

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780089

研究課題名 (和文) 酸味受容体候補の生理機能の検証と食品科学的応用に向けた分子基盤の解明

研究課題名 (英文) The in vivo roles of PKD1L3 and PKD2L1 in sour taste detection

研究代表者

石丸 喜朗 (ISHIMARU YOSHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：10451840

研究成果の概要 (和文)：

研究代表者らが世界に先駆けて発見した酸味受容体候補 PKD1L3 と PKD2L1 の生理機能を検証する目的で、それぞれの遺伝子破壊(KO)マウスと二重 KO マウスを作出した。KO マウスが、酸味や他の味覚受容に関してどのような表現型を示すかを調べるために、行動学的な2瓶嗜好テスト・リッキングテストと電気生理学的な味神経応答解析を行った。行動学的解析では、いずれの KO マウスも、全ての5基本味物質溶液に対して同腹子の野生型マウスと同様の嗜好行動や忌避行動を示した。一方、味神経応答解析では、PKD2L1 KO マウスと二重 KO マウスのクエン酸、塩酸、酢酸に対する鼓索神経応答が、神経束全体と単一神経繊維の両方の場合で、野生型マウスと比較して有意に抑制された。PKD1L3 KO マウスでは酸刺激応答が野生型マウスと同様に観察された。また、舌咽神経ではいずれの KO マウスでも野生型マウスと同様の酸刺激に対する応答を示した。さらに、塩味、甘味、苦味、うま味物質に対しては、鼓索神経と舌咽神経の両方で、いずれの KO マウスも野生型と同様の応答を示した。以上の結果から、PKD2L1 は生体内で実際に酸味受容体として機能することが実証され、また、体性感覚など味蕾組織以外を介する酸味受容機構の存在が示唆された。

ヒト酸味受容体に関しては、カルシウムイメージング法を用いた機能解析において、クエン酸など酸味物質投与に対してオフ応答を示す機能的な PKD1L3 の N 末端細胞外領域と PKD2L1 の全長領域を同定した。N 末端細胞外領域がヒト由来でそれ以降はマウス由来のキメラ PKD1L3 を、ヒト PKD2L1 と共に HEK293 細胞に発現させた場合、クエン酸など酸味物質投与に対してオフ応答を示し、また、酸味を甘味に変える味覚修飾物質クルクリゴ果実抽出物存在下でも酸刺激に対する応答が観察された。この実験結果からクルクリゴの酸味抑制機構としては、PKD1L3 の N 末端細胞外領域以外の領域に対して作用するか、あるいは、味覚受容体レベルではなく、味細胞や神経レベルで抑制される可能性が考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

To elucidate the physiological roles of a candidate sour taste receptor, PKD1L3/PKD2L1, we generated gene knockout mice for PKD1L3 and/or PKD2L1. To investigate phenotype of these mice in taste sensation including sour taste, behavioral and electrophysiological analyses were performed. In the behavioral analyses such as two-bottle preference test and brief-access licking test, PKD1L3, PKD2L1, and double KO mice showed normal preference or avoidance behavior similar to the wild-type littermates for all the five basic taste qualities. In contrast, both whole-nerve and single-fiber chorda tympani nerve responses of PKD2L1 KO and double KO mice to sour solutions such as citric acid, HCl, and acetic acid significantly reduced compared with wild-type mice, while PKD1L3 KO mice showed normal responses. In glossopharyngeal nerve recordings, PKD1L3, PKD2L1, and double KO mice showed normal responses compared with wild-type mice. In addition, PKD1L3, PKD2L1, and double KO mice showed responses similar to wild-type mice upon stimulation with salt,

sweet, bitter, and umami (savory) taste compounds. Collectively, these results demonstrate that PKD2L1 functions as a sour taste receptor *in vivo* and suggest that there are multiple mechanisms underlying sour taste detection such as somatosensation other than via taste buds.

