

苦味受容体の高濃度塩味受容機構解析

中北 智哉

明治大学農学部

概要

研究では苦味受容体が高濃度塩に対して応答する機構を理解することを目的としている。苦味受容体 T2R は G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、ヒトでは 25 種存在する。これらは 7 回膜貫通型構造という GPCR の特徴は有しているものの、一般的な GPCR (class A GPCR) とは配列的特徴が異なることから、class T に分類されている。class A GPCR においては generic GPCR numbering に基づく 2.50 とよばれるポジションの残基は負電荷の Asp であり、対となる形で Na⁺イオンを構造内に保持していることが知られている。ところが、T2R の 2.50 ポジションの残基は正電荷の Arg であり、class A GPCR とは逆になっている。このことから、T2R は Cl⁻イオンと相互作用することが可能であると推測された。一方、マウス舌における電気生理学的実験から、高濃度塩 (150 mM 以上) に対する忌避味は酸味細胞と苦味細胞に由来する複合味であり、苦味受容体のシグナル伝達因子をノックアウトした個体では高濃度塩に対するシグナルも半減 (酸味細胞側刺激は残る) するとされている (Oka et al., *Nature*, 2013)。

以上の知見を踏まえ、申請者は高濃度塩の忌避シグナルの一方は Cl⁻イオンを苦味受容体が受容することでもたらされていると仮定して研究を行った。

培養細胞による測定を試みたものの、浸透圧の関係で高濃度塩の応答を取得することが困難であった。様々な条件検討の結果、N-methyl-D-glucamine とグルコン酸をベースに、唾液と同程度のミネラルを含有するバッファーを作製することで苦味受容体特異的な細胞応答を取得することに成功した。

このバッファーを用いて 25 種類の苦味受容体の 100 mM NaCl に対する応答を測定したところ、よく応答するもの、応答が認められないものなど様々であった。

本研究では測定系の構築に時間がかかってしまったため、高濃度塩に対する様々な応答が得られたものの、これらの違いについては解明するに至らなかった。既に明らかにされている T2R46 の構造や、ごく最近報告された T2R14 の構造を元に、引き続きこれらの応答の違いがどのようにもたらされるのか、MD シミュレーションなどを用いて検証していく予定である。

1. 研究目的

苦味受容体 T2R は G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、ヒトでは 25 種存在することが知られている。これらは 7 回膜貫通型構造という GPCR の特徴を有しているものの、一般的な GPCR (class A GPCR) とは配列的特徴が異なることから、class T GPCR とカテゴリーされている。class A GPCR においては 2 番目の α -ヘリックスにおいて

最も保存性の高い残基 (generic GPCR numbering に基づき 2.50 ポジションとよばれる) は負電荷の Asp であり、対となる形で Na⁺イオンを構造内に保持していることが知られている⁽¹⁾。ところが、T2R の 2.50 ポジションの残基は正電荷の Arg であり、class A GPCR とは逆になっている。このことから、T2R は Cl⁻イオンと相互作用することが可能であると推測された。一方、マウス舌における電気生理学的実

験から、高濃度の塩 (150 mM 以上) に対する忌避味は酸味細胞と苦味細胞に由来する複合味であり、苦味受容体のシグナル伝達因子をノックアウトした個体では高濃度塩に対するシグナルも半減 (酸味細胞側刺激は残る) するとされている⁽²⁾。これらの知見を踏まえ、申請者は高濃度塩の忌避シグナルの一方は Cl⁻イオンが苦味受容体に受容されることでもたらされていると仮定して研究を行うこととした。

2. 研究方法

2.1 培養細胞を用いた高濃度塩測定系の確立

2.1.1 測定バッファの検討

本研究には培養細胞 HEK293T を用いて、苦味受容体及び G16/Ggust キメラ G タンパク質 (Ca²⁺ をセカンドメッセンジャーとする G16 の C 末端を苦味受容体固有の G タンパク質 gustducin に変換したもの) を一過的に発現させた上で、Gq 系シグナル依存的な細胞内 Ca²⁺ イオン濃度上昇を Ca²⁺ 蛍光指示薬で検出する手法を用いた。

