

令和元年6月3日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11049

研究課題名(和文) 酸感受性イオンチャネルを介した新しい味覚受容機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of acid-sensing ion channel in sour-taste perception

研究代表者

植田 高史 (UEDA, Takashi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90244540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス味蕾において酸感受性イオンチャネル1a(ASIC1a)は味細胞ではなくP2X2/3陽性の神経線維に豊富に発現していた。この神経線維の投射元の膝神経節ニューロンでは水素イオンによりATP応答性が種々の程度に変化していた。この変化は主にP2X2とP2X3によってもたらされ、P2X3単独発現細胞ではリガンドに対する応答が酸によって抑制される一方、P2X2/3発現細胞では抑制されず、さらにASIC1aの有無で様々な応答の修飾が観察された。シナプス伝達を介したIII型味細胞による酸味の伝達に水素イオンが神経伝達修飾因子として働き、その伝達にASIC1aが関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、従来不明であった「なぜ味蕾という狭い空間で、塩味、酸味、甘味、苦味、うま味という性質の異なる味を混線することなく受容できるか」についての新知見が得られた。本研究によれば、酸味を感じる際、水素イオンが放出され、これが酸味以外の味伝達経路を抑制して酸味の伝達を強調していると考えられる。味覚伝達の様式がラベルドライン(味ごとに異なる神経線維で伝える方式)か否かについては未だ学会でも結論に至っていないが、水素イオンという新たな因子が発見され、味覚受容機構の理解が進んだ。また、さらに高齢化を迎える日本では味覚障害も多くなると予想され、この理解と克服につなげる一助となることを目指した。

研究成果の概要(英文)：Acid-sensing ion channel 1a (ASIC1a) was primarily detected in P2X2/P2X3-immunopositive nerve fibers within mouse taste buds, but not in mouse taste receptor cells. In primary culture of neurons isolated from geniculate ganglia, proton differentially modulated ATP-induced intracellular calcium mobilization. In a heterologous expression system using recombinant P2X2, P2X3 and ASIC1a, acidic buffer (pH6.5) enhanced P2X2/P2X3-mediated calcium response, while it reduced P2X3-mediated cellular response. ASIC1a further modulated proton-induced modification of P2X2/P2X3-mediated response. Finally, ASIC1a-knockout mice show reduced behavioral response to sour tastants (citric and hydrochloric acids). Proton could thus be a neuromodulator for sour taste perception and ASIC1a in the P2X2/P2X3-positive gustatory neurons may be involved in this signaling pathway.

研究分野：神経解剖学

キーワード：味覚受容 酸味 酸感受性イオンチャネル 水素イオン 膝神経節 シナプス伝達 側方抑制

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸味は味蕾の味細胞に発現するイオンチャネル型受容体により感知される。この酸味受容体の候補分子としてこれまでに ASIC (acid-sensing ion channel; 酸感受性イオンチャネル) と PKD1L3/2L1 チャネルが同定されている。ASIC2a/2b はラットの酸味受容体として同定されたものの、マウスの酸味受容には関与していない (文献①)。一方、PKD1L3/2L1 は現在マウスの酸味受容体と位置付けられている。しかし、この PKD チャネルにみられる OFF-活性型の性質は実際の味細胞の酸応答性とは異なる上、この遺伝子を欠失したマウスでも酸味受容が完全には消失していないことから、PKD1L3/2L1 とは別の酸味受容体の存在が指摘されている。マウスの味蕾に ASIC1 および ASIC3 の発現が示唆されており、これら ASIC チャネルが現在未知の味覚受容機構に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

第1に、マウス味蕾に ASIC1 や ASIC3 が発現しているか否かを再確認する。先行研究として、Richter らによる味蕾組織を使った RT-PCR (文献①) と九州大学大学院に所属していた宮内の GAD67-GFP 細胞によるシングルセル RT-PCR の実験がある。彼らによれば、マウス味蕾組織に ASIC1 や ASIC3 の遺伝子断片が検出されたものの、酸味受容細胞とされる III 型味細胞にそれら mRNA の発現はほとんどないという結論であった。この真偽について別の実験方法にて精査する。第2に、ASIC が味蕾組織に発現していた場合、その味覚受容への関与について個体および細胞レベルで解析する。第3に、ASIC とは異なる種類の酸感受性イオンチャネルについてもその発現や味覚受容についての解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現と形態学的解析

