

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570170

研究課題名(和文)茶カテキンが引き起こす渋味感覚の分子機構

研究課題名(英文) Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons.

研究代表者

斉藤 修 (Saitoh, Osamu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：60241262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、渋味の分子機構解明に向け「味覚神経上ではTRPA1とTRPV1が緑茶カテキン(EGCG)を感じる渋味センサーであり、それらが活性化されることが渋味感覚を導いている。」という仮説を立て研究を進めた。結果、調製後時間経過し酸化したEGCGのみが、TRPA1、TRPV1、更に培養感覚神経を活性化すること、更に酸化EGCG溶液中のTheasinensin Aが、それらの活性化を引き起こす物質の一つであることを突き止めた。また、酸化EGCGへの各動物種のTRPチャンネルの応答性の違いからキメラ解析を行い、両TRPチャンネルとも6回膜貫通部位に酸化EGCG応答に重要な部位が存在することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We examined how mammalian TRPV1 and TRPA1, which are nociceptive sensors are activated by green tea catechins during the auto-oxidation process. Neither TRPV1 nor TRPA1 could be activated by any of the freshly prepared catechin. When EGCG was pre-incubated for 3h in salt solution, it significantly activated both TRP channels expressed in HEK293 cells. Even after incubation other catechins showed much less effects, suggesting that only oxidative products of EGCG activate both TRPV1 and TRPA1. Dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons were also activated by the incubated EGCG through TRPV1 and TRPA1 channels. Liquid chromatography/mass spectrometry revealed that theasinensin (TS) A and D are formed during incubation of EGCG. We found that purified TS-A activates both TRPV1 and TRPA1, and that it stimulates DRG neurons through TRPV1 and TRPA1 channels. Results suggested a possibility that TRPV1 and TRPA1 channels are involved in the sense of astringent taste of green tea.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：味覚 TRPチャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高等動物が舌で感じる5基本味(甘味・苦味・塩味・酸味・旨味)のセンサーとして、種々の受容体(T1R,T2Rファミリー)とイオンチャンネルが同定されてきた。これらの味覚センサーは、味蕾の味細胞に存在しいずれも味物質で刺激されると、最終的には細胞内Ca<sup>2+</sup>を上昇させ、味覚神経への伝達物質を放出させる。また基本味以外にも、主に口の感覚神経などを刺激する味覚の表現として辛味・渋味などがあり、そのうち辛味の感覚はTransient receptor potential(TRP)チャンネルがセンサーの本体である。TRPファミリーは、化学物質・温冷感・酸化還元・pHなど様々な変化に対して応答する6回膜貫通型のカチオンチャンネル分子である。この中で辛味の感覚は、辛味成分のcapsaicinなどが味覚神経にあるTRPV1に作用し、活性化・陽イオン流入を引き起こさせ、神経細胞を興奮させることによって起こる。これに対し、渋味については、センサーやその感覚の実体については、現在のところ詳細は殆ど明らかにされていない。渋味感覚を引き起こす物質としては、渋柿・ワインに含まれるタンニン、緑茶に豊富なカテキン類、コーヒーに多いクロゲン酸などが知られている。

渋味を引き起こす主要な緑茶カテキンは、エピガロカテキンガレート(EGCG)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(ECG)、エピカテキン(EC)である。その中で最も豊富なEGCGの抗癌作用が注目され、EGCG受容体67kDaラミニンレセプター(67LR)が立花らによって同定された(Tachibana et al. Nat. Struct. Mol. Biol; 11:380, 2004)。しかし67LRは、細胞にCa<sup>2+</sup>などの陽イオン流入を引き起こせないこと、さらに感覚神経以外にも多くの細胞に発現していることから、渋味感覚を引き起こすEGCGセンサーではなかった。では、何がEGCGで活性化される渋味センサーなのか?我々は、ごく最近遂に候補分子を

