

ENaC 発現味蕾細胞の塩味センサー機構の解明

樽野 陽幸

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学部門

概要 Na⁺は多細胞生物の細胞外液の主要陽イオンであり、体液量調節に必須の物質である。動物は Na⁺の摂取量を適切に制御するための塩味受容機構を発達させており、塩味受容の全容解明は生理学的興味のみならず、特に先進国で深刻な高血圧の予防など社会的にも希求がある。上皮型 Na⁺チャンネル(Epithelial Sodium Channel, ENaC)の α サブユニット ENaC α のノックアウトマウス解析により、ENaC がアミロライド感受性 Na⁺選択的塩味受容の必須分子であることが明らかとなったが、ENaC 発現味蕾細胞の塩味受容機構は全く不明のままである。このような末梢味覚の生理学的理解の遅れは、主に味蕾の組織形態学的特性からくる生理学実験技術応用の制限に起因する。本研究では従来の実験手法を見直し、味蕾における塩味受容の生理現象の包括的理解の為の新しい技術的基盤として舌上皮内で正常形態を保つ味蕾中の味細胞からの味刺激応答記録の実験技術の構築、とこれによる ENaC 発現味蕾細胞の塩味センサー機構解明を目指した。

これまでの単離細胞を用いた実験の欠点を克服する実験技術の開発を目指したが、そこでのポイントは、正常組織形態を維持したまま生理条件で刺激・記録可能であること、多数の細胞の中から応答細胞を確実に同定できること、である。そのために、遺伝子工学的蛍光 Ca²⁺センサータンパク質 GCaMP3 を塩味受容味蕾細胞特異的に安定発現するマウスを作出した。方法は、ENaC α プロモータ制御下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと、近年開発された Cre リコンビナーゼ活性によってコンディショナルに GCaMP3 を発現する Ai38 マウスとの交配し、ENaC α 発現味蕾細胞特異的に GCaMP3 を発現するマウス(ENaC α - GCaMP3 マウス)を作出した。作出した ENaC α - GCaMP3 マウスに目立った外見上の異常は見られず、発達にも異常は無かった。さらに、ENaC α - GCaMP3 マウスの味蕾において ENaC α 発現味蕾細胞選択的に GCaMP3 を発現していることを蛍光免疫染色によって確認することができた。

本年度中に ENaC 発現味蕾細胞の塩味センサー機構の解析までは行うことができなかったが、本研究で得られた ENaC α - GCaMP3 マウスは末梢塩味受容機構研究の強力なツールとなると期待できる。

1. 研究目的

食べ物の味は栄養素・毒素の存在を知らせることで生存に、更に食の愉楽を通じて生活の質にも重要な役割を果たし、動物は5感の1つとして「味覚」を発達させてきた。味蕾での末梢味覚の分子的理解は *Gustducin* の発見に始まり¹、その後、味物質の受容体遺伝子が次々と同定されてきた²。更に5基本味(甘味・苦味・塩味・酸味・旨味)が味蕾でそれぞれ異なる細胞種により受容されるといった味受容の細胞基盤はよく理解されている。しかし、味細胞内または味細胞間での味受容時の生理現象理解が進ん

でいない。

ナトリウムイオンは多細胞生物の細胞外液の主要陽イオンであり、体液量調節に必須の物質である。動物はナトリウムイオンの摂取量を適切に制御するための塩味受容機構を発達させており、塩味受容の全容解明は生理学的興味のみならず、特に先進国で深刻な高血圧の予防など社会的にも希求がある。実際に、我が国で高血圧患者は4,000万人にも上ると推定され、脳心血管障害の発症と進展に深く関与しており、食塩の摂り過ぎが高血圧の牽引となることは古くから知られている。上皮型ナトリウムチャネ

