

ナトリウム利尿ペプチドによる末梢塩味感受性調節機構の解明

高井 信吾¹, 重村 憲徳¹, 菅原 友佳²

¹九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学, ²味の素株式会社

概要 Na⁺は生命活動の維持に必要な不可欠なミネラルの一つであり、動物は毎日十分量の Na⁺を食物から摂取する必要がある。最近の研究では、味覚は全身の栄養状態を反映した調節を受け、その時生体は必用とする栄養の効率的な摂取に寄与していると考えられている。塩に関しても、過去に血圧上昇および腎臓の集合管での Na⁺吸収調節に関わるホルモンであるアンジオテンシン II (AngII) が、マウスの塩味感受性を抑制するという報告がある。この AngII による末梢塩味感覚のダウンレギュレーションは、Na⁺不足の際に通常忌避行動を示すような高濃度 Na⁺への嗜好性を惹起することで、積極的な食塩摂取を促し、ミネラルバランスを保つ働きがあると考えられる。一方、体内のNa⁺が過剰になった際に、末梢において塩味感受性がどのように制御されるのかは全く解明されていない。

本研究では、バソプレシン、エンドセリン、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系に対して拮抗的な作用を有するナトリウム利尿ペプチド(NP)に着目し、その末梢味覚器における発現と機能を探索した。

RT-PCRの結果、マウス味覚器で2つのNP受容体サブタイプ(NPRB, NPRC)のmRNA発現が検出された。

免疫染色の結果、NPRBは塩味受容体サブセットである上皮性ナトリウムチャンネル α サブユニット(ENaC α)と高頻度で共発現していることがわかった。

合成C型NPアナログ(CNP; NPRBリガンド)であるvosoritideを皮下投与すると、短時間リック試験において、マウスの生理的濃度の塩味(NaCl)に対する嗜好性が有意に抑制された。この時、他の味質(甘味、苦味、うま味、酸味)およびKClに対する行動応答には変化は見られなかった。さらに、舌前方の味覚を支配する鼓索神経の各味質刺激に対する応答を、vosoritide投与前後で比較した結果、vosoritideを投与により、NaClに対する神経応答が有意に増強した。またこの増強はamiloride添加により消失したことから、NPRBの薬理的活性化はENaCを介した塩味を選択的に増強することが示唆された。

本結果は、体内のNa⁺濃度上昇に伴い分泌されたNPが味細胞に発現するNPRBを活性化し、塩味感受性を変化させるということの意味する。この末梢における塩味の調節機構は、食塩の過剰摂取に起因する高血圧症や循環器障害の効果的な予防医療戦略を策定するための基盤的知見となる可能性がある。

1. 研究目的

ナトリウムイオン(Na⁺)は生体にとって必須のミネラルの一つであり、動物は生命活動の維持ために十分量のNa⁺を摂取する必要がある。末梢味覚系では、上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)が生理的濃度の塩味を感じる受容体として機能している^{(1), (2)}。ENaCを介したNa⁺流入により生じる塩味感覚は、塩に対する嗜好や忌避行動の発現に重

要である⁽²⁾。最近の研究結果から、味覚は全身の栄養状態を反映して逐次最適化され、生体の需要に応じて効率的な栄養摂取を可能にしていると考えられている。また、この栄養状態を反映した味覚調節メカニズムには、様々な内分泌因子の関与が示唆されており⁽³⁾、過去に塩においても、腎臓の集合管でのNa⁺吸収を促進するアルドステロンの分泌を刺激するホルモンであるアンジオテンシン II

(AngII)が、マウス味覚器において塩味調節因子として働くという報告がなされている⁽⁴⁾。AngIIによる味蕾の1型AngII受容体(AT1)活性化は、動物の塩味感度を有意に低下させ、通常忌避行動を示すような高濃度NaClへの嗜好性を惹起する⁽⁴⁾。この塩味感受性調節機構は、体内のNa⁺が不足した際、積極的な食塩摂取を促し、全身のミネラルホメオスタシスを維持することに寄与していると考えられる。しかし、体内のNa⁺が過剰になった際に、末梢において塩味感受性がどのような制御を受けるかに関しては、何もわかっていない。現代社会では、食塩の過剰摂取に起因する高血圧症や循環器障害が大きな社会的健康問題となっており⁽⁵⁾、末梢の塩味感受性を制御する分子基盤の解明は、喫緊の課題である。

