno A, Miyazaki H, Niisato N, Sun H, Kashio M, Marunaka Y. CALHM1 and CALHM3 are assembled to form a novel voltage-gated ATP channel. 第93回日本生理学会大会. 2016年3月22-24日; 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 口演.
 - 15 Taruno A, Sun H, Kashio M, Marunaka Y. N-linked glycosylation regulates CALHM1 channel function and subcellular localization. 60th Annual Meeting of the Biophysical Society. 2016年2月27日-3月2日; Los Angeles Convention Center (Los Angeles, USA), ポスター.
 - 16 Taruno A, Miyazaki H, Niisato N, Sun H, Kashio M, Marunaka Y. CAL1AP の同定と CALHM1/CAL1AP チャンネルの機能解析. 第108回近畿生理学談話会 2015年10月24日;近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市), 口演.
 - 17 Taruno A, Marunaka Y. Cell type-specific recording of taste cell activity by genetically-encoded Ca²⁺ indicator (GEC1). 第49回日本味と匂学会大会. 2015年9月24-26日; じゅろくプラザ(岐阜県・岐阜市), ポスター.
 - 18 Taruno A, Makiko Kashio, Hongxin Sun, Marunaka Y. Regulation of CALHM1 ion channel by N-linked glycosylation. 第38回日本神経科学学会大会. 2015.7.28-31; 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市), ポスター.
 - 19 Taruno A. 味覚神経伝達を担う新規形質膜 ATP 放出イオンチャンネル CALHM1 の同定と上皮細胞イオンチャンネルの膜局在の数理モデル解析. 2015.5.15; 早稲田大学(東京都), 口演.
 - 20 Taruno A. 味蕾における味覚情報の神経伝達メカニズム: 甘味・苦味・旨味の非シナプス性プリン作動性神経伝達. 革新的味覚研究ワークショップ. 2015.4.10; 慶應大学(東京都), 口演.
 - 21 Taruno A, Kashio M, Sun H, Marunaka Y. Regulation of CALHM1 ion channel by N-linked glycosylation. 第92回日本生理学会大会. 2015年3月21-23日; 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市), ポスター.
 - 22 Taruno A, Ma Z, Niisato N, Miyazaki H, Kashio M, Sun H, Foskett JK, Marunaka Y. CALHM イオンチャンネルの構造・機能の解析. 膜シンポジウム 2014. 2014年11月26-27日; 神戸大学(兵庫県・神戸市), 口演.
 - 23 Taruno A, Marunaka Y, Foskett JK. Identification of a novel ATP release ion channel, CALHM1, essentially required for purinergic neurotransmission of tastes. 上皮バリアと輸送についてのシンポジウム. 2014年11月1-2日; 立命館大学(滋賀県・草津市), ポスター.
 - 24 Taruno A, Foskett JK, Marunaka Y. 味覚神経伝達を担う新規 ATP 放出イオンチャンネル CALHM1 の同定. 生理学研究所研究会「粘膜免疫学と巻く輸送生理学の融合」. 2014年10月27-28日; 生理学研究所(愛知県・岡崎市), 口演.
 - 25 Taruno A, Foskett JK, Marunaka Y. CALHM1 channel mediation of purinergic neurotransmission from taste bud cells devoid of synapses. 第37回日本神経科学学会大会. 2014年9月11-13日; パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 口演.
 - 26 Taruno A. Calcium Homeostasis Modulator 1: 味覚神経伝達に関わる新規電位依存性 ATP 透過性イオンチャンネル. 京都大学イオンチャンネル研究会. 2014.7.16; iCeMS(京都府・京都市), 口演.
- 〔その他〕
 京都府立医科大学細胞生理学研究室
 ホームページ
<http://kpum-molecular-cell-physiology.info>
6. 研究組織
 (1)研究代表者
 樽野 陽幸 (Taruno Akiyuki)
 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
 研究者番号: 20706824
- (4)研究協力者

孫 紅昕 (Sun Hongxin)
加塩 麻紀子 (Kashio Makiko)
丸中 良典 (Marunaka Yoshinori)
宮崎 裕明 (Miyazaki Hiroaki)
新里 直美 (Niisato Naomi)
中條 浩一 (Nakajo Koichi)
城戸 瑞穂 (Kido Mizuho)
村上 達郎 (Murakami Tatsuro)
南部 篤 (Nambu Atsushi)
小林 憲太 (Kobayashi Kenta)
佐野 裕美 (Sano Hiromi)
松本 一朗 (Matsumoto Ichiro)
J. Kevin Foskett
Michael G. Tordoff