ル (Epithelial Sodium Channel, ENaC) の α サブユニット ENaC α (SCNN1A) のノックアウトマウス解析により、ENaC がアミロライド感受性 Na^+ 選択的塩味受容の必須分子であることが報告された³。このように、分子遺伝学の発展により塩味受容における ENaC の必要性は明らかとなったが、ENaC 発現味細胞の塩味受容機構は全く不明のままである。このような末梢味覚の生理学的理解の遅れは、主に味蕾の組織形態学的特性からくる生理学実験技術応用の制限に起因する。本研究ではこれまでの実験手法を見直し、味蕾における塩味受容の生理現象の包括的理解の為の新しい技術的基盤の構築とこれによる ENaC 発現味蕾細胞の塩味センサー機構解明を目指した。

味蕾は 50–100 個の味細胞が密着して構成され、個々の細胞は密着結合により味を受容する口腔側膜と味情報処理・伝達を行う血管側膜に分れている (Fig. 1)。味受容による味細胞の興奮は細胞内カルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の可視化で検出できるが、味蕾中で味細胞は密着し重なっているために、味蕾形態を保った状態での AM 体カルシウムイオン感受性蛍光色素の導入は困難であり、通常酵素で単離した味細胞を用いて実験される (Fig. 2)。しかし:

- (a) 単離細胞では口腔側膜のみをターゲットに味刺激できないので生理的味応答の解析が不可能である
- (b) 味覚情報の統合に関わる味蕾内における味細胞間相互作用は解析不可能である

など、単離細胞での実験には致命的な制限が存在する。特に細胞外液の主要陽イオンでもあるナトリウムイオンの味である塩味については、口腔側膜 (受容を行う膜) と血管側膜 (情報処理を行う膜) でナトリウムイオンの役割が異なるので単離細胞での塩味応答解析はできない。また、味蕾組織中の味細胞への電気生理学的アプローチも散見されるが、この方法では散在する特定細胞種を標的に実験することが難しく、味蕾内部にある細胞には物理的にアプローチできないこと等が実験の効率上大きな障害となり、味蕾中で数の少ない塩味細胞の解析で特に問題となる。

本研究では、1. 1 舌上皮内で正常形態を保つ味蕾中の味細胞からの味刺激応答記録の実験技術の構築と、1. 2 この技術を応用した味蕾での塩味の受容・処理・統合機構の体系的解析を目指した。

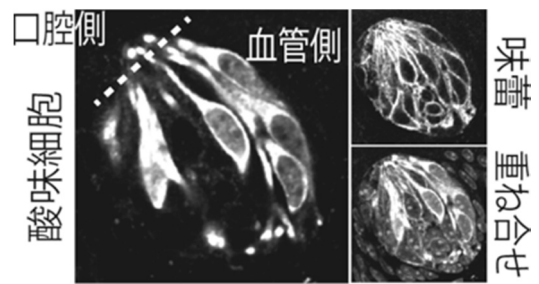


Fig. 1. Immunofluorescence image of mouse taste bud. Dashed line is the boundary between apical and basolateral sides

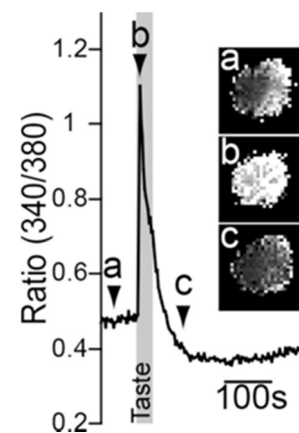


Fig. 2. Fura-2 Ca^{2+} imaging on a freshly-isolated taste cell. Note that the cell responds to taste stimulus with an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$

1. 1 蛍光イオンインジケータによる味細胞応答記録法の構築

これまでの単離細胞を用いた実験の欠点を克服する実験技術を構築する。ポイントは、正常組織形態を維持したまま生理条件で刺激・記録可能であること、多数の細胞の中から応答細胞を確実に同定できること、である。それには、味蕾中の細胞腫特異的に蛍光イオン指示薬を導入して、共焦点レーザー顕微鏡で記録する方法が最善であるが、AM 体色素導入以外の方法の開発が不可欠であり、本研究ではこの実現を目指した。そのために、近年開発された遺伝子工学的蛍光カルシウムイオンセンサータンパク質 GCaMP3 を塩味細胞特異的に安定発現するマウスを作製する方法を試みた。この方法は、Calcium Green や Oregon Green BAPTA-AM など通常の蛍光指示薬と同程度のシグナル-to-ノイズ比を持ちながら、長時間記録にも

