

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月24日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15181

研究課題名（和文）CALHMチャネル機能を基盤とした感覚情報伝達機構の新規概念の構築

研究課題名（英文）Neurotransmission of sensory information through CALHM ion channels

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）・教授

研究者番号：20706824

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：イオンチャネルサブユニットCALHM1およびCALHM3の機能と発現を独自の研究ツールを用いて探索・解析した。まずCALHM1のゲート機構と局在がパルミトイル化で調節されることを発見した。次に、味覚を担う味細胞からの神経伝達物質放出経路がヘテロ6量体CALHM1/3チャネルと突き止めた。さらに、CALHM1/3により構成される味蕾細胞シナプスの局在と構造を明らかにした。一方で、CALHMチャネルを発現する新たな感覚受容器細胞を見出している。以上よりCALHMチャネルが担う味蕾細胞シナプスの構成分子・局在・構造を明らかにするとともに、CALHMシナプスの新たな生理機能を示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外ATPシグナルは味覚・機械・侵害など多くの感覚情報伝達など幅広い生理現象を担うが、多くの場合細胞からのATP放出の分子機構は不明である。本研究では味覚の認識を担う味蕾細胞からの神経伝達物質ATPの放出経路としてCALHM1/3チャネルを同定し、その機能調節機構も発見した。さらに、CALHMチャネルが担う味蕾細胞シナプスの構造とその形成原理の一端を明らかにすることで、シナプス小胞を持たない”イオンチャネルシナプス”とも呼ぶべき全く新しい化学シナプスの概念を確立した。さらにCALHMチャネルシナプスの新たな機能部位を示唆するデータを得たことは新たな学術領域の萌芽である。

研究成果の概要（英文）：Using my original research tools, I analyzed function and expression of two ion channel subunits, CALHM1 and CALHM3. First, I discovered protein palmitoylation on CALHM1 regulating its gating and localization. Second, I identified a CALHM1/3 heteromer as the neurotransmitter-release pathway in taste receptor cells of the taste buds required for taste perception. Third, I elucidated the structure and localization of CALHM channel synapses in taste cells. Lastly, my analyses uncovered sensory cells expressing CALHM channel subunits. These findings revealed the structure, localization, molecular mechanisms, function, and regulatory mechanisms of CALHM channel synapses of the taste buds, and further proposed novel physiological function of CALHM synapses.

研究分野：生理学

キーワード：シナプス イオンチャネル CALHM 味覚

## 1. 研究開始当初の背景

細胞外 ATP シグナルは味覚・機械・侵害・温度受容など多くの感覚情報伝達、血管緊張性制御、グリア細胞間連絡など幅広い生理現象を担うが、多くの場合細胞からの ATP 放出の分子機構は不明である (*Physiol Rev* 87:659, 2007)。Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) チャンネルはアルツハイマー病発症に関わる遺伝子として同定され (*Cell* 133:1149, 2008)、最近 CALHM1 が重要な生理的役割を担っていることが明らかとなってきた (*PNAS* 109:E1963, 2012; *J Neurosci* 33:12275, 2013)。特に、CALHM1 が ATP 放出チャンネルとして味蕾での甘味・苦味・旨味のプリン作動性神経伝達を担うという発見(研究代表者の成果: Taruno *et al. Nature* 495:223, 2013; Taruno *et al. BioEssays* 35:1111, 2013)から、CALHM 研究が ATP 放出機構不明のプリン作動性細胞間連絡分子機構解明の糸口として期待されているが、従来の研究は CALHM1 単独および味蕾等に局限された部位での研究に留まっていた。

## 2. 研究の目的

本研究では独自の研究ツールを用いて CALHM チャンネルファミリーの全身における発現部位・機能発現分子機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変動物の作出

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の技術を用いて、内在性 CALHM1 タンパクに V5 エピトープタグを付与するとともに CALHM1 プロモータの下流で Cre を発現するノックインマウス系統 Calhm1-V5-IRES-Cre を作出した。本マウスは組織における CALHM1 パルミトイル化の生化学的検出に用いた。また、GCaMP3 レポーターマウス Rosa26LSL-GCaMP3 (Ai38 系統) と交配させることで Calhm1 プロモータの制御下で GCaMP3 を発現するマウス Calhm1-GCaMP3 の作出にも本マウスを用いた。

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の技術を用いて、Calhm3 の exon1 を tdTomato に置換した Calhm3-tdTomato マウス系統を作出した。本マウスは、Calhm3 をノックアウトするとともに CALHM3 プロモータの下流で赤色蛍光タンパク tdTomato を発現するので、Calhm3 の機能解析とともに全身における Calhm3 発現部位の探索にも用いた。

