

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2006 ～ 2010
課題番号：18077004
研究課題名（和文） 味覚センサーの空間的、時間的、種間的モーダルシフトによる細胞応答、
個体応答の変化
研究課題名（英文） Alteration of cell response and behavior by temporal, special,
phylogenetic modal-shifts of taste cell sensors.
研究代表者 ニノ宮 裕三 (Ninomiya Yuzo)
九州大学・大学院歯学研究院・教授)
研究者番号：50076048

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：セルセンサー、モーダルシフト、甘味センサー、塩味センサー

1. 研究計画の概要

本研究は、味覚センサーの種間的、空間的、時間的モーダルシフトについて追求するため、1) 甘味セルセンサーの、レプチン受容体や TRPM5 チャンネルなどセンサー群との相互作用による感受性変化を調べ、また、あらたな修飾物質の探索と、そのセンサーと既知のセンサーとの相互連関を解析する。次に、2) 塩味セルセンサー ENaC チャンネルの機能発現動態について、マウス系統差に關与する ENaC サブユニットのアミノ酸変異について調べ、その塩味応答との連関、さらには ENaC サブユニットの発現の舌部位特性や、量的差異や、それに伴う「嗜好」から「忌避」への行動変化に至るモーダルシフトの詳細を細胞から個体レベルで解析するものである。

2. 研究の進捗状況

(1) 甘味センサー受容体のモーダルシフト

マウス単離味蕾の味細胞応答をルースパッチ法により測定し、甘味感受性細胞の約 50%に、基底外側膜(体内)に与えたレプチンにより活動電位頻度の抑制が見られることが明らかになった。応答味細胞の発現分子を single cell RT-PCR 法により検索し、T1R3, Ggust など甘味関連分子の発現が確認されたが、レプチン受容体 ObRb の発現は、まだ確認できていない。甘味応答の TRPM5 チャンネルを介する温度特性は糖や人工甘味料などで類似していたが、唯一グルコース応答は TRPM5-KO マウスでも温度感受性を示し、異なるチャンネル(おそらく TRPM4)の関与が示唆された。また、新たに TRPM5 が苦味物質キニーネなどにより活性抑制をうけることが判明し、古くから知られていた苦味による甘味抑制効果が、甘味細胞における TRPM5 の働き

によるものであることがわかった。

新規修飾物質の探索では、内因性カンナビノイドであるアナンダミドや 2-AG が甘味応答を増強することを示唆する結果を得た。すなわち、サッカリン応答 II 型味細胞の活動電位頻度がアナンダミドおよび 2-AG の処理により、平均でコントロールの 30%増大を示し、味神経応答でも、甘味応答が有意に増大し、その効果は塩味、酸味、苦味応答にはなく、甘味特異的であることが判明した。カンナビノイドは行動実験においても甘味物質に対するリック数を増大、嗜好性を増大させ、行動のモーダルシフトをもたらすことが示唆された。

(2) 塩味センサーチャンネルのモーダルシフト

味神経の食塩応答のアミロライドによる抑制は、129 系統に比べ B6 系統の方が大である。その系統差を利用して、ENaC の遺伝子のアミノ酸変異を解析したところ、alpha サブユニットに見つかったアミノ酸変異が、2 系統間のアミロライド感受性と連関することが判明した。ENaC 各サブユニットの発現と、その舌部位について検討したところ、アミノ酸変異は受容膜表面における発現量との関連があり、各サブユニットのアセンブリ形成から膜輸送に至る過程に連関する可能性が示唆された。また、アミロライド非感受性の舌後部では beta, gamma サブユニットの顕著な低下が認められ、サブユニット間の機能的アセンブリの形成に問題がある可能性が示唆された。また、単一細胞レベルにおける各サブユニットの発現は必ずしも明瞭ではないが、スパイク発現細胞にアミロライド感受性をもつものが存在することが判明した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
(理由)

