

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23791881
研究課題名（和文）哺乳類酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 の構造・機能相関解析
研究課題名（英文）Analysis for structural-functional interaction of a mammalian candidate sour taste receptor, PKD1L3/PKD2L1 complex
研究代表者
藤本 千里 (FUJIMOTO CHISATO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60581882

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳類酸味受容体の候補である polycystic kidney disease 1-like 3 (PKD1L3)-polycystic kidney disease 2-like 1 (PKD2L1) 複合体の構造・機能相関解析を行った。PKD1L3/PKD2L1 複合体のチャネルポア領域の同定を目指し、カルシウムイメージング法による検討を行ったところ、PKD2L1 の 523 番目のアスパラギン酸残基がカルシウム透過性を決定することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we analyzed structural-functional interaction of a mammalian candidate sour taste receptor, PKD1L3/PKD2L1 complex. We aimed to identify the molecular determinants responsible for the Ca²⁺ permeability of the PKD1L3/PKD2L1 complex. By Ca²⁺ imaging analyses, we demonstrated that the single pore residue Asp⁵²³ in PKD2L1 determines Ca²⁺ permeation of the PKD1L3/PKD2L1 complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,330,000	990,000	4,290,000

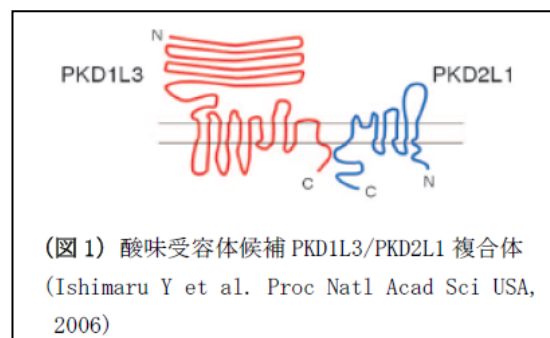
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：咽頭科学

1. 研究開始当初の背景

味覚は、主として口腔・咽頭に存在する味蕾にて受容される。味物質が味蕾先端部の味孔に局在する味覚受容体によって感知されると、細胞内シグナル伝達を介して脱分極が起こり、味神経に伝達物質が放出される。味神経に伝達されたシグナルは最終的に大脳皮質の第一次味覚野に送られ、味の質や強さ



が識別される。

味蓄にて受容されるのは、甘・苦・酸・塩・うま味の5基本味である。近年、味覚受容体の同定、および、その構造機能解析に関する報告がなされている。このうち、哺乳類の酸味受容体候補として、TRPチャンネル関連分子である*PKD1L3*と*PKD2L1*が、当研究室の石丸喜朗特任助教らにより提唱されている(図1)(Ishimaru Y et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006)。両分子は有郭・葉状乳頭では味蓄中の同じ細胞に共発現し、これらの細胞は甘・苦・うま味受容細胞とは異なる細胞であった。次に、HEK293T培養細胞に両分子を発現させるとヘテロマーを形成し、その形成が細胞膜表面における発現に必要であった。さらに、Ca²⁺イメージング法とパッチクランプ法による機能解析により、両分子を共発現させた場合にのみ酸味物質刺激に対する応答が認められ、他の4基本味物質には応答しないことが示された。

これらの知見より、*PKD1L3*/*PKD2L1*複合体は酸味受容体の有力な候補であるといえるが、ヘテロマーを形成する両分子の相互作用、および、両分子の細胞表面における発現・機能の分子メカニズムの詳細に関しては、不明な点も多かった。そこで当研究室では、両分子の欠失変異体を用いてその構造・機能相関解析を行うという着想のもと研究を進めており、既に研究成果の一部は英文雑誌に発表している(Ishimaru Y et al., FASEB J, 2010)。まず、両分子の欠失変異体を作製し、共免疫沈降実験を行い、両分子間の相互作用に重要な領域が膜貫通ドメインであることを決定した。相互作用に重要な領域を欠失した変異体は、チャンネルとして機能するために必要な細胞表面への輸送が認められなかった。さらに、膜貫通ドメインを欠損させた*PKD1L3*ノックアウトマウスを作製し、両タンパクが共

発現する有郭・葉状乳頭の味細胞において、*PKD2L1*タンパク質が細胞質全体に分布することを示し、*PKD2L1*が味物質と接触する味孔に多く存在する通常のマウスに見られる発現パターンと異なることを示した。以上より、培養細胞と同様に味細胞においても、両分子間の膜貫通ドメインを介した相互作用が、複合体の味孔への輸送に必要であることを証明した。

