

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390494

研究課題名（和文） シグナルプレックスを基盤とした口腔感覚形成機構の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of oral sensation on the basis of signalplexes

研究代表者

若森 実（WAKAMORI MINORU）

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50222401

研究成果の概要（和文）：

甘味、苦味、酸味、塩味、旨味が5基本味と言われている。脂肪は3大栄養素の1つであるが、油（脂）の味は5基本味に入っていない。一方、我々は味が油で大きく変わることを経験しているが、そのメカニズムは不明である。本研究では電気生理学的・薬理学的手法により味蕾で甘味、苦味、旨味のシグナルトランスダクションに関わる TRPM5 チャンネルの活性が細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的に脂質によって修飾されることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Fat is one of the three major nutrients but it is not a sapid substance which activates one of the five basic tastes, sweet, bitter, sour, salt, and umami. However, we have experience that fat changes the taste of dishes largely. Transient receptor potential M5 (TRPM5) channel is not a receptor of the five basic tastes but it is gated after stimulation of the gustducin-coupled receptors for sweet, bitter, and umami. We analyzed the electrophysiological and pharmacological properties of TRPM5 channel. TRPM5 channel was not activated by fatty acids, but modulated by fatty acids.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：機能系基礎歯科学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：パッチクランプ法、TRPM5、TRPV1、チャンネル、口腔感覚

1. 研究開始当初の背景

現在までに甘味、苦味、酸味、塩味、旨味が味として認められ5基本味と言われている。脂肪は3大栄養素の1つであるが、味を提示する物質ではなく油（脂）の味は5基本味にも入っていない。一方、我々は味が油で大きく変わることを日常経験しているが、そのメ

カニズムは不明である。

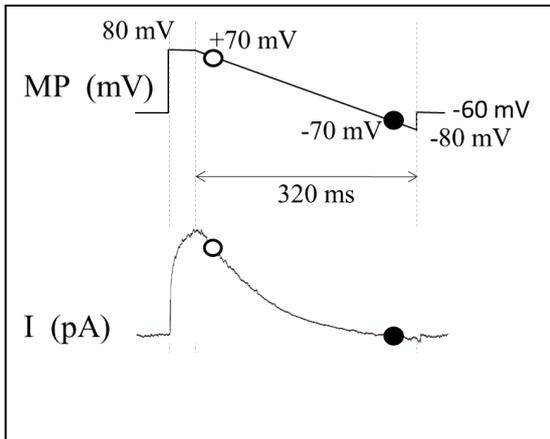
2. 研究の目的

味蕾で甘味、苦味、旨味のシグナルトランスダクションに関わる Transient receptor potential M5 (TRPM5) チャンネルの機能解析を

