

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660108

研究課題名(和文)酸味・塩味受容機構の全容解明に向けた新規イオンチャンネル型味覚受容体の探索

研究課題名(英文) Screening of novel ion channels for sour and salty taste

研究代表者

石丸 喜朗 (ISHIMARU, YOSHIRO)

東京大学・農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10451840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-Seq法と、味蕾を構成する味細胞種の割合が変化した転写因子Skn-1a(Pou2f3)欠損マウスを用いて、新規イオンチャンネル型味覚受容体、特に高濃度の塩に対する塩味受容体の探索を行った。その結果、有郭乳頭と葉状乳頭の味蕾特異的に発現する遺伝子を同定した。HEK293T細胞を用いた電気生理学的解析から、この分子はクロライドチャンネルであることが示された。欠損マウスは高濃度の塩溶液に対する舌咽神経応答と忌避のリック応答が減少していた。以上の結果から、この遺伝子は食品中に含まれるクロライドアニオンの検出に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We carried out screening of novel ion channels for salty taste using RNA-Seq method and the transcription factor Skn-1-deficient mice. As a result, we found that gene X is specifically expressed in taste receptor cells of circumvallate and foliate papillae. Electrophysiological analysis using HEK293T cells revealed that X forms a chloride channel. Finally, X-deficient mice showed reduced glossopharyngeal nerve and aversive lick responses to high concentration (>100 mM) of NaCl. Taken together, these results demonstrate that gene X may be involved in the detection of chloride anion in food.

研究分野：食品科学

キーワード：味覚受容体 イオンチャンネル 遺伝子発現解析 RNA-Seq法 in situ hybridization法

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物は、食物の栄養価(糖、アミノ酸含量)、毒性(苦味強度)、塩濃度、酸性度(腐敗度)を評価するために味覚系を利用している。口腔内に取り込まれた食物は、主に舌上皮に存在する味蕾という組織でまず受容される。味覚は、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の5基本味に分類される。近年、味蕾における甘、旨、苦味受容の分子機構に関しては、Gタンパク質共役型受容体からその下流のシグナル伝達因子など、多くの知見が得られた。一方、酸味と塩味の受容に関しては、後述するいくつかのイオンチャンネル型受容体が報告されているが、複数の受容機構が存在し、分子機構全体像の解明には至っていない。

酸味は食物が腐敗していることを示すシグナルである一方で、乳酸、クエン酸、酢酸などは我々の健康に良い様々な働きを持つ。味蕾や味蕾に投射する味神経を用いた解析では、酸に対する応答には、酸刺激直後の「オン応答」と酸刺激除去後の「オフ応答」という二種類の応答が観察された。味蕾で酸味を感知する酸味受容体に関しては、研究代表者自らが発見したTRPチャンネル関連分子Pkd113/Pkd211や炭酸脱水酵素の一種Car4などが報告されている(Ishimaru *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2006); Ishimaru *et al.*, *FASEB J.* (2010); Chandrashekar *et al.*, *Science* (2009))。Pkd113/Pkd211はクエン酸や酢酸など様々な酸溶液に対する「オフ応答」を担っており、これは、例えばレモンをかじった時、徐々に唾液が出てきて次第に酸味が強くなる現象の分子基盤と解釈できる。一方、Car4は炭酸飲料やビールなどの飲料に含まれる炭酸と水を、炭酸水素イオンと水素イオンに変換し、炭酸を感知する働きを持つ。

塩味は生体のミネラル平衡維持のために必要であり、低濃度では嗜好され、高濃度では忌避される。味神経の電気生理学的な解析から、低濃度の塩に対するナトリウム選択的アミロライド感受性の応答と、高濃度の塩に対するナトリウム非選択的アミロライド非感受性の応答という薬理的に異なる二種類の応答が観察されていた。前者の応答を担う塩味受容体として、アミロライド感受性ナトリウムチャンネルであるENaCが報告された(Chandrashekar *et al.*, *Nature* (2010))。後者の応答に関しては、高濃度の塩はマウスの味蕾において、苦味と酸味という共に忌避される基本味を感知する味細胞を刺激することが示された(Oka *et al.*, *Nature* (2013))。しかし、高濃度の塩に対する受容体の分子実体は依然として不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、酸味・塩味受容機構の全容解明に向けて、RNA-Seq法という新しい網羅的な遺伝子発現解析の手法と、味蕾を構成する味細胞種の割合が変化した転写因子Skn-1a

