

酢酸の有する呈味発現機構の解析

## 目次

略語

第 1 章 序論

第 2 章 酢酸による PKD1L3/PKD2L1 の活性化

第 3 章 カプサイシンおよびその刺激性を有する類縁体による  
PKD1L3/PKD2L1 を介した細胞応答の抑制

第 4 章 酢酸投与に対する培養細胞の内因性応答の解析

第 5 章 総合討論

引用文献

謝辞

## 略語

2-APB	2-Aminoethyl biphenyl borate
AITC	Allylisothiocyanate
ASIC(s)	Acid-sensing ion channels (s)
BCECF	2,7-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein
CALD	Cinnamaldehyde
CBD	Cannabidiol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
GAD	Glutamic acid decarboxylase
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
PKD	Polycystic kidney disease
TRP	Transient receptor potential

## 第 1 章

### 序論

## 酢酸 -食酢中に含まれる酸味成分-

食品は多様な酸を含有している。代表的な例として、食酢には酢酸、ヨーグルトには乳酸、レモンにはクエン酸、リンゴにはリンゴ酸、ワインには酒石酸、ビールには炭酸が主要な酸として含有されることが挙げられる。ヒトがこれらの食品の味を感じるということは、含有される呈味成分を味覚として受容するということであり、酸は呈味成分の重要な要素である。特に食酢はおよそ 500—1000 mM という高濃度で酢酸を含有しており、酢酸の有する呈味性、すなわち酸味を強く呈する食品である。この酸味を呈するという性質に基づき、食酢は調理において酸味を付与する酸味調味料として広く世界中で使用されている。食酢の歴史は古く、バビロニア（現在のイラク）では紀元前 5000 年頃から使用されていたといわれる(1)。また酢酸には強い防腐・静菌作用があることから、食酢は調味用途以外にも静菌用途として古くから使用されている(2)。事実、現代食品業界においても米飯や、生タイプ麺に少量の食酢を添加、浸漬することで保存性を向上させる技術が一般的に普及している(3)。更に近年、酢酸の経口摂取による内臓脂肪減少、血圧低下、血中脂質低下、食後血糖上昇抑制、カルシウム吸収促進、疲労回復効果といった健康機能が証明され、生活習慣病の予防を期待して食酢が摂取される機会も多い(4-9)。これらに示されるよう、酢酸は人類の食生活に呈味性、防腐・静菌性、健康機能性の点で古来より重要な関わりを持った酸であると言える。

## 味覚

味覚は化学感覚の一種であり、甘味、旨味、苦味、酸味、塩味の 5 基本味より形成されている。味覚は飲食物の味を評価する機能を担う。飲食物に含まれる味物質は哺乳類においては舌上の有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭(図 1-1)および軟口蓋に存在する味蕾と呼ばれる組織によって受容される。ヒトの舌上に存在する味蕾の数は平均 5,235 個で、そのうち 30% が茸状乳頭に、28% が葉状乳頭に、42% が有郭乳頭に存在する(10)。1 個の味蕾は 50—100 個の味細胞から構成される。5 基本味はそれぞれが味蕾中の異なる味細胞で受容される。茸状乳

頭の味蕾には鼓索神経が投射しており、有郭乳頭の味蕾には舌咽神経が投射している。葉状乳頭は鼓索、舌咽神経の両方が投射している。これら味神経によって味覚シグナルは脳へと伝達され、味覚が認識される。味蕾は舌の上皮細胞層に埋め込まれるように配置しているが、味細胞の先端部は舌表面に露出しており、食品成分と接触することができる。各味細胞には 5 基本味のうち 1 種類の味覚受容体が発現しており味物質の受容を担うと考えられている(図 1-2)(11, 12)。甘味受容体としては G タンパク質共役型受容体である T1R2 と T1R3 のヘテロマー (T1R2/T1R3) が機能している。T1R2/T1R3 は糖、人工甘味料、甘味タンパク質など多様な甘味物質を受容することが *in vitro* の解析によって示されている(13, 14)。野生型マウスの舌を甘味刺激すると鼓索神経の応答が認められるが T1R2 および T1R3 のダブル KO マウスでは甘味刺激に対する鼓索神経応答が消失し、しかも糖(スクロース、マルトース、グルコース)、人工甘味料(サッカリン)、甘味アミノ酸(D-トリプトファン)のいずれの甘味刺激に対しても鼓索神経応答が消失した(15)。すなわち甘味物質の受容を T1R2/T1R3 受容体が担っており、かつこの受容体は分子構造の異なる様々な甘味物質をいずれも受容しているのである。旨味受容体としては G タンパク質共役型受容体である T1R1 と T1R3 のヘテロマー (T1R1/T1R3) が機能している。苦味受容体としては G タンパク質共役型受容体であり、ヒトでは 25 種類存在する T2Rs という分子群が機能している(11)。塩味に対する味神経応答は薬理学的にアミロライドの口腔内投与によって抑制されるアミロライド感受性成分と、抑制されないアミロライド非感受性成分に分類される(16)。すなわち塩味受容には少なくとも、アミロライド感受性の受容機構と非感受性の受容機構の 2 種類の機構が存在すると考えられている。アミロライド感受性の塩味受容を担う受容体としてはイオンチャネル型受容体である ENaC が機能している(17)。アミロライド非感受性の塩味受容機構に関しては受容細胞に関する知見は得られつつあるものの、受容体は未だに同定されていない(18)。

## 酸味受容体

Acid-sensing ion channels (ASIC)、hyperpolarization activated channels、two-pore domain  $K^+$  channels などの複数の分子が酸味受容体候補として提唱されている(19–21)。しかしながらいずれの分子も酸味受容体であることを示す直接的な証拠は得られていない(22, 23)。近年、新たにプロトン透過性のイオンチャネルが酸味受容体として機能している可能性が提唱されたが、この仮説も決定的なものではない。これは *in vitro* 実験にて単離味細胞の味孔付近に酸を投与すると膜電流が生じることが確認されたことから、酸刺激によって開口するプロトン透過性のイオンチャネルが味細胞に発現していることが示唆されたのみで、その分子実態を明らかにするものではなかった(24)。また観察された膜電流は  $Zn^{2+}$  によって阻害されたが、ヒトの酸味受容強度は  $Zn^{2+}$  によって抑制されないことが官能評価によって示されている(24, 25)。このことから味細胞に酸投与した際に観察された膜電流と酸味受容の関係性は現段階では明らかでない。

Polycystic kidney disease (PKD) 1L3 と PKD2L1 のヘテロマーである PKD1L3/PKD2L1 は後述の理由から哺乳類における酸味受容体として機能している可能性が考えられている(26, 27)。PKD2L1 は transient receptor potential (TRP) イオンチャネルファミリーに属する膜タンパク質であり(28)、PKD1L3 は C 末に 6 回膜貫通の TRP 様ドメインを有する 11 回膜貫通タンパク質である(29)。PKD1L3 および PKD2L1 は甘味、苦味、旨味受容体発現細胞とは異なる一部の味細胞に発現している。野生型マウスの茸状乳頭および葉状乳頭に投射している鼓索神経は酸味刺激に対して神経応答を生じるが、弱毒性のジフテリアトキシンを発現させることにより PKD2L1 発現細胞を人為的に欠失させたトランスジェニックマウスでは酸味刺激に対する鼓索神経応答が消失したことから PKD2L1 発現細胞が酸味受容細胞として機能していることが示されている(27)。マウス味細胞における発現分布の解析より PKD1L3 および PKD2L1 は有郭乳頭、葉状乳頭において同一味細胞に共発現しており(26, 27, 30, 31)、互いに相互作用してヘテロマーである PKD1L3/PKD2L1 を形成し味孔付近へ局在することが示されている(32, 33)。PKD1L3/PKD2L1 の *in vitro* における機能解析では PKD1L3/PKD2L1 を発現させた

HEK293T 培養細胞は酸刺激に対して応答を示した。一方、甘味、苦味、旨味、塩味刺激に対して応答を示さなかった(26)。このことは PKD1L3/PKD2L1 が酸刺激特異的に応答する受容体であることを示している。これらのことから PKD1L3/PKD2L1 は酸味受容体として機能している可能性が考えられている。

ここで PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の酸刺激に対する応答が「オフ応答」と称される特殊な様式を示したことは特筆すべきである。すなわち PKD1L3/PKD2L1 チャンネルは酸刺激に対して開口するのではあるが、詳細には酸に暴露されている間は開口せず、酸を洗い流した後には開口することが *in vitro* での詳細な機能解析により示された(34)。オフ応答は HEK293T 培養細胞を用いた試験だけでなく味細胞を用いた試験でも観察され、マウスの有郭乳頭 (PKD1L3 および PKD2L1 が共発現している) より単離した味細胞は酸刺激に対してオン応答 (酸への暴露中に生じた応答) とオフ応答の両方を示した(35)。茸状乳頭 (PKD2L1 は発現しているが PKD1L3 は発現していない) より単離した味細胞ではオン応答のみが観察された(35)。この結果は PKD1L3/PKD2L1 がオフ応答を発生する受容体として有郭乳頭において機能していることを示唆している。「オフ応答」は特徴的な応答様式であるが、酸味刺激に対して味神経もオフ応答を示すことが過去の複数の報告において示されている。すなわち舌を酸味溶液で刺激すると味神経の応答ピークが観察されるが、続いて酸味溶液を舌から洗い流すと味神経応答のピークが再び観察される(36–38)。オフ応答の生理学的意義は不明であるが、例えばレモンをかじったとき、ジワジワと唾液が出てきて、次第に酸味が強くなる感覚を惹起している可能性が考察されている(39)。有郭乳頭、葉状乳頭の周囲には唾液分泌腺が配置しており、また酸味刺激は唾液分泌を誘導することから(40)、酸に暴露された味細胞は唾液による中和作用を受け、PKD1L3/PKD2L1 がオフ応答を示すと考えられている(34)。また唾液分泌速度の速いヒトでは、分泌速度の遅いヒトよりも、酸味刺激を受けた際の唾液の中和作用により、舌上の pH が高く推移するにも関わらず、酸味強度を強く感じることを示されている(41)。このことは唾液の分泌作用による食品中の酸の中和と酸味受容強度が深く関与していることを示唆し



ており、酸刺激に対するオフ応答が酸味受容に寄与している可能性を示していると考えられる。

近年 PKD1L3 および PKD2L1 のダブルノックアウトマウスが作出され、その酸味刺激に対する味神経応答についての報告がなされた(42, 43)。ダブルノックアウトマウスでは有郭乳頭と葉状乳頭を支配する舌咽神経の酸刺激に対するオフ応答(酸味刺激除去後 10 秒間の舌咽神経応答より算出)は野生型マウスと比較して有意に低下した(42, 43)。このことから PKD1L3/PKD2L1 は酸味刺激に対する味神経のオフ応答の発生に寄与していることが示された。一方でオン応答には低下が認められず、PKD1L3/PKD2L1 を介さない酸味受容経路が別に存在する可能性も同時に示唆された(42, 43)。すなわち酸味受容の全体において PKD1L3/PKD2L1 は部分的に寄与していると考えられた。

ヒトにおける知見としては酸味感受性を失った二人の味覚異常症患者の舌における発現遺伝子に関する報告がなされている。健常なヒトの茸状乳頭には PKD1L3 および PKD2L1 が発現しているが、二人の患者の茸状乳頭中の mRNA を解析したところ PKD1L3、PKD2L1 の転写産物が認められなかった(44)。なお、ASIC も健常なヒトでは発現しているが、患者では発現していなかった(44)。この報告は PKD1L3 および PKD2L1 が酸味受容を担っているという考え方と矛盾しない。これらのことより PKD1L3/PKD2L1 は生体における酸味受容に部分的ではあるものの、寄与している可能性が強く示唆されている。

## 酢酸の酸味

酸味は基本的にはプロトン(pH)によって惹起されると考えられている。しかしながら酸味強度が pH だけでは説明しきれないことが古くから指摘されており、現在でも酸味強度を決定する要因に関する議論がなされている(45, 46)。等しい pH における比較では、一般に強酸よりも弱酸の酸味が強い。また弱酸の中では酢酸の酸味が強い。官能評価による酸味強度の測定では pH3.1 の酢酸刺激によって惹起される酸味は pH3.0 のクエン酸によって惹起される酸味

の約 2 倍(フィンガースパン法、すなわち被験者が指の距離で酸味強度を示す手法によって定量化された数値より算出)の強度を示した(41)。また酸味の閾値は酢酸:pH4.55、クエン酸:pH4.40、塩酸:pH4.00 と報告されており、酢酸は他の酸より高 pH(低プロトン濃度)で酸味を惹起する(47)。またマウスの味細胞を用いたカルシウムイメージングによる生理学的解析では味細胞はpH3.0の塩酸よりもpH3.0のクエン酸に有意に強く応答した(23)。ラットの神経生理学的解析では pH3.2 程度の酢酸刺激に対して pH3.2 程度の塩酸刺激に対するよりも約 2.5 倍程度大きな鼓索神経応答が観察された(48)。またヒトの官能的には酸の種類により酸味の強度だけでなく、酸味の味質(tart;鋭い、acidic;ツンとする、smooth;なめらかな等)にも差が認められる(49)。このように酸の種類によって酸味強度や味質の違いが認められることから、生体の酸味受容機構はいずれの酸に対しても同じではなく、酸の種類毎によって受容機構や応答性が異なることが予想される。しかしながら基本的な酸味受容機構や、酸により差が生じる機構は明らかではない。ここで、酢酸は同じ pH の他の酸と比較して、強い酸味を惹起することから(41)、酢酸に対する応答性の高い受容機構が酸味受容に関与している可能性がある。すなわち酢酸は酸味受容機構全体像を解明する上で良好なモデル分子と考えられ、酢酸の呈味発現機構を解明することは酸味受容機構の全体像解明の端緒となり得る。

#### 酢酸の呈味発現機構の解明の応用的意義

酸味は多様な食品の味の全体像を形づくる上で重要な役割を担う。*Macaca nemestrina*(ブタオザル)での酢酸の嗜好試験では、スクロース溶液に低濃度(<20 mM)の酢酸を添加した場合は酢酸濃度依存的な嗜好性の上昇が認められたが、高濃度(>20 mM)の酢酸を添加した場合は濃度依存的に嗜好性の低下が認められた(50)。このように高濃度の酸味は忌避される傾向にある。酸味に対する忌避行動は、未成熟な果実や食品の腐敗により蓄積する酸を検出、忌避するという生理学的意義を反映していると推察されている(51)。上述の通り、食酢は酸味付与の目的のみならず、静菌、健康機能を期待して使用される。しかしながら、これらの用

途においては酸味が付与されることは必ずしも望ましいとは言えない。例えば健康機能を期待して飲まれる食酢飲料は、酸味が強すぎて嗜好性が損なわれている、と感じる方もいる。

嗜好性を維持しつつ、食酢の静菌作用や健康機能の効果を享受するためには、食酢の使用量は減らさずに酸味を低減させる酸味抑制剤の開発が有効と考えられる。これまでに酸味抑制剤が探索されており、ショ糖、豚肉由来ペプチドなどが酸味抑制作用を持つことが見出されている(52, 53)。しかしながら、いずれも酸味抑制作用は弱く、完全に酸味を消失させる酸味抑制剤は見出されていない。甘味においてはラクチゾール(2-(4-メトキシフェノキシ)プロピオン酸塩)と呼ばれる化合物が強い甘味抑制作用を持ち、甘味をほぼ消失させることが見出されている(54)。酸味において同様に効果の強い抑制剤が見出されていない点は対照的である。ラクチゾールは甘味受容体(T1R2/T1R3)の応答を抑制することが、甘味受容体を発現させた培養細胞を用いたカルシウムイメージングによって示されている。すなわち味覚受容体の応答抑制活性を持つ物質は味覚の抑制剤となり得るのである。現時点で酢酸の酸味の受容体は明らかにされていないが、酢酸の酸味の受容体を同定し、その受容体の応答抑制剤を見出すことで酢酸の酸味を抑制できる可能性がある。酢酸の酸味抑制剤は、食酢の酸味抑制剤としても応用可能であろうと考えられ、強すぎる酸味で嗜好性を損なうことなく、食酢の静菌作用や健康機能の効果を享受するために有益なものとなろう。このように食品産業における応用的側面からも、酢酸の呈味受容機構を解明することは意義深い。

本論文においては酢酸の有する呈味発現機構について解明を試みた。特に酸刺激に対してオフ応答を示す PKD1L3/PKD2L1 による酢酸受容について解析を実施した。第 2 章では PKD1L3/PKD2L1 の酢酸に対する応答性を評価した。第 3 章では PKD1L3/PKD2L1 の薬理的性質の解明を試み、酢酸の酸味抑制の可能性について言及した。第 4 章では酢酸が培養細胞に特異的に誘起するがクエン酸は誘起しない内因性応答について、その発生要因の解明を行った。

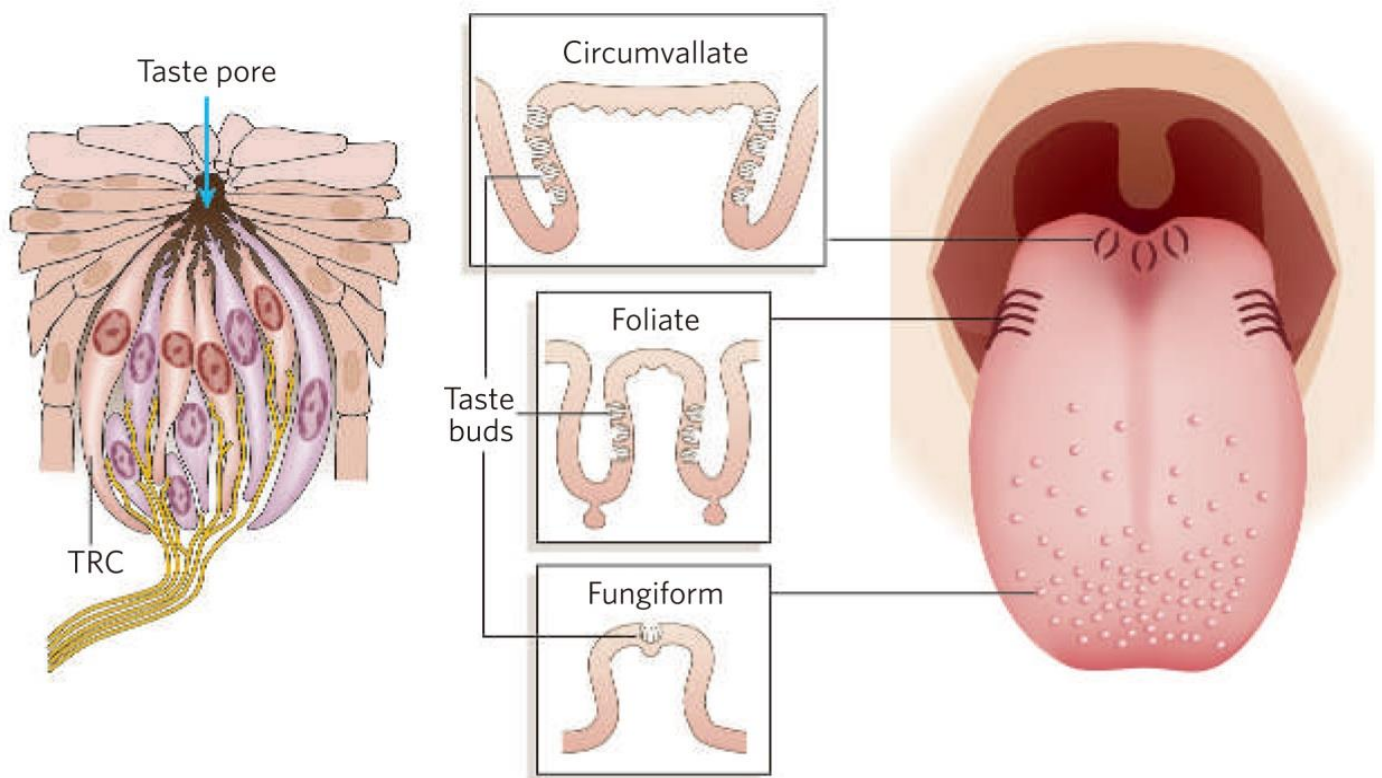
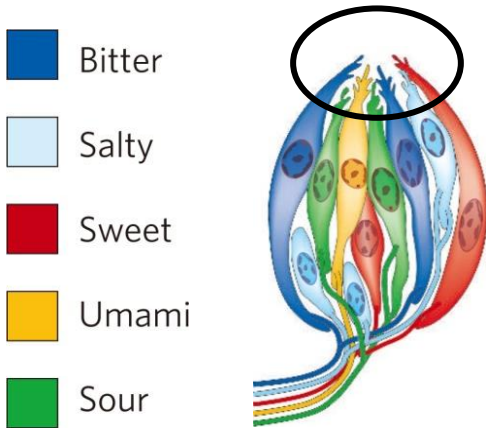
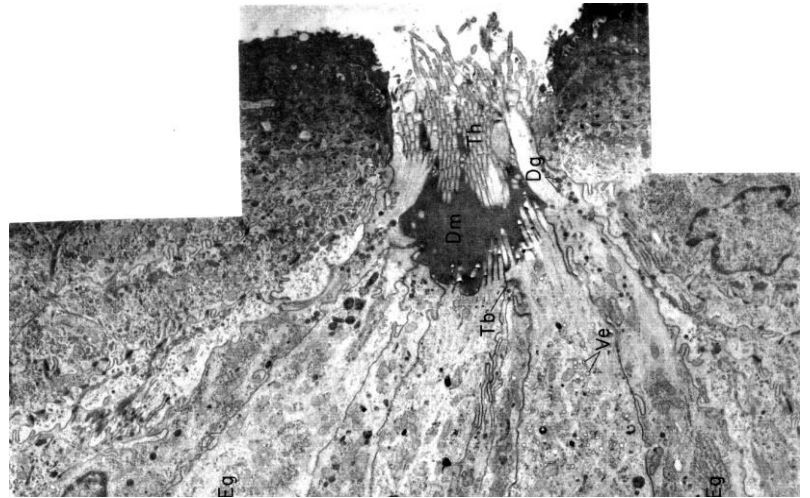
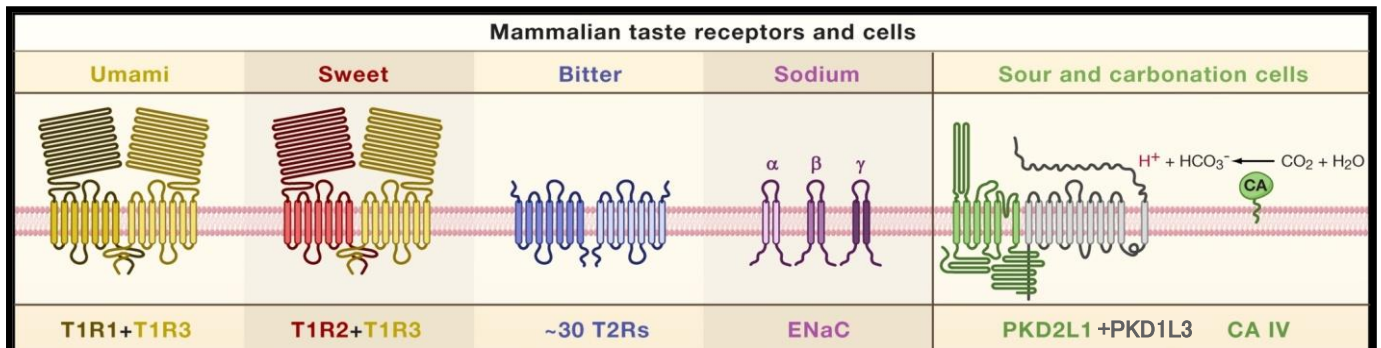


図1-1 舌上に存在する味蕾の模式図

味蕾 (Taste buds) は有郭乳頭 (Circumvallate)、葉状乳頭 (Foliate)、茸状乳頭 (Fungiform) に存在する。味蕾は50-100個の細胞 (TRC: Taste Receptor Cell) から構成される。味物質は味孔 (Taste pore) を通じて味蕾に到達する。図は *Nature*, **444**, 288-294 (2006) より引用。

**A****B****C**

**図1-2 味覚受容体**

(A) 味蕾の模式図。5基本味は味蕾中の異なる味細胞で受容される。図は*Nature*, **444**, 288-294 (2006)より引用。  
 (B) ウサギ葉状乳頭の味蕾の味孔付近の電子顕微鏡観察像(A)において円で囲んだ部分に相当。図は『電子顕微鏡による細胞組織図譜IV』(1986)より引用。  
 (C) 味覚受容体の模式図。酸味受容細胞ではPKD1L3とPKD2L1のヘテロマー(PKD1L3/PKD2L1)が酸味受容体の機能を担っていると考えられている。また炭酸脱水素酵素CA IVは炭酸の受容に関与する。旨味受容体はT1R1とT1R3、甘味受容体はT1R2とT1R3のヘテロマーである。苦味受容体としては哺乳類では~30種類のT2Rsが存在する。ヒトでは25種類存在する。ENaCは塩味受容体である。味覚受容体は味細胞の味孔付近に発現する。図は*Cell*, **139**, 234-244 (2009)より引用、一部改変。

## 第 2 章

### 酢酸による PKD1L3/PKD2L1 の活性化

## 2-1. 序

### 酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 の活性化

PKD1L3/PKD2L1 は第1章にて記載した通り、酸刺激を感知し得る受容体として機能している。PKD1L3 および PKD2L1 を共発現させた HEK293T 細胞は、酸刺激のみには反応しないものの、それに続き、酸を洗い流した際に応答を示す(オフ応答)ことがカルシウムイメージング、あるいはパッチクランプ法により示されている(26, 34)。これまでに 7 種類の酸、すなわち無機酸である塩酸、硫酸、リン酸、ジカルボン酸であるリンゴ酸、コハク酸、酒石酸、トリカルボン酸であるクエン酸により PKD1L3/PKD2L1 が活性化されることが示されている(26, 34)。従ってモノカルボン酸である酢酸や他の酸によっても PKD1L3/PKD2L1 が活性化されることが予想される。しかしながら、それを示す実験的な証拠は得られていなかった。

### カルシウムイメージングによる機能解析

カルシウムイメージングは生細胞におけるカルシウム濃度変化を記録できるため、カルシウムシグナリングを誘導する様々な受容体の機能解析に用いられている。受容体を発現している細胞にカルシウム指示薬を負荷した後に受容体を刺激すると、受容体の活動により生じたカルシウム濃度変化を反映して指示薬は蛍光変化を生じるため、蛍光変化を測定することで受容体の活動を測定できる。しかしながら、代表的なカルシウム指示薬 Fura-2 を負荷した培養細胞自体が、酢酸の投与に対して、大きな蛍光変化を示すことが予備試験より明らかにされている。そのために PKD1L3/PKD2L1 を発現させた培養細胞に酢酸を投与した後に観察される応答が、PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映した反応であるか、内因性の反応であるかについて、カルシウムイメージングによって判断することができなかった。一方、電気生理学的手法においても HEK293T 培養細胞を用いたパッチクランプ法において酢酸の投与中および投与後に酸受容とは無関係な反応が観察されることが報告されている(34)。これらの結果は酢酸が酸味

という呈味特性以外にも多様な生理機能を持ち、それによって培養細胞が様々な反応を起こしてしまうことを示している。そのため、これまでに酢酸による PKD1L3/PKD2L1 の活性化は実験的に示されおらず、酢酸の酸味受容における PKD1L3/PKD2L1 の寄与については不明であった。

### 異なる酸に対する PKD1L3/PKD2L1 の応答性の差異

第 1 章にて述べた通り、酸の種類によって酸味閾値や強度が異なることが示されている(41, 49)。等しい pH における比較では、一般に強酸よりも弱酸の酸味が強く、弱酸の中では酢酸の酸味が強いが、興味深いことに PKD1L3/PKD2L1 を発現した HEK293T において、弱酸であるクエン酸に対する応答は、同じ pH の強酸である塩酸に対する応答よりも強いことが、カルシウムイメージングおよびパッチクランプにより示されている(26)。すなわち PKD1L3/PKD2L1 の反応性は、酸の種類による酸味閾値や強度の差を説明する可能性がある。この点においても PKD1L3/PKD2L1 の酢酸刺激に対する応答性を測定することは意義深い。

本章では PKD1L3/PKD2L1 の酢酸刺激に対する応答性の評価を目的とした。カルシウムイメージング法に基づく測定手法の最適化を行い、酢酸に対する培養細胞の内因性応答と、PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映した細胞応答の分離を試みた。その結果、酢酸刺激に対する応答を正確に測定できる条件の確立に成功した。更にその手法を用いて、PKD1L3/PKD2L1 が酢酸刺激によって pH 依存的に活性化されることが示された。これらの結果は酢酸の酸味受容における PKD1L3/PKD2L1 の関与を強く示唆すると言える。



## 2-2. 材料と方法

### PKD1L3 および PKD2L1 発現ベクター

PKD1L3 (Accession no. AB290926) と PKD2L1 (Accession no. AB290927) の発現ベクターはマウス由来の遺伝子のコード領域を pDisplay (Invitrogen) と pCI (Promega) ベクターにそれぞれサブクローニングして構築されたものを東京大学、石丸喜朗特任助教より分与頂いた(26)。

### バッファーおよび酸溶液(表 2-1)

カルシウムイメージング用アッセイバッファーの組成は 1 mM HEPES、130 mM NaCl、5 mM KCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM glucose とし、NaOH を用いて pH 7.4 に調整した。また緩衝剤による pH 変化の影響を観察するため HEPES 濃度の異なるバッファーを準備した。HEPES 濃度を 2、5、10、20 mM とし、その他の組成は上記バッファーと等しいバッファーを調製した(以下それぞれ 1H、2H、5H、10H、20H バッファーと記載する)。カルシウム非含有の 1 mM HEPES アッセイバッファー(以下 0Ca-1H バッファーと記載する)の組成は 1 mM HEPES、130 mM NaCl、5 mM KCl、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM glucose、0.2 mM EGTA とし、NaOH を用いて pH 7.4 に調整した。酸溶液は酢酸、クエン酸を希釈して調製し、酸以外の組成はアッセイに使用したバッファーの組成と等しくした。

### 細胞培養

HEK293T 培養細胞は直径 100 mm のプラスチック製培養皿 (IWAKI) にて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。培地は 10%ウシ胎児血清 (Invitrogen) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich Japan) とした。継代操作として細胞が増殖して 80–90%コンフルエントに達する度(約 2 日間隔)に培養皿底面に接着している HEK293T をトリプシン処理して回収し、新しい培養皿に 10 分の 1 から 8 分の 1 量程度を播種した。

## トランスフェクション

トリプシン処理して回収した細胞を直径 35 mm ガラス底培養皿 (IWAKI) に 40–60 万個播種した。翌日、約 60%コンフルエントの状態の細胞に発現ベクターをリポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) と共に投与して遺伝子を導入した。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T は PKD1L3、PKD2L1、およびトランスフェクションマーカーとして赤色蛍光タンパク質 DsRed2 (pDsRed2-N1; Takara Bio Inc.) 発現ベクターを 10:10:0.4 の比率にて導入して得た。PKD2L1 発現 HEK293T は PKD2L1、DsRed2 発現ベクターを 10:0.4 にて導入して得た。トランスフェクション操作の 30–38 時間後にカルシウムイメージングに供し細胞応答を記録した。画像解析においては DsRed2 陽性細胞を遺伝子導入がなされた細胞とみなして解析を行った。

## カルシウムイメージング

培養皿から培地をバッファーで洗浄した後、底面に接着している細胞に対して 5  $\mu$ M Fura-2/AM を 30 分間室温で負荷させ、その後、細胞をバッファーで洗浄した後、バッファー中で 10 分間以上静置した。その後、培養皿を灌流装置に設置し、流速 10 mL/分でバッファーを灌流した。細胞に対する刺激は、灌流液をバッファーから刺激溶液に切り替えることで実施した。1 回あたりの刺激時間は 6 秒間とし、刺激後は速やかに灌流液をバッファーに切り替えて、刺激溶液を洗い流した。このとき、灌流液に使用したアッセイバッファーと刺激溶液の HEPES 濃度 (1、2、5、10、20 mM) は一致させた。細胞応答の測定は 340 nm 及び 380 nm にて励起した際の 510 nm における Fura-2 の蛍光 (F340 および F380) をシャッターコントローラー Lambda 10-2 (Sutter)、MicroMax 冷却 CCD カメラ (Princeton Instruments)、蛍光倒立顕微鏡 IX-70 (Olympus) を用いて 4 秒毎に記録した。画像解析は解析ソフトウェア MetaFluor (Molecular Devices) を用いて実施した。2 種の励起波長における蛍光の比 (F340/F380; 以下 Ratio もしくは  $\text{Ratio}_{\text{F340/F380}}$  と記載する) を細胞内カルシウム濃度の指標として採用した。解析対象とした細

胞数および試行数は結果の段落もしくは図のレジェンド欄に記載した。応答曲線はヒルの式を用いて近似した(55)。

## 2-3. 結果

### 酢酸刺激に対する HEK293T 細胞の応答

PKD1L3/PKD2L1 の酢酸刺激に対する応答性を評価するために、PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T に Fura-2 を負荷し、カルシウムイメージングに供した。コントロールとして PKD2L1 発現 HEK293T、ノントランスフェクション HEK293T を用いた。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T はこれまでに酢酸以外の 5 種類の弱酸及び 2 種類の強酸による pH3.0 以下の刺激にオフ応答を示すことが報告されている(26, 34)。オフ応答とは第 1 章に記載の通り、酸刺激に続いて酸を洗い流した後に発生する応答である。カルシウムイメージングによる観察では細胞が酸に暴露されている間はカルシウム濃度上昇が認められず、酸を洗い流した後に細胞内カルシウム濃度の明瞭な上昇が認められる(26, 34)。

PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T に 100 mM 酢酸溶液 (pH 2.8、1 mM HEPES) を投与し、速やかに 1H バッファーで酢酸溶液を洗い流す操作を行った。酢酸溶液投与中に視野中のほぼ全ての細胞で Ratio が速やかに上昇し(図 2-1A、32 s)、酢酸投与から約 40 秒間上昇を示すことが判明した(図 2-1B)。この現象は PKD2L1 発現 HEK293T、ノントランスフェクション HEK293T にも共通しており、100 mM 酢酸溶液を投与したところ、同様に視野中ほぼ全ての細胞で Ratio が上昇する現象が認められた(図 2-1A、32 s)。

