

機関番号：17102

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・種間的モダリティ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 二ノ宮 裕三 (NINOMIYA YUZU)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：50076048

## 研究成果の概要(和文)：

味覚セルセンサーのモダリティシフトによる細胞応答・個体応答の変化を検索し、甘味センサーは食欲調節物質のレプチンとエンドカンナビノイドによって相互拮抗的な感度調節を受けること、マウスの甘味抑制ペプチド(ヒトに無効)・グルマリンはその甘味受容体 T1r3 の細胞外ドメイン(一部 T1r2)に働くこと、塩味センサーは ENaC チャネルの3種のサブユニットの内、 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸変異がモダリティシフトをもたらすことが判明した。

## 研究成果の概要(英文)：

Potential modal-shifts of sensitivities of taste cell sensors were studied by examining cellular and behavior responses to sweet and salty stimuli under various molecular and environmental conditions. The results suggest that as comparable with the action of central nervous system, endocannabinoids, orexigenic mediators, enhanced peripheral sweet taste sensitivities, that opposes the action of leptin, an anorexigenic mediator. Species-specific sweet-suppressing effect of gurmardin occurs its binding to the mouse extracellular domain of T1r3 (partially that of T1r2). In addition, molecular based modal-shift was found in sodium-salt sensor ENaC channels where an amino acid change (R616W) in  $\alpha$  subunit may produce variation in amiloride-sensitivity of the channel.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,100,000	0	12,100,000
2007年度	13,100,000	0	13,100,000
2008年度	13,700,000	0	13,700,000
2009年度	12,800,000	0	12,800,000
2010年度	12,700,000	0	12,700,000
総計	64,400,000	0	64,400,000

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、モダリティシフト、甘味センサー、塩味センサー

## 1. 研究開始当初の背景

味覚センサーは、外界からもたらされるエネルギー源(糖、糖源性アミノ酸など)のセンサーである甘味センサー受容体 T1r2/T1r3、ナトリウムセンサーである塩味センサーチ

ヤネル ENaCs、植物アルカロイドなど毒物のセンサーである苦味センサー受容体 T2rs などがある。そのシグナルは脳に伝えられ、食調節の基本情報として、「嗜好」行動や「忌避」行動を惹起する。これら味覚センサーの

舌や口腔内の分布は均一ではない。例えば、マウスの甘味抑制剤グルマリリンや、塩味抑制剤のアミロライドは舌前部でのみ有効である。また、センサー感度は細胞周囲環境により変化する。例えば甘味センサーの感受性は血中レプチン濃度の増加により抑制される。さらに、味覚センサーには種差があり、グルマリリンはマウスの甘味応答を抑制するが、ヒトには無効である。このように、味覚センサーの感受性モードは空間的、時間的、種間的に変化するが、そのモダリティシフトの分子神経基盤など詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究は、味覚センサーの空間的、時間的、種間的モダリティシフトについて追求するため、1) 甘味セルセンサーの空間的、種間的モダリティシフトに関わる甘味抑制剤グルマリリンの甘味抑制動態の分子・神経機構と、甘味セルセンサーのあらたな修飾物質の探索と、そのセンサーと既知のレプチンなどセンサー群との相互作用によるモダリティシフトを解析する。次に、2) 塩味セルセンサー ENaC チャネルの機能発現動態について、マウス系統差に関与する 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、それに伴う「嗜好」から「忌避」への行動変化に至るモダリティ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。

## 3. 研究の方法

### (1) 甘味セルセンサーのモダリティシフト

マウス単離味蕾の味細胞応答をルースパッチ法、味神経応答を通法により測定し、甘味応答のレプチンや新たな修飾物質の基底外側膜刺激による変化を調べ、相互作用を検索する。味細胞の発現分子を single cell RT-PCR 法により検索する。