耐えること、細胞種特異的な色素導入が可能であること、が利点である。

1. 2 塩味の受容・処理・統合機構の体系的解析

これまで塩味受容の細胞内現象についての研究はなく、1. 1 で開発した方法を応用して以下 A-D の解明を目指した (Fig. 3)。

- A) ENaC 発現細胞の塩味刺激応答特性の解明
- B) 塩味による細胞興奮の分子基盤の解明: 塩味刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 応答のカルシウムイオンのソースや応答の分子基盤の解明。
- C) ENaC による Na^+ 輸送-味細胞興奮連関の解析: 恒常活性をもつ静的な ENaC を介する口腔 $[Na^+]$ -細胞興奮連関および塩味の順応機構の解明。
- D) 塩味情報の統合機構の解明: 塩味細胞の興奮が周囲の他の味を受容する細胞の応答性に影響を与えるか、あるいは逆に他の味の受容が塩味細胞の応答性に影響を与えるかを解析し、複合味における塩味の役割の解析を行う。

2. 研究方法

本年度中は、1. 研究目的で述べた1. 1を実施することができた。つまり、塩味細胞特異的に GCaMP3 を安定発現する遺伝子改変マウスの作製を行い、このマウスの味蕾における GCaMP3 の発現細胞腫の確認を行った。この実験における研究方法を以下に述べる。

2. 1 ENaCa (SCNN1A)発現味細胞に蛍光カルシウムイオンセンサー蛋白質 GCaMP3 を発現する遺伝子改変マウスの作出

ENaCa プロモータ制御下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニック (Tg) マウス (ENaCa-Cre Tg マウス)

と、近年開発された Cre リコンビナーゼ活性によってコンディショナルに GCaMP3 を発現する Ai38 マウス⁴ を交配し、ENaCa 発現味細胞特異的に GCaMP3 を発現するマウス (ENaCa-GCaMP3 マウス) の作出を行った (Fig. 4)。

ENaCa-Cre Tg マウスは Columbia 大学 Charles Zuker 教授³ の研究室にて作製された BAC (bacterial artificial chromosome) Tg マウスであり、本研究の一環として譲り受けた。簡潔に述べると、マウスの sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha (Scnn1a; ENaCa と呼ばれる) 遺伝子座をふくむゲノム DNA の BAC クローン (RP2396C20) を back-bone とし、その Scnn1a 遺伝子のストップコドンのさらに 3' 側に、脳心筋炎ウイルス (ECMV) IRES (internal ribosomal entry site; mRNA 内部のリボソーム進入サイト) 配列とその下流に P1-Phage 由来 Cre リコン