この酢酸溶液投与直後に観察された Ratio の上昇は PKD2L1 発現 HEK293T、ノントランスフェクション HEK293T においても観察されたことから、PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映した現象でなく、酢酸刺激に対する HEK293T 内因性の応答を反映した現象であることが示された。既報では PKD1L3/PKD2L1 の活性化を介した細胞応答は投与した塩酸またはクエン酸をバッファーで洗い流した後、細胞応答が認められた直後に定量化されている(26)。しかし酢酸を投与した場合は投与直後に HEK293T の強い内因性応答がバックグラウンドとして観察されるため、PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映した細胞応答を、既報と同様の時点で定量化すること

は困難であった。

しかしながら Ratio の経時的な変動パターンは PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T、PKD2L1 発現 HEK293T、ノトランスフェクション HEK293T の間で異なった。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T では測定開始から 100 秒以上経過した時点において明瞭に高い Ratio を示す細胞が一部に認められた(図 2-1A、100 s、152 s のパネルにて赤く表示された細胞)。PKD2L1 発現 HEK293T およびノトランスフェクション HEK293T は測定開始後 152 秒の時点では、ほぼすべての細胞の Ratio が基底状態に戻っていた(図 2-1A、100 s、152 s、B)。測定開始後 100 秒以降の時点において高い Ratio を示す細胞は PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T でのみ観察され、PKD2L1 発現 HEK293T、ノトランスフェクション HEK293T ではほとんど観察されなかったことから、測定開始後 100 秒以降に観察される高い Ratio が PKD1L3/PKD2L1 の活性化による細胞内カルシウム濃度上昇を反映している可能性が考えられた。

#### クエン酸刺激後の PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T における Ratio の経時的変化

測定開始後 100 秒以降に観察される Ratio が PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映している可能性を検証するために、クエン酸をリガンドとして用いた際の Ratio の経時変化を観察した。クエン酸は HEK293T に投与した際に内因性の応答を誘起しないことが示されている(34)。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T に Fura-2 を負荷し、カルシウムイメージングに供した。4 mM クエン酸溶液 (pH 2.8) で酸刺激を行い、刺激後速やかに 1H バッファーにてクエン酸を洗い流した。クエン酸の投与中に細胞応答は認められず、クエン酸を洗い流した後に細胞応答、すなわちオフ応答が観察された(図 2-2A)。この結果は既報と同様であった(34)。引き続き観察を続けたところ、オフ応答により上昇した Ratio は 152 秒の時点で基底状態には戻らず、高いカルシウム濃度を保つことが示された(図 2-2B)。細胞応答が観察された直後の時点を early フェーズ(測定開始後 80 秒)、十分に洗浄された時点を late フェーズ(測定開始後 152 秒)と定義し、それぞれの時点における Ratio の測定開始時点(0 秒)との差 ( $\Delta$  Ratio)を求めた。early

フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  は  $0.17 \pm 0.03$  であり、この値はコントロールである PKD2L1 発現 HEK293T の early フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  よりも有意に高かった(図 2-2C)。またこの現象が、細胞外からのカルシウムイオンの流入によるかどうかを検証するために実施した 0Ca-1H バッファー中での PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T のクエン酸刺激に対する early フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  よりも有意に高かった。このことから PKD1L3/PKD2L1 がクエン酸刺激によって活性化され、細胞外液からカルシウムが流入したことを反映して Ratio が上昇したと考えられた。

次に late フェーズにおける活性評価の妥当性を判断するために、クエン酸刺激後の細胞応答の late フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  を評価した。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T では late フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  は  $0.15 \pm 0.01$  であり、基底状態よりも高いカルシウム濃度を示していた。この値はコントロールである PKD2L1 のみ発現させた HEK293T や、0Ca-1H バッファー中での PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の late フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  よりも有意に高かった(図 2-2C)。すなわち late フェーズにおける Ratio も early フェーズと同様に PKD1L3/PKD2L1 がクエン酸により活性化され、細胞外からカルシウムイオンが流入した結果を反映していることが示唆された。

次いで late フェーズに観察できる Ratio の pH 依存性を評価するために PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を pH3.4–2.8 のクエン酸溶液で刺激した。late フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  は pH3.0 付近を閾値として、pH 低下依存的に増加した(図 2-2D)。この性質は early フェーズで認められたものと同様であった。late フェーズの  $\Delta \text{Ratio}$  が early フェーズにおける  $\Delta \text{Ratio}$  と同様に PKD1L3/PKD2L1 の発現依存的、細胞外液カルシウム依存的、pH 低下依存的であったことから、本実験系において観察される late フェーズの  $\Delta \text{Ratio}$  は PKD1L3/PKD2L1 の活性化を評価し得ると判断した。

#### 酢酸刺激による PKD1L3/PKD2L1 チャンネルの活性化の評価

PKD1L3/PKD2L1 の活性化を late フェーズの Ratio が反映することが示されたため、late フ

フェーズ(152 s)において  $\Delta$  Ratio を定量することにより、酢酸刺激による PKD1L3/PKD2L1 の活性化を評価できると判断し評価を実施した。

PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T、PKD2L1 発現 HEK293T、ノントランスフェクション HEK293T をカルシウムイメージングに供した。100 mM 酢酸 (pH2.8) を投与し、速やかに酢酸溶液を1Hバッファーで洗浄し、late フェーズにおける観察を実施した。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T では late フェーズにおいて一部の細胞が高い Ratio を示したが、PKD2L1 発現 HEK293T、ノントランスフェクション HEK293T では高い Ratio を示す細胞はほとんど認められなかった(図 2-3A)。なお、PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T において高い Ratio 値を示した細胞はトランスフェクションマーカーである DsRed2 陽性細胞と一致している場合が多かった(結果は示さない)。late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio は PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T では  $0.16 \pm 0.03$  (n=3)であった。この値は PKD2L1 発現 HEK293T の late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio よりも有意に高かった。PKD2L1 発現 HEK293T の  $\Delta$  Ratio は負の値を示した。これはベースラインのドリフトによるものと考えられた。また PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を細胞外液中にカルシウムを含まない条件にて酢酸刺激した後の late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio よりも有意に高かった(図 2-3B)。これらの結果は酢酸刺激後に観察された late フェーズでの  $\Delta$  Ratio が、PKD1L3/PKD2L1 発現依存的、細胞外液カルシウム依存的に高値となることを示す結果と言える。

pH 依存性を評価するために、pH3.5 – 2.8 の酢酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の応答を観察した。酢酸溶液の酢酸濃度は 10 – 100 mM とし、酢酸溶液およびバッファー中の HEPES 濃度は 1 mM とした。late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio は pH3.1 以下の酢酸刺激により上昇が認められ、より低い pH の酢酸刺激に対して高い値を示す、pH 依存性が認められた(図 2-3C)。しかし、ここで用いた酢酸溶液は pH が異なるだけでなく、酢酸濃度も異なるため、 $\Delta$  Ratio の増加が pH でなく酢酸濃度依存的である可能性も考えられた。そこで酢酸濃度が等しく pH の異なる酢酸溶液を調製し PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の応答性を

評価した。酢酸溶液は酢酸濃度を 100 mM に固定し HEPES 濃度を 1 – 20 mM とした。それぞれの溶液の pH は 2.8 – 3.6 であった(表 2-1)。late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio は pH3.1 以下で上昇を示し、pH が低下するに従って依存的に増加した(図 2-3C)。このことから PKD1L3/PKD2L1 は酢酸刺激に対して pH 依存的に活性化され、その応答閾値は pH3.1 付近であることが示された。



## 2-4. 考察

PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T をカルシウムイメージングに供し 100 mM 酢酸溶液を投与したところ、ほぼ全ての細胞で Ratio が顕著に上昇した。この現象はノントランスフェクション HEK293T でも観察されたため HEK293T 細胞に内因性の応答であることが示唆された(図 2-1)。酢酸刺激自身が強いバックグラウンドを与えるため、酢酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 の活性化を、塩酸、クエン酸刺激に対する活性化を評価した既報(26)と同様に評価することは困難と判断された。なお、酢酸刺激に対する内因性応答は CHO-K1、HeLa 培養細胞株においても観察された(結果非掲載)ため各種の培養細胞において共通に認められる普遍性を持った細胞応答であると考えられ、大変興味深い。そこで内因性応答が酢酸特異的に生じる機構については本論文第 4 章にて論じた。

PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T では内因性応答によって上昇した Ratio が基底状態に戻った時点でもなお高い Ratio を示している細胞が観察された(図 2-1)。これは PKD1L3/PKD2L1 の活性化による細胞内カルシウム濃度上昇を反映している可能性が考えられたため、late フェーズにおいて PKD1L3/PKD2L1 を介した応答を定量することの妥当性について検討を実施した。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T をクエン酸で刺激すると内因性応答は認められなかった。クエン酸を洗い流した後に PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映した Ratio の上昇が一部の細胞で認められ、late フェーズでも基底状態には戻らなかった(図 2-2B)。late フェーズにおける Ratio の上昇は PKD1L3/PKD2L1 発現依存的、pH 依存的に認められたことから PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映していると考えられた。PKD1L3/PKD2L1 はカルシウム透過性のイオンチャネルであり、活性化されると細胞外液から細胞内へカルシウムを流入させる(34)。細胞外液にカルシウムが存在しない場合、流入による細胞内カルシウム濃度の上昇は起こらない。late フェーズにおける Ratio の上昇が細胞外液カルシウム依存的であったことは、PKD1L3/PKD2L1 の活性化によって生ずる細胞内カルシウム濃度の上昇が比較的長時間持

続することを示している。これらのことから late フェーズにおける Ratio の上昇は PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映していることが示された。酸刺激後、酸を洗い流し、応答が認められた時点で定量するという既存手法に加え、本章において示した late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio を定量する手法も PKD1L3/PKD2L1 の活性化を評価する手段として妥当であることが示された。

PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を酢酸刺激した際の late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio は PKD2L1 発現 HEK293T の  $\Delta$  Ratio よりも有意に大きかったことから、late フェーズにおける Ratio の上昇は PKD1L3/PKD2L1 発現依存的であることが示された。Ratio の上昇は細胞外液カルシウムに依存的であり、PKD1L3/PKD2L1 を介したカルシウム流入による細胞内カルシウム濃度の上昇を反映していると考えられた(図 2-3)。HEK293T の酢酸刺激に対する内因性応答は細胞外カルシウムの有無に関わらず観察された(第 4 章 図 4-3 に図示している)。このため late フェーズにおける高い Ratio は内因性応答と異なる細胞応答を反映していることが示唆された。以上より PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T で酢酸刺激後の late フェーズに観察される Ratio は PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映しており、酢酸が PKD1L3/PKD2L1 を活性化することが実験的に示された。このため酢酸の有する酸味は PKD1L3/PKD2L1 を介して受容され我々の味覚感覚として認知されている可能性がある。

酢酸はクエン酸とは異なる化学的特性を有する。例えば酢酸の解離定数( $pK_{a1}$ )はクエン酸よりも高い(酢酸:4.8、クエン酸:3.1)。疎水性の指標とされる Log P(オクタノール／水分配比の対数)は、酢酸(-0.17)ではクエン酸(-1.72)よりも高い(56)。解離定数や疎水性は酸味の閾値や強度に関わることが報告されている(57–60)。官能評価による酸味強度の測定では pH3.1 の酢酸刺激によって惹起される酸味は pH3.0 のクエン酸によって惹起される酸味の約 2 倍(フィンガースパン法、すなわち被験者が指の距離で酸味強度を示す手法によって定量化された数値より算出)の強度を示した(41)。しかしながら PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の pH2.8

酢酸刺激に対する late フェーズの応答強度は  $0.16 \pm 0.03$  であり pH2.8 のクエン酸刺激に対する応答強度  $0.15 \pm 0.01$  と同程度であった(図 2-2C、2-3B)。また酢酸刺激に対する応答閾値は約 pH3.1、クエン酸刺激に対する応答閾値 pH3.0 であり、両者に顕著な差は認められなかった(図 2-2D)。すなわち PKD1L3/PKD2L1 の応答強度、閾値 pH に酢酸とクエン酸の間で顕著な差は認められなかった。酢酸の呈味発現機構を解明する上で、酢酸とクエン酸の酸味の閾値、強度の差が生じる機構を解明することは重要な課題であるが PKD1L3/PKD2L1 の性質からは、その機構を説明することはできなかった。そのため何らかの他の受容機構が関与していることが示唆された。例えば酢酸はクエン酸と異なり強い臭気を呈するため、この臭気が酸味の閾値や強度に影響を与えて、酸味を強く感じさせる可能性が考えられる。また酸分子の解離定数や疎水性によって感度が変わる、別の酸味の受容機構が存在しているのかもしれない。クエン酸よりも酢酸刺激に対して強く応答する体性感覚神経の存在も示されており(61)、体性感覚との複合的感覚によって酸味を強く感じている可能性もある。これらの仮説の検証が研究の進展の方向性として重要であると言えよう。

本章においては酢酸刺激に対する内因性応答と PKD1L3/PKD2L1 を介したカルシウム応答を観察時間により分離することで、酢酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 の応答測定系を確立した。また本手法により酢酸が PKD1L3/PKD2L1 を活性化することを実験的に示し、酢酸の酸味が PKD1L3/PKD2L1 を介して受容される可能性が示唆された。

表2-1 本章で用いた溶液の組成

		酢酸溶液										クエン酸溶液									
		1H バッファー					0Ca-1H バッファー														
	(mM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HEPES	(mM)	1	130	5	2	1.2	10	0.2	-	-	-	10	40	50	80	100	100	100	100	100	100
NaCl	(mM)	130	130	5	2	1.2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
KCl	(mM)	5	5	5	2	1.2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CaCl <sub>2</sub>	(mM)	2	2	2	2	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MgCl <sub>2</sub>	(mM)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Glucose	(mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
EGTA	(mM)	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetic	(mM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citric	(mM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH		7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4

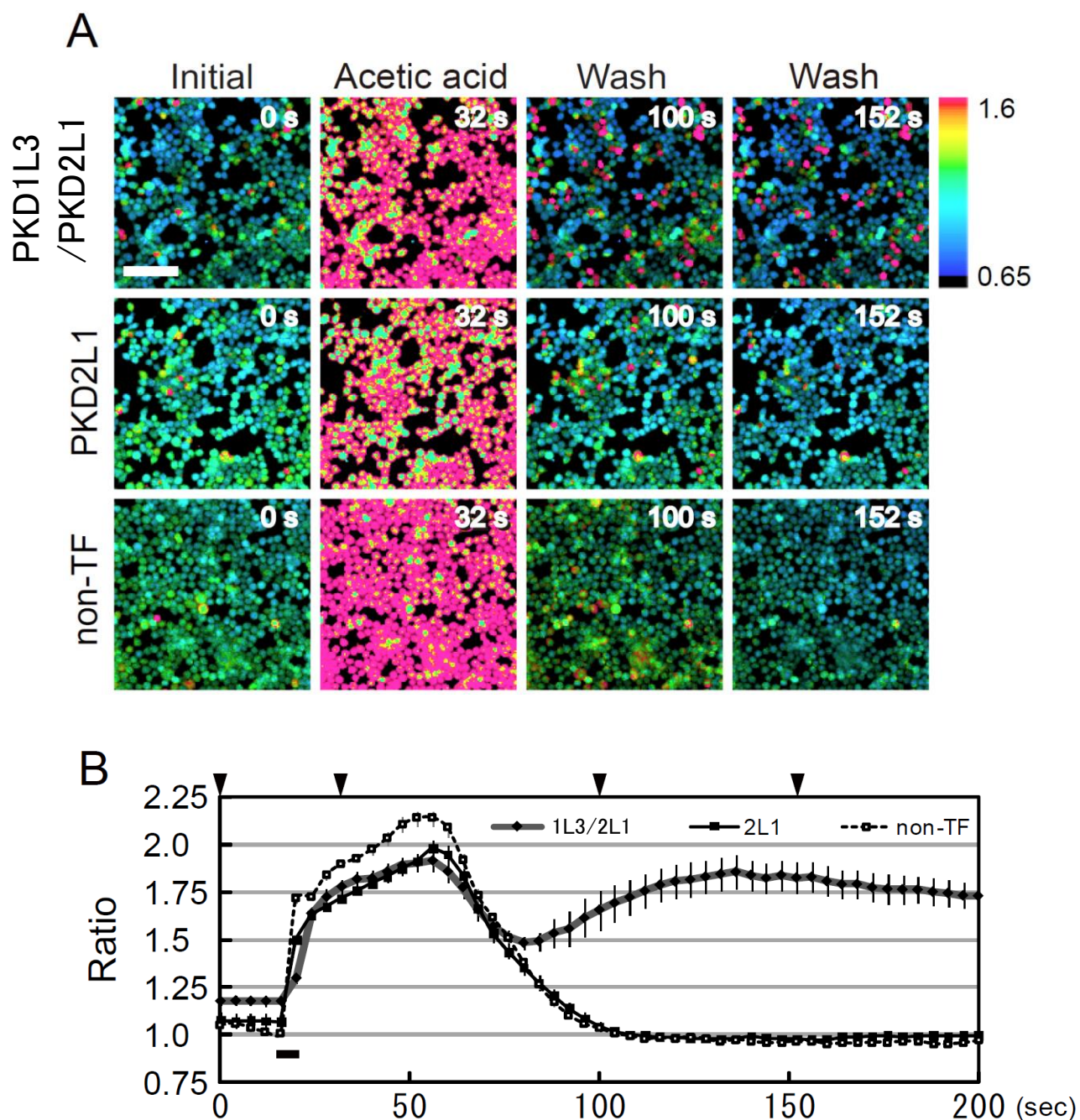


図2-1 酢酸刺激に対する内因性応答

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293T (PKD1L3/PKD2L1)、PKD2L1発現HEK293T (PKD2L1) およびノントランスフェクションHEK293T (non-TF) をカルシウムイメージングに供し、100 mM酢酸 (pH2.8) で刺激した際のRatioの経時変化を示した。(A) Bにおいて矢頭で示した時点(0秒、32秒、100秒、152秒)における代表的な蛍光イメージを示した。スケールバー:100  $\mu\text{m}$ 。(B) 代表的な10細胞のRatioの平均の経時変化を示した。エラーバーは標準誤差を示す。PKD1L3/PKD2L1発現HEK293T (1L3/2L1) では152秒時点で高いRatioを示していた10細胞の平均を示した。黒色の水平な線は100 mM酢酸 (pH2.8) の投与を示す。

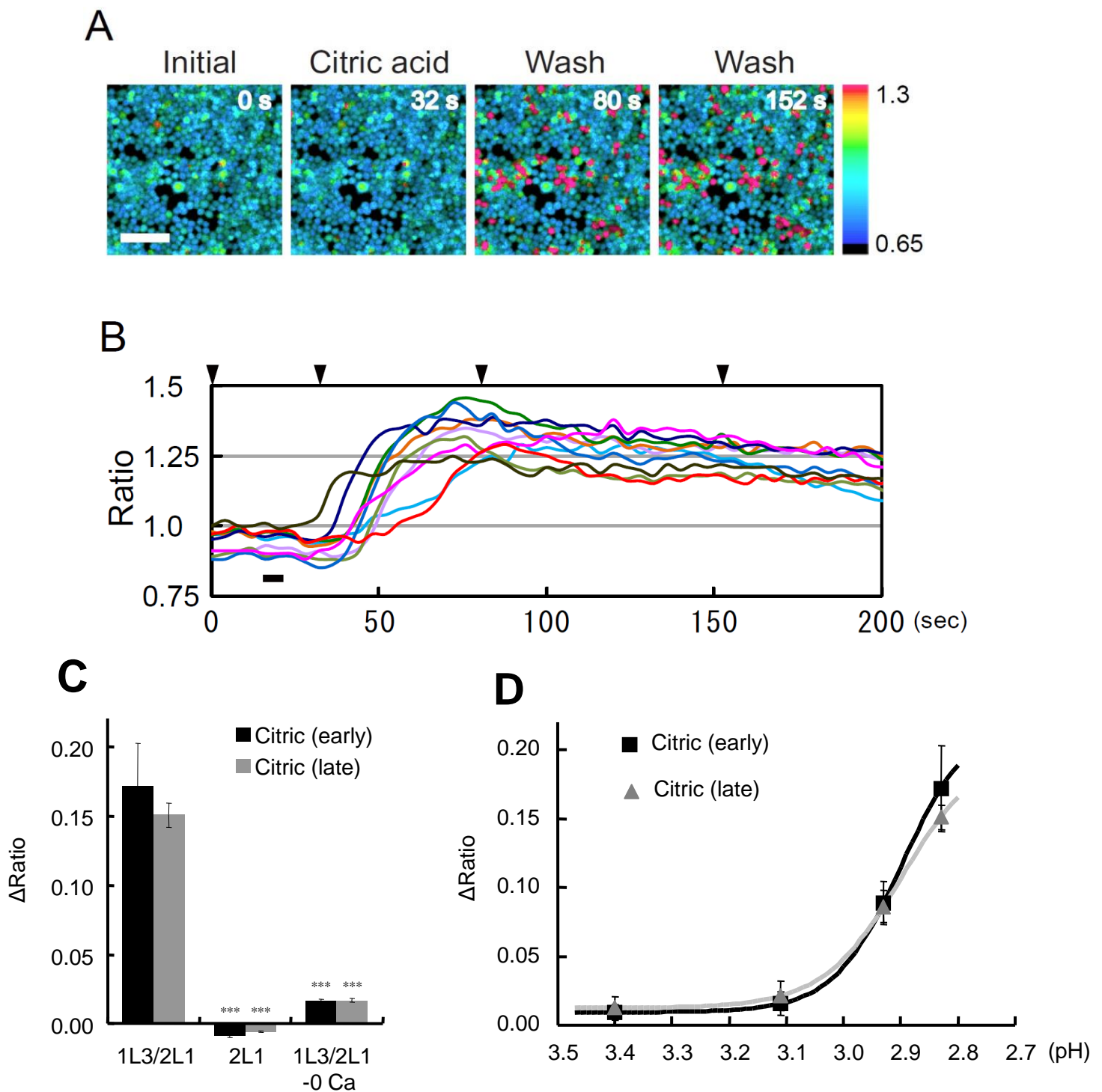


図2-2 クエン酸刺激に対するPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tをカルシウムイメージングに供し、Ratioの経時変化を示した。(A) Bにおいて矢頭で示した時点(0秒、32秒、100秒、152秒)における代表的な蛍光イメージを示した。スケールバー: 100  $\mu\text{m}$ 。(B) 80秒時点で高いRatioを示した代表的な10細胞のRatio経時変化を示した(C) earlyフェーズ(黒)、lateフェーズ(灰)における $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示した( $n = 3$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。PKD1L3/PKD2L1発現HEK293T(1L3/2L1)、PKD2L1発現HEK293T(2L1)、PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tを0Ca-1Hバッファー中で測定(1L3/2L1-0Ca)。有意差検定は分散分析に続くダネットの検定を1L3/2L1群を対照としearly、lateのそれぞれで実施した。\*\*\* $p < 0.001$ (D) クエン酸刺激に対する細胞応答強度のpH依存性を示した。四角印: 80秒(earlyフェーズ)、三角印: 152秒(lateフェーズ)におけるRatio変化値。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n = 3$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。



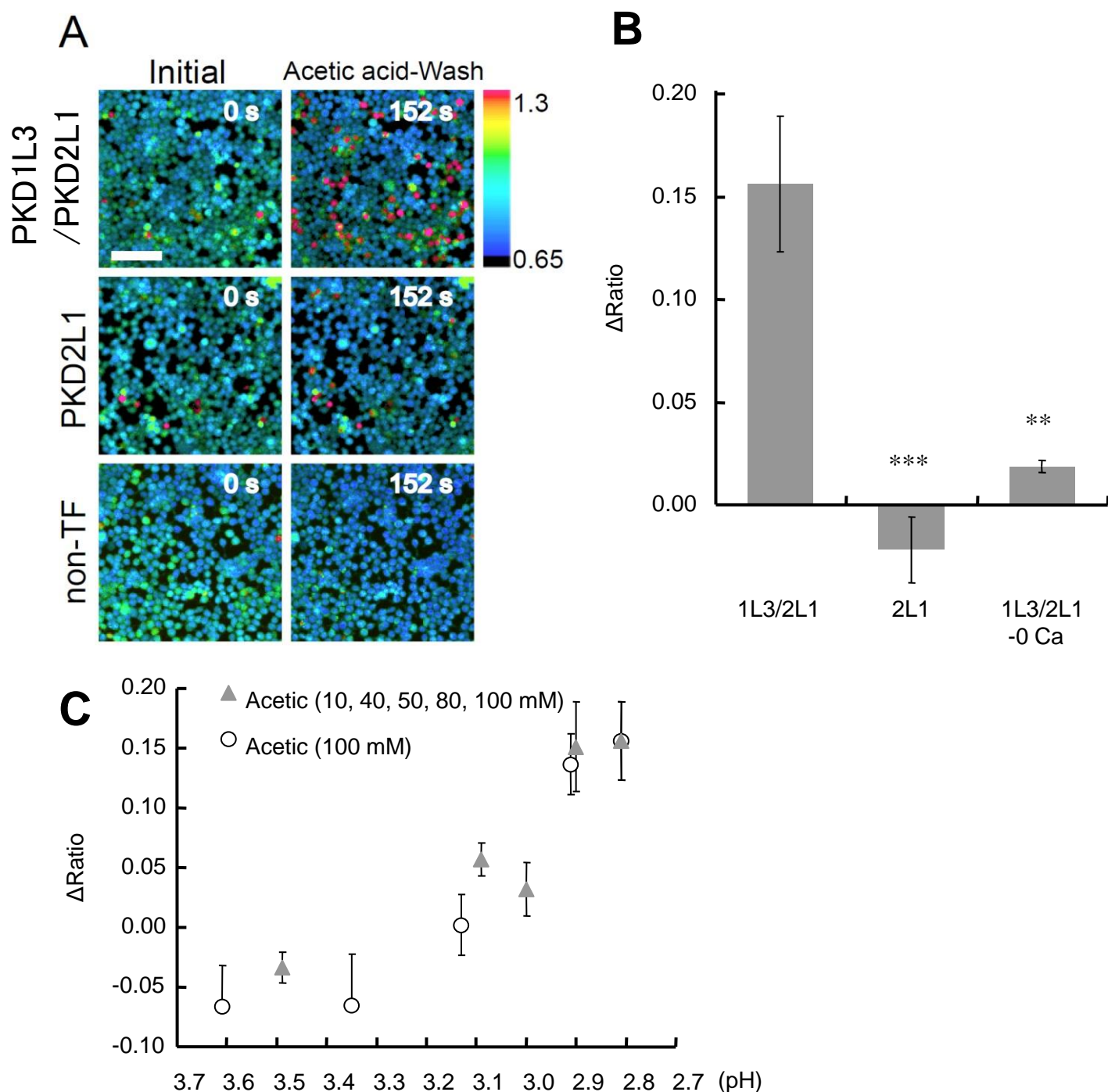


図2-3 酢酸刺激に対するPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293T (PKD1L3/PKD2L1)、PKD2L1発現HEK293T (PKD2L1) およびノントランスフェクションHEK293T (non-TF) をカルシウムイメージングに供した。(A) 代表的な蛍光イメージ。スケールバー: 100  $\mu$ m。(B) 152 秒 (late phase) における $\Delta$ Ratioの平均 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 3$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta$ Ratioの平均値を算出した。PKD1L3/PKD2L1発現HEK293T (1L3/2L1)、PKD2L1発現HEK293T (2L1)、PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tを0Ca-1Hバッファー中で測定 (1L3/2L1-0Ca)。有意差検定は分散分析に続くダネットの検定を1L3/2L1群を対照として実施した。 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。(C)  $\Delta$ RatioのpH依存性。三角印: 異なる酢酸濃度の溶液 (10, 40, 50, 80, 100 mM, pH3.5, 3.1, 3.0, 2.9, 2.8) で刺激した際の値。丸印: 酢酸濃度は100 mMで一定とし、HEPES濃度が異なる酸溶液 (1, 2, 5, 10, 20 mM HEPES, pH2.8, 2.9, 3.1, 3.4, 3.6) で刺激した際の値。各点は $\Delta$ Ratio変化の平均 $\pm$ 標準誤差を示す ( $n = 3$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta$ Ratioの平均値を算出した。

### 第 3 章

カプサイシンおよびその刺激性を有する類縁体による

**PKD1L3/PKD2L1** を介した細胞応答の抑制



### 3-1. 序

#### PKD1L3/PKD2L1 の薬理的性質

PKD1L3/PKD2L1 は PKD1L3 と PKD2L1 からなるヘテロマーである(33)。一方で PKD2L1 は単独でも、また PKD1L3 以外の分子ともヘテロマーを形成し機能することが報告されており、以下に記載するような多様な性質を示す。培養細胞に単独で発現させた PKD2L1 は酸刺激に対しては応答しないがアルカリに対しては応答する(62)。また培養細胞に PKD1 と共発現させた PKD2L1 は低浸透圧刺激に対して応答する(63)。PKD1L3 と共発現させると第 2 章にて示した通り酸刺激に対してオフ応答を示す(図 2-2)。このように相互作用する分子によって性質が変化するのである。この特性は同じファミリーに属する PKD2 においても認められており、PKD ファミリーの特徴の 1 つとされる(64)。しかしながら PKD1L3/PKD2L1 が示すオフ応答のように、酸刺激後に酸が除去されて初めて応答が生じる、という特徴的な様式は他に例を見ず、このような性質を有する PKD1L3/PKD2L1 の薬理的な性質は非常に興味深い。また薬理的性質の解明は味覚受容機構の解明においても有益な情報となる場合がある。塩味受容機構の解明ではアミロライドやマスタードの辛味成分であるアリルイソチオシアネート(AITC)が塩味に対する応答を抑制するという薬理的性質を端緒に塩味受容体や、塩味受容細胞の解明がなされている(17, 18)。このように受容体の薬理的性質の解明の意義は味覚受容機構の解明、ひいては酢酸の呈味発現機構の解明にとって有益と考えられる。しかしながら PKD1L3/PKD2L1 の薬理的な性質はほとんど明らかにされていないのが実情であった。

#### 酸味抑制

酢酸は食酢中に含まれる主要な酸であり、食品の腐敗を防ぐ静菌作用や、様々な健康機能を発揮することが知られている。しかしながら静菌作用や健康機能を期待して食酢を多く使用しすぎると酸味が強くなりすぎて嗜好されない場合がある。酸味抑制が可能になると嗜好性

を維持したまま静菌または健康機能用途で食酢を使用することが可能となり、食品衛生、健康維持に貢献することができる。第 2 章にて示した通り、酢酸は PKD1L3/PKD2L1 を活性化し、酢酸の酸味受容に関わっている可能性があるため PKD1L3/PKD2L1 の抑制剤は酢酸の酸味抑制剤になりうる可能性がある。しかしながら PKD1L3/PKD2L1 の薬理学的な性質に関する報告はほとんどなく、これまでに有効な抑制剤の報告はない。

### TRP チャネルのアゴニストの多様な作用

TRP チャネルファミリーは哺乳類では少なくとも 29 種類の遺伝子より構成されており、PKD2L1 は、この TRP チャネルファミリーに属する(28)。PKD1L3 は 11 回膜貫通タンパク質であり(29)、一般に 6 回膜貫通タンパク質である TRP チャネルとは区別される。しかし C 末端領域に 6 回膜貫通の TRP 様ドメインを有することから、広義には TRP チャネルファミリーに属するとして扱われる。TRP チャネルの生理学的機能は多様であるが、感覚受容体としての機能が広く知られている。

興味深いことに TRP チャネルファミリーにおいては、単一のチャネルが複数の異なる刺激により活性化される例が複数報告されている。例えば、TRPV1 は熱(>43°C)、酸、カプサイシン、2-aminoethyl diphenyl borate (2-APB)、カンファールなどによって活性化される(65, 66)。一方、単一の刺激が複数の TRP チャネルを活性化する例も報告されている。カンファールは TRPV3 と TRPV1 の両方を活性化し(67, 68)、イシリンは TRPA1 と TRPM8 の両方を活性化する(69, 70)。更に単一の刺激が複数の TRP チャネルに対して逆の作用をすることも報告されている。2-APB は TRPV1、TRPV2、TRPV3 を活性化する一方で TRPC5、TRPC6、TRPM2、TRPM3、TRPM8 を抑制する(66, 71–73)。メントールは TRPM8、TRPV3 を活性化する一方で、TRPA1 を抑制し、シンナムアルデヒド(CALD)は TRPA1 を活性化する一方で TRPM8 を抑制する(74)。このように TRP チャネルのアゴニストの中には他の TRP チャネルと相互作用するものが認められ、なおかつ抑制的に作用することがある。そのため既知の TRP チャネルアゴニストの中には

PKD1L3/PKD2L1 に対し抑制作用を有する物質が存在する可能性がある。

本章では特定の TRP チャネルのアゴニストが他の TRP チャネルの抑制剤として機能する例があることに着目し、各種 TRP チャネルのアゴニストの PKD1L3/PKD2L1 に対する影響を評価し、抑制剤の探索を試みた。PKD1L3/PKD2L1 の活性評価は HEK293T を用いたカルシウムイメージングを適用した。実験の迅速性を向上させるために、新たに中和法と定義したリガンド投与法を開発した。その結果、TRPV1 のアゴニストとして知られるカプサイシンおよびその類縁体が PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の酸刺激に対するカルシウム応答を抑制することを見出した。更にマウスの有郭乳頭より単離した味細胞の酸刺激に対する応答もカプサイシンにより可逆的に抑制された。以上よりカプサイシンおよびその類縁体が酸味抑制剤となる可能性が示された。

### 3-2. 材料と方法

#### 試薬

カプサイシン、カンファー、CALD、バニリルアミン、ノナン酸、6-ジングロールは和光純薬工業株式会社より購入した。(–)カンナビジオール(CBD)は Tocris Bioscience 社より購入した。2-APB、ジヒドロカプサイシン、オルバニル、アルバニルは Cayman Chemical 社より購入した。L-メントールは関東化学株式会社より購入した。リナロールは BASF 社より購入した。AITC、オイゲノールは東京化成工業株式会社より購入した。ノニバミドは Enzo Life Sciences 社より購入した。 $\omega$ -アガトキシ IV A は株式会社ペプチド研究所より購入した。

