

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07305

研究課題名(和文)植物ポリフェノール類によるTRPチャネル活性化と渋味感覚の仕組み

研究課題名(英文) Diversity of sensitivity of TRPA1 and TRPV1 to polyphenols

研究代表者

斉藤 修 (Saitoh, Osamu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：60241262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、渋味を呈するポリフェノール類が如何にTRPチャネルを活性化し、どう感覚神経を発火させ、渋味の感覚に繋がっているかを解析した。哺乳類では、感覚神経にあるTRPA1とTRPV1が、酸化カテキン・タンニン酸・ミリセチンといったポリフェノールで活性化された。次に哺乳類・鳥類・爬虫類・両生類・魚類の感覚TRPの渋味応答を比較すると、哺乳類TRPが最もポリフェノール感受性が高く、一方、爬虫類TRPは、調べたポリフェノール全てに全く応答しないことが判明した。よって、ポリフェノールへの渋味感覚の多様性は、各動物種の食性や生存戦略と深く関わって機能的に獲得されたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味覚の仕組みの中で渋味は、研究が最も進んでいなかった。我々は、3種の渋味を呈するポリフェノールが感覚神経の細胞表面上のTRPA1あるいはTRPV1を直接活性化することを発見し、この神経応答が渋味感覚を引き起こすことが強く示唆された。更にこのポリフェノールの渋味感覚が動物種間で大きく異なることを見出した。ヒトが最も感受性が高く、爬虫類が全く感じないという特徴は、動物の食性と強く関連すると期待され、正に渋味研究を大きく進展させる。一方、ヒト渋味センサーの同定については、長年のなぞ“渋味”が解明されるだけでなく、渋味物質の多くがヒトの健康に有用であり、飲食品・医薬業界に大きなインパクトになる。

研究成果の概要(英文)：In some beverages and several types of fruits, a characteristic astringent sensation is elicited primarily by polyphenols. It has been proposed that astringent sensation is caused in sensory terminals in the oral cavity, but the sensation mechanism for astringent taste induced by polyphenols is currently not well understood. We first observed that three polyphenols of oxidized EGCG, tannic acid, and myricetin activated DRG sensory neurons through TRP channels. We next indicated that mammalian transient receptor potential V1 (TRPV1) and TRPA1, which are nociceptive sensors in sensory neurons, were activated by these polyphenols. Then, we examined the polyphenol-sensitivity of TRPV1 and A1 from various animals. Results indicated that mammalian TRPs have the high sensitivity to polyphenols, and that reptile TRPs are much less sensitive, demonstrating that the diverse polyphenol sensitivity of TRPs are involved in food habitat and/or adaptation to environment of each animal.

研究分野：生化学、神経細胞生物学

キーワード：味覚 チャンネル センサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、高等動物が舌の味蕾で感じる5基本味のセンサーとして、種々の受容体とイオンチャネルが同定されてきた。また基本味以外にも、主に口の間覚神経などを刺激する味覚の表現として辛味・渋味などがあり、そのうち辛味の感覚は Transient receptor potential (TRP) チャネルがセンサーの本体である。TRP ファミリーは、化学物質・温冷感・酸化還元・pH など様々な変化に対して応答する6回膜貫通型のカチオンチャネル分子である。辛味の感覚は、辛味成分の capsaicin (CAP) などが味覚神経にある TRPV1 に作用し、活性化・陽イオン流入を引き起こさせ、神経細胞を興奮させることによって起こる。これに対し、渋味については、センサーやその感覚の実体、辛味との識別など、不明な点が非常に多かった。渋味感覚を引き起こす物質としては、植物由来のポリフェノール類が多く、渋柿・ワインに含まれるタンニン、緑茶に豊富なカテキン類、コーヒーに多いクロロゲン酸、更にザクロ・ベリーに多いエラグ酸などが知られている。

これに対し、我々は、本研究の実施前に、主要な緑茶カテキンの EGCG がどのように渋味感覚を引き起こすのか、多くの点を明らかにしていた。即ち、お茶に含まれる EGCG の自動酸化物の EGCG 二量体 (Theasinensin) が、感覚神経上の TRPA1 と TRPV1 を特異的に活性化する渋味リガンドである事を突き止めていた。しかも、その応答は辛味物質による TRP 活性化のパターンとは大きく異なり、緩徐な活性化を引き起こすことを明らかにしていた。更に、酸化 EGCG が、実際の感覚神経の後根神経節細胞 (DRG) を「特異的な発火パターン」で活性化することが発見された。即ち、TRPA1 あるいは TRPV1 を刺激する辛味物質 (AITC, CAP) はほぼ同調して細胞を活性化するが、渋味物質の酸化 EGCG では細胞はバラバラにずれて興奮する事が判明した。この現象は、渋味物質が両 TRP を緩徐に活性化する為、発火の閾値に達するまでの時間が細胞ごとに異なるためと考えられた。おそらく、「これらの活性化・発火パターンの違いが、辛味と渋味の違いとして識別されるのではないだろうか」と考えられた。

