

「光による擬似味覚をもちいた味認識・欲求の神経基盤の解明」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：樽野 陽幸

1. 研究のねらい

食塩(NaCl)はそのおいしさゆえに摂り過ぎる傾向にあるが、塩分過剰摂取は高血圧の最大のリスク因子であり、世界中で減塩が推奨されている。しかしながら、日本の平均塩分摂取量は9.9g(H29国民健康・栄養調査)は世界保健機関の減塩目標値5.0gを大幅に上回り、諸外国と比べてもその消費量は多い。その結果、我が国の高血圧性疾患の993万人を数えるとともに、高血圧は成人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、年間医療費も1.8兆円に上っている。このように、減塩は世界的な健康と経済の課題となっている。しかし、我々がどのようにして塩味を感じ、そしておいしいと感じているのか、その神経基盤が不明なために経験的な減塩戦略に頼らざるをえず、その効果は限定的であった。

ナトリウム(Na⁺)は体液量を決定する重要な栄養素であるが、自ら作り出すことはできず代替物もないことから外から摂取する必要がある。一方で、塩の過剰摂取は致命的ともなりうる。そこで多くの動物は通常、塩分の適量の摂取のために塩水に対して2相性の応答を示す。つまり、低濃度の塩水を嗜好し、高濃度を忌避する。この背景には、味蕾に存在する嗜好性判断の異なる複数の塩味受容経路があるとされる。しかし、味蕾でどのような細胞分子基盤により、これらの塩味受容がなされているのかについては不明な点が多い。加えて、体内環境に応じて塩味に対する嗜好性は大きく変容する。塩欠乏状態では塩を強く嗜好し、塩分過多状態または水分欠乏状態では塩の忌避が優る。しかし、複数の受容経路によって塩味がどのように表現されるのか、また塩味への嗜好性や満足感と末梢感覚入力の関係など、実際の塩味体験を説明する神経基盤はその複雑さゆえその多くが未解明である。本研究では、味蕾における嗜好性を司る塩味受容の細胞分子メカニズムを解明し、飲水行動に同期した塩味細胞の光活性化による擬似味覚(光味覚)の創出とその味覚行動への影響を観察・測定する。これにより、塩味受容機構および末梢感覚入力による塩味の脳内ロジックを明らかにし、塩味体験の神経基盤の統合的な理解を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

はじめに、舌での塩味受容機構について、塩の嗜好性を司るNa⁺選択的塩味細胞(Na⁺細胞)の活動原理の解析を行った。Na⁺細胞を可視化する遺伝子改変マウスや細胞刺激法の開発および考案によってNa⁺細胞を同定するとともに、この細胞で起こるNa⁺の感知、シグナル変換、神経伝達の分子カスケードを解明した。ENaCとCALHM1/3を共発現する細胞がNa⁺細胞であり、ENaCを介したNa⁺流入が細胞膜の脱分極、続いて活動電位を惹起する。これにより活性化するCALHM1/3チャネルが神経伝達物質を放出し、塩味情報を味神経へと伝達することを明らかにした。さらに、同定したNa⁺細胞の遺伝子発現パターンを知り、その機能・発生の詳細を理解するべく、シングルセルトランスクリプトーム解析を実施し、Na⁺細胞

に特異的に発現する遺伝子を多数見出した。

次に、特定の味細胞選択的光操作による擬似味覚創出の技術開発を行った。マウスが飲水口を舐める行動、すなわちリック行動の計測とリック行動と同期した舌へのレーザー照射が可能となる行動実験装置の開発、および、Na⁺細胞などの味細胞に選択的に光駆動型カチオンチャンネル Channelrhodopsin-2 (ChR2) を発現するマウス、すなわち光味覚マウスを3系統作出した。実際に、光 Na⁺塩味マウスは塩欠乏状態で舌への青色レーザー照射を好む行動が見られるなど、光による擬似味覚の創出と計測ができるようになった。さらに、この光 Na⁺塩味を用いて塩味に対する満足感や嗜好性に及ぼす神経回路ロジックを検討した。

以上、本研究では舌における塩味嗜好性を司る主要な細胞の一つである Na⁺細胞の同定とその機能を解明するとともに、この細胞の人為的活動操作技術の開発による擬似味覚の創出、塩味のおいしさの背景にある神経回路ロジックの解析を実施した。今後、Na⁺細胞を標的とした人工塩味料開発が加速し、おいしい食事とともに健康長寿社会を実現するイノベーションの創出が期待できる。

