

味蕾における塩味受容の細胞基盤の解明

加塩 麻紀子

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 我が国の高血圧症患者数は900万人に登り、成人の死因上位を占める脳心血管障害の発症と進展に深く関与している。食塩の摂取過多が高血圧(塩分感受性高血圧)の牽引であることがよく知られるが、これは我々が食塩を「おいしい」と感じることに起因する。実際、日本人の平均塩分摂取量は日本高血圧学会の減塩目標値を大きく上回る。従って、食塩摂取に深く関わる舌で塩味を受容するメカニズムの全容解明には予防医学的観点からも社会的希求がある。しかし、舌における塩味受容の細胞基盤・受容機構・神経伝達機構はその大部分が未解明である。

塩味は少なくとも2種類に分類できる。閾値が低く Na^+ 選択性が高いアミロライド感受性(AS)塩味、および、閾値が高くイオン非選択性のアミロライド非感受性(AI)塩味である。前者のAS塩味受容は上皮型 Na^+ チャネル(ENaC)が受容分子であることが知られているが、その細胞基盤や神経伝達機構は不明である。一方で、後者のAI塩味受容は苦味・酸味細胞を介することが知られているが受容体は不明で神経伝達機構についても全容は不明である。本研究では、塩味の(1)神経伝達分子機構および(2)細胞基盤の解明を目指した。

(1)について、Calcium Homeostasis Modulator 1(CALHM1)が味蕾で甘味・苦味・旨味・AI塩味受容を担うII型味細胞に選択的に発現し、プリン作動性味覚神経伝達を担うATP放出チャネルの必要分子である事が報告されていたが、未知のCALHM1チャネル機能調節因子の存在が示唆されていた。我々は、CALHM1のパラログであるCALHM3がCALHM1と共にヘテロメリックチャネルCALHM1/3チャネルを構成することを明らかにし、CALHM1/3チャネル電流とII型味細胞におけるATP放出チャネル電流が電気生理学的・薬理的に同じ性質を持つこと、CALHM3がII型味細胞特異的に発現していること、さらにはCALHM3のノックアウトマウスにおいて甘味・苦味・旨味・AI塩味受容が減弱することを明らかにした。これらの結果より、CALHM1/3チャネルがAI塩味の神経伝達の分子機構であると結論付けた。

(2)について、AS塩味は茸状乳頭味蕾において、甘味・苦味・旨味・酸味を受容する細胞とは独立した細胞集団によって受容されるが、その詳細は不明である。今回我々は、茸状乳頭味蕾においてENaCがCALHM1/3チャネルと共発現していることを明らかにした。このことはAS塩味受容がCALHM1/3発現細胞集団が担っていることを示唆しており、さらにはCALHM1/3チャネルが神経伝達の分子機構であることを強く示唆している。

1. 研究目的

我が国の高血圧症患者数は900万人に登り、成人の死因上位を占める脳心血管障害の発症と進展に深く関与している。また毎年、高血圧性疾患治療が国民医療費の約5%、1.9兆円を占める。食塩(NaCl)の摂取過多が高血圧(塩分感受性高血圧)の牽引であることがよく知られるが、これは我々が食塩を「おいしい」と感じることに起因する。実際、日本人の平均塩分摂取量(10.7 g)は日本高血圧

学会の減塩目標値(6 g)を大きく上回る。従って、食塩摂取に深く関わる舌で塩味を受容するメカニズムの全容解明には予防医学的観点からも社会的希求がある。しかし、味細胞における塩味受容・伝達の分子機構は未解明のままである。しかし、舌における塩味受容の細胞基盤・受容機構・神経伝達機構はその大部分が未解明である。これまでの研究から、塩味は少なくとも2種類に分類することができる。閾値が低く Na^+ 選択性が高いアミロライド感受性

(AS) 塩味, および, 閾値が高くイオン非選択性のアミロライド非感受性(AI)塩味である。AS 塩味受容はアミロライド感受性上皮型 Na^+ チャネル(ENaC)が受容分子であることが知られているが(Chandrashekar *et al.* 2010), その細胞基盤や神経伝達様式は不明である。一方で, AI 塩味受容は苦味・酸味細胞を介することが知られている(Oka *et al.* 2013)が塩受容体は不明で神経伝達機構についても全容は不明である。本研究では, 塩味の(1)神経伝達分子機構および(2)細胞基盤の解明を目指した。