特定することに成功した。これまで我々は、消化管内の成分感知のセンサー細胞とされる腸内内分泌細胞(EC)を研究してきた。そして、マウスのEC細胞株STC-1が、5種すべての味覚基本味に反応し顕著に細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇することを発見した(Saitoh et al. Neuroreport; 18:1991, 2007、Fukunaga et al. Neuroreport; 21:772, 2010)。そこで次に我々は、この腸内EC細胞が渋味に反応するか解析を行った。するとこの細胞が緑茶カテキンEGCGに反応して細胞内のCa<sup>2+</sup>が上昇することが見出された。即ち、「STC-1細胞は、まだ世界で誰も特定できていないカテキンセンサーを発現している培養細胞である」ことが判明したのである。そこで、このセンサーは何であるか、薬理的検討・発現解析など種々の解析を行い、TRPファミリーの一つTRPA1が働いていることを突き止めたのである。即ち、通常の培養細胞にTRPA1を発現させると、EGCGに反応して細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇する細胞になることを発見した。そして、このセンサーは既にこのチャンネルのリガンドとして知られていた辛味物質AITCとは全く違ったゆっくりとしたパターンでEGCGに応答することが見出されたのである。また、この研究の過程でTRPV1も同様にEGCGに応答する可能性が見出された。TRPA1とTRPV1は、どちらも味覚神経に発現しているチャンネルであり、しかもEGCGにより活性化されて陽イオンを細胞内に流入させる。即ち、当然味覚神経を興奮・発火させると考えられる。さらに、そのどちらの辛味センサーも辛味物質とは違ったパターンで渋味物質EGCGにより活性化されるのである。おそらく、それらの発火・活性化パターンの違いが、辛味と渋味の違いとして識別されるのではないだろうか。一方、ごく最近ヒトの苦味受容体の一つhTAS2R39が緑茶カテキンをリガンドとすることを成川らが報告した(Narukawa et al. BBRC 405:620, 2011)。hTAS2R39は、味蕾に

発現する苦味受容体ファミリーである。このように、現在、茶カテキン類を感じる渋味センサー候補は、TRPA1、TRPV1、hTAS2R39の3種である。本研究では、動物が味覚神経や味蕾でこれらのセンサーを使って茶カテキンを独立の味の「渋味」として感知していることを明らかにする。

## 2. 研究の目的

茶カテキン類をセンズし渋味感覚を引き起こすセンサー候補は、TRPA1、TRPV1、hTAS2R39である。そこで、我々は特に感覚神経に注目し、**「味覚神経上では TRPA1 と TRPV1 が茶カテキン(EGCG)を感じる渋味センサーであり、それらがカテキンによりゆっくと活性化されることが渋味感覚を導いている。」**という仮説を立てた。本研究では、この仮説の実証に向け、主に感覚神経センサー (TRPA1 と TRPV1) を中心に解析を進めていった。具体的には以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- (1) 茶カテキン類を感じる渋味センサー候補 (TRPA1、TRPV1) の特性決定。
- (2) リガンド反応部の決定。
- (3) センサー候補の舌上・口腔内の発現部位の解析。
- (4) TRPA1 と TRPV1 が味覚(感覚)神経細胞上で渋味センサーとして機能しているか。
- (5) 個体レベルでみられる渋味感覚が引き起こす行動(飲水抑制など)の特性とセンサー候補の特性の比較。

(3) については、既に先行研究があり、解析の必要がなかった。(5) については、味蕾上の hTAS2R39 をはじめとする苦味受容体の EGCG 感受性を捉えることが出来ず、その為神経と味蕾由来の入力を区別することが出来ない為、行動解析を断念した。

## 3. 研究の方法

- (1) TRPA1 及び TRPV1 cDNA

以下をコードする発現ベクターを使用した。ヒト TRPA1・TRPV1 (Dr.Christopher A. Reilly)、マウス TRPA1(Dr.Yoshiro Kubo)、ラット TRPV1(Dr.David Julius)、ニワトリ TRPA1(本研究で完全長 cDNA を単離)、ニワトリ TRPV1(Dr.David Julius)、ガラガラヘビ TRPA1・TRPV1(Dr.David Julius)、ゼブラフィッシュ zTRPA1・zTRPA1b(Dr.David Prober)、フグ TRPA1(Dr. Ardem Patapoutian)、メダカ TRPA1(本研究で完全長 cDNA を単離)。

### (2) Ca<sup>2+</sup>イメージング法

培養細胞の HEK293T 細胞に TRPA1 あるいは TRPV1 cDNA を遺伝子導入し、そのタンパク質を発現させた。遺伝子導入から 1~3 日後、Ca<sup>2+</sup>感受性蛍光色素 Flou8<sup>TM</sup> を取り込ませ、蛍光顕微鏡上で各種カテキン類を作用させ、蛍光変化をモニターした。