(Pou2f3)欠損マウスを用いて、新規イオンチャンネル型味覚受容体、特に高濃度の塩に対する塩味受容体を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)RNA-Seq法(Mortazavi *et al.*, *Nat. Methods* (2008))を用いて、野生型(WT)マウスの味蕾を多く含む有郭乳頭上皮(CV)と味蕾を含まない周辺上皮(Epi)における遺伝子発現プロファイルと比較した。約20匹のWTマウスからそれぞれの組織を単離し、全RNAを抽出した後、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq解析とERANGEによる発現情報解析を行った。

(2)公開プログラム(TMpredやTMHMM)を用いて膜貫通領域を予測した。

(3)(1)と同様にRNA-Seq法を用いて、KOマウスの有郭乳頭上皮における遺伝子発現プロファイルを解析し、WTマウスのCV値と比較した。

(4)*in situ* hybridization(ISH)法を用いて、有郭乳頭上皮においてどのような発現様式を示すかを調べた。

(5)培養細胞やアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、パッチクランプ法により電気生理学的な機能解析を行った。

(6)TALEN法を用いて、遺伝子欠損マウスを作出し、表現型を解析した。具体的には、行動学的な2瓶嗜好テスト(長期)とリッキングテスト(短期)及び、電気生理学的な味神経応答解析を行った。

## 4. 研究成果

最初に、RNA-Seq法を用いて味蕾特異的発現遺伝子の探索を行った。CV値とCV/Epi値が大きい遺伝子は、味蕾特異的に強く発現すると予想した。その結果、CVかEpiの少なくとも一方で発現する遺伝子が約18,000個存在し、そのうちCV値>3かつCV/Epi値>3以上の遺伝子が1,123個抽出された。これらには、味蕾特異的に発現し、味覚の受容伝達に重要な働きをする甘・旨味受容体(Tas1r1、Tas1r2、Tas1r3)、苦味受容体(Tas2rs)、酸味受容体(Pkd113、Pkd211、Car4)、Gタンパク質(Gnat3、Gna14、Gnb3、Gng13)、下流シグナル伝達因子(Plcb2、Trpm5)などが含まれたことから、本実験方法の有効性が実証された。イオンチャンネルは一般に、複数回膜貫通型の膜タンパク質である。そこで次に、公開プログラム(TMpredやTMHMM)を用いて膜貫通領域を予測し、候補遺伝子の絞り込みを行った。

我々の研究室は、転写因子Skn-1a(Pou2f3)欠損(KO)マウスの味蕾では、甘・旨・苦味細胞が消失し、代わりに酸味細胞に置き換わっていることを報告した(Matsumoto *et al.*, *Nature Neurosci.* (2011))。つまり、KOマウスの有郭乳頭上皮では、WTマウスのCV値と比較して、甘・旨・苦味細胞特異的に発現す

る遺伝子の値が0に近くなるのに対して、酸味細胞特異的に発現する遺伝子の値は増大すると予想される。本研究の目的とした高濃度の塩に対する塩味受容体は、苦味・酸味細胞特異的に発現すると考えられる。そこで、前述と同様に RNA-Seq 法を用いて、KO マウスの有郭乳頭上皮における遺伝子発現プロファイルを解析し、WT マウスの CV 値と比較することによって、各遺伝子が発現する味細胞の種類を予測した。その結果、約 900 個の遺伝子に絞られた。

そのうち、候補遺伝子 72 個に関して、*in situ* hybridization (ISH) 法を用いて、有郭乳頭上皮においてどのような発現様式を示すかを調べた。その結果、21 個の新規味覚特異的発現遺伝子を同定することができた。

候補遺伝子が塩味受容体である可能性を検証するため、培養細胞やアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、パッチクランプ法により電気生理学的な機能解析を行った。その結果、ある分子がクロライドチャンネルとしての性質を持つことを明らかにした。

塩味受容体候補の生体内での機能を明らかにする目的で、TALEN 法を用いて、その遺伝子欠損マウスを作成し、表現型を解析した。作成した欠損マウスが、塩味や他の味覚受容体において欠損の表現型を示すかを、野生型マウスと比較して調べた。具体的には、行動学的な 2 瓶嗜好テスト（長期）とリッキングテスト（短期）及び、電気生理学的な味神経応答解析を行った。その結果、欠損マウスは高濃度の塩溶液に対する応答が減少する表現型を示した。

以上より、新規塩味受容体候補（クロライドアニオンチャンネル）を同定することに成功した。

## 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 8 件)

Ushima S, Ishimaru Y, Narukawa M, Yoshioka M, Kozuka C, Watanabe N, Tsunoda M, Osakabe N, Asakura T, Masuzaki H, Abe K, Catecholamines facilitate fuel expenditure and protect against obesity via a novel network of the gut-brain axis in transcription factor *Skn-1*-deficient mice、EBioMedicine、査読有、2016、印刷中  
DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.04.031