(1)について, Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1)が味蕾で甘味・苦味・旨味・AI 塩味受容を担う II 型味細胞に選択的に発現し, ノックアウトすることにより甘味・苦味・旨味・AI 塩味受容が消失することから, プリン作動性味覚神経伝達を担う ATP 放出チャネルの必要分子である事が報告されていた(Ma *et al.* 2016; Taruno *et al.* 2013a; Taruno *et al.* 2013b)。しかしながら, 培養細胞に発現させた CALHM1 チャネルと味細胞から記録される ATP 放出チャネル電流の間には電気生理学的および薬理的な性質に齟齬があり, 未知の CALHM1 チャネル機能調節因子の存在が示唆されていた。例えば, 活性化速度が CALHM1 チャネル($\tau \sim 3$ s)よりも味細胞における ATP チャネル電流($\tau \sim 10$ ms)の方が圧倒的に早く(Ma *et al.* 2012; Romanov *et al.* 2008), carbenoxone は味細胞 ATP チャネルを阻害するが CALHM1 チャネルは阻害しない(Huang and Roper 2010; Huang *et al.* 2007; Ma *et al.* 2012; Murata *et al.* 2010)。このように, AI 塩味の神経伝達の分子機構の全容は解明されておらず, 本研究では味細胞 ATP チャネルを構成する CALHM1 のカウンターパート分子の発見を目指した。

(2)について, AS 塩味は茸状乳頭味蕾において, 甘味・苦味・旨味・酸味を受容する細胞とは独立した細胞集団によって ENaC を Na^+ センサーとして受容されるが, AS 塩味細胞についての詳細は不明であった(Oka *et al.* 2013)。特に, その神経伝達機構は明らかでなかった。本研究で我々は, 茸状乳頭味蕾の AS 塩味細胞に CALHM1/3 チャネルが発現しているかどうかを, 免疫組織学的手法を用いて検討した。さらに, 細胞種特異的な ENaC α サブユニットのコンディショナルノックアウトマウスの作成を行い, AS 塩味受容の細胞基盤・神経伝達様式の解明を目指した。

以上, (1) (2)の研究項目の成果についてここに報告する。

2. 研究方法

2.1 細胞培養

Neuro2a 細胞は ATCC[®]より入手し, 10% FBS (Gibco) および 1x antibiotic/antimycotic (Gibco) を添加した MEM 培地 (Gibco) を用い, 37°C の 5% CO_2 /95% O_2 インキュベーター内にて培養した。プラスミド DNA の導入には Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用い, 手順は使用説明書に従った。プラスミド DNA を導入した細胞で実験を行う場合は全て, 導入後 24 時間で実験を実施した。

2.2 パッチクランプ法

細胞外液: 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 10 Glucose, pH 7.4 (in mM); 細胞内液: 140 CsCl, 2 MgCl₂, 11 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4 (in mM)。パッチクランプシステムは Axopatch 1D-2/ Digidata 1321A/ pCLAMP8 (Molecular Devices) を用い, 電流は 500 Hz の 4-pole Bessel filter をかけ, 2 kHz でサンプリングした。

2.3 組織・細胞染色

細胞を 4% paraformaldehyde in PBS で固定し(室温, 20 min), 0.25% Triton X-100 in PBS で透過処理(室温, 15 min), 5% Normal Goat Serum in PBS でブロッキング(室温, 1 hr)を行った後, 1次抗体(抗 GFP 抗体および抗 FLAG 抗体)でインキュベートし(4°C, 一晚), 続いて蛍光 2次抗体(Alexa 488 および Alexa 546 コンジュゲート)と反応させた。撮影は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を用いて行った。

味細胞組織染色(免疫染色および in situ hybridization) は先行研究の通り行った (Taruno *et al.* 2013b)。抗 CALHM1 抗体は guinea pig を用いて作製し, アフィニティー精製したものを用いた。

2.4 共免疫沈降法

細胞を 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1x Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) を含む PBS で溶解し, 共免疫沈降法を標準的な方法を用いて行った。

2.5 リックテスト

味覚嗜好試験(リックテスト)については *Calhm3*^{-/-}マウスと野生型マウスを用いて先行研究の通りおこなった (Taruno *et al.* 2013b)。

3. 研究結果

3. 1 味細胞 ATP チャンネルの同定

3. 1. 1 CALHM1 のカウンターパート分子 CALHM3 の発見

CALHM 遺伝子ファミリーは6遺伝子で構成される (Fig. 1)。我々は生化学的手法および電気生理学的手法を用いて CALHM1 と相互作用し機能修飾するパラログを探索した。CALHM1 以外のパラログの中に単独でイオンチャンネル機能を持つものはなかった。まず、我々は5つのパラログの中から、CALHM3 が CALHM1 と最も強く相互作用することを明らかにした。Fig. 2 に示すように、N2a 細胞に発現させると CALHM1 と CALHM3 は形質膜状で共局在を示した。さらに、共免疫沈降法によって CALHM1 と CALHM3 が相互作用を示すことを明らかにした (Fig. 3)。イオンチャンネル機能に関しても、CALHM3 単独では膜コンダクタンスを発生させなかったが CALHM1 と共発現させることで CALHM1 電流が増大することを見出した (Fig. 4)。これらの結果は CALHM ファミリーの中で CALHM1 と CALHM3 が複合体を形成してオリゴメリックイオンチャンネル CALHM1/3 として機能しうることを示唆している。

3. 1. 2 CALHM1/3 チャンネルと味細胞 ATP チャンネルの電気生理学的性質

先行研究で CALHM1 チャンネルと味細胞 ATP チャンネルが共に電位依存性を示すことが報告されている。しかし、

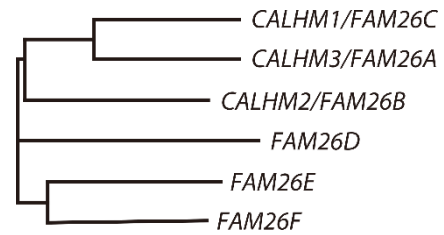


Figure. 1. CALHM gene family

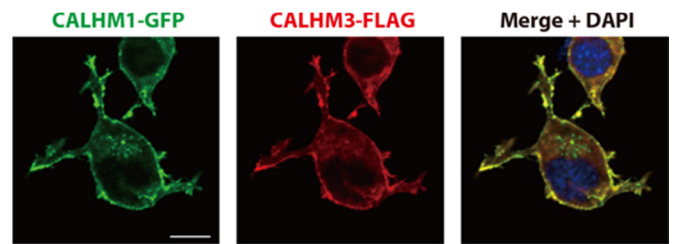


Figure. 2. Co-localization of CALHM1 and CALHM3 in N2a cells

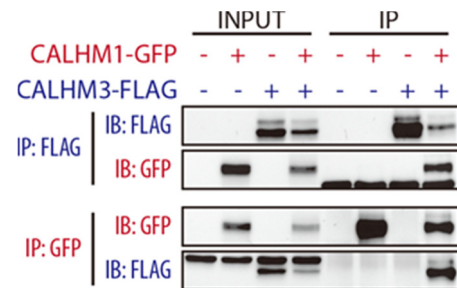


Figure. 3. Protein-protein interaction of CALHM1 and CALHM3 in N2a cells

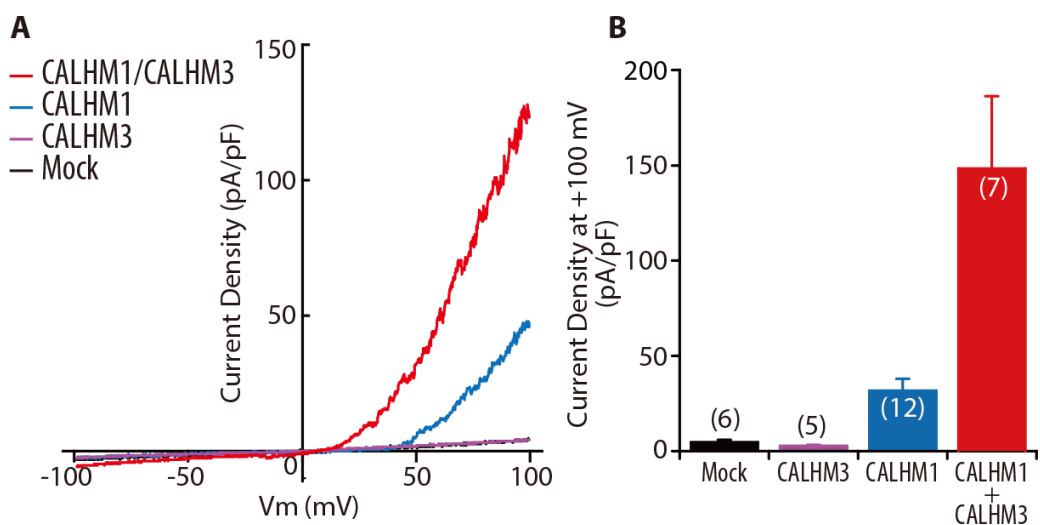


Figure. 4. CALHM3 augments CALHM1 current in N2a cells

この二つのチャンネルの間には電位依存性や活性化速度において大きな違いがあった。CALHM1 チャンネルの $V_{1/2}$ は+71.7 mV で活性化速度は 3.5 s at +80 mV であるのに対して、味細胞 ATP チャンネルの $V_{1/2}$ は+31 mV で活性化速度は~10 ms at +80 mV である。このように CALHM1 単独では、活性化するのに味細胞 ATP チャンネルに比較してより強い脱分極を必要とし、さらにその活性化速度は 350 倍も遅いことが分かる。我々はパッチクランプ法を用いて recombinant CALHM1/3 チャンネル電流の性質を解析した。すると、CALHM1/3 チャンネルの $V_{1/2}$ は+23.2 mV で活性化速度が 9.58 ms at +80 mV であった (Fig. 5)。このように、CALHM1/3 チャンネルと味細胞 ATP チャンネルのゲーティングの性質はよく似ていることが分かる。

3. 1. 3 CALHM1/3 チャンネルと味細胞 ATP チャンネルの薬理的性質

また、CALHM1 チャンネルと味細胞 ATP チャンネルは carbenoxolone (CBX) に対する感受性も異なっている。CBX に対して CALHM1 は非感受性であるが、味細胞

ATP チャンネルは感受性がある (Huang and Roper 2010; Huang *et al.* 2007; Ma *et al.* 2012; Murata *et al.* 2010)。そこで、我々は CALHM1/3 チャンネルの CBX 感受性を、パッチクランプ法を用いてテストした。CALHM1/3 チャンネル電流は 10 μ M CBX によって 90% 以上阻害された (阻害時定数 $\sim 83.4 \pm 7.4$ s)。このように、CALHM1/3 チャンネルと味細胞 ATP チャンネルは電気生理学的性質のみならず薬理的性質も類似している。

3. 1. 4 味蕾における CALHM3 の発現パターン

CALHM1 は味蕾において TRPM5 陽性の II 型味細胞選択的に発現していることが知られている。そこで、CALHM3 の味蕾における発現パターンを *in situ* hybridization 法を用いて調べた。Fig. 6 に示す通り、CALHM3 発現細胞と TRPM5 発現細胞が完全に一致することが分かる。このことは、CALHM1 と CALHM3 が味蕾において II 型味細胞選択的に共発現していることを示している。

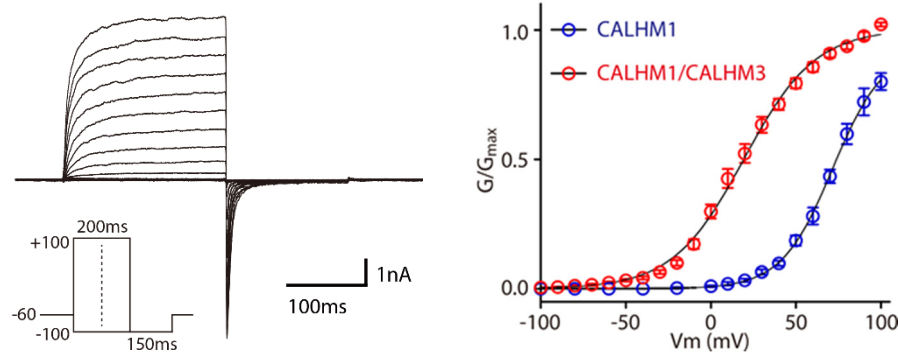


Figure 5. Gating properties of CALHM1/CALHM3 is identical to those of taste cell ATP channel

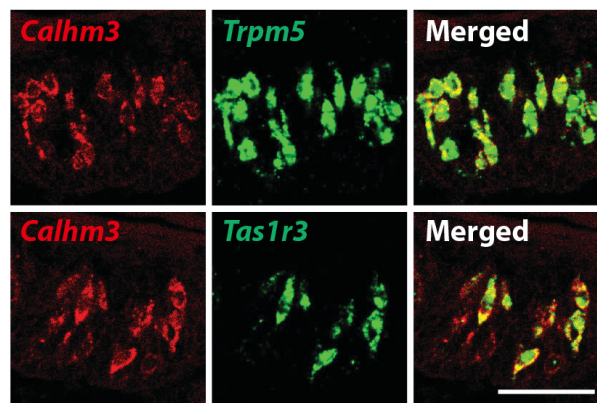


Figure 6. Selective CALHM3 expression in type II taste cells

3. 1. 5 味覚受容における CALHM3 の役割

最後に、CALHM3 の味覚受容における役割を行動実験(リックテスト)によって調べた。Fig. 7 に示す通り、CALHM3 ノックアウトマウスにおいて甘味(サッカリン)、旨味(MSG)、苦味(denatonium)、AI 塩味(高濃度 NaCl に対する応答に含まれる)に対する応答が野生型に比べて優位に減弱していることが分かる。一方で、III 型細胞によって受容される酸味応答は野生型と CALHM3 ノックアウトマウスで違いは見られなかった。この味覚表現型は CALHM1 ノックアウトマウスでみられたものと酷似している。

本研究で我々は、新規イオンチャネル CALHM1/3 を同定し、CALHM1/3 ヘテロオリゴマーが II 型味細胞 ATP チャネルの分子実態であることを明らかにした。本研究結果は AI 塩味の神経伝達分子機構を明らかにしたものである。

3. 2 AS 塩味細胞の characterization

3. 2. 1 AS 塩味細胞における CALHM チャネル発現

ENaC を Na⁺センサーとする AS 塩味は茸状乳頭味蕾において、甘味・苦味・旨味・酸味を受容する細胞とは独立した細胞集団によって受容されるが、AS 塩味細胞の特徴については全く未解明である。先行研究において CALHM1 ノックアウトマウスで AS 塩味受容も消失していたことから(Tordoff *et al.* 2014)、ENaC のポア形成サブユニットである α サブユニット発現細胞における CALHM1 の発現の有無を免疫組織染色により解析した。

まず抗 CALHM1 抗体を作製し、免疫組織染色における抗体の特異性の確認を行った。抗 CALHM1 抗体による免疫染色により葉状乳頭において味細胞特異的に点状の小さなシグナルが多数見られ、CALHM1 ノックアウト組

織においてそのシグナルは消失していた(Fig. 8)。このことから、この抗体は CALHM1 タンパク質特異的に反応していることが確認された。特筆すべきは、CALHM1 は味細胞において点状に局在していることである。CALHM チャネルが味細胞からの神経伝達を担うことを考えると、P2X2/3R 陽性の求心性神経終末との接触部位との関係性を今後注意深く解析する必要があると思われる。

次に、この抗 CALHM1 抗体と ENaC α サブユニット発現

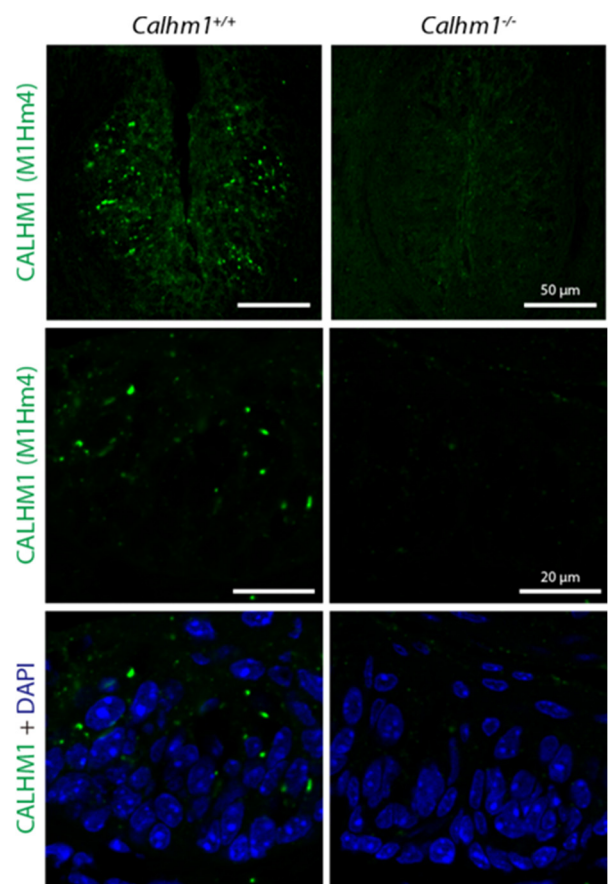


Figure 8. Validation of guinea pig anti-CALHM1 antibody

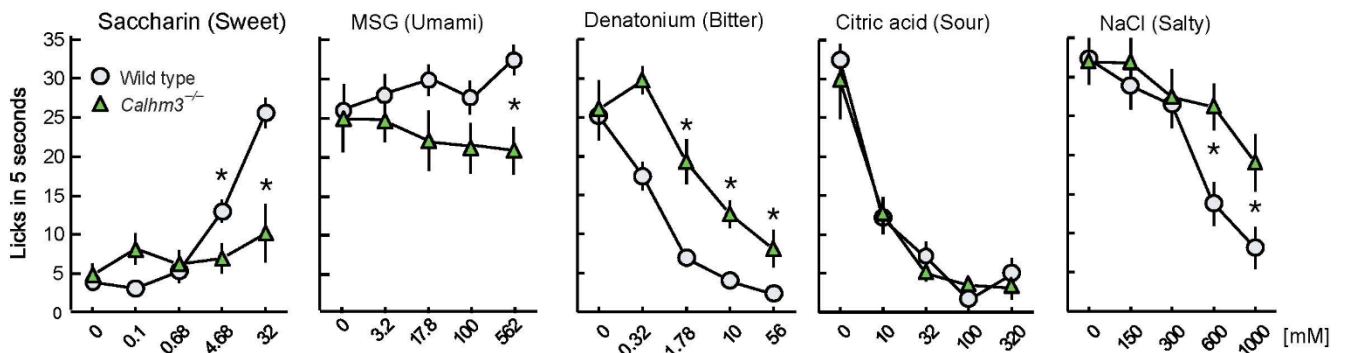


Figure 7. Effects of Calhm3 knockout on taste behavior of mice

細胞に GCaMP3 が発現する ENaC α -Cre;Rosa^{26LSL-GCaMP3} マウスを用いて ENaC α 発現細胞における CALHM1 発現を解析した。CALHM1 を Alexa488 で、ENaC α 発現細胞を、抗 GFP 抗体を用いて Alexa546 で染色した。Fig. 9 に示す通り、CALHM1 が ENaC α 発現細胞に CALHM1 が発現していることが確認できた。

3. 2. 2 結論

上記の結果は、AS 塩味細胞に CALHM チャンネルが発現していることを示している。別の研究でも示されているとおり、CALHM チャンネルは甘味・苦味・旨味・AI 塩味の神経伝達を担っていることがわかっている。本研究結果と先行研究結果 (Tordoff *et al.* 2014) を合わせると、AS 塩味の神経伝達も CALHM チャンネルが担っていることを強く示唆している。

4. 考察

本研究では、塩味を AI 塩味と AS 塩味に分類し、AI 塩味の神経伝達分子機構 CALHM1/3 チャンネルの新規同定、および AS 塩味受容細胞における CALHM1/3 チャンネル発現の検出に成功した。これらの研究結果により、塩味の神経伝達は AI・AS に関わりなく CALHM1/3 チャンネルがその分子機構であることが強く示唆される。

5. 今後の課題

今後、CALHM1 と AS 塩味の関係をより明確にするべく、CALHM1 発現細胞特異的に ENaC α サブユニットをノックアウトした CALHM1-Cre;ENaC α fl/fl マウスにおいて、AS 塩味受容を行動実験・鼓索神経応答記録などを持ちいて解析する予定である。これにより CALHM1 発現細胞に存在する ENaC の役割が明らかになり、AS 塩味の神経伝達

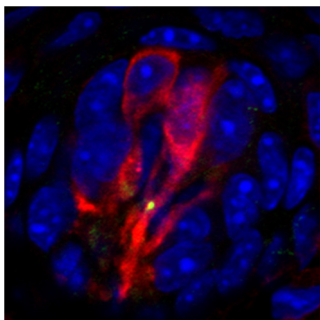


Figure. 9. CALHM1 expression in ENaC α -expressing fungiform taste cells

における CALHM1/3 チャンネルの役割が明確になると期待される。

6. 参考文献

- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. 2010. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464: 297-301.
- Huang YA, Roper SD. 2010. Intracellular Ca(2+) and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *J Physiol* 588: 2343-2350.
- Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD. 2007. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6436-6441.
- Ma Z, Siebert AP, Cheung KH, Lee RJ, Johnson B, Cohen AS, Vingtdeux V, Marambaud P, Foscett JK. 2012. Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca²⁺ regulation of neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E1963-1971.
- Ma Z, Tanis JE, Taruno A, Foscett JK. 2016. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels. *Pflugers Arch* 468: 395-403.
- Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y. 2010. Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol* 104: 896-901.
- Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJ, Zuker CS. 2013. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494: 472-475.
- Romanov RA, Rogachevskaja OA, Khokhlov AA, Kolesnikov SS. 2008. Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. *J Gen Physiol* 132: 731-744.
- Taruno A, Matsumoto I, Ma Z, Marambaud P, Foscett JK. 2013a. How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP

channel. *Bioessays* 35: 1111-1118.

Taruno A, Vingtdeux V, Ohmoto M, Ma Z, Dvoryanchikov G, Li A, Adrien L, Zhao H, Leung S, Abernethy M, Koppel J, Davies P, Civan MM, Chaudhari N, Matsumoto I, Hellekant G, Tordoff MG, Marambaud P, Foskett JK. 2013b. CALHM1 ion channel mediates

purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495: 223-226.

Tordoff MG, Ellis HT, Aleman TR, Downing A, Marambaud P, Foskett JK, Dana RM, McCaughey SA. 2014. Salty taste deficits in CALHM1 knockout mice. *Chem Senses* 39: 515-528.

Peripheral Coding and Neurotransmission of Salty Taste

Makiko Kashio

Department of Molecular Cell Physiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Summary

Although the pathogenesis of hypertension is multifactorial, high salt intake is the best known factor. Therefore, understanding the mechanism of tasting salt which controls our salt intake is crucial for prevention of hypertension. However, the peripheral mechanisms of salty taste sensing and neurotransmission in the taste bud are largely known. Salty taste sensation involves at least two pathways: amiloride-sensitive (AS) and amiloride-insensitive (AI) pathways. AS salty taste is known to utilize epithelial sodium channel (ENaC) as the Na⁺ sensor but its cellular basis and neurotransmission mechanisms are unknown. AI salty taste is known to recruit sour and bitter taste pathways but its salt sensor molecule and neurotransmission mechanisms remain to be identified. This study is aimed at elucidating (1) the neurotransmission mechanism of salty taste and (2) the cellular basis of AS salty taste. Regarding (1), type II taste bud cells sense sweet, bitter, umami, and AI salty tastes and transmit the taste information to the afferent nerves by releasing ATP as the neurotransmitter. Although Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the essential component of the ATP release channel in type II taste cells, involvement of unknown interacting partner(s) of CALHM1 has been suggested. We found that CALHM1 and CALHM3, a CALHM1 paralog, form a novel heterooligomeric ion channel, that biophysical and pharmacological properties of the CALHM1/3 channel are identical to those of the ATP release channel in type II taste cells, that CALHM1 and CALHM3 are co-expressed in type II taste cells, and that genetic elimination of CALHM3 diminishes sweet, bitter, umami, and AI salty taste sensation. These data lead to the conclusion that a CALHM1/3 heterooligomer is the neurotransmitter release ion channel for AS salty taste. Regarding (2), AS salty taste is sensed in fungiform taste buds by a taste cell population which is different from sweet, bitter, umami, and sour cells. However, the properties of AS salty taste cells are unknown. We found that ENaC and the CALHM1/3 channel is co-expressed in fungiform taste buds. This result suggests that AS salty taste is mediated by CALHM1/3-expressing taste cells and thereby CALHM1/3 mediates the neurotransmission of AS salty taste.