カプサイシン、CBD、2-APB、カンファー、L-メントール、リナロール、AITC、CALD、ジヒドロカプサイシン、ノニバミド、バニリルアミン、ノナン酸、6-ジングロール、オイゲノールは DMSO に溶解したものを、オルバニル、アルバニルはエタノールに溶解したものをそれぞれストック溶液とした。

#### 溶液(表 3-1)

カルシウムイメージング用のバッファーは第 2 章にて使用した 1H バッファー (1 mM HEPES)、10H バッファー (10 mM HEPES) と同じものを使用した。中和法用の中和液の組成は 100 mM HEPES、130 mM NaCl、5 mM KCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM glucose、0.2 mM EGTA、80 mM NaOH、pH 8.2 とした。50 mM high K 液の組成は 10 mM HEPES、85 mM NaCl、50 mM KCl、2 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM glucose とした。それぞれ NaOH を用いて pH 7.4 に調整した。酸溶液は酢酸、クエン酸を希釈して調製し、酸以外の組成はアッセイに使用したバッファーの組成と等しくした。カプサイシン、カンファー等、上述の試薬を含む溶液は各試薬のストック溶液を 1H バッファー、10H バッファー、酸溶液、中和液、50 mM high K 溶液に適宜溶解して調製した。全ての実験において DMSO の終濃度は < 1.0%

(vol/vol)、エタノールの終濃度は<0.1% (vol/vol)であった。

## 細胞培養とトランスフェクション

灌流法(細胞外液を灌流して刺激溶液を投与する方法)によるカルシウムイメージングに供するトランスフェクション細胞は、第2章に記載の通り、直径 35 mm ガラス底培養皿上に準備した。中和法(後述)によるカルシウムイメージングに供するトランスフェクション細胞も基本的には同様の操作により準備したが、発現ベクターとリポフェクトアミンの投与 6 時間後に細胞を回収し、ルモックス 96 穴プレート(Sarstedt) (以下 96 穴プレートと記載する)に播種しなおした。更に 24–28 時間培養した後にカルシウムイメージングに供した。尚、対照実験に用いた hTRPA1 と hTRPV3 の発現ベクターはそれぞれのコード領域(BC148423、BC104866)を pcDNA5/FRT (Invitrogen)、pEAK10 (EdgeBio System)に導入して作製した。

## カルシウムイメージング

灌流法によるカルシウムイメージングは第2章に記載の通り実施した。中和法によるカルシウムイメージングは 96 穴プレートの各穴から培地を 10H バッファーで洗浄し除去した後、底面に接着している細胞に対して 5  $\mu$ M Fura-2/AM を 30 分間室温で負荷させた。細胞を 1H バッファーでリンスした後、100  $\mu$ l の 1H バッファー中で 10 分間以上静置した。酸溶液の投与は 2 $\times$ 濃度の酸溶液(酸以外の組成は 1H バッファーと同じ)を各穴に 100  $\mu$ l ずつ添加して実施した。投与された刺激溶液(100  $\mu$ l)は穴中のバッファー(100  $\mu$ l)と混合され 1 $\times$ 濃度に希釈される。希釈後の終濃度を刺激濃度と定義した。酸溶液投与 8 秒後に中和液 50  $\mu$ l を添加して細胞外液を中和した。実施したいずれのケースにおいて中和液投与後の細胞外液 pH はほぼ中性域になった。例えば pH4.0、3.8、3.5、3.3、3.0、2.8 のクエン酸溶液は中和液投与後にはそれぞれ pH 8.0、8.0、7.9、7.6、7.4、7.2 となった。細胞応答の測定は第2章に記載の通り実施した。

## カルシウムイメージングによる味細胞応答の評価

動物実験は東京大学動物実験委員会の承認のもと実施された。味細胞の単離に用いたタイロイド液の組成は 10 mM HEPES、140 mM NaCl、10 mM glucose、10 mM sodium pyruvate、5 mM KCl、1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1 mM  $\text{MgCl}_2$  とし、NaOH で pH7.2 に調整した。カルシウムおよびマグネシウム非含有タイロイド液は上記の組成より  $\text{CaCl}_2$  および  $\text{MgCl}_2$  を除き、1 mM EGTA を加えたものとした。コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) はタイロイド溶液で希釈した。

8 週齢以上の成体の C57BL/6J 雄マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、舌を摘出した。2 mg/mL コラゲナーゼ溶液を有郭乳頭周辺の上皮直下に注入し 7 分間室温で静置した。有郭乳頭を含む上皮を剥がして、2 mg/mL コラゲナーゼ溶液に 30 秒間浸漬した後、15 分間カルシウムおよびマグネシウム非含有タイロイド液に浸漬して室温で静置した。味細胞を上皮よりガラスキャピラリーを用いて穏やかに吸引して単離し Cellmatrix type I-C (新田ゼラチン株式会社) でコートした直径 35 mm ガラス底培養皿に移した。単離した味細胞に 5  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM を 30 分間室温で負荷させた。細胞をバッファーでリンスした後、試験に供した。刺激溶液の投与は灌流装置を用いて実施した。灌流液は 10H バッファーとし流速は 5 mL/分とした。カルシウムイメージング法による細胞応答の記録操作は第 2 章に記載の通り実施した。但し味細胞では HEK293T 細胞と比較して、蛍光像の輝度が低かったため露光時間を延長して 340 nm: 1500 ms、380 nm: 750 ms とした。

### 3-3. 結果

#### PKD1L3/PKD2L1 活性化の迅速な評価法の開発

PKD1L3/PKD2L1 の機能解析手法として HEK293T 培養細胞を用いたカルシウムイメージング法が確立されている。カルシウムイメージングにおいて PKD1L3/PKD2L1 を活性化するためには培養細胞の細胞外液(バッファー)を中性から一度酸性にした後に、中性に戻す必要がある。既報では灌流装置によって連続的に細胞外液を置換しながら酸を投与し、一度酸性化した後に、酸を洗い流すことで中性に戻すという制御をしている。しかしながら灌流装置を用いる手法は迅速性に欠け、リガンド溶液が大量に必要になるという課題があり、抑制剤、増強剤のスクリーニングには不向きであった。迅速にスクリーニングを実施するためにカルシウムイメージングにおける細胞外液 pH 制御法を改良した。

PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を 96 穴プレートで培養し、Fura-2 を負荷した後に、ウェルに酸溶液を添加して細胞外液を一度酸性化した後に、中和液を添加して中性に戻す方法を採用した(図 3-1A)。酸溶液にはクエン酸溶液を用いた。なお酢酸溶液を用いた場合には酢酸自身の緩衝能の高さから中和液の投与により中和することが困難であった(結果非掲載)。中和液は緩衝剤濃度(100 mM HEPES)が酸溶液の緩衝剤濃度(1 mM HEPES)より高い pH8.2 の溶液とし、HEPES の緩衝能を利用して中和する方法を採用した。本方法により灌流装置を用いることなく、迅速な細胞外溶液の pH 制御が可能となった。PKD1L3/PKD2L1 は酸刺激後(< pH3.0)、細胞外液が pH5.0 以上まで戻ることで十分に活性化される(34)。本研究において実施したいずれの実験においても、中和後の pH は 5.0 以上に戻ることを確認している。以下、本方法による細胞外液の pH 制御を伴うカルシウムイメージング法を「中和法」と記述した。酸溶液投与後に中和液を投与する刺激を「酸-中和刺激」と記述した。また酸性化時の pH を「刺激 pH」と定義した。

中和法の具体的な操作および結果を記す。96 穴プレートに播種した PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T に Fura-2 を負荷した後、細胞外液を 1H バッファーに置換してカルシウムイメージ

ングに供した。2×濃度の酸溶液を投与し細胞外液を酸性化した 8 秒後、中和液を投与して、細胞外液を中性化した(図 3-1A)。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を pH3.0 のクエン酸溶液 (2.5 mM) で刺激し、続いて中和液を添加した(酸-中和刺激)。クエン酸溶液の添加時には応答細胞は認められなかったが、中和後に応答細胞が観察された。PKD2L1 のみ発現した細胞は、酸-中和刺激に対し応答を示さなかった(図 3-1B)。これは灌流法により細胞外液の pH 制御を実施した場合と同様の結果であった(第 2 章)。これらのことから中和法を用いて観察された細胞のカルシウム応答は機能的な PKD1L3/PKD2L1 チャネルの活性化を介して誘導されていることが示された。

pH2.8－4.0 の酸-中和刺激を実施し、細胞応答の pH 依存性を評価した。応答強度 ( $\Delta$ Ratio) は酸刺激の pH 低下依存的に強くなり  $EC_{50}$  値は pH3.3 であった(図 3-1C)。この値は以前の報告とほぼ同等であった(26)。これらの結果から中和法が PKD1L3/PKD2L1 の応答評価法として適当であり、灌流法より迅速性に優れることからチャネルの抑制剤の迅速なスクリーニングに適用可能であると判断した。

### TRP チャネルアゴニストの PKD1L3/PKD2L1 に対する抑制作用の評価

TRP チャネルアゴニストの PKD1L3/PKD2L1 に対する抑制作用を評価した。以下の 8 種類の TRP チャネルアゴニストを被験化合物とした。カプサイシン (TRPV1 アゴニスト、トウガラシに含まれる成分)(65)。CBD (TRPV2 アゴニスト、大麻に含まれる成分)(75)。カンファー (TRPV3、TRPV1 アゴニスト、湿布などに用いられ鎮痛作用を有する)(67, 68)。2-APB (TRPV1、TRPV2、TRPV3 アゴニスト、人工合成化合物)(68)。メントール (TRPM8 アゴニスト、ミント中に含有される成分)(76)。リナロール (TRPM8 アゴニスト、レモン中に含有される成分)(77)。AITC (TRPA1 アゴニスト、マスタードオイルに含有される成分)(78)。CALD (TRPA1 アゴニスト、シナモンに含有される成分)(79)。



初めに 8 種類の TRP チャネルのアゴニストをそれぞれ PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T に単独で投与した。その結果ほとんど応答が認められなかったため、これらの化合物自身によって PKD1L3/PKD2L1 は活性化されないことが示された(図 3-2)。次に PKD1L3/PKD2L1 の酸-中和刺激に対する応答が TRP チャネルアゴニストによって抑制作用を受ける可能性を検証した。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を 100  $\mu$ M の TRP チャネルのアゴニスト存在下で酸-中和刺激し、応答強度を測定した。酸溶液には 2 $\times$ 濃度の被験化合物(TRP アゴニスト)を、中和液には 1 $\times$ 濃度の被験化合物を予め添加することで酸刺激以降の細胞外液中の被験化合物濃度を一定に保った(図 3-3A)。酸刺激に用いる酸溶液のクエン酸濃度は 1.4 mM と 2.5 mM の 2 点とした。前者は EC<sub>50</sub> 付近である pH3.3 を与え、後者は応答が飽和する付近の pH3.0 を与える。TRP アゴニスト非存在下(コントロール)では PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T は pH3.3-中和刺激に対して  $0.13 \pm 0.03$  の、pH3.0-中和刺激に対して  $0.20 \pm 0.05$  の  $\Delta$  Ratio を示した。続いて TRP アゴニスト存在下で酸-中和刺激に対する応答評価を行った。注目すべきことに 100  $\mu$ M カプサイシン存在下における pH3.0-中和刺激に対する応答強度( $\Delta$  Ratio  $0.04 \pm 0.01$ )はコントロールと比較して有意に低かった。CBD、2-APB、カンファー、メントール、リナロール、AITC、CALD の存在による細胞応答強度の有意な変化は認められなかった(図 3-3B)。

応答強度を経時的に解析すると、コントロールでは酸刺激に続く中和後に Ratio の上昇が認められた。Ratio は 60 秒間以上高い値を維持した(図 3-3C)。一方、カプサイシン存在下では Ratio の上昇を示した細胞数は少なく、また応答強度も弱かった(図 3-3C)。この結果はカプサイシンが PKD1L3/PKD2L1 の活性抑制作用を有する可能性を示唆した。そこでカプサイシンの抑制作用について以下で詳細に解析を行った。

#### pH 依存性および濃度依存性の評価

カプサイシン存在下における PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の酸-中和刺激に対する

応答の pH 依存性を評価した。カプサイシン非存在下(コントロール)では酸 - 中和刺激に対して図 3-1C に示した結果と同様に細胞応答強度は酸刺激の pH 低下依存的に上昇した。一方、100  $\mu$ M カプサイシン存在下では酸-中和刺激に対してほとんど応答を示さなかった。pH3.8、3.5、3.3、3.0、2.8 における応答強度はカプサイシン非存在下と比較して有意に小さかった(図 3-4A)。

抑制作用のカプサイシン濃度依存性を評価するために PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の酸(pH3.0) - 中和刺激に対する応答を 1 – 150  $\mu$ M カプサイシン存在下において評価した。カプサイシン濃度は酸溶液投与時から、中和剤投与時、測定終了まで一定に保った。応答強度はカプサイシン濃度依存的に減少し、用量依存的抑制カーブから IC<sub>50</sub> が  $32.5 \pm 10.2 \mu$ M であることが示された。150  $\mu$ M のカプサイシン存在下では応答はほぼ完全に消失した(図 3-4B)。この結果よりカプサイシンが PKD1L3/PKD2L1 の抑制剤として機能することが示唆された。

### 抑制作用の特異性の評価

カプサイシンの応答抑制作用の特異性を評価するために、他の TRP チャネルや受容体を介した HEK293T のカルシウム応答に対するカプサイシンの作用を検証した。初めに TRP チャネルの一種である hTRPA1 を介した応答に対するカプサイシンの作用を評価した。hTRPA1 を一過的に発現させた HEK293T を 100  $\mu$ M カプサイシン存在下、非存在下で hTRPA1 の既知のアゴニストである 100  $\mu$ M AITC で刺激した。hTRPA1 発現 HEK293T はカプサイシンの存在の有無に関わらず 100  $\mu$ M AITC 刺激に対して明瞭なカルシウム応答を示した(図 3-5A)。またカプサイシン存在下、非存在下における AITC 濃度依存性は同等であり各濃度における細胞応答強度に有意差は認められなかった(図 3-5B)。更に TRP チャネルの一種である hTRPV3、および HEK293T に内在性の受容体であるプリン受容体(80)を介した応答に対するカプサイシンの作用を評価した。前者は hTRPV3 を一過的に発現させた HEK293T を既知のリガンドであるカンファーで刺激して評価した。後者は HEK293T を ATP で刺激して評価した。

いずれの応答も 100  $\mu$ M カプサイシンの存在の有無に関わらず明瞭なカルシウム応答を示した。さらに応答の濃度依存性はカプサイシンの存在の有無に関わらず同等であり、各濃度における細胞応答強度に有意差は認められなかった(図 3-5C、D)。これらの結果よりカプサイシンは非特異的にあらゆる受容体を介した細胞応答を抑制するわけではないこと、および HEK293T はカプサイシン存在下でカルシウム応答能を維持していることが示された。

### カプサイシン類縁体の PKD1L3/PKD2L1 に対する作用の評価

カプサイシンが PKD1L3/PKD2L1 の応答抑制作用を発揮するために必要となる分子の構造的特徴を明らかにするため、カプサイシン類縁体群の PKD1L3/PKD2L1 に対する抑制作用を評価した。カプサイシンと構造的に類似性を持つ化合物は多数存在する。カプサイシンはバニルアミンと 8-メチル-6-ノネン酸がアミド結合した酸アミドという構造である(図 3-6A)。まず酸アミドの構成部位のうちアミド結合から伸びている炭素鎖の構造と抑制作用の関連性を評価した。ジヒドロカプサイシン、ノニバミド、オルバニル、アルバニルはそれぞれバニルアミンと、8-メチルノナン酸、ノナン酸、オレイン酸、アラキドン酸の酸アミドとみなすことができ、炭素鎖の長さや二重結合、分岐の有無が異なる(図 3-6A)。これら類縁体の存在下で PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を酸-中和刺激し応答強度をカルシウムイメージングによって記録した。100  $\mu$ M ジヒドロカプサイシン、ノニバミド存在下では  $\Delta$  Ratio(応答強度)は  $0.08 \pm 0.02$ 、 $0.04 \pm 0.01$  であり、非存在下(コントロール)における  $\Delta$  Ratio( $0.31 \pm 0.04$ )より有意に低かった。一方、オルバニル、アルバニル存在下での  $\Delta$  Ratio にコントロールと比較して有意な差は認められなかった。一方、バニルアミン、ノナン酸はカプサイシンおよびノニバミド分子を構成する部分構造とみなせる。これらの部分構造のみによって応答抑制作用が発揮されるか否かを評価するためにバニルアミン、ノナン酸の存在下で細胞応答を評価したところ抑制作用は認められなかった。6-ジングロールおよびオイゲノールの分子構造はカプサイシン同様にバニル基と炭素鎖を有するが、アミド結合を有さない。応答抑制作用にアミド結合が必須

であるか否かを評価するために 6-ジンゲロール、オイゲノール存在下で細胞応答を評価した。6-ジンゲロール存在下において、酸-中和刺激に対する細胞応答時の  $\Delta \text{Ratio}$  は  $0.11 \pm 0.02$  であり、抑制作用は小さいながらもコントロールより有意に低かった。オイゲノール存在下では応答強度にコントロールと有意な差は認められなかった(図 3-6B)。

抑制作用を示した類縁体、すなわちジヒドロカプサイシン、ノニバミド、6-ジンゲロールについて抑制作用の濃度依存性を評価した。いずれの化合物も濃度依存的に酸-中和刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の細胞応答強度を低下させた。濃度依存曲線より推定された  $\text{IC}_{50}$  値はジヒドロカプサイシンで  $55.0 \pm 14.2 \mu\text{M}$ 、ノニバミドで  $42.2 \pm 8.9 \mu\text{M}$  であった。これらの値はカプサイシンの  $\text{IC}_{50}$  値と同等程度であった。一方、6-ジンゲロールの  $\text{IC}_{50}$  値は  $85.9 \pm 34.7 \mu\text{M}$  であり、この値はカプサイシンの  $\text{IC}_{50}$  値の約 2.5 倍であった(図 3-6C)。抑制作用の強度( $\text{IC}_{50}$  値より示される等濃度での抑制強度)はカプサイシン  $\approx$  ジヒドロカプサイシン  $\approx$  ノニバミド  $>$  6-ジンゲロールであり、オルバニル、アルバニル、バニリルアミン、ノナン酸、オイゲノールに抑制作用は認められなかった。

#### カプサイシンの PKD1L3/PKD2L1 抑制作用の可逆性

カプサイシンによる PKD1L3/PKD2L1 抑制作用の可逆性を検証するため、PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の酸刺激に対する細胞応答を灌流装置を用いて連続的に細胞外液のカプサイシンの有無を切り替えながら観察した。初めにカプサイシン非存在下においてクエン酸(pH 2.8)を投与し、投与後速やかにバッファー(pH 7.4)でクエン酸を洗い流した。この時には明瞭なカルシウム応答が認められ、 $\Delta \text{Ratio}$  は  $0.12 \pm 0.02$  であった。応答細胞の  $\text{Ratio}$  が基底レベル付近まで低下した後(約 800 秒後)、 $100 \mu\text{M}$  カプサイシン存在下においてクエン酸(pH 2.8)を投与し速やかに洗浄した。この場合、細胞応答はほとんど観察されず、 $\Delta \text{Ratio}$  は  $0.02 \pm 0.01$  であり 1 度目の酸刺激に対する応答強度より有意に低かった。再度、灌流液をカプサイシン非含有バッファーに切り替えて細胞外液からカプサイシンを除去し、クエン

酸(pH 2.8)を投与した後に、速やかに洗浄したところ再び明瞭な細胞応答が観察された(図 3-7A)。 $\Delta$  Ratio は  $0.08 \pm 0.01$  でありカプサイシン存在下と比較して有意に大きかった(図 3-7B)。この結果はカプサイシンによる PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の応答抑制作用が可逆的であることを示している。

#### マウス味細胞における酸応答のカプサイシンによる抑制

マウスの有郭乳頭より単離された味細胞の中に、クエン酸刺激に対してオン応答およびオフ応答を示す細胞が存在することが近年、実験的に示された(35)。単離された味細胞のうち酸刺激に応答した細胞は全てグルタミン酸脱炭酸酵素 67 kDa アイソフォーム(GAD67)を発現していた。GAD67 陽性細胞は酸刺激に対する応答性を持つことが確認されており、酸味受容細胞のマーカー遺伝子とされる(81)。GAD67 陽性細胞の大部分(92.8%)が PKD2L1 タンパク質を発現しており、また有郭乳頭において PKD2L1 は PKD1L3 と共発現している。一方 PKD2L1 は発現するが、PKD1L3 を発現しない茸状乳頭由来の味細胞はオン応答のみを示した(32, 35)。以上のことより有郭乳頭由来味細胞において観察された酸に対するオフ応答は PKD1L3/PKD2L1 を介して発生したものである可能性が示唆されている(35)。そこで HEK293T を用いた実験系にて見出されたカプサイシンの抑制作用が、味細胞のオフ応答に対しても同様に発揮されるか否かを検証した。

C57BL/6J マウスの有郭乳頭より味細胞を摘出し、味細胞に Fura-2 を負荷してカルシウムイメージングに供した。味細胞に連続的に刺激溶液を投与してカルシウム応答を評価した。味細胞の準備にあたり、ガラスキャピラリーを使用して味蕾全体を摘出したため、目的の酸味受容細胞以外の甘味受容細胞等もカルシウムイメージングの視野中に含まれてしまっている。細胞の外観による細胞種の識別は不可能であるので、常法に従い、脱分極刺激に対する応答性により酸味受容細胞の識別を試みた。味細胞の脱分極を誘導する 50 mM カリウム(高濃度 K) 刺激すると、電位依存性カルシウムチャネルを発現している一部の細胞においてカルシウ

ム応答が観察される。この高濃度 K 刺激応答性細胞の大部分が酸味受容細胞に相当すると考えられている(82, 83)。高濃度 K 刺激を酸やカプサイシンなど一連の被験物質の投与後に実施し、高濃度 K 刺激に対して応答した細胞を酸味細胞とみなし解析対象として選択した。酸刺激には pH4.3 のクエン酸溶液を用いた。この pH は HEK293T に発現させた PKD1L3/PKD2L1 の活性化閾値(pH3 付近)より高いが、味細胞でのオフ応答の閾値は pH5 付近と報告されているため、オフ応答を誘起し得ると考えられた(35)。

その結果、5 個の味蕾に由来する 11 細胞が高濃度 K 刺激に対して応答した。代表的な 2 細胞(図 3-8A で cell a、cell b で示した細胞)の Ratio を図 3-8B に示した。11 細胞のうち 10 細胞(90.9%)において最初の 3.0 mM クエン酸刺激(pH 4.3)に対して 2 回の独立した一過的な応答が認められた(図 3-8B-2)。1 回目の応答は酸溶液に暴露中に観察されたためオン応答、2 回目の応答は酸溶液の洗浄後に観察されたためオフ応答とみなした。オフ応答における  $\Delta$  Ratio は  $0.62 \pm 0.11$  であった。Ratio が基底レベル付近に戻った後(400 秒後)、100  $\mu$ M カプサイシン存在下で 3.0 mM クエン酸刺激(pH 4.3)を実施した。酸溶液の洗浄後にオフ応答が観察されたが、 $\Delta$  Ratio は  $0.17 \pm 0.03$  でカプサイシン非存在下と比較して有意に小さかった。オフ応答のピークはブロードな形状を示した(図 3-8B-3、C)。カプサイシン存在下における酸に対するオン応答の  $\Delta$  Ratio も非存在下と比較して有意に小さかった(図 3-8B-3、C)。カプサイシン除去後に再度 3.0 mM クエン酸刺激(pH 4.3)すると明瞭なオン応答とオフ応答が観察された(図 3-8B-4)。オフ応答の  $\Delta$  Ratio は  $0.50 \pm 0.10$  でカプサイシン存在下と比較して有意に大きかった。一方、味細胞をカプサイシンのみで刺激した際に明瞭な応答は観察されなかった(図 3-8B-5)。これよりカプサイシンがマウスの味細胞において酸刺激に対するオフ応答を可逆的に抑制することを示された。

#### 味細胞におけるカプサイシンの作用機序解明

酸味受容細胞は電位依存性カルシウムチャネルを発現している(82, 83)。味細胞で観察さ

れたオフ応答における Ratio の上昇は PKD1L3/PKD2L1 のポアを通じたカルシウム流入だけでなく、カルシウム流入により生じた膜電位の変化により二次的に活性化された電位依存性カルシウムチャネルを通じたカルシウム流入を反映している可能性も否定することはできない。そのため、カプサイシンによるオフ応答の抑制が PKD1L3/PKD2L1 の抑制を反映しているか、電位依存性カルシウムチャネルによる二次的なシグナル伝達の抑制を反映しているかは不明である。このことを検証するために味細胞の高濃度 K 応答に対するカプサイシンの影響を評価した。摘出した味細胞に Fura-2 を負荷し、高濃度 K 刺激をカプサイシン存在下、非存在下で評価した。その結果、味細胞の高濃度 K 応答がカプサイシンによって可逆的に抑制された(図 3-9)。すなわち味細胞に発現している電位依存性カルシウムチャネルがカプサイシン感受性であることが示された。味細胞においてカプサイシンが PKD1L3/PKD2L1 を直接的に抑制しているか否かを評価するためには電位依存性カルシウムチャネルの影響を排除して、オフ応答の観察およびカプサイシン感受性の評価を実施する必要があると考えられた。酸味受容細胞に発現する電位依存性カルシウムチャネルは P/Q タイプに分類され、選択的 P/Q タイプチャネルブロッカーである 300 nM  $\omega$ -アガトキシン IV A によって高濃度 K 刺激に対する細胞応答が抑制されることが報告されている(82, 83)。P/Q タイプチャネルの影響を排除するために  $\omega$ -アガトキシン IV A 存在下で酸応答に対するカプサイシンの影響を評価する実験を計画した。しかしながら  $\omega$ -アガトキシン IV A の作用条件の予備的検討段階において、300、および 1000 nM  $\omega$ -Agatoxin IV A (株式会社 ペプチド研究所)は高濃度 K 刺激に対する応答を抑制しなかった(図 3-10、1000 nM については結果非掲載)。そのため電位依存性カルシウムチャネルの影響について詳細な解析はしなかった。

#### 酢酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の応答のカプサイシンによる抑制

これまでの実験では迅速性の観点より中和法にて評価ができるクエン酸溶液を使用した、ここでは第 2 章にて開発した酢酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 応答評価手法を用いて酢

酸刺激に対する応答と、そのカプサイシンによる抑制を評価した。PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T を灌流装置を用いて 100 mM 酢酸 (pH2.8) で刺激し、速やかに酢酸を洗い流した。一過的な内因性応答が観察された後、late フェーズにおいても高い Ratio を維持している応答細胞が観察された。 $\Delta$  Ratio は  $0.10 \pm 0.01$  であった。late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio は PKD1L3/PKD2L1 の活性化を反映している (第 2 章)。次に 100  $\mu$ M カプサイシン存在下で酢酸刺激に対する応答を評価した。内因性応答は同様に観察されたが、late フェーズにおける  $\Delta$  Ratio は  $0.02 \pm 0.01$  でありカプサイシン非存在下と比較して有意に小さかった (図 3-11)。以上より、酢酸刺激に対する PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の応答も、カプサイシンにより抑制されることが示された。



### 3-4. 考察

本章において、PKD1L3/PKD2L1 発現 HEK293T の酸-中和刺激に対する応答は、TRPV1 のアゴニストとして良く知られているカプサイシンによって抑制されることが示された(図 3-3、3-4)。異種発現させた hTRPA1、hTRPV3、および内在性プリン受容体を介した HEK293T のカルシウム応答はカプサイシン非感受性であり(図 3-5)、また PKD1L3/PKD2L1 の抑制作用は可逆的であったことから(図 3-7)、カプサイシンによる抑制作用はおそらく PKD1L3/PKD2L1 タンパク質とカプサイシンの一過的な相互作用によるものであり、HEK293T 自体の応答性を抑制したり、PKD1L3/PKD2L1 タンパク質を不可逆的に変性するものでないと推察された。TRPV1 および PKD1L3/PKD2L1 はいずれも TRP チャンネルファミリーに属するにも関わらず、カプサイシンは両者に対して逆の作用を示した点は非常に興味深い。味細胞の酸刺激に対するオフ応答もカプサイシンは可逆的に抑制した(図 3-8)ことから、カプサイシンを経口摂取した際に発揮される作用は TRPV1 活性化による辛味の惹起に留まらず、味細胞の酸刺激に対する応答性にも影響することが示された。

さらに一部のカプサイシン類縁体においても PKD1L3/PKD2L1 を介した細胞応答の抑制作用が認められた(図 3-6)。カプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノニバミドは抑制作用を示し、その IC<sub>50</sub> 値は同程度であった。一方、オルバニル、アルバニルは抑制作用を示さなかった。カプサイシンの炭素鎖の鎖長は C9 である。ジヒドロカプサイシン、ノニバミドも C9 であるが、炭素鎖内の二重結合、メチル基の有無や位置が異なる。オルバニルの炭素鎖は C18、アルバニルの炭素鎖は C20 である。これらのことから炭素鎖における二重結合、メチル基の存在よりも、炭素鎖長が重要であることが示唆された。複数のカプサイシン類縁体が PKD1L3/PKD2L1 抑制作用を示したことから、抑制作用を発揮するために必要な構造には一定の多様性が許容されることが示唆された。すなわち本研究において評価した類縁体の他にも、カプサイシンと類似構造を有する化合物の中に PKD1L3/PKD2L1 抑制作用を持つ物質が存在するかもしれない。

更なるスクリーニングによって新たな抑制剤を見出せる可能性がある。

本研究において開発された中和法は一般的な灌流装置を用いた方法と比較し、測定に要する時間を約 5 分の 1 に短縮することができる。更に試験に供するサンプル化合物の消費量を約 50 分の 1 に減らすことができる。そのため抑制剤のスクリーニングにおいては有効な手段と言える。一般的な TRP チャネルの抑制剤として知られる複数の化合物 (66) の PKD1L3/PKD2L1 に対する効果を、中和法を用いて評価したところ、SKF96365 が PKD1L3/PKD2L1 に対する抑制作用を示すことも証明した。その  $IC_{50}$  値は  $48.1 \pm 10.8 \mu M$  であり、カプサイシンと同程度であった (図 3-12)。SKF96365 は広範な TRP チャネルにポアブロッカーとして作用することが知られるが、PKD1L3/PKD2L1 に対する作用や力価はこれまでに評価されていなかった。本手法を用いて多様な成分を対象にスクリーニングを実施することで、酸味抑制成分を同定できる可能性がある。

PKD1L3/PKD2L1 抑制作用を示したカプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノニバミド、ジンゲロールはいずれも辛味 (Pungency) を呈する物質として知られる (84)。そのため、これらの化合物による口腔内における辛味誘導機構と PKD1L3/PKD2L1 抑制機構の間に共通性が存在する可能性が推察された。辛味は体性感覚神経に発現する TRPV1 の活性化を介して誘導される (65)、カプサイシン、ジヒドロカプサイシン、ノニバミド、ジンゲロールはいずれも TRPV1 のアゴニストである (85, 86)。カプサイシンによる TRPV1 の活性化については変異体を用いた解析から、TRPV1 タンパク質の細胞内領域に位置する Y511 の芳香環とカプサイシンのバニリル基の相互作用が必須とする作用モデルが提唱されている (87)。TRPV1 の Y511 残基の近傍アミノ酸配列 (<sup>509</sup>DSYSE<sup>513</sup>) は PKD2L1 のアミノ酸配列の一部 (<sup>562</sup>DTYSE<sup>566</sup>) と相同性を有する。この相同配列は PKD2L1 の第 6 膜貫通領域の直後の細胞質内、すなわち C 末端領域に位置するが、この領域は PKD1L3/PKD2L1 チャネルが活性化し、カルシウムを透過させるために必須の機能を果たしていると考えられている (32)。具体的には、PKD2L1 のデリーションミュータ

ントを用いた試験により、PKD2L1 の細胞質側 C 末端領域 (N561-F621) を欠失したデリーションミュータントは PKD1L3 と相互作用し、細胞膜表面に発現する性質は維持するにもかかわらず、酸刺激に対する応答性を失うことが示されている(32)。相同配列 (<sup>562</sup>DTYSE<sup>566</sup>) はこの C 末端領域 (N561-F621) 内に位置するためカプサイシンと PKD1L3/PKD2L1 は PKD2L1 サブユニット中の相同領域において相互作用し、チャネルの活性化阻害やポアのブロックに関わっているのかもしれない。

TRPV1 のカプサイシン受容機構の解明を目的として、ラット TRPV1 の Y511 における点変異体の機能解析がなされている(87)。野生型の TRPV1 はカプサイシンだけでなく酸刺激に対しても応答を示す。一方、点変異体 Y511A、Y511C、Y511F は酸応答性を維持しながら、カプサイシン応答性が選択的に消失もしくは低下することが報告されており Y511 がカプサイシンの相互作用に関与していることが示されている(87)。そこで PKD2L1 においても相同配列 (<sup>562</sup>DTYSE<sup>566</sup>) におけるチロシン残基 (Y564) がカプサイシンとの相互作用に関与している可能性があり、このことを検証するために、PKD2L1 の 3 種類の変異体 (Y564A、Y564C、Y564F) を作出し、PKD1L3 (WT) と HEK293T に共発現させカルシウムイメージングによる機能解析を実施した。その結果 Y564A、Y564C はチャネル本来の機能自体を喪失し、酸 - 中和刺激に対して応答しなかった。また Y564F は酸 - 中和刺激に対する応答性を維持していたがカプサイシン感受性を評価したところ、野生型と同様にカプサイシン濃度依存的に酸 - 中和刺激に対する応答強度の低下が観察された (図 3-13A、B)。この結果は PKD2L1 の Y564 とカプサイシンとの相互作用性を示唆するものではなかった。次に別の残基がカプサイシンとの相互作用に関与する可能性についても検証を試みた。ラット TRPV1 のカプサイシン受容には S512 も関与していることが示唆されている(87)。これは TRPV1 の点変異体、S512Y、S512A、S512T が酸応答性を維持しながら、カプサイシン応答性が選択的に消失もしくは低下することから示されている(87)。そこで PKD2L1 においても相同配列 (<sup>562</sup>DTYSE<sup>566</sup>) におけるセリン残基 (S565) がカプサイシンとの相互作用に関与している可能性があり、このことを検証するため