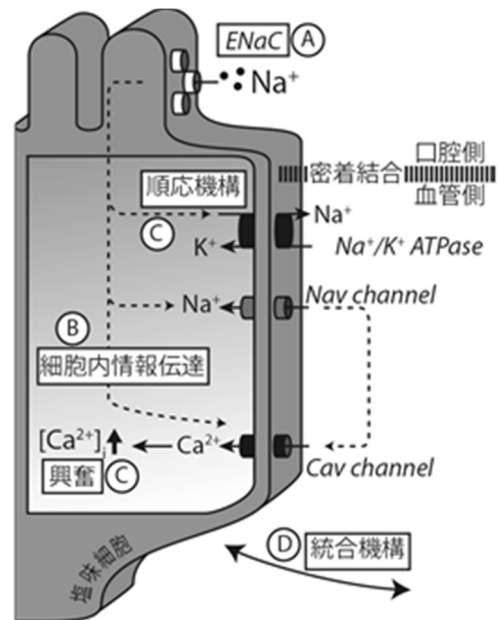


Fig. 3. Hypothetical model of salt taste transduction

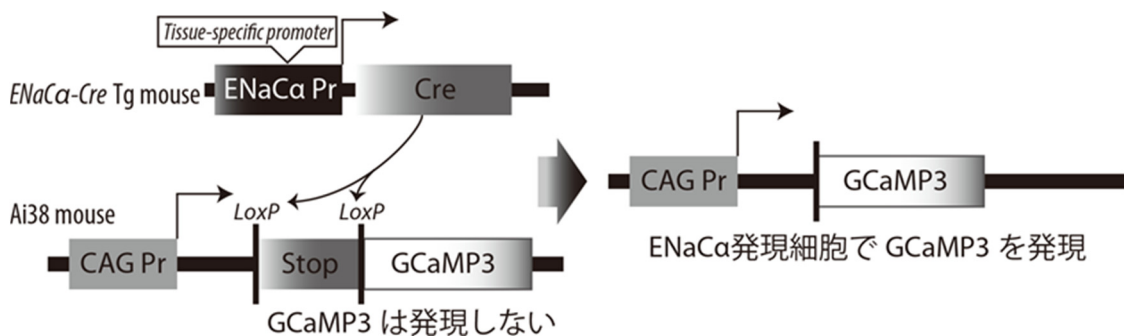


Fig. 4. Scheme of ENaCa-GCaMP3 mouse generation

ビナーゼ cDNA、そしてウシ成長ホルモン遺伝子由来ポリ A 付加配列を挿入したトランスジーンを用いて作製された。Columbia 大学の実験動物施設の微生物検査基準が京都府立医科大学の実験動物施設の SPF 基準に満たず、第三者機関(オリエンタルバイオサービス株式会社)において人工授精による SPF 化を行ったのちに京都府立医科大学の実験動物施設へと搬入した。

Ai38 マウスは Cre リコンビナーゼ活性によってコンディショナルに GCaMP3 を発現する遺伝子カセットを Rosa26 遺伝子座にノックインしたマウス (Fig. 5) であり、本研究の一環として Jackson laboratory より購入した (JAX no.014538)。ノックインに用いられた Rosa26-CAG-LSL-GCaMP3-WPRE ターゲティングベクターについて簡潔に述べる。マウス Rosa26 遺伝子座の第一エクソン下流 (第一イントロン) の 1.1kb のゲノム DNA を 5'側断片とし、その直下の第二エクソン直上までの 4.3kb ゲノム DNA を 3'側断片として置換型ベクターが作製された。インサートとしては CAG プロモーター (cytomegalovirus enhancer: サイトメガロウイルス由来, β -actin promoter: chicken 由来, β -globin 3'非翻訳領域: rabbit 由来) の下流に FRT sequence (short flippase recognition target; 出芽酵母 [*Saccharomyces cerevisiae*] 由来) 配列を 1 コピー置き、その下流に LoxP 配列 (P1 phage 由来) で挟んだ STOP コドン (3 フレームの人工的ストップコドン配列と 3 個の polyA signal をもつ) と、それに引き続き GCaMP3 (ニワトリ由来ミオシン軽鎖キナーゼ M13 断片, オワンクラゲ由来 EGFP, ラット由来カルモジュリン, M13 の融合遺伝子 (Nature

Methods 6:875, 2009)。ただし、EGFP には M153K および T203V、カルモジュリンには N60D の変異が導入されている。)、その下流に転写産物安定化のための WPRE (ウッドチャック肝炎ウイルス由来転写後調節 DNA エlement) と polyadenylation site (pA: SV40 由来)、さらに attB と attP sequence ではさんだ薬剤選択のための PGK-Neomycin cassette (Phosphoglycerate kinase I [PGK]) promoter [human 由来] の下流に FRT sequence [short flippase recognition target; 出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来] を 1 コピー置いて neomycin resistance gene [neomycin phosphotransferase II (*neoII*) gene, E-coli 由来] と bovine growth hormone polyadenylation site [bpA; bovine 由来] が挿入されている。