本研究では、血圧やミネラルバランスの調節に関与する生理活性ペプチドであるナトリウム利尿ペプチド(NP)に着目した。NPには、ANP(心房性ナトリウム利尿ペプチド)、BNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)、CNP(C型ナトリウム利尿ペプチド)という3種のサブタイプと、3種類のNP受容体(NPRA(A型ナトリウム利尿ペプチド受容体A)、NPRB(ナトリウム利尿ペプチド受容体B)、NPRC(C型ナトリウム利尿ペプチド受容体C))が報告されている。ANPとBNPはNPRAに、CNPはNPRBに選択的に結合し、細胞内のcGMP濃度を上昇させることで様々な生理作用を誘導する。NPRCは全てのNPと結合することで循環血液中のNP濃度を下げるクリアランス受容体として機能している⁽⁶⁾。大部分のANPとBNPは主に心筋細胞で産生されるが^{(7),(8)}、CNPは中枢神経細胞、軟骨細胞、血管内皮細胞、心筋細胞、線維芽細胞など、より広い範囲に分布していることが知られている⁽⁹⁾。ANPやBNPは心室血液量の増加による心房、心室壁の伸展に応答して分泌小胞から放出される⁽¹⁰⁾。CNPの分泌機構に関しては未だ不明な点も多いが、血圧の上昇に伴う機械的ストレス⁽¹¹⁾、炎症性サイトカイン⁽¹²⁾、細菌性リポ多糖^{(12),(13)}など様々な刺激に応答して、その分泌や遺伝子発現が増強されることが示されている。すべてのNPは細胞外液量の調節に関与し、バソプレシン、エンドセリン、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系に対して拮抗的な作用を有する^{(14),(15)}。前述の通り、AngIIは味細胞に作用して塩味を抑制することが示されているが⁽⁴⁾、味覚器におけるNPの発現と機能についてはこれまでに全く研究されていない。そこで本研

究では、マウスを用いて末梢味覚器におけるNPとその関連分子の発現解析、および塩味摂取行動への影響を探索した。

2. 研究方法

2.1 RT-PCR

C57/BL6Jマウス(n=3, 24.1±1.2g)をイソフルランで麻酔し、頸椎脱臼により安楽死させた後、舌、心房、心室、大脳皮質を解剖、摘出した。舌には、エラスターゼ(0.5-1mg/ml; Elastin Products, Owensville, MO, USA; 室温で8分間インキュベート)を注入し、舌前部および舌後部の上皮を剥離、周辺組織を除去し、味蕾を含まない舌上皮(NT)と舌尖部の茸状乳頭(FP)の味蕾(マウス1匹につき50個)をガラスピペットでタイロッド溶液(mM: NaCl 140, KCl 5, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 5, glucose 10, sodium pyruvate 10, HEPES 10; pH 7.4)中に回収した。舌後部部の有郭乳頭(CV)は周辺上皮から切り離し、顕微鏡下でVon Ebner腺を排除した。各組織のRNAをPureLink RNA Mini Kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で抽出した。その後、SuperScript VILO Master Mix(Thermo Fisher Scientific)を用いて、Total RNAから一本鎖cDNA合成反応を進めた。

PCRは以下の条件下で行った: 94°C 15分(1サイクル); 94°C 30秒, 57°C 30秒, 72°C 30秒(35サイクル); 72°C 30分(1サイクル)。PCR反応溶液は全量10µlで、組成は次の通りである: 10×ExTaq buffer, プライマーペア(1µM), dNTP mixture(0.2mM), およびcDNA(1ng), および0.5U ExTaq DNAポリメラーゼ(TaKaRa ExTaq HS, Takara Bio)。増幅産物5µlを、ゲル電気泳動(2%TBEアガロースゲル+GelRed Nucleic Acid Gel Stain(Biotium, Fremont, CA, USA))に供し、UV照射下で検出した。

2.2 免疫組織化学染色

Gnat3-GFPマウス(n=3, 8-12週齢, 24.4±1.5g)の舌をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで50分間固定し、スクロース溶液で脱水した。OCT compound(Sakura Finetechnical, 東京, 日本)に包埋凍結後、10µmの切片にスライスし、スライドグラスにマウントした。TBS+0.05% Tween20(TNT)で洗浄、切片をHisto VTOne(ナカライテスク, 京都, 日本)中で70°C, 20分間インキュベートして抗原賦活化を行い、Blocking One(ナカライテスク)で40分間インキュベートした後、切片を以下の一次抗体と4°Cで

一晚反応させた:抗 GFP(1:1000;Aves Labs, Davis, CA, USA), 抗 NPRB(1:100;Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), 抗 NPRC(1:100;Abcam), 抗 CNP(1:100; Thermo Fisher Scientific), 抗 PECAM-1(1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) および抗 ENaCa(1:100;StressMarq Bioscience, Victoria, BC, Canada)。TNT で洗浄後, 切片を以下の二次抗体で 2 時間インキュベートした:GFP 用(1:300;CFTM543 donkey anti-chicken IgY, Biotium), NPRB および PECAM-1(1:300;Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific), ENaCa, CNP(1:300;Alexa Fluor 647 donkey anti-rabbit IgG, Thermo Fisher Scientific)。標識した味細胞の免疫蛍光はレーザー走査型顕微鏡(FV-1000, オリンパス, 東京, 日本)を用いて観察した。