に、PKD2L1 の 3 種類の変異体(S565Y、S565A、S565T)を作出し機能解析した。その結果 S565Y はチャンネル本来の機能自体を喪失し、カプサイシン非存在下においても酸 - 中和刺激に対して応答しなかった。S565A、S565T は酸 - 中和刺激に対する応答性を維持していたが、S565A、S565T のカプサイシン感受性を評価したところ野生型と同様、カプサイシン濃度依存的に酸 - 中和刺激に対する応答強度の低下が観察された(図 3-13C、D)。これらの結果は PKD2L1 の S565 とカプサイシンとの相互作用性を示唆するものではなかった。PKD1L3/PKD2L1 とカプサイシンの相互作用領域の解明には更なる研究が必要であろう。

TRPV1 アゴニストであるカプサイシン、ノニバミド、ジヒドロカプサイシン、6-ジングロールは PKD1L3/PKD2L1 の応答を抑制したが、同じく TRPV1 アゴニストであるオルバニル、アルバニル(88, 89)は抑制作用を示さなかった(図 3-6)。TRPV1 は食品の辛味の受容体としての機能を有し、カプサイシン、ノニバミド、ジヒドロカプサイシン、6-ジングロールは辛味を惹起する。オルバニル、アルバニルは *in vitro* では TRPV1 のアゴニスト活性を示すが、辛味を惹起しない類縁体(Nonpungent analogs)である。TRPV1 アゴニスト活性を持つカプサイシン類縁体の中で PKD1L3/PKD2L1 の応答を抑制する化合物と、辛味を惹起する化合物が一致している。この点は PKD1L3/PKD2L1 の応答抑制機構を考察するうえで興味深い点であり、更なる解析が待たれる。

マウスの味細胞を用いた解析においても、カプサイシンは酸刺激に対するオフ応答を有意に抑制した(図 3-8)。有郭乳頭より摘出された味細胞で観察されるオフ応答は PKD1L3/PKD2L1 の活性化を介して発生していることが示唆されている(35)。また味細胞におけるオフ応答のカプサイシンによる抑制は可逆的であり、カプサイシン投与後に味細胞が応答性を失っていないことが高濃度 K 応答性により確認されている(図 3-8)。さらに HEK293T を用いた異種発現系においてもカプサイシンによる PKD1L3/PKD2L1 の抑制作用が確認されている(図 3-3、4)ことから味細胞における酸刺激に対するオフ応答のカプサイシンによる抑制は、

カプサイシンによる PKD1L3/PKD2L1 の応答抑制を反映している可能性が示唆された。

しかしながら味細胞においてカプサイシンが PKD1L3/PKD2L1 を直接的に作用していることを示すためには更なる解析が必要である。味細胞で観察されたオフ応答における Ratio の上昇は PKD1L3/PKD2L1 のポアを通じたカルシウム流入だけでなく、カルシウム流入により生じた膜電位の変化により二次的に活性化された電位依存性カルシウムチャネルを通じたカルシウム流入を反映している可能性がある。またカプサイシンは電位依存性カルシウムチャネルを可逆的に抑制するということが今回示された(図 3-9)。このため観察されたオフ応答の抑制が、二次的に活性化された電位依存性カルシウムチャネルに対するカプサイシンの抑制作用のみを反映している可能性を否定できておらず、PKD1L3/PKD2L1 にカプサイシンが直接的に作用していない可能性も否定できていない。味細胞の細胞内シグナル伝達に關与する分子群や薬理学的な性質に関する知見の集積は十分ではない。本研究においても酸味受容細胞の電位依存性カルシウム流入は  $\omega$ -アガトキシン IV A 非感受性であるという、既報(83)とは異なる知見が得られた(図 3-10)。カプサイシンによる味細胞のオフ応答抑制の作用機序の詳細な解明のために、シグナル伝達機構、薬理学的感受性に関する知見の集積が待たれる。

次に PKD1L3/PKD2L1 の応答をカプサイシンが抑制する、という本研究において明らかにされた知見と、ヒトの食生活実態との関連性について考察する。まず、カプサイシンの作用濃度に関してであるが、PKD1L3/PKD2L1 の応答抑制におけるカプサイシンの  $IC_{50}$  値は  $32.5 \pm 10.2 \mu M$  であり(図 3-4B)、この値は重量濃度に換算するとおよそ  $9.9 \mu g/g$  に相当する。市販の食品中には  $2.6 - 1471.5 \mu g/g$  程度のカプサイシンが含まれるものがあり(90)、そのため PKD1L3/PKD2L1 を抑制するために十分な濃度のカプサイシンが食事によって口腔内に到達しうる。すなわち通常の食事においてカプサイシンによる PKD1L3/PKD2L1 の阻害が味細胞の酸応答の抑制を引き起こし酸味抑制を誘導するかもしれない。実際に、カプサイシンは味細胞の酸応答を抑制する(図 3-8)。また、カプサイシン及びトウガラシの粗抽出物が官能的に酸

味を抑制することが複数の論文により報告されている(91, 92)。なお、本研究においてはクエン酸刺激だけでなく、酢酸刺激に対するPKD1L3/PKD2L1の応答もカプサイシンにより抑制されることが示された(図 3-11)。そのため酢酸を主成分とする食酢の酸味をカプサイシンは抑制する可能性があると言えよう。

本章では PKD1L3/PKD2L1 の迅速な活性評価法を確立した。本手法を用いて PKD1L3/PKD2L1 の薬理的性質の解明を試みカプサイシンとその類縁体によって PKD1L3/PKD2L1 を介した細胞応答が抑制されることを示した。またマウス有郭乳頭より単離した味細胞の酸刺激に対するオフ応答がカプサイシンによって抑制されることを示した。

表3-1 本章で用いた溶液の組成

	1H バッファー		10H バッファー		中和液	50 mM HighK液	クエン酸溶液										酢酸溶液	
							1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	10
HEPES	(mM)	1		10	100	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
NaCl	(mM)	130		130	130	85	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130
KCl	(mM)	5		5	5	50	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CaCl <sub>2</sub>	(mM)	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub>	(mM)	1.2		1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Glucose	(mM)	10		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Acetic	(mM)	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Citric	(mM)	-		-	-	-	0.45	0.55	0.9	1.4	2.5	4.0	3.0	25.0	-	-	-	-
pH		7.4		7.4	8.2※	7.4	4	3.8	3.5	3.3	3.0	2.8	4.3	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8

※80 mM NaOH添加による。

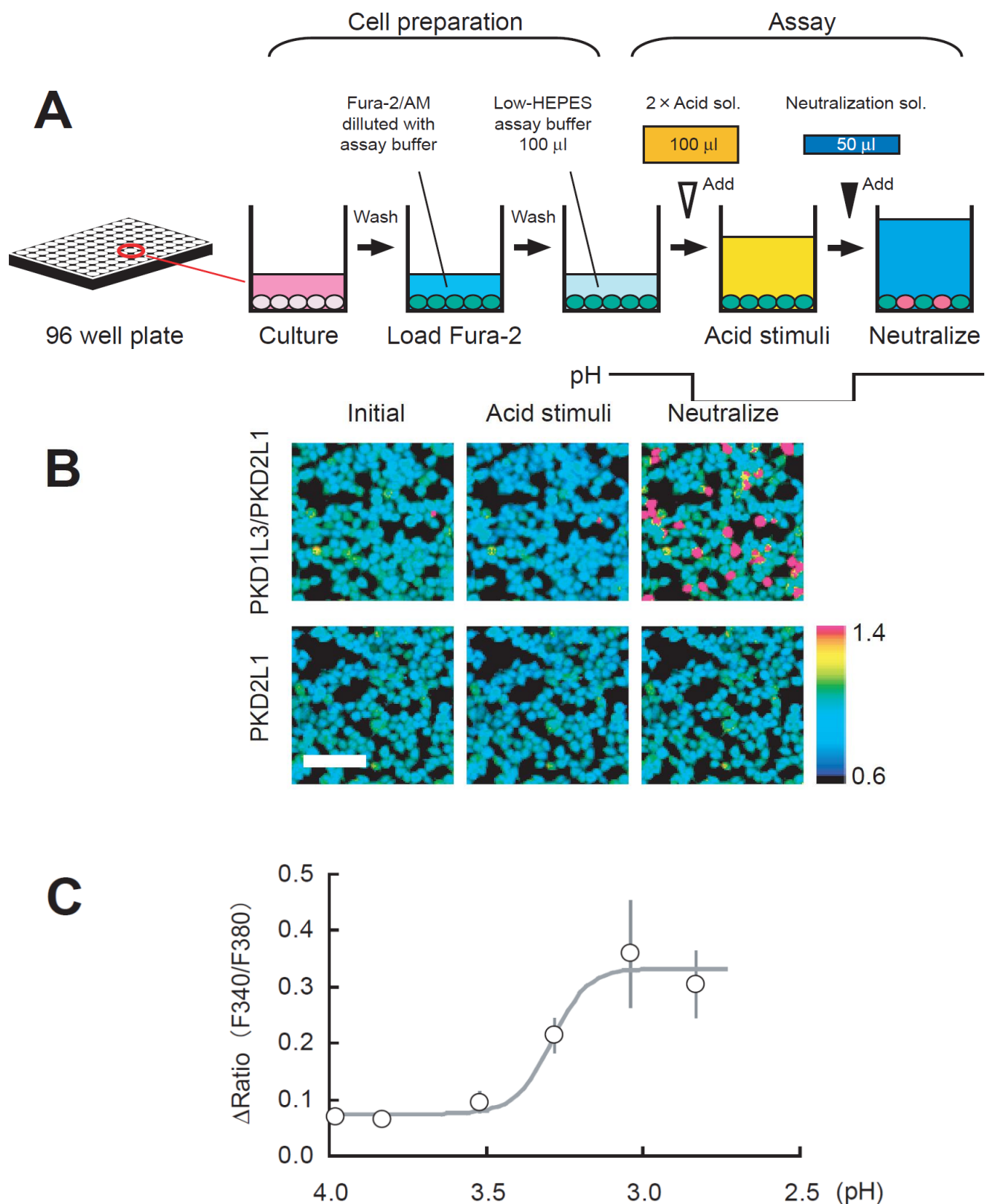


図3-1 「中和法」によるPKD1L3/PKD2L1の活性評価

(A) 中和法の模式図。細胞の準備と測定の段階を示した。測定の段階では細胞を酸に8秒間暴露し、その後中和した。下部の黒色線は細胞外液のpH変化を模式的に表現した。(B) Fura-2を負荷した細胞の代表的な蛍光イメージを示した。上段はPKD1L3/PKD2L1発現HEK293T (PKD1L3/PKD2L1)、下段はPKD2L1発現HEK293T (PKD2L1)。スケールバー: 100 µm。(C) 中和法により評価したPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答のpH依存性。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す(n = 6)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。



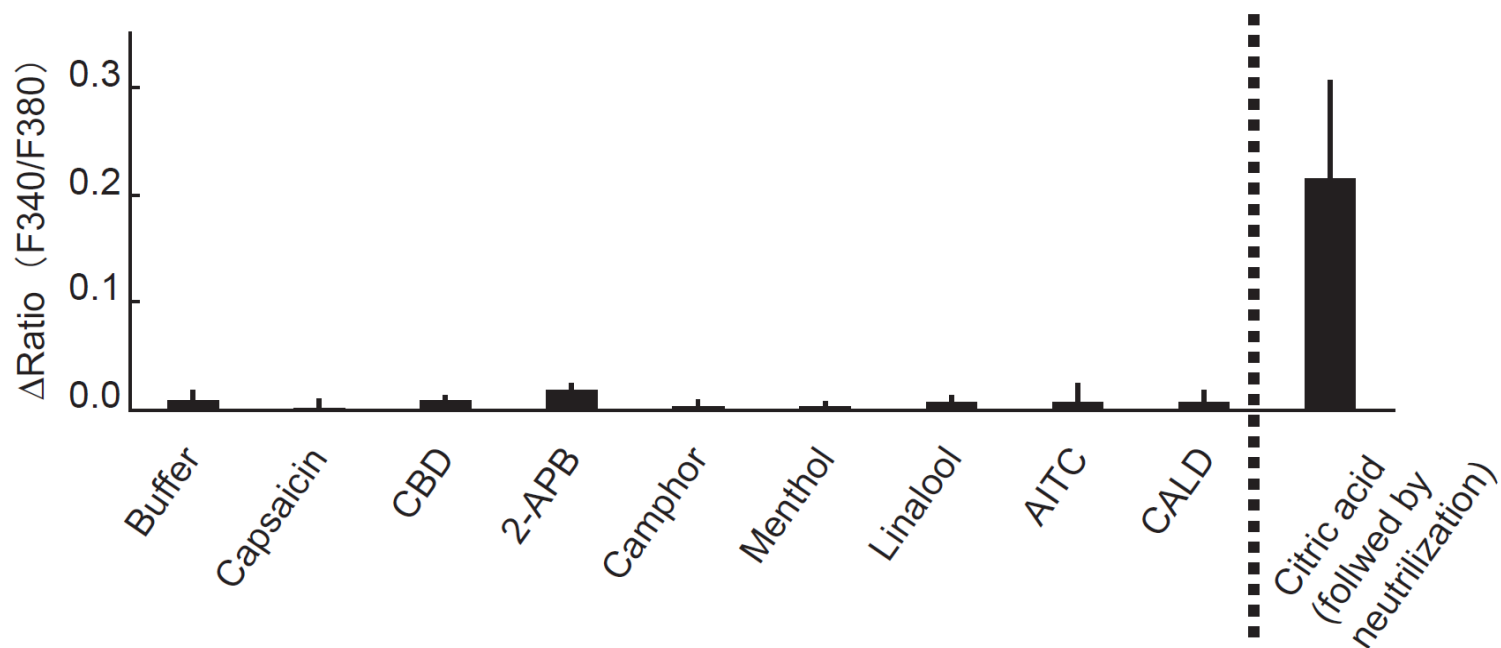


図3-2 TRPチャネルアゴニストのPKD1L3/PKD2L1に対するアゴニスト活性

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tをカルシウムイメージングに供した。TRPアゴニストを終濃度100  $\mu$ Mで投与し細胞応答を観察した。酸 - 中和刺激は実施していない。各バーは $\Delta$ Ratioの平均 $\pm$ 標準誤差を示す(n = 3–6)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta$ Ratioの平均値を算出した。同条件で準備した細胞に対して酸 - 中和刺激を実施した際の $\Delta$ Ratioを最も右のバーに示す。

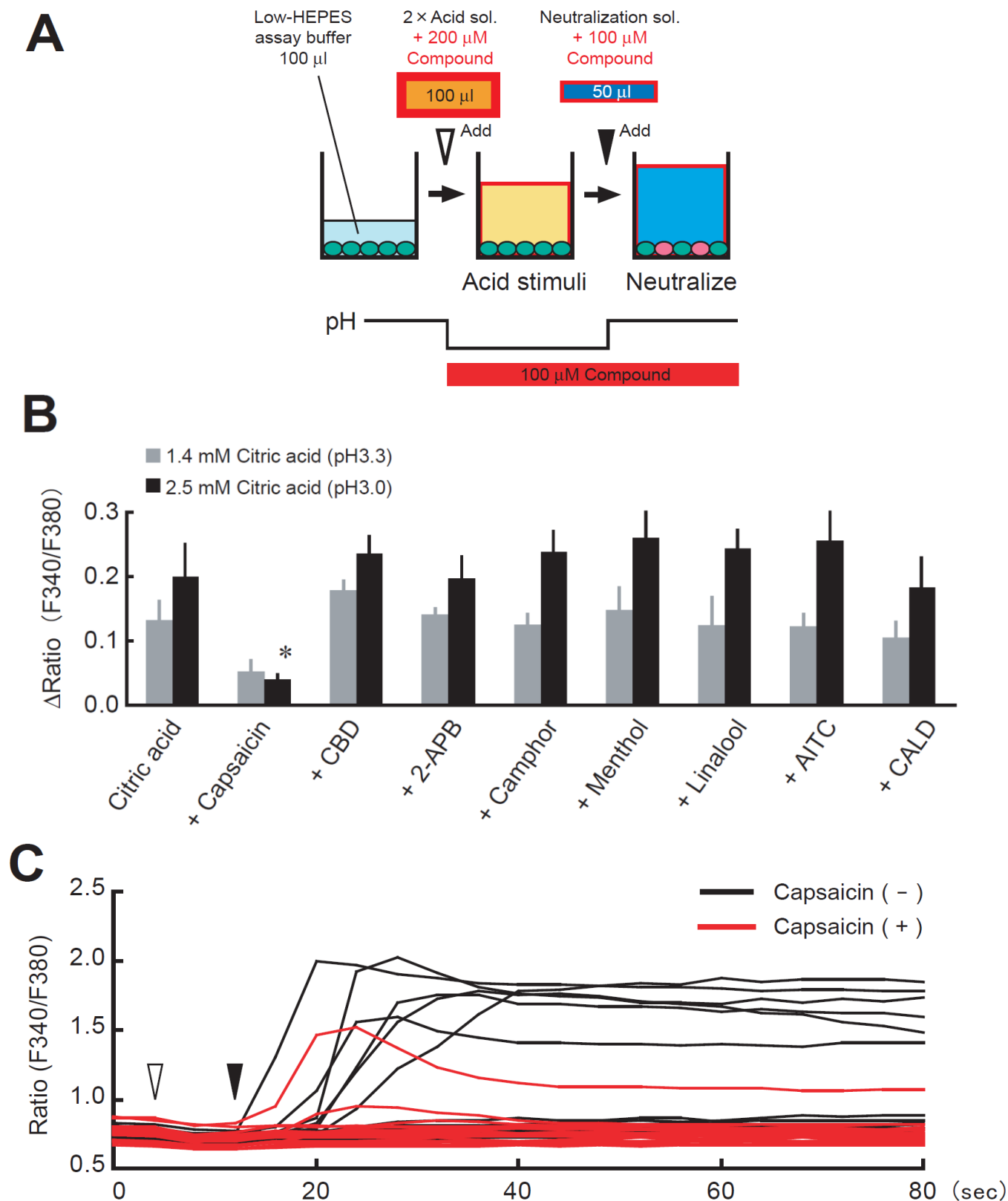
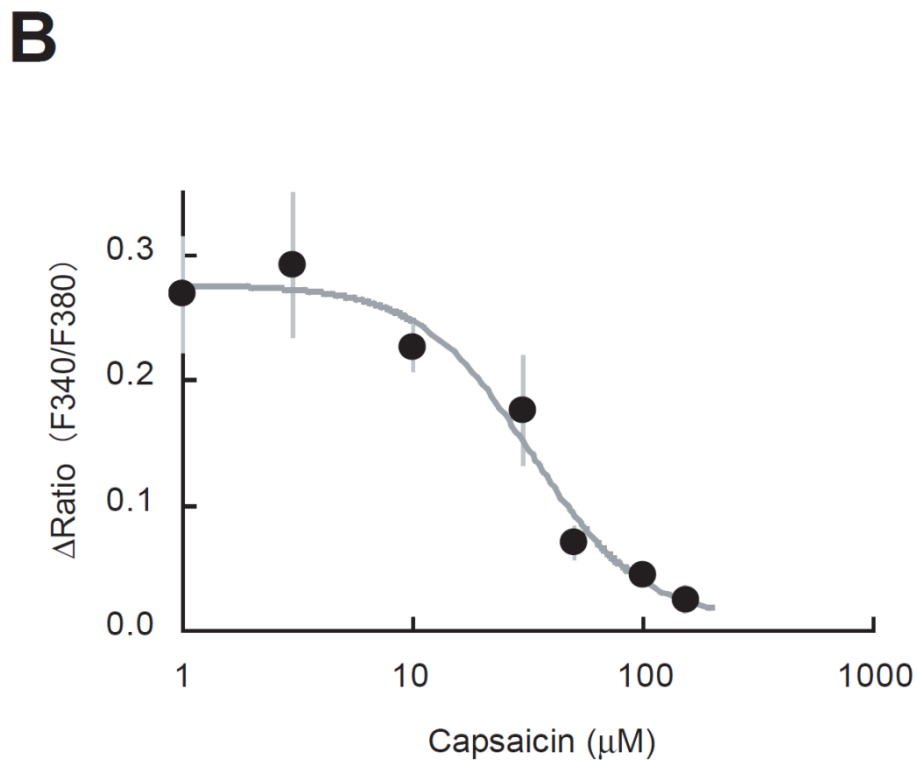
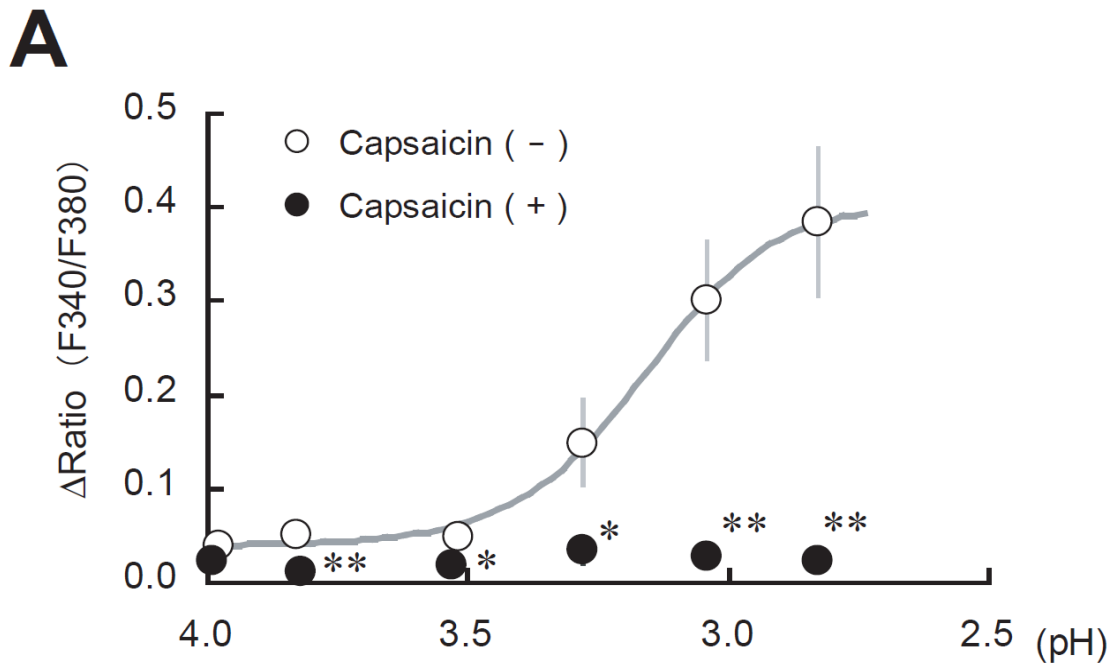


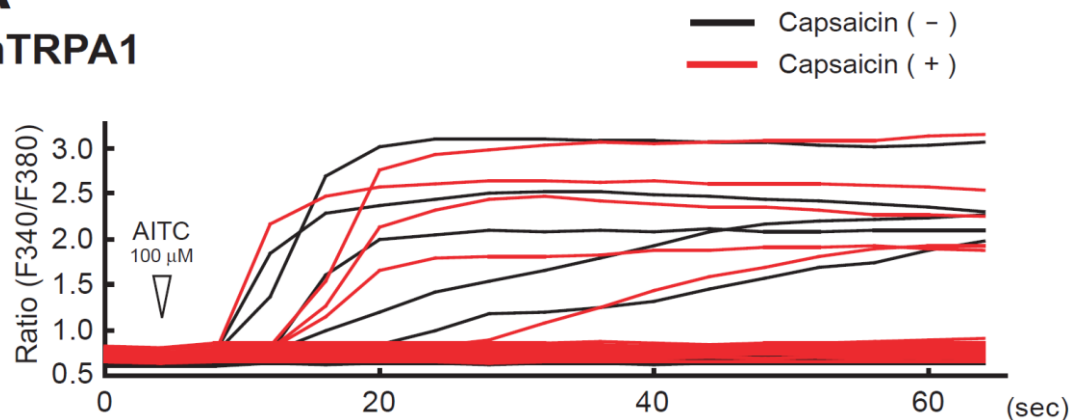
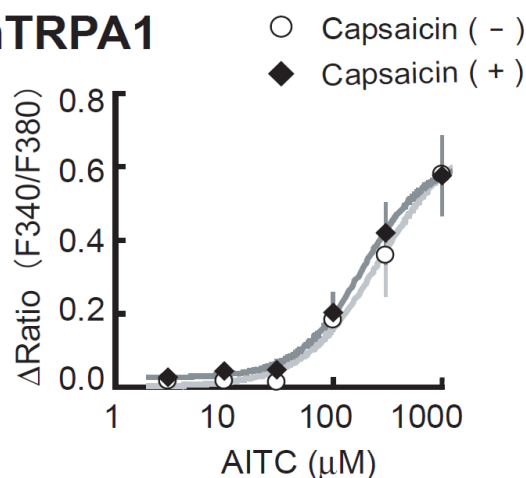
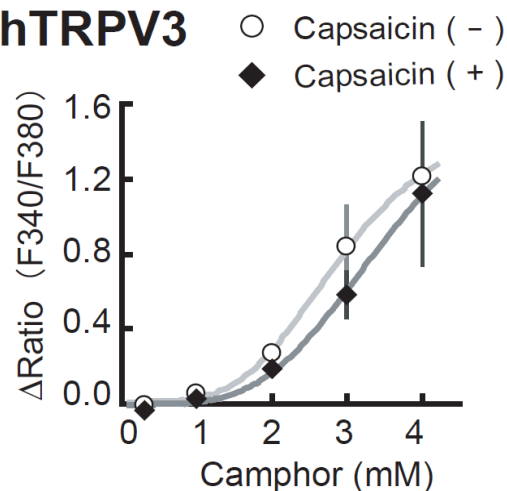
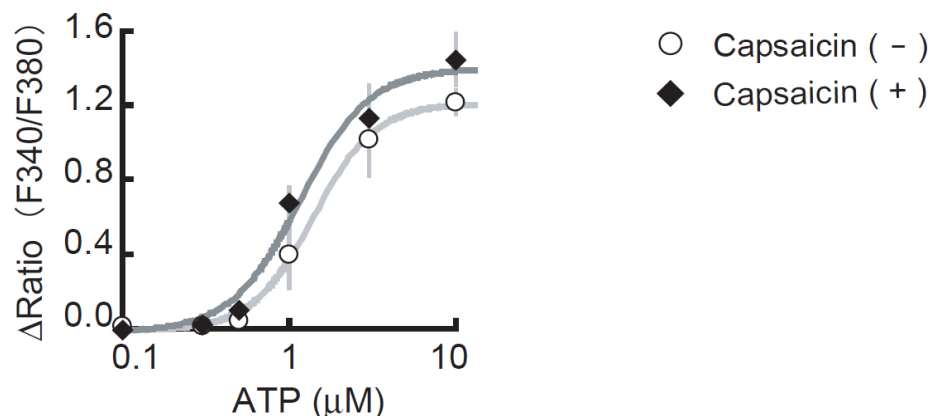
図3-3 TRPチャネルアゴニストのPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答への影響

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tを中和法を用いたカルシウムイメージングに供した。(A)実験手法の模式図。下部の黒色線は細胞外液のpH変化を模式的に表現した。水平な赤線は被験化合物の存在を示す。(B)100 µMのTRPチャネルアゴニスト存在下における酸-中和刺激に対する細胞応答。酸溶液として1.4 mM(灰色)、2.5 mM(黒色)のクエン酸を用いた。各バーはΔRatioの平均±標準誤差を示す(n = 5)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞よりΔRatioの平均値を算出した。1.4 mM、2.5 mMクエン酸溶液のpHはテスト化合物の有無に関わらずpH3.3、3.0であった。但し100 µM 2-APBを添加した2.5 mMクエン酸溶液は例外的にpH3.1であった。有意差検定は分散分析に続くダネットの検定をCitric acid群(コントロール)を対照とし1.4 mM、2.5 mMのそれぞれで実施した。\* $p < 0.05$ 。(C)Ratioの経時的な測定。黒色の線はカプサイシン非共存下において、赤色の線は100 µM カプサイシン共存下において酸-中和刺激をした際の代表的な20細胞のRatioを示す。酸刺激はいずれもpH3.0。白、黒の矢頭はそれぞれ酸刺激、中和の時点を示す。



**図3-4 カプサイシン濃度依存的なPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答の抑制**

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tを中和法を用いたカルシウムイメージングに供した。(A)カプサイシン共存下(黒丸印)、非共存下(白丸印)における細胞応答のpH依存性。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n = 11$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。有意差検定は各pHにおいて対応のあるt検定にて実施した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ (B) 応答抑制効果のカプサイシン濃度依存性。カプサイシン共存下で酸(pH3.0)ー中和刺激をした。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n = 4$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。

**A****hTRPA1****B****hTRPA1****C****hTRPV3****D****Endogeneous purinergic receptor in HEK293T**

**図3-5 TRPA1、TRPV3、内在性のプリン受容体を介したHEK293Tのカルシウム応答に対するカプサイシンの影響**

hTRPA1もしくはhTRPV3遺伝子を導入したHEK293TおよびノントランスフェクションHEK293Tをカルシウムイメージングに供した。刺激は既知のリガンド(AITC、カンファー、ATP)を投与して実施した。(A) hTRPA1導入細胞におけるRatioの経時的な測定。黒色の線はカプサイシン非共存下において、赤色の線は100  $\mu$ M カプサイシン共存下において100  $\mu$ M AITC刺激をした際の代表的な20細胞のRatioをそれぞれ反映している。白の矢頭はAITC刺激の時点を示す。(B) TRPA1、(C) TRPV3、(D) 内在性プリン受容体を介した細胞応答のリガンド濃度依存性。カプサイシン共存下(黒四角印)、非共存下(白丸印)における細胞応答。各点は $\Delta$ Ratioの平均 $\pm$ 標準誤差を示す(n = 3)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta$ Ratioの平均値を算出した。

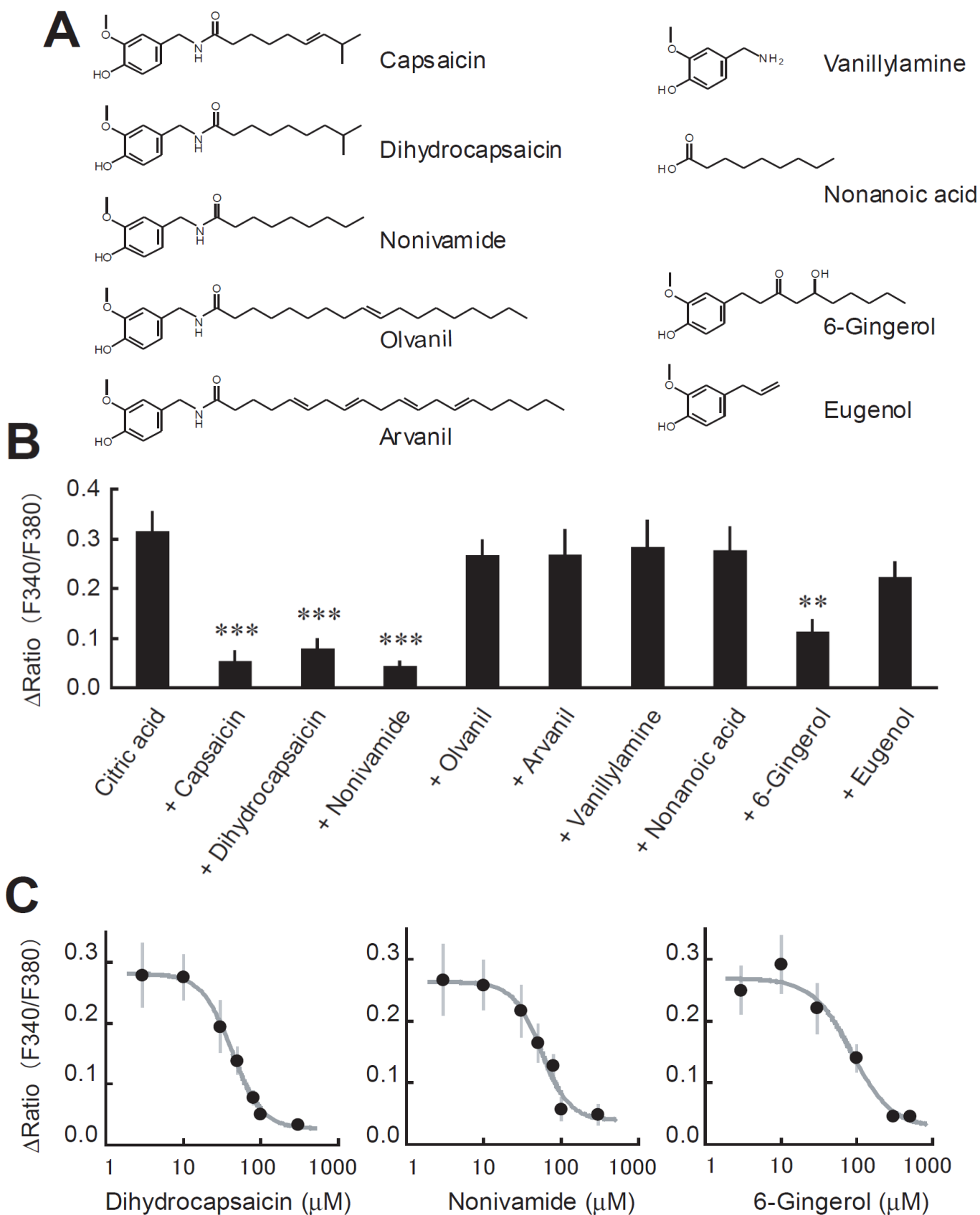


図3-6 カプサイシン類縁体のPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答に対する抑制作用

(A) カプサイシン類縁体の構造式。(B) 100 μMのカプサイシン類縁体存在下における2.5 mMクエン酸一中和刺激に対する細胞応答。各バーはΔRatioの平均±標準誤差を示す(n = 11)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞よりΔRatioの平均値を算出した。2.5 mMクエン酸溶液のpHは類縁体の有無に関わらずpH3.0であった。有意差検定は分散分析に続くダネットの検定をCitric acid群を対照とし実施した。\*\*\* $p < 0.001$ 。(C) 抑制効果の濃度依存性。カプサイシン類縁体共存下で酸(pH3.0)一中和刺激をした。各点はΔRatioの平均±標準誤差を示す(n = 10)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞よりΔRatioの平均値を算出した。