### (3) LC-ESI-MS と LC-MS/MS

EGCG 溶液と酸化した EGCG 溶液を解析した。LC-ESI-MS と LC-MS/MS は、LCMS-IT-TOF (Shimazu) を用いて行った。カラムは、Cosmosil 5C18-ARII を使用した。溶出条件は、最初の 15 分間、90% A [0.1% formic acid] + 10% B [CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN=3:2] から 75% A + 25% B に直線的にグラディエントをかけた。次の 10 分間は、更に 40% A + 60% B に直線的にグラディエントをかけ、その後 90% A + 10% B に戻し、更に 15 分間維持した。

### (4) Theasinensin A の合成

Shii ら (Chem Pharm Bull 59: 1183, 2011) の方法で合成し、LC-ESI-MS 及び LC-MS/MS で確認した。

### (5) 感覚神経の培養

6 から 10 週令のマウスから後根神経

節を取り出し、神経細胞を分散させ、Dai ら (J Clin Invest 117: 1979, 2007) 方法で培養した。

( 6 ) ホールセルパッチクランプ

HEK293T 細胞に TRP コンストラクトと蛍光マーカートンパクのコンストラクトを同時に遺伝子導入して、Tateyama と Kubo (Neuropharmacology 61:832, 2011) の方法を用い蛍光陽性細胞のホールセルパッチクランプ記録を行った。

( 7 ) キメラ作成

オーバーラップ PCR 法を用いて二つの cDNA のキメラを作成し、期待するキメラ cDNA が出来ているか配列決定した。

#### 4 . 研究成果

本研究では、渋味感覚の分子機構解明に向け以下の成果を得ることが出来た。

( 1 )  $Ca^{2+}$  イメージング法で解析した結果、ヒトとマウスの TRPA1 は、4 種のカテキン (EC, EGC, ECG, EGCG) の中で、どちらも EGCG で最も活性化されるが、ヒトの方がマウスより EGCG 感受性が高いことが判明した。また、それらの活性化は、 $5\mu M$  Ruthenium Red (RR) で部分抑制され、 $100\mu M$  AP-18 と  $100\mu M$  HC-030031 で遮断された。

( 2 ) 感覚神経に発現する他の TRP の中で更にどの TRP が EGCG 応答性をもつか、HEK293T 細胞に発現させ、 $Ca^{2+}$  イメージング法で解析した。結果、TRPV1 が EGCG に反応した。さらに、TRPV1 は、 $2\mu M$  以上で活性化され TRPA1 より EGCG 感受性が高かった。また、その応答は  $5\mu M$  RR,  $10\mu M$  capsazepin (CPZ) で遮断された。これら ( 1 ) ( 2 ) の内容は、Chem. Senses 37:167, 2012 に掲載され、ハイライト論文と雑誌表紙に選ばれた。

( 3 ) TRPA1 と TRPV1 を発現する感覚神経が実際に EGCG に反応するか、マウス後根神経

節 (DRG) 由来の培養感覚神経を  $Ca^{2+}$  イメージング法で解析した。すると、感覚神経が実際に EGCG により濃度依存的に刺激されるのが観察された。

( 4 ) 詳細な条件検討を重ねた結果、溶解直後の EGCG は TRP チャンネルを活性化せず、数時間経過した EGCG が TRP チャンネルを活性化することが判明した。また、酸化防止剤の Vitamin C 添加で  $Ca^{2+}$  イメージング法で検出された EGCG への応答が消失した。即ち、酸化した EGCG 溶液中に TRPA1 と TRPV1 を活性化する物質が出現することが明らかになった。HPLC と LC-MS 解析より、時間経過により出現する物質の中に、生理活性の高い EGCG の二量体 Theasinensin A/D が存在する事が分かった。即ち、Theasinensin が、TRP チャンネルを活性化する渋味リガンドの実体である事が示唆された。( 1 ) ~ ( 4 ) の内容を大学院生が学会発表し、学術奨励賞を受賞した (第 28 回茶学研究会)。