(2) 詳細

「塩の嗜好性を司る Na⁺選択的塩味細胞(Na⁺細胞)の活動原理の解明」

これまで味蕾における味覚受容メカニズムについては世界中で多くの研究がなされ、5基本味のうち、塩味以外の全ての味質の受容細胞、センサー分子、細胞内情報伝達系、そして神経伝達機構が明らかとなっている。一方で塩味に関しては、Na⁺を検知するセンサー分子が上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC)であることがわかっていたものの、ENaCを発現する Na⁺塩味受容味蕾細胞(Na⁺細胞)の正体は、30年以上もの間不明であった。さらに、Na⁺細胞がどのようなメカニズムで Na⁺情報を変換し神経に伝えているのかも長年の謎だった。

Na⁺塩味研究が遅れていた要因の一つは、細胞を Na⁺で刺激して細胞応答を測定するのが難しいことだった。これは、Na⁺が正常な細胞機能の維持にも必要なため、細胞外の Na⁺濃度を変えることができなかったためである。そこで私は、あらかじめ ENaC 阻害剤を作用させておいた細胞(=ENaC が抑制された状態)から、阻害剤を瞬時に除去するという細胞刺激手法を考案した。これにより、Na⁺濃度を変えずに ENaC だけを活性化させた時の細胞応答を記録することができるようになった。

さらに、ENaC を持つ細胞が緑色に光る ENaC α -GCaMP3 マウスを作製し、緑色に光る味蕾細胞を単離して(図1A)、上の方法で ENaC を活性化させた時の細胞応答を解析した。その結果、ENaC を介した Na⁺流入により応答を示す細胞の記録に成功した(図1B)。この細胞のさらなる解析の結果、ENaC をもつ細胞集団の中でも CALHM1/3 をもつ細胞だけが塩味細胞として機能することを突き止めた。

さらに、Na⁺を好む行動(嗜好性行動)や舌と脳をつなぐ神経(味神経)の Na⁺に対する応答が、ENaC を欠損したマウスや CALHM1/3 を欠損したマウスにおいて損なわれていた。このように、Na⁺塩味受容に関与する分子、細胞の機能から個体の行動までを包括的に解析した

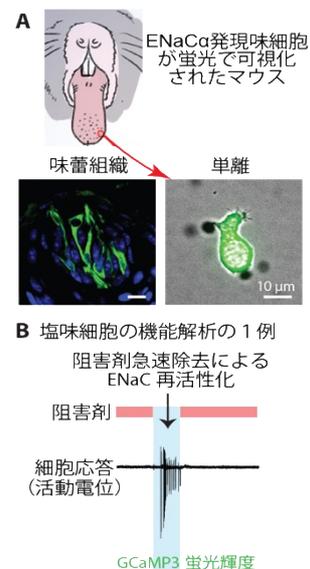


図 1. 実験イメージ

A. ENaC α -GCaMP3 マウスから単離した緑色に光る味細胞

B. ENaC 阻害剤 amiloride の急速除去による ENaC 活性化と細胞応答(活動電位, 上; Ca²⁺測光, 下)

結果、味蕾で Na⁺塩味を作り出す細胞およびその塩味受容の分子メカニズムを明らかにすることができた (*Neuron* 106:816–829, 2020)。

主な成果は以下の3点:

(1) Na⁺細胞の同定: 数ある味蕾細胞のうち、ENaC と CALHM1/3 を同時に発現するという特徴を持った細胞のグループが Na⁺細胞であることを突き止めた(図2A)。

(2) Na⁺細胞の情報変換・神経伝達の分子機構の解明: 塩味細胞が食塩に応答して活性化する仕組みを以下のように明らかにした。まず ENaC を介して細胞内に Na⁺が流入すると細胞膜が脱分極する。そうすると電位依存性 Na チャネル(Nav)が活性化して活動電位が発生する。この活動電位に反応して活性化した CALHM1/3 チャネルが神経伝達物質 ATP を放出し、求心性味神経を活性化させることで塩味を生じさせる(図2A)。実際に、超解像顕微鏡で Na⁺細胞の微細な構造を観察すると、Na⁺細胞のうち味神経と接している部分(図2B、白矢印)に CALHM チャネルが配置されていることも明らかにした。

(3) Na⁺細胞の1細胞解析:

