

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25年 6月 3日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580154

研究課題名（和文）味の相互作用理解のための味覚受容からシグナル発生を担う味覚シグナロソームの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the taste signalosome involved from taste reception to taste signal generation to understand taste interactions

研究代表者

日下部 裕子 (KUSAKABE YUKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号：90353937

研究成果の概要（和文）：

味覚情報伝達の内、特に、基本味の発生に関係する細胞内ナトリウムイオンおよびカルシウムイオンの濃度制御に関与する分子について、分子生理学的解析を行った。その結果、Na, K-ATPase $\alpha 1$, $\beta 1$, FXD6 が複合体を形成して甘味・苦味・うま味を受容する味細胞のナトリウムイオンの濃度制御に関与することを示唆する結果を得た。また、甘味・苦味・うま味を受容する味細胞のカルシウムイオンを介した情報伝達に、イノシトール三リン酸受容体、TRPM5, Jaw1 が複合体を形成して関与する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We conducted molecular physiological analyses of the molecules involved in the sodium and calcium concentration control systems that are related to the generation of basic taste signals. The data suggested that Na, K-ATPase $\alpha 1$, $\beta 1$, and FXD6 formed a complex involved in sodium concentration control in type II taste cells, which respond to sweet, bitter, and umami tastes. In addition, we found that TRPM5 could bind to Jaw1 in heterologous expression systems. These results suggest that the complex of inositol triphosphate (IP_3) receptor type III, TRPM5, and Jaw1 is involved in IP_3 -calcium signaling in type II taste cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：食品機能、味覚、情報伝達

1. 研究開始当初の背景

(1) 基本五味それぞれに対する味覚受容体

が同定されたが、受容した情報を伝達する分子については、数種類が同定されていたもの

の、それらの分子間の相互作用はほとんど明らかにされていない状態であった。

(2) 味覚情報伝達機構の理解には情報伝達機構、特に細胞内のナトリウムやカルシウムなどのイオン動態変化を担う分子の細胞内における局在を把握することが重要であるが、それらの知見は不足していた。

(3) 味覚受容体以外も、膜受容体を介した情報伝達機構に関する研究が進捗し、受容体など外界と接する分子とその下流の情報変換装置が集積して分子複合体「シグナロソーム」を形成するという概念が確立してきた。そこで、味覚情報伝達についてもシグナロソーム形成に関する解析が必要とされていた。

2. 研究の目的

(1) 受容体やチャネルなど外界と接する分子とその下流の情報変換装置が集積する分子複合体「シグナロソーム」の概念が味覚情報伝達機構にも適用されると予想し、味覚受容からシグナル発生に至るまでの情報伝達関連分子が味覚受容体に近接して外界に接しているかどうかを明らかにすることを目的とする。

(2) 味覚情報伝達の内、特に、基本味の発生に関与する細胞内カルシウムイオンおよびナトリウムイオンの濃度制御に関与する分子について、分子間結合、分子の細胞内局在の変化、生理学的変化を中心に解析を行い、分子間相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 味細胞内ナトリウムイオン動態の制御に関する解析

我々は、研究開始時点で、細胞内ナトリウムイオン濃度制御を担う Na, K-ATPase レギュレーター FXYD6 が甘味・苦味・うま味受容細胞特異的に発現することを見出していた。そこで、FXYD6 と複合体を形成する Na, K-ATPase の α , β サブユニットの検出とその相互作用の解析を行った。

(2) 味細胞内カルシウムイオン動態の制御に関する解析

我々は、研究開始時点で、リンパ球で細胞分化に関与することが知られている分子 Jaw1 が味細胞ではイノシトール三リン酸受容体 IP_3R3 と結合して甘味・苦味・うま味の味覚情報伝達に関与する可能性を見出していた。そこで、味細胞に発現する分子の内、カルシウムイオン動態の中心を担う IP_3R3 、ナトリウムイオン動態を担う Na, K-ATPase、カルシウムとナトリウム両者の細胞内動態に深く関わる分子である一過性受容体電位