2.2 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色に用いる固定舌組織切片の作製に際し、5 週齢以上のマウスをペントバルビタールの過剰投与により麻酔し、氷上で冷やしたリン酸緩衝液 (PBS)、続いて 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS で経心臓灌流を行った。有郭乳頭を含む舌上皮組織を実体顕微鏡下に採取し、4%PFA-PBS 中で後固定を行った (4°C で一晩)。続いてスクロース置換 (30%スクロース-PBS) を行った後、OCT コンパウンド (Sakura Finetech) に包埋しクライオスタット (CM1900, Leica Microsystems) を用いて切片を作製した (8 μ m 厚)。組織切片は組織接着コーティングを施したスライドガラス (Matsunami) に貼り付け、免疫染色に用いるまで -80°C で保存した。

蛍光免疫染色ではまず、組織切片を貼り付けたスライド

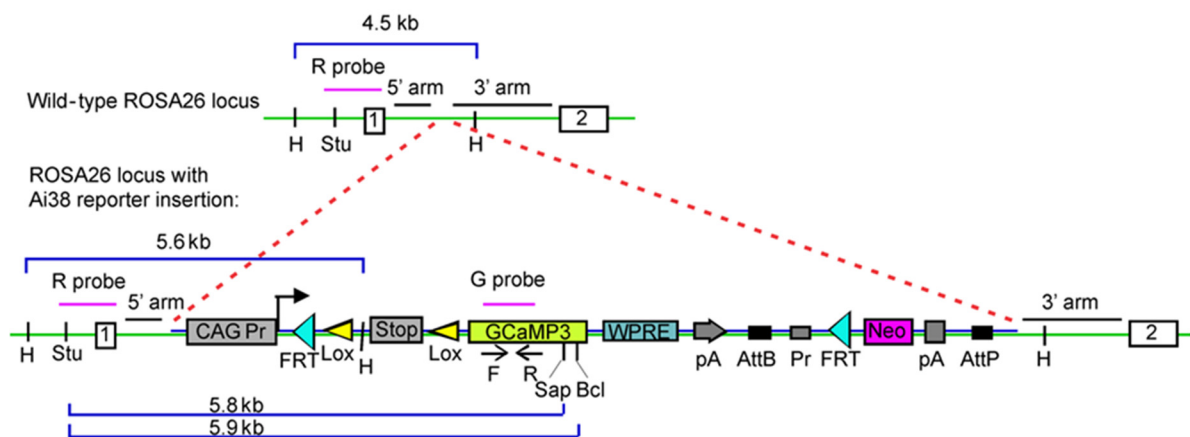


Fig. 5. Scheme of *Rosa26* locus of *Ai38* mouse

ガラスを PBS でリンスし、あらかじめ 80°C に温めておいた抗原賦活液 (S1700, Dako) 中で 20 分間インキュベートした。続いて PBS で組織切片を洗浄後 (10 分/3 回)、5% normal goat serum (NGS)-PBS で室温で 1 時間かけてブロッキングを行った。1 次抗体とのインキュベートは同じく 5% NGS-PBS 中で、4°C で一晩かけて行った。使用した 1 次抗体はマウス抗 GFP 抗体 (Invitrogen, 1:2000) およびウサギ抗 AADC 抗体 (Gene Tes, 1:500) である。翌日、スライドグラスを PBS で洗浄後 (10 分/3 回)、2 次抗体とのインキュベートを室温で 1 時間行った。使用した 2 次抗体は goat anti-mouse IgG Alexa 488 (Invitrogen, 1:500) および goat anti-rabbit IgG Alexa 568 (Invitrogen, 1:500) である。最後に、スライドグラスを PBS で洗浄後 (10 分/3 回)、VectaShield with DAPI (H-1500, Vector Laboratories) を用いてマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

3. 研究結果

3. 1 ENaCa (SCNN1A) 発現味細胞に蛍光カルシウムイオンセンサー蛋白質 GCaMP3 を発現する遺伝子改変マウスの作出

ENaCa-GCaMP3 マウスの作出は、*ENaCa-Cre Tg* マウス (ヘテロ接合体) と Ai38 マウス (ホモ接合体) の交配によって行った。*ENaCa-Cre Tg* マウスはヘテロ接合体として維持し交配に用いたが、*Rosa26* 遺伝子座への Cre リポーター遺伝子カセットのノックインマウスである Ai38 マウスについては遺伝子型判定を簡便にするために、*Rosa26* 遺伝子座の変異 (Ai38) アリルのホモ接合体の作製をまず行