2. 研究の目的

*PKD1L3*と*PKD2L1*は、多発性嚢胞腎の原因遺伝子として同定された*PKD1*や*PKD2*と高い相同性を示す膜タンパク質であり、これらはPKDファミリーに属する。PKDファミリーは、TRPファミリーのTRP polycystin (TRPP)サブファミリーである。*PKD1L3*は、長いN末端細胞外ドメインに続き、11回膜貫通ドメイン(TM1~TM11)を有する(Li A et al., Genomics, 2003)。TM6~TM11の領域は、TRPチャンネルと相同性がある(Li A et al., Genomics, 2003)。N末端細胞外ドメインには、カルシウム依存性レクチン、G-protein-coupled receptorタンパク分解サイトがあり、TM1~TM2間には、polycystin-1-lipoxygenase-alpha toxin/lipoxygenase homology 2ドメインが存在する。*PKD2L1*は、他のTRPチャンネルファミリー同様、6回膜貫通型ドメイン(TM1~TM6)を有し、C末端細胞内領域には、TM側から順に、ER1, ER2という2つの小胞体リテンションシグナル、Ca²⁺ binding EF-handドメイン、coiled-coilドメインを有する(Nomura H et al., J Biol Chem, 1998)。

*PKD1L3*と*PKD2L1*のように、他のTRPサブファミリーにおいても、機能的チャンネルの形成に重要である相互作用を有するタンパク質複合体が存在し、その機能と構造の相関に関する知見が多数報告されている。例えば、

PKDサブファミリーのPKD1とPKD2やPKD2同士は、各々のC末端細胞内ドメインを介して相互作用し、ヘテロマー結合が細胞膜表面に移行し機能的チャネルを形成するのに重要であることが示された (Qian F et al., Nat Genet, 1997; Tsiokas L et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997; Casuscelli J et al., Am J Physiol Renal Physiol, 2009)。また、PKD1/PKD2複合体は、3つのPKD2と1つのPKD1からなる四量体を形成し、PKD2のC末端細胞内領域に存在するcoiled-coilドメインがPKD1のC末端にあるcoiled-coilドメインと結合していることが示された (Yu Y et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2009)。一般的に、TRPチャネルは四量体を形成し (Kuzhikandathil EV et al., J Neurosci, 2001; Hoenderop JG. et al., Embo J, 2003)、各構成分子がイオン選択フィルターやチャネルポアの形成に関わると考えられている (Yellen G et al., Nature, 2002; Long SB et al., Science, 2005)。

本研究では、PKD1L3とPKD2L1の各種欠失変異体を作製し、HEK293T培養細胞発現系を用いて両分子の構造・機能相関解析を行うことを目的とした。具体的には、チャネルポア領域の特定、酸受容領域の特定、の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 複合体のチャネルポア領域の同定

PKD1L3の推定ポア領域は、TRPチャネルと相関性があるTM6~TM11の領域中の、TM10~TM11間と考えられている (Li A et al., Genomics, 2003)。また、PKD2L1の推定ポア領域は、ハイドロパシー解析によりTM5~TM6間のループ構造であることが報告されている (Nomura H et al., J Biol Chem, 1998)。

そこでこれらの推定ポア領域をイオンが透過すると仮定し、アミノ酸点変異体を用いてイオン透過領域を明らかにすることを試みた。TRPサブファミリーの一つであるTRPVanilloid (TRPV)サブファミリーに属するタ



ンパクにおいて、ポア領域内に存在するアスパラギン酸残基の点変異がCa²⁺透過性を低下させるという報告がある (Garcia-Martinez C et al., J Biol Chem, 2000; Nilius, B et al., J Biol Chem, 2001; Voets T et al., J Biol Chem, 2002)。ポア領域内に存在するグルタミン酸残基の点変異においても、TRP cation channel, subfamily V, member 5 (TRPV5)において同様の報告がある (Voets T et al., J Biol Chem, 2002)。これらの知見を踏まえ、アミノ酸点変異は、酸性pH域でプロトン化を受けるアスパラギン酸、グルタミン酸を、それぞれアスパラギン、グルタミンに置換し、中性化するように導入した。

PKD1L3の推定ポア領域には、アスパラギン酸残基(D2049)が1つとグルタミン酸残基(E2072)が1つ存在し、PKD2L1の推定ポア領域には、3つのアスパラギン酸残基(D523, D525, D530)が存在する (図2)。PKD1L3全長を発現ベクターpDisplay (Invitrogen)に挿入したコンストラクト(PKD1L3-FLと命名)、および、PKD2L1全長を発現ベクターpCI (Promega)に挿入したコンストラクト(PKD2L1-FLと命名)を鋳型として、各種点変異体をOverlap PCR法 (Horton R et al., Gene, 1989)により作製した。