高濃度の塩を培養細胞に投与するにあたり、一般的な細胞外液組成に含まれる NaCl の濃度、及び浸透圧の問題が挙げられた。マウスに対する NaCl の嗜好性を評価すると、150 mM 程度から NaCl に対する嗜好性は低下することが知られているため⁽³⁾、高濃度忌避性応答を測定すべきは 150 mM 以上の NaCl を培養細胞へ投与する必要がある。そこでまずはどの程度の塩濃度に対して細胞が耐えられるのか、浸透圧の条件検討をしなくてはならなかった。苦味受容体やキメラ G タンパク質を発現させていない基の HEK293T 細胞に対し NaCl を投与し、Ca²⁺ 蛍光指示薬で検出したところ、250 mM NaCl 程度までの NaCl に対して細胞内応答は検出されなかった。よってこの濃度までの NaCl 濃度投与は可能であると判断した。

次に、通常の生理食塩水塩分濃度のバッファ組成では既に 150 mM NaCl がバッファに含まれていることから、仮に苦味受容体が 150 mM の NaCl に応答するとしても、バッファ中の NaCl により脱感作している可能性が考えられた。そこでバッファ中の NaCl の量を減らした組成のバッファを作製する必要がある。さまざまな条件検討の結果、NaCl の代わりに N-メチル-D-グルカミン (NMDG) 及びグルコン酸を用いたバッファに置換することで、この問題の解決を図った。ただし、完全に NaCl、KCl を抜いてしまうと途端に細胞が死滅してしまうことから、実際の口腔環境に合わせた唾液程度の塩濃度を添加し

た上で⁽⁴⁾、浸透圧をグルコン酸 NMDG で調整したバッファを用いることで NaCl に対する細胞応答を取得することに成功した。

2.1.2 キメラ G タンパク質の安定発現化

使用した元細胞、HEK293T 細胞そのものに対し高濃度塩を投与した際に非特異的な応答が認められないことが確認されたものの、苦味受容体の有無に関わらず一過的に発現させたキメラ G タンパク質によって非特異的な Ca²⁺ 上昇が認められ、苦味受容体依存的な応答であるかの判断が難しい状態であった。上記非特異的な応答は余剰に発現しているキメラ G タンパク質が問題であると判断し、細胞内の発現量をコントロールすべく、キメラ G タンパク質の安定発現株化を実施した。一般的に一過性発現よりも安定発現株の方が発現量はマイルドになる。安定発現株は pcDNA5 FRT ベクターにキメラ G タンパク質 G16gust44、G15i2 など各遺伝子を組み込んだものを遺伝子導入した後に、hygromycinB によるセレクションにより実施した。実際、G16gust44 の安定発現株、及び G15i2 の安定発現株の 2 系統で試したところ、G15i2 を安定発現する細胞を用いることで余剰 G タンパク質の応答を抑え、苦味受容体特異的な応答を取得することに成功した。

2.2 培養細胞を用いた高濃度塩測定

2.2.1 25 種類の苦味受容体の応答の確認

各苦味受容体の高濃度塩に対する高騰を測定するため、25 種の苦味受容体遺伝子を pcDNA3.4 ベクターに組み込んだ。さらには、細胞表面への発現を担保すべく、N 末端に FLAG-タグを配し、次いで発現量の増大を見込み、ratSSTR3 (ラットのソマトスタチン受容体 3) の N 末端の配列を苦味受容体に付したコンストラクトを作製した。また塩受容にキーとなっていると期待される Arg²⁵⁰ の重要性を調べるため、25 種類で唯一 Thr²⁵⁰ を有している T2R42 に倣い、他 24 種の苦味受容体においては R2.50T 変異体を作製 (T2R42 は T2.50R 変異体) し、同様に測定を行った。