った。Jackson Laboratory より入手した Ai38 マウスは 2 匹のオスのヘテロ接合体であったので、まずメス B6 マウスと交配してヘテロ接合体マウスのコロニーを拡大した。その後、第 2 世代のヘテロ接合体のオスとメスの交配でホモ接合体の Ai38 マウスを作出した (Fig. 6)。作出したホモ接合体の Ai38 マウスに外見上の目立った異常はなく、生殖機能も正常であったため、ホモ接合体としてコロニーを維持できることが分かった。

続いて、*ENaCa-Cre Tg* マウス (ヘテロ接合体) と Ai38 マウス (ホモ接合体) の交配を行い、*ENaCa-Cre* と Ai38 アリルの両方を持つ *ENaCa-GCaMP3* マウスの作出を行った。*ENaCa-Cre Tg* マウス (ヘテロ接合体) のメスと Ai38 マウス (ホモ接合体) のオスとの交配で生まれた仔の遺伝子型判定を行い、*ENaCa-GCaMP3* マウスを選別した (Fig. 7)。

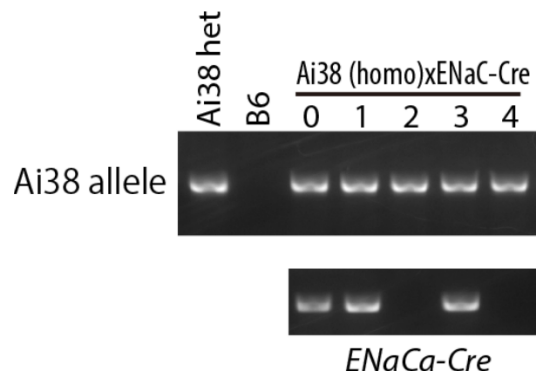


Fig. 7. Selection of *ENaCa-GCaMP3* mice (Ai38/Ai38 x *ENaCa-Cre* heterozygote). Mice #0, 1, and 3 are *ENaCa-GCaMP3* mice (Ai38/+;*ENaCa-Cre*) and mice #2 and 4 are just Ai38 heterozygotes without *ENaCa-Cre* transgene (Ai38/+).

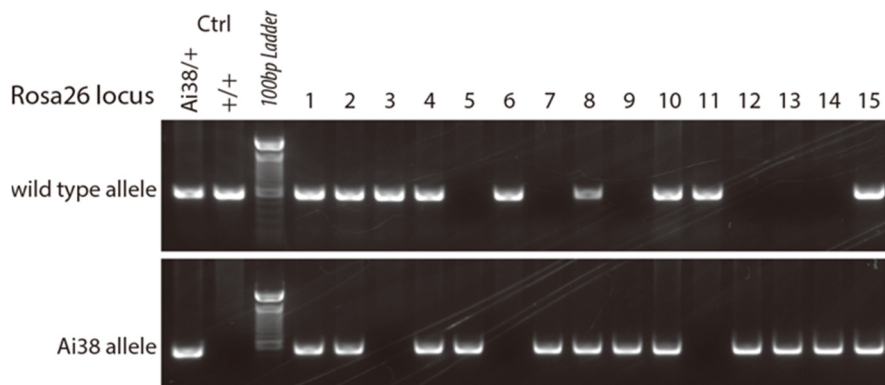


Fig. 6. Genotyping result of Ai38 mice (Ai38/+ x Ai38/+). Mice #1, 2, 4, 8, 10, and 15 are homozygotes (Ai38/Ai38) and mice #5, 7, 9, 12, 13, and 14 are heterozygotes (Ai38/+), while #3, 6, and 11 are wild-type.