(transient receptor potential: TRP) イオンチャネル TRPM5) を軸に、Jaw1, FXYD6 との相互作用および、甘味・うま味受容体 T1rs との関係の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 味細胞内ナトリウムイオン動態の制御に関する解析

① FXYD, Na, K-ATPase α および β サブユニットのサブファミリーメンバーについて、舌有郭乳頭上皮を用いて RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、甘味・苦味・うま味を受容する II 型の味細胞に Na, K-ATPase $\alpha 1$, $\beta 1$ サブユニットと FXYD6 のみが共発現することが明らかとなった。(図. 1-3)

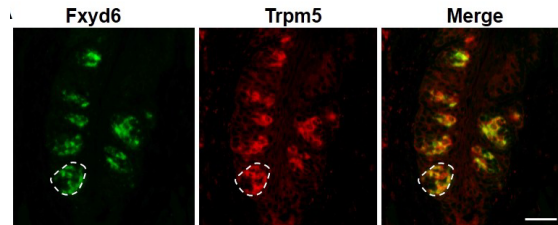


図 1. マウス舌有郭乳頭中の味蕾における FXYD6 と II 型味細胞に発現する TRPM5 との共発現様式 (*in situ* hybridization) 点線で囲んだ部分: 典型的な味蕾の例

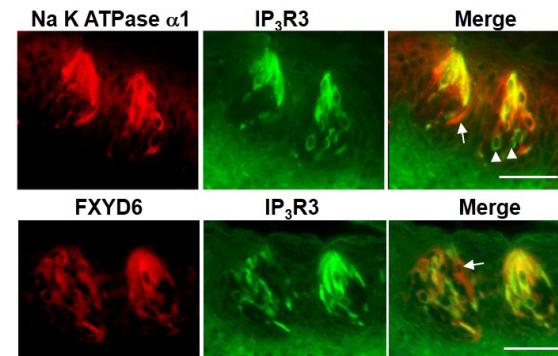


図 2. マウス舌有郭乳頭中の味蕾における FXYD6, Na, K-ATPase $\alpha 1$ と II 型味細胞に発現する IP_3R3 との共発現様式 (抗体染色)

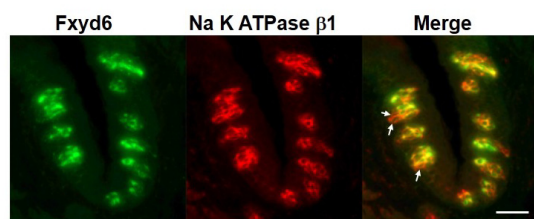


図 3. マウス舌有郭乳頭中の味蕾における FXYD6 と Na, K-ATPase $\beta 1$ との共発現様式 (*in situ* hybridization)

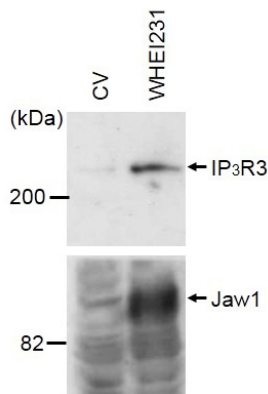
矢印は Na, K-ATPase $\beta 1$ のみが発現している細胞を示す。

② 強制発現系を利用して、Na, K-ATPase $\alpha 1$ と FXYD6 の相互作用について解析したところ、両者が直接結合することを観察した。そこで、味細胞における相互作用を解析したが、味細胞が非常に微量であることと、Na, K-ATPase $\alpha 1$ と FXYD6 に対する抗体の検出性が低かったため、結論が得られなかった。