Maeda N, Ohmoto M, Yamamoto K, Kurokawa A, Narukawa M, Ishimaru Y, Misaka T, Matsumoto I, Abe K, Expression of serotonin receptor genes in cranial ganglia、Neurosci. Lett.、査読有、617 巻、2016、46-51  
DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.050

Ogi K, Yamashita H, Terada T, Homma R,

Shimizu-Ibuka A, Yoshimura E, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Long-Chain Fatty Acids Elicit a Bitterness-Masking Effect on Quinine and Other Nitrogenous Bitter Substances by Formation of Insoluble Binary Complexes、J. Agric. Food Chem. 査読有、63 巻、2015、8493-8500  
DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03193

Ishimaru Y、Molecular mechanisms underlying the reception and transmission of sour taste information、Biosci. Biotechnol. Biochem.、査読有、79 巻、2015、171-176  
DOI: 10.1080/09168451.2014.975187

Suzuki-Hashido N, Hayakawa T, Matsui A, Go Y, Ishimaru Y, Misaka T, Abe K, Hirai H, Satta Y, Imai H, Rapid Expansion of Phenylthiocarbamide Non-Tasters among Japanese Macaques、PLoS One、査読有、10 巻、2015、e0132016  
DOI: 10.1371/journal.pone.0132016

Midorikawa K, Kuroda M, Terauchi K, Hoshi M, Ikenaga S, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Additional nitrogen fertilization at heading time of rice down-regulates cellulose synthesis in seed endosperm、PLoS One、査読有、9 巻、2014、e98738  
DOI: 10.1371/journal.pone.0098738

Hoshi M, Ohki Y, Ito K, Tomita T, Iwatsubo T, Ishimaru Y, Abe K, Asakura T, Experimental detection of proteolytic activity in a signal peptide peptidase of *Arabidopsis thaliana*、BMC Biochem.、査読有、14 巻、2013、16  
DOI: 10.1186/1471-2091-14-16

Toda Y, Nakagita T, Hayakawa T, Okada S, Narukawa M, Imai H, Ishimaru Y, Misaka T, Two distinct determinants of ligand specificity in T1R1/T1R3 (the umami taste receptor)、J. Biol. Chem.、査読有、288 巻、2013、36863-36877  
DOI: 10.1074/jbc.M113.494443

〔学会発表〕(計 18 件)

Ishimaru Y, Ushima S, Narukawa M, Yoshioka M, Kozuka C, Watanabe N, Osakabe N, Asakura T, Masuzaki H, Abe K, Loss of brush cells in the gastrointestinal tract alters energy metabolism in *Skn-1*-deficient mice、ECRO 2015、2015 年 9 月 2 日、トルコ・イスタンブール

石丸喜朗、牛尼翔太、成川真隆、吉岡美沙子、小塚智沙代、越阪部奈緒美、朝倉富子、益崎裕章、阿部啓子、転写因子 *Skn-1* 欠損マウスにおける腸脳軸ネットワークを介したカテコールアミンのエネルギー亢進・抗肥満作用、第 93 回日本生理学会、2016 年 3 月 24 日、札幌コンベンションセンター（札幌）

谷下道大、吉岡美沙子、朝倉富子、阿部啓子、石丸喜朗、RNA-Seq法を用いた小腸刷子細胞発現遺伝子の網羅的探索、日本農芸化学会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター（札幌）

Ishimaru Y, Yoshioka M, Asakura T, Abe K, Loss of gastrointestinal brush cells in *Skn-1*-deficient mice reduces insulin secretion, Association for Chemoreception Sciences 36th Annual Meeting, 2014年4月11日、アメリカ合衆国・ボニタスプリングス

Ishimaru Y, Yoshioka M, Asakura T, Abe K, Loss of gastrointestinal brush cells in *Skn-1*-deficient mice reduces insulin secretion, The 12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2014年11月2日、九州大学（福岡）

吉岡美沙子、石丸喜朗、朝倉富子、阿部啓子、小腸刷子細胞の分化制御と機能の解明、日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学（神奈川）

角田俊介、石丸喜朗、吉澤真人、吉岡美沙子、朝倉富子、阿部啓子、mRNA-Seq法を用いた味蕾特異的発現遺伝子の網羅的解析、日本農芸化学会、2014年3月29日、明治大学（神奈川）

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/tastescience/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石丸 喜朗 (ISHIMARU Yoshiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10451840