



酸味受容体の発見とその味覚伝達機構の解明

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 特任助教 石丸喜朗

はじめに

食は生命の根源である。ヒトを含むすべての動物は、食物の栄養性（糖・アミノ酸含量）、毒性（苦味強度）、塩濃度、酸性度を、味覚系を用いて評価している (*Odontology*, 2009; *J. Dent. Res.*, 2009)。口腔内に取り込まれた食物が、主に舌上皮の味蕾に存在する味覚受容体によって受容されると、細胞内シグナル伝達系を介して味細胞の脱分極が引き起こされ、味細胞に投射している味神経に向けて神経伝達物質が放出される。味神経に伝達されたシグナルは数段階の神経細胞を経由し、最終的に大脳皮質味覚野に到達して味が認知される。

味は、甘味、苦味、酸味、塩味、うま味の5基本味に分類される。最近約10年間に、末梢組織である味蕾における甘味、苦味、うま味受容の分子機構に関しては、受容体からその下流のシグナル伝達因子など、多くの知見が得られている。一方、酸味と塩味に関しては、味覚受容体をはじめとするシグナル伝達機構に未解明の問題が数多く残されている。筆者は酸味受容・伝達の分子機構の全容解明を目指し、世界をリードする研究を展開してきた。以下に主な研究概要を述べる。

1. 酸味受容体 PKD1L3/PKD2L1 の発見

Transient receptor potential (TRP) チャネルファミリー分子は、視覚、嗅覚、温度感覚などさまざまな感覚系において、受容体やシグナル伝達因子として重要な役割を果たす。筆者らは、33種類ある広義の TRP チャネルファミリー分子に関して、マウス有郭乳頭味蕾における網羅的な発現解析を行った。その結果、甘味・苦味・うま味の細胞内シグナル伝達への関与が知られていた *Trpm5* に加えて、二つの分子 *Pkd1l3* と *Pkd2l1* が味蕾中の一部の味細胞に特異的に発現することを発見した (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006)。*Pkd1l3* と *Pkd2l1* はそれぞれ、多嚢胞性腎疾患の原因遺伝子 *PKD1* と *PKD2* と相同性があり、PKD1L3 は長い N 末端細胞外領域をもつ 11 回膜貫通型、PKD2L1 は 6 回膜貫通型と予想される機能未知の分子であった (図 1)。

Pkd1l3 と *Pkd2l1* は舌後部の有郭・葉状乳頭では味蕾中の約 20% を占める同一の細胞に共発現するのに対して、舌前部の茸状乳頭と軟口蓋では *Pkd2l1* だけが発現していた。また、*Pkd1l3* や *Pkd2l1* は、甘味・苦味・うま味を受容する細胞とは異なる細胞に発現した (図 2A)。ところで、1 個の味蕾は約 50~100 個の細胞からなり、古くから電子顕微鏡観察による細胞形態と細胞内微細構造に基づいて、紡錘形をした I 型、II 型、III 型細胞と基底部に存在する丸型の IV 型細胞に分類されている。この発見以前は、甘味・苦味・うま味物質は味蕾の II 型細胞で受容され、シナプス構造の存在が観察される III 型細胞は、II 型細胞で感知された味情報を味神経へと伝達する働きをされると考えられていた。しかし、免疫電子顕微鏡法を用いた解析から、*Pkd2l1* を発現する細胞は III 型細胞であること

(*Chem. Senses*, 2008)、*Pkd2l1* 発現細胞をジフテリア毒素によって特異的に死滅させた遺伝子改変マウスでは、酸味刺激に対する味神経応答が消失する報告などから、III 型細胞は酸味を感知する機能をもつことが示された。つまり、筆者の研究は解剖学的な分類を細胞機能の観点から解明した点で重要である。

次に、培養細胞発現系を用いて、両分子が味覚系において果たす役割を解析した。*Pkd1l3* と *Pkd2l1* を HEK293T 細胞に発現させるとヘテロマーを形成し、その共発現が細胞膜表面における機能的な発現に必要であった。Ca²⁺ イメージング法とパッチクランプ法による機能解析では、酸味以外の 4 基本味物質には応答しなかったが、クエン酸や酢酸などさまざまな酸溶液に対して、酸刺激除去後に応答する「オフ応答」を示した (図 2B) (*EMBO Rep.*, 2008; *BBRC*, 2009)。これは、例えばレモンをかじったとき、徐々に唾液が出てきて最後に酸味が強くなる現象を反映するものと解釈できる。最近、*Pkd2l1* が単独で発現する茸状乳頭から単離した III 型細胞では、酸刺激時の「オン応答」だけが観察されるのに対して、両分子が共発現する有郭乳頭から単離した III 型細胞では、「オン応答」と「オフ応答」が引き起こされることが報告された。この実験結果は、PKD1L3/PKD2L1 複合体が生体でも「オフ応答」を司る酸味受容体として機能する可能性を示唆している。