(2) 味細胞内カルシウムイオン動態の制御に関する解析

①舌に占める味細胞の割合は 10^4 - 10^5 個と極めて微量であり、味細胞を用いた免疫沈降法を成功させている例は少ない。一方、リンパ球を由来とする WHEI231 細胞は味細胞に発現している IP_3R3 と Jaw1 を発現していることが明らかにされている。そこで、味細胞を用いた実験の前段階として WHEI231 細胞内での IP_3R3 と Jaw1 の結合を解析した。その結果、微量ながら WHEI231 内で IP_3R3 と Jaw1 が直接結合している可能性が高いことを示唆する結果を得た(図4)。また、TRPM5などを培養細胞 HEK293 に強制発現させ、 IP_3R3 と Jaw1 との相互作用を解析したところ、TRPM5 が Jaw1 と結合する可能性を示唆する結果を得た(図5)。

②マウス舌組織を用いた免疫沈降法を行い、味細胞中で IP_3R3 および Jaw1 の相互作用について解析した。その結果、 IP_3R3 と Jaw1 の共沈が観察され、 IP_3R3 と Jaw1 は味細胞中でも結合する可能性が高いことが示唆された(図



4)。並行して、甘味受容体 T1r2 あるいは T1r3 に対する抗体を用いた免疫沈降を行ったが、これらが IP_3R3 や Jaw1 と複合体を形成する可能性については結論が得られなかった。

図4. 培養細胞および組織を用いた IP_3R3 と Jaw1 の相互作用の解析

免疫沈降法を用いて IP_3R3 と Jaw1 が共沈することを確認した。免疫沈降には抗 Jaw1 抗体を用いて検出には抗 IP_3R3 、抗 Jaw1 抗体を用いた。

CV:マウス舌有郭乳頭上皮

WHEI231:WHEI231 細胞

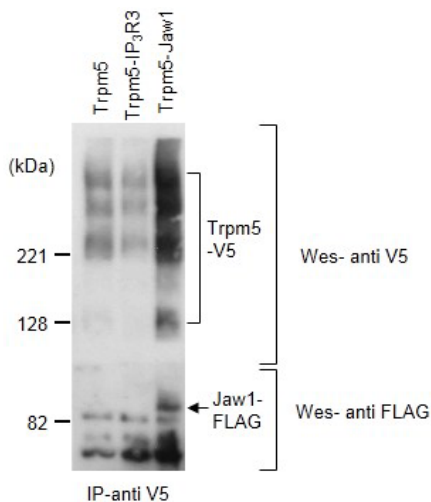


図5. 強制発現系を用いた TRPM5 と Jaw1 の相互作用の解析

免疫沈降法を用いて TRPM5 と Jaw1 が共沈することを確認した。

③培養細胞 HEK293 に Jaw1 および IP_3R3 を導入し、 IP_3R3 を活性化させる細胞刺激に対する細胞内カルシウムイオン濃度変化をカルシウムイメージング法により解析することで、Jaw1 のカルシウムイオン動態制御に及ぼす影響の解析を行った。その結果、Jaw1 が細胞内カルシウム濃度の変化に直接作用する可能性が低いことが示された(図6)。

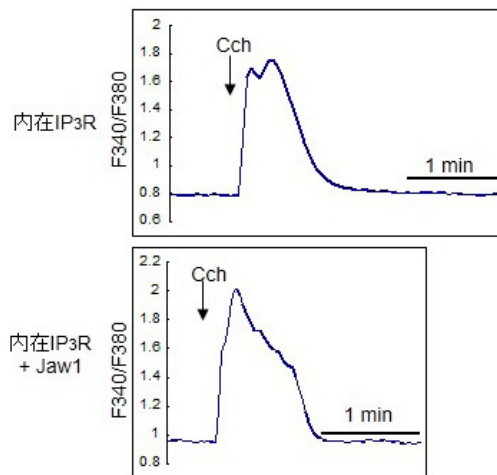


図6. IP_3R を介した伝達系への Jaw1 の関与 HEK293 細胞へ Jaw1 を導入し、 IP_3 -カルシウム情報伝達系への関与を観察した。図では Jaw1 の有無によりピークの形状が変化するように見えるが、Jaw1 の有無に関わらず、ピークの形状は多様であったため、Jaw1 の IP_3 -カルシウム情報伝達系への関与は確認できなかった。