( 5 ) 次に EGCG から Theasinensin A を合成、更に精製して、TRPA1 と TRPV1 に対する作用を  $Ca^{2+}$  イメージング法で解析した。結果、Theasinensin A が実際に TRPA1 と TRPV1 を活性化することが分かり、数時間経過し酸化した EGCG 溶液に出現する Theasinensin A が渋味感覚を引き起こす物質の一つである事が強く示唆された。

( 6 ) 魚類のゼブラフィッシュには、特別に二種の TRPA1 (zTRPA1a と zTRPA1b) が存在する。そこで、両 TRPA1 チャンネルの酸化 EGCG に対する応答性を  $Ca^{2+}$  イメージング法で解析した。結果、zTRPA1a のみが反応性を示した。そこで、zTRPA1a と zTRPA1b の間でキメラチャンネルを作成し解析した結果、zTRPA1a の酸化 EGCG 認識にはその N 端部が重要であることが示された。

( 7 ) 各種の動物 (ヒト、マウス、ニワトリ、ガラガラヘビ) の TRPV1 及び TRPA1 の酸化

EGCG への反応性を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法で解析した。結果、TRPV1 は鳥類から、TRPA1 は哺乳類からカテキン反応性を示すことが明らかになった。一方、魚類については、メダカとフグの TRPA1 が酸化 EGCG 感受性を持たないことから、ゼブラフィッシュ zTRPA1a の応答性はゲノム倍加により特別に機能獲得されたものと考えられた。いずれにしても、以上の解析から、動物がどのようにして TRPV1 と TRPA1 を使って植物由来の渋味成分を認識できるようになってきたか、解析することが可能になった。

(8) 実際の感覚神経が本当に EGCG そのものでは活性化されず、酸化 EGCG さらには Theasinensin A により活性化されるかどうか、マウス DRG 由来の培養感覚神経を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法で解析した。すると確かに DRG 細胞は EGCG そのものには応答性がなく、酸化 EGCG と Theasinensin A では活性化されることが明らかになった。更にそれらの DRG 応答は、TRPA1 ブロッカー (AP-18) と TRPV1 ブロッカー (SB-366791) の一方のみの添加で極めてよく遮断されることが判明した。即ち、これらの細胞応答が TRPA1 及び TRPV1 を介したものであること、一方 DRG 中には TRPA1 と TRPV1 を共発現する多く細胞の存在が知られており、片方の TRP チャンネルの遮断でもう一方の TRP チャンネルの応答も阻害されることから、感覚神経細胞内で渋味応答に対して TRPA1 と TRPV1 は相互作用していることが強く示唆された。

(9) 酸化 EGCG・Theasinensin A により TRPV1 と TRPA1 のチャンネル活性が実際に活性化されるどうか、ホールセルパッチクランプ法により電気生理学的解析を行った。すると、TRPV1 チャンネルは低濃度 (20  $\mu\text{M}$ ) の酸化 EGCG で実際に活性化されるが、高濃度 (200  $\mu\text{M}$ ) ではチャンネルに阻害がかかることが明らかになった。一方、TRPA1 チャンネルについては、4  $\mu\text{M}$  の Theasinensin A で活性化が起こり、

そして 100  $\mu\text{M}$  では抑制されることが判明した。このように電気生理実験により、酸化 EGCG による TRPA1 及び TRPV1 チャンネルの活性化が確認された。また同時に高濃度では、どちらのチャンネルにも酸化 EGCG は阻害効果を持つことが明らかになった。

(10) TRPV1 は鳥類から、TRPA1 は哺乳類から酸化 EGCG 反応性を示すことが明らかになった。両 TRP の動物種による応答性の違いから酸化 EGCG 感受性部位の探索が可能になり、キメラチャンネルを作成して検討した。結果、どちらの TRP チャンネルも 6 回膜貫通部位に酸化 EGCG への感受性に重要な部位が存在することが判明した。

渋味感覚の解明に向け、これらの研究成果の貢献は非常に大きい ((4) - (10) の内容は、*Chem. Senses* 40:27, 2015 に掲載され、ハイライト論文と雑誌表紙に選ばれた)。