さらに、両分子のさまざまな欠失変異体やアミノ酸点変異体を作製し、構造・機能相関について詳細に解析した (*FASEB J.*, 2010; *BBRC*, 2011)。まず、共免疫沈降実験を行って、両分子間の相互作用に重要な領域がそれぞれの膜貫通ドメインであることを決定した。相互作用に重要な領域を欠失した変異体

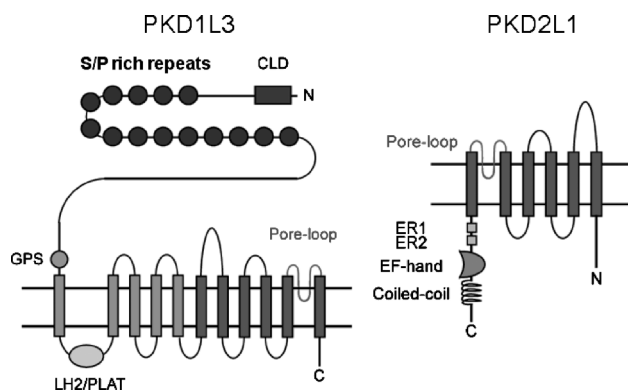


図 1 PKD1L3 と PKD2L1 の構造模式図

PKD1L3 は長い N 末端細胞外領域をもつ 11 回膜貫通型、PKD2L1 は 6 回膜貫通型と予想される広義の TRP チャネルファミリー分子である。PKD2L1 の C 末端細胞内領域には、EF-hand ドメインや coiled-coil ドメインが含まれる。両分子はそれぞれの膜貫通領域を介してヘテロマーを形成し、酸刺激除去後に応答する「オフ応答」を示した。

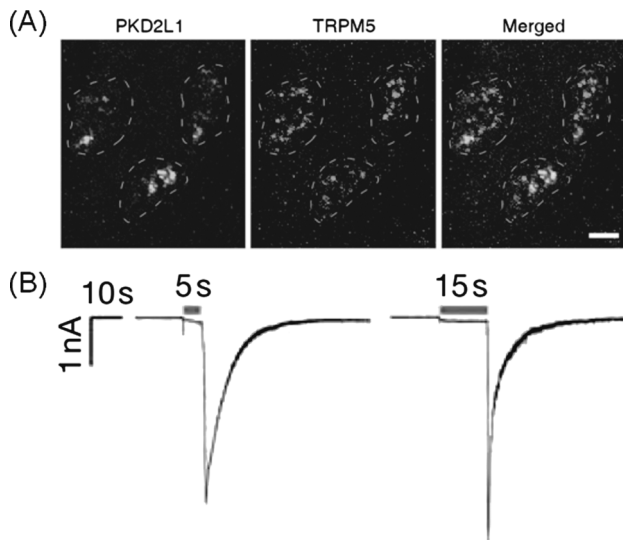


図2 *In situ* hybridization 法を用いた *Pkd2l1* の発現解析 (A) と培養細胞発現系を用いた機能解析 (B)
 (A) *Pkd2l1* は *Pkd1l3* とともに、甘味、苦味、うま味を受容する II 型細胞 (*Trpm5* 陽性細胞) とは異なる III 型細胞特異的に発現する。
 (B) *Pkd1l3* と *Pkd2l1* を共発現させた HEK293T 細胞において、酸溶液投与 (横線) の除去直後に「オフ応答」が観察された。