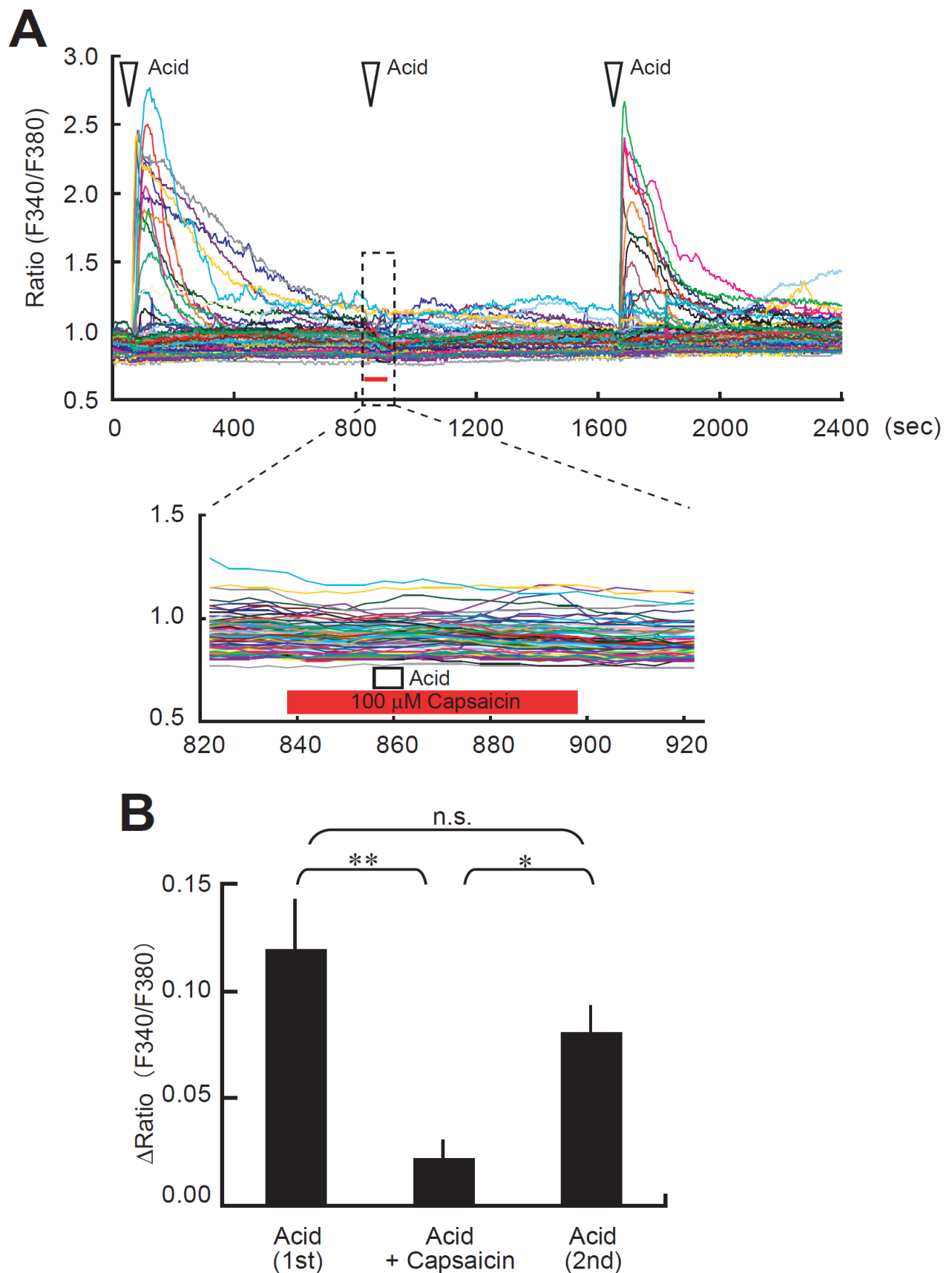
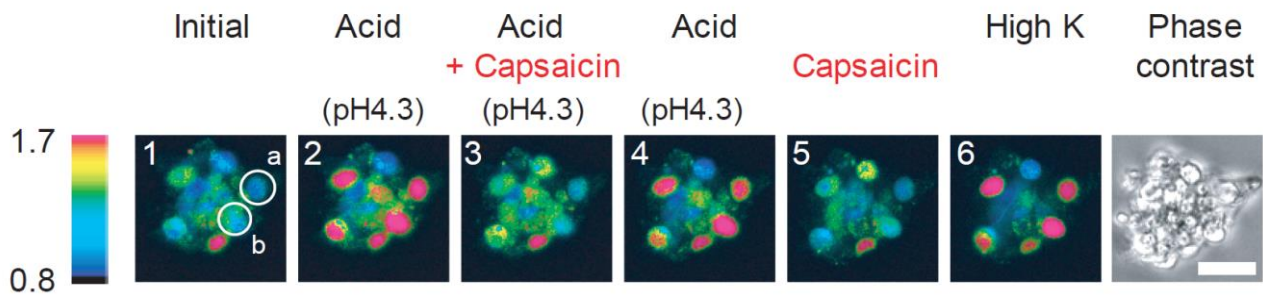
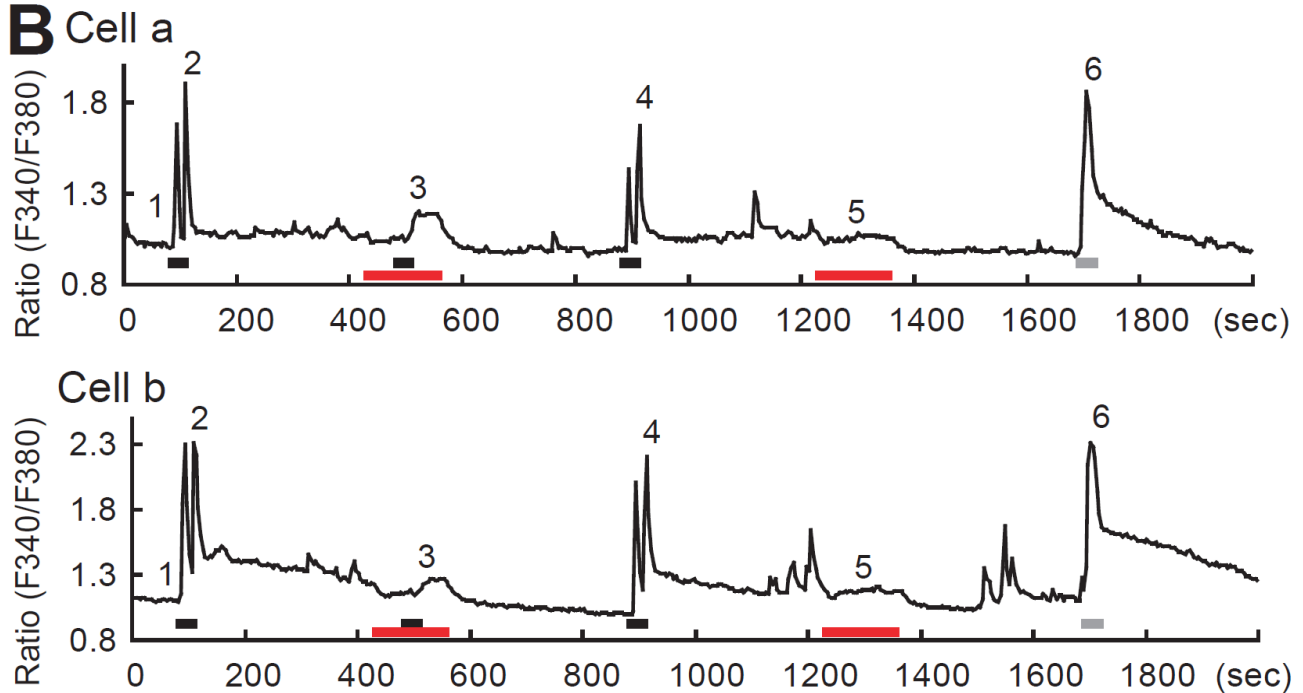
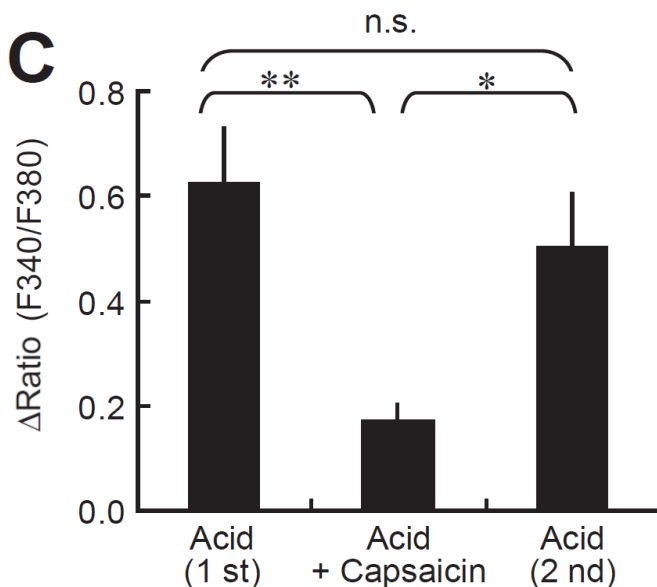


図3-7 カプサイシンの抑制効果の可逆性

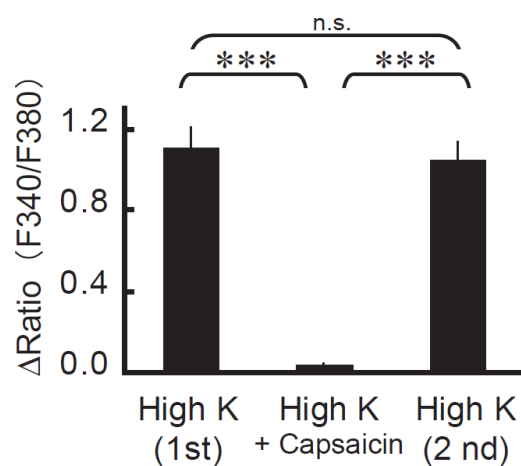
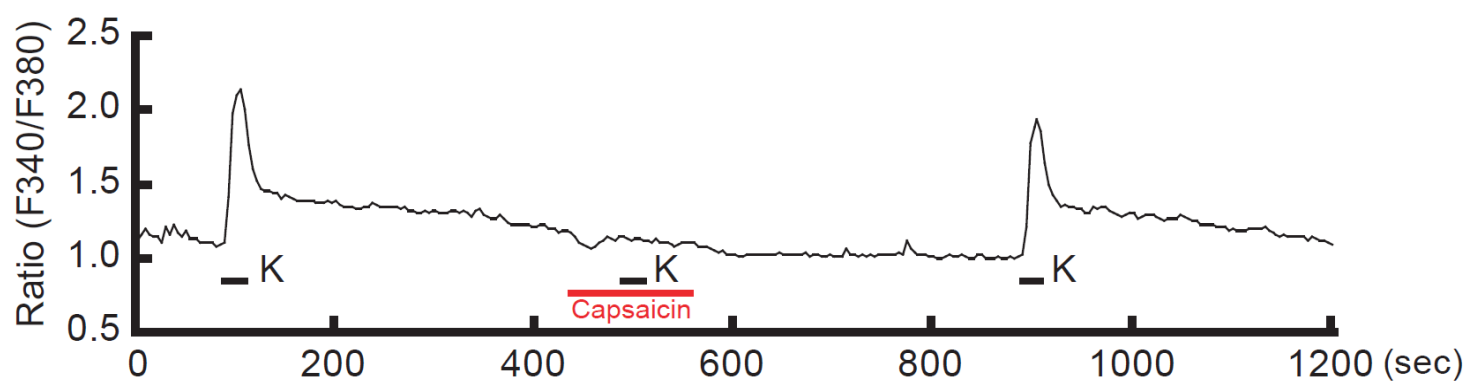
PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tをカルシウムイメージングに供した。刺激には灌流装置を用い連続的に細胞応答を測定した。(A) Ratioの経時変化。各線は代表的な100細胞のRatioを示している。上側のパネルでは矢頭が25 mM クエン酸刺激(pH2.8)の投与時点を示している。赤色の水平線は100  $\mu$ Mのカプサイシンの存在を示している。下側のパネルは、上側パネルにおいて点線で囲った部分の拡大図である。白色、赤色の水平線は酸、カプサイシンの存在をそれぞれ示している。(B) 細胞応答の定量結果。各バーは $\Delta$ Ratioの平均 $\pm$ 標準誤差を示す(n = 6)。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta$ Ratioの平均値を算出した。有意差検定は分散分析に続くチューキーの検定を実施した。\* $p$ <0.05、\*\* $p$ <0.01、n.s.: not significant。

**A****B****C**

**図3-8 マウス有郭乳頭の酸応答に対するカプサイシンの作用**

マウス有郭乳頭を摘出しカルシウムイメージングに供した。(A) 有郭乳頭由来味細胞の応答の経時変化。(B) における1、2、3、4、5、6時点の蛍光イメージを示した。位相差観察像を右に示した。スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ 。(B) Ratioの経時変化。(A) においてa、bとして示した味細胞のRatioを反映している。黒色の水平線は3.0 mMクエン酸 (pH4.3) 刺激を、赤色の水平線は100  $\mu\text{M}$ カプサイシンの存在を、灰色の水平線は50 mM high K刺激をそれぞれ示した。(C) 各バーは酸に対するオフ応答の $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す ( $n = 10$ 細胞)。High Kに応答した5個の味蕾に由来する11細胞のうち、酸刺激に対して応答した10細胞を解析対象とした。 $\Delta\text{Ratio}$ は各酸刺激直前のベースラインから、オフ応答のピークまでの変化値とした。有意差検定は分散分析に続くチューキーの検定を実施した。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ , n.s.: not significant.

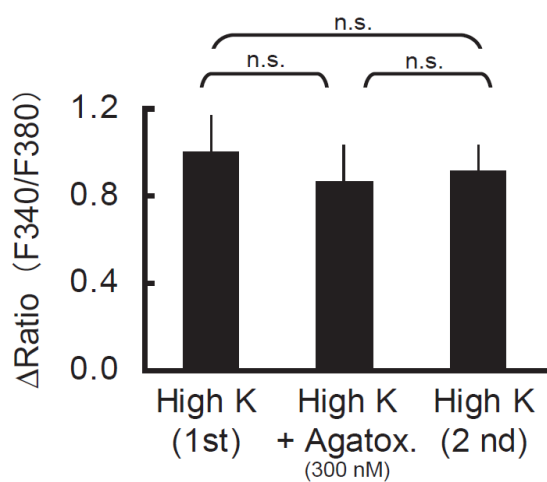
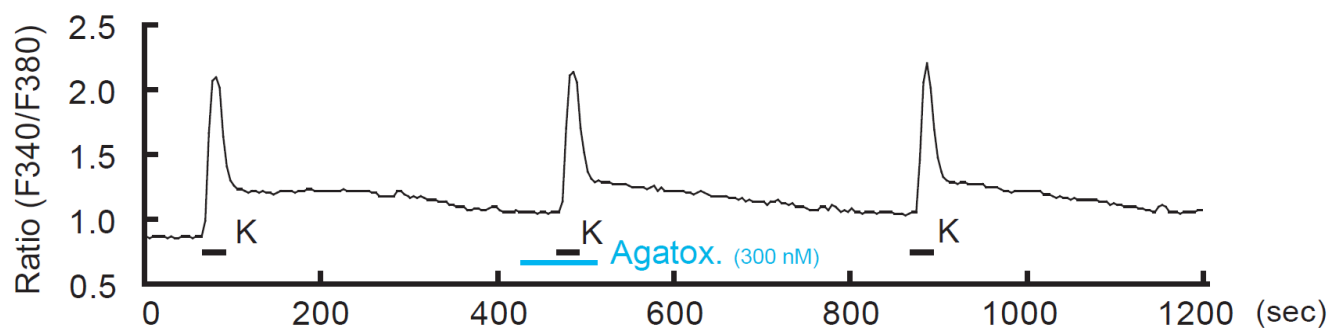




**図3-9 マウス有郭乳頭の高濃度K刺激応答に対するカプサイシンの作用**

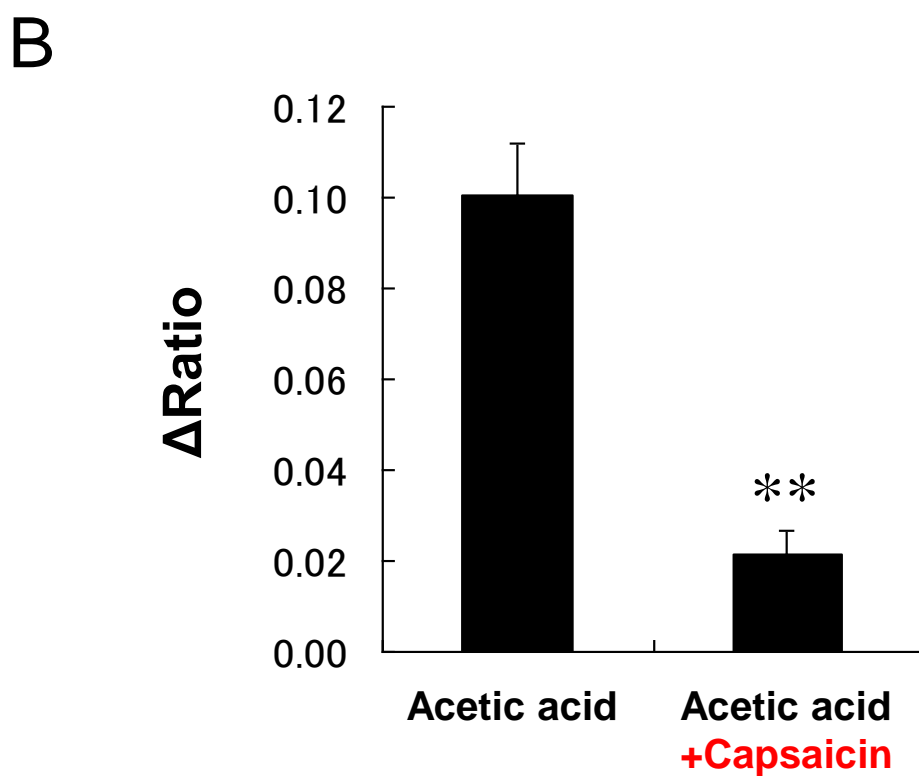
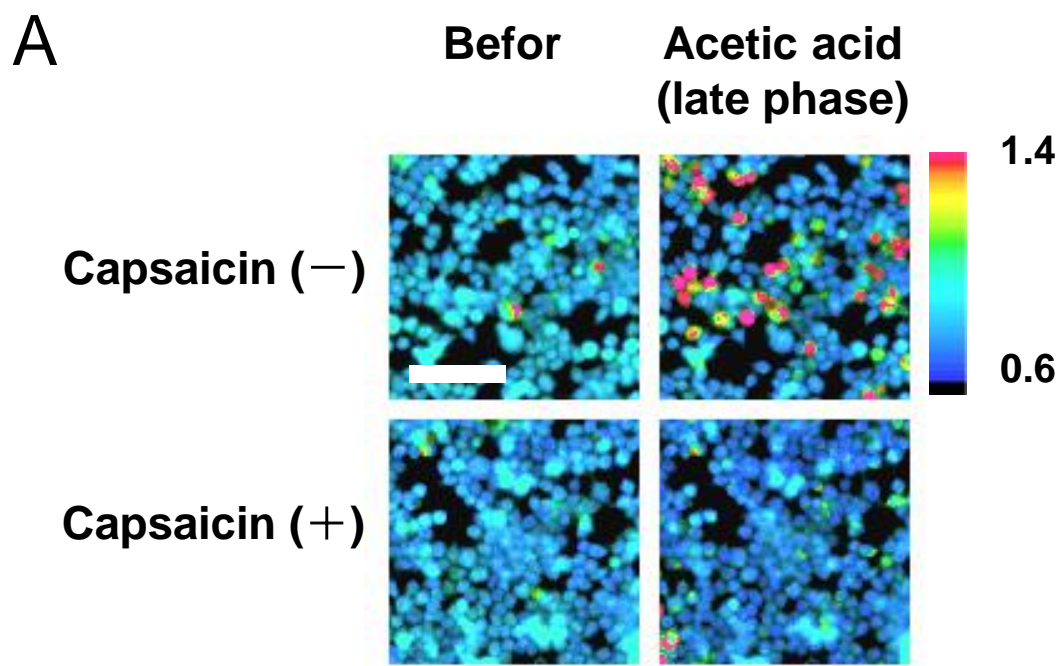
マウス有郭乳頭を摘出しカルシウムイメージングに供した。(A) 代表的な味細胞のRatioの経時変化。黒色の水平線は50 mM カリウム刺激を、赤色の水平線は100  $\mu$ Mカプサイシンの存在をそれぞれ示した。(B) 各バーはhigh K刺激に対する応答の $\Delta$ Ratioの平均 $\pm$ 標準誤差を示す(n = 9細胞、5個の味蕾に由来)。 $\Delta$ Ratioは各high K刺激直前のベースラインから、応答のピークまでの変化値とした。有意差検定は分散分析に続くテューキーの検定を実施した。\*\*\* $p$ <0.001、n.s.: not significant。





**図3-10 マウス有郭乳頭のhigh K応答に対する $\omega$ -アガトキシニンIV Aの作用**

マウス有郭乳頭を摘出しカルシウムイメージングに供した。(A) 代表的な味細胞のRatioの経時変化。黒色の水平線は50 mM カリウム刺激を、水色の水平線は300 nM  $\omega$ -アガトキシニンIV Aの存在をそれぞれ示した。(B) 各バーはhigh K刺激に対する応答の $\Delta$ Ratioの平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n = 5$ 細胞、1個の味蕾に由来)。 $\Delta$ Ratioは各high K刺激直前のベースラインから、応答のピークまでの変化値とした。有意差検定は分散分析に続くチューキーの検定を実施した。n.s.: not significant。



**図3-11 酢酸刺激に対するPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答のカプサイシンによる抑制**  
 PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tをカルシウムイメージングに供した。(A) 代表的な蛍光イメージ。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。(B) late phaseにおける $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示した( $n = 6$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。有意差検定は対応のあるt検定を実施した\*\* $p < 0.01$

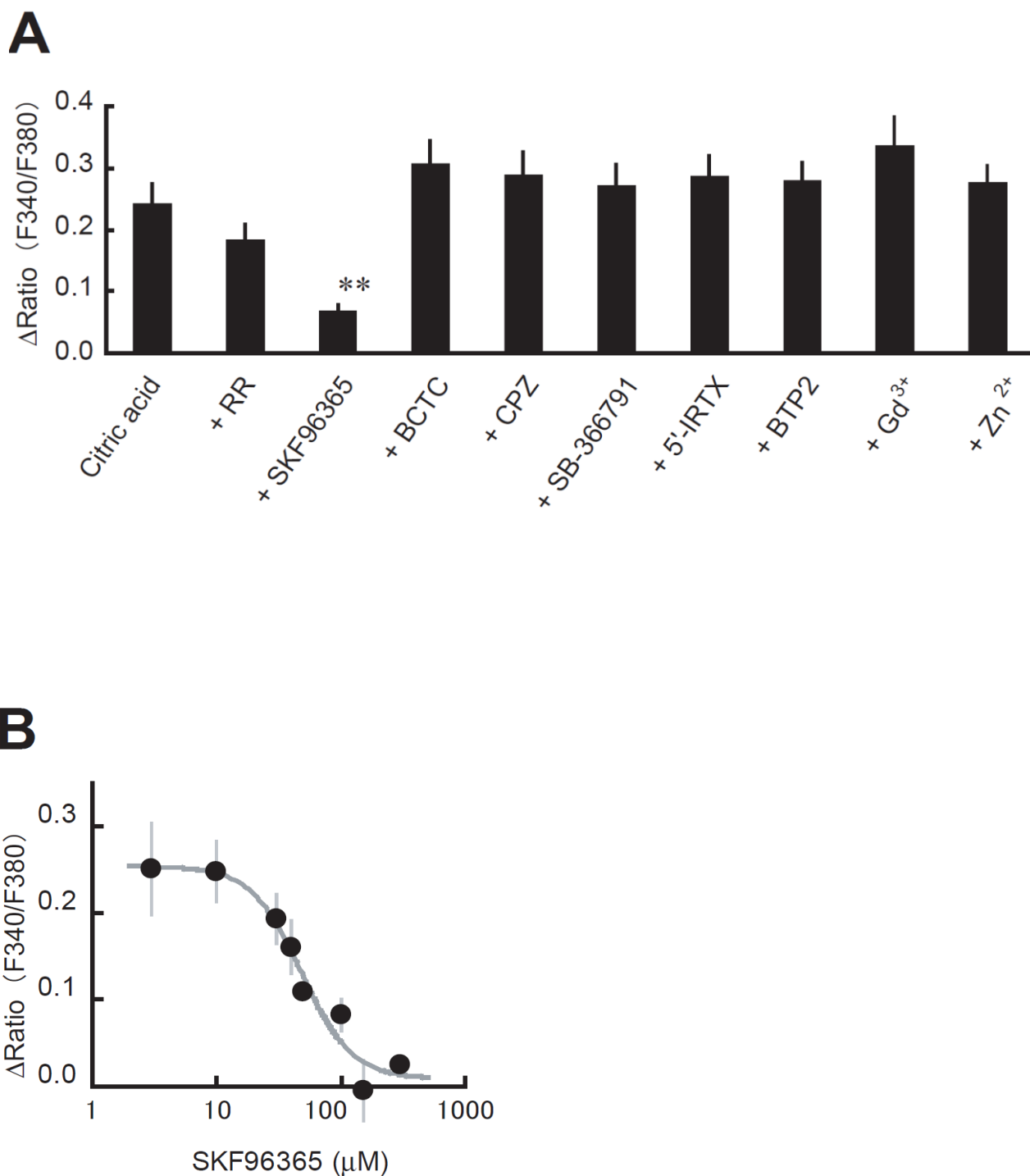


図3-12 TRPチャネル阻害剤のPKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tの応答に対する作用

PKD1L3/PKD2L1発現HEK293Tを中和法を用いたカルシウムイメージングに供した。(A) TRPチャネル阻害剤存在下における酸一中和刺激に対する細胞応答。酸溶液として2.5 mMクエン酸を用いた。各バーは $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n = 4 - 10$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。RR、SKF96365、CPZ、Gd<sup>3+</sup>は100  $\mu\text{M}$ で、BCTC、SB-366791、5'-IRTX、BTP2は10  $\mu\text{M}$ で、ZnCl<sub>2</sub>は1 mMの濃度で投与した。2.5 mMクエン酸溶液のpHはテスト化合物の有無に関わらずpH3.0であった。但し100  $\mu\text{M}$  RRを添加した2.5 mMクエン酸溶液は例外的にpH3.1であった。有意差検定は分散分析に続くダネットの検定をCitric acid群を対照とし実施した。 $**P < 0.01$ 。(B) SKF96365による抑制効果の濃度依存性。SKF96365共存下で酸(pH3.0)一中和刺激をした。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n = 5$ )。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。

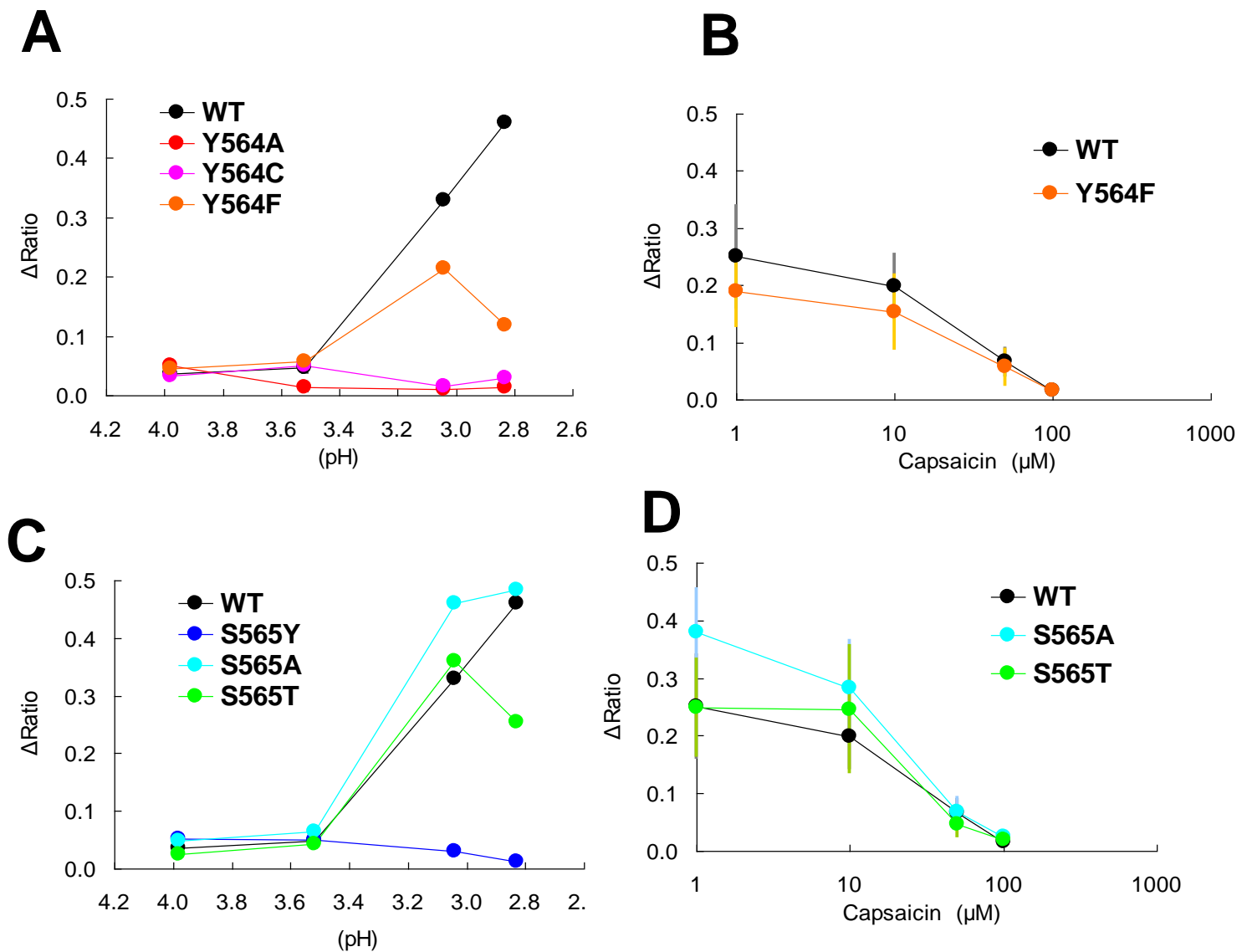


図3-13 PKD2L1の点変異体の機能解析

PKD2L1の点変異体(Y564A、Y564C、Y564F、S565Y、S565A、S565T)をそれぞれPKD1L3(WT)とHEK293Tに共発現させ中和法を用いたカルシウムイメージングに供した。各試行にてランダムに選択した100個のDsRed陽性細胞より $\Delta\text{Ratio}$ の平均値を算出した。(A) (C) Y564およびS565における点変異体の酸-中和刺激に対する応答のpH依存性評価。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均を示す( $n=2$ )。(B) (D) Y564F、S565A、S565T変異体のカプサイシン感受性評価。カプサイシン共存下で2.5 mM クエン酸(pH3.0) - 中和刺激に対する応答を評価した。各点は $\Delta\text{Ratio}$ の平均 $\pm$ 標準誤差を示す( $n=4$ )。

## 第4章

### 酢酸投与に対する培養細胞の 内因性応答の解析

#### 4-1. 序

##### 酸の種類によって異なる細胞応答

哺乳類細胞は外界の多様な刺激に暴露されており、刺激に対して多様な応答を示す。例えば消化管の上皮細胞は食品に含まれる多様な成分に暴露されており、この刺激に対して消化管内分泌細胞はホルモン分泌、小腸エンテロサイト細胞は食品成分の取り込みを行うトランスポーターの発現亢進といった応答を示す(93, 94)。果実やピクルス、ヨーグルトなど酸味食品を摂取した際、口腔内や食道の組織は酢酸、クエン酸、乳酸、酒石酸など多様な酸に暴露される。酸に対する応答は暴露される酸の種類によって異なることが知られている。第 1 章にて述べた通り、酸の種類によって酸刺激に対する神経応答強度や酸味強度が異なる。また食道の上皮細胞は酢酸に暴露されると外観が白色化するが、クエン酸の暴露ではこの応答は生じない(95)。白色化の強さや持続時間が組織によって異なることが知られており、この性質に基づき咽頭に酢酸を塗布し、白色化の状態を観察する手法が咽頭のがん診断において適用されている(96)。第 2 章にて示した通り、Fura-2 を負荷した HEK293T 細胞は酢酸刺激に対して内因性応答を生じた。一方で、クエン酸刺激に対しては生じなかった(図 2-1、2-2)。このことは酸の種類により生体応答が異なることを示す顕著な例と言える。

##### Fura-2

Fura-2 は一般的な細胞内カルシウム指示薬である。Fura-2 はカルシウムイオンをキレートし、Fura-2-Ca<sup>2+</sup>複合体を形成する。カルシウム濃度の変動に伴い Fura-2-Ca<sup>2+</sup>複合体の存在比率が変動する。遊離の Fura-2 と Fura-2-Ca<sup>2+</sup>複合体では蛍光特性が異なるためカルシウム濃度を反映して蛍光が変化する。一方で Fura-2 の蛍光に pH が影響を与えることも知られている。これは pH が Fura-2 とカルシウムイオンの解離定数に影響を与えるためである(97)。