遺伝子導入にはリポフェクタミン 2000 を用いた。苦味受容体特異的な応答であることを担保するため、mock として空の pcDNA3.4 ベクターを、class A GPCR としてヒスタミン受容体 HRH1 も同様に測定を行った。

測定は FlexStation3 (Molecular Devices) で行い、Ca²⁺ 6 assay kit (Molecular Devices) の蛍光指示薬をロードしてから 1 時間後に 37°C で測定を行った。

2. 2. 2 FACS による各受容体の膜表面発現量の確認

各受容体を測定と同条件で遺伝子導入し、一過的に発現させた細胞に対して、N 末端に配した FLAG-タグに anti-FLAG-FITC を作用させることで蛍光標識し、FACS に供することで、膜表面の発現量を解析した。

3. 研究結果

3. 1 実験方法の確立、条件検討の結果

まずは元細胞 HEK293T に対し、高濃度 NaCl を投与した場合に非特異的な応答を示さないことを確かめる必要があった。結果を図 1 に示す。図 1 の mock が HEK293T における、Ca²⁺濃度上昇値応答挙動を観察したものである。この結果を見るに mock において 130 mM NaCl を投与した際の応答と 250 mM NaCl の応答に差がないことがわかる。このことから、250 mM NaCl までは培養細胞への浸透圧等の問題を考慮せず投与可能であると判断した。なお、同様に測定を行った苦味受容体 T2R14 においては、130 mM NaCl を投与した場合に比べ、250 mM NaCl を投与した場合において有意な応答が認められた。この応答は、塩受容が関与していると期待される Arg2.50 を Thr に変えた変異体においては観察されず、同様に class A GPCR として観察したヒスタミン H1 受容体でも観察されなかった。

このようにして 250 mM NaCl という濃度では、苦味受容体の応答が特異的である可能性が見出された。ではどの程度の濃度から高濃度塩の応答が見出されるのかを調べる必要があった。ここで、忌避性の塩味応答は 150 mM NaCl 程度から観察されることから、150 mM でも応答が観察されるような系を構築する必要があった。ところが、現行の 150 mM NaCl を含むバッファー組成では 150 mM NaCl に対する応答を見出すことが難しいことから、バッファー組成の検討を行った。唾液程度の塩濃度に保ちつつグルコン酸 NMDG に変換した結果を図 2 に示す。

各濃度帯の棒グラフの一番左に示したものが遺伝子導入をしていない HEK293T そのもの応答(Basal な応答)。その隣のものがキメラ G タンパク質 G16gust44 を発現させたものである。まず、この 2 条件をくらべた際に、G16gust44 を発現させたものの応答が NaCl の濃度に依存せず、極めて大きいことがわかる。更には各苦味受容体+G16gust44 に対する発現させた場合は G16gust44 のみを発現させた場合よりも応答小さくなった。これは余剰分の G タンパク質がこの非特異的の応答の大きさに寄与していることを示唆する結果となった。こ

のため、例えば T2R14 単独で見た場合には(左から 6 番目の棒グラフ)NaCl 濃度依存的に応答が得られているように見受けられるが、隣の T2R14(R55T)変異体ではこのような濃度依存性は見られず、むしろ T1R14 よりも大きな応答が得られてしまっていた。

このような状況を打開するため、キメラ G タンパク質の発現量を抑え、余剰キメラ G タンパク質を減らすべく、安定発現株の作製を試みた。G16gust44 安定発現細胞では(図 3a)、T2R14 のリガンドであるアリストロキア酸に対する応答が野生型でもそれほど大きな応答が得られず、R55T 体では低濃度ほど強い応答が得られ、これは野生型の応答値を上回っていた。このことから上記余剰キメラ G タンパク質による応答が抑えられていないと判断した。一方で G15i2 を用いたところ(図 3b)、野生型ではアリストロキア酸の濃度依存的な応答をしっかりと描くことができ、かつ R55T 体ではその応答がほとんど認められなかった。