2. 3 短時間リック試験

マウス(C57BL/6J, n = 12, 23.1 ± 1.8 g)は 12 時間周期の明期/暗期のサイクルで固形飼料を自由に摂取できる環境で飼育した。すべてのトレーニング, テストは明期に行った。トレーニング初日は 23 時間の絶水後, テストケージ内で 1 時間, 水を自由に摂取させた。2-14 日目は 23 時間絶水後, 10 秒間水を提示した後, 20 秒間のインターバルをあげ, 再び 10 秒間水を提示するというトレーニングを 30 分間連続して行った。15, 16 日目はリックメーター(Yutaka Electronics Co., 長崎, 日本)を用いてランダムに提示された各種味溶液(10-1000 mM sucrose + 1 mM QHCl, 10-1000 mM NaCl, 10-1000mM NaCl + 30 μM amiloride, 10-1000 mM KCl, 1-30 mM HCl, 0.01-1 mM QHCl, 1-300 mM MPG + 1 mM QHCl) および水のリック数(マウスが舐め始めた 1 回目のリックから 10 秒間)をカウントした。各試験日の最初に提示される溶液は水とし, 水に対する味物質の割合として lick ratio を算出した。生理食塩水を皮下投与したコントロール群, および vosoritide 投与群として 200 ng/kg b.w.の vosoritide を生理食塩水に溶解し皮下投与した群に対して同じ実験を行い, 両群ともに, 投与 5 分後から記録を開始した。

2. 4 鼓索神経応答記録

C57/BL6J マウス(n = 8, 24.4 ± 1.9 g)をペントバルビタール(40-50 mg/kg b.w.)を腹腔内投与にて麻酔後, 内側翼突筋の除去によって舌神経から枝分かれしている右側鼓索神経を剖出した。その後, 鼓索神経を鼓室に入る直前で切断し, 周囲の組織から分離, 露出させ, Ag/AgCl 電極に乗せた。不関電極は周囲組織に装着した。味刺激に用いた溶液は次の通りである: 100 mM NH₄Cl, 10-1000 mM sucrose, 10-1000 mM NaCl, 10-1000 mM NaCl + 30 μM amiloride, 100mM KCl, 10 mM HCl, 20mM QHCl(キニーネ塩酸塩), 100mM MPG。味刺激は味溶液を 0.1 ml/s で 30 秒間舌上に流すことで行い, その後舌を約 1 分間蒸留水で洗浄した。amiloride を含む味刺激を行った後は, amiloride を含まない 10-1000 mM NaCl で繰り返し刺激を行い, 阻害からの応答の回復を確認した。対照群の応答を記録後, 生理食塩水に溶解した vosoritide を皮下投与した(200 ng/kg b.w.)。基準刺激である 100 mM NH₄Cl に対する応答を周期的にモニターし, 応答の安定性を確認した。刺激シリーズの最初と最後に記録した刺激開始後 5 秒-25 秒までの応答をインテグレーターにて積分し, その大きさの平均値を求め, 100 mM NH₄Cl 応答を 1.0 とした相対値で算出した。AS の塩味応答は NaCl 溶液の応答値から, NaCl + amiloride 混合味溶液の応答値(AI)を減算して算出した。

3. 研究結果

3. 1 マウス末梢味覚器における NP, NPR の遺伝子発現

RT-PCR の結果から, *Nppa* (ANP), *Nppb* (BNP) の mRNA は, CV, FP, 非味覚舌上皮(NT)のいずれにおいても検出されなかった(図 1)。一方, *Nppc* (CNP) は FP, CV 組織で発現が見られた。3 種類の NP 受容体サブタイプ(*Npr1* (NPRA), *Npr2* (NPRB), *Npr3* (NPRC))のうち, *Npr2*, *Npr3* が FP と CV のサンプルから検出された。*Gnat3* (II 型味細胞に発現する G タンパク質)は, 味覚上皮でのみ発現しており, NT サンプルでは観察されなかった。*Nppa* と *Npr1* は心房筋組織, *Nppb*, *Npr2*, *Npr3* は心室筋組織, *Nppc* は大脳皮質から合成した cDNA をポジティブコントロール(PC)として実験に使用した(図 1)。