2. 研究の目的

前述の背景の渋味仮説を検証する為、本実施研究では、渋味を呈する各種のポリフェノールを用いて、感覚神経上の TRP センサーを活性化して渋味応答を引き起こすかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ポリフェノール類による感覚神経発火の解析

マウスより後根神経節を単離し酵素解離後、イメージングチェンバーに培養する。この培養感覚神経に、Fluo8 などのカルシウム感受性色素を取り込ませた後、種々の濃度のポリフェノール (酸化 EGCG、タンニン酸、クロロゲン酸、エラグ酸、ミリセチン) を作用させ、細胞応答を Ca²⁺ イメージング法で解析した。酸化 EGCG 以外の渋味を引き起こすポリフェノール類が、どう感覚神経を発火させるのか、詳細に観察した。ポリフェノール添加後、AITC あるいは CAP (カプサイシン) を添加してどの TRP 発現細胞が応答したかを調べ、また特異的な応答が各 TRP 阻害剤を加え遮断効果を確認した。また、濃度依存性も検討した。

(2) ヒト、ネズミ、ヘビ、ゼブラフィッシュの TRPA1 及び TRPV1 の cDNA (ゼブラフィッシュについては TRPA1a と b の二種) は、海外の研究者から譲り受けた。ニワトリ、アホロートル、メダカの TRPA1 及び TRPV1 (メダカについては、TRPV1a と b) については、全長 cDNA を後根神経節あるいは脳からクローニングし、配列決定後 (DBJ に登録中) 応答解析に使用した。

(3) 各動物の TRPA1 あるいは TRPV1 を発現させた HEK 細胞に、カルシウム感受性色素の Fluo8 を取り込ませた後、渋味感覚を引き起こすポリフェノール類を作用させ、Ca²⁺ 応答を解析した。

(Ca²⁺イメージング法)。活性化は濃度依存的かどうか調べた。又、それらの細胞応答が特異的か、TRPA1 阻害剤の AP18 や HC-030031、TRPV1 阻害剤カプサゼピンや SB366791 の応答遮断効果を解析した。

4. 研究成果

(1) 各ポフェノールによる感覚神経の活性化

培養マウス後根神経節細胞に各ポフェノール(酸化 EGCG、タンニン酸、クロロゲン酸、エラグ酸、ミリセチン)を作用させ、Ca²⁺イメージング解析で応答を調べた。クロロゲン酸とエラグ酸は、濃度を上げて安定した細胞応答は得られなかった。一方、酸化 EGCG は以前報告したように顕著な細胞応答が観られ、その応答は TRP チャネルのジェネラル阻害剤 Ruthenium red(RR)で完全阻害され、TRPA1 阻害剤 HC030031(HC)と TRPV1 阻害剤 SB366791(SB)によって部分阻害された。また、タンニン酸も顕著な感覚神経の応答を引き起こし、その応答は TRP チャネルのジェネラル阻害剤 RR と V1 阻害剤 SB で強く阻害され、A1 阻害剤 HC では殆ど阻害されなかった。更に、ミリセチンも顕著な応答を引き起こして、その応答は TRP チャネルのジェネラル阻害剤 RR で完全阻害されたが、HC と SB では部分阻害のみであった。

これらのことから、感覚神経は確かに複数のポフェノールによって活性化され、それらの応答は TRPA1 及び TRPV1 阻害剤で影響されることから、これら TRP を介して神経応答していることが分かった。

(2) 各動物の TRP チャネルのポリフェノール応答性

各動物の TRPA1 のポリフェノール応答性

実験に先立ち、ニワトリ、アホロートル、メダカの TRPA1 をクローニング・配列決定した(AB986554, Chem. Senses 40:27, LC381924, Neuroreport 30:323, XM_004081025, BBRC494:194)。ヒト、マウス、ニワトリ、ラットヘビ、ガラガラヘビ、ツメガエル、アホロートル、ゼブラフィッシュ、フグ、メダカの TRPA1 を HEK 細胞に発現させ、3種のポリフェノール(酸化 EGCG、タンニン酸、ミリセチン)に対する応答を Ca²⁺イメージング解析で調べた。その結果、ヒト TRPA1 は、3種全てに応答した。マウス TRPA1 は、酸化 EGCG とミリセチンに応答した。ニワトリ TRPA1 は、タンニン酸のみに応答した。どちらのヘビ TRPA1 もすべてに応答しなかった。ツメガエル TRPA1 は、ミリセチンのみに応答した。アホロートル TRPA1 は、タンニン酸とミリセチンに応答した。ゼブラフィッシュ TRPA1a は3種全てに応答したが、ゼブラフィッシュ TRPA1 b は全く応答しなかった。フグとメダカの TRPA1 は、ミリセチンにのみ応答した。このように TRPA1 の3種のポリフェノールへの応答は、動物ごとに実に多様であることが判明した(図1)。