培養細胞の内因性応答に関する詳細な解析は生体細胞の様々な酸に対する応答を解釈する上で重要な知見をもたらす可能性がある。特に酢酸が特異的に細胞応答を誘起することは、酢酸の呈味の発現機構を解析する上で非常に興味深い現象である。本章では培養細胞に内因性応答を誘起させる要因について詳細な解析を行った。その結果、非解離酢酸分子が細胞内を酸性化することが要因となり内因性応答が誘起されることが示された。

## 4-2. 材料と方法

### 溶液（表 4-1）

カルシウムイメージング用および細胞内 pH の測定用のバッファーは第 2 章にて使用した 10H バッファー (10 mM HEPES) と同じものを使用した。50 mM high K 液は第 3 章にて使用したものと同じものを使用した。酸溶液は各酸を希釈して調製し、酸以外の組成はアッセイに使用したバッファーの組成と等しくした。

### 細胞培養

第 2 章記載の通り実施した。

### カルシウムイメージング

HEK293T 培養細胞を 96 穴プレートに各穴あたり 4–5 万個播種して、20–28 時間培養した後に Fura-2 を負荷した。Fura-2 の負荷は第 2 章に記載の通り実施した。刺激溶液の投与は 2×濃度に調整した刺激溶液を各穴に 100  $\mu$ l 添加し実施した。投与された刺激溶液 (100  $\mu$ l) は穴中のバッファー (100  $\mu$ l) と混合され 1×濃度に希釈される。この終濃度を刺激濃度と定義した。

### pH<sub>i</sub>測定

HEK293T 培養細胞を 96 穴プレートに各穴あたり 4–5 万個播種した。20–28 時間培養した後、培地をバッファーで洗浄し、3  $\mu$ M BCECF/AM (Invitrogen) を 30 分間室温で負荷した。負荷後 30 分間隔で 2 度、細胞をバッファーでリンスした。100  $\mu$ l のバッファー中で 10 分以上静置し、pH<sub>i</sub>測定に供した。刺激溶液投与は 2 × 濃度に調製した刺激溶液を各穴に 100  $\mu$ l 添加し実施した。445 nm 及び 500 nm にて励起した際の 542 nm における BCECF の蛍光



(F445 および F500)をシャッターコントローラーLambda 10-2、MicroMax 冷却 CCD カメラ、蛍光倒立顕微鏡 IX-70 を用いて 4 秒毎に記録した。画像解析は解析ソフトウェア MetaFluor を用いて実施した。2 種の励起波長における蛍光の比 (F500/F445; 以下  $\text{Ratio}_{\text{F500/F445}}$  と記載する)を  $\text{pHi}$  の指標として採用した。解析対象とした細胞数および試行数は結果の段落もしくは図のレジェンド欄に記載した。 $\text{Ratio}_{\text{F500/F445}}$  は必要に応じてキャリブレーションカーブにより  $\text{pH}$  に変換した。キャリブレーションカーブは BCECF を負荷した細胞を 10  $\mu\text{M}$  ナイジェリシン (Sigma)を含むキャリブレーション液 ( $\text{pH}$  6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) 中で 10 分間静置した後、細胞の  $\text{Ratio}_{\text{F500/F445}}$  を測定し、得られた  $\text{Ratio}_{\text{F500/F445}}$  を非線形最小二乗法によりフィッティングして得た(98)。キャリブレーション液の組成は 10 mM HEPES、5 mM NaCl、130 mM KCl、2 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM glucose とし、NaOH を用いて  $\text{pH}$  6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 に調整した。

### 4-3. 結果

#### 酢酸刺激に対する HEK293T の内因性応答の評価

酢酸刺激に対する HEK293T 細胞の内因性応答を評価するため、96 穴プレートに播種した HEK293T (ノトランスフェクション) に Fura-2 を負荷してカルシウムイメージングに供した。酸溶液をピペットマンを用い各穴に投与して細胞を刺激した。10 mM 酢酸 (pH4.5) で刺激するとほぼ全ての HEK293T 細胞において Ratio (蛍光強度比 F340/F380) の増加が認められた (図 4-1A)。Ratio の上昇は酢酸投与後に速やかに認められ、酢酸存在下では Ratio は高値を維持していた (図 4-1B)。一方、10 mM 塩酸 (pH3.0) および 10 mM クエン酸 (pH3.2) で刺激した場合には Ratio の増加は認められなかった。内因性応答の酢酸濃度依存性を評価するために、濃度の異なる酢酸溶液によって HEK293T を刺激したところ 6 mM 以上の酢酸刺激で応答が誘起された (図 4-1C)。

経時変化を観察するため Fura-2 を負荷した HEK293T に灌流装置を用いて酢酸を投与し、続いて酢酸を洗浄した際の Ratio 変化を観察した。Ratio は酢酸刺激後に増加し洗浄後に基底レベルに戻った。このことから酢酸刺激により誘起された Ratio 上昇は、可逆的な応答を反映していることが示唆された。また酢酸洗浄後に ATP を投与したところ明瞭なカルシウム応答が観察された。このことより細胞が不可逆的に変性を受けていないことおよびカルシウム応答性を失っていないことが示された (図 4-2)。

カルシウムイメージングで認められた内因性応答が細胞内カルシウム濃度変化によるものであるかどうかの検討を行った。細胞内カルシウム濃度上昇は一般に細胞外液からのカルシウム流入、もしくは小胞体からのカルシウム放出により発生する。両方のカルシウム源を枯渇させるために、小胞体のカルシウムを枯渇させる作用を持つタプシガルギンの前処理をカルシウムを含まないバッファー中で行った。HEK293T はプリン受容体を発現しており ATP 刺激に対して通常はカルシウム応答を示すが、この前処理を施した細胞では ATP に対するカルシウム応

答がほぼ完全に消失した(図 4-3)。そのため前処理によってカルシウム源は枯渇していることが確認された。前処理によってカルシウム源を枯渇させた細胞においても酢酸刺激に対しては明瞭な Ratio の上昇が認められた(図 4-3)。この結果より内因性応答が細胞内カルシウム濃度の上昇ではなく、酢酸によって特異的に誘導される何らかの現象を反映していることが示唆された。

これらのことから、酢酸は他の酸と異なり、内因性応答を誘起する性質を有することが示された。また内因性応答は可逆的で、かつカルシウム非依存的であることが示された。本章ではこの HEK293T 内因性の応答発生要因の解明を試みた結果について述べる。

### プロトン、酢酸イオンの影響評価

酢酸分子は解離定数に従って部分的に解離しており、非解離酢酸と酢酸イオンとプロトンの 3 要素の平衡状態にある。そのため酢酸刺激はこれらの 3 要素の複合刺激とみなすことができる。3 要素のうち内因性応答を誘起する要素の特定を試みた。10 mM 酢酸(pH4.5)刺激は(I)pH4.5(プロトン 32  $\mu$ M)、(II)酢酸イオン 3.6 mM、(III)非解離酢酸 6.4 mM の混合刺激とみなせる。なお、pH は pH メーターによる実測値であり、酢酸イオン濃度、非解離酢酸濃度は酢酸の解離定数( $pK_a=4.76$ )から算出した理論値である。

はじめにプロトンの影響を評価するために 4.8 mM 塩酸溶液((I)pH4.5、(II)酢酸イオン 0 mM、(III)非解離酢酸 0 mM)で刺激を行った。4.8 mM 塩酸溶液(pH4.5)のプロトン濃度は、応答を誘起した 10 mM 酢酸溶液(pH4.5)と等しいにも関わらず、応答は認められなかった(図 4-4)。次いで酢酸イオンの影響を評価するために、3.6 mM 酢酸ナトリウム((I)pH7.4、(II)酢酸イオン 3.6 mM、(III)非解離酢酸  $\approx$  0 mM)で刺激を行った。酢酸ナトリウムは水溶液中でほぼ完全に酢酸イオンとナトリウムイオンに電離する。そのため 3.6 mM 酢酸ナトリウム溶液中の酢酸イオン濃度は 3.6 mM となり、10 mM 酢酸溶液の酢酸イオン濃度と等しい。しかしこの条件でも応答は認められなかった(図 4-4)。以上より、酢酸刺激時に観察される内因性応答は

プロトン、酢酸イオンによって誘起されたものではないことが示された。

### 非解離酢酸の影響評価

次に非解離酢酸の影響を評価した。酢酸は解離、非解離状態の平衡にあるが、pH 低下に伴い平衡は非解離側に傾く。そこで pH を制御しながら、酢酸濃度を変化させるために酢酸と塩酸の混合溶液を調製した。酢酸溶液に塩酸を混合することで溶液の pH は低下し、非解離酢酸の比率が酢酸単独の場合と比較し上昇する。そこで酢酸と 2、3、4、5、10 mM 塩酸の混合溶液で細胞を刺激し細胞応答を評価した。

数多くの組み合わせの溶液を投与したところ、非常に興味深い結果が得られた。4 mM 酢酸刺激に対して細胞応答は認められなかった。一方で、4 mM 酢酸と 3 mM 塩酸の混合溶液に対しては穏やかな応答が認められた(図 4-5A)。各刺激溶液の非解離酢酸濃度を算出し、それに対して、応答強度(刺激溶液投与 20 秒後における細胞の Ratio)をプロットした。Ratio は無作為に抽出した 60 細胞(20 細胞×3 回の独立した試行)の平均値とした。応答は 0.5 mM 以上の非解離酢酸濃度で認められ、応答強度は非解離酢酸濃度依存的に上昇した(図 4-5B)。この結果より、酢酸刺激を構成する 3 つの要素、(I)プロトン、(II)酢酸イオン、(III)非解離酢酸のなかで(III)非解離酢酸が HEK293T の内因性応答を誘起することが示された。

### 疎水性の異なる酸に対する応答評価

引き続いて非解離酢酸の作用機構解明を試みた。酢酸イオンやプロトンがそれぞれ負、正の電荷を帯びたイオンであるのに対し、非解離酢酸は電荷を帯びておらず、このため疎水性が高いと考えられる。そこで疎水性が高いことが応答を誘起するための重要な要因であると仮定し、様々な疎水性を有する 14 種類の酸(酢酸、酪酸、プロピオン酸、蟻酸、コハク酸、乳酸、マロン酸、酒石酸、グリコール酸、ピルビン酸、リンゴ酸、クエン酸、シュウ酸、グルコン酸)に対する細胞応答を評価した。疎水性の指標としてオクタノール/水分配比(LogP)を用い、各化合

物の LogP の値は ALOGPS 2.1 (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>) より得た(99)。一般に LogP が高いほど、疎水性が高い。投与した 14 種類の酸の Log P は-1.87 から 0.79 であった。14 種類の酸を 10 mM の濃度で Fura-2 を負荷した HEK293T に投与したところ、酪酸、プロピオン酸、酢酸、蟻酸刺激により応答が誘起されたものの、コハク酸、乳酸、マロン酸、酒石酸、グリコール酸、ピルビン酸、リンゴ酸、クエン酸、シュウ酸、グルコン酸刺激によっては応答は認められなかった。(図 4-6)。このとき応答を誘起した酪酸、プロピオン酸、酢酸、蟻酸の LogP は-0.54 以上であったのに対し、誘起しなかった他の酸の LogP は全て-0.59 以下であったことから、細胞応答に疎水性が関与する可能性が示唆された。更に疎水性の高い安息香酸 (Log P は 1.87) は 10 mM の濃度でバッファーに溶解しなかったため、上記の結果と直接的に比較することができなかったが、5 mM 安息香酸溶液によって明瞭な内因性応答が観察された(結果は示さない)。安息香酸によっても内因性応答が誘起されたことは、直鎖短鎖脂肪酸に限定される現象ではないことを示しており、疎水性の高さが内因性応答を誘因する条件と考えられた。

次いで疎水性が高いことが応答を誘起するために十分な条件であるか否かを検証するために、酪酸、プロピオン酸、酢酸、蟻酸と同程度の LogP を示すアルコールであるメタノール (LogP: -0.77)、エタノール (-0.31)、プロパノール (0.25)、ブタノール (0.88) 刺激に対する細胞応答を評価した。投与濃度は 10 mM とした。いずれのアルコール刺激に対しても細胞応答は認められなかった(図 4-6)。これらの結果より内因性応答を誘起するために疎水性が高いことは必要条件であるが、十分条件ではなく、これらの結果から疎水性が高く、かつ酸としての性質を有することが必要であることが示唆された。

### 細胞内酸性化の影響評価

内因性応答は疎水性の高い酸刺激によって共通に認められたことから、内因性応答は酢酸に特異的な機構ではなく、疎水性の高い酸に共通する性質を反映した機構によって生じる

可能性が考えられた。一般的に分子の疎水性が高いほど脂質二重膜に対する透過速度が高く、細胞内に酸が透過することで細胞内環境が酸性化されることが予想される。そのため内因性応答は細胞内酸性化に伴って発生している可能性が考えられた。そこで、酸刺激時の細胞内 pH ( $pH_i$ ) を測定し応答強度との関係を評価した。

Fura-2 を負荷した HEK293T に 4 種類の疎水性の高い酸(蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸)、2 種類の親水性の高い酸(塩酸、クエン酸)を 2、4、6、8、10 mM の濃度で投与して Ratio を測定した。蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸を 6 mM 以上の濃度で投与した際、明瞭な応答が認められたが、塩酸、クエン酸の投与では応答が認められなかった(図 4-7A)。

次に細胞内 pH 指示薬である BCECF を用いて  $pH_i$  を測定した。BCECF を負荷した HEK293T を酸溶液で刺激し、Ratio<sub>F500/F445</sub> を測定した。得られた Ratio<sub>F500/F445</sub> は必要に応じてキャリブレーションカーブ(図 4-8)を用い  $pH_i$  に変換した。刺激前の細胞の Ratio<sub>F500/F445</sub> は 1.59 であった。この値は  $pH_i 7.32$  に相当する(結果非掲載)。細胞をバッファー( $pH 7.4$ )で刺激した場合 Ratio<sub>F500/F445</sub> はほとんど変化せず 1.58 であった。この値は  $pH_i 7.30$  に相当する。2、4、6、8、10 mM 酢酸で細胞を刺激したところ、濃度依存的に Ratio<sub>F500/F445</sub> は低下した(それぞれ 1.41、1.13、1.01、0.77、0.75、刺激 20 秒後の値)。2、4、6、8、10 mM の蟻酸、プロピオン酸、酪酸刺激に対しても Ratio<sub>F500/F445</sub> 低下が観察された(蟻酸: 1.46、1.12、0.74、0.72、0.72 プロピオン酸: 1.33、1.07、0.82、0.87、0.76、酪酸: 1.45、1.04、0.83、0.79、0.74、刺激 20 秒後の値)(図 4-7B)。

Fura-2 の Ratio (図 4-7A) を BCECF の Ratio<sub>F500/F445</sub> (図 4-7B) に対してプロットした(図 4-7C)。Fura-2 の Ratio 増加は BCECF の Ratio<sub>F500/F445</sub> がおよそ 1.0 以下( $pH_i < 6.5$  に相当)に低下した際に観察された。また Fura-2 の Ratio は BCECF の Ratio<sub>F500/F445</sub> 低下依存的に上昇する傾向にあった。これらの結果より HEK293T において細胞内酸性化に伴い Fura-2 の Ratio が増加すること、すなわち内因性応答が誘起されることが示された。

細胞内の酸性化によって内因性応答が誘起されることを検証するために、細胞内を人為的

に酸性化した際の細胞応答を評価した。プロトンの脂質二重膜に対する透過速度は疎水性分子と比較して遅く、細胞外液に存在するプロトンの細胞内への透過は限定的である。細胞内を人為的に酸性化させるために、ナイジェリシン-high K 法(98)により細胞膜のプロトン透過性を上昇させた条件下において細胞外液に酸を投与した。ナイジェリシンはプロトン、カリウムイオン透過性のイオノフォアであり、細胞外液にナイジェリシンを添加すると細胞膜のプロトン、カリウムイオンの透過性が向上する。ここで細胞内外のカリウムイオン濃度を等しくすると、細胞内 pH は細胞外 pH に等しくなる。Fura-2 を負荷した HEK293T を 10  $\mu$ M ナイジェリシンを含む high K バッファー中で 10 分間インキュベートした後 10 mM 酢酸、塩酸、クエン酸溶液で細胞を刺激した。細胞外 pH はそれぞれ 4.7、3.1、3.3 であり、細胞内 pH も同程度の値と考えられた。いずれの酸刺激によっても明瞭な応答が観察された。ナイジェリシン処理しなかった細胞は high K バッファー中で塩酸、クエン酸刺激しても応答は認められなかった。酢酸はナイジェリシン処理の有無に関わらず応答を誘起した(図 4-9)。塩酸やクエン酸のような親水性の酸刺激に対してもナイジェリシン処理した細胞では応答が誘起されたことから細胞内酸性化が内因性応答を誘起する要因であると考えられた。

#### 4-4. 考察

酢酸は哺乳類細胞において特徴的な内因性応答を誘起することが、第2章にて示された。酢酸に対する細胞応答は Fura-2 のみならず、別のカルシウム指示薬である Fluo-4 を用いたカルシウムイメージングによっても確認され、Fura-2 に特異的な現象ではないことが確認されている(図 4-10)。酸味受容体の機能解析のために実施された HEK293T を用いたパッチクランプにおいても内因性応答が確認されている。しかし、クエン酸、塩酸に対して内因性応答はいずれの手法によっても検出されていない(図 4-1)(34)。本章ではこの応答を誘起する酢酸分子の化学的性質について解明を試みた。その結果、酢酸の持つ疎水性が、Fura-2 を負荷した HEK293T の細胞応答を誘起する要因であることが示された。更に、酢酸以外の疎水的な酸(蟻酸、プロピオン酸、酪酸)も細胞応答を誘起することが示された(図 4-6)。

疎水的な酸は脂質二重膜を透過することが報告されていることから(100, 101)、細胞内の酸性化が細胞応答を誘起する要因であると仮説が立てられた。細胞内 pH 指示薬 BCECF を用いた試験により、酢酸刺激後に細胞内 pH が低下していることが確認された(図 4-7)。疎水的な酸を 6-10 mM の濃度で投与したところ、BCECF の蛍光比  $\text{Ratio}_{F500/F445}$  は約 1.0 以下に低下した。これはおよそ細胞内 pH6.5 以下に相当し、細胞応答と細胞内酸性化が伴って発生していることが確認された。更にプロトン透過性のイオノフォアを用いた試験により、細胞内酸性化の細胞内応答への寄与を検証した。ナイジェリシン high  $K^+$  処理によって細胞外液中のプロトンが細胞内に透過し、細胞内が酸性化がされる条件下では親水的な酸である塩酸、クエン酸刺激によっても応答が誘起された(図 4-9)。以上の結果から、内因性応答は細胞内酸性化によって誘起されると結論付けられた。

Fura-2 は細胞内カルシウム濃度指示薬として汎用されており、通常、細胞内カルシウム濃度上昇を反映して Ratio が上昇する。しかしながら、タプシガルギン処理とカルシウムフリーバッファの使用によって、小胞体由来のカルシウム放出および細胞外からのカルシウム流入を遮断した HEK293T においても、酢酸刺激に対して細胞応答が明瞭に確認された。このため酢



酸刺激によって観察される細胞応答、すなわち Ratio の上昇は細胞内カルシウム濃度上昇を反映していない可能性が考えられた。Fura-2 の蛍光はカルシウム濃度以外にも pH、疎水性物質、温度、マグネシウムイオン濃度の影響を受けることが報告されている。(97, 102, 103)。pH、疎水性物質は細胞の生理応答とは関係なく、Fura-2 とカルシウムイオンの解離定数に影響することで蛍光に影響を及ぼすことが報告されている(103)。酢酸刺激によって細胞内 pH は低下するため、Fura-2 の蛍光に影響を及ぼすこと予想される。しかしながら報告されている pH 依存的な Fura-2 の蛍光の変化によって、酢酸刺激に対する細胞応答、すなわち Ratio の上昇を説明することはできない。Fura-2 は解離定数に従いカルシウムイオンをキレートし、Fura-2-Ca<sup>2+</sup>複合体を形成する。カルシウム濃度の上昇に伴い Fura-2-Ca<sup>2+</sup>複合体の存在比率が上昇する。このことによって蛍光特性が変化し Ratio が上昇する。Fura-2 とカルシウムイオンの解離定数は pH 低下依存的に上昇し、pH7.4 では 10 - 20 nM であるが、pH6.0 では 5000 nM である(104)。このことは細胞内酸性化に伴い、Fura-2-Ca<sup>2+</sup>複合体の存在比率が低下することを意味する。実験的にも酸性条件下で Ratio が低下することが示されている(103)。報告されている疎水性物質の Fura-2 に対する影響によっても、酢酸刺激に対する Ratio 上昇を説明することはできない。プロパノールに溶解した Fura-2 の蛍光 F340 (340 nm で励起した際の 510 nm における蛍光)は水に溶解した Fura-2 の F340 より低いと報告されている(103)。一方、Fura-2 を負荷した HEK293T を酢酸で刺激すると明瞭な F340 の上昇が認められる(結果非掲載)。また、疎水的なアルコールを 10 mM の濃度で細胞外に投与した場合には Ratio の上昇は認められなかった(図 4-6)。すなわち報告されている疎水性物質中における Fura-2 の蛍光特性の変化によって酢酸刺激に対する Ratio 上昇を説明することはできない。これらのことから細胞内酸性化によって内因性応答が誘起される機構の解明には更なる研究が必要である。細胞内にはカルモジュリンのようにカルシウムと結合しているタンパク質が存在しているが、疎水性の酸刺激によって、細胞内の pH が低下したことにより、それらタンパク質のコンホメーション変化が生じ、結合していたカルシウムを細胞質内に遊離し細胞内の遊離カルシウムイオンの濃度を上昇させ

ているのかもしれない。

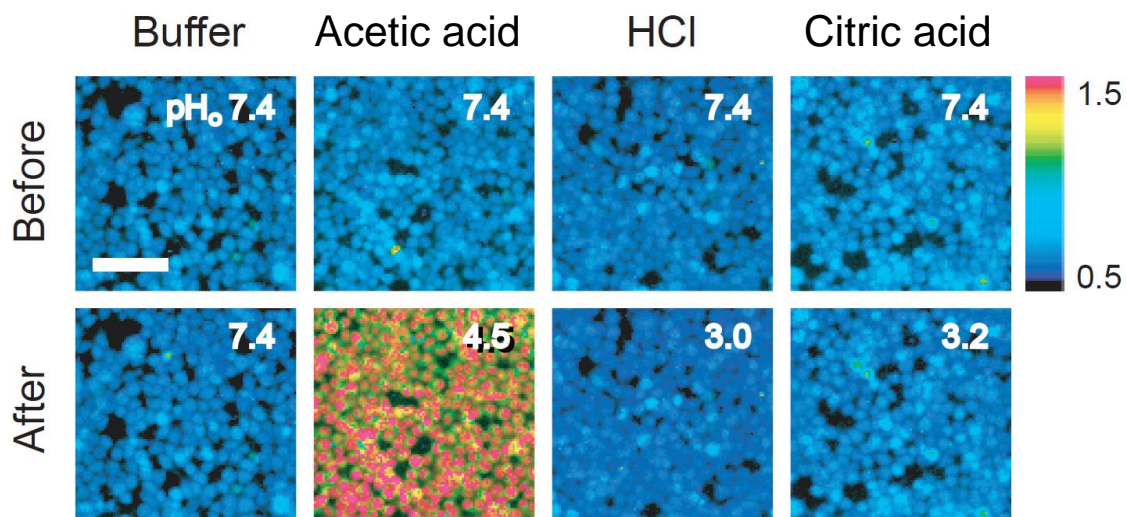
カルシウムイオンは重要なセカンドメッセンジャーである。そのためカルシウムイメージングは細胞応答を解析するために幅広く用いられている手法である。過去の報告の中には酢酸や他の疎水性の酸の存在下でカルシウムイメージングが実施されている例がある(105–107)。酢酸や他の疎水性の酸によって誘起される Ratio の上昇はバックグラウンドノイズとなるであろう。カルシウムイメージングを実施する際にシグナルのバックグラウンドノイズを理解することは重要であるが、本章において酢酸や他の疎水性の酸によって誘起される細胞応答について詳細に記述された内容は、培養細胞を用いたカルシウムイメージングにおいて観察される蛍光シグナルを正しく解釈するために、重要な情報となろう。

本章では、Fura-2 を負荷した HEK293T 細胞において観察される酢酸刺激に対する応答が非解離酢酸濃度に依存的事であること、および細胞応答は細胞内酸性化によって誘起されることを見出した。酢酸によって誘起される細胞応答の生理的意義については、今後の更なる研究が待たれるが、本章で示した結果は、非解離型の酢酸分子の有する、細胞に対する特徴的な性質を明瞭に示した例であると考ええる。生体と酢酸分子の接触する領域で起こる現象の記録と解釈は、酢酸の呈味性の発現機構を考察する上で重要な知見となるであろう。

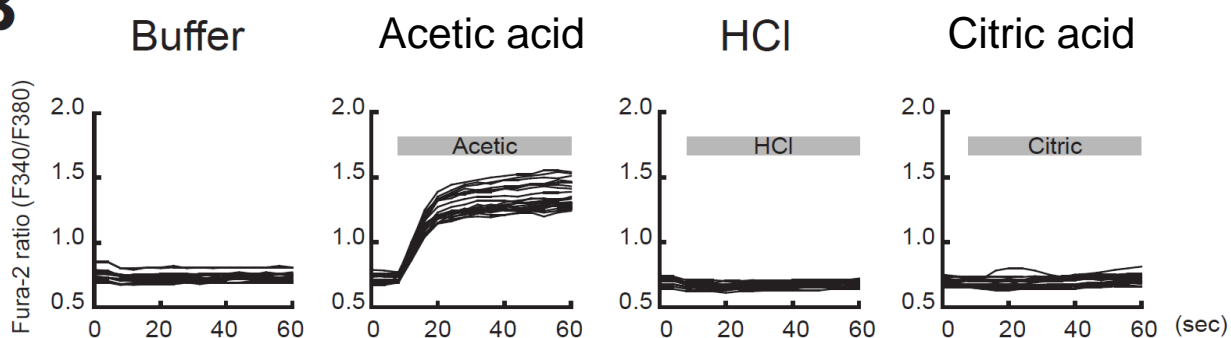
表4-1 本章で用いた溶液の組成

	10H バッファー	0Ca-10H バッファー	High K液	キャリブレーション液
HEPES (mM)	10	10	10	10
NaCl (mM)	130	130	5	5
KCl (mM)	5	5	130	130
CaCl <sub>2</sub> (mM)	2	-	2	2
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1.2	1.2	1.2	1.2
Glucose (mM)	10	10	10	10
EGTA (mM)	-	0.2	-	-
pH	7.4	7.4	7.4	6.0、6.5、7.0、7.5、8.0

**A**



**B**



**C**

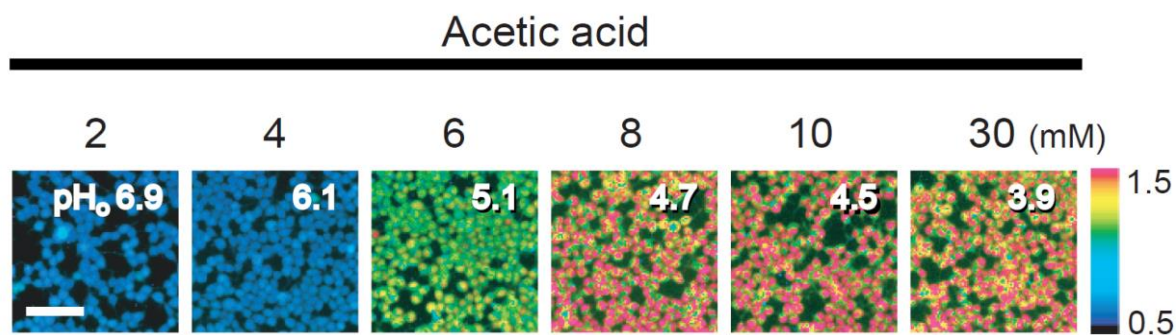


図4-1 Fura-2を負荷したHEK293Tの酸刺激に対する応答

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー:100  $\mu$ m。(A) 10 mM酢酸、塩酸、クエン酸でHEK293Tを刺激した際の代表的な蛍光イメージ。上段は酸投与前、下段は酸投与20秒後。(B) Ratioの経時変化。黒色線は代表的な20細胞のRatioを反映している。灰色の水平の線は10 mMの各酸の存在を示す。(C) 様々な濃度の酢酸によりHEK293Tを刺激した。

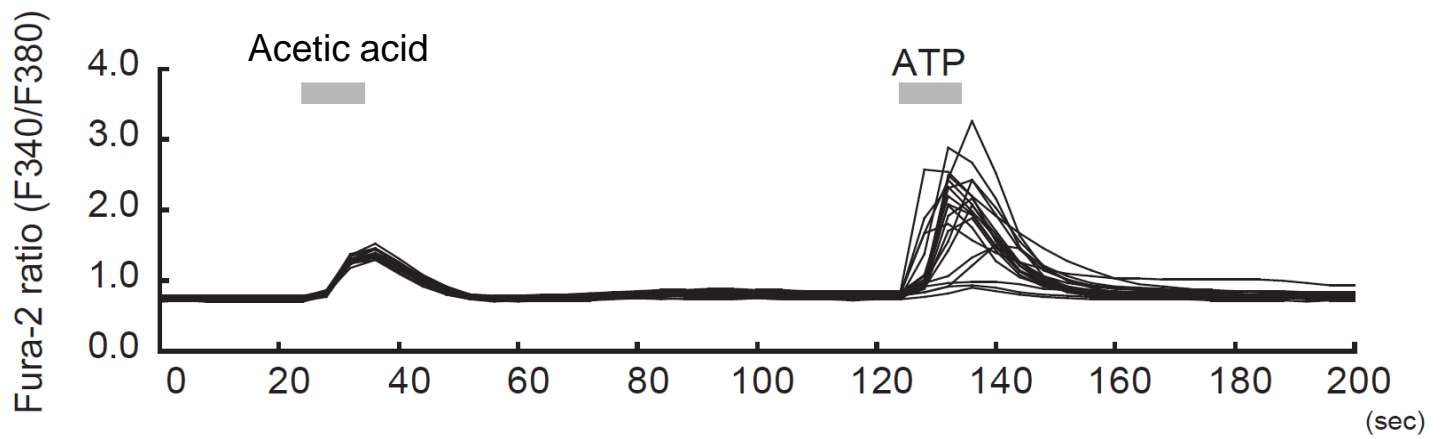


図4-2 酢酸投与後の細胞応答の可逆性評価

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。灌流装置を用いて10 mM酢酸(pH4.5)を投与した後、すみやかに酢酸を洗い流し、続けて10  $\mu$ MATPを投与した。黒色の線は代表的な20細胞のRatioを反映している。灰色の水平線は各リガンドの投与を示す。

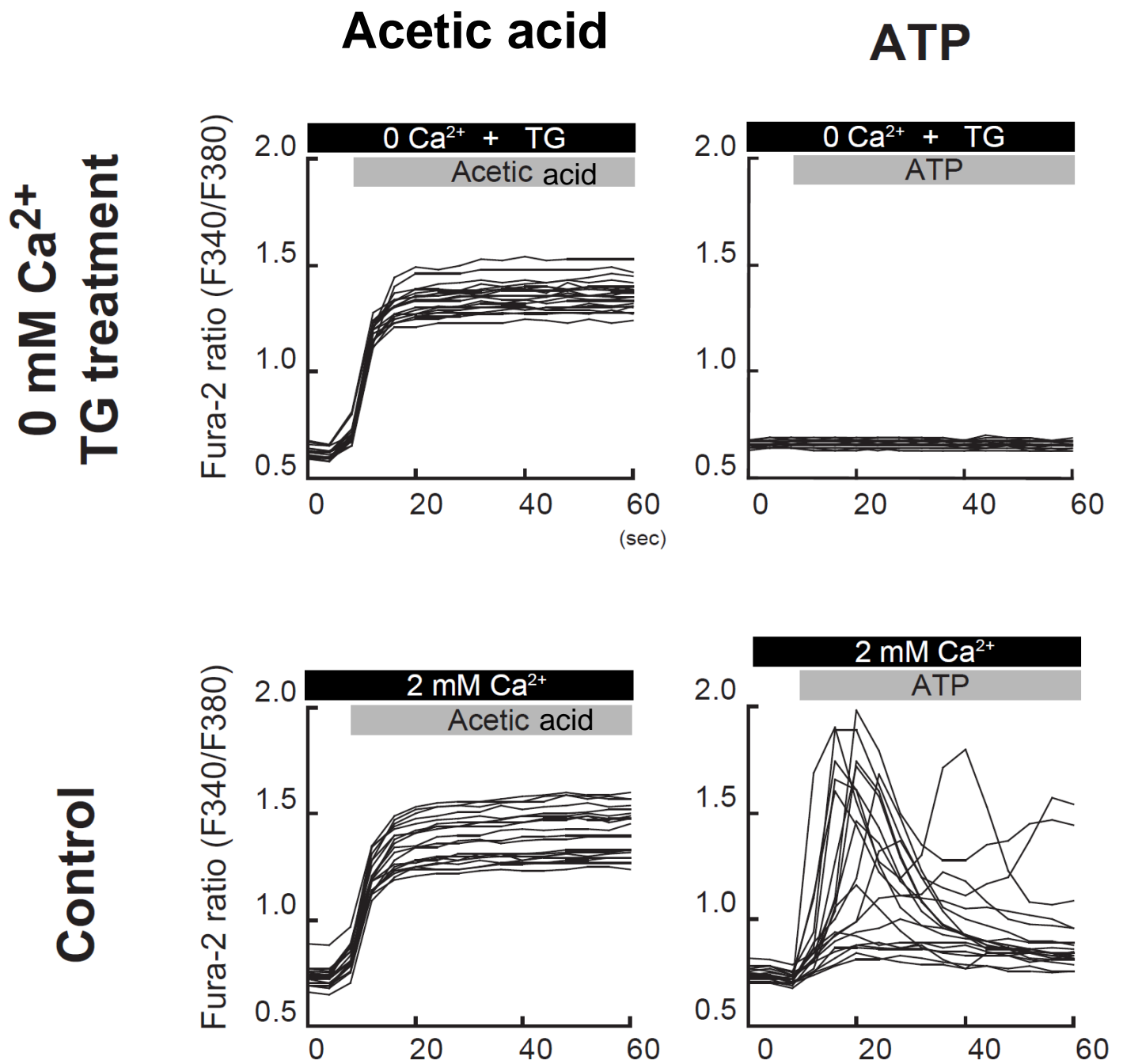


図4-3 内因性応答のカルシウム依存性評価

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。黒色線は代表的な20細胞のRatioを反映している。黒色の水平の線は細胞外カルシウム濃度とタプシガルギン(TG)の存在を示す。灰色の水平の線は10 mM酢酸、10  $\mu$ MATPの存在を示す。タプシガルギンによる前処理は0Ca-10Hバッファー中で10分間以上実施した。