目的とした。

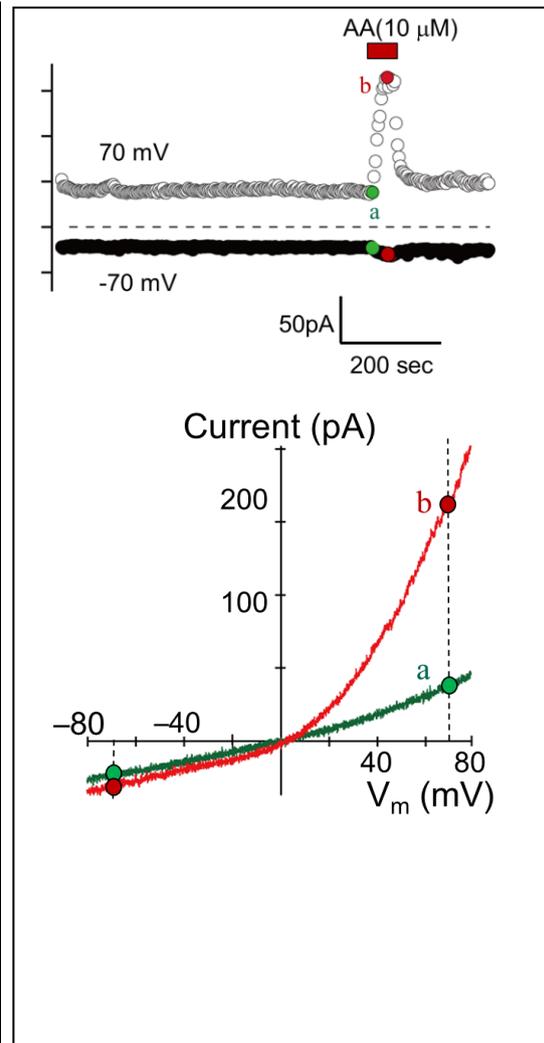
3. 研究の方法

TRPM5 チャンネルを HEK293 細胞に強制発現させ、パッチクランプ法ホールセルモードで膜電位固定下にチャンネルの活性化によるイオン電流を計測した。膜電位を -60mV に設定し、3 秒毎に 80mV から -80mV までのランプ波を与え、 70mV と -70mV での膜電流を計測した。細胞外液の組成は 121.7mM NaCl 、 1.2mM CaCl_2 、 33mM Mannitol 、 1.2mM MgCl_2 、 11.5mM HEPES 、 10mM glucose 、 2mM EGTA であり、 NaOH により pH を 7.4 とした。パッチ電極内液の組成は 108mM CsOH 、 $100\text{mM aspartic acid}$ 、 30mM CsCl 、 10mM NaCl 、 1mM MgCl_2 、 3.41mM CaCl_2 、 5mM EGTA 、 10mM HEPES であり、 CsOH により pH を 7.2 とした。この時のパッチ電極内液中の Ca^{2+} 濃度は WEBMAXCHELATER STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxcS.htm>) を使って計算し $0.3\mu\text{M}$ となった。



4. 研究成果

膜電位を -60mV に設定し、3 秒毎に 80mV から -80mV までのランプ波を与えながら、細胞外から $10\mu\text{M}$ のアラキドン酸を投与した。逆転電位が約 8mV の外向き整流性を示す電流がアラキドン酸により惹起された (図 2)。アラキドン酸投与により惹起される膜電流は、膜電位 $+70\text{mV}$ において TRPM5 発現細胞では $43.30 \pm 9.92\text{ pA/pF}$ ($n = 27$)、コントロールでは $9.04 \pm 3.26\text{ pA/pF}$ ($n = 10$) となり、HEK293 細胞に endogenous に発現しているチャンネルもアラキドン酸で活性化されるが発現させた TRPM5 チャンネルはアラキドン酸で 4.8 倍大きい電流が惹起されることが明らかになった。逆転電位と外向き整流性からアラキドン酸は TRPM5 チャンネル電流を惹起したと考えられる。アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼ (COX) によりプロスタノイド、トロンボキサンに代



謝される。そこで代謝物である PGH_2 、 PGD_2 、 PGE_2 、 PGI_2 、 $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 TXB_2 を直接投与し、TRPM5 チャンネルの活性調節因子としこれらの代謝物が関与しているか検討した。全ての代

謝物の濃度をアラキドン酸投与と同じ $10\mu\text{M}$ とし、TRPM5 チャンネルを発現した HEK293 細胞に投与した。COX 代謝物によるチャンネル活性はアラキドン酸応答に対して $\text{PGE}_2 > \text{PGH}_2 = \text{PGF}_{2\alpha} > \text{PGD}_2, \text{PGI}_2, \text{PGF}_{1\alpha}, \text{TXB}_2$ の順であった。 PGE_2 はアラキドン酸応答の $59 \pm 3\%$ ($n = 6$) の大きさであったが、その他の代謝物は最大でもアラキドン酸応答の 11% であった。更に、アラキドン酸代謝を止める為、COX、LOX、CYP の全ての阻害剤である $5, 8, 11, 14$ -Icosatetraynoic Acid (ETYA) や COX、LOX の酵素阻害剤である Indomethacin と Esculetin を投与したが、アラキドン酸応答は有意に変化しなかった。従って、アラキドン酸の代謝物より、アラキドン酸自体が TRPM5 チャンネル電流を惹起することが明らかになった。一方、細胞内遊離カルシウム濃度を低くするために Ca^{2+} を含まず EGTA のみを

含む電極内液を用いてホールセル法を確立した。細胞内の遊離カルシウム濃度が低い場合、外液からアラキドン酸を投与しても TRPM5 チャンネル様の外向き整流性電流は惹起されなかった。