マウス、ヒト及びそのキメラの T1r2/T1r3 甘味受容体遺伝子を HEK293 細胞に導入した甘味感受性細胞再構築系でマウスの甘味抑制剤グルマリリンと甘味物質の相互作用部位と特性を解析する。

### (2) 塩味セルセンサーのモダリティシフト

味細胞・味神経食塩応答のアミロライド抑制性と ENaC 発現との連関ならびにその舌部位差と系統差、さらには ENaC サブユニットのアミノ酸変異との連関を検索する。神経切断再生過程における再発現過程でのそれらの連関を分子発現、細胞応答、行動応答で検索する。

## 4. 研究成果

### (1) 甘味セルセンサーのモダリティシフト

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 40%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。single cell RT-PCR 法による検索では、T1R3, Ggust など甘味関連分子の発現が確認されたものの、レプチン受容体 Ob-Rb の発現は確認できなかったが、免疫組織学的検索では T1r3 発現細胞の約 40%に Ob-Rb が発現しており、その比率は一致していた。甘味応答の TRPM5 チャ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(Ohkuri et al., Am J Physiol., 2009)。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(Taravela et al, FASEB J, 2008)。

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(図 1-AB)。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(図 1-CD)させ、嗜好行動のモダリティシフトをもたらすことが示唆された。

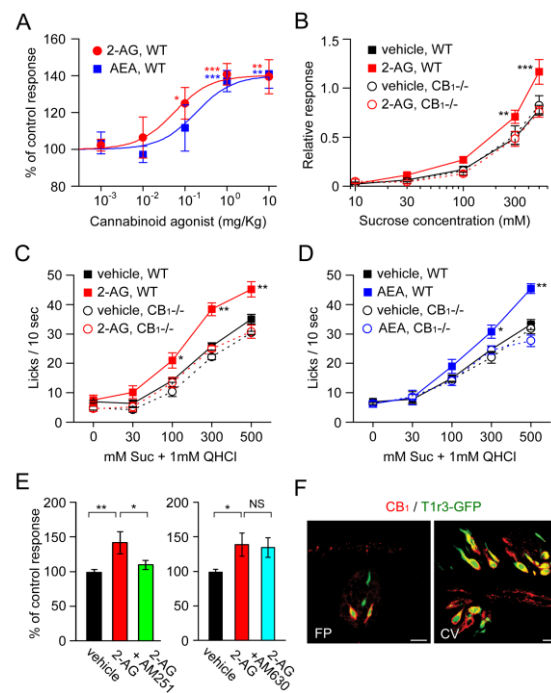


図 1 エンドカンナビノイドによる甘味応答の増強効果

また、この増強効果は CB<sub>1</sub>-KO マウスでは見られず(図 1-B, C, D)、甘味応答味細胞においても、甘味応答は内因性カンナビノイド投与により増強され、CB<sub>1</sub>阻害剤 (AM251) により増強効果は消失するが、CB<sub>2</sub>阻害剤 (AM630) では効果がないことがわかった(図 1-E)。さらに、甘味受容体コンポーネント T1R3 を発現する細胞の約 60%は CB<sub>1</sub> と共発現することも判明した(図 1-F)(Yoshida et al., PNAS 2010)。

甘味抑制ペプチド・グルマリンの種特異性を利用して甘味受容体における結合サイトを同定するため、ヒトおよびマウスの受容体キメラ体を作成し、その甘味応答のグルマリン抑制性をもとに検索した。その結果、10 μg/ml グルマリン(Gur)処理前後の 10 mM Sac に対する応答への抑制性から T1r3 の細胞外ドメインが主要な結合サイトであること(図 2-A)、グルマリン非感受性系統の BALB マウスにおける T1r2 のアミノ酸変異 P352R もグルマリンの抑制効果を減弱させること(図 2-B)、3 種のシクロデキストリン(CD)の中で、β-CD のみがグルマリン効果を消失させることが(図 2-C)明らかになった。