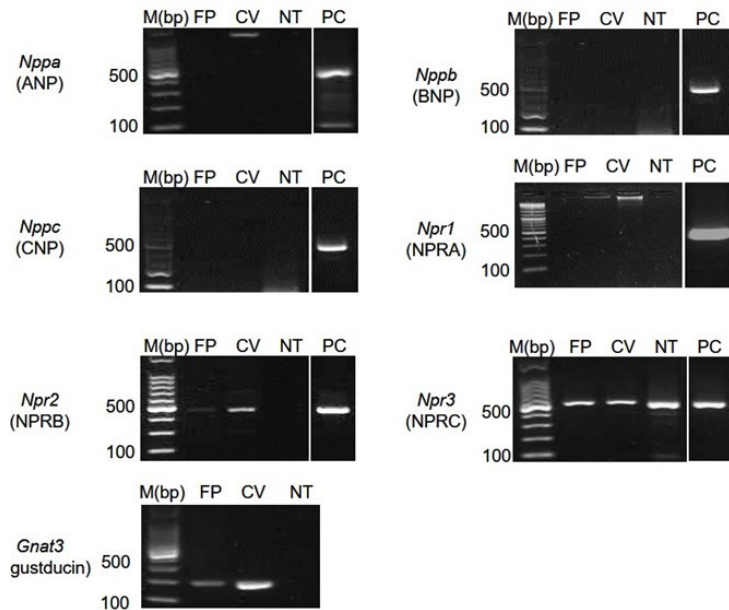


図 1

Nppa (ANP), *Nppb* (BNP) and *Nppc* (CNP) were not detected in mouse fungiform papillae (FP), circumvallate papillae (CV), non-taste lingual epithelium (NT) but clearly detected in the organs that were used as positive controls (PC). The expression of *Npr2* (NPRB) and *Npr3* (NPRC) is observed in taste epithelium of FP and CV. *Npr3* were expressed also in NT, on the other hand, *Npr2* was not expressed in NT.

3. 2 NPRB は, ENaCa, GNAT3 と共発現しており, CNP は味蕾の周囲の毛細血管に発現する

免疫組織化学染色の結果, NPRB シグナルは NT では検出されず, 特定の味細胞で観察された。NPRB を発現する細胞は, GNAT3 を一部共発現, ENaCa を高頻度で

共発現していた (図 2A)。CNP のシグナルは, 内皮細胞マーカーの一種である PECAM1 によって示される毛細血管で観察された (図 2B)。一次抗体を用いない場合, 同じサンプルで特異的な蛍光は観察されなかった。

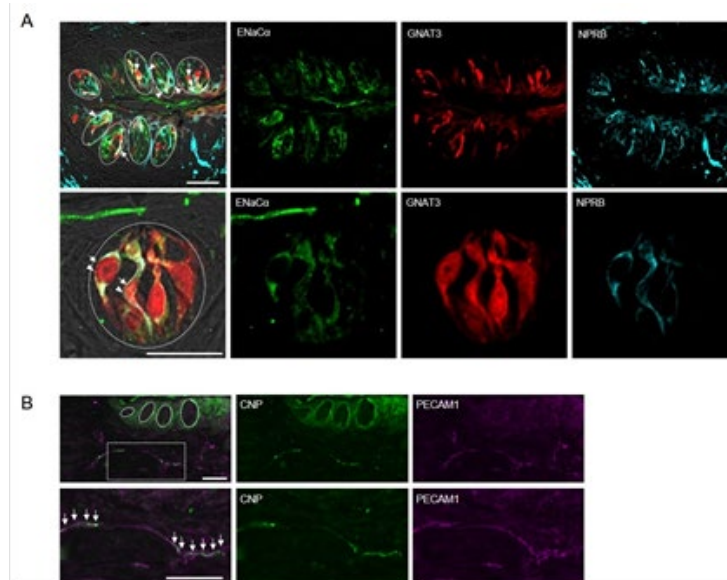


図 2

(A) In both FP and CV taste buds, NPRB and ENaCa (a salt-sensitive taste cell marker) and/or GNAT3 (a type II taste cell marker) was coexpressed. Arrows indicate NPRB-positive cells co-localized with GNAT3. Arrowheads indicate NPRB-positive cells co-localized with ENaCa.
 (B) CNP signals were detected in the blood capillaries that are indicated by PCAM1 immunoreactivity surrounding taste buds.

3.3 vosoritide による NPRB の活性化は、短時間リック試験においてマウスの NaCl 溶液に対する嗜好性を有意に減少させる

次に、CNP-NPRB シグナルの活性化に伴う味覚嗜好性の変化を検証するために、短時間リック試験を実施した。CNP は、NP のクリアランス受容体である NPRC や血漿中の中性エンドペプチダーゼによって速やかに分解されるため、血中半減期が 2.6 分と短い⁽¹⁶⁾。合成 CNP アナログである vosoritide は、内因性 CNP と比較して、C 末端アミノ酸 37 個に 2 個のアミノ酸(Pro と Gly)を付加した改変型組み換え CNP アナログであり、エンドペプチダーゼ分解に対する抵抗性が飛躍的に向上している^{(17),(18)}。

vosoritide を投与したマウスは、NaCl に対する lick ratio は有意に減少したが(図 3; F (5, 129) = 16.677, P < 0.05, two-way ANOVA), NaCl + 30 μ M amiloride(図 3; F (5, 129) = 16.677, P < 0.05, two-way ANOVA)や、他の味質では有意な変化は見られなかった(図 3; NaCl + 30 μ M amiloride (F(5, 130) = 1.097), HCl (F (3, 88) = 0.591), sucrose + 1 mM QHCl (F (5, 132) = 0.296), MPG + 1 mM QHCl (F (4, 104) = 0.619), QHCl (F (4, 108) = 1.099), KCl (F (2, 66) = 0.394, P > 0.05, two-way ANOVA))。これらの結果は、CNP-NPRB シグナルを薬理的に活性化することで、動物の Na⁺感知および塩摂取行動が変化することを強く示唆している。