We identified the N-terminal extracellular region of human PKD1L3 and the full-length of human PKD2L1. HEK 293T cells expressing human PKD2L1 and chimeric PKD1L3, which consists of the N-terminal extracellular region of human PKD1L3 and the following region of mouse PKD1L3, showed off-response upon stimulation with sour solution such as citric acid. These cells still showed robust response to sour stimuli in the presence of a taste-modifying protein, neoculin, extracted from *Curculigo latifolia*. These results raise the possibility that neoculin inhibits the region other than the N-terminal extracellular region of human PKD1L3. Alternatively, inhibition event occurs at the level of taste cells or taste neurons, not at the taste receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：味覚受容体、酸味、TRPチャネル、シグナル伝達、遺伝子破壊マウス、味神経応答解析、カルシウムイメージング解析

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物は、食物の栄養価（糖、アミノ酸含量）、毒性（苦味強度）、塩濃度、酸性度（腐敗度）を評価するために味覚系を利用している。口腔内に取り込まれた食物は、主に舌上皮に存在する味蕾という組織でまず受容される。末梢の味蕾において直接味物質を受容する味覚受容体を同定することは、味覚の研究における最重要課題と言える。味覚は、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の5基本味に分類される。近年、味蕾における甘、旨、苦味受容の分子機構に関しては、受容体からその下流のシグナル伝達因子など、多くの知見が得られている。一方、酸味と塩味の受容に関しては、いくつかの受容体候補分子が報告されているが、いずれも真の受容体である証拠は示されていない。例えば、酸味受容体に関しては、ラットにおいてASIC2 (Ugawa *et al.*, 1998; Ugawa *et al.*, 2003)、マウスではHCN1とHCN4 (Stevens *et al.*, 2001)、two-pore domain K⁺チャネル (Lin *et*

al., 2004; Richter *et al.*, 2004)、Na⁺/H⁺ exchanger (Vinnikova *et al.*, 2004) といった分子が提唱されていた。しかし、どの候補分子も、甘・旨味受容体 T1R ファミリーと苦味受容体 T2R ファミリーで示された以下の一連の過程によっては証明されていない。証明には、1) 受容体候補分子が味蕾細胞特異的で強い発現を示すこと、2) ヘテロな細胞系を用いた機能解析において味物質に応答すること、3) 受容体をコードする遺伝子破壊 (KO) マウスの作出と表現型解析によって *in vivo* において実際に味覚受容体として機能することの実証が不可欠である。酸味・塩味受容体の同定こそ、現在、味覚研究分野で最も必要とされていることの一つであった。

このような状況で、2006年、本研究代表者らのグループを含む2つのグループがそれぞれ独立に、新しい酸味受容体の有力な候補TRPチャネル分子に関する論文を発表した (Ishimaru *et al.*, 2006; Huang *et al.*,

2006)。研究代表者らは、33種類ある広義のTRPチャネルファミリー分子に関して、マウス有郭乳頭味蕾における網羅的な発現解析を行った結果、これまで報告されていた *TRPM5* に加えて、2つの分子 *PKD1L3* と *PKD2L1* が味蕾特異的に発現することを発見した。*PKD1L3* と *PKD2L1* は味蕾中の同じ細胞（約20%）に共発現し、これらの細胞は、甘・苦・旨味を受容する細胞とは異なる細胞であった。抗 *PKD2L1* 抗体を用いた免疫組織染色から、*PKD2L1* タンパク質は実際に味を受容する味孔付近に局在した。HEK293細胞に発現させた場合、*PKD1L3* と *PKD2L1* はヘテロマーを形成し、両分子の共発現が、細胞膜表面における機能的な発現に必要であった。HEK293細胞を用いた機能解析（ Ca^{2+} イメージング法とパッチクランプ法）では、両分子を共発現させた場合のみ、酸味物質による刺激に応答したが、他の4基本味物質には応答しなかった。以上の実験結果に基づいて、*PKD1L3/PKD2L1* が酸味受容体候補であることを初めて提唱した。一方、Zukerらのグループは、*PKD2L1* を発現する細胞を毒素によって特異的に死滅させる遺伝子導入マウスを作製して、各種味物質に対する味神経応答を計測し、遺伝子導入マウスは酸味物質だけに応答しないことを示した。2つのグループの実験結果を合わせて考察すると、*PKD1L3/PKD2L1* が酸味受容体であることが強く推察された。なお、味蕾における両遺伝子の発現に関しては、さらに別のグループによっても報告されていた（Lopezjimenez *et al.*, 2006）。