#### 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. Kurogi, M., Kawai, Y., Nagatomo, K., Tateyama, M., Kubo, Y., and Saitoh, O. Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons. ***Chem. Senses*** 40, 27-46 (2015)  
査読有 doi: 10.1093/chemse/bjr087
2. 齊藤修、黒木麻湖、織田麻衣、久保義弘。腸内の味覚成分を化学受容する仕組みの解明、生理学研究所年報 第35巻 148-149 (2014) 査読無し
3. Miyata, M., Kurogi, M., Oda, M., and Saitoh, O. Effects of five taste ligands on the release of CCK from an enteroendocrine cell line, STC-1. ***Biomed. Res.*** 35, 171-176 (2014)  
査読有  
<http://doi.org/10.2220/biomedres.35.171>

4. 齊藤修、黒木麻湖、織田麻衣、久保義弘、腸内の味覚成分を化学受容する仕組みの解明、生理学研究所年報 第 34 巻 157(2013) 査読無し
5. Kurogi, M., Miyashita, M., Emoto, Y., Kubo, Y., and Saitoh, O. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate Activates TRPA1 in an Intestinal Enteroendocrine Cell Line, STC-1. **Chem Senses** 37, 167-177 (2012) 査読有 doi: 10.1093/chemse/bju05
6. 齊藤修、黒木麻湖、織田麻衣、宮田睦月、久保義弘、腸内の味覚成分を化学受容する仕組みの解明、生理学研究所年報 第 33 巻 147-148(2012) 査読無し

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 二宮和也、織田麻衣、黒木麻湖、齊藤修、タンニン酸による TRPV1 及び TRPA1 の抑制作用、第 87 回日本生化学会、京都 (2014,10.16)
2. 齊藤寛、八田駿、織田麻衣、黒木麻湖、齊藤修、メダカ TRPA1 の同定と機能解析、第 87 回日本生化学会、京都 (2014,10.16)
3. 織田麻衣、黒木麻湖、久保義弘、齊藤修、ゼブラフィッシュの 2 種の TRPA1 の機能解析、第 87 回日本生化学会、京都 (2014,10.16)
4. 黒木麻湖、立山充博、久保義弘、齊藤修、酸化 EGCG による TRPA1 及び TRPV1 の活性化、日本味と匂い学会第 48 回大会、静岡(2014,10.2)
5. 齊藤修、織田麻衣、黒木麻湖、久保義弘、魚類 TRPA1 の化学物質及び温度への応答性の解析 第 86 回日本遺伝学会ワークショップ「温度感受性 TRP チャンネルの機能的多様性と生理的意義:分子から個体までの統合的な理解を目指して」、長浜 (2014,9.19)
6. 織田麻衣、黒木麻湖、久保義弘、齊藤修、魚類 TRPA1 の機能解析 第 61 回日本生化学会近畿支部例会、京都(2014,5.17)
7. 黒木麻湖、河合靖、長友克広、久保義弘、齊藤修、緑茶カテキンによる TRPA1 と TRPV1 の活性化、第 84 回日本動物学会、岡山(2013,9.26)
8. 織田麻衣、黒木麻湖、久保義弘、齊藤修、魚類 TRPA1 の機能解析、第 84 回日本動物学会、岡山(2013,9.26)
9. 村竹勇樹、織田麻衣、齊藤修、ヒドラ TRPA1 の同定と機能解析、第 84 回日本動物学会、岡山(2013,9.26)
10. 黒木麻湖、長友克広、河合靖、久保義弘、齊藤修、緑茶カテキン等を感知する渋味センサーの探索、第 28 回茶学術研究会講演会、静岡(2013,3.15) 学術奨励賞受賞
11. 織田麻衣、木村光、齊藤修、小腸細胞 STC-1 の甘味応答の仕組み、第 85 回日本生化学会、福岡(2012,12.14)
12. 黒木麻湖、河合靖、長友克広、久保義弘、齊藤修、渋味感覚における TRPV1 の役割、第 85 回日本生化学会、福岡(2012,12.14)
13. 織田麻衣、木村光、齊藤修、小腸細胞 STC-1 の甘味応答の仕組み、第 46 回日本味と匂学会、大阪(2012,10.3)
14. 黒木麻湖、河合靖、長友克広、久保義弘、齊藤修、渋味センサー探索の試み、第 46 回日本味と匂学会、大阪(2012,10.3)
15. 黒木麻湖、河合靖、長友克広、久保義弘、齊藤修、緑茶カテキンによる TRPA1 及び TRPV1 の活性化、第 59 回日本生化学会近畿支部例会、京都(2012,5.19)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

齊藤 修 (SAITOH Osamu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：60241262