HEK293T細胞において、PKD1L3かPKD2L1のどちらかを単独で発現させると細胞質に留まるが、両分子を同時に発現させると両分

子は細胞表面へと移行する (Ishimaru Y et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006)。そこで、PKD1L3-FL と PKD2L1 各種変異体の共発現、および、PKD2L1-FL と PKD1L3 各種変異体の共発現により、両分子の HEK293T 細胞表面への移行が認められるかを、細胞表面発現解析法 (Satio H et al., Cell, 2004) を用いて観察した。具体的には、PKD1L3-FL、PKD1L3 各種変異体の N 末端細胞外領域に HA タグをつけて、抗 HA タグ抗体を用いて細胞表面に存在するタンパク質を検出した。

続いて、Ca²⁺イメージング法による機能解析を行った。PKD1L3-FL と PKD2L1 各種変異体の共発現、および、PKD2L1-FL と PKD1L3 各種変異体の共発現により、25mM クエン酸 (pH=2.7) に対して応答するかを解析した。パッチクランプ法による電気生理学的解析により、PKD1L3/PKD2L1 複合体の酸に対する応答は、酸刺激直後ではなく酸溶液が除去された後に見られることが明らかとなっている (Ishimaru Y et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2006; Inada H et al., EMBO Rep, 2008)。そこで、酸溶液の投与後のバッファーへの迅速な置換を行いながら Ca²⁺イメージングを行う実験系を用いた。

(2) 酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 複合体の酸応答機能に重要な領域の解明

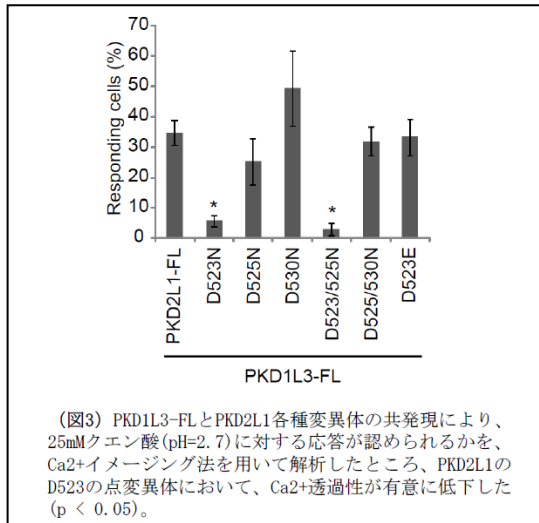
細胞表面発現が観察された欠失変異体を用いて、Ca²⁺イメージング法による機能解析を行ったところ、PKD2L1 の C 末端細胞内に存在する EF-hand ドメインと coiled-coil ドメインを含む領域を欠失させた場合に、25mM クエン酸への応答を示した (Ishimaru Y et al., FASEB J, 2010)。さらに、EF-hand の Ca²⁺結合ドメインにアミノ酸点変異を導入した 5 種類の変異体を作製して機能解析を行ったところ、全ての変異体で 25mM クエン酸への応

答を示した。一方、PKD1L3 の C 末端細胞内ドメインを欠失させた場合は酸応答を認めなかった (Ishimaru Y et al., FASEB J, 2010)。よって、当研究室におけるこれまでの研究成果から、PKD2L1 の C 末端細胞内領域に存在する EF-hand ドメインと coiled-coil ドメインは、酸応答に不要であり、PKD1L3 の C 末端細胞内領域は酸応答に重要であることが示唆された。本研究では、ホスファチジルイノシトール(4,5)2リン酸による温度感受性 TRP チャネル TRP cation channel, subfamily V, member 1 (TRPV1) と TRP cation channel, subfamily M, member 8 (TRPM8) の活性制御機構の検討の報告で施行された方法 (Brauchi et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2007) に習い、PKD1L3 と PKD1L2 や PKD1、PKD2L1 と PKD2 といった各種キメラ体を作製し、Ca²⁺イメージング法を用いて酸応答に重要な領域の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) 酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 複合体のチャンネルポア領域の同定

まず、PKD2L1-FL と PKD1L3 各種変異体の共発現、および、PKD1L3-FL と PKD2L1 各種変異体の共発現により、両分子の HEK293T 細胞表面への移行が認められるかを細胞表面発現解析法にて観察したところ、いずれの共発現においても細胞表面への移行が認められた。続いて、PKD2L1-FL と PKD1L3 各種変異体の共発現、および、PKD1L3-FL と PKD2L1 各種変異体の共発現により、25mM クエン酸 (pH=2.7) に対する応答が認められるかを、Ca²⁺イメージング法を用いて解析したところ、PKD2L1 の D523 の点変異体において、Ca²⁺透過性が低下した (図 3)。以上より、PLD2L1 の D523 が PLD1L3/PKD2L1 複合体のカルシウム透過性を決定することが明らかとなった。



