

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21505

研究課題名（和文）チャンネルシナプス全身分布の網羅的探索

研究課題名（英文）Whole-body search of the channel synapse in mice

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近年発見された新しい神経伝達様式であるチャンネルシナプスの全身分布を網羅的に解析した。まず、マウスを用いてCALHM1とCALHM3の共発現臓器を網羅的に解析し、複数の臓器での共発現を確認。その上で、これら細胞がチャンネルシナプスを形成する可能性を示す構造的な証拠を得た。これにより、チャンネルシナプスが全身で普遍的に存在し、神経科学の新たな研究領域を開拓す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

チャンネルシナプス研究を全身展開し、その普遍的な重要性を示す研究にとって重要な知見を与えるとともに、今後、チャンネルシナプスが生み出す新たな神経科学研究領域の萌芽となった。本研究の結果からチャンネルシナプスが担う生命現象は多岐にわたると考えられ、チャンネルシナプスは将来、様々な疾患の理解や創薬標的になると考えられる。

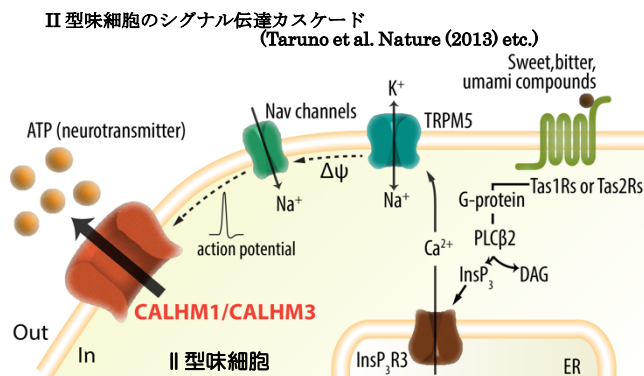
研究成果の概要（英文）：In this study, we comprehensively analyzed the distribution of channel synapses, a new form of chemical neurotransmission discovered in recent years. First, we comprehensively analyzed the organs co-expressing CALHM1 and CALHM3 using mice and confirmed their co-expression in multiple organs. Subsequently, we obtained structural evidence suggesting the potential formation of channel synapses by these cells. This indicates that channel synapses are present throughout the body, suggesting the potential to open up new areas of research in neuroscience.

研究分野：生理学

キーワード：シナプス ATP イオンチャンネル CALHM ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

味蕾で5基本味(甘味・苦味・うま味・塩味・酸味)はそれぞれ異なる味細胞により受容されるが、中でも甘味・苦味・うま味の受容細胞はII型味細胞に分類される。味物質がII型味細胞口腔側膜上の味覚受容体に結合すると、活動電位依存性ATP放出が惹起され、このATPが求心性味神経への神経伝達物質として味情報を脳へと伝える。II型細胞の神経伝達物質放出機構は非小胞性である点がユニークで、研究代表者は先行研究においてcalcium homeostasis modulator 1 (CALHM1)とCALHM3によるヘテロメリックCALHM1/3複合体が神経伝達物質放出チャネルであることを発見した。さらにこのCALHM1/3を基盤とする特殊な化学シナプス様式を「チャネルシナプス」と命名し、研究を推進してきた(Nature 495:223, 2013; J Physiol 595:6121, 2017; Neuron 98:547, 2018 etc.)。



さらにこのCALHM1/3を基盤とする特殊な化学シナプス様式を「チャネルシナプス」と命名し、研究を推進してきた(Nature 495:223, 2013; J Physiol 595:6121, 2017; Neuron 98:547, 2018 etc.)。

2. 研究の目的

シナプス小胞に依存しない神経伝達を行うチャネルシナプスは「第2の化学シナプス」と捉えられうるものであるが、まだ味細胞でしか見つかっていない。この新しい化学シナプス様式が全身で普遍的かつ重要な役割を持つことを示すため、チャネルシナプスの全身分布を明らかにしたい。これにより、新たな神経科学研究領域を創出することを本研究の目的とする。

具体的には、以下の二つの課題に取り組んだ。

課題1. 全身でのCALHMチャネル発現組織と細胞種の同定

課題2. 各CALHM発現臓器におけるチャネルシナプス構造の同定

3. 研究の方法

本研究におけるマウスを用いた実験は、動物実験計画書を京都府立医科大学および研究分担者の所属する研究機関の動物実験委員会に提出し、動物実験委員会の承認を受けた上で研究を実施した。また、実際の動物実験においては、「京都府立医科大学動物実験指針」および各研究機関の動物実験指針に従い、可能な限り使用個体を少なくし、ストレスや苦痛を軽減する条件で実験を行った。

組換えDNA実験は、「京都府立医科大学遺伝子組換えDNA実験安全管理規程」および研究分担者の所属する研究機関の遺伝子組換えDNA実験安全管理規程に基づき、承認を得て実施した。