Na⁺細胞の遺伝学的特徴を抽出し、細胞操作技術開発に生かすべく、1細胞解析を行った。ここでは、Na⁺細胞特異的に発現するマーカー遺伝子を多数見出すことができた。

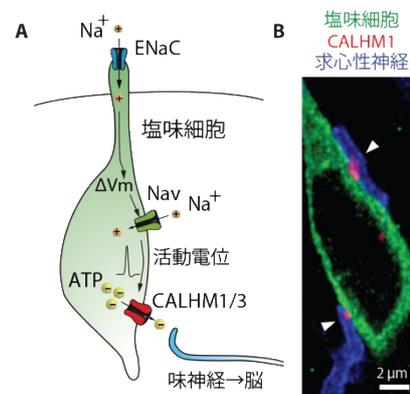


図2. A. 塩味情報変換・神経伝達機構
B. 塩味細胞の蛍光染色超解像写真

「Na⁺細胞選択的光操作による擬似的な光味覚の創出」

(1) リック行動に同期した舌光刺激装置の開発: 自作および既製品のマウスリック計測装置に以下の改造を施した。マウスが飲水口を舐める行動(リック行動)に同期したレーザー駆動によって給水瓶の飲水口から口腔内に向けてレーザーが照射される。これを用いることで、リック行動計測と同時にリック行動と同期した舌へのレーザー照射が可能となる。この装置と味細胞に光遺伝学分子ツールを発現した遺伝子改変マウス(味細胞光操作マウス、後述)と組み合わせることで、光による「擬似味覚」の創出とその行動応答の解析が可能になる。

(2) 味細胞光操作マウスの作出: 本研究では Na⁺細胞光操作マウスを含む計3種類の味細胞光操作マウスの作出を行った。Na⁺細胞光操作マウスでは想定どおり、味蕾で ChR2 が茸状乳頭の ENaC 発現味細胞特異的に発現していた。さらに、上記の「飲水行動に同期する舌光刺激装置」で行動解析を行ったところ、このマウスは塩欠乏状態で青色レーザーを好んで舐める(摂取しようとする)行動を強く示した。この結果は、光による Na⁺塩味の擬似的創出と解釈できる。光塩味は NaCl の摂取を伴わずに感覚だけを惹起することができる、すなわち「人工塩味料」のモデルでもあり、この光 Na⁺塩味を用いて、中枢における末梢塩味入力に対する満足感や嗜好性のロジックの解析を実施した。

3. 今後の展開

本さきがけ研究では、塩味嗜好性を司る主要な細胞の一つである Na⁺細胞の同定に成功し、

塩味受容の理解を大きく前進させることができた。しかし、塩味の認識は今回発見した Na⁺細胞を含む複数の味細胞の組み合わせによって表現されており、依然として塩味の全貌は不明である。さらに、この未知の味蕾からのマルチ感覚入力がどのように脳内で統合されて塩味感覚となるのか、その神経基盤は未だほとんど分かっていない。今後、さきがけ研究を通じて得た独自開発の技術や知見を駆使して、こうした複雑な塩味感覚の背景にある神経基盤の解明を目指す。その後、医薬農学分野・食品関連企業との共同研究にて社会実装を目指す。

4. 自己評価

本研究では当初研究計画の多くを達成することができ、その一部は論文発表に至った (*Neuron* 106:816–829, 2020 他)。論文発表に至っていない計画部分については今後の発展的研究の礎となっており、さきがけ光操作領域がきっかけとなった共同研究チームとともに継続予定である。本研究での成果に対し、三島海雲学術賞(2019)・バイオインダストリー奨励賞(2021)・Mid-career investigator award of Association for Chemoreception Sciences (2022)に加え、JST による推薦をいただき文部科学大臣表彰若手科学者賞(2021)を受賞した。また、研究実施体制については、さきがけ開始当初は独立したばかりで一人の研究室だったが、その後メンバーが加わり現在は私以外に博士3名、研究員・大学院生3名、研究補助員1名の合計8名にまで拡大し、さきがけ研究を起点とした研究の多様性が生まれるとともに本研究の発展のための研究体制が着実に整いつつある。減塩は世界的な健康と経済の課題である。現在、世界中で夢の「人工塩味料」の開発競争が繰り広げられている。しかし、これまで塩味受容の科学的理解が欠如しており、経験的な開発戦略では成功の兆しは見えなかった。本研究では、塩のおいしさを司る主要な味細胞を同定するとともに、その細胞内シグナル伝達および神経伝達の分子カスケードを解明した。今後、この細胞および分子を標的として人工塩味料開発が加速し、おいしい食事とともに健康長寿社会を実現する、社会・経済に多大なインパクトのあるイノベーションの創出が期待できる。以上のように、JST さきがけ事業が提供する資金・人的ネットワーク・メンタリングに関する支援を大いに活用し、研究計画の着実な達成、国民の健康に資するイノベーションの科学技術シーズの創出、今後の発展的研究のための研究実施体制および共同研究体制を整えることができたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(*責任著者, #共同筆頭著者を示す)