2. 研究の目的

本研究は研究代表者自身が世界に先駆けて発見した酸味受容体候補 *PKD1L3/PKD2L1* を中心分子とする研究である。酸味受容体、酸味受容細胞の細胞内シグナル伝達系、酸味受容細胞と味神経のシナプス連絡、中枢神経系での酸味認識処理といった哺乳類における酸味感覚の全体像を分子細胞生物学的に解明することを最終的な目標とし、本研究では以下に述べる2課題を実施した。

①「*PKD1L3*、*PKD2L1* 遺伝子破壊 (KO) マウスの作出と表現型解析」

PKD1L3/PKD2L1 が実際に生体内で哺乳類の酸味受容体として機能するか解明する目的で、その遺伝子破壊マウスを作製、表現型を解析した。

②「ヒト酸味受容体の同定と味覚修飾物質による酸味抑制機構の解明」

ヒトの酸味受容体 *PKD1L3/PKD2L1* を同定する。酸味を甘味に変える味覚修飾物質（クルクリゴ (*Curculigo latifolia*) 果実のネオクリン）によるヒト酸味受容体の抑制機構を解析した。

3. 研究の方法

①「*PKD1L3*、*PKD2L1* 遺伝子破壊 (KO) マウスの作出と表現型解析」

PKD1L3 か *PKD2L1* 遺伝子の片方、あるいは、両方を欠失させた遺伝子破壊 (KO) マウスを作製し、解剖学的、行動学的、電気生理学的方法を用いて表現型を解析した。

PKD1L3、*PKD2L1* 遺伝子はそれぞれ約60 kb、約45 kbとゲノム上の広い領域から成るため、全コード領域の欠失は実現困難であった。そこで、それぞれの遺伝子産物の機能に不可欠だと予想される推定ボア領域を含む領域を欠失させた。

最初に、味細胞の形態と味覚シグナル伝達に重要な分子群のmRNA発現を調べるため、*PKD1L3*、*PKD2L1*、*TRPM5* のプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。次に、*PKD1L3*、*PKD2L1* KO マウスが、酸味や他の味覚受容において欠損の表現型を示すかを、野生型と比較して調べた。具体的には、1) 2ボトルテスト、2) リッキングテスト、3) 味神経応答記録を行った。リッキングテストは、リッキングメーターを用いて一定時間内に何回なめるかを計測する方法で、2ボトルテストにおいて考慮が必要な末梢の味覚入力以外の因子（中枢神経での処理、学習等）の影響を排除できるため、行動解析に有用である。味神経応答記録は、酸味物質を含む様々な味物質を摂取した際の味神経（鼓索神経、舌咽神経）の電気応答を記録する方法である。さらに、*PKD1L3* KO マウスと *PKD2L1* KO マウスを交配し、*PKD1L3/PKD2L1* 二重 KO マウスを作製して、上記と同様に表現型解析を行った。

②「ヒト酸味受容体の同定と味覚修飾物質による酸味抑制機構の解明」

ヒトの *PKD1L3* と *PKD2L1* コード領域全長を獲得し、培養細胞に発現させて、酸味刺激に対して応答するかを調べた。味覚修飾物質が酸性条件下で、酸味受容体と甘味受容体に与える影響を解析した。

我々が味蕾組織から獲得したマウス *PKD1L3* のコード領域の配列は、精巣由来 (Li *et al.*, 2003) と同じであった。ヒト味蕾組織は入手困難であるため、ヒト精巣 total RNA (Clontech 社) から RT-PCR 法を用いて機能的 *PKD1L3* の獲得を試みた。ヒト *PKD2L1* に関しては、購入した cDNA クローン (OpenBiosystems 社) を発現ベクターに挿入した。次に、ヒト *PKD1L3* と *PKD2L1* を HEK293 細胞に共発現させて、酸に反応するかを Ca^{2+} イメージング法を用いて解析した。機能的なヒト *PKD1L3* 全長が得られなかったため、N末端細胞外領域以外の領域をマウス *PKD1L3* と交換したキメラ体を作製し、機能解析に用いた。