は、チャネルとして機能するために必要な細胞表面に輸送されなかった。Ca²⁺ イメージング法を用いた機能解析から、PKD2L1 の C 末端細胞内領域に存在する EF-hand ドメインと coiled-coil ドメインは、酸応答には必要でないことが明らかとなった。パッチクランプ法による機能解析からは、PKD1L3/PKD2L1 複合体は、高い Ca²⁺ 透過性を示す非選択的陽イオンチャネルであることが示された。この Ca²⁺ 透過機構を調べるために、両分子の推定ポア領域内に存在する酸性アミノ酸の点変異体を作製し、Ca²⁺ イメージング法を用いた機能解析を行った。PKD2 ファミリー間で保存された PKD2L1 の Asp⁵²³ 残基を Asn 残基に置換すると、細胞膜表面における発現は観察されたが、Ca²⁺ 透過性を示さなかった。一方、他の 4 種類の点変異体では、Ca²⁺ 透過性に変化は見られなかった。以上の結果から、PKD2L1 の推定ポア領域内に存在する Asp⁵²³ 残基が、PKD1L3/PKD2L1 複合体が示す高い Ca²⁺ 透過性に重要であることと、PKD2L1 がポア形成に関与することが明らかとなった。

2. *Pkd1l3* および *Pkd2l1* 遺伝子破壊マウスの作出と表現型解析

生体内における両分子の機能を解明するために、各遺伝子単独と二重遺伝子破壊マウスを作成し、その表現型を解析した (*FASEB J.*, 2010; *PLoS One*, 2011)。その結果、野生型マウスでは、PKD2L1 タンパク質は味物質と接触する味孔部位に局在するのに対して、PKD2L1 との相互作用に重要な膜貫通領域を欠失させた *Pkd1l3* 変異マウスの有郭・葉状乳頭味蕾では、野生型と異なり、PKD2L1 タンパク質は細胞質全体に分布していた (図 3A)。つまり、培養細胞発現系と同様に味細胞でも、両分子の膜貫通領域を介した相互作用は、細胞表面への移行に重要であることが明らかになった。次に、酸味刺激に対する味神経の応答を電気生理学的な手法を用いて調べた。*Pkd2l1* 変異マウスと二重変異マウスでは、茸状・葉状乳頭味

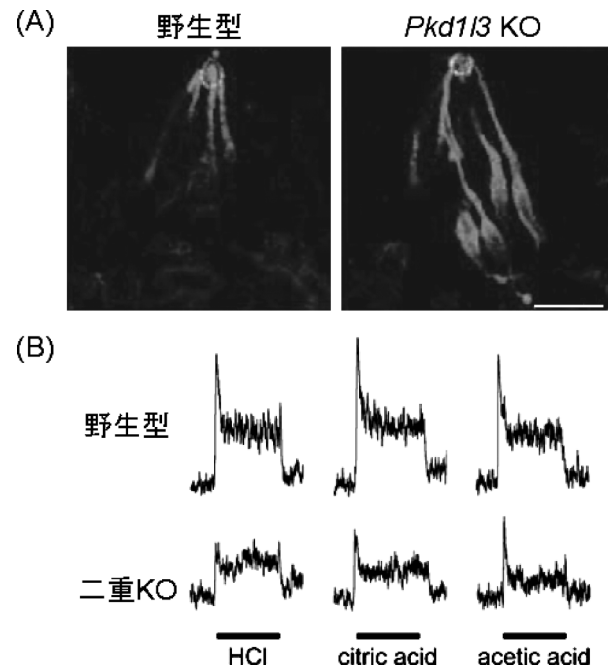


図3 *Pkd1l3* および *Pkd2l1* 遺伝子破壊マウスの表現型解析
 (A) PKD2L1 タンパク質は野生型では味孔付近に局在するが、*Pkd1l3* KO マウスでは細胞質全体に分布していた。
 (B) KO マウスでは酸味刺激に対する味神経応答が野生型と比較して抑制されたが、完全には消失しなかった。

蕾に投射する鼓索神経の酸味応答が野生型と比較して抑制されたが、完全には消失しなかった (図 3B)。一方、有郭・葉状乳頭味蕾に投射する舌咽神経では、いずれの変異マウスでも酸味応答に野生型と顕著な差は見られなかった。有郭・葉状乳頭味蕾において酸刺激に対する「オフ応答」を検出できる実験系を用いて検証することが今後の課題である。以上の結果から、PKD2L1 が実際に酸味受容へ関与することが解明されたが、ほかにも未知の酸味受容体が存在する可能性が強く示唆された。