この結果を受け、NaCl に対する応答も測定したところ、150 mM, 200 mM, 250 mM において野生型, R55T 体間での有意な応答値の差の検出に成功した。

以上の条件検討をまとめると、グルコン酸 NMDG を含む唾液中程度の塩濃度を有するバッファーに対して、キメラ G タンパク質 G15i2 を安定発現する細胞を使用することで苦味受容体特異的な高濃度の塩に対する応答を検出することが可能となった。

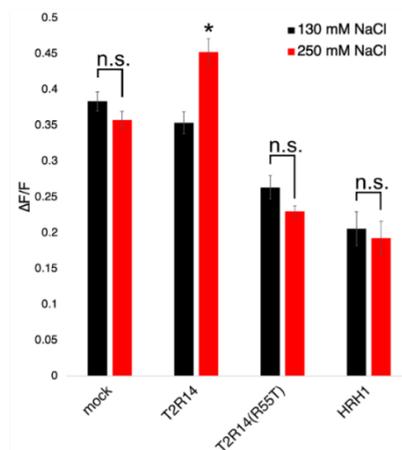


図 1. 130 mM NaCl 投与時、250 mM NaCl 投与時のそれぞれの応答値

mock: HEK293T 細胞。T2R14: 苦味受容体の一つ T2R14 及びキメラ G タンパク質 G16gust44 を発現させたもの。
T2R14(R55T): T2R14 の 2.50Arg を Thr に置換した変異体。
HRH1: class A GPCR ヒスタミン受容体を発現させたもの。
n = 3 (mean ± SEM), *: student's t-test p < 0.05, n.s.: non-significant