ASIC チャネルについて、RT-PCR による遺伝子発現解析を行い、各 mRNA の発現を決定した。具体的には、C57BL6J マウスから舌を摘出後、味蕾のない部分および味蕾を含む葉状および有郭乳頭部分からそれぞれ total RNA を抽出して、RT-PCR 法を実施した。さらにタンパクレベルでの局在を決定するため、市販の特異抗体を用いたウエスタンブロット法と蛍光間接免疫染色を実施した。抗体の特異性は、ノックアウトマウスにより確認した。さらに味細胞や味覚神経のマーカー分子 [Gustducin (II 型味細胞), SNAP25 (III 型味細胞), P2X3 (神経線維)] と二重染色することで ASIC が発現している組織構造あるいは細胞を決定した。

(2) 味覚嗜好試験

ASIC の生体での機能を探るため、絶水したマウスに試したい味質を2分間与えた後、水を2分間与え、各溶液に何回口をつけたか (リッキング) を数えて味質/水を求め嗜好性とした。本実験には、C57BL6J 野生型マウス、ASIC1a ノックアウト (KO) マウス、ASIC1b-KO マウス、ASIC3-KO マウス、ASIC1a/1b/3 トリプル KO マウスの5種の動物を使用した。また味質として、酸味には 1, 3, 10, 30 mM のクエン酸と塩酸を用い、それ以外の味質については、2 mM デナトニウム (苦味)、500 mM NaCl (塩味)、100 mM スクロース (甘味) を用いた。

(3) カルシウムイメージング解析

膝神経節 (geniculate ganglia; GG) ニューロンを *ex vivo* で解析する方法を確立して、ASIC のリガンドである酸 (水素イオン、プロトン) の神経伝達に及ぼす影響を検索した。具体的にはマウスより GG を単離し、酵素処理で単細胞にしたサンプルを用いて Fura-2 によるカルシウムイメージング解析を行った。さらに CHO-K1 細胞に P2X2, P2X3, ASIC1a を様々な組み合わせにて発現させた時のリガンドに対する応答性とプロトン感受性についても解析した。

(4) TRPV4 酸感受性イオンチャネルの解析

酸感受性の性質を持つ Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) チャネルは一般上皮の基底幹細胞に発現しており、味幹細胞にも発現している可能性がある。上述の ASIC と同様に、野生型および TRPV4-KO マウスを用い、特異抗体による味蕾での発現とその分布、味覚嗜好試験による各味質受容の違いについて観察した。

4. 研究成果

(1) ASIC チャネルの味蕾での発現

マウス味蕾における ASIC の発現を RT-PCR 法により解析し、味蕾組織には ASIC1a の転写産物が発現していることを確認した (図1左)。味蕾の有無の確認には、PKD2L1 (酸味受容に関わる III 型味細胞)、PLCβ2 (II 型味細胞) ならびに NTPDase (塩味受容の I 型味細胞) を用いた (図1右)。

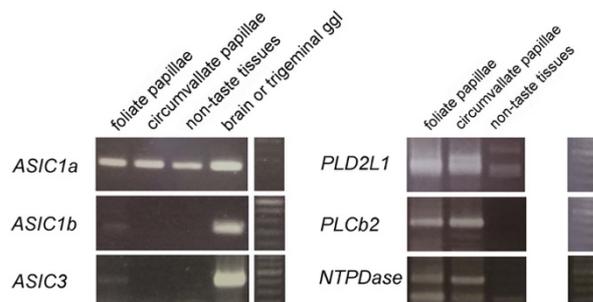


図1 マウス舌乳頭におけるASICの発現

さらに ASIC1a と ASIC1b の双方を認識する市販抗体にて、マウス有郭乳頭組織にてウエスタンブロット法を実施すると、発現量は少ないものの、ASIC1a の分子量付近に細いシャープなバンドを認めた (図2)。このバンドは ASIC1a-KO の有郭乳頭組織では認められなかった。さらに味覚受容の一次ニューロンが集まる膝神経節 (図中; Genuiculate ggl) でも ASIC1a と 1b がタンパクレベルで発現していることが明らかとなった。