生まれた *ENaCa-GCaMP3* マウスにも外見上の目立った異常もなく、発達にも異常が無いようである。

3.2 *ENaCa-GCaMP3* マウスの味蕾における GCaMP3 の発現細胞腫の同定

3.1 で作出した *ENaCa-GCaMP3* マウスおよびネガティブコントロールとして *ENaCa-Cre Tg* マウス(ヘテロ接合体)から固定味蕾組織切片を作製し、蛍光免疫染色によって GCaMP3 の発現を確認した。GCaMP3 の染色には抗 GFP 抗体を用いた。結果を Fig. 8 に示す。想定(Fig. 4)通り、GCaMP3 の発現が *ENaCa-GCaMP3* マウスの味蕾においてのみ観察され、*ENaCa-Cre Tg* マウスの味蕾には観察されなかった。さらに、GCaMP3 の発現は味蕾細胞に一律に見られるのではなく、一部の細胞にのみ観察されることも同時に分かる。

そこで次に、2重蛍光免疫染色によって GCaMP3 の発現細胞腫を検討した。GCaMP3 の染色には抗 GFP 抗体を、味細胞種特異的のマーカータンパク質の染色には抗 AADC 抗体を用いた。結果を Fig. 9 に示す。ここでは III 型味蕾細胞のマーカーである AADC を用いたが、AADC 発現細胞のほとんどに GCaMP3 の発現が確認されるのに加えて、少数の AADC 非発現細胞にも GCaMP3 が発現されていることもわかる。このように、III 型細胞とその他少数の細胞に GCaMP3 が発現していると結論づけられるが、これは先行報告³における *ENaCa* の発現パターンと同じであり、本研究で作出した *ENaCa-GCaMP3* マウスは正確に *ENaCa* 発現細胞種に GCaMP3 を安定させることに成功していると結論づけた。

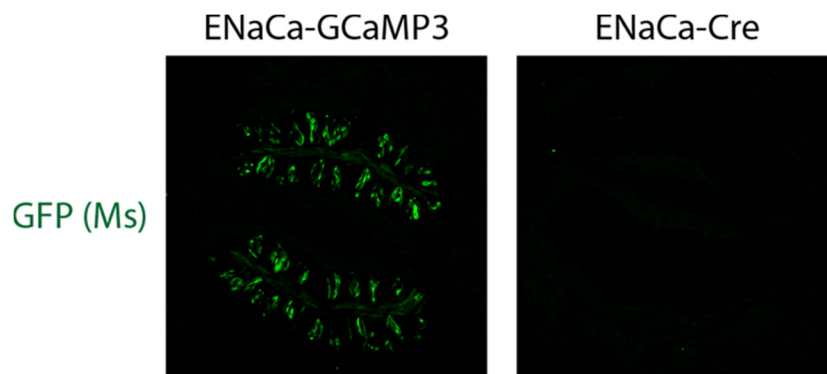


Fig. 8. Immunofluorescence staining of GCaMP3 in circumvallate papilli of *ENaCa-GCaMP3* mouse and *ENaCa-Cre Tg* mouse. Note that GCaMP3 is expressed in a subset of taste cells only in *ENaCa-GCaMP3* mouse.