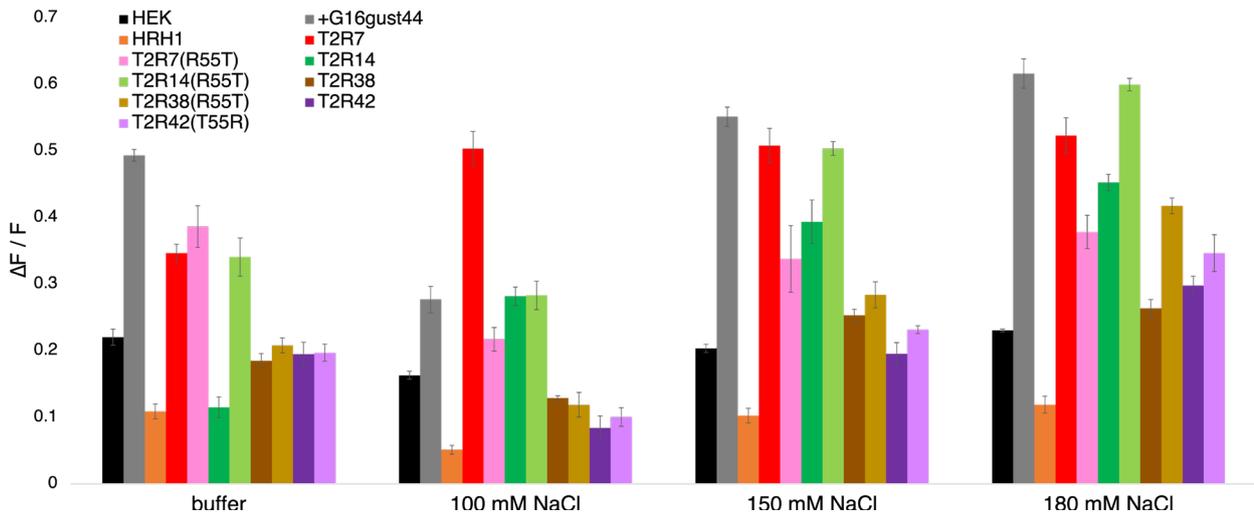


図 2. グルコン酸 NMDG を用いたバッファーによる測定結果

左からバッファーそのもののかけた場合。100 mM, 150 mM, 180 mM NaCl を投与した場合の応答を示す。

棒グラフは左から HEK293T (遺伝子導入なし), G16gust44 のみを, HRH1 のみ, T2R7+G16gust44, T2R7(R55T) +G16gust44, T2R14+G16gust44, T2R14(R55T)+G16gust44, T2R38+G16gust44, T2R38(R55T)+G16gust44, T2R42+G16gust44, T2R42(T55R) +G16gust44。n=3 (mean ± SEM)

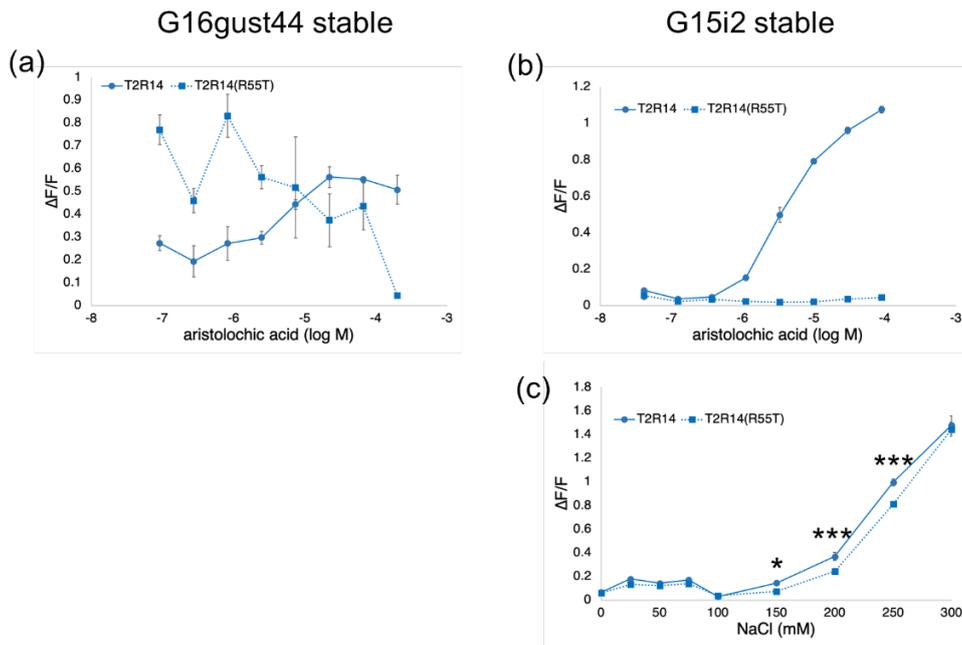


図 3. キメラ G タンパク質の安定発現株化

(a) G16gust44 安定発現株による T2R14 に対するアリストロキア酸の応答。実線は野生型, 点線は R55T 変異体の値を示す。

(b) G15i2 安定発現株による T2R14 に対するアリストロキア酸の応答。

(c) G15i2 安定発現株による T2R14 に対する NaCl の応答。

n=3 (mean ± SEM)

3. 2 25 種類の苦味受容体及び R2.50T 変異体における高濃度塩応答の確認

3. 1 節における条件検討の結果, 苦味受容体の高濃度塩応答測定が可能となったことから, 全 T2R とその

R2.50T 変異体 (T2R42 は T2.50R) に対する応答を測定した。なお, T2R20 については SNP で R2.50K も存在していることから, こちらも検討を行った。100 mM NaCl に対する結果を図 4 に示す。