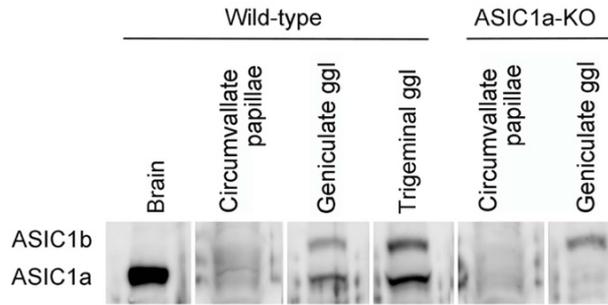


図2 マウス組織におけるASIC1のウエスタンブロット解析

(2) 味蕾における ASIC の発現部位

次にマウス有郭乳頭の組織切片にてウエスタンブロット法と同一の抗体を用いた免疫染色法を実施した (図3)。味蕾の存在と位置は II 型味細胞に発現する gustducin の抗体にて確認した (緑色)。図3のように、野生型(Wild type) マウスの味蕾内にドット状の免疫陽性構造 (赤色) を認めた。この陽性反応は ASIC1a/1b-dKO マウスではみられないことから ASIC1a または 1b と考えられた。

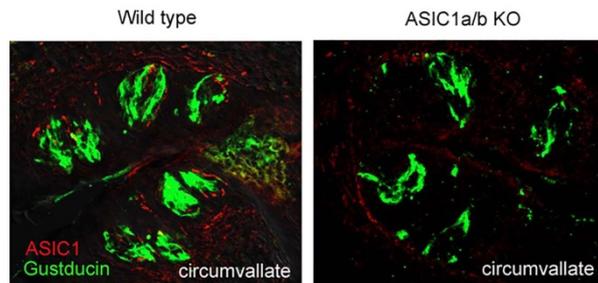


図3 マウス味蕾におけるASIC1の局在

さらに各種味細胞のマーカーとの二重染色を実施した (図4)。赤色の ASIC1 陽性構造は、II 型味細胞のマーカーの gustducin とは全く重ならず、III 型味細胞のマーカーの SNAP25 とは一部重なる程度であった (図4 A)。一方、味蕾に分布する神経線維のマーカーである P2X3 とは極めて高い頻度で重なっていた (図4 B)。さらに観察された味蕾内の ASIC1 陽性反応は ASIC1a/3-dKO マウスでもほとんど認められなかったことから、この反応は ASIC1a によるものであり、ASIC1a が味細胞ではなくむしろ味蕾に投射する神経線維に豊富に発現していることが示唆された。

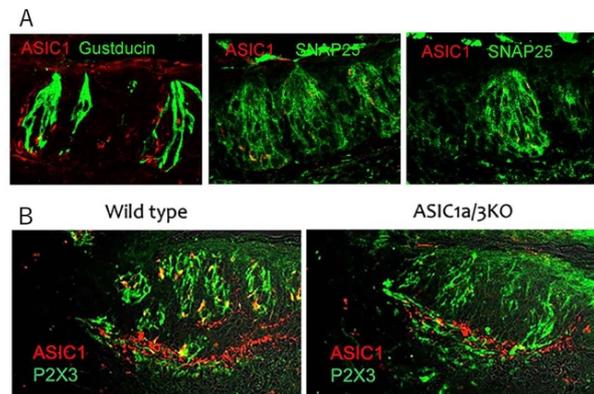


図4 ASIC1 と各種マーカーとの二重染色

(3) 味覚嗜好試験

この神経線維に発現する ASIC1a の味覚への関与について、野生型、ASIC1a-KO (1aKO) ならびに ASIC1a/1b/3-tKO (1c/3KO) マウスを用い、頻用される味質による嗜好試験を実施した。図5に示すように、有機酸のクエン酸と無機酸の塩酸ともに、ASIC1a-KO マウス (1aKO) では野生型マウス (Wild) と比して酸に対する忌避反応が減弱しており、ASIC1a-KO マウスでは生体レベルで酸味の受容が鈍感になっていることがわかった。