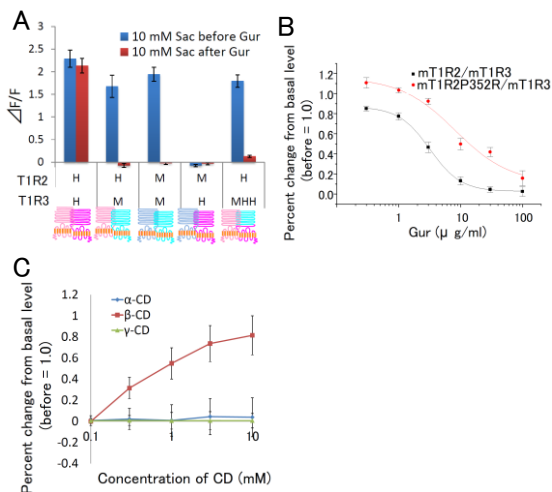


図 2 甘味抑制ペプチド・グルマリンの結合サイトの HEK293 細胞発現系による解析

## (2) 塩味センサーチャ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、α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関連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関連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 β、γ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(Shigemura et al., Am J Physiol., 2008)。

また、アミロライド感受性の味細胞が活動電位を発生しないとされる I 型細胞に見られるという報告があるが、我々はアミロライドにより食塩応答が抑制される味細胞が、活動電位を発生することを明らかにした(図 3)(Yoshida et al., Neuroscience, 2009)。しかも、single cell RT-PCR による発現分子の解析で、ENaC αサブユニットはアミロライド感受性を示す細胞には発現するが、非感受性のものには発現しないことから、分子発現との対応も明らかになった。活動電位を発生する味細胞に食塩応答細胞が存在することで、I 型の中にも活動電位を発生する細胞が存在するのか、あるいは II 型 III 型にアミロライド感受性の食塩応答細胞が存在するのかどちらかであるものと考えられる。

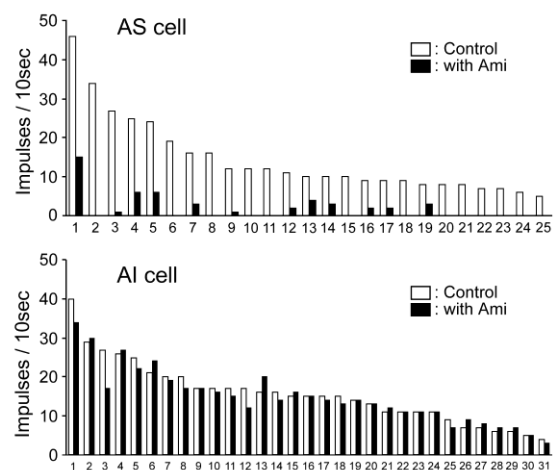


図 3 マウス味細胞 NaCl 応答(白)のアミロライドによる抑制(黒): 上段アミロライド感受性細胞; 下段アミロライド非感受性細胞

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 28 件)

(以下の論文はすべて査読有)