予想に反し, mock の G15i2 安定発現株に比べ, ヒスタミン受容体 H1 を一過的に発現させた細胞において 100 mM NaCl に対する応答が認められてしまった。同時に測定を行ったうま味受容体 T1R1/T1R3, 甘味受容体 T1R2/T1R3 においても同様に応答が認められた。一方で, 25 種類の苦味受容体の応答を測定したところ, H1 受容体やうま味, 甘味受容体の応答に比べ優位に強い応答が得られた受容体が存在した。具体的には T2R7, 8, 16, 20, 40, 41, 43, 46, 50 である。一方で, その他の苦味受容体については NaCl に対する応答が認められなかった。R2.50T 変異体に着目すると, 野生型で応答が認められた苦味受容体のうち, T2R8, 40, 41 は変異体でも応答が認められたものの, 残りの T2R7, 16, 20, 43, 46, 50 は変異体での応答が認められなかった。2.50R に着目する限り, このように NaCl に対する応答が認められないもの, 野生型では NaCl の応答が認められるが変異体では認められないもの, 野生型でも変異体でも応答が認められるもの, という 3 種のタイプ苦味受容体が存在することが明らかになった。

なお, これらの応答が発現量の違いによって生じている可能性が考えられたことから, FACS による膜表面発現を確認した(表 1)。NaCl に対して応答しない苦味受容体については膜表面発現量が低い可能性は挙げられたものの, 少なくとも上記 T2R7, 8, 16, 20, 40, 41, 43, 46, 50 については変異体による発現量に減少は認められなかった。

表 1. anti-FLAG-FITC を用いた FACS による各受容体の細胞表面への発現量の計測

	野生型発現細胞数(%)	R ^{2.50} T変異体発現細胞数(%)
T2R1	26.2	4.73
T2R3	10.1	10.9
T2R4	50.2	44.4
T2R5	32.1	20.3
T2R7	15.1	21.1
T2R8	36.5	52.9
T2R9	25.5	33.7
T2R10	28.2	13.5
T2R13	23.5	14.3
T2R14	16.5	15.4
T2R16	43.6	49.5
T2R19	24.3	35.2
T2R20	18.8	20.0
T2R30	9.91	12.6
T2R31	26.2	21.3
T2R38	22.8	28.0
T2R39	12.7	18.5
T2R40	19.8	43.2
T2R41	23.2	22.7
T2R42	23.0	16.0
T2R43	12.9	61.8
T2R45	6.67	8.61
T2R46	16.3	16.5
T2R50	20.3	16.7
T2R60	15.8	51.2