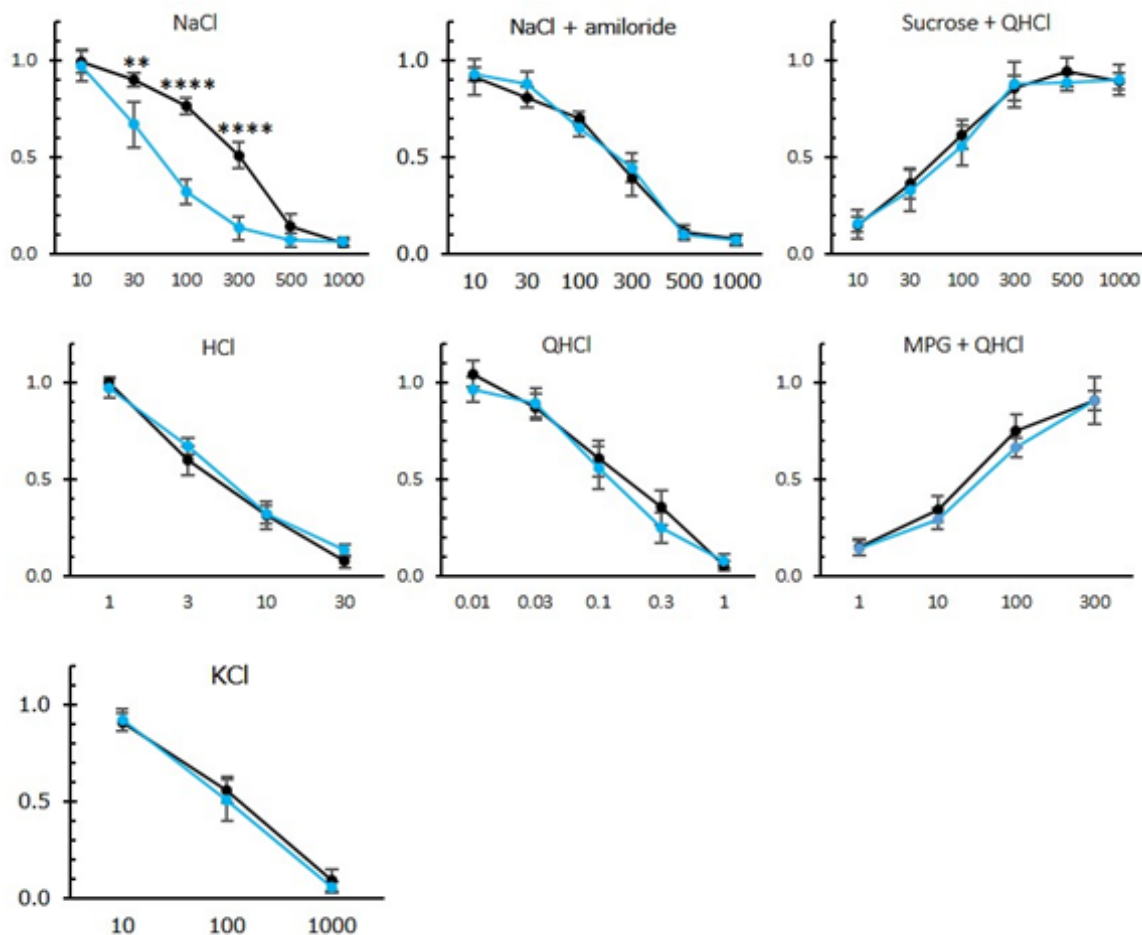


図 3

Concentration-response relationships for varying concentrations of NaCl, NaCl + 30 μ M amiloride, HCl, sucrose + 0.1 mM QHCl, MPG + 0.1 mM QHCl, QHCl and KCl. 30 min after intraperitoneal injection of vehicle (black symbols) or 2 mg/kg body weight flecainide (blue symbols).

The lick ratio to distilled water is presented as the mean \pm SEM (n = 9–12).

*P < 0.05, *P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001 (two-way ANOVA and post-hoc unpaired t-test).

3. 4 マウス鼓索神経応答記録実験において、vosoritide は amiloride 感受性 NaCl 応答を有意に増強する

NP シグナルの活性化がマウスの味覚感度にどのように影響するかを調べるため、vosoritide の皮下注射と鼓索神経からの味覚応答の電気生理学的記録を行った。vosoritide 投与により、NaCl に対する神経の応答は有意に増加した(図 4; $F(5, 80) = 4.008, P < 0.05$, two way ANOVA)。特に NaCl の amiloride 感受性成分で増強が

見られたが、amiloride 非感受性成分、および他の味質では変化が見られなかった(図 4; $\text{NaCl} + \text{amiloride}: F(5, 68) = 0.257$, two-way ANOVA, $P > 0.05$, $\text{KCl}: F(1, 14) = 0.16$, $\text{sucrose}: F(5, 78) = 0.669$, $\text{MPG}: F(1, 12) = 0.032$, $\text{QHCl}: F(1, 12) = 0.054$, $\text{HCl}: F(1, 14) = 0.237$, unpaired t-test, $P > 0.05$)。以上の結果から、vosoritide による NPRB の活性化は、ENaC を介した Na^+ 流入によって引き起こされる味覚応答を特異的に調節している可能性が示唆された。