- ① Plegems E., Iwatsuki K., Kokrashvili Z., Benard O., Ninomiya Y., Margolskee RF. REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J Neurosci.* 30:(41)13774-13783, 2010
- ② Murata Y., Yasuo T., Yoshida R., Obata K., Yanagawa Y., Margolskee RF., Ninomiya Y. Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol.* 104:(2)896-901, 2010
- ③ Jyotaki M., Shigemura N., Ninomiya Y. Modulation of sweet taste sensitivity by orexigenic and anorexigenic factors. *Endocr J.* 57 : (6) 467-475, 2010
- ④ Yoshida R., Ninomiya Y. New insights into the signal transmission from taste cells to gustatory nerve fibers. *Int Rev Cell Mol Biol* 279:101-134, 2010
- ⑤ Cartoni C., Yasumatsu K., Ohkuri T., Shigemura N., Yoshida R., Godinot N., le Coutre J., Ninomiya Y., Damak S. Taste Preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci.* 30 : (25)8376-8382, 2010
- ⑥ Yoshida R., Ohkuri T., Jyotaki M., Yasuo T., Horio N., Yasumatsu K., Sanematsu K., Shigemura N., Yamamoto T., Margolskee RF., Ninomiya Y. Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:(2)935-939, 2010
- ⑦ Yasumatsu K., Ohkuri T., Sanematsu K., Shigemura N., Katsukawa H., Sako N., Ninomiya Y. Genetically-increased taste cell population with G(alpha)-gustducin-coupled sweet receptors is associated with increase of gurmardin-sensitive taste nerve fibers in mice. *BMC Neurosci.* 10(1): 152, 2009
- ⑧ Arai T., Ohkuri T., Yasumatsu K., Kaga T., Ninomiya Y. The role of transient receptor potential vanilloid-1 on neural responses to acids by the chorda tympani, glosso—pharyngeal and superior laryngeal nerves in mice. *Neuroscience* 165:(4) 1476-1489, 2009
- ⑨ Shigemura N., Shirotsaki S., Sanematsu K., Yoshida R., Ninomiya Y. Genetic and molecular basis of individual differences in human umami taste perception. *PLoS ONE* 4:(8) e6717, 2009
- ⑩ Yoshida R., Miyauchi A., Yasuo T., Jyotaki M., Murata Y., Yasumatsu K., Shigemura N., Yanagawa Y., Obata K., Ueno H., Margolskee RF., Ninomiya Y. Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J Physiol* 587: (18) 4425-4439, 2009
- ⑪ Shigemura N., Shirotsaki S., Ohkuri T., Sanematsu K., Islam AA., Ogiwara Y., Kawai M., Yoshida R., Ninomiya Y. Variation in umami perception and in candidate genes for the umami receptor in mice and humans. *Am. J. Clin. Nutr* 90: (3) 764S- 769S, 2009
- ⑫ Yasumatsu K., Horio N., Murata Y., Shirotsaki S., Ohkuri T., Yoshida R., Ninomiya Y. Multiple receptors underlie glutamate taste responses in mice. *Am. J. Clin. Nutr* 90: (3) 747S-752S, 2009
- ⑬ Nakagawa Y., Nagasawa M., Yamada S., Hara A., Mogami H., Nikoleav VO., Lohse MJ., Shigemura N., Ninomiya Y., Kojima I. Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS ONE* 4: (4) e5106, 2009
- ⑭ 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 gurmardin sensitivity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 296(4)R960-971, 2009
- ⑮ Yoshida R., Horio N, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N., Ninomiya Y. NaCl responsive taste cells in the mouse fungiform taste buds. *Neuroscience*, 159: (2)795-803, 2009
- ⑯ Sanematsu K., Horio N., Murata Y., Yoshida R., Ohkuri T., Shigemura N., Ninomiya Y. Modulation and transmission of sweet taste information for energy homeostasis. *Ann NY Acad Sci.* 1170: 102-106, 2009
- ⑰ Yoshida R., Yasumatsu K., Shirotsaki S., Jyotaki M., Horio N., Murata Y., Shigemura N., Nakashima K, Ninomiya Y. Multiple receptor systems for umami taste in mice. *Ann NY Acad Sci.* 1170: 51-54, 2009
- ⑱ Nakamura Y., Sanematsu K., Ohta R., Shirotsaki S., Koyano K., Nonaka K., Shigemura N., Ninomiya Y. Diurnal variation of human sweet taste recognition thresholds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes*, 57: (10)2661-2665, 2008
- ⑲ 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