### (2) 抗マウス CALHM1 抗体の作出

マウス CALHM1 の C 末端領域に対するポリクローナル抗体をモルモットを宿主に作製した。血清からアフィニティ精製によって得た精製抗体を実験に用いた。

### (3) 電気生理実験

急性単離した味細胞または CALHM チャンネルを発現させた培養細胞におけるパッチクランプ法による全細胞電流測定を行った。

### (4) ATP 放出アッセイ

急性単離した味細胞または CALHM チャンネルを発現させた培養細胞からの細胞外への ATP 放出量をルシフェラーゼアッセイを用いて測定した。

### (5) 細胞・組織免疫蛍光染色

4 % paraformaldehyde で固定した組織切片または培養細胞を用いて、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。

### (6) 味覚解析

4 8時間2瓶味覚嗜好性試験、リックテスト、鼓索神経応答を用いてマウス個体の味刺激に対する行動および神経応答を解析した。

#### (7) 生化学解析

急性単離した味細胞または CALHM チャンネルを発現させた培養細胞の細胞溶解液を用いてタンパク質間相互作用を調べる共免疫沈降法、細胞表面に局在するタンパク質検出のための表面ビオチン化法、パルミトイル化を検出するアシル-ビオチン交換アッセイ (ABE アッセイ) をはじめ種々の生化学的解析を適宜用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) パルミトイル化による CALHM1 機能調節機構の発見 (Taruno et al. *J Physiol*, 2017)

CALHM1 の翻訳後修飾を探索した。様々な化学修飾を受けるシステイン残基 (C) に着目し、変異体スクリーニングから C100 と C207 の分子内 2 カ所にパルミトイル化とよばれる可逆的脂質修飾を受けることを発見した。パルミトイル化の検出にはトリチウムによる代謝ラベルや、アシル-ビオチン交換法などの生化学的手法を駆使した。また、23あるパルミトイル化酵素のスクリーニングにより、3つの CALHM1 パルミトイル化酵素 DHHC3/7/20 を同定した。さらにパルミトイル化が CALHM1 の電位依存性を制御すること、味細胞に発現する CALHM1 がパルミトイル化を受けていることなどを明らかにした。これは初めて見つかった CALHM1 機能調節機構であり、味覚神経伝達の調節メカニズムを含めた全容解明に資する発見である。

#### (2) 味蕾細胞神経伝達物質放出経路 CALHM1/CALHM3 チャンネルの同定 (Ma#, Taruno# et al. *Neuron*, 2018)

次に、CALHM1 に結合する分子を探索した。その結果、新たな CALHM1 の修飾サブユニット CALHM3 を発見し、CALHM1/CALHM3 複合体が内在性味細胞 ATP 放出チャンネルと同一の性質を持つ電位依存性 ATP 放出チャンネルとして機能することを電気生理学的な方法を駆使して明らかにした。さらに CALHM1 と同様に、マウスにおける CALHM3 ノックアウトが II 型味細胞 ATP チャンネル電流・ATP 放出および味認識 (甘・苦・うま味) を消失させたことから、CALHM1/CALHM3 複合体が II 型細胞の神経伝達物質放出機構の分子実体であると結論づけた。

本研究結果により、味を舌から脳へと伝える分子レベルの仕組みを明らかにするとともに、シナプス小胞をもちいないイオンチャンネルによる神経伝達物質の放出という“イオンチャンネルシナプス”の概念を分子レベルで確立することに成功した。

#### (3) 味蕾細胞 CALHM チャンネルシナプスの構造・局在の解明 (Kashio et al. *Sci Rep*, 2019)

(2) で明らかにしたイオンチャンネルシナプスは類例のない新しい化学シナプス様式であり、その構造や形成原理については全くわかっていない。そこで、独自にモルモットを宿主に作製した抗マウス CALHM1 抗体を用いてマウス味蕾における CALHM1 の局在を解析し、CALHM チャンネルが味細胞と ATP 受容体 P2X2R を発現する求心性味細胞との接点に局在することを明らかにした。味細胞内で、求心性味細胞と接する部分の形質膜を裏打ちするように巨大なミトコンドリアが存在することが知られている。これらの結果から、巨大ミトコンドリア (ATP リザーバー) ~ CALHM1/3 チャンネル (ATP 放出部位) ~ 求心性味神経 (ATP レシーバー) が直線的空間配置を取ること限局かつ安定した神経伝達を可能にしていることが強く示唆された。

さらに、MDCKII 細胞による極性モデル上皮への CALHM サブユニットの強制発現系を用いて、CALHM チャンネルが生得的に側底膜へと選択的にソーティングされる性質をもつことが明らかになった。側底膜ソーティングに必要なシグナル配列の一部も突き止めることができた。