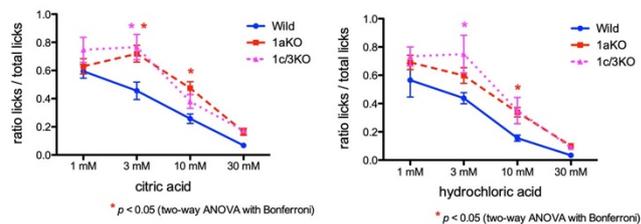


図5 ASIC-KOマウスにおける酸味嗜好試験

それ以外の味質についても調べたところ、野生型 (WT) と ASIC1a-KO (1aKO) の間で有意な違いは認められなかった (図6)。

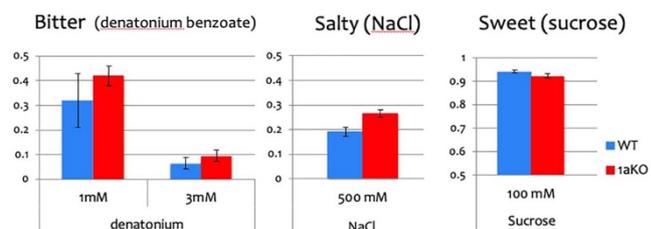


図6 酸味以外の味質の味覚嗜好試験

(4) カルシウムイメージング解析

膝神経節(GG)はほぼ全てのニューロンが味覚に関わっている。そこでこの神経節をカルシウムイメージング法にて解析した。酸による細胞内カルシウムの応答は観察できなかったが、味覚の伝達に重要なATPと5-HTに対する応答については記録できたため、この応答に対する酸の影響を観察した(図7)。その結果、pH6.5の酸がATPに対するGGニューロンの応答性に対して、増強、不変、減少という多様性を生み出すことが明らかとなった。これはP2X3ブロッカーであるAF-353と同様の現象であったので、P2X3とP2X2/3の関与が考えられた。

そこで、CHO-K1細胞を用いた強制発現系にてこのメカニズムを追求した。図8のようにP2X3単独の細胞ではpH6.5の酸によりリガンドに対する用量応答曲線が右側にシフトしており、最大応答で比較するとその応答は有意に抑制されていた。一方、P2X3に加えP2X2も発現させた細胞ではpH6.5により用量応答曲線は変化せず、さらにASIC1aの存在により2通りの結果が得られた。ASIC1a非存在下では酸により応答が増強する一方、ASIC1a存在下ではpH7.4と同程度の応答であった。

酸味の伝達は、他の味質の伝達とは異なり、古典的なシナプスを介して行われている。シナプス小胞内には神経伝達物質とともに水素イオンも存在し機能することが知られているので、III型味細胞は酸味伝達の際にシナプス小胞から水素イオンを放出して後シナプスの応答を修飾していると考えられる。一種の「側方抑制によるコントラスト強調」と考えられ、ASIC1aもこの機能に関与している可能性がある。

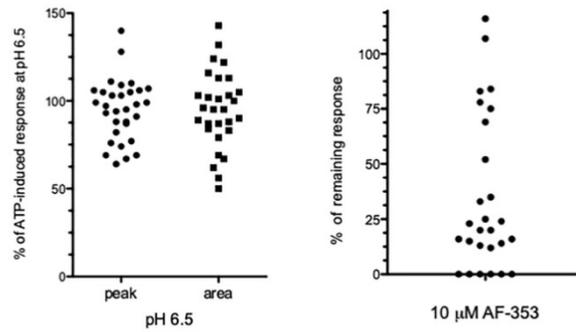


図7 マウス膝神経節ニューロンのATPに対する応答性

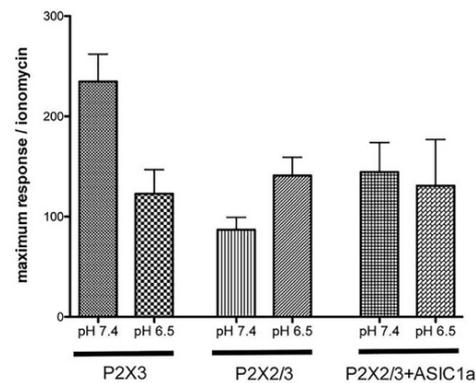
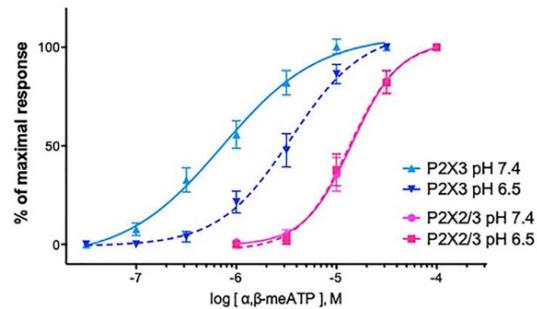