(2) 酸味受容体候補 PKD1L3/PKD2L1 複合体の酸応答機能に重要な領域の解明

PKD1L3 と PKD1L2 のキメラ体を複数種作製し、キメラ体と PKD2L1 との共発現により、両分子の HEC293T 細胞表面への移行を観察した。PLD1L3 の N 末端細胞外領域、TM1-5 領域、TM6-C 末端細胞内領域のいずれの部分も PKD1L2 に置換しても、PKD2L1 との共発現による細胞表面への移行が認められなかった。さらに、PKD2L1 と PKD2 のキメラ体を複数種作製し、キメラ体と PLD1L3 との共発現により、両分子の HEC293T 細胞表面への移行を観察した。PKD2L1 の C 末端細胞内領域以外の領域を PKD2 に置換すると、PKD1L3 との共発現による細胞表面への移行が認められなかった。現在、PKD2L1 と PKD2 のキメラ体のうち、細胞表面への移行が認められたものに関し、PKD1L3 との共発現によるクエン酸応答の有無を解析中である。

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 15 件)

藤本千里、中屋宗雄、大貫裕香、木田渉、籠谷領二、渡辺健太、阿部和也、食道小細胞癌の甲状腺転移症例、耳鼻咽喉科・頭頸部外科、査読有、83 巻、2011、333-336

藤本千里、前庭機能障害と高齢者のふらつき、Monthly Book ENTONI、査読無、125 巻、2011、6-11

藤本千里、内耳発生の分子メカニズム、Clinical Neuroscience、査読無、29 巻、2011、1340-1343

Fujimoto C, Murofushi T, Sugawara K, Chihara Y, Ushio M, Yamasoba T, Iwasaki S. Assessment of postural stability using foam posturography at the chronic stage after acute unilateral peripheral vestibular dysfunction. *Otology & Neurotology*、査読有、33巻、2012、432-436
DOI : 10.1097/MAO.0b013e3182487f48

Fujimoto C, Murofushi T, Sugawara K, Chihara Y, Ushio M, Yamasoba T, Iwasaki S. Bilateral vestibulopathy with dissociated deficits in the superior and inferior vestibular systems. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*、査読有、121 巻、2012、383-388

藤本千里、岩崎真一、山嵜達也、ラバー負荷重心動揺検査による末梢前庭障害の予備的診断、*Equilibrium Research*、査読有、71 巻、2012、472-477

[学会発表] (計 14 件)

藤本千里、山嵜達也、酸味受容体

PKD1L3/PKD2L1 複合体のチャンネルポア領域の解析、第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2011 年 5 月 20 日、京都

藤本千里、室伏利久、木下淳、菅澤恵子、井上亜希、江上直也、牛尾宗貴、山嵜達也、岩崎真一、特発性両側性末梢前庭機能低下症の障害部位と静的体平衡所見の関連性について、2011 年 11 月 17 日、千葉

藤本千里、尾関英徳、鈴川佳吾、近藤健二、加我君孝、山嵜達也、内耳発生をモニターするトランスジェニックマウスを用いた、耳胞領域特異的なトランスクリプトーム解析、第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会、2011 年 11 月 25 日、宜野湾

藤本千里、岩崎真一、山嵜達也、ラバー負荷重心動揺検査の末梢前庭障害に対する有用性について、第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2012 年 5 月 12 日、新潟

Chisato Fujimoto, Tatsuya Yamasoba, Shinichi Iwasaki. Idiopathic latent vestibulopathy: a clinical entity as a cause of chronic postural instability. 27th Barany Society、2012 年 6 月 13 日、ウプサラ (スウェーデン)

藤本千里、岩崎真一、山嵜達也、メニエール病患者のラバー負荷重心動揺検査所見に影響を及ぼす因子の検討、第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会、2012 年 10 月 5 日、名古屋

藤本千里、山嵜達也、岩崎真一、内耳障害を疑わせる病歴・所見を伴わず、立位・歩行時のふらつきのみを主訴とする特発性末梢前

庭障害の検討、第 71 回日本めまい平衡医学会・学術講演会、2012 年 11 月 29 日、東京

藤本千里、岩崎真一、木下淳、江上直也、菅澤恵子、山嵜達也、前庭神経炎患者のラバー負荷重心動揺検査所見、第 11 回姿勢と歩行研究会、2013 年 3 月 23 日、東京

〔図書〕 (計 1 件)

藤本千里、山嵜達也、シーエムシー出版、高齢者用食品の開発と展望、2012、302

〔産業財産権〕 (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 千里 (FUJIMOTO CHISATO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 60581882