野生型に比べ, 変異体で発現量が低下しているものを橙色, 特に少ないものを赤色, 逆に増加したものを青色で示した。

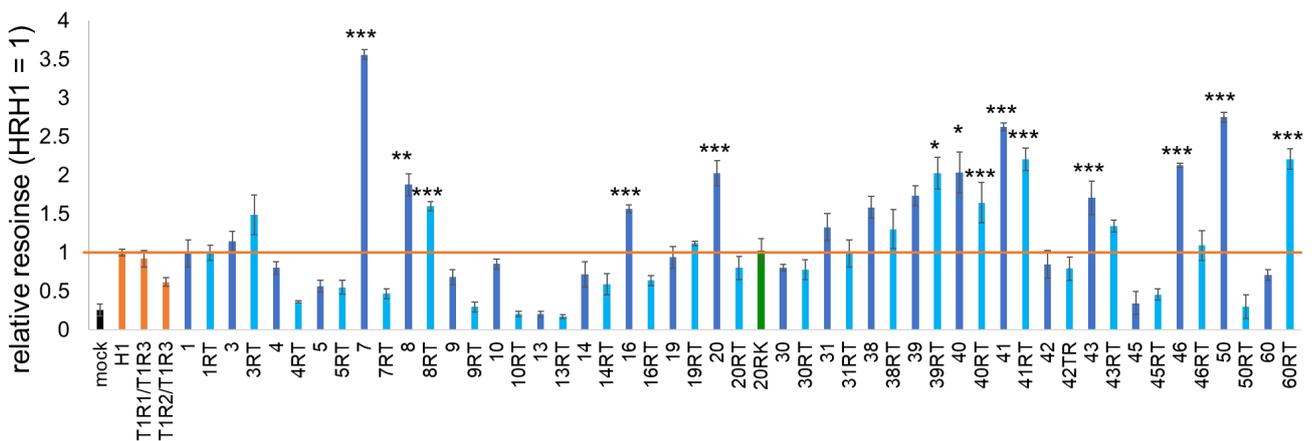


図 4. 各苦味受容体及び R2.50T (T2R42 は T2.50R) 変異体における 100 mM NaCl に対する応答
 mock: キメラ G タンパク質 G15i2 安定発現細胞, HRH1: ヒスタミン受容体 H1, T1R1/T1R3: うま味受容体 T1R2/T1R3: 甘味受容体。
 T2R20 は SNP で R2.50K が存在。

n = 3 (mean ± SEM), *: student's t-test p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.005

4. 考察

本研究は、苦味受容体が高濃度の NaCl に応答することを示した初めての成果であるといえる。しかしながら、条件検討に時間を要したため、苦味受容体に Na⁺が重要なのか、Cl⁻が重要なのか、その結論を出すには至らなかった。だが、少なくともいくつかの R2.50T 変異体によって苦味受容体の NaCl 応答が消失したことから、やはり Arg の正電荷が重要であり、Cl⁻がこの残基とインタラクションする可能性が考えられる。R2.50T 変異体では NaCl に対する応答が苦味受容体 T2R7, 16, 20, 43, 46, 50 においては消失した。これら受容体の FACS 評価においては野生型に対して変異体の発現量が低下することはなかったことから、野生型変異体間の応答の差はやはり Arg2.50 に起因すると考えられた。この中でも興味深いのは T2R46 である。T2R46 については既に構造が明らかにされている⁶⁾。そこで Cl⁻が実際にどこに受容されるのかをシミュレーションしていくことが可能である。

一方、最も大きな応答を示した T2R7 についてであるが、2 通りの応答原理がはたらいっている可能性が挙げられた。T2R7 は金属イオンを受容する苦味受容体として知られている。従って、私の仮説通り苦味受容体が高濃度の Cl⁻を受容する可能性、あるいは Na⁺をリガンドとして受容している可能性、もしくはその両方が考えられた。

また T2R8, 40, 41 については苦味受容体の応答が認められるものの、2.50 変異体においてもこの応答が減弱することなくほぼ同等の応答を示すものであった。これらは Arg2.50 とは異なる苦味受容システムが存在する可能性が挙げられ、引き続き探索を行う必要がある。

5. 今後の課題

まずは早急に Na⁺, Cl⁻のどちらが苦味受容体の応答に重要であるかを明らかにしなくてはならない。そのためには NMDG-HCl やグルコン酸 Na を用いる予定である。また、前述した T2R46 の構造を用いたシミュレーションを実施していかなくてはならない。更には、2024 年 4 月に T2R14 の構造が新たに発表されたことから⁶⁾、こちらについても解析を進める必要がある。今回の測定結果では T2R14 は 100 mM NaCl に対しては応答を示さない受容体

であった。T2R46 は今回の実験で見出した高感受性タイプであったことから、低感受性タイプである T2R14 の構造や Cl⁻との相互作用の具合を比較することで、これらの塩感受性の違いについての考察が可能となることが期待される。

一方で、T2R46 や T2R14 の構造から見るに Arg2.50 の近傍に、同様に塩基性アミノ酸である His7.49 も存在している。R2.50T 変異でも NaCl に対する応答を保っていた T2R8, 40, 41 についてはこちらの残基が重要である可能性もある。したがって、R2.50 のみならず H7.49 も Cl⁻との相互作用候補として加え、更なる実験を実施していきたい。