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Okui M, Murakami T, Sun H, Ikeshita C, Kanamura N, Taruno A*. Posttranslational regulation of CALHM1/3 channel: N-linked glycosylation and S-palmitoylation. *FASEB J*, 2021, 35, e21527.

味蕾の甘味、苦味、うま味細胞に加えて Na⁺塩味は特殊な化学シナプス機構を有する。ここでは活動電位で開口する CALHM1/3 イオンチャネルのポアを介して神経伝達物質として ATP が放出されるが、CALHM1/3 チャネル機能を制御する分子機構は不明だった。本研究

では、2つの翻訳後修飾、N型糖鎖修飾およびSパルミトイル化修飾がCALHM1/3チャンネルの生成および機能・局在に及ぼす影響を解明した。

2. Demura K, Kusakizako T, Shihoya W, Hiraizumi M, Nomura K, Shimada H, Yamashita K, Nishizawa T, Taruno A^{*}, Nureki O^{*}. Cryo-EM structures of calcium homeostasis modulator channels in diverse oligomeric assemblies. 2020, *Sci Adv*, 6, eaba8105.

味蕾の甘味、苦味、うま味細胞に加えてNa⁺塩味は特殊な化学シナプス機構を有する。ここでは活動電位で開口するCALHM1/3イオンチャンネルのポアを介して神経伝達物質としてATPが放出されるが、CALHMチャンネルの構造は不明だった。本研究では、様々な種のCALHMチャンネルの立体構造を解明し、電気的に中性かつ大きなイオン透過ポアがATP透過性の分子基盤であることを解明した。加えて、サブユニットストイキオメトリーを決定する構造基盤も明らかにした。

3. Nomura K[#], Nakanishi M, Ishidate F, Iwata K, Taruno A^{#,*}. All-electrical Ca²⁺-independent transduction mediates attractive sodium taste in taste buds. 2020, *Neuron*, 106, 816-829. (Selected for journal cover; Faculty Opinions recommended)

味蕾における嗜好性塩味を司るNa⁺センサー分子がENaCであることは30年以上前に報告されていたが、味蕾のNa⁺受容細胞の正体やそこで行われるシグナル伝達及び神経伝達機構は長らく不明だった。本研究では、独自のマウスモデル及び細胞機能解析法の開発・考案を通じて、Na⁺細胞を2つのマーカー遺伝子により同定するとともに、Na⁺細胞のCa²⁺シグナルに依存しない特殊なシグナル伝達・神経伝達の分子カスケードを解明した。

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(国際学会・シンポジウム講演のみ)

1. Taruno A. Salt-responsive Cells – A Unique Cell Type? The 42nd Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences. 2021 Apr 19-23; Online, USA.
2. Taruno A. All-electrical signal transduction and “channel synapses” mediate sodium taste. The 18th International Symposium on Olfaction and Taste. 2020 Jun 5-9; Portland, OR, USA.
3. Taruno A. Cells and transduction of sodium taste at the periphery. The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. 2019 Nov 2-3; Fukuoka.
4. Taruno A, Ma Z, Ohmoto M, Matsumoto I, Kido MA, Tordoff MG, Foskett JK. Ion channel synapses of the taste bud. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress (in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan). 2019 Mar 28-31; Kobe.

受賞

1. Association for Chemoreception Sciences Mid-career Investigator Award (2022)
2. 文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2021)
3. バイオインダストリー奨励賞(2021)
4. 三島海雲学術賞(2019)

総説論文

1. Taruno A*, Nomura K, Kusakizako T, Ma Z, Nureki O, Foskett JK. Taste transduction and channel synapses in taste buds. 2021, *Pflugers Arch*, 473, 3-13.

他、和文総説4編