図8 CHO-K1細胞を用いた強制発現系による解析

(5) TRPV4 酸感受性イオンチャネルの解析

TRPV4も酸に感受性を持つイオンチャネルである。一般上皮の幹細胞に発現することはわかっていたが、味蕾の幹細胞については調べられていなかった。そこで我々はマウス味蕾において味幹細胞(IV型味細胞)のマーカーであるsonic hedgehog(SHH)とともに、TRPV4の免疫染色を実施し、TRPV4がこのIV型味細胞にも一部発現していることを見いだした(図9)。

さらに金城学院大学薬学部の津嶋教授にご協力いただき、29-45週齢の野生型マウス(WT)とTRPV4-KOマウス(KO)(理研BRC;RBRC01939)の酸味に対する忌避反応を観察したところ、10mM塩酸に対する反応がWTに比べてKOで減弱していることが明らかとなった(図10)。

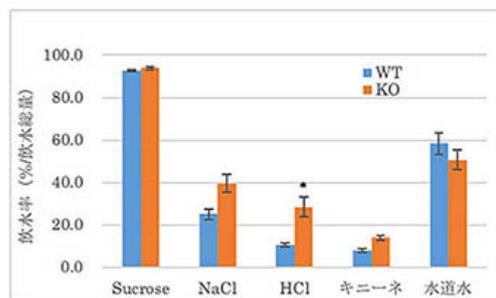


図10 TRPV4-KOマウスにおける味覚嗜好試験

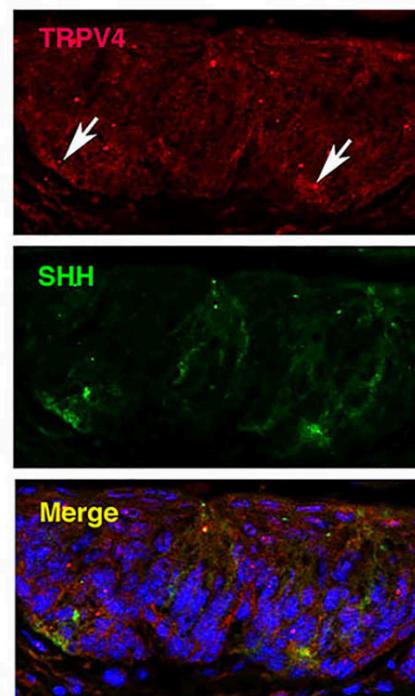


図9 マウス味蕾におけるTRPV4の局在

<引用文献>

① Richter TA, Dvoryanchikov GA, Roper SD, Chaudhari N. Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. J Neurosci. 2004 Apr 21;24(16):4088-91.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① Ueda T, Hoshikawa M, Shibata Y, Kumamoto N, Ugawa S. Basal cells express functional TRPV4 channels in the mouse nasal epithelium. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Sep 16;474:169-174. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.09.008. 査読有り

② Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, Kumamoto N, Shimada S, Ugawa S. Expression and Regulation of Cav3.2 T-Type Calcium Channels during Inflammatory Hyperalgesia in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. PLoS One. 2015 May 14;10(5):e0127572. doi: 10.1371/journal.pone.0127572. 査読有り

[学会発表] (計4件)

① 樹神璃奈、鈴木映見、野澤里奈、河辺真由美、植田高史、津嶋宏美 生理活性物質の遊離機構における TRPV4 の役割、日本薬学会第 139 年会、2019. 3. 20-23、千葉

② 植田高史、鹿野美千子、柴田泰宏、熊本奈都子、神谷武、鶴川眞也 マウス消化管における ASIC4チャネルの発現 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2018. 3. 28-30, 東京

③ 村瀬香、城戸咲恵、佐藤俊幸、奥田圭、志賀彩美、高瀬弘嗣、水野健太郎、林佑太郎、安井孝周、植田高史、梶光一 野生動物の被曝影響分析手法、日本哺乳類学会、2016. 9. 23-9. 26、筑波

④ 柴田泰宏、星川真理子、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也 マウス前庭系有毛細胞における ASIC1bの発現と分布 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2016. 3. 28-30, 福島

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：柴田 泰宏

ローマ字氏名：(SHIBATA, Yasuhiro)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号：10534745

研究分担者氏名：鶴川 眞也

ローマ字氏名：(UGAWA, Shinya)

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号：20326135

(2)研究協力者

研究協力者氏名：津嶋 宏美

ローマ字氏名：(TSUSHIMA, Hiromi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。