このように、CALHM チャンネルによるイオンチャンネルシナプスの構造とその形成原理の一端を明らかにした。

#### (4) CALHM チャンネルサブユニットの発現部位の網羅的解析

CALHM チャンネル機能は今のところ味細胞においてのみ詳細に記述されている。一方で、その他の臓器における発現や機能については未だよく分かっていない。さらに、おそらく発現量が低いことが原因で *in situ* hybridization や特異的抗体などを用いた発現解析もこれまでうまくいっていない。そこで、我々は CALHM サブユニットの発現の高感度解析を可能にする 2 系統の遺伝子改変マウス Calhm1-GCaMP3 および Calhm3-tdTomato を作出し、これらのマウスを用いて Calhm1 および Calhm3 を発現する細胞を全身で探索することを目指した。CRISPR/Cas9 システムによって Calhm1-GCaMP3 および Calhm3-tdTomato の作出に成功し、それぞれ各種臓器における GCaMP3 および tdTomato の発現を解析している。全ての臓器の解析は終了していないが、これまでに今まで知られていなかった CALHM サブユニット発現細胞を発見しており、今後の CALHM チャンネル研究の萌芽が得られたと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Taruno A, Kashio M. AAV-Mediated Gene Delivery to Taste Cells of the Tongue. *Methods Mol Biol.* 2019;1950:299-307.
2. Kashio M, Wei-Qi G, Ohsaki Y, Kido MA, Taruno A. CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral membrane of epithelial cells including taste cells. *Sci Rep.* 2019;9:2681.
3. Taruno A. ATP Release Channels. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
4. Mura E, Taruno A, Yagi M, Yokota K, Hayashi Y. Innate and acquired tolerance to bitter stimuli in mice. *PLoS One.* 2018;13:e0210032.
5. Matsumoto M, Zhang J, Zhang X, Liu J, Jiang JX, Yamaguchi K, Taruno A, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Cui W, Matsuno K, Marunaka Y, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2018;115:412-420.
6. Marunaka Y, Niisato N, Miyazaki H, Nakajima KI, 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.* 2018;25:4876-4887.
7. Marunaka R, Taruno A, Yamamoto T, Kanamura N, Marunaka Y. Action of Protein Tyrosine Kinase Inhibitors on the Hypotonicity-Stimulated Trafficking Kinetics of Epithelial Na<sup>+</sup> Channels (ENaC) in Renal Epithelial Cells: Analysis Using a Mathematical Model. *Cell Physiol Biochem.* 2018;50:363-377.
8. Ma Z, Taruno A, Ohmoto M, Jyotaki M, Lim JC, Miyazaki H, Niisato N, Marunaka Y, Lee RJ, Hoff H, Payne R, Demuro A, Parker I, Mitchell CH, Henao-Mejia J, Tanis JE, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK. CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes. *Neuron.* 2018;98:547-561 e510.
9. Taruno A, Sun H, Nakajo K, Murakami T, Ohsaki Y, Kido MA, Ono F, Marunaka Y. Post-translational palmitoylation controls the voltage gating and lipid raft association of the

CALHM1 channel. *J Physiol.* 2017;595:6121-6145.

10. Taruno A, Marunaka Y. Hypotonicity activates a voltage-dependent membrane conductance in N2a neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;484:331-335.

11. 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. *Chem Senses.* 2017;42:69-78.

12. Sasamoto K, Marunaka R, Niisato N, Sun H, Taruno A, Pezzotti G, Yamamoto T, Kanamura N, Zhu W, Nishio K, Inui T, Eaton DC, Marunaka Y. Analysis of Aprotinin, a Protease Inhibitor, Action on the Trafficking of Epithelial Na<sup>+</sup> Channels (ENaC) in Renal Epithelial Cells Using a Mathematical Model. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41:1865-1880.

13. Nomura T, Taruno A, Shiraishi M, Nakahari T, Inui T, Sokabe M, Eaton DC, Marunaka Y. Current-direction/amplitude-dependent single channel gating kinetics of mouse pannexin 1 channel: a new concept for gating kinetics. *Sci Rep.* 2017;7:10512.

14. Marunaka Y, Marunaka R, Sun H, Yamamoto T, Kanamura N, Inui T, Taruno A. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules.* 2017;22.

〔学会発表〕（計 26 件）

1) Taruno A, Marunaka Y. Purinergic neurotransmission of taste by CALHM channel. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. 2016.6.5-9; Yokohama.

2) Taruno A, Sun H, Kashio M, Marunaka Y. Regulation of CALHM1 channel by protein S-palmitoylation. 17th International Symposium on Olfaction and Taste. 2016.6.5-9; Yokohama.