各動物の TRPV1 のポリフェノール応答性

実験に先立ち、アホロートル、メダカの TRPV1 をクローニング・配列決定した(登録中)。ヒト、ラット、ニワトリ、ガラガラヘビ、アホロートル、ゼブラフィッシュ、メダカ(TRPV1 b)の TRPV1 を HEK 細胞に発現させ、3種のポリフェノール(酸化 EGCG、タンニン酸、ミリセチン)に対する応答を Ca²⁺イメージング解析で調べた。その結果、ヒト、ラット、ニワトリの TRPV1 は、3種全てに応答した。ガラガラヘビ TRPV1 は、全く応答しなかった。アホロートル TRPV1 は、タンニン酸のみに応答した。ゼブラフィッシュ TRPV1 は酸化 EGCG とタンニン酸に応答したが、メダカの TRPV1b は、3種全てに応答しなかった。このように TRPV1 の3種のポリフェノールへの応答も、動物ごとに実に多様であることが判明した(図1)。

まとめを図1に示した。

classification	Species	Polyphenols					
		Oxi-EGCG		Tannic acid		Myricetin	
		A1	V1	A1	V1	A1	V1
Mammal	Human	○	○	○	○	○	○
	Rodent	○	○	×	○	○	○
Bird	Chicken	×	○	○	○	×	△
Reptile	snake	×	×	×	×	×	×
Amphibian	Axolotl	×	×	○	○	○	×
Fish	Zebrafish	○	△	△	○	○	×
	Medaka	×	×	×	×	△	×

図 1 各動物の TRPA1 と TRPV1 のポリフェノール類への応答

これらの研究により、「哺乳類 TRP のポリフェノール感受性が最も高い」、「爬虫類 TRP にはほぼポリフェノール感受性ない」、「両生類・魚類の TRP のポリフェノール感受性は多様である」の傾向が明らかになった。

(3) ポリフェノール認識部位

TRP チャンネルの渋味リガンドのポリフェノールの認識機構の解明に向け、両チャンネルのキメラ作り、感受性変化を調べた。

TRPA1 のポリフェノールの認識

酸化 EGCG とミリセチンに反応するマウス TRPA1 とタンニン酸のみに反応するニワトリ TRPA1 の間で 16 回のアンキリンリピートを含む N 端を交換し、3 種のポリフェノール反応性を解析した結果、マウスの N 端を持ち、後半はニワトリのキメラ TRPA1 は、タンニン酸のみ反応した。逆キメラのニワトリの N 端を持ち、後半はマウスのキメラ TRPA1 は、酸化 EGCG とミリセチンに反応した。即ち、後半の 6 回膜貫通部を含む部位に 3 種のポリフェノールの認識部位があると考えられた。また、酸化 EGCG・ミリセチン認識とタンニン酸認識が共存しないケースもあることから、少なくとも二つ以上の認識部位を使っていると考えられた。

TRPV1 のポリフェノールの認識

酸化 EGCG、タンニン酸、ミリセチンに反応するラット TRPV1 と全てに反応しないガラガラヘビ TRPV1 の間でアンキリンリピートを含む N 端を交換し、3 種のポリフェノール反応性を解析した結果、ガラガラヘビの N 端を持ち、後半はラットのキメラ TRPV1 は、3 種全てに反応した。逆キメラの TRPV1 は、チャンネルを形成せず、カプサイシン反応も示さない為、解析出来なかった。しかし、前述のヘビ・ラットキメラ TRPV1 の結果から、後半の 6 回膜貫通部を含む部位に 3 種のポリフェノールの認識部位があると考えられた。

これらの研究により、植物由来のポリフェノールによっておこる TRPA1 及び TRPV1 を介した口腔内の感覚神経の活性化が渋味という味覚の感覚を引き起こしている現象、仕組み、そして多様性が明らかになってきた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Oda, M., Ogino, H., Kubo, Y., and Saitoh, O. Functional properties of axolotl transient receptor potential ankyrin 1 revealed by the heterologous expression system. *NeuroReport*, 30:323–330 (2019)

DOI: 10.1097/WNR.0000000000001197

Mito, N., Ohshima, K., and Saitoh, O. Genetic diversity among clouded salamanders (*Hynobius nebulosus*) in Shiga prefecture. *Zool. Sci.* 35, 427-435 (2018)

DOI: 10.2108/zs170095

Oda, M., Kubo, Y., and Saitoh, O. Sensitivity of Takifugu TRPA1 to thermal stimulations analyzed in oocyte expression system. *NeuroReport* 29, 280-285 (2018)