味覚修飾物質クルクリゴの果実が酸味を甘味に変える分子機構を解明した。クルクリゴ果実の活性本体（ネオクリン）は培養細胞に発現させたヒト甘味受容体 T1R2/T1R3 を活性化することが報告されている

(Nakajima *et al.*, 2006)。上で獲得したヒト酸味受容体を HEK293 細胞に発現させて、味覚修飾物質を添加し、酸味応答が抑制されるかを Ca²⁺イメージング法を用いて解析した。

4. 研究成果

研究代表者らが世界に先駆けて発見した酸味受容体候補 PKD1L3 と PKD2L1 の遺伝子破壊(KO)マウスに関しては、各 KO マウスと二重 KO マウスの獲得に成功した。これらの KO マウスはいずれも生存可能で、発生段階における成長欠損は観察されなかった。また、味細胞の形態と PKD1L3 や PKD2L1 以外の味細胞マーカー分子の発現も正常であった。さらに、これらの KO マウスが、酸味や他の味覚受容に関してどのような表現型を示すかを調べるために、まず、2 瓶嗜好テストとリッキングテストによる行動学的解析を行った。その結果、全ての 5 基本味物質溶液に関して、同腹子の野生型マウスと同様の嗜好行動や忌避行動を示した。この結果を他のグループによる報告と合わせて考察すると、酸味に関しては、体性感覚など味蕾組織以外を介する受容機構が存在することが示唆された。

次に、酸味物質を含む様々な味物質を投与した際の味神経（鼓索神経と舌咽神経）の電気応答を記録する味神経応答解析を行った。その結果、PKD2L1 KO マウスと二重 KO マウスでは、クエン酸、塩酸、酢酸に対する鼓索神経応答が、神経束全体と単一神経繊維の両方の場合で、野生型マウスと比較して有意に抑制されたのに対して、PKD1L3 KO マウスでは酸刺激応答が野生型マウスと同様に観察された。これは、鼓索神経が投射する茸状乳頭と口蓋の味蕾における両遺伝子の発現の有無を反映していると考えられる。一方、味神経以外の体性感覚神経などを鼓索神経よりも多く含む舌咽神経では、いずれの KO マウスでも野生型マウスと同様の酸刺激に対する応答を示した。さらに、塩味、甘味、苦味、うま味物質に対しては、鼓索神経と舌咽神経の両方で、いずれの KO マウスも野生型と同様の応答を示した。以上の実験結果から、PKD2L1 は、生体内で実際に酸味受容体として機能することが実証された。

ヒト酸味受容体の同定に関しては、カルシウムイメージング法を用いた機能解析において、クエン酸など酸味物質投与に対してオフ応答を示す機能的な PKD1L3 の N 末端細胞外領域と PKD2L1 の全長領域を同定でき

た。N 末端細胞外領域がヒト由来でそれ以降はマウス由来のキメラ PKD1L3 を、ヒト PKD2L1 と共に HEK293 細胞に発現させた場合、クエン酸など酸味物質投与に対してオフ応答を示した。さらに、酸味を甘味に変える味覚修飾物質クルクリゴ果実抽出物存在下でも酸刺激に対する応答が観察された。この実験結果から酸味抑制機構としては、PKD1L3 の N 末端細胞外領域以外の領域に対して作用するか、あるいは、味覚受容体レベルではなく、味細胞や神経レベルで抑制される可能性が考えられる。

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 6 件)