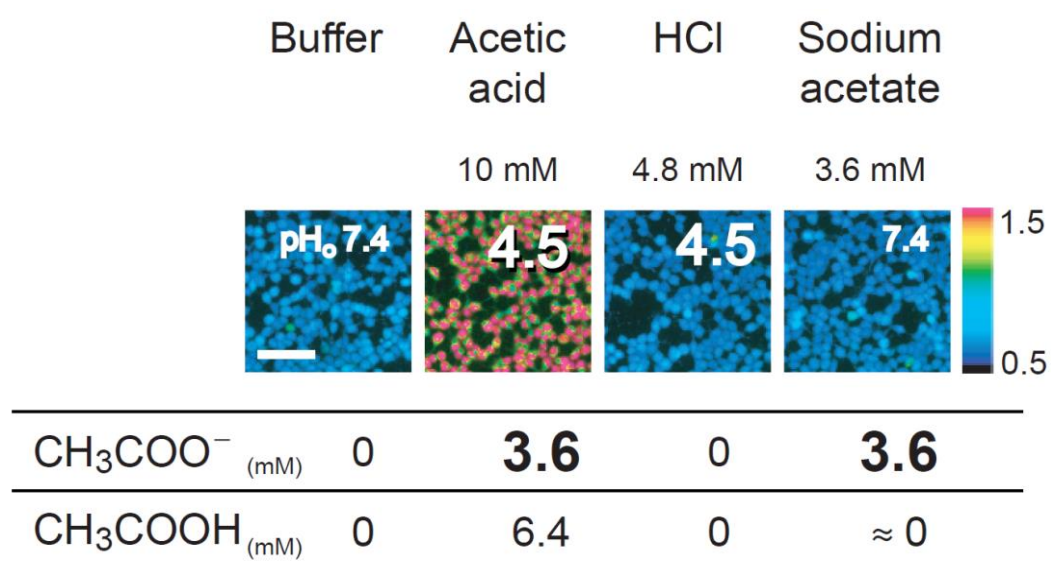
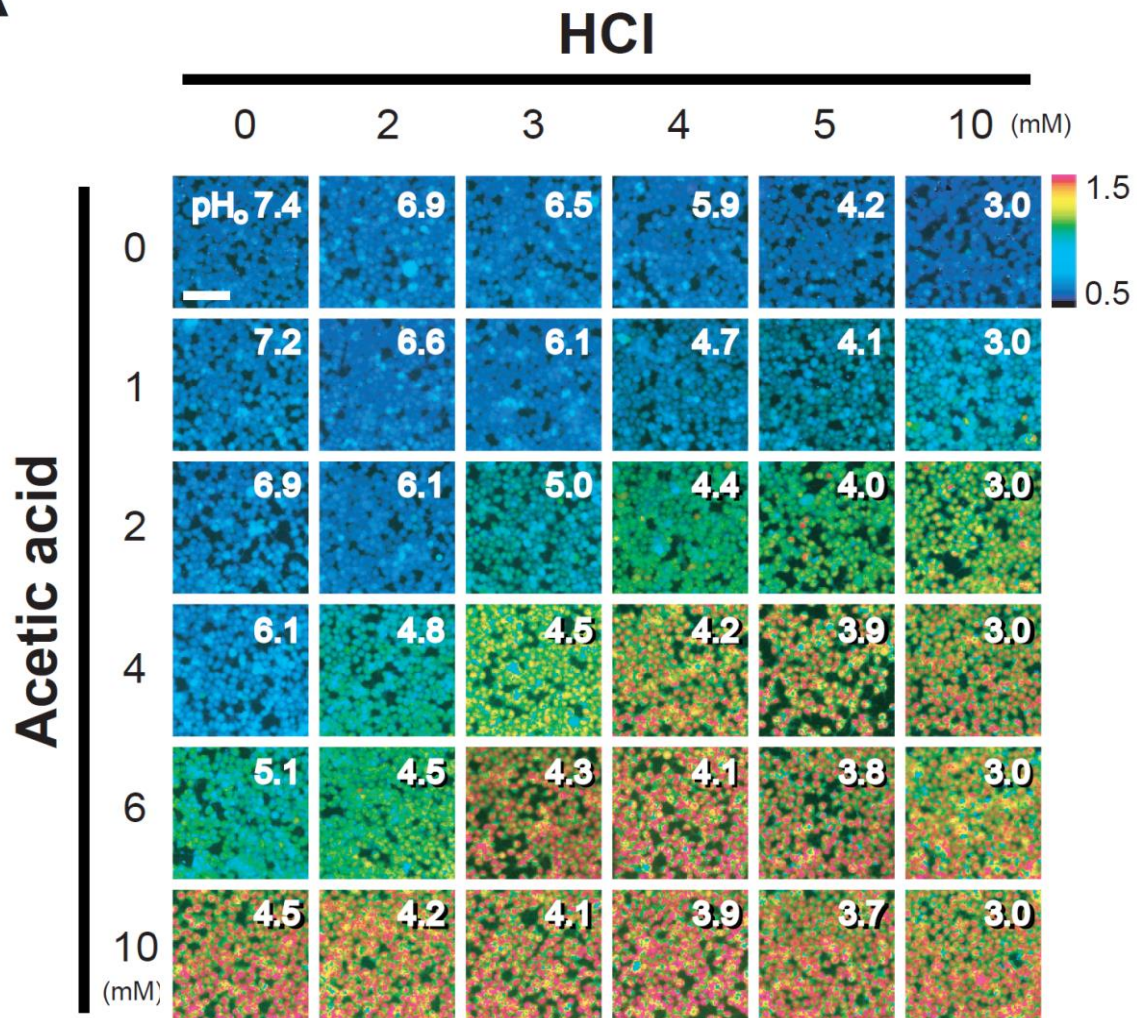
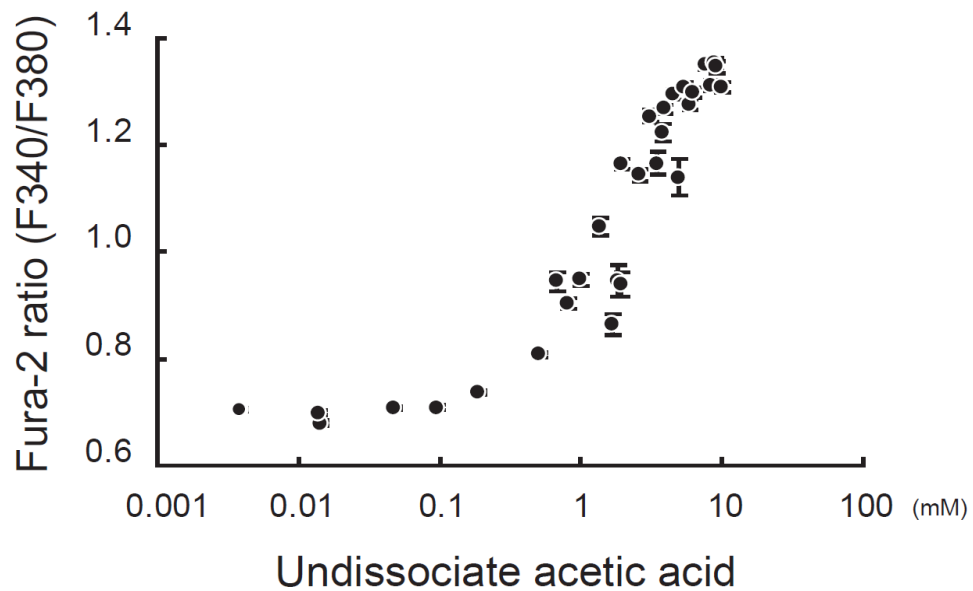


図4-4 Fura-2を負荷したHEK293Tのプロトン、酢酸イオン刺激に対する応答

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。HEK293Tを10 mM酢酸、4.8 mM塩酸、3.6 mM酢酸ナトリウムで刺激し、刺激20秒後の代表的な蛍光イメージを示した。酢酸イオン( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )、非解離酢酸( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )の理論濃度を下部に示した。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー:100  $\mu\text{m}$ 。



**A****B**

**図4-5 内因性応答の非解離酢酸濃度依存性**

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。(A) 刺激20秒後の代表的な蛍光イメージ。刺激溶液は酢酸と塩酸を混合して調製した。酢酸と塩酸の終濃度をそれぞれ図の左側と上部に記した。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー:100  $\mu$ m。(B) 刺激溶液の非解離酢酸濃度に対して細胞のRatioをプロットした散布図。非解離酢酸濃度は総酢酸濃度とpHから計算された理論値。各点は平均 $\pm$ 標準誤差を示す(n = 60、3回の独立した試行 $\times$ 20細胞)。



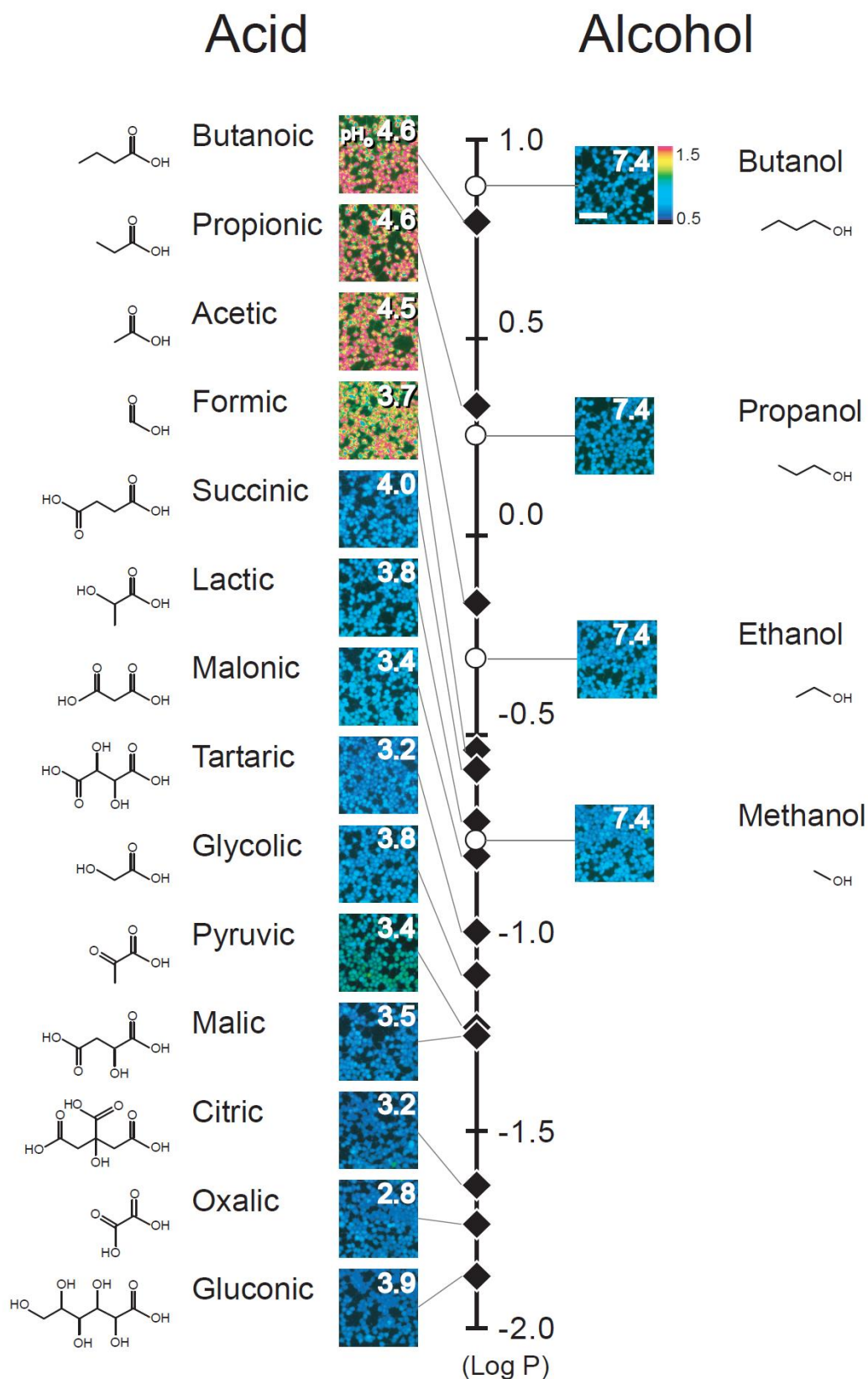


図4-6 Fura-2を負荷したHEK293Tの疎水性の異なる酸に対する応答

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。細胞を10 mMの酸およびアルコールで刺激し、刺激20秒後の代表的な蛍光イメージを示した。垂直の軸は各分子のLog P値を示す。黒色の四角印は各酸の、白色の丸印は各アルコールのLogP値を示した。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー: 100  $\mu$ m。Butanoic: 酪酸、Propionic: プロピオン酸、Acetic: 酢酸、Formic: 蟻酸、Succinic: コハク酸、Lactic: 乳酸、Malonic: マロン酸、Tartaric: 酒石酸、Glycolic: グリコール酸、Pyruvic: ピルビン酸、Malic: リンゴ酸、Citric: クエン酸、Oxalic: シュウ酸、Gluconic: グルコン酸。

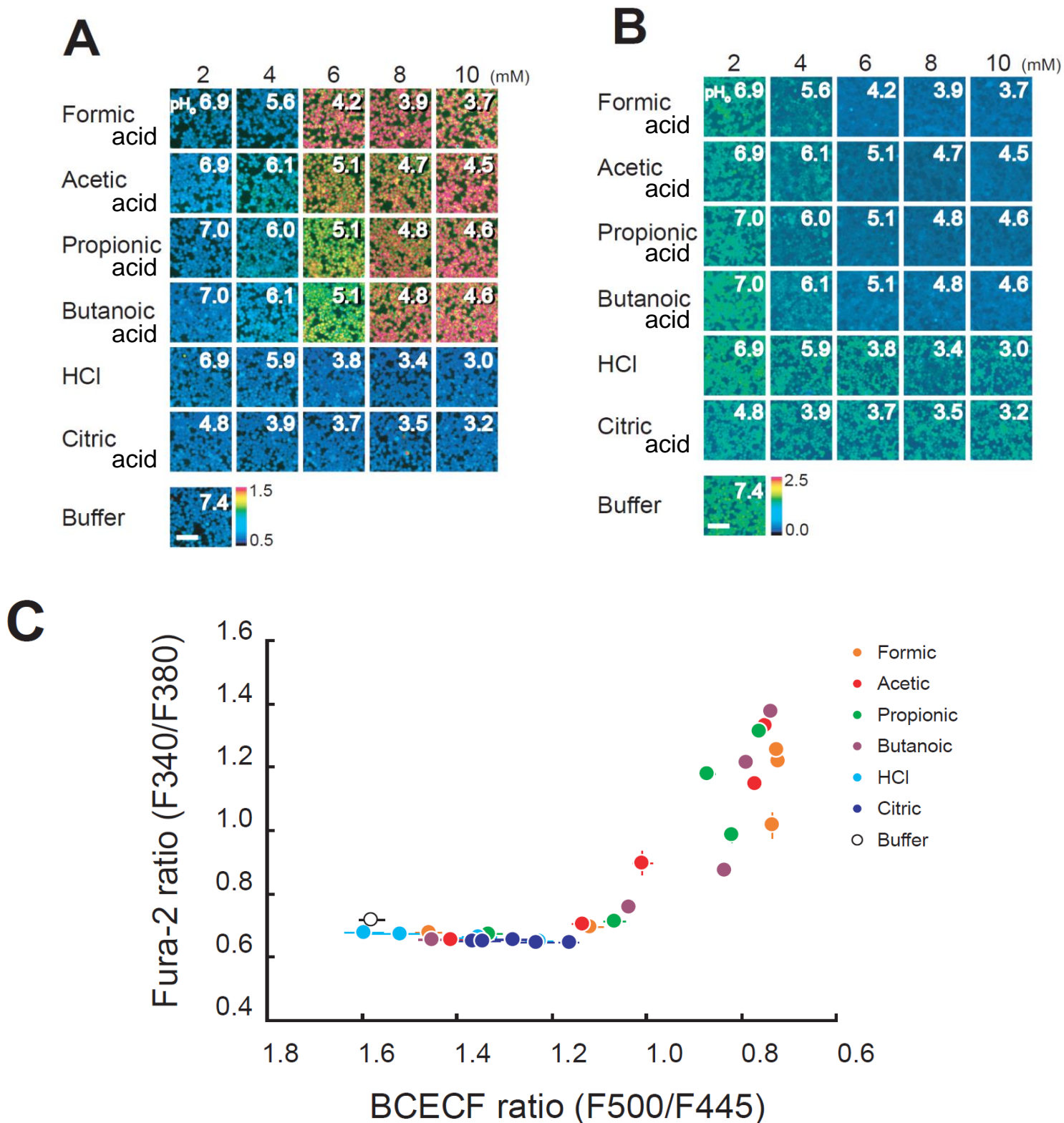
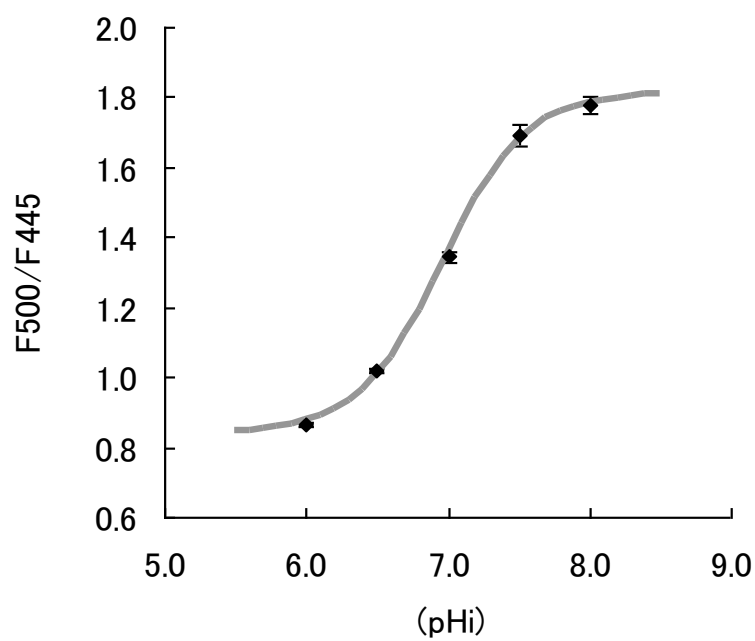


図4-7 細胞応答の細胞内pH(pHi)依存性

pHiと細胞応答の関係を示した。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー: 100  $\mu$ m。(A) Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供し、2、4、6、8、10 mMの蟻酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、塩酸、クエン酸で細胞を刺激した(n=3)。刺激20秒後の代表的な蛍光イメージを示した。(B) BCECFを負荷したHEK293TをpHi測定に供した。(A) で用いたものと同じ酸溶液で細胞を刺激した(n=3)。刺激20秒後の代表的な蛍光イメージを示した。(C) BCECFのRatio (F500 / F445) に対してFura-2のRatio (F340 / F380) をプロットした。各Ratio値は(A)、(B) に示した実験により得たものである。各点は平均±標準誤差を示す(n = 60、3回の独立した試行より得られた60細胞の値)。



**図4-8 BCECFのRatio (F500/F445)をpHiに変換するキャリブレーションカーブ**

作成されたキャリブレーションカーブ。pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0のキャリブレーション溶液中でのHEK293T細胞のRatio (F500/F445)をプロットした。各点は平均±標準誤差を示す。フィッティングは非線形最小二乗法により実施した。

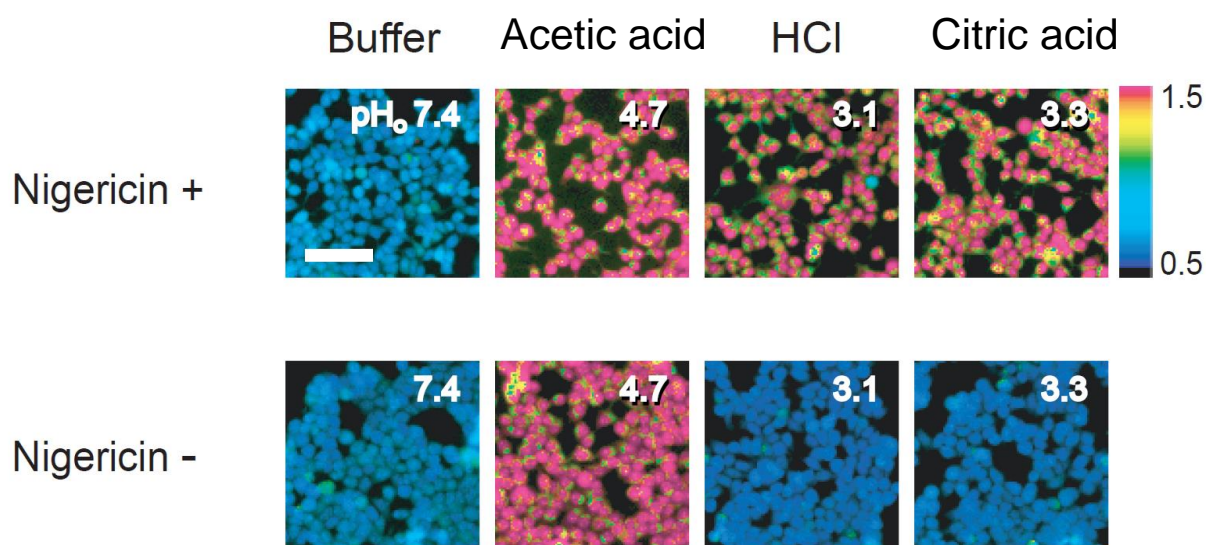


図4-9 ナイジェリシン処理したHEK293Tの酸刺激に対する応答

Fura-2を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。細胞をhigh Kバッファー中でインキュベートし、ナイジェリシン共存下(上段)、非共存下(下段)で10 mM酢酸、塩酸、クエン酸で刺激した。刺激20秒後の代表的な蛍光イメージを示した。酸溶液は酸をhigh Kバッファーに溶解して調製した。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー: 100  $\mu$ m。



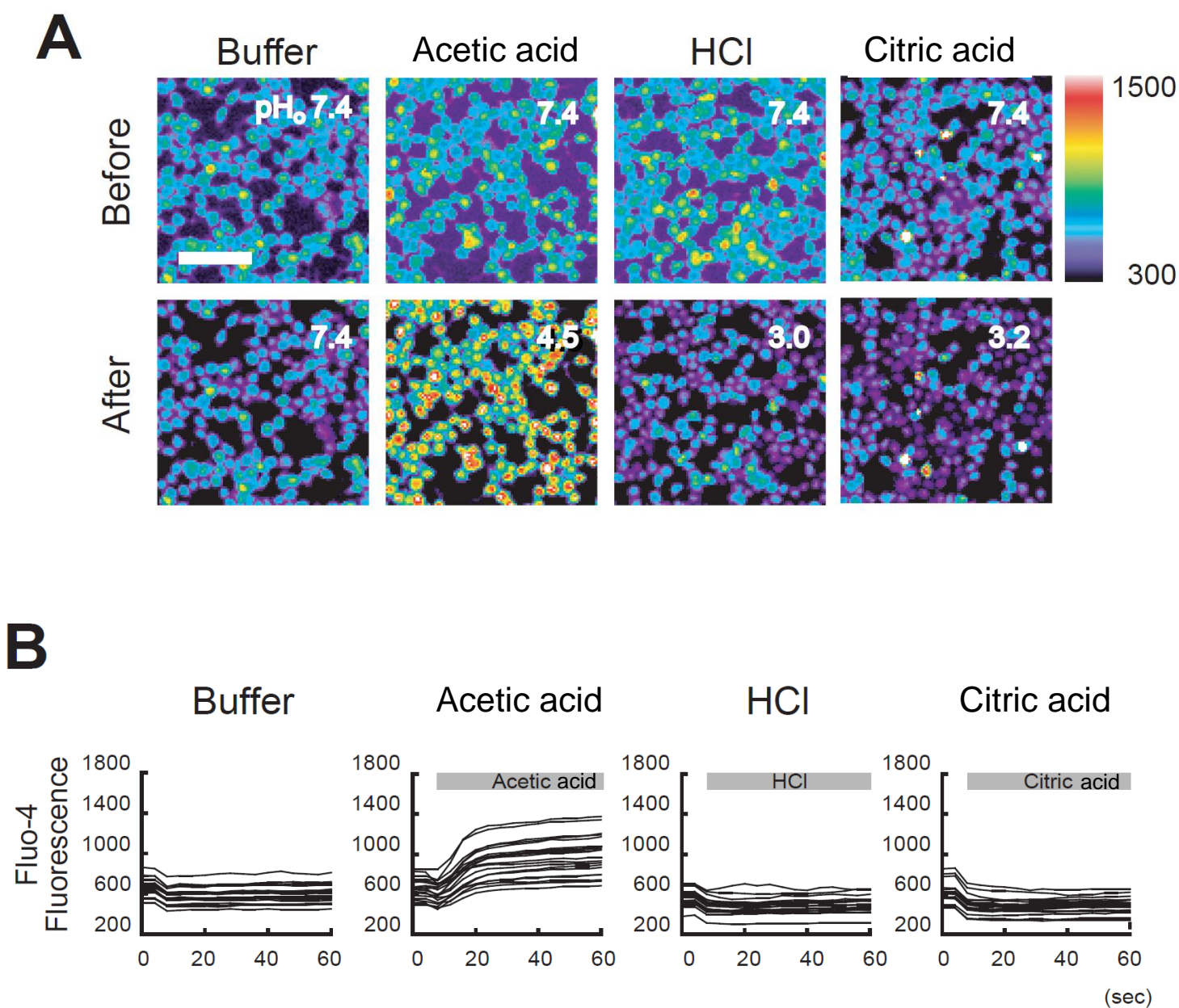


図4-10 Fluo-4を負荷したHEK293Tの酸刺激に対する応答

Fluo-4を負荷したHEK293Tをカルシウムイメージングに供した(n=3)。(A) 10 mM酢酸、塩酸、クエン酸でHEK293Tを刺激した際の代表的な蛍光イメージ。上段は酸投与前、下段は酸投与20秒後。白色文字は細胞外pHを示す。スケールバー: 100  $\mu$ m。(B) Fluo-4蛍光の経時変化。黒色線は代表的な20細胞の蛍光強度を示している。灰色の水平の線は10 mMの各酸の存在を示す。

## 第 5 章

### 総合討論

本論文では酢酸が PKD1L3/PKD2L1 を活性化することを実験的に証明し、このチャンネルが酢酸の酸味発現に強く関与するという可能性を示した。更にカプサイシンとその類縁体が PKD1L3/PKD2L1 を介した細胞応答を抑制することを示した。また酢酸刺激に対して培養細胞が示す内因性応答についてその要因が細胞内酸性化にあることを明らかにした。

第 1 章の序論にて述べた通り、酢酸は食酢中の主要な有機酸である。しかしながら食酢が酸味調味料として用いられる上で最も重要といえる、酢酸の有する呈味発現機構について、十分に解明されていないのが現状であった。酸味の受容機構は、甘味や苦味などの他の基本味と比較し、その解明が遅れているが、これは酸味の受容機構の複雑性を反映した結果かもしれない。すなわち酸味はプロトンによって惹起されると考えられながらも、酸の種類によって同じ pH でも異なった酸味強度を示すため(45, 46)、単純なプロトン受容体が酸味受容体であると想定した場合、酸味受容の全体像を説明できないのである。このため必然的に酸の種類毎によって、異なった応答性を示す酸受容機構の存在が想定される。ここで、酢酸は同じ pH の他の酸と比較して、強い酸味を惹起することから(41)、酢酸に対する応答性の高い機構が酸味受容に関与している可能性がある。すなわち酢酸は酸味受容機構全体像を解明する上で良好なモデル分子と考えられ、酢酸の呈味発現機構を解明することは酸味受容機構の全体像解明の端緒となり得る。また酢酸が食酢中の主要な酸味物質であることを鑑みると、酢酸の呈味発現機構の解明は学術的価値を有するだけでなく、食品産業における応用学的見地からも意義深いものである。

第 2 章では、PKD1L3/PKD2L1 が酢酸刺激により活性化することを実験的に証明した。すなわち従来課題となっていた、カルシウムイメージングにおける酢酸刺激に対する培養細胞の内因性応答の影響を、リガンド投与法や応答解析時間の最適化によりできるだけ排除することで酢酸に対する本チャンネルの応答測定手法の確立に成功した。この手法により本チャンネルが酢酸によっても pH 依存的に活性化されることを証明した。このことから PKD1L3/PKD2L1 が酢酸

の呈味発現に関与するという可能性を示した。

第3章では、PKD1L3/PKD2L1の薬理学的性質の解明を目的としてチャネルの応答を抑制する阻害剤の探索を実施した。これまでに PKD1L3/PKD2L1 の薬理学的性質についての報告はほとんどなかったが、本研究において辛味を有する化合物であるカプサイシンに抑制能があることを見出した。またカプサイシンの類縁体についても幅広く探索した結果、抑制能を有する類縁体も多数同定した。カプサイシンはマウスの味細胞の酸刺激に対するオフ応答も抑制したため、カプサイシンが酢酸の酸味を抑制する物質となる可能性が示された。味覚受容体における薬理学的な性質の解明は、味覚受容機構を解析する上においても重要な知見と言え、本解析で明らかにされた結果は、今後の酸味受容機構の全体像解明においても有用なものとなることが期待される。

第4章では酢酸刺激に対して培養細胞が示す内因性応答の発生機序の解明を試みた。この内因性応答は、塩酸やクエン酸刺激によっては誘起されない。そのため酢酸が、他の酸よりも強い酸味を惹起する、などの酢酸の特殊性の解明の端緒となる可能性があった。詳細な解析の結果、酢酸は細胞内を酸性化して内因性応答を誘起することが示された。これは塩酸やクエン酸など、親水性の高い酸では認められなかったが、蟻酸、プロピオン酸、酪酸のように酢酸同様に疎水性の高い酸によって誘起されることが判明した。すなわち、生体細胞における酸刺激受容を考察する上で pH のみならず、疎水性のような酸分子の化学的性質が細胞の反応性を大きく左右するという新たな視点を提起した。更に、疎水性のような化学的性質が、pH だけでは説明できない、他の酸よりも強く酸味を惹起するという酢酸の呈味発現機構に関与する可能性をも同時に示唆することができた。

### **PKD1L3/PKD2L1 による酢酸受容**

培養細胞を用いたカルシウムイメージングによって PKD1L3/PKD2L1 の機能解析が行われているが、酢酸は培養細胞に内因性応答を誘起するために、これまでは酢酸刺激に対して



PKD1L3/PKD2L1 が活性化されることは示されていなかった(26, 34)。そこで応答解析時間の最適化として late フェーズに定量を行うことの妥当性を示し、内因性応答の影響を可能な限り排除した測定手法を確立した。この手法により酢酸が PKD1L3/PKD2L1 を活性化することを直接的に示した。PKD1L3/PKD2L1 は 40 mM 酢酸 (pH3.1) 刺激に対して応答を示した (図 2-3)。一般的な食酢中の酢酸濃度は 500–1000 mM 程度で pH2.5–3.5 程度である。このことから食酢を喫食した際に酢酸が PKD1L3/PKD2L1 を活性化しうる濃度で味細胞に到達することが予想される。市販の食酢(ミツカン穀物酢、10 倍希釈液)を PKD1L3/PKD2L1 発現細胞に投与したところ明瞭な応答が認められた(結果非掲載)。すなわち、市販の食酢の喫食時に感知される、酸味の発現に PKD1L3/PKD2L1 による酢酸刺激の受容が関与している可能性が示唆された。

#### カルシウムイメージングによる味の客観的測定

培養細胞を用いたカルシウムイメージングにより PKD1L3/PKD2L1 の酢酸刺激による活性化を評価できたことは、産業上も重要な意味を持つ。食品の呈味の評価は、食品の品質設計において重要な工程である。食品の呈味評価は一般に官能評価によって実施されるが、官能評価には、評価者間における感受性の違いなどの個人差や、1 人の評価者においても日ごとの体調等の影響による個人内差など、多様な誤差要因が多く、また客観性確保が困難であるというデメリットがある。そのため官能評価に変わる安定で客観的な呈味評価技術が求められている。一方、食品中の呈味物質の濃度を測定し、味の強度を推定する方法は1つの有効な手段であるが、呈味物質の濃度から味の強度を完全に推定することは困難である。例えば旨味物質であるグルタミン酸ナトリウムとイノシン酸の混合溶液で発揮される、旨味の相乗効果に代表されるように、呈味物質同士の相互作用が発揮されるため、呈味物質濃度と呈味強度の間に単純な相関関係はない(108)。また食品中の呈味物質の種類は多く、例えば甘味物質だけでも、糖、アミノ酸、甘味タンパク質、人工甘味料、というように化学的性質の全く異なる物質

が多種類含まれている。また同定すらされていない呈味物質も存在するであろう。これら化学的性質の異なる成分は、それぞれ異なった手法で濃度測定を実施する必要があり、呈味物質の濃度を網羅的に把握することは非常に煩雑な作業となる。これらの理由から呈味成分の分析濃度から、完全に味覚強度を推定することは困難である。