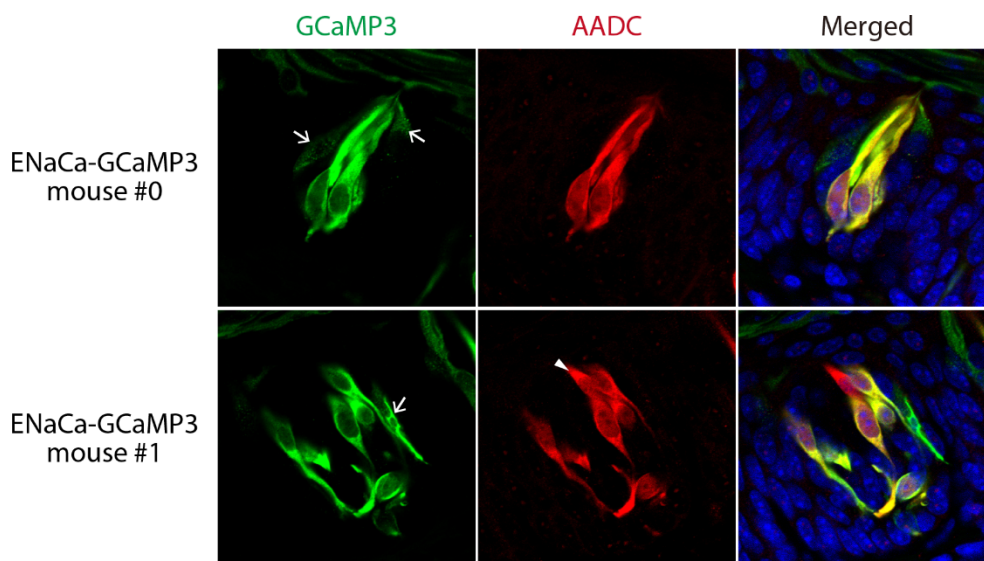


Fig. 9. Immunofluorescence staining of GCaMP3 and AADC in circumvallate papilli of *ENaCa-GCaMP3* mice.

4. 考 察

本研究では、味蕾における塩味受容の生理現象の包括的理解の為の新しい技術的基盤の構築として *ENaCa-GCaMP3* マウスの作出を行った。3. 研究結果で述べた通り、作出されたマウスは正確に *ENaCa* 発現味細胞に *GCaMP3* を発現している。マウスの入手・SPF 化・交配に時間がかかり、本年度中に目標の塩味の受容・処理・統合機構の解析にまで至らなかったが、本研究で作出されたマウスが今後味蕾における塩味研究の強力なツールとして活躍すると強く期待される。

5. 今後の課題

本研究で得られた *ENaCa-GCaMP3* マウスを用いて本年度中に達成できなかった塩味の受容・処理・統合機構

の解析を行うことが今後の課題である。技術的には、実際にライブイメージングで塩味刺激によって *GCaMP3* の蛍光輝度の変化を捉えることができるのか、感度不足の場合には最新の *GCaMP6* の使用も検討しながら、今後も高感度に味蕾細胞の生理的塩味応答記録を実現していく工夫を続けていくことが必要だと思われる。

6. 文 献

1. Nature **357**:563,1992
2. Nature **444**:288,2006
3. Nature **464**:297, 2010
4. J Neurosci **32**:3131, 2012

Salt-Sensing Mechanism of ENaC-Expressing Taste Bud Cells

Akiyuki Taruno

Department of Molecular Cell Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

Na⁺ is a major cation in the extracellular fluid of multicellular organisms and is essential for maintaining the body fluid volume. Animals have the ability to sense Na⁺ in their food and drinks to regulate the amount of salt intake. Especially in developed countries full understanding of the salt taste mechanism is demanded for prevention of hypertension. Although epithelial sodium channel (ENaC) has been identified as the key player of Na⁺-selective amiloride-sensitive salt taste reception from recent analysis of ENaC α knockout mice, the mechanism of salt taste transduction in ENaC-expressing taste bud cells is not known at all. In the present study, I aimed to establish a new technical basis to record responses to taste stimuli of taste cells in intact taste buds embedded in the lingual epithelium and, with this technique, to study the salt-sensing mechanism of ENaC-expressing taste cells. As a new research tool for recording taste cell responses, I generated mice that stably express a genetically-encoded calcium indicator, GCaMP3, selectively in *ENaC α* -expressing taste cells (*ENaC α -GCaMP3* mice) by crossing transgenic mice expressing Cre recombinase under the control of *ENaC α* promoter with Ai38 Cre reporter mice conditionally expressing GCaMP3. Generated *ENaC α -GCaMP3* mice displayed no abnormality in their appearance and development. By immunofluorescent staining, I confirmed that *ENaC α -GCaMP3* mice express GCaMP3 selectively in *ENaC α* -expressing taste cells. Those mice, therefore, will be a useful tool to study peripheral salt taste transduction mechanism in taste buds.