- interactions. *FASEB J.* 22(5)1343-1355, 2008
- ⑳ Yamaguchi N., Kukita T., Li Y-J., Kamio N., Fukumoto S., Nonaka K., Ninomiya Y., Hanazawa S., Yamashita Y. Adiponectin inhibits induction of TNF- $\alpha$ /RANKL-stimulated NFATc1 via the AMPK signaling. *FEBS Lett.* 582: 451-456, 2008
- ㉑ Shigemura N., Nakao K., Yasuo T., Murata Y., Yasumatsu K., Nakashima A., Katsukawa H., Sako N., Ninomiya Y. Gurmardin sensitivity of sweet taste responses is associated with co-expression patterns of T1r2, T1r3, and gustducin. *Biochem Biophys Res Commun.* 367: (2)356-363, 2008
- ㉒ Shigemura N., Ohkuri T., Sadamitsu C., Yasumatsu K., Yoshida R., Beauchamp GK., Bachmanov AA., Ninomiya Y. Amiloride-sensitive NaCl taste responses are associated with genetic variation of ENaC alpha-subunit in mice. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: (1)R66-R75, 2008
- ㉓ Margolskee RF., Dyer J., Kokrashvili Z., Salmon KS., Ilegems E., Daly K., Maillet EL., Ninomiya Y., Mosinger B., Shirazi-Beechey SP. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: (38)15075-15080, 2007
- ㉔ Hisatsune C., Yasumatsu K., Takahashi-Iwanaga H., Ogawa N., Kuroda Y., Yoshida R., Ninomiya Y., Mikoshiba K. Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *J. Biol. Chem* 282: 37225-37231, 2007
- ㉕ Yasumatsu K., Kusuhara Y., Shigemura N., Ninomiya Y. Recovery of two independent sweet taste systems during regeneration of the mouse chorda tympani nerve after nerve crush. *Eur J Neurosci.* 26: (6)1521-1529, 2007
- ㉖ Talavera K., Ninomiya Y., Winkel C., Voets T., Nilius B. Influence of temperature on taste perception. *Cell Mol Life Sci* 64:(4) 377-381, 2007
- ㉗ Yoshida R., Shigemura N., Sanematsu K., Yasumatsu K., Ishizuka S., Ninomiya Y. Taste responsiveness of fungiform taste cells with action potentials. *J Neurophysiol* 96: (6) 3088-3095, 2006
- ㉘ Ohkuri T., Yasumatsu K., Shigemura N., Yoshida R., Ninomiya Y. Amiloride inhibition on NaCl responses of the chorda tympani nerve in two 129 substrains of mice, 129P3/J and 129X1/SvJ. *Chem. Senses* 31: (6) 565-572, 2006

[学会発表] (計 4件)

- ① Sanematsu K, Ninomiya Y. Molecular mechanisms between sweet receptors and taste modifiers. PACIFICHEM2010, Honolulu, Hawaii, USA 2010.12.15-20 (招待講演)
- ② Ninomiya Y. The taste organ is a target for orexigenic and anorexic mediators, 20<sup>th</sup> European Chemoreception Research Organization(ECRO) Avignon, France 2010.9.14-19 (招待講演)
- ③ Ninomiya Y. Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids 30<sup>th</sup> Blankenese Conference Humburg-Blankenese, Germany 2010.5.8-12 (招待講演)
- ④ Ninomiya Y. Modulation of sweet taste responses by orexigenic and anorexigenic factors, 32<sup>th</sup> AchemS, St.Pete Beach, Florida, USA, 2010.4.21-25 (特別講演)

[図書] (計 2件)

- ① 重村憲徳、二ノ宮裕三., 医学のあゆみ「味覚受容体の構造と機能の多様性」, 医歯薬出版株式会社, 233(9): 875-80, 2010
- ② 吉田竜介、大栗弾宏、重村憲徳、二ノ宮裕三 実験医学「内因性カンナビノイドの甘味増強作用」, 羊土社, 28(9):1405-8, 2010

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二ノ宮 裕三 (NINOMIYA YUZO)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：50076048

### (2) 研究分担者

重村 憲徳 (SHIGEMURA NORIATSU)  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号：40336079  
吉田 竜介 (YOSHIDA RYUSUKE)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：60380705