(1) 甘味センサー受容体のモーダルシフトにおいては、1) 苦味による甘味抑制サイトは TRPM5 チャンネルであること、2) 新たなグルコース受容システムの存在とその経路には TRPM4 が関与する可能性、3) グルマリン感受性甘味応答の舌部位差が甘味受容体と結合する G α タンパク質によりもたらされる (Ggust と G14 の差) 可能性、4) 新規甘味増強物質として、内因性カンナビノイドを発見したこと、などセンサー感受性の種間、空間、時間のモーダルシフトに関連する多くの新知見が得られており、また新たな予想外の発見も多くある。

(2) 塩味センサーチャンネルのモーダルシフトにおいては、1) ENaC- α サブユニットのアミノ酸変異が、塩味応答のアミロライド感受性と連関すること、2) アミロライド非感受性の舌後部では beta, gamma サブユニットの顕著な低下が認められ、サブユニット間の機能的アセンブリの形成に問題があること、3) スパイク発現味細胞の一部がアミロライド感受性をもつこと、などの新知見が得られている。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 甘味センサー受容体のモーダルシフト

マウス単離味蕾の受容膜/基底外側膜側分離標本による味細胞応答測定法や、single cell RT-PCR 法による甘味応答と分子発現の連関の解析を中心に、神経・行動応答、分子遺伝子発現解析により、センサー感受性のモーダルシフトについて追求する。甘味受容細胞の同定をより簡便にするため、II 型細胞の GFP 標識マウス [TRPM5-GFP、T1R3-GFP、Ggust-GFP マウスは Dr. R. Morgolskee (Mount Sinai Sch. Med) および Dr. S. Damak (Nestle) より入手し、継代中] を用いる。新規修飾物質の探索過程で浮上したカンナビノイドによる甘味応答増強について検索する。受容体発現、発現細胞の特性の解析、甘味受容細胞における修飾効果とその機序、さらに甘味感受性モードの変換が行動変化をもたらす過程を検索する。その過程で、レプチンなど既知の修飾因子との相互作用や味細胞における分子連携や、そのカンナビノイド作用発現における TRPM5 チャンネルの関与 (富永真琴教授グループの協力を仰ぐ) についても解析を行う。

(2) 塩味センサーチャンネルのモーダルシフト

II 型 TRPM5-GFP および III 型 GAD67-GFP (柳川右千夫群馬大教授より入手) を用いて、アミロライド感受性塩味応答味細胞の同定を行い、マウス遺伝解析により明らかにした ENaC サブユニットのアミノ酸変異のアミロライド感受性との連関の細胞内メカニズム

を解析し、それらの系統間、舌部位間のモーダルシフトのメカニズムを解明する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 42 件)

- ① Shigemura N, Shirosaki S, Ohkuri T, Sanematsu K, Islam AA, Ogiwara Y, Kawai M, Yoshida R, Ninomiya Y. Variation in umami perception and its receptor candidate genes in rodents and humans. *Am J Clin Nutr.* (In press) 査読有
- ② Yasumatsu K, Horio N, Murata Y, Shirosaki S, Ohkuri T, Yoshida R, Ninomiya Y. *Am J Clin Nutr.* (In press). 査読有
- ③ Ohkuri T, Yasumatsu K, Horio N, Jyotaki M, Margolskee RF, Ninomiya Y. Multiple sweet receptors and transduction pathways revealed in knockout mice by temperature dependence and gurmarin sensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 296:R960-971, 2009 査読有
- ④ Yoshida R, Horio N, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Ninomiya Y. NaCl responsive taste cells in the mouse fungiform taste buds. *Neuroscience*, 159: 795-803, 2009 査読有
- ⑤ Talavera K, Yasumatsu K, Yoshida R, Margolskee RF, Voets T, Ninomiya Y, Nilius B. The taste transduction channel TRPM5 is a locus for bitter-sweet taste interaction. *FASEB J.* 22:1343-1355, 2008 査読有

[学会発表] (計 100 件)

- ① 二ノ宮裕三 摂食調節に関わる味のシグナルと受容体特性、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都
- ② Ninomiya Y Umami reception in the oral cavity: Receptor and transduction. 15th International Symposium on Olfaction and Taste, 2008 年 7 月 21-26 日、San Francisco.

[図書] (計 10 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>