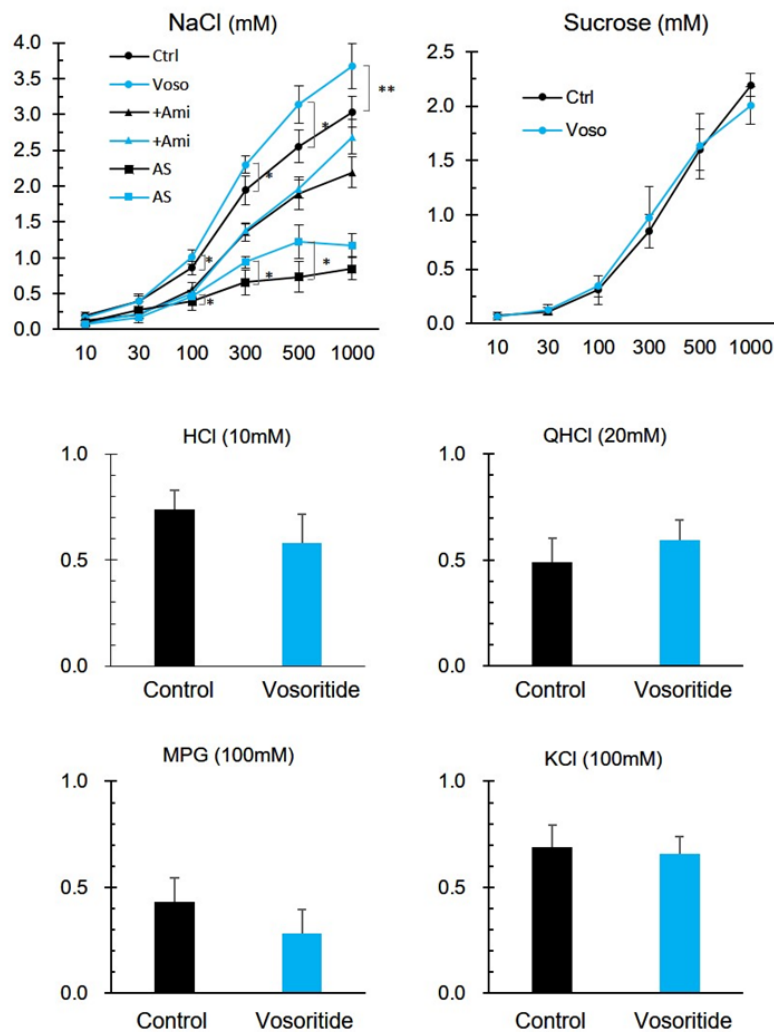


図 4

上(折れ線グラフ)左; Concentration-dependent CT nerve responses of control (black) and vosoritide-treated animals (blue) to NaCl (circle symbols), NaCl + 30 μM amiloride (triangle symbols) and amiloride-sensitive components (square symbols).
 上(折れ線グラフ)右; Concentration-dependent CT nerve responses of control (black) and vosoritide-treated animals (blue) to sucrose.
 Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 4-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (two-way ANOVA and post-hoc unpaired t-test).
 下(棒グラフ); CT nerve responses of control (black) and vosoritide-treated animals (blue) to 10 mM HCl, 20 mM QHCl, 100 mM MPG and 100 mM KCl.
 Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 7-8$).

4. 考察

本研究では、CNP-NPRB シグナルを薬理的に活性化すると、NaCl に対する味神経応答のうち amiloride 感受性の応答が特異的に増強され、生理的濃度範囲で NaCl 嗜好性が有意に抑制されるという結果を得た。

全身では、様々な種類の細胞が CNP を産生することが報告されている⁽⁹⁾。しかし、CNP は血漿中や内皮細胞表面に存在する中性エンドペプチダーゼにより速やかに分解されるため⁽¹⁰⁾、ANP や BNP と比較して血漿中濃度は比較的低い⁽¹⁶⁾。したがって、CNP は局所的なパラクライン/オートクラインメディエーターとして作用していると考えられている⁽¹⁹⁾。

本研究では、味蕾内と味蕾取り囲む血管の内皮細胞に CNP の発現を見出した。この局在はパラクライン/オートクラインメディエーターとしての CNP の特性を理解する上で合理的である。加えて、NP のクリアランスレセプターである NPRC は、味蕾内外に発現していることから、NPRC とエンドペプチダーゼによる CNP の迅速な分解は、全身のミネラル代謝の状態をタイムリーに反映した塩味感度のスマートな調節を可能にしていると推測される。