3) Taruno A, Miyazaki H, Niisato N, Sun H, Kashio M, 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. 2016.7.20-22; Yokohama.

4) Taruno A, Sun H, Kashio M, Marunaka Y. S - パルミトイル化修飾による CALHM1 チャネル機能制御. 日本膜学会第 39 年会. 2016.5.10; Tokyo.

5) 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. 2016.12.3-4; Fukuoka.

6) Taruno, A. Molecular machinery for taste neurotransmission from the tongue to the brain. the 2nd UK-Japan Frontiers of Science Symposium. 2016.11.7-9; UK.

7) 樽野陽幸, 丸中良典. Neurotransmission of taste mediated by calcium homeostasis modulator ion channels. 第 94 回日本生理学会大会. 2017.3.28-30; Hamamatsu.

8) 孫紅キン, 樽野陽幸, 中條浩一, 小野富三人, 丸中良典. Palmitoylation regulates gating and lipid raft association of CALHM1 channel. 第 94 回日本生理学会大会. 2017.3.28-30; Hamamatsu.

9) 加塩麻紀子, 樽野陽幸, 丸中良典. Molecular basis of polarized sorting of CALHM channels in epithelial cells. 第 94 回日本生理学会大会. 2017.3.28-30; Hamamatsu.

10) 白石真土, 野村健, 樽野陽幸, 丸中良典. Current-direction/amplitude-dependent single channel gating kinetics of Pannexin 1 channel. 第 94 回日本生理学会大会. 2017.3.28-30; Hamamatsu.

- 11) Taruno A, Marunaka Y. The voltage gating and lipid raft association of CALHM1 channel is controlled by post-translational palmitoylation. 第 51 回日本味と匂学会大会. 2017.9.25-27; Kobe.
- 12) Taruno A. CALHM channel-mediated neurotransmission of tastes. The 19th Scientific Meeting of the Australasian Association for ChemoSensory Science. 2017.12.6-8; Hamilton Island, Australia.
- 13) Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK, Marunaka Y. A CALHM1/CALHM3 heteromeric channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter, and umami tastes. 第 95 回日本生理学会大会. 2018.3.26-28; Takamatsu.
- 14) 奥井元貴, 孫紅昕, 樽野陽幸, 丸中良典. Palmitoylation of CALHM3 positively controls activity of the CALHM1/3 channel. 第 110 回近畿生理学談話会. 2017.11.18; Kobe.
- 15) 白石真土, 野村健, 樽野陽幸, 丸中良典. Pannexin 1 channel gating is dependent on the unitary current direction and amplitude. 第 110 回近畿生理学談話会. 2017.11.18; Kobe.
- 16) Okui M, Sun H, Taruno A, Marunaka Y. Palmitoylation of CALHM3 positively controls activity of the CALHM1/3 channel. 第 95 回日本生理学会大会. 2018.3.26-28; Takamatsu.
- 17) Marunaka R, Taruno A, Marunaka Y. Action of protein tyrosine kinase inhibitors on the trafficking kinetics of epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaC) in renal epithelial cells: Analysis using a mathematical model. 第 95 回日本生理学会大会. 2018.3.26-28; Takamatsu.
- 18) Sun H, Taruno A, Nakajo K, Ono F, Marunaka Y. Regulation of CALHM1 channel gating and association with lipid microdomains by protein S-palmitoylation. 第 95 回日本生理学会大会. 2018.3.26-28; Takamatsu.
- 19) Taruno A. Taste cells lacking synapses open a wide pore channel for rapid neurotransmission of tastes. 第 56 回日本生物物理学会大会. 2018.15-17; Okayama.
- 20) Taruno A. Ion channel synapse: CALHM1/3 channel mediates rapid neurotransmitter release in taste perception. 第 41 回日本神経科学大会. 2018.7.26-29; Kobe.
- 21) 樽野陽幸. 塩味の受容とそのメカニズムについて. うま味研究会公開シンポジウム. 2018.6.29; Tokyo.
- 22) Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses of the taste bud. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan). 2019.3.28-31; Kobe.
- 23) Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. CALHMs: Fast-activating voltage-gated ATP channels for rapid purinergic neurotransmission. The 49th National Institute of Physiological Sciences International Symposium "Ion channels: looking back, seeing ahead". 2018.12.5-8; Okazaki.
- 24) Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses of the taste bud. The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. 2018.11.30-12.2; Fukuoka.
- 25) Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses in taste buds. 第 52 回日本味と匂学会大会. 2018.10.29-31; Saitama.
- 26) Taruno A. イオンチャネルから味覚へ (研究奨励賞受賞講演). 第 52 回日本味と匂学会大会. 2018.10.29-31; Saitama.