課題① 全身でのCALHMチャネル発現組織と細胞種の同定

チャネルシナプスに局在することが知られる分子は現在のところCALHM1とCALHM3の2つだけである。また、これらの分子の全身における発現パターンは知られていなかった。この事実に着目し、CALHM1とCALHM3が共発現する細胞においてチャネルシナプスが存在する可能性が高いと考え、CALHM1・CALHM3の共発現臓器を全身で網羅的に解析することを着想した。

方法としては、*Calhm1* および *Calhm3* のプロモータの下流でそれぞれ異なる色の蛍光レポータータンパクを発現するデュアルノックインマウスを開発した。このマウスを以下、*Calhm1/3* デュアルKIマウスと呼ぶ。安楽死させた*Calhm1/3* デュアルKIマウスから43の臓器を採取し、2つのレポータータンパクが共発現する臓器を免疫組織学的解析により探索した。

さらに、レポータータンパクの発現が観察された臓器については、RT-PCRを用いて*Calhm1*、*Calhm3*のmRNA発現を確認した。

上記の方法で同定されたCALHM1/3発現細胞について、組織毎に特徴的な既知の細胞種マーカータンパクとの共発現を免疫組織学的に解析することにより、その細胞種を同定した。

課題② 各CALHM発現臓器におけるチャネルシナプス構造の同定

課題①で見出したCALHM1/3共発現細胞において、チャネルシナプスが形成されているかについて各種組織学的方法により解析を行なった。

まず、CALHM1/3共発現細胞と神経終末との接触について、CALHM1/3共発現細胞特異的抗

体と神経繊維を可視化する Vglut2-ChR2-EYFP マウスを用いた免疫組織学的解析を行なった。

次に、CALHM1/3 共発現細胞に接触する神経繊維が発現する神経伝達物質受容体について、CALHM1/3 共発現細胞を可視化する *Calhm1/3* デュアル KI マウスと各種抗 ATP 受容体抗体を用いた免疫組織学的解析を行なった。

最後に、CALHM1/3 共発現細胞とプリン作動性神経終末の間にチャネルシナプスに特徴的な解剖学的構造が見られるかについて、抗ミトコンドリア抗体 (CytC)、抗 CALHM1 抗体、抗 P2X2 抗体を用いたマルチカラー超解像イメージングによって解析を行なった。

4. 研究成果

課題① 全身での CALHM チャネル発現組織と細胞種の同定

Calhm1/3 デュアル KI マウスにおけるレポータータンパク発現の全身網羅的解析の結果、CALHM1/3 共発現細胞を複数の臓器で発見した。また、CALHM1 もしくは CALHM3 の単独発現臓器も数多く見つかり、それぞれが単独で担う生理機能についても興味深い結果が得られている。

CALHM1/3 共発現細胞が発見されたいずれの臓器においても、これらは希少な上皮細胞として同定された。各臓器において、既知の細胞種マーカーとレポータータンパクの共存が確認され、CALHM1/3 共発現細胞の担う生理機能とチャネルシナプスの役割を示唆する結果が得られている。なお、レポーター発現が確認された臓器において RT-PCR を行った結果、*Calhm1* および *Calhm3* のいずれも mRNA 発現が確認されており、レポータータンパクの異所性発現ではないものと考えられる。

各臓器において CALHM1/3 共発現細胞は Vglut2-ChR2-EYFP マウスにおいて可視化された Vglut2 発現神経繊維と接触していることが確認された。このことは、CALHM1/3 共発現細胞が神経とシナプスを形成して情報連絡を行なっている可能性を示唆する。

さらに CALHM1/3 共発現細胞に接触する神経繊維が ATP 受容体である P2X2 を発現していること、つまり、CALHM1/3 共発現細胞とプリン作動性神経終末が接触していることが明らかとなった。

最後に、マルチカラー超解像顕微鏡撮影により、CALHM1/3 共発現細胞とプリン作動性神経終末との間に、チャネルシナプスに特有の分子、細胞内小器官の近接配置が確認された。