- ① Tamura T, Kuroda M, Oikawa T, Kyojuka J, Terauchi K, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Signal peptide peptidases are expressed in the shoot apex of rice, localized to the endoplasmic reticulum, Plant Cell Rep., 査読有、28 巻、2009、1615-1621
- ② Ishii S, Misaka T, Kishi M, Kaga T, Ishimaru Y, Abe K. Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel - a candidate sour taste receptor, Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有、385 巻、2009、346-350
- ③ Ishimaru Y. Molecular mechanisms of taste transduction in vertebrates, Odontology, 査読有、97 巻、2009、1-7
- ④ Ishimaru Y, Matsunami H. Transient receptor potential (TRP) channels and taste sensation, J. Dent. Res., 査読有、88 巻、2009、212-218
- ⑤ Sakurai T, Misaka T, Nagai T, Ishimaru Y, Matsuo S, Asakura T, Abe K. pH-Dependent Inhibition of the Human Bitter Taste Receptor hTAS2R16 by a Variety of Acidic Substances, J. Agric. Food Chem., 査読有、57 巻、2009、2508-2514
- ⑥ Inada H, Kawabata F, Ishimaru Y, Fushiki T, Matsunami H, Tominaga M. Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1, EMBO Reports, 査読有、9 巻、2008、690-697

[学会発表] (計 13 件)

- ① 石丸喜朗、秋場雅人、成川真隆、朝倉富子、松波宏明、阿部啓子、酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 遺伝子破壊マウスの作

- 出と行動学的表現型解析、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京
- ②片野佑香、石丸喜朗、朝倉富子、松波宏明、阿部啓子、哺乳類酸味受容体 PKD1L3/PKD2L1 の構造・機能相関解析、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京
- ③山本くるみ、石丸喜朗、應本真、朝倉富子、阿部啓子、酸味情報伝達神経回路の可視化、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京
- ④石井翔、三坂巧、岸幹也、山上圭吾、石丸喜朗、阿部啓子、酢酸刺激に対する培養細胞の応答の蛍光イメージングによる解析、日本農芸化学会、2010年3月29日、東京
- ⑤櫻井敬展、石黒正路、三坂巧、石丸喜朗、朝倉富子、松尾伸二、阿部啓子、ヒト苦味受容体 hTAS2R16 のリガンド受容部位の解析、日本農芸化学会、2010年3月29日、東京
- ⑥田村倫子、成川知世、石丸喜朗、舟木淳子、阿部啓子、朝倉富子、グリシニン欠失大豆の特性と登熟期における遺伝子発現の網羅的解析、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京
- ⑦成川知世、黒田昌治、石丸喜朗、阿部啓子、朝倉富子、施肥量の異なる区で栽培されたイネ種子における遺伝子発現の網羅的解析、日本農芸化学会、2010年3月28日、東京
- ⑧片野佑香、石丸喜朗、朝倉富子、松波宏明、阿部啓子、哺乳類酸味受容体 PKD1L3/PKD2L1 のサブユニット間相互作用領域の解析、日本農芸化学会、2009年3月29日、博多
- ⑨石井翔、三坂巧、岸幹也、加賀孝之、石丸喜朗、阿部啓子、酢酸に対する酸味受容体候補分子 PKD1L3/PKD2L1 の応答測定条件の最適化、日本農芸化学会、2009年3月29日、博多
- ⑩櫻井敬展、三坂巧、石丸喜朗、朝倉富子、阿部啓子、ヒト苦味受容体のリガンド認識は pH 低下とともに抑制される、日本農芸化学会、2009年3月29日、博多
- ⑪富永真琴、稲田仁、石丸喜朗、松波宏明、PKD1L3/PKD2L1 チャネル複合体による酸味受容の分子機構、中部日本生理学会、2008年10月17日、愛知
- ⑫成川知世、田村倫子、寺内かえで、石丸喜朗、阿部啓子、朝倉富子、大豆種子成熟過程における発現遺伝子の網羅的解析、日本農芸化学会、2009年3月28日、博多
- ⑬田村倫子、黒田昌治、及川鉄男、中井雄治、石丸喜朗、三坂巧、経塚淳子、阿部啓子、朝倉富子、イネの膜結合型酵素シグナルペプチドペプチダーゼの発現解析、日本農

芸化学会、2009年3月28日、博多

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 喜朗 (ISHIMARU YOSHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：10451840

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし