

哺乳類において機能不明な膜タンパク質 TMC ファミリーの Na⁺センサーとしての役割の解析

西谷 友重, 久光 隆

国立循環器病研究センター分子生理部

概要 食塩の過剰摂取は高血圧, 心血管疾患等の疾病リスクを増大させる原因となるため, 減塩は必須であり, これを成功させるには塩味感覚のメカニズムを明らかにすることが重要である。ヒトの味覚感覚のメカニズムとして, 甘味, 旨味, 酸味, 苦味などは受容体やシグナル伝達機構など比較的明らかになってきているが, 塩味受容については不明な点が多い。近年, 膜タンパク質 TMC-1 (transmembrane channel-like protein-1) が, 線虫において塩分センサーとして働き, 高濃度塩分環境下での回避行動に必須であることが見出された。TMC-1 は *in vitro* で NaCl により直接活性化されるイオンチャネルであり, 細胞内 Ca²⁺ 上昇を引き起こす。哺乳動物においては, TMC は 8 回膜貫通性のタンパク質で TMC1-8 まで 8 つのサブタイプが存在する。TMC-1 および TMC-2 は機械刺激受容に関連し, その欠損は難聴を引き起こす。TMC-3 は神経特異的に, また TMC8 は胸腺特異的に発現する。しかし, 残りの TMC4-7 タンパク質は, その発現パターンおよび分子機能は未だ不明である。本研究では, これら分子発現パターンや分子機能, 特に NaCl により活性化される Na⁺センサーとして働くかについて検討を行った。

まず, マウス TMC4-7 の DNA を取得し, 哺乳細胞に発現する GFP 標識体・非標識体を構築した。これらを用い, サブタイプ特異的抗体を作製・精製し, 評価を行った。その結果, TMC5 および TMC6 に関しては, マウスの心臓および脳で発現していることがわかった。また, 作製した抗体が細胞外エピトープを認識することを利用して, 非透過細胞で, 免疫抗体法で染めたところ, TMC4, 6, 7 は形質膜に発現していることが明らかとなった。さらに分子機能をみるため, これら GFP 標識した TMC 分子の1つを哺乳類細胞に発現させ, 高 Na⁺溶液にて刺激を行ったところ, GFP 標識細胞でのみ細胞内 Ca²⁺ レベルの上昇が認められた。この結果は, この分子が Na⁺センサー, あるいは高浸透圧を検出するメカニズムのセンサーである可能性を示唆している。今後は, 舌での発現を見るほか, 電気生理学的手法を用いてこれら分子がイオン輸送体であるかを検討する予定である。

1. 研究目的

食塩の過剰摂取は高血圧, 心血管疾患, 胃がん等の疾病リスクを増大させる原因となるため, 減塩は健康維持のため必須である。これを成功させるには, 塩味感覚のメカニズムを明らかにすることが重要である。

1.1 味覚と味覚受容体

ヒトの味覚には, 甘味, 旨味, 酸味, 苦味, 塩味などが存在し, 食物摂取判断のシグナルとして, それぞれ栄養的・生理的意義を持つと考えられている。特に塩味は生体内のミネラルの濃度を一定に保つという重要な目的の

ため, 低濃度では嗜好, 高濃度では忌避できるよう, 鋭敏な塩味センサーが存在すると考えられる。旨味, 甘味, 苦味に関しては, その受容体として 7 回膜貫通型の GPCR (T1R1, T1R2, T1R3 および T2Rs の組み合わせ) が知られており, 受容体活性化の後, 下記のように説明されている⁽¹⁾。すなわち, 各々の GPCR のシグナルを受ける G タンパク質が PLCβ を活性化し, セカンドメッセンジャーである IP₃ (イノシトール三リン酸) および DAG を産生する。IP₃ は細胞内 Ca²⁺ ストア ER にある IP₃ 受容体に作用し, ER からの Ca²⁺ を放出する。これが引き金となって, 形質膜上の

TRPM5 というイオンチャンネルが活性化され、細胞内に Na^+ が流入することにより膜電位が上昇し、電位依存性イオンチャンネルである CALHM1 を活性化し、味覚シグナル伝達のセカンドメッセンジャーである ATP が放出されることが見出された⁽²⁾。これにより、GPCR を介した旨味、甘味、苦味の末梢におけるシグナル伝達のメカニズムはかなり解明されたと考えられる。酸味受容体の候補分子としては非選択性陽イオンチャンネル (TRP チャンnel) ファミリーに属する PKD2L1 および PKD1L3 が報告されている⁽³⁾。このチャンネルはクエン酸、リンゴ酸、酢酸、塩酸などを受容するが、これらの酸を投与後、除去した際にチャンネルが開くオフ応答を示すことから、PKD2L1, PKD1L3 以外の酸味受容体が存在すると考えられている。一方、塩味の受容体は長らく明らかにされていなかったが、近年、上皮性 Na^+ チャンnelである ENaC が、マウスにおける塩味受容体として機能することが報告された⁽⁴⁾。ENaC は、腎臓の尿細管腔に存在し、原尿中の Na^+ を細胞内に流入させる働きを持つが、舌上皮にも存在し、ENaC を欠失したマウスでは、低濃度の

塩に対する感受性が低下したことより塩味の受容体の1つと考えられている。しかし、塩への感受性を全て失うことが無かったため、ENaC 以外にも塩を受容する分子の存在が示唆されているが、その分子実体やシグナル伝達経路は未だ明らかでない。

1.2 TMC ファミリー

近年、機能不明の膜タンパク質ファミリー TMC (transmembrane channel-like protein family) のうちの1つである TMC-1 が、線虫において塩分センサーとして働き、高濃度塩分環境下での回避行動に必須であることが見出された⁽⁵⁾。この研究の中で、TMC-1 は *in vitro* で NaCl により直接活性化されるイオンチャンネルとして働き、イオン電流と共に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がおり、下流のシグナルが活性化されることが示された。TMC スーパーファミリーは、植物や酵母以上の生物種に存在し、これまで 8 種類 (TMC1-TMC8) がクローニングされている (Fig 1-A)⁽⁶⁾。配列情報から、8 回膜貫通性のタンパク質で、C(システイン) -W(トリプトファン) -E(グルタミン酸) から始まる進化的

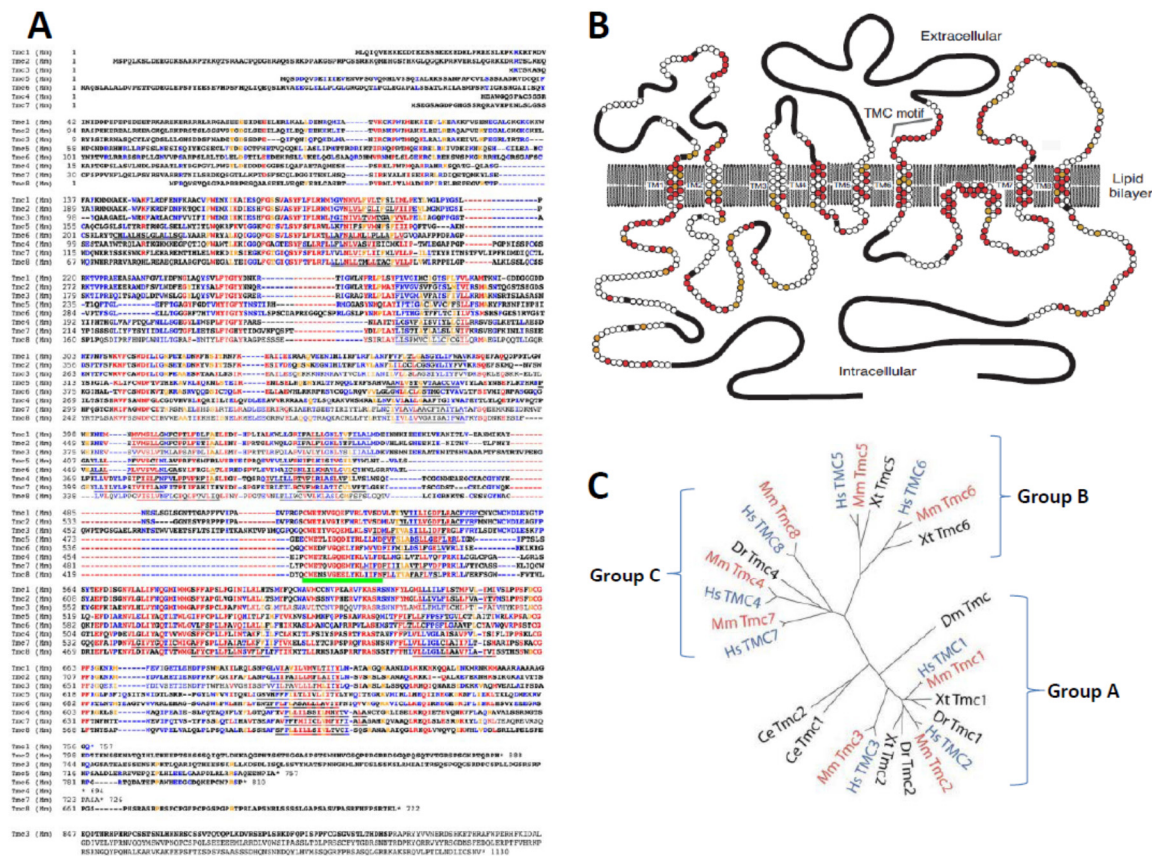


Fig.1; A: Amino acid sequences of mouse TMC1-8. B: Proposed structure of TMC proteins. C: Phylogenetic tree drawn based on the similarity of the gene structure of murine TMC genes.

に保存された特徴的な配列 CWETXVQGELY(K/R)LtvXD (TMC signature sequence motif と呼ばれる)を有する (Fig.1A, B)。また長さや配列の類似性から系統樹的に A, B, C の3つのサブファミリーに分類される。サブファミリーA は TMC-1 から TMC-3 が、サブファミリーB には TMC-5 および TMC-6, サブファミリーC には TMC-4, TMC-7, TMC-8 が含まれる (Fig.1C)。

一方、TMC-1 のヒトおよびマウスホモログは機械刺激受容に関連し、その変異は難聴を引き起こすことが報告されている⁽⁷⁻⁹⁾。しかし、これら TMC-1-8 タンパク質の哺乳動物における組織発現パターンや細胞内局在、さらに分子機能については今のところ、全く不明である。

そこで、本研究では線虫 TMC のマウスホモログである TMC1-8 のいくつかについて、

1) 組織や細胞における発現パターン、2) 発現系におけるイオンチャネルとしての活性、特に線虫 TMC-1 と同様、NaCl により活性化されるイオンチャネル、すなわち Na⁺センサーとして機能するかどうか、3) マウスの個体レベルでの役割は何かについて、網羅的に解析することを目的とする。

これらで得られた結果は、塩味の感覚シグナル伝達経路を解明する基盤研究となるほか、機能不明な膜タンパク質群の機能を解明する点で新規性が高い。

2. 研究方法

これまでの研究により、マウス TMC ファミリー (TMC-1~8) において、TMC-1, 2, 3, 8 は発現量が低く、一方、

TMC-4, 5, 6, 7 は脳・神経系、消化器系、循環器系とほとんど全ての臓器に発現していることが RT-PCR により明らかになっている (Fig. 1)。そこで本研究では、まず TMC-4, 5, 6, 7 に着目し、以下の方法で研究目的である TMC ファミリーの発現および機能解析を行った。

2. 1 GFP 標識型・非標識型 TMC クローンの哺乳類発現ベクター等の構築

マウス TMC1 4-7 は Open Biosystem より insert を含むベクターを購入。Table 1 はその遺伝子情報である。

これらを哺乳類およびアフリカ爪ガエル卵母細胞に発現できるよう Gateway system (Thermo scientific) を用いて下記のベクターにサブクローニングを行った。1) 非標識で哺乳類に発現させるためのもの (pDEST30 ベクター)、N 末端および C 末端に GFP が融合するよう設計されたもの (pDEST53 および pDEST47 ベクター)、アフリカ爪ガエルへ注入する cRNA 合成を可能とするバクテリアプロモータがついたもの (pDEST14 ベクター)、さらに心筋細胞など遺伝子導入しにくい細胞への導入のため、アデノウイルス発現ベクター (pAd/CMV/V5) にそれぞれサブクローニングを行った。Table 2 は各ベクターの特徴を表している。

また、先行研究との比較のため、線虫 TMC-1 はインサートの全長 DNA を合成の後、上述のそれぞれのベクターにサブクローニングした。

2. 2 特異的抗体のデザイン、作製およびアフィニティ精製

各クローンに対する抗体は、サブタイプ特異的配列の検索、抗原部位のデザイン、ペプチド合成、ウサギ 2 羽へ

Table 1; Detailed information of mouse TMC clones

	accession No	Original clone	Vector	その他
mTMC-4	BC156371	NM_181820	pENTER223.1	without stop codon
mTMC-5	BC108482	NM_001105252	CMV-SPORT6	
mTMC-6(v1)	BC058195	NM_145439	CMV-SPORT6	
mTMC-7	BC141540	NM_172476	pENTER223.1	without stop codon

Table 2; Information of various vectors

ベクター名	プロモータ	標識	発現系	用途
pT-Rex-DEST30	CMV	なし	哺乳類細胞	
pDEST53	CMV	N末端GFP	哺乳類細胞	GFP標識
pDEST47	CMV	C末端GFP	哺乳類細胞	GFP標識
pDEST14	T7	なし	大腸菌	cRNA合成
pAd/CMV/V5-DEST	CMV	V5		ウイルス作製用

の免疫 3 回、免疫前血清および免疫後血清の取得を Sigma との共同で行った。

各クローンを発現させた細胞を用いて、各血清における抗体の強さおよび特異性を確認後、アフィニティカラムを用いた精製をおこなった。

2.3 細胞培養および遺伝子導入

HEK293 細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)およびペニシリン・ストレプトマイシン入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) にて培養した。細胞は、35 mm の培養皿中で 70-80%コンフルエントになるまで培養し、Lipofectamine 2000 試薬(Life Technologies, Carlsbad, CA.)を用いて 4 μ g の DNA を遺伝子導入した。

2.4 Western Blotting

同量のタンパク量を含むサンプルを 1.5X LDS sample buffer+0.1 M DTT に溶解し、sonication(10s x 3)後 4-15% polyacrylamide gel にアプライして電気泳動を行った。PVDF 膜に転写後、5% milk in TBS-Tween(0.1%)で 1 時間ブロッキング、その後、1次抗体(4°C, 一晚)、2次抗体(室温, 1時間)を加えてインキュベートし、化学発光法によりシグナルを検出した。

2.5 免疫蛍光法

ガラスカバースリップ上に HEK-293 細胞を培養し、48 時間後、4% paraformaldehyde で固定した(15 min, 4°C)。0.1% Triton X-100 /PBS で 10 分間、透過処理を行った後、5% milk/0.1% Triton X-100 /PBS でブロッキングした(室温, 30 分)。その後、1次抗体でインキュベートし(4°C, 一晚)、蛍光タンパク質結合型2次抗体で処理を行った(室温, 1 時間, 暗所)。PBS で十分洗浄後、共焦点ユニットのついた倒立型顕微鏡(Olympus 1X81, equipped with 60 \times /1.42 oil immersion objective lens)を用いて細胞を観察した。イメージは FV10-ASW imaging software を用いて取得し、Adobe Photoshop を用いてさらなる解析を行った。

2.6 抗体

使用した一次抗体は、新たに作製した TMC4-7 の抗体および、anti-GFP マウスモノクローナル抗体(1:200 Clontech), rabbit anti-TMC4 抗体(1:500, Osenses), rabbit anti-TMC4 抗体(1:500, NOVUS), rabbit anti-TMC5 抗体(1:500, Osenses), rabbit anti-TMC6 抗体(1:500, Osenses), rabbit anti-TMC7 抗体(1:500, Osenses)である。2次抗体は、HRP 標識 anti-rabbit IgG(1:5000 Millipore)および HRP 標識 anti-mouse IgG(1:5000 Millipore)である。

2.7 Ca²⁺蛍光測光による機能解析

HEK293細胞をガラスボトムdishに蒔き、C末端にGFPが標識された各TMCクローン/pDEST47を遺伝子導入した。2日後、4 μ M Fura2を45分間ロードし、1.8 mM CaCl₂を含むTyrode溶液(mmol/L): NaCl, 140; KCl, 5.4; HEPES, 10; MgCl₂, 1をconstantに流し続けながらCa²⁺測定を行った。高濃度Na⁺溶液としては300 mM NaClを含むTyrode溶液を用いた。また、高浸透圧溶液のコントロールとして300 mMのマンニトールを含むTyrode溶液も用いた。イメージは、340 nmおよび380 nmで励起し510-530 nmでの放射蛍光をcooled CCD camera(ORCA-ER, Hamamatsu photonics K.K., Japan)で5秒ごとに測定し、AQUACOSMOS software(Hamamatsu photonics)にてデータ処理を行った。

3. 研究結果

3.1 GFP 標識型・非標識型 TMC クローンの哺乳類発現ベクターの構築

上記方法に従って、各 TMC クローンを各ベクターにサブクローニングした。Table 3 はそれら construct の当研究室における ID である。

3.2 各 TMC 抗体の作製および特異性のチェック

各クローンの特異配列および抗体の出しやすさから Table 4 の position を抗原部位に選んだ。予測される認識部位は mTMC-4 および mTMC-7 では細胞外となり、細胞外から反応させることができる。

Table 3; Summary of construction of mouse TMC 4-7 in various vectors

	pT-Rex-DEST30	pDEST47	pDEST53	pAd	pDEST14
mTMC-4	165	157	168	177	187
mTMC-5	166	171	169	178	188
mTMC-6	167	172	170	179	189
mTMC-7	173	158	174	180	190

作製された抗体の力価・特異性をチェックするため、HEK293 細胞に各 TMC クローンおよび GFP 標識体を遺伝子導入し、各抗体が認識するか確認した。結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 から新規に作成した抗体は、いずれも推測されるサイズで TMC を認識しており、GFP 標識体も anti-GFP 抗体で検出できたが、TMC-6 に関しては買った抗体の方が良いという結果が得られた。そこで、これら抗体を affinity column で精製した後、サブタイプ間での特異性を見たのが Fig. 3 である。

Fig. 3 で認められるように、精製した抗体では非特異的バンドは減少し、TMC-6 抗体以外はいずれも特異的に各 TMC クローンを検出した。以上の結果から、抗体の良否

をまとめたのが Table 5 である。

3. 3 各 TMC の心臓, 脳における発現パターン

TMC4-7 の心臓(新生児から成体まで)および脳における発現を調べたところ、TMC-5 及び TMC-6 で両組織に発現していることがわかった(Fig. 4)。しかし、脳では分子量が少し高いのではないかと推測された。

Table 4; Position of antibody-recognition sites of each TMC clones

	残基数	position	予測される認識部位
mTMC-4	694	102-119	N末端-細胞外
mTMC-5	967	949-967	N末端-細胞内
mTMC-6(v1)	810	784-802	N末端-細胞内
mTMC-7	726	1-17	N末端-細胞外

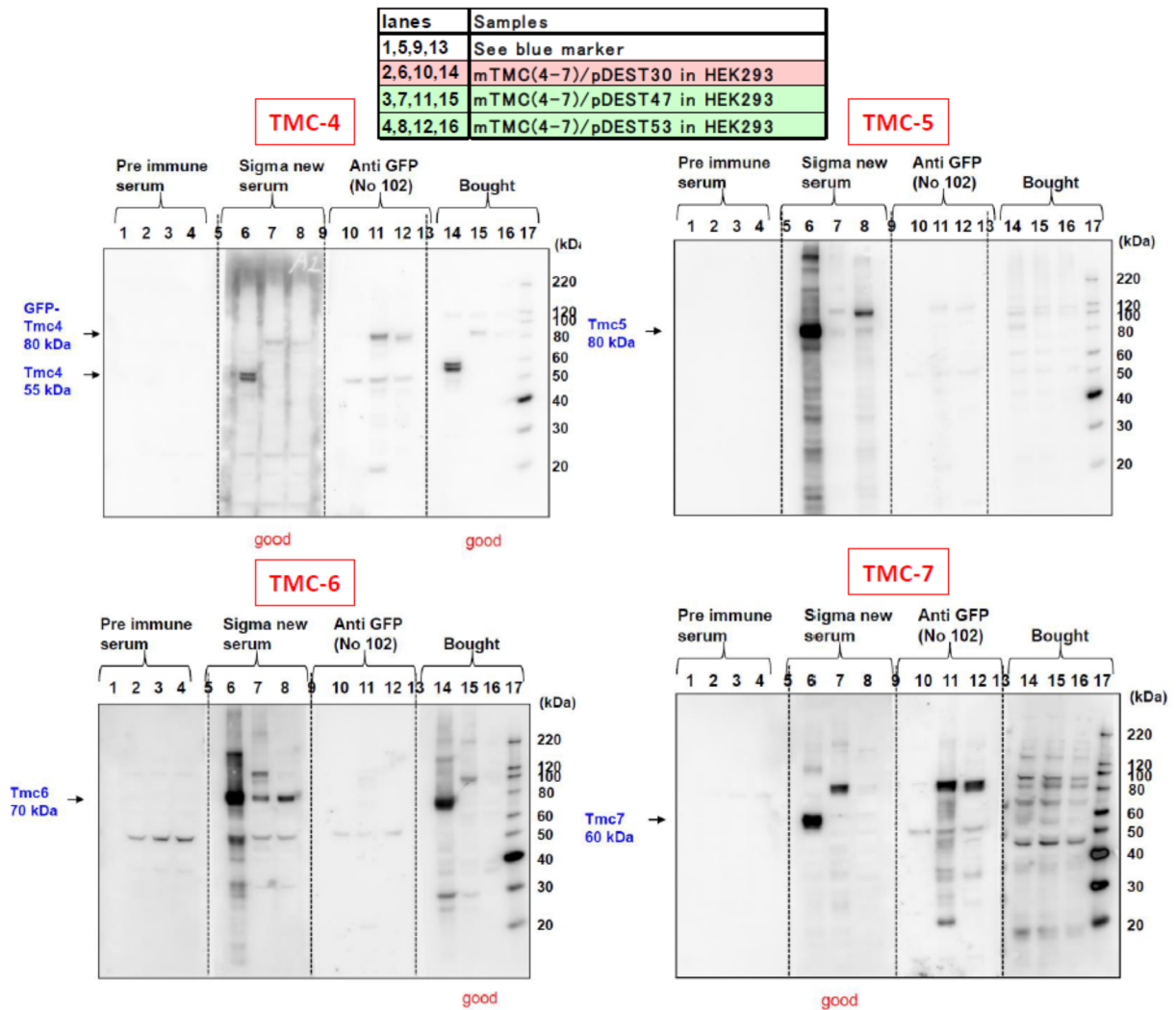


Fig.2; Comparison of newly made TMC antibodies and bought antibodies

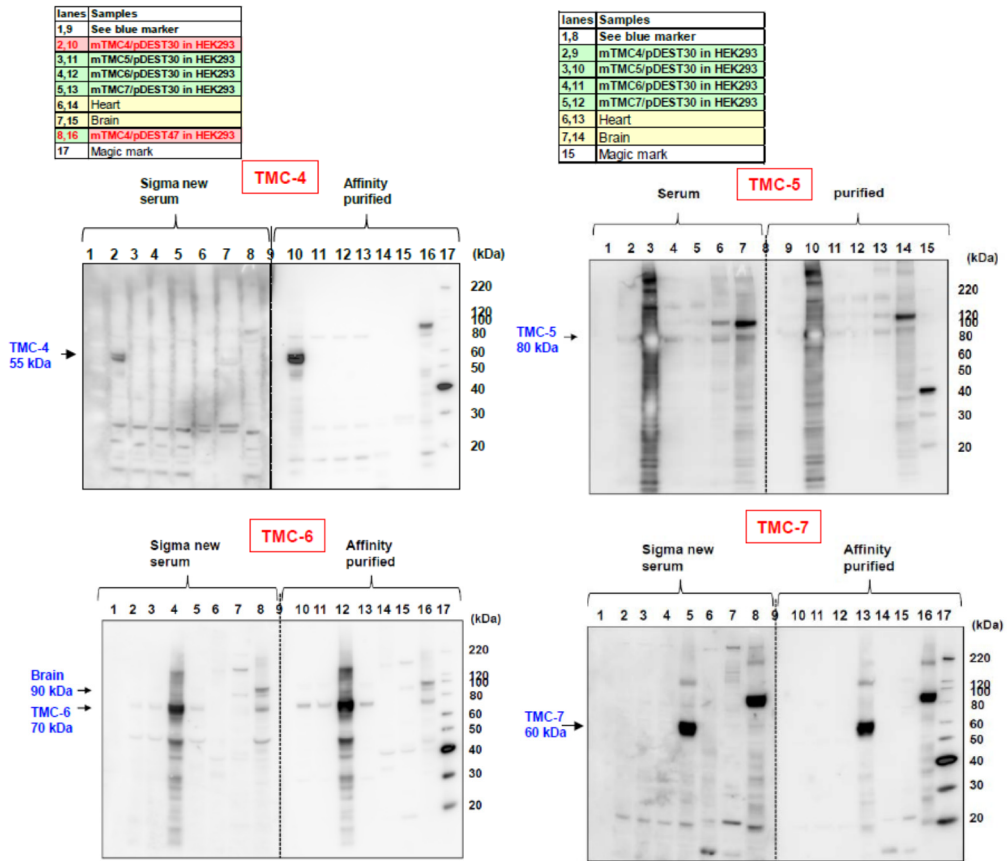


Fig.3; Subtype-specificity of affinity-purified TMC antibodies

Table 5; Summary of TMC antibodies

	MW	Serum	Purified	Bought	Summary
Tmc 4	55-60	○ outside	○ outside	○	○ outside
Tmc 5	80-90	○	○	X	X
Tmc 6	70	○	○	○ outside	○ outside
Tmc 7	60	○ outside	○ outside	X	○ outside

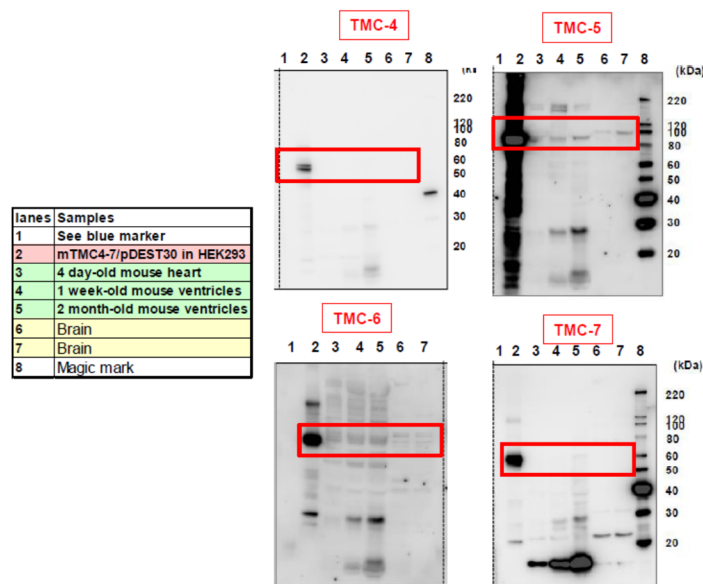


Fig.4; Expression pattern of TMC4-7 in the hearts and brain

3. 4 TMC の細胞内局在

次に TMC4-7 が形質膜に局在するか確かめるため、細胞外を認識する抗体 TMC4, 6, 7 を用いて検討した。具体的には GFP 標識した TMC4, 6, 7 を CCL39 細胞に発現させ、透過処理したものとしいないもので、細胞外を認識する抗体によって検出できるか確認した。

Fig. 5 に示すように、TMC4, 6, 7 いずれも透過処理をしない場合でも抗体が access できたことから、TMC4, 6, 7 タンパク質は形質膜に発現していることが明らかとなった。一方、透過処理を行うと細胞内の膜系で検出できたことから、内膜にも発現していることがわかった。

3. 5 TMC の高濃度 NaCl 溶液に対する Ca²⁺ 応答

これら TMC が線虫 TMC-1 と同様、細胞外 Na⁺ センサーとして働き、Na⁺ 添加によって細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇するか蛍光法により確認した (Fig. 6)。その結果、GFP 標識した、ある TMC クローンを発現させた HEK293 細胞では、300 mM NaCl 添加により可逆的に細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が認められた。

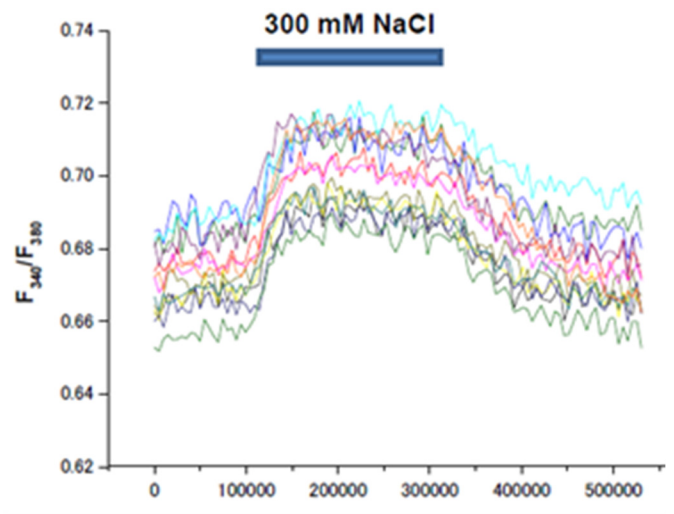


Fig. 6; Effects of 300mM NaCl on the intracellular Ca²⁺ levels in HEK293 cells transfected with a GFP-tagged TMC

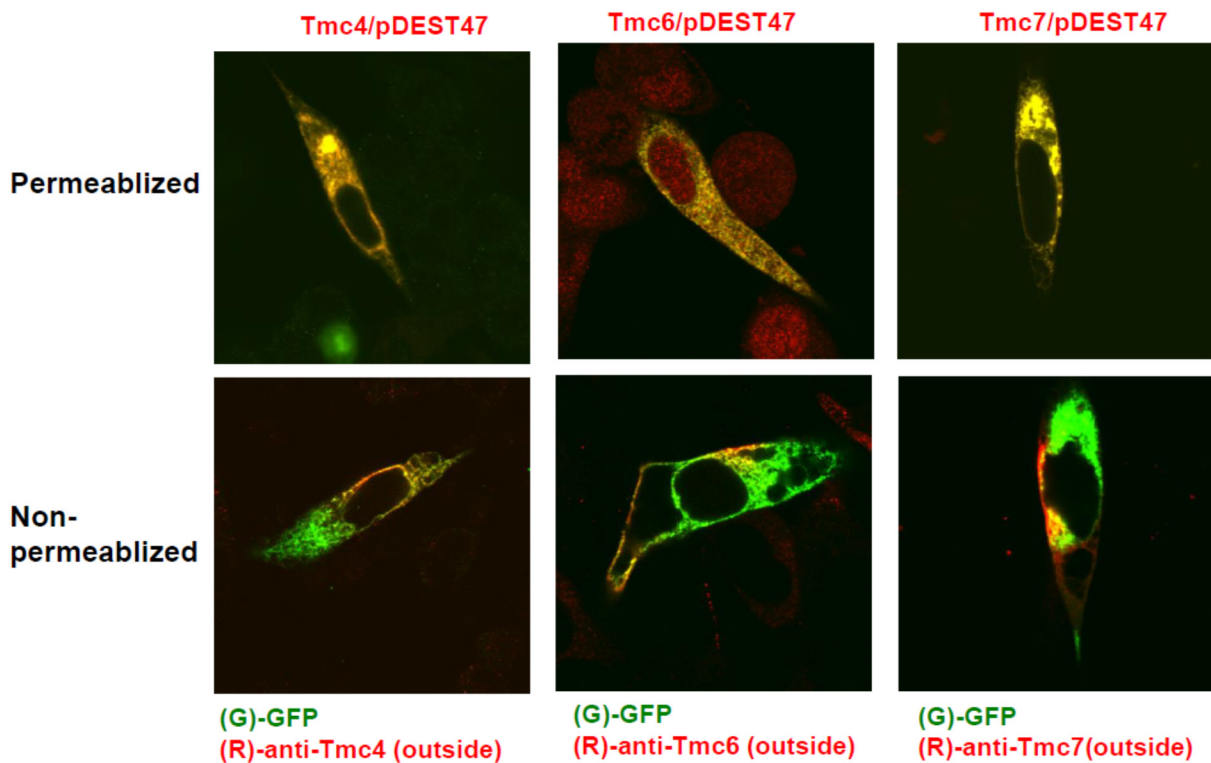


Fig.5; Subcellular localization pattern of TMC4, 6 or 7 in CCL39 cells that were either permeabilized or non-permeabilized

4. 考 察

本研究で、機能未知なタンパク質ファミリーTMC4-7 に関し、以下の実験結果を得た。

- 1) マウス cDNA を取得し、N 末端および C 末端 GFP 標識体を構築した。
- 2) これらを駆使し、サブタイプ特異的抗体を作製・精製し、評価を行った。
- 3) 心臓、脳に発現するものとして、TMC5 および TMC6 が挙げられることがわかった。しかし、組織分布に関して全身を見るため、新生児などの全身切片などを作製し、それぞれの特異抗体で発現パターンを確認する必要がある。
- 4) 外側から認識する抗体を用いた結果、少なくとも TMC4, 6, 7 は細胞内局在として形質膜に発現していることがわかった。
- 5) 分子機能として、TMC のあるタイプでは高濃度 NaCl によって Ca²⁺濃度上昇が生じたことから、高濃度 Na⁺に対し感受性がある可能性が示唆された。しかし、これは高浸透圧によって生じている可能性も有るので、マンニトールなどの効果もみる必要がある。マンニトールでも活性化されれば高浸透圧(機械刺激)により活性化される分子であると言える。また、先の論文⁽⁵⁾で示されていた線虫 TMC-1 を陽性コントロールとして使用するため、既に線虫 TMC-1 の DNA を合成後、哺乳動物発現ベクターに組み込んでいる。今後は、これを哺乳動物細胞に発現させ、実際、NaCl 添加により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇するか確認する予定である。

5. 今後の課題

細胞内 Ca²⁺測光から、マウス TMC のあるサブタイプは Na⁺センサーである可能性が浮上している。今後は、TMC がイオンチャネルあるいはイオン輸送体である可能性を確認するため、パッチクランプ法などを用いてイオン電流を測定する必要がある。もしイオン電流が確認できれば、流れるイオンや活性化を起こすイオンの選択性を詳細に調べる。

さらに、全身における生理的役割を明らかにするため、将来的には CRISPR/CAS9 システムなどのゲノム編集技術を用いて遺伝子欠損マウスを作製し、機能解析を行う予定である(現在、当研究室ではこの技術を用いて多くの遺伝

子改変動物が作成されており、技術的には可能)。以上の解析を介し、機能不明な哺乳類膜タンパク質 TMC の生理機能、特に Na⁺センサーとしての役割を明らかにする予定である。

6. 文献等

1. Liman ER, Zhang YV, Montell C. Peripheral coding of taste. *Neuron*. 2014;81:984-1000
2. Taruno A, Vingtdoux 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. CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*. 2013;495:223-226
3. Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:12569-12574
4. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*. 2010;464:297-301
5. Chatzigeorgiou M, Bang S, Hwang SW, Schafer WR. tmc-1 encodes a sodium-sensitive channel required for salt chemosensation in *C. elegans*. *Nature*. 2013;494:95-99
6. Keresztes G, Mutai H, Heller S. TMC and EVER genes belong to a larger novel family, the TMC gene family encoding transmembrane proteins. *BMC genomics*. 2003;4:24
7. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T, Ghosh M, Menon PS, Deshmukh D, Oddoux C, Ostrer H, Khan S, Riazuddin S, Deiningner PL, Hampton LL, Sullivan SL, Battey JF, Jr., Keats BJ, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1,

- required for cochlear hair-cell function. *Nature genetics*. 2002;30:277-284
8. Nakanishi H, Kurima K, Kawashima Y, Griffith AJ. Mutations of TMC1 cause deafness by disrupting mechano-electrical transduction. *Auris, nasus, larynx*. 2014;41:399-408
9. Vreugde S, Erven A, Kros CJ, Marcotti W, Fuchs H, Kurima K, Wilcox ER, Friedman TB, Griffith AJ, Balling R, Hrabe De Angelis M, Avraham KB, Steel KP. Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nature genetics*. 2002;30:257-258

Analysis of TMC Proteins, Unknown Function Proteins in Mammals, as Novel Na⁺ Sensor

Tomoe Nishitani, Takashi Hisamitsu

Department of Molecular Physiology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

Summary

Excessive salt intake is a leading cause of several cardiovascular diseases, including hypertension. Underlying salt intake is our ability to taste salt. Although molecular mechanisms of sensing sweet, sour, umami and bitter taste are relatively well defined, molecular basis of the salt taste is poorly understood. Recent evidence suggests that the *tmc-1* (transmembrane channel-like protein-1) gene in *C. elegans* is a sodium sensor required for behavioral avoidance of high salt concentrations. There are eight ortholog genes in mammals (TMC1 to TMC8). TMC1 and TMC2 have a role in hair-cell mechanotransduction and mutations in these genes are associated with deafness. TMC3 is expressed specifically in neuron and TMC8 is in the thymus. The function and expression of the remaining genes (TMC4-TMC7) are poorly characterized. To address this limitation, we obtained mouse TMC4-7 cDNAs and constructed GFP-tagged fusion proteins. We also produced subtype-specific antibodies against TMC4, 5, 6 and 7 that are designed to recognize extracellular epitopes. These antibodies demonstrated that TMC 5 and 6 are expressed in the heart and brain at different developmental stages of mice. TMC4, 5 and 7 are expressed at the plasma membrane in cultured cells since they were detected in non-permeabilized cells with extracellular accessible antibodies. To determine the function of these molecules, we performed Ca²⁺ imaging analysis and examined the effects high extracellular Na⁺ stimulation (300 mM NaCl-containing Tyrode solution). This intervention evoked a rise in intracellular Ca²⁺, but only when cells were transfected with one of the TMC cDNAs. Thus, we conclude that TMC proteins sense high concentrations of Na⁺ and/or a high extracellular osmolality. This result provides a strong support that TMC proteins are Na⁺ sensors or mechanosensors. Further studies are required to determine the expression in the tongue and whether they are ion transporters using electrophysiological techniques.