3. 酸味情報伝達神経回路の解明

最後に、末梢の味蕾で感知された酸味シグナルがどのように中枢へ伝えられるかを解析した (*J. Neurochem.*, 2011)。コムギ胚芽レクチン (WGA) は、連絡する神経細胞間をシナプスを介して輸送される性質をもち、WGA タンパク質を免疫組織学的に検出することによって、特定の神経回路を標識する目的で利用されている。まず、味蕾特異的な組織発現プロファイルを示す *Pkd1l3* 遺伝子の 5' 上流約 10 kb 領域の制御下に、経シナプストレーサー WGA を発現するトランスジェニックマウスを作成した。味蕾において WGA の mRNA とタンパク質の発現を調べたところ、酸味受容細胞特異的な発現様式を示した。次に、神経細胞における WGA シグナルの分布を詳細に解析したところ、味神経の細胞体が集まる感覚性脳神経節と二次味神経の細胞体が存在する延髄孤束核で、輸送された WGA タンパク質の強いシグナルが検出された (図 4)。つまり、末梢の味蕾から二次味神経に至る 2 段階の経路まで、酸味情報伝達神経回路を可視化することに成功した。今後、異なる基本味がそれぞれ別々の神経回路で伝えられるか、あるいは、共通の神経回路を経由するかに関する「味覚コーディング機構」という重要な問題の解明につながることを期待される。

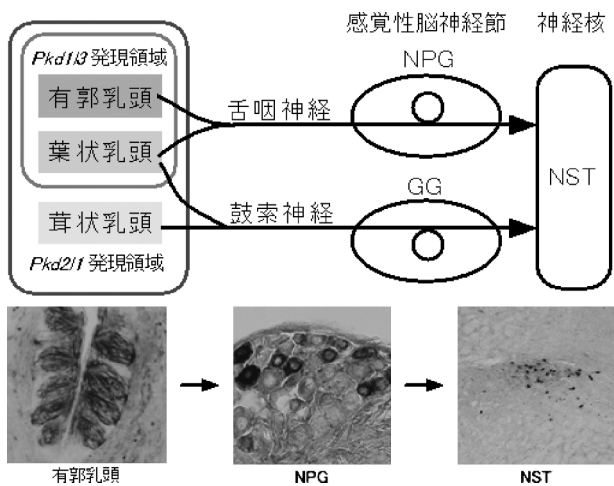


図4 酸味情報伝達神経回路の可視化

Pkd113 遺伝子の発現制御領域を利用して、有郭・葉状乳頭の酸味受容細胞特異的に経シナプストレーサー WGA を発現するトランスジェニックマウスを作成した。抗 WGA 抗体を用いて免疫染色すると、酸味受容細胞から舌咽神経や鼓索神経を介して輸送された WGA タンパク質のシグナルが、感覚性脳神経節 (NPG と GG) と延髄孤束核 (NST) で検出された。

おわりに

以上のように、これまでに複数の酸味受容体候補分子が報告されているが、筆者が発見したものは生体内において実際に酸味に関与することが初めて実証された唯一の分子である。筆者はこのようにして酸味受容・伝達の分子機構の重要な一端を解

明した。今後、われわれがおいしさを感じる仕組みの全体像を解明し、酸味抑制物質の探索など食品開発にとって「夢」の応用研究につながる基盤を確立したいと考えている。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻味覚サイエンス研究室と留学先のデューク大学（アメリカ合衆国）において行ったものです。本研究を行う機会を与您いただき、学生時代から温かいご指導ご鞭撻を賜りました東京大学名誉教授・阿部啓子先生に心より御礼申し上げます。本研究を始めるきっかけを与您いただき、ご指導賜りましたデューク大学の松波宏明先生に深く感謝いたします。東京大学の朝倉富子先生、松本一朗先生（現 モネル化学感覚研究所）、三坂 巧先生には、多くの有意義なご助言をいただきましたことを感謝いたします。本研究成果は、共に研究を行った卒業生の秋場雅人氏、片野佑香氏、山本くるみ氏、共同研究者の藤本千里博士、成川真隆博士、應本 真博士、石井 翔氏の協力によって成し遂げたものです。また、パッチクランプ法による機能解析では自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンターの富永真琴先生、稲田 仁先生（現 ハーバード大学）、味神経応答解析では九州大学の二ノ宮裕三先生、吉田 竜先生、堀尾奈央氏、免疫電子顕微鏡解析ではコロラド大学の Thomas E. Finger 先生、片岡真司先生（現 九州歯科大学）と共同研究をさせていただきました。この場を借りて、ご支援賜りました諸先生方に心より感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました東京農業大学客員教授・荒井綜一先生に厚く御礼申し上げます。