DOI: <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000939>

Oda, M., Saito, K., Hatta, S., Kubo, Y., and Saitoh, O. Chemical and thermal Sensitivity of medaka TRPA1 analyzed in heterologous expression systems. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 494, 194-201 (2017)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.057

[学会発表](計 18 件)

西川翔、黒木麻湖、齋藤修、イトヨの TRPA1 のクローニングと機能解析、第 89 回日本動物学会大会、札幌代替大会、東京(2018,12,9)

黒木麻湖、堀翔悟、齋藤修、アホロートル TRPV1 のクローニングと機能解析、第 41 回日本分子生物学会年会、横浜(2018,11,30)

黒木麻湖、齋藤修、侵害刺激センサー TRPA1 のポリフェノール応答性についての研究、第 52 回日本味と匂い学会大会、大宮(2018,10,29)

高橋紗悠里、水戸(黒木)麻湖、齋藤修、渋味を呈するポリフェノールによる TRP チャネル活性化の動物種間多様性 第 52 回日本味と匂い学会大会、大宮(2018,10,29)

浅野麻己子、安田隆之介、久保義弘、齋藤修、メダカの 2 種の TRPV1 の刺激応答性の解析、第 91 回日本生化学会大会、京都(2018,9,25)

黒木麻湖、齋藤修、TRPA1 のポリフェノール応答の多様性 第 65 回日本生化学会 近畿支部例会、兵庫(2018,5,26)

織田麻衣、齋藤修、魚類 TRPA1 の高温応答特性を決定する分子基盤の検討 第 90 回日本生化学会、神戸(2017,12,7)

浅野麻己子、安田隆ノ介、糸慎一郎、久保義弘、齋藤修、メダカの侵害刺激センサー TRPV1 の刺激応答性についての研究 第 90 回日本生化学会、神戸(2017,12,7)

高橋紗悠里、水戸(黒木)麻湖、齋藤修、渋味物質タンニン酸による TRPV1 活性化に関する研究 第 51 回日本味と匂い学会、神戸(2017,9,26)

高橋紗悠里、水戸(黒木)麻湖、齋藤修、渋味物質タンニン酸による TRPV1 活性化に関する研究 第 64 回日本生化学会 近畿支部例会、大阪(2017,5,27)

浅野麻己子、安田隆ノ介、齋藤修、メダカの侵害刺激センサー TRPV1 の刺激応答性についての研究 第 64 回日本生化学会 近畿支部例会、大阪(2017,5,27)

Mai Oda, Kazuya Ninomiya, Yoshihiro Kubo, Osamu Saitoh, Sensitivity of Takifugu TRPA1 to chemical and thermal stimuli analyzed in heterologous expression systems. 第 87 回 日本動物学会、沖縄(2016,11,17)

Kan Saito, Yasuhiro Tonoyama, Mai Oda, Osamu Saitoh, Expression and functional properties of TRPA1 in medaka, *Oryzias latipes*. 第 87 回 日本動物学会、沖縄(2016,11,17)

Mamiko Asano, Ryunosuke Yasuda, Mai Oda, Osamu Saitoh, Molecular cloning of two TRPV1 paralogs in medaka. 第87回 日本動物学会、沖縄(2016,11,17)

Shogo Hori, Mai Oda, Osamu Saitoh, Molecular identification of TRPV2 from axolotl. 第87回 日本動物学会、沖縄(2016,11,17)

Mai Oda, Hajime Ogino, Yoshihiro Kubo, Osamu Saitoh, Molecular identification of TRPA1 from axolotl. 第87回 日本動物学会、沖縄(2016,11,17)

齊藤修、水戸(黒木)麻湖、茶カテキンと TRP チャネル、第31回日本香辛料研究会、長浜(2016,10,8)

織田麻衣、齊藤修、アホロートル TRPA1 の機能解析 第63回日本生化学会 近畿支部例会、神戸(2016,5,21)

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：久保 義弘

ローマ字氏名：(KUBO, yoshihiro)

研究協力者氏名：黒木 麻湖

ローマ字氏名：(KUROGI, mako)

研究協力者氏名：織田 麻衣

ローマ字氏名：(ODA, mai)

研究協力者氏名：堀 翔悟

ローマ字氏名：(HORI, shogo)

研究協力者氏名：齊藤 寛

ローマ字氏名：(SAITO, kan)

研究協力者氏名：荻野 肇

ローマ字氏名：(OGINO, hajime)

研究協力者氏名：浅野 麻己子

ローマ字氏名：(ASANO, mamiko)

研究協力者氏名：高橋 紗悠里

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, sayuri)

研究協力者氏名：西川 翔

ローマ字氏名：(NISHIKWA, shou)

研究協力者氏名：安田 隆之介

ローマ字氏名：(YASUDA, ryunosuke)

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。