循環中の Na⁺が不足すると、血中 AngII 濃度が上昇し、最終的に Na⁺と水の再吸収が促進され、循環血流量が増加する。逆に、血流中の Na⁺が過剰に存在する状況では、NP の合成と分泌が促進され、利尿亢進、血圧低下が誘導される。Na⁺過剰時、腎臓と血管内皮細胞における CNP の濃度は上昇することがわかっている⁽²⁰⁾。心筋細胞においては、CNP は Ang II と拮抗した役割を持ち、心肥大、線維化、心収縮機能不全を抑制する^{(21), (22)}。また、腎皮質では、Ang の抑制により CNP の発現量が増加するという報告もある⁽²³⁾。末梢味覚器では、特定の味細胞群で発現する AT1 (Ang II 受容体) を活性化することで、通常は回避行動を引き起こす高濃度の塩分の摂取が促進される⁽⁴⁾。本研究では、CNP が末梢味覚系において Ang II と対照的な作用を持ち、塩味感受性を特異的に増加させることを明らかにした。今回示した我々の免疫組織化学的研究、および先行論文を併せて考えると⁽⁴⁾、NPRB と AT1 の発現は、ENaCα を発現する味細胞で共局在する可能性があり、このような細胞では Ang II と CNP が拮抗的に作用し、塩味感受性を細胞レベルで制御していることが示唆された。

この調節機構は動物の塩摂取行動を規定する重要な調節系の1つであると予想される。

慢性的な高ナトリウム摂取は、心筋梗塞、脳卒中、腎不全などの心血管疾患の主たる病因とされており、減塩は心血管系疾病予防に対し重要な方策であると考えられている。今回得られた知見は、CNP が Na⁺に対する味覚感受性を高め、NaCl 摂取量を減少させる重要な分子であるという新規のアイデアを提示する。味覚器における CNP-NPRB シグナルは、心血管疾患の効果的な予防医療戦略を策定するための新たなターゲットとなり得る可能性がある。

5. 今後の課題

NPRB の活性化は、細胞内の cGMP (cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate) 濃度上昇を誘導する⁽²⁴⁾。また、CNP は PDE3 (Phosphodiesterase 3) 活性を阻害することにより、cAMP (cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate) 濃度を上昇させる^{(25), (26)}。ENaC の内向きナトリウム電流は、cGMP によって濃度依存的に増強される^{(27), (28)}。また、単離された味覚細胞を用いた電気生理学的実験では、ENaC を介した内向き Na⁺電流は cAMP によって有意に増強されることが示されている⁽²⁹⁾。つまり、CNP は味覚細胞の cAMP および cGMP 産生を刺激することで ENaC を活性化し、鼓索神経応答解析および行動応答解析で観察されたように、amiloride 感受性の塩応答を増強すると考えられる。一方、NPR を強制発現させた *Xenopus* 2F3 細胞では、NP が cGMP シグナルを介して ENaC の開口確率を低下させるという報告もあり⁽³⁰⁾。塩味感受性細胞における NPRB の細胞内シグナルカスケードを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

6. 文献

1. Nomura, K., Nakanishi, M., Ishidate, F., Iwata, K. & Taruno, A. All-Electrical Ca²⁺-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds. *Neuron* 106, 816-829.e6 (2020).
2. Chandrashekar, J. et al. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nat.* 2010 4647286 464, 297-301 (2010).
3. Takai, S., Yoshida, R., Shigemura, N. & Ninomiya, Y. Peptide Signaling in Taste Transduction. in *Chemosensory Transduction* 299-317 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-801694-7.00017-2.

4. Shigemura, N. et al. Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. *J. Neurosci.* 33, 6267–6277 (2013).
5. Dong, O. M. Excessive dietary sodium intake and elevated blood pressure: a review of current prevention and management strategies and the emerging role of pharmaconutrigenetics. *BMJ Nutr. Prev. Heal.* 1, 7–16 (2018).
6. Pandey, K. N. Molecular and genetic aspects of guanylyl cyclase natriuretic peptide receptor-a in regulation of blood pressure and renal function. *Physiol. Genomics* 50, 913–928 (2018).
7. Edwards, B. S., Zimmerman, R. S., Schwab, T. R., Heublein, D. M. & Burnett, J. C. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ. Res.* 62, 191–195 (1988).
8. Kinnunen, P., Vuolteenaho, O. & Ruskoaho, H. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. *Endocrinology* 132, 1961–1970 (1993).
9. Moyes, A. J. & Hobbs, A. J. C-Type Natriuretic Peptide: A Multifaceted Paracrine Regulator in the Heart and Vasculature. *Int. J. Mol. Sci.* 20, (2019).
10. Potter, L. R., Yoder, A. R., Flora, D. R., Antos, L. K. & Dickey, D. M. Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications. *Handb. Exp. Pharmacol.* 191, 341 (2009).
11. Okahara, K. et al. Shear stress induces expression of CNP gene in human endothelial cells. *FEBS Lett.* 373, 108–110 (1995).
12. Suga, S. I. et al. Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells—evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* 133, 3038–3041 (1993).
13. Vollmar, A. M. & Schulz, R. Expression and differential regulation of natriuretic peptides in mouse macrophages. *J. Clin. Invest.* 95, 2442–2450 (1995).
14. Anand-Srivastava, M. B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 26, 1044–1059 (2005).
15. Brenner, B. M., Ballermann, B. J., Gunning, M. E. & Zeidel, M. L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol. Rev.* 70, 665–699 (1990).
16. Hunt, P. J., Richards, A. M., Espiner, E. A., Nicholls, M. G. & Yandle, T. G. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 1428–1435 (1994).
17. Wendt, D. J. et al. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 353, 132–149 (2015).
18. Lorget, F. et al. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a Fgfr3 mouse model recapitulating achondroplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 1108–1114 (2012).
19. G. Lumsden, N., S. Khambata, R. & J. Hobbs, A. C-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr. Pharm. Des.* 16, 4080–4088 (2010).
20. Bae, E. H., Kim, I. J., Ma, S. K. & Kim, S. W. Altered regulation of renal sodium transporters and natriuretic peptide system in DOCA-salt hypertensive rats. *Regul. Pept.* 157, 76–83 (2009).
21. Ding, D. Z. et al. C-type natriuretic peptide prevents angiotensin II-induced atrial connexin 40 and 43 dysregulation by activating AMP-activated kinase signaling. *Mol. Med. Rep.* 20, 5091–5099 (2019).
22. Izumiya, Y. et al. Chronic C-Type Natriuretic Peptide Infusion Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Superoxide Production and Cardiac Remodeling. *Int. J. Vasc. Med.* 2012, (2012).
23. Walther, T., Schuitheiss, H. P. & Tschöpe, C. Impaired angiotensin II regulation of renal C-type natriuretic peptide mRNA expression in experimental diabetes mellitus. *Cardiovasc. Res.* 51, 562–566 (2001).
24. Koller, K. J. et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252, 120–123 (1991).
25. Guo, J. Y. et al. The role of CNP-mediated PKG/PKA-PLC β pathway in diabetes-induced gastric motility disorder. *Peptides* 110, 47–55 (2018).