これらの結果は脂肪酸によって味蕾に発現する TRPM5 チャンネルは活性化されない、つまり、TRPM5 チャンネルを介しては味として認識されない可能性が示唆された。脂由来の脂肪酸が味細胞に作用することで TRPM5 チャンネルの活性を修飾し、脂肪酸の感知、つまり基本味の修飾が行われる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- 1) Uriu Y, Kiyonaka S, Miki T, Yagi M, Akiyama S, Mori E, Nakao A, Beedle AM, Campbell KP, Wakamori M, Mori Y. Rab3-interacting molecule γ isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca^{2+} channels. J Biol Chem 285; 21750-21767 (2010). 査読有
- 2) Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Ishihara S, Yoshida T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Nav1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. J Neurosci 30; 5744-5753 (2010). 査読有
- 3) Wakamori M. Neuronal Ca^{2+} -sensitive non-selective cation channels and TRPC5. J Oral Biosci 52; 352-357 (2010). 査読有
- 4) 若森実, 近藤大祐, 荒木健太郎. 痛覚 (侵害受容) とは何か? ユーキノールはなぜ効くのか? 日本歯科評論 70; 135-142 (2010). 査読無
- 5) Saito H, Okada M, Miki T, Wakamori M, Futatsugi A, Mori Y, Mikoshiba K, Suzuki N. Knockdown of Cav2.1 calcium channels is sufficient to induce neurological disorders observed in natural occurring Cacnala mutants in mice. 390; 1029-1033 (2009). 査読有
- 6) Miyagi K, Kiyonaka S, Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, Numata T, Sawaguchi Y, Numaga T, Kimura T, Kanai Y, Kawano M, Wakamori M, Nomura H, Koni I, Yamagishi M, Mori Y. A pathogenic C terminus-truncated polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca^{2+} entry via association with TRPC3 and TRPC7. J Biol Chem 284; 34400-34412 (2009). 査読有
〔学会発表〕 (計 8 件)

- 1) 吉田卓史, 菊池尚, 高橋かおり, 若森実, 鎮静薬ユーキノールの TRPV1 チャンネルに対する効果, 日本薬理学会年會, 2012 年 3 月 16 日, 京都
- 2) 若森実, 電位依存性カルシウムチャンネルの生物物理学的解析, 新薬理学セミナー 2011, 2011 年 9 月 30 日, 仙台
- 3) Wakamori M, Kondoh D, Yoshida T, Kikuchi H, Komatsu M, Facilitation of TRPM5 channel activities by fatty acids, Harvard-Tohoku-Forsyth Symposium, January 6 2011, Boston, USA
- 4) Yoshida T, Wakamori M, TRP channels play a role in the mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 under shear stress, Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 23, 2011, Yokohama
- 5) 近藤大祐, 吉田卓史, 菊池尚, 小松正志, 若森実, TRPM5 チャンネル活性の脂肪酸による修飾, 日本薬理学会北部会, 2010 年 9 月 10 日, 札幌
- 6) 若森実, 神経や口腔内組織に発現する細胞外環境センサーとしての TRP チャンネル, 歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 9 日, 新潟
- 7) 若森実, 吉田卓史, 菊池尚, TRPM5 チャンネルの脂肪酸による修飾, 日本薬理学会, 2010 年 3 月 17 日, 大阪
- 8) Wakamori M, Yoshida T, Yamamoto S, Mori Y, FACILITATION OF TRPC5 CHANNEL BY CALCIUM, 国際生理学会, 2009 年 7 月 30 日, 京都

〔図書〕 (計 4 件)

- 1) 若森実, 歯学英和辞典, 監修 渡邊誠, 研究社, 2012, 1-921 (分担執筆, 生理学・薬理学担当)
- 2) 若森実, 現代歯科薬理学 第 5 版, 医歯薬出版, 2012, 14-19
- 3) Wakamori M, Yoshida T, Kikuchi T, Kondoh D, Komatsu M, Melastatin Transient Receptor Potential Channel Type 5, Interface Oral Health Science 2011, 2011, 341-345
- 4) Wakamori M, Imoto K, Voltage-Gated Calcium Channels, Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology 3rd Ed, 2009, 543-558

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bsc.tohoku.ac.jp/contents/c2_32/c2_32_wakamori_m.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若森 実 (WAKAMORI MINORU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50222401

(2) 研究分担者

吉田 卓史 (YOSHIDA TAKASHI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30455795

(3) 連携研究者

森 泰生 (MORI YASUO)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80212265