結論

課題①、②の実験の結果、全身の複数の臓器に CALHM1/3 共発現細胞が発見され、さらにこれらの細胞がチャネルシナプスを形成している可能性を強く示唆する結果を得ることができた。この結果は、チャネルシナプス研究を全身展開し、その普遍的重要性を示す研究にとって重要な知見を与えたとともに、今後、チャネルシナプスが生み出す新たな神経科学研究領域の萌芽となったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okui Motoki, Murakami Tatsuro, Sun Hongxin, Ikeshita Chiaki, Kanamura Narisato, Taruno Akiyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Posttranslational regulation of CALHM1/3 channel: N linked glycosylation and S palmitoylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002632R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taruno Akiyuki, Nomura Kengo, Kusakizako Tsukasa, Ma Zhongming, Nureki Osamu, Foskett J. Kevin	4. 巻 473
2. 論文標題 Taste transduction and channel synapses in taste buds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 3~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-020-02464-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okui Motoki, Murakami Tatsuro, Sun Hongxin, Ikeshita Chiaki, Kanamura Narisato, Taruno Akiyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Posttranslational regulation of CALHM1/3 channel: N linked glycosylation and S palmitoylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202002632R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo Masahiro, Seo Kazuyuki, Taruno Akiyuki, Mizoro Yasutaka, Yamaguchi Yoshiaki, Doi Masao, Nakao Rhyuta, Kori Hiroshi, Abe Takaya, Ohmori Harunori, Tominaga Keiko, Okamura Hitoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 A light-induced small G-protein gem limits the circadian clock phase-shift magnitude by inhibiting voltage-dependent calcium channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110844 ~ 110844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taruno Akiyuki, Gordon Michael D.	4. 巻 85
2. 論文標題 Molecular and Cellular Mechanisms of Salt Taste	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annual Review of Physiology	6. 最初と最後の頁 25 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-physiol-031522-075853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計25件 (うち招待講演 19件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 The channel synapse mediates epithelial chemosensory neurotransmission
3. 学会等名 2022年度日本農芸化学大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 The channel synapse mediates epithelial chemosensory neurotransmission
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会 国際連携シンポジウムCPS-KPS-JPS合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 チャンネルシナプス:シナプス小胞に依存しない化学神経伝達機構
3. 学会等名 生理研シナプス研究会「シナプスの理解深化からの神経回路動態の再考」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Murakami T, Nomura K, Hayatsu N, Okazaki Y, Taruno A
2. 発表標題 Extra-oral distribution and function of the channel synapse
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 塩味の細胞と分子のメカニズム
3. 学会等名 生理研上皮膜研究会「上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 光に照らし出された塩味受容の細胞分子メカニズム
3. 学会等名 第92回日本動物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms underlying sodium taste in taste buds
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 味覚神経伝達を担う “チャンネルシナプス” の構造と機能
3. 学会等名 自然科学研究機構 ネットワーク型研究加速事業 生理研プロジェクト 「機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成」シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Physiological roles of CALHM1/3 channels ~ Channel Synapse ~
3. 学会等名 The 73rd Korean Physiological Society Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Taste Coding and “Channel Synapse” in the Gustatory System
3. 学会等名 The 35th Joint Annual Conference of Biomedical Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Salt-responsive Cells; A Unique Cell Type?
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 All-electrical signal transduction and "channel synapses" mediate sodium taste
3. 学会等名 第5回食欲・食嗜好研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 All-electrical signal transduction and "channel synapses" mediate sodium taste
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 All-electrical signal transduction and "channel synapses" mediate sodium taste
3. 学会等名 The 18th international symposium on olfaction and taste（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 塩味受容の細胞と分子のメカニズム - チャネルシナプスの構造と生理 -
3. 学会等名 生理学研究所 研究会 「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム：構造生物学の先にあるもの」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 Transduction and coding of sodium taste in taste buds
3. 学会等名 日本味と匂学会第54回大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 味覚神経伝達を担う“チャネルシナプス”の構造と機能
3. 学会等名 自然科学研究機構 ネットワーク型研究加速事業 生理研プロジェクト「機能タンパク質の構造と機能のダイナミクスと、それに基づく細胞・生体システム作動機構の研究拠点の形成」シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taruno Akiyuki
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms underlying sodium taste in taste buds
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakanishi Miho, Nomura Kengo, Taruno Akiyuki
2. 発表標題 Attenuation of electrical excitability of sour taste cells by extracellular acidification
3. 学会等名 日本味と匂学会第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nomura Kengo, Taruno Akiyuki
2. 発表標題 ナトリウムの好ましい味を担う細胞内情報伝達メカニズムの解明
3. 学会等名 日本味と匂学会第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Channel synapse: a chemical synapse where transmitter release is mediated by ion channel pores.
3. 学会等名 Ion Channel Modulation Symposium 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Gustatory neurotransmission mediated via the channel synapse
3. 学会等名 the 44th Annual Meeting of Association for Chemoreception Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms underlying airway protective reflexes
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 チャンネルシナプス 生体内外の化学感覚を担う上皮性シナプス
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taruno A
2. 発表標題 塩のおいしさを司るナトリウム味受容の細胞分子機構
3. 学会等名 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

樽野研究室HP https://www.tarunolab.com 研究室ホームページ https://www.tarunolab.com
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 達郎 (Murakami Tatsuro) (30848502)	京都府立医科大学・医学部・研究員 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------