また、甘味受容体と IP_3R3 の両者に作用することが示唆されている CIB1 について強制発現系を用いて T1r2 あるいは IP_3R3 と CIB1 の相互作用の検討を、カルシウムイメージング法により行った。CIB1 の結合領域とされている mT1r2 の C 端を mT1r1 の C 端と置換した変異体と mT1r3 および CIB1 を共発現させた系を用いた解析を行ったが、CIB1 の有無にかかわらず、mT1r2 の置換により甘味応答が極めて小さくなったため、甘味情報伝達過程における mT1r2 と CIB1 の相互作用を解析することはできなかった(図7)。

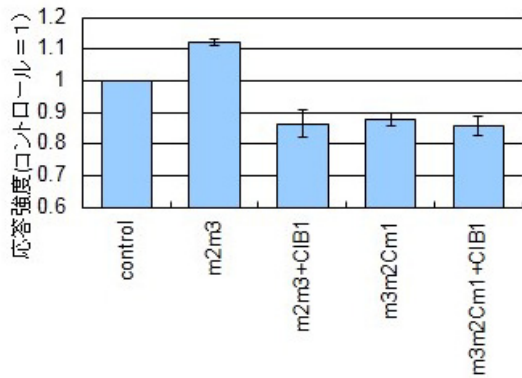


図7. CIB1 と mT1r2 の相互作用の解析
HEK293 細胞へ mT1r2, C 末端を mT1r1 由来に置換した mT1r2, mT1r3, CIB1 を導入し、10 mM アセスルファム K(甘味料)に対する応答を測定した。

m2m3: mT1r2, mT1r3 を導入した細胞

m2m3+CIB1: mT1r2, mT1r3, CIB1 を導入した細胞

m3m2Cm1: mT1r3 と C 末端を mT1r1 由来に置換した mT1r2 を導入した細胞

m3m2Cm1+CIB1: mT1r3, C 末端を mT1r1 由来に置換した mT1r2, CIB1 を導入した細胞

CIB1 は IP₃R を阻害するという報告がある。

④ヒト甘味受容体 T1r2, T1r3 は、単独では膜移行能が低い、共存すると高くなることを我々は観察している。そこで、甘味受容体 T1r2, T1r3 を IP₃R3, Jaw1 とともに培養細胞 HEK293 に導入して、これらの膜移行性の変化を観察した。その結果、甘味受容体 T1r2, T1r3 の膜移行能は、IP₃R3, Jaw1 を同時に発現させても変化せず、受容体シグナロソーム形成と受容体の膜移行は無関係である可能性が高いことが示唆された。

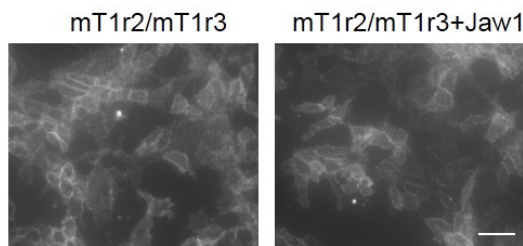


図8. 甘味受容体 mT1r2/mT1r3 の膜移行への Jaw1 の関与

甘味受容体の N 末端にタグを付加し、膜表面に移行した受容体のみを抗体染色で検出した結果を示す。

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 1 件)

- ① 進藤洋一郎、森下加奈、小竹英一、三浦裕仁、カルニンチ ピエロ、河合純、林崎良英、日野明寛、神田智正、日下部裕子、FXD6, a Na, K-ATPase regulator, is expressed in type II taste cells. Biosci Biotechnol Biochem、査読有、Vol.75, No.6 2011、1061-1066、doi:10.1271/bbb.100718

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 裕子 (KUSAKABE YUKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・上席研究員

研究者番号：90353937