近年、味覚センサーと呼ばれる、人間の味覚を再現する装置が複数開発されている。これらは一定の客観性や評価の安定性を有している点で優れているが、いずれも完全に人間の味覚を再現したものとは言えない。AISSY 社の開発した味覚センサーは代表的な 8 種の呈味成分 ( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^+$ 、 $\text{H}^+$ 、グルコース、スクロース、グルタミン酸塩、カフェイン) の濃度測定値より呈味強度を推定するという原理に基づいている(109)。そのため、人工甘味料、ペプチド成分のような測定対象物以外の呈味成分の味覚への影響や、pH だけでは説明できない酸の種類ごとの酸味強度の違いは測定できないと思われる。Insent 社の味覚センサーは人工脂質膜に対する呈味物質の相互作用強度と、官能的な呈味強度の相関に基づいて味覚測定を行う装置である(110)。しかしこの手法は味覚受容体の分子基盤に基づく味覚の受容機構を一切反映していない。そのため本研究の第 3 章で実施したような味覚受容体を分子標的とする味覚抑制剤の探索には原理的に適用することができない。

一方、本研究で実施した、味覚受容体の反応性をカルシウムイメージングにて測定する手法は、個人差、体調などの影響を排除した客観的手法としても、酸味抑制剤の探索においても、その適用が期待される。しかしカルシウムイメージングを一般食品の呈味評価に適用するためには技術的課題が存在することも事実である。食品は多様な成分の混合物であり、含まれる成分がカルシウムイメージングの測定系に影響を与え、測定を妨害する場合がある。例えば酢酸は培養細胞に内因性応答を誘起する(図 2-1)。また食品中に一般的に含まれるメイラード反応物は自家蛍光を発してカルシウム指示薬の蛍光測定を阻害する。前者は測定時間を late フェーズにすることによって(図 2-3)、後者は蛍光指示薬の代わりに発光タンパク質を使用することによって解決することが可能である(111)。このような測定手法の改良、最適化は受

容体の機能解析技術を食品産業に応用するために欠かすことのできない研究領域と考えられ、今後ますますの発展が待たれる。

### カプサイシンによる抑制

本研究において、カプサイシンおよびその類縁体が PKD1L3/PKD2L1 の応答抑制剤として機能することが示された(図 3-6)。PKD1L3/PKD2L1 は酸味受容体としての機能を有することが強く示唆されており、カプサイシンおよびその類縁体は酸味抑制剤となる可能性が示唆された。これまでにカプサイシンやトウガラシ粗抽出物により酸味の強度が抑制されることが、複数の官能評価に基づく研究報告により示されている(91, 92)。カプサイシンによる酸味抑制の作用機序として PKD1L3/PKD2L1 のカプサイシンによる応答抑制が考えられる。ここで興味深い点は、PKD1L3/PKD2L1 の応答はカプサイシンによりほぼ消失するが(図 3-4A)、官能的な酸味の抑制は酸味が完全に消失するのではなく、部分的な抑制効果しか認められていないことである(91, 92)。このことからヒトの酸味受容にはカプサイシンによって抑制されるカプサイシン感受性の機構と、抑制されない非感受性の機構の双方が存在することが予想される。すなわち PKD1L3/PKD2L1 以外の受容体が酸味受容体として機能している可能性を支持する結果とも言えよう。

PKD1L3/PKD2L1 を介さない酸味受容機構が機能していることは、マウスの神経生理学的な実験からも示唆されている。すなわち PKD1L3 および PKD2L1 のダブルノックアウトマウスの酸味刺激に対する味神経応答は野生型と比較して有意に小さかったが、完全には消失しなかったのである(42, 43)。このように酸味受容は複数の受容機構が関与する、複雑で多元的な受容機構であると考えられ、甘味や旨味が単一の受容体によって受容されることと比較すると、対照的である。酸味受容機構の解明が、甘味、旨味受容機構よりも遅れていることの一因としてこの複雑性があげられよう。塩味も同様に複数の受容機構が関与するとされ、その受容機構の解明はなされていなかった。しかし塩味にはアミロライド感受性の機構と、アミロライド非感受

性の機構があるという薬理学的な性質が知られており、この事実に基づき解析が進められ ENaC がアミロライド感受性の塩味受容体であることが同定された(17)。またアミロライド非感受性の機構は、マスタードの辛味成分である AITC によって抑制されることが、近年示され、この薬理学的性質から、塩味シグナル伝達経路の解明が試みられている(18)。このように味覚受容体の薬理学的な性質は味覚受容機構解明にとって重要な知見と言える。本研究では PKD1L3/PKD2L1 がカプサイシン感受性であることを示した。本知見はカプサイシンが酸味抑制剤となる可能性を示したに留まらず、今後の酸味受容機構の全体像解明にとっても有用な知見である。

#### 酢酸の呈味発現機構に関する考察 一味覚受容の観点より

酢酸の酸味は同じ pH のクエン酸や塩酸よりも強く(41)、酢酸の呈味発現機構は他の酸と比較して特徴的であると考えられる。それにも関わらずその呈味発現機構については、既知の酸受容体である PKD1L3/PKD2L1 に対する作用さえ、明らかでなかった。本研究において、酢酸は PKD1L3/PKD2L1 を活性化させることが明らかにされ、酢酸の呈味発現に PKD1L3/PKD2L1 の活性化が関与することが強く示唆された。しかし一方で、その閾値 pH、同じ pH における応答強度にクエン酸と顕著な差は認められなかった(図 2-2、2-3)。このことから酢酸とクエン酸の酸味閾値、強度の差を生じさせるのは PKD1L3/PKD2L1 の酸の種類毎の反応性の差ではなく、別の酸受容機構の関与の可能性も示唆された。

同じ pH でも酸の種類によって酸味強度が異なることから、pH でなく酸の分子構造を認識する受容機構が機能している可能性も疑われる。G タンパク質共役型受容体 FFA2(GPR43)は酢酸を含む短鎖脂肪酸の構造を認識して活性化される受容体であり、脂肪組織、膵臓などでの発現が報告されている。(112, 113)。興味深いことに FFA2 の mRNA はマウスの茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭でも検出された(114)。現時点で舌における FFA2 の機能は明らかでないが、酢酸の呈味性に関与している可能性があり、今後の研究が待たれる。

酸の種類による酸味強度の差は、プロトンを供出するという酸に共通の性質とは異なる、各酸分子に特有の化学的性質の差によって説明されるのかもしれない。酢酸分子は非解離型と解離型の平衡状態にあるが、本研究では酢酸は高い細胞膜透過性を有しており、クエン酸や塩酸よりも、細胞内の pH を低下させることが示された(図 4-5)。このことから、細胞膜の透過性や、細胞内の酸性化能の違いを反映して、反応性が変わる酸受容機構が存在しており、このような機構によって酢酸とクエン酸、塩酸の酸味閾値、強度の差が生じている可能性がある。味覚受容体は、味孔付近で一部を細胞外に露出するように発現しており、食品中の呈味成分と直接相互作用する。そのため、呈味物質の細胞膜透過性や細胞内酸性化能は、味覚受容には関与しにくいと考えられる。しかし、酢酸の呈味発現に関しては、一般的なこの考え方と異なり、細胞膜透過性や細胞内酸性化能が関与している可能性がある。この仮説を支持する神経生理学的な報告がある(115)。これによるとラットの舌表面をプロテアーゼ処理して味溶液に対する鼓索神経応答を評価すると、スクロース刺激に対する神経応答の低下が認められたが、酸刺激に対する神経応答の低下は認められなかった(ただし Ogiso らはプレリミナリーな実験結果であると報告している)というものである(115)。このことは甘味受容がプロテアーゼの消化作用を受けやすい、味細胞の表面に露出したタンパク性受容体によって受容されるのに対して、鼓索神経を介した酸の受容には、味細胞の表面に露出したタンパク性受容体が関与しない可能性を示唆している。すなわち酸刺激は舌表面でない部位(細胞内、組織内)によって受容されており、酸の細胞膜透過性の影響を強く受ける可能性がある。

#### 酢酸の呈味発現機構に関する考察 一体性感覚受容の寄与について

本研究では、分子生物学的な研究の進展が目覚ましい、味覚受容機構を切り口として実験を進め、PKD1L3/PKD2L1 が酢酸の呈味発現に部分的ではあるものの関与することを示した。一方で味覚受容機構とは異なる感覚受容機構もまた、酢酸の呈味発現に寄与している可能性もある。食品にはトウガラシの辛味のように一般に食品の「味」と認識されているものの、基本

五味とは区別される感覚がある。基本五味は味覚神経系を介するが、辛味は体性感覚神経系を介し、脳に伝達される。この体性感覚が、酢酸の呈味発現に寄与している可能性がある。味覚シグナルは味細胞が神経伝達物質として ATP を放出し、ATP が味神経に発現するプリン受容体  $P2X_2$  および  $P2X_3$  により受容されることで伝達される。そのため  $P2X_2P2X_3$  ノックアウトマウスは味覚シグナルの伝達ができず、酸味刺激や他の味刺激に対する味神経(鼓索、舌咽神経)応答を失う。しかしながら、このマウスは二瓶試験法という味溶液の飲水量を評価する行動学的試験では、酸溶液を忌避した(116)。すなわち味神経以外にも酸刺激を受容する機構が存在する結果であると言える。味神経以外の酸受容機構の全体像は明らかでないが、体性感覚神経の神経終末は味蕾内および味蕾周辺にも存在する(117)。また顎顔面領域の痛みを中継する三叉神経脊髄路核尾側亜核も舌への酸の投与に対して応答する(118)。これにより不快なヒリヒリとした感覚(unpleasant burning sensation)や炭酸の心地よいピリピリした感覚(pleasant tingling sensation)が引き起こされると考えられている(119)。このように酸の口腔内における受容には、味覚と体性感覚の二者が関与していると考えられる。両者はシグナル伝達経路において明瞭に区別されるが、摂食により口腔内で惹起される感覚という点では類似している。また様々な食品成分の呈味特性を官能評価した場合、sour(酸味)の強い食品は、burning(ヒリヒリする)、tingling(ピリピリ感)という特性も強いという相関関係が認められている(120)。このことから酸味食品の喫食時に惹起される味覚と体性感覚は無意識に混同して認知されている可能性がある。そのため酢酸刺激に対して惹起される味覚と体性感覚の複合感覚が「酢酸の呈味」として捉えられている可能性があり、酢酸の呈味発現機構の解明には両者の包括的理解が必要となろう。

近年、体性感覚神経の酸に対する応答性は、酸の細胞内酸性化能の影響を受けることが明らかにされつつある。体性感覚神経の一部である三叉神経に発現する TRPA1 受容体は、細胞内酸性化によって活性化される(107)。本研究では  $>1$  mM の非解離酢酸溶液は細胞内酸性化を誘導することを示した(図 4-5)。一般的な食酢中の非解離酢酸濃度は  $>450$  mM

(酢酸濃度 500–1000 mM 程度、pH2.5–3.5 程度として算出)であり、十分に細胞内を酸性化し得る。このことから TRPA1を介した体性感覚神経の応答が酢酸の呈味発現に寄与している可能性がある。また、咽頭を酸で刺激すると TRPV1 の活性化を介して体性感覚神経の一部である上喉頭神経が応答し、なおかつ酢酸刺激に対する上喉頭神経の TRPV1 を介した応答は同じ pH のクエン酸刺激に対する応答より大きいことが明らかにされている(61)。このことから TRPV1 を介した体性感覚神経の応答も酢酸の呈味発現に寄与している可能性がある。

酢酸の呈味発現が TRPA1 や TRPV1 を発現する体性感覚神経を介するという仮説は、喫食時に酢酸がこれらの受容体に到達することを前提としている。しかし、味覚受容体が味細胞の先端に局在し(図 1-2)、食品成分と直接、接触できることが明らかであるのに対し、TRPA1 や TRPV1 を発現する体性感覚神経は組織の内部に投射しており、食品成分の到達経路は不明瞭である。薬物動態学の領域では、上皮組織への物質の浸透性が研究されており、薬剤の浸透経路として細胞間隙を透過するパラセラー経路と、細胞内を透過するトランスセラー経路が想定されている(121)。同様にこのような経路を経て、食品中の酸が体性感覚神経に到達するのかもしれない。非解離酢酸分子は細胞膜に対する透過性が高く、クエン酸よりも細胞内を酸性化しやすいことが示された(図 4-5)。このことから細胞内を透過するトランスセラー経路での透過性が、酢酸は、他の酸よりも高く、体性感覚神経に強く作用する可能性がある。このことは酢酸の呈味発現機構の特性を本質的に示しているのかもしれない。現在、酢酸の組織透過性に関する報告は少なく(122)、酢酸の呈味性の理解において非常に興味深い研究領域であり、今後の研究の進展が待たれる。

## 引用文献

1. 飴山實, 大塚滋. (1990) 酢の科学 株式会社朝倉書店.
2. Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y., Ohta, M. (1998) Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.* **61**:953-959.
3. 高橋幸裕, 石井翔. (2010) 酢酸含有飲食物及び酢酸含有飲食物の酢酸臭低減方法. 特許公開2010-124696.
4. Kondo, T., Kishi, M., Fushimi, T., Ugajin, S., Kaga, T. (2009) Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**:1837-1843.
5. Kondo, S., Tayama, K., Tsukamoto, Y., Ikeda, K., Yamori, Y. (2001) Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:2690-2694.
6. Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukiharu, M., Tsukamoto, Y., Goda, T. (2006) Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *Br. J. Nutr.* **95**:916-924.
7. Sakakibara, S., Yamauchi, T., Oshima, Y., Tsukamoto, Y., Kadowaki, T. (2006) Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A(y) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**:597-604.
8. Kishi, M., Fukaya, M., Tsukamoto, Y., Nagasawa, T., Takehana, K., Nishizawa, N. (1999) Enhancing effect of dietary vinegar on the intestinal absorption of calcium in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**:905-910.
9. Fushimi, T., Tayama, K., Fukaya, M., Kitakoshi, K., Nakai, N., Tsukamoto, Y., Sato, Y. (2001) Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *J. Nutr.* **131**:1973-1977.
10. 本郷利憲, 廣重 力, 豊田順一, 小澤瀨司, 福田康一郎, 本間研一, 大森治紀, 大橋俊夫. (2005) 標準生理学 第6版 医学書院.
11. Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**:288-294.
12. Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., Ryba, N.J. (2009) Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell* **139**:234-244.
13. Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* **106**:381-390.
14. Nakajima, K., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Abe, K. (2006) Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport* **17**:1241-1244.
15. Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**:255-266.
16. Heck, G.L., Mierson, S., DeSimone, J.A. (1984) Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* **223**:403-405.
17. Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D.A., Hummler, E., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* **464**:297-301.
18. Oka, Y., Butnaru, M., von, Buchholtz L., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2013) High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* **494**:472-475.



19. Ugawa, S., Minami, Y., Guo, W., Saishin, Y., Takatsuji, K., Yamamoto, T., Tohyama, M., Shimada, S. (1998) Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature* **395**:555-556.
20. Stevens, D.R., Seifert, R., Bufe, B., Muller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U.B., Lindemann, B. (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* **413**:631-635.
21. Lin, W., Burks, C.A., Hansen, D.R., Kinnamon, S.C., Gilbertson, T.A. (2004) Taste receptor cells express pH-sensitive leak K<sup>+</sup> channels. *J. Neurophysiol.* **92**:2909-2919.
22. Richter, T.A., Dvoryanchikov, G.A., Roper, S.D., Chaudhari, N. (2004) Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J. Neurosci.* **24**:4088-4091.
23. Richter, T.A., Caicedo, A., Roper, S.D. (2003) Sour taste stimuli evoke Ca<sup>2+</sup> and pH responses in mouse taste cells. *J. Physiol.* **547**:475-483.
24. Chang, R.B., Waters, H., Liman, E.R. (2010) A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:22320-22325.
25. R.S.J., Keast (2003) The Effect of Zinc on Human Taste Perception *J. Food Sci.* **68**:1871-1877.
26. Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., Matsunami, H. (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:12569-12574.
27. Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* **442**:934-938.
28. Nomura, H., Turco, A.E., Pei, Y., Kalaydjieva, L., Schiavello, T., Weremowicz, S., Ji, W., Morton, C.C., Meisler, M., Reeders, S.T., Zhou, J. (1998) Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J. Biol. Chem.* **273**:25967-25973.
29. Li, A., Tian, X., Sung, S.W., Somlo, S. (2003) Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics* **81**:596-608.
30. LopezJimenez, N.D., Cavenagh, M.M., Sainz, E., Cruz-Ithier, M.A., Battey, J.F., Sullivan, S.L. (2006) Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J. Neurochem.* **98**:68-77.
31. Kataoka, S., Yang, R., Ishimaru, Y., Matsunami, H., Seigny, J., Kinnamon, J.C., Finger, T.E. (2008) The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem. Senses* **33**:243-254.
32. Ishimaru, Y., Katano, Y., Yamamoto, K., Akiba, M., Misaka, T., Roberts, R.W., Asakura, T., Matsunami, H., Abe, K. (2010) Interaction between PKD1L3 and PKD2L1 through their transmembrane domains is required for localization of PKD2L1 at taste pores in taste cells of circumvallate and foliate papillae. *FASEB. J.* **24**:4058-4067.
33. Yu, Y., Ulbrich, M.H., Li, M.H., Dobbins, S., Zhang, W.K., Tong, L., Isacoff, E.Y., Yang, J. (2012) Molecular mechanism of the assembly of an acid-sensing receptor ion channel complex. *Nat. Commun.* **3**:1252.
34. Inada, H., Kawabata, F., Ishimaru, Y., Fushiki, T., Matsunami, H., Tominaga, M. (2008) Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1. *EMBO Rep.* **9**:690-697.
35. Kawaguchi, H., Yamanaka, A., Uchida, K., Shibasaki, K., Sokabe, T., Maruyama, Y., Yanagawa, Y., Murakami, S., Tominaga, M. (2010) Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J. Biol. Chem.* **285**:17277-17281.
36. DeSimone, J.A., Callahan, E.M., Heck, G.L. (1995) Chorda tympani taste response of rat to hydrochloric acid subject to voltage-clamped lingual receptive field. *Am. J.*

*Physiol.* **268**:C1295-C1300.

37. Danilova, V., Danilov, Y., Roberts, T., Tinti, J.M., Nofre, C., Hellekant, G. (2002) Sense of taste in a new world monkey, the common marmoset: recordings from the chorda tympani and glossopharyngeal nerves. *J. Neurophysiol.* **88**:579-594.
38. Lin, W., Ogura, T., Kinnamon, S.C. (2002) Acid-activated cation currents in rat vallate taste receptor cells. *J. Neurophysiol.* **88**:133-141.
39. 生理学研究所 プレスリリース: レモンが唾液でジワっと「酸っぱい!」の不思議を解明—酸味と唾液の"舌" 奇妙な関係—. <http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2008/06/post-34.html>, 2008
40. Hodson, N.A., Linden, R.W. (2006) The effect of monosodium glutamate on parotid salivary flow in comparison to the response to representatives of the other four basic tastes. *Physiol. Behav.* **89**:711-717.
41. Lugaz, O., Pillias, A.M., Boireau-Ducept, N., Faurion, A. (2005) Time-intensity evaluation of acid taste in subjects with saliva high flow and low flow rates for acids of various chemical properties. *Chem. Senses* **30**:89-103.
42. Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., Matsunami, H., Ninomiya, Y. (2011) Sour Taste Responses in Mice Lacking PKD Channels. *PLoS. One* **6**:e20007.
43. 堀尾奈央. (2012) 酸味受容体候補分子の電気生理学的解析. 九州大学 学位論文. <https://qir.kyushu-u.ac.jp/dspace/bitstream/2324/21993/1/dent529.pdf>
44. Huque, T., Cowart, B.J., Dankulich-Nagrudny, L., Pribitkin, E.A., Bayley, D.L., Spielman, A.I., Feldman, R.S., Mackler, S.A., Brand, J.G. (2009) Sour ageusia in two individuals implicates ion channels of the ASIC and PKD families in human sour taste perception at the anterior tongue. *PLoS. One* **4**:e7347.
45. Harvey, R.B. (1920) The relation between the total acidity, the concentration of the hydrogen ion, and the taste of acid solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **42**:712-714.
46. Johanningsmeier, S.D., McFeeters, R.E., Drake, M.A. (2005) A hypothesis for the chemical basis for perception of sour taste *J. Food Sci.* **70**:R44-48.
47. 多田ひろみ, 小林昇, 岡本奨. (1972) 有機酸の化学構造と酸味閾値との関係について. *栄養と食糧* **25**:83-88
48. Koyama, N., Kurihara, K. (1972) Receptor site for sour stimuli. *Nature* **239**:459-460.
49. Ramos, Da Conceicao Neta E.R., Johanningsmeier, S.D., McFeeters, R.F. (2007) The chemistry and physiology of sour taste—a review. *J. Food Sci.* **72**:R33-R38.
50. Laska, M. (2000) Gustatory responsiveness to food-associated sugars and acids in pigtail macaques, *Macaca nemestrina*. *Physiol. Behav.* **70**:495-504.
51. Roper, S.D. (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers. Arch.* **454**:759-776.
52. Schifferstein, H.N., Frijters, J.E. (1991) The effectiveness of different sweeteners in suppressing citric acid sourness. *Percept. Psychophys.* **49**:1-9.
53. Okumura, T., Yamada, R., Nishimura, T. (2004) Sourness-suppressing peptides in cooked pork loins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**:1657-1662.
54. Sclafani, A., Perez, C. (1997) Cypha [propionic acid, 2-(4-methoxyphenol) salt] inhibits sweet taste in humans, but not in rats. *Physiol. Behav.* **61**:25-29.
55. Hill, A.V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves *J. Physiol. (Lond.)*. **40**:iv-vii..
56. Leo, A., Hansch, C., and, Elkins D. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* **71**:525-616.

57. Gardner, R.J. (1980) Lipid solubility and the sourness of acids: implications for models of the acid taste receptor. *Chem. Senses* **5**:185-194.
58. Hartwig, P., McDaniel, M.R. (1995) Flavor Characteristics of Lactic, Malic, Citric, and Acetic Acids at Various pH Levels *J. Food Sci.* **60**:384-388.
59. Makhoulouf, GM. BLUM. AL. (1972) Kinetics of the taste response to chemical stimulation: a theory of acid taste in man. *Gastroenterology*. **63**:67-75.
60. Greenberg, M.J. (1980) The importance of hydrophobic properties of organic compounds on their taste intensities: a quantitative structure-taste-intensity study *J. Agric. Food Chem.* **28**(3):562-566. .:
61. Arai, T., Ohkuri, T., Yasumatsu, K., Kaga, T., Ninomiya, Y. (2010) The role of transient receptor potential vanilloid-1 on neural responses to acids by the chorda tympani, glossopharyngeal and superior laryngeal nerves in mice. *Neuroscience* **165**:1476-1489.
62. Shimizu, T., Higuchi, T., Fujii, T., Nilius, B., Sakai, H. (2011) Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflugers. Arch.* **461**:507-513.
63. Murakami, M., Ohba, T., Xu, F., Shida, S., Satoh, E., Ono, K., Miyoshi, I., Watanabe, H., Ito, H., Iijima, T. (2005) Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J. Biol. Chem.* **280**:5626-5635.
64. Chen, X.Z., Li, Q., Wu, Y., Liang, G., Lara, C.J., Cantiello, H.F. (2008) Submembraneous microtubule cytoskeleton: interaction of TRPP2 with the cell cytoskeleton. *FEBS. J.* **275**:4675-4683.
65. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816-824.
66. Ramsey, I.S., Delling, M., Clapham, D.E. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* **68**:619-647.
67. Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., Patapoutian, A. (2005) Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* **307**:1468-1472.
68. Xu, H., Blair, N.T., Clapham, D.E. (2005) Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J. Neurosci.* **25**:8924-8937.
69. Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**:819-829.
70. McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., Julius, D. (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**:52-58.
71. Hu, H.Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C.K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L.Y., Wood, J.D., Zhu, M.X. (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol. Chem.* **279**:35741-35748.
72. Togashi, K., Inada, H., Tominaga, M. (2008) Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br. J. Pharmacol.* **153**:1324-1330.
73. Xu, S.Z., Zeng, F., Boulay, G., Grimm, C., Harteneck, C., Beech, D.J. (2005) Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br. J. Pharmacol.* **145**:405-414.
74. Macpherson, L.J., Hwang, S.W., Miyamoto, T., Dubin, A.E., Patapoutian, A., Story, G.M. (2006) More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol. Cell Neurosci.* **32**:335-343.

75. Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., Flores, C.M. (2008) TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* **28**:6231-6238.
76. Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., Patapoutian, A. (2002) A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* **108**:705-715.
77. Behrendt, H.J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H., Jostock, R. (2004) Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br. J. Pharmacol.* **141**:737-745.
78. Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D., Julius, D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**:260-265.
79. Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**:849-857.
80. Schachter, J.B., Sromek, S.M., Nicholas, R.A., Harden, T.K. (1997) HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y1 and P2Y2 receptors. *Neuropharmacology* **36**:1181-1187.
81. Yoshida, R., Miyauchi, A., Yasuo, T., Jyotaki, M., Murata, Y., Yasumatsu, K., Shigemura, N., Yanagawa, Y., Obata, K., Ueno, H., Margolskee, R.F., Ninomiya, Y. (2009) Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J. Physiol.* **587**:4425-4439.
82. DeFazio, R.A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J.W., Pereira, E., Roper, S.D., Chaudhari, N. (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J. Neurosci.* **26**:3971-3980.
83. Roberts, C.D., Dvoryanchikov, G., Roper, S.D., Chaudhari, N. (2009) Interaction between the second messengers cAMP and Ca<sup>2+</sup> in mouse presynaptic taste cells. *J. Physiol.* **587**:1657-1668.
84. Govindarajan, V.S., Sathyanarayana, M.N. (1991) Capsicum — production, technology, chemistry, and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism; structure, pungency, pain, and desensitization sequences *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**:6435-6474.
85. Walpole, C.S., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E.A., Dray, A., James, I.F., Masdin, K.J., Perkins, M.N., Winter, J. (1993) Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 3. The hydrophobic side-chain "C-region". *J. Med. Chem.* **36**:2381-2389.
86. Dedov, V.N., Tran, V.H., Duke, C.C., Connor, M., Christie, M.J., Mandadi, S., Roufogalis, B.D. (2002) Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *Br. J. Pharmacol.* **137**:793-798.
87. Jordt, S.E., Julius, D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**:421-430.
88. Liu, L., Lo, Y., Chen, I., Simon, S.A. (1997) The responses of rat trigeminal ganglion neurons to capsaicin and two nonpungent vanilloid receptor agonists, olvanil and glyceryl nonamide. *J. Neurosci.* **17**:4101-4111.
89. Lo, Y.K., Chiang, H.T., Wu, S.N. (2003) Effect of arvanil (N-arachidonoyl-vanillyl-amine), a nonpungent anandamide-capsaicin hybrid, on ion currents in NG108-15 neuronal cells. *Biochem. Pharmacol.* **65**:581-591.
90. Kozukue, N., Han, J.S., Kozukue, E., Lee, S.J., Kim, J.A., Lee, K.R., Levin, C.E., Friedman, M. (2005) Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **53**:9172-9181.

91. Lawless, H., Stevens, D.A. (1984) Effects of oral chemical irritation on taste. *Physiol. Behav.* **32**:995-998.
92. Karrer, T., Bartoshuk, L. (1995) Effects of capsaicin desensitization on taste in humans. *Physiol. Behav.* **57**:421-429.
93. Woods, S.C. (2004) Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **286**:G7-13.
94. Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., Shirazi-Beechey, S.P. (2007) T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:15075-15080.
95. MacLean, A.B. (2004) Acetowhite epithelium. *Gynecol. Oncol.* **95**:691-694.
96. Lambert, R., Rey, J.F., Sankaranarayanan, R. (2003) Magnification and chromoscopy with the acetic acid test. *Endoscopy* **35**:437-445.
97. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**:3440-3450.
98. Boyarsky, G., Ganz, M.B., Sterzel, R.B., Boron, W.F. (1988) pH regulation in single glomerular mesangial cells. I. Acid extrusion in absence and presence of HCO<sup>3-</sup>. *Am. J. Physiol.* **255**:C844-C856.
99. Tetko, I.V., Tanchuk, V.Y. (2002) Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **42**:1136-1145.
100. Gutknecht, J., Tosteson, D.C. (1973) Diffusion of weak acids across lipid bilayer membranes: effects of chemical reactions in the unstirred layers. *Science* **182**:1258-1261.
101. Evtodienko, V.Y., Kovbasnjuk, O.N., Antonenko, Y.N., Yaguzhinsky, L.S. (1996) Effect of the alkyl chain length of monocarboxylic acid on the permeation through bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1281**:245-251.
102. Larsson, D., Larsson, B., Lundgren, T., Sundell, K. (1999) The effect of pH and temperature on the dissociation constant for fura-2 and their effects on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in enterocytes from a poikilothermic animal, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Anal. Biochem.* **273**:60-65.
103. Roe, M.W., Lemasters, J.J., Herman, B. (1990) Assessment of Fura-2 for measurements of cytosolic free calcium. *Cell Calcium.* **11**:63-73.
104. Martinez-Zaguilan, R., Gurule, M.W., Lynch, R.M. (1996) Simultaneous measurement of intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> in insulin-secreting cells by spectral imaging microscopy. *Am. J. Physiol.* **270**:C1438-C1446.
105. Silver, W.L., Clapp, T.R., Stone, L.M., Kinnamon, S.C. (2006) TRPV1 receptors and nasal trigeminal chemesthesis. *Chem. Senses* **31**:807-812.
106. Huang, Y.A., Maruyama, Y., Stimac, R., Roper, S.D. (2008) Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J. Physiol.* **586**:2903-2912.
107. Wang, Y.Y., Chang, R.B., Allgood, S.D., Silver, W.L., Liman, E.R. (2011) A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids. *J. Gen. Physiol.* **137**:493-505.
108. 山口 静子. (1976) 味覚の数量化. 調理科学 **9**:80-85.
109. 鈴木 孝治, 石原 才子, 池田 睦, 荒木 敬夫, 丸山 健一, チッテリオ ダニエル, 萩原 将文. (2006) 味の測定方法並びにそのための味覚センサー及び味測定装置. 特許公開2006-329674.
110. Toko, K., Habara, M. (2005) Taste sensor. *Chem. Senses* **30. Suppl. 1**:i256-i257.

111. Toda, Y., Okada, S., Misaka, T. (2011) Establishment of a new cell-based assay to measure the activity of sweeteners in fluorescent food extracts. *J. Agric. Food Chem.* **59**:12131-12138.
112. Wellendorph, P., Johansen, L.D., Brauner, Osborne H. (2009) Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Mol. Pharmacol.* **76**:453-465.
113. Schmidt, J., Smith, N.J., Christiansen, E., Tikhonova, I.G., Grundmann, M., Hudson, B.D., Ward, R.J., Drewke, C., Milligan, G., Kostenis, E., Ulven, T. (2011) Selective orthosteric free fatty acid receptor 2 (FFA2) agonists: identification of the structural and chemical requirements for selective activation of FFA2 versus FFA3. *J. Biol. Chem.* **286**:10628-10640.
114. Gilbertson, T.A., Yu, T., Shah, B.P. (2010) Gustatory Mechanisms for Fat Detection. In Taste, Texture, and Post Ingestive Effects. CRC Press.
115. Ogiso, K., Shimizu, Y., Watanabe, K., Tonosaki, K. (2000) Possible involvement of undissociated acid molecules in the acid response of the chorda tympani nerve of the rat. *J. Neurophysiol.* **83**:2776-2779.
116. Finger, T.E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D.L., Vigers, A.J., Stone, L., Hellekant, G., Kinnamon, S.C. (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* **310**:1495-1499.
117. Finger, T.E., Silver, W.L., Restrepo, D. (2000) The Neurobiology of Taste and Smell, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
118. Carstens, E., Kuenzler, N., Handwerker, H.O. (1998) Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. *J. Neurophysiol.* **80**:465-492.
119. Simon, S.A., de Araujo I.E., Gutierrez, R., Nicolelis, M.A. (2006) The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**:890-901.
120. Schiffman, S.S., Erickson, R.P. (1971) A psychophysical model for gustatory quality. *Physiol. Behav.* **7**:617-633.
121. Sadekar, S., Ghandehari, H. (2012) Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: implications for oral drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **64**:571-588.
122. Dempster, W.T. (1960) Rates of penetration of fixing fluids. *Am. J. Anat.* **107**:59-72.

## 謝辞

本研究は、多くの方々のご協力、ご支援のもと実施することができました。紙面にて恐縮ですが、ここに謝意を述べさせていただきます。

研究方針策定における大局的視点での御指導のみならず、味覚研究における実験手技、論文執筆等の研究実務執行におきましても、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 三坂巧 准教授に心より感謝の意を表します。

高い学術的な御見識と、深い食品産業への御理解より、本研究の場を整えて頂き、また終始、研究の指針を与えて下さいました、東京大学 阿部啓子 名誉教授に心より感謝の意を表します。

食品研究の根幹に深く関わる、示唆に富んだご指導を多く賜りました、東京大学農学部元教授 現東京農業大学総合研究所客員教授 荒井綜一 先生に心より感謝の意を表します。

本研究の発端となった PKD1L3/PKD2L1 チャネル研究の先駆者であり、本研究における同チャネルの機能解析における御指導を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 石丸喜朗 特任助教に心より感謝いたします。原著論文執筆にあたり、洞察力に富むご指摘を、数多く賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科 岡田晋治 助教に心より感謝いたします。味細胞応答のカルシウムイメージングにおいてご協力頂きました、東京大学大学院農学生命科学研究科（現所属は高砂香料工業㈱） 黒川あずさ 博士に御礼申し上げます。

本研究に携わる機会を与えてくださり、また本研究遂行に際して深いご理解を頂きました株式会社ミツカングループ本社 代表取締役会長兼社長 中埜又左エ門和英氏、常務執行役員 山上圭吾氏、グローバル事業部 課長 加賀孝之氏、中央研究所 戦略室 室長 岸幹也 博士に、謝意を表します。

また、日頃の研究活動や研究報告会を通じ、様々な議論をさせて頂いた中島健一郎博士はじめ東京大学大学院農学生命科学研究科生物機能開発化学研究室の皆様には感謝いたします。また日清食品HD株式会社櫻井敬展 博士、長谷川香料株式会社 藤原聡氏、キッコーマン株式会社 戸田安香氏をはじめとする受託研究員、共同研究員の皆様には、同じ食品産業界の研究者として、大変良い刺激を与えて頂きました。心より御礼申し上げます。

平成 25 年 7 月

石井 翔