6. 文献

1. G. Fenalti, P. M. Giguere, V. Katritch, X. Huang, A. A. Thompson, V. Cherezov, B. Roth and R. C. Stevens, Molecular control of δ -opioid receptor signalling, *Nature*, 2014, Feb, 13;506(7487):191-6.
2. Y. Oka, M. Butnaru, L. V. Buchholtz, N. J. P. Ryba and Charles S Zuker, High salt recruits aversive taste pathways, *Nature*, 2013, Feb 28;494(7438):472-5.
3. M. Narukawa, R. Matsuda, I. Watari, T. Ono and T. Misaka, Effect of salivary gland removal on taste preference in mice, *Pflugers. Arch.*, 2024 Jan;476(1):111-121.
4. J. J. Pytko-Polonczyk, A. Jakubik, A. Przeklasa-Bierowiec and B. Muszynska, Artificial saliva and its use in biological experiments, *J Physiol Pharmacol*, 2017 Dec;68(6):807-813.
5. W. Xu, L. Wu, S. Liu, X. Liu, X. Cao, C. Zhou, J. Zhang, Y. Fu, Y. Guo, Y. Wu, Q. Tan, L. Wang, J. Liu, L. Jiang, Z. Fan, Y. Pei, J. Yu, J. Cheng, S. Zhao, X. Hao, Z. Liu and T. Hua, Structural basis for strychnine activation of human bitter taste receptor TAS2R46, *Science*, 2022, Sep 16;377(6612):1298-1304.
6. Y. J. Kim, R. H. Gumpfer, Y. Liu, D. D. Kocak, Y. Xiong, C. Cao, Z. Deng, B. E. Krumm, M. K. Jain, S. Zhang, J. Jin and B. L. Roth, Bitter taste receptor activation by cholesterol and an intracellular tastant, *Nature*, 2024 Apr;628(8008):664-671.

Reception Mechanism of Bitter Taste Receptors for High Salt

Tomoya Nakagita

School of agriculture, Meiji University

Summary

This study aims to understand the mechanisms that bitter taste receptors respond to high salt. The bitter taste receptor T2R is a G-protein-coupled receptor (GPCR), which consists 25 subtypes in human. Although they have a common feature, seven-transmembrane structure, they differ in sequence features from the generic GPCRs (class A GPCRs). So T2Rs are classified as class T GPCR. In class A GPCRs, the residue in position 2.50, based on generic GPCR numbering, is a negatively charged Asp and is known to hold Na⁺ in the structure in a paired form with the Asp. However, the residue at position 2.50 in T2R is a positively charged Arg, which is the opposite of that in class A GPCRs. This suggests that T2R is capable of interacting with Cl⁻. On the other hand, electrophysiological experiments on the mouse tongue have shown that the aversive taste against high salt (>150 mM) is a complex taste originating from sour and bitter cells. The individuals a bitter receptor signalling factor knocked out, lost their signal to high salt is also halved (although stimulation on the sour cell side remains) (Oka et al., Nature, 2013). Based on these findings, I conducted research on the assumption that one of the repellent signals for high salt concentrations is caused by the reception of Cl⁻ by bitter taste receptors.

Despite attempts to measure this in cultured cells, it was difficult to obtain a response to high salt due to osmotic pressure. After examining various conditions, we succeeded in obtaining bitter taste receptor-specific cellular responses by preparing a buffer based on N-methyl-D-glucamine and gluconic acid and containing the same level of minerals as saliva.

Using this buffer, the responses of 25 bitter taste receptors to 100 mM NaCl were measured, with some T2Ra responding well and others showing no response.

Although various responses to high salt were obtained, these differences could not be elucidated because constructing measurement system wasted much time. Based on the structure of T2R46, which has already been clarified, and the structure of T2R14, which has been reported very recently, we will continue to verify how these different responses are brought about, using MD simulations and other methods.