26. Meier, S. et al. PDE3 inhibition by C-type natriuretic peptide-induced cGMP enhances cAMP-mediated signaling in both non-failing and failing hearts. *Eur. J. Pharmacol.* 812, 174–183 (2017).
27. Nie, H. G. et al. 8-pCPT-cGMP stimulates $\alpha\beta\gamma$ -ENaC activity in oocytes as an external ligand requiring specific nucleotide moieties. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 298, 323–334 (2010).
28. Nie, H. G. et al. Regulation of epithelial sodium channels by cGMP/PKGII. *J. Physiol.* 587, 2663–2676 (2009).
29. Gilbertson, T. A., Roper, S. D. & Kinnamon, S. C. Proton currents through amiloride-sensitive Na⁺ channels in isolated hamster taste cells: enhancement by vasopressin and cAMP. *Neuron* 10, 931–942 (1993).
30. Guo, L. J., Alli, A. A., Eaton, D. C. & Bao, H. F. ENaC is regulated by natriuretic peptide receptor-dependent cGMP signaling. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 304, 930–937 (2013).

Regulatory Mechanisms of Peripheral Salt Sensitivity by Natriuretic Peptides

Shingo Takai¹, Noriatsu Shigemura¹, Yuka Sugawara²

¹ Kyushu University Graduate School of Dental Science, ² Ajinomoto Co., Inc.

Summary

Na⁺ is one of the most important minerals for living organisms, and animals need to ingest sufficient amounts of Na⁺ to maintain vital activity. Recent studies suggest that an animal's taste sensitivity is dynamically optimized to reflect the nutritional status of the whole body, enabling efficient nutritional intake in response to biological demands. About the salt taste, in mice, angiotensin II (AngII), a hormone that stimulates the secretion of aldosterone, which increases blood pressure and promotes Na⁺ absorption in the renal collecting ducts, has been reported to act as a suppressor for the salt taste sensitivity. This regulation mechanism promotes active salt intake when Na⁺ is deficient. However, how animals' peripheral salt sensitivity and salt ingestion behavior are regulated when there is an excess of Na⁺ in the body. In this study, we focused on natriuretic peptide (NP), a bioactive peptide involved in the regulation of blood pressure and mineral balance. There is an excess of Na⁺ in the bloodstream, NP synthesis and secretion are promoted, and inducing increased diuresis and decreased blood pressure. Our experiments revealed the expression of two subtypes of NP receptors (NPRB and NPRC) in mouse taste buds. NPRB is highly coexpressed with epithelial sodium channel (ENaC), a salt taste receptor subunit. Moreover, pharmacological activation of NPRB signaling by vosoritide, a synthesized NPRB ligand, specifically enhanced amiloride-sensitive (ENaC-mediated) NaCl taste responses without affecting other taste qualities (sweet, umami, bitter and sour) in chorda-tympani nerve response recording experiments. Finally, we found that the activation of NPRB signaling significantly suppressed NaCl preference in the physiological concentration range in short-time lick tests. Altogether, NPRB signaling in the peripheral taste system may specifically increase ENaC-mediated salt taste sensitivity, and reduce salt intake when excessive sodium is present in the body. This regulatory mechanism may be one of the important regulatory systems that define salt intake behavior in animals.