九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

マウスおよびヒトうま味受容体に関する行動学的および分子遺伝学的研究

城﨑, 慎也
Faculty of Dental Science, Kyushu University

https://doi.org/10.15017/14250

出版情報：九州大学, 2008, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

マウスおよびヒトうま味受容体に関する
行動学的および分子遺伝学的研究

城崎　慎也

九州大学大学院歯学府歯学専攻

口腔常態制御学講座口腔機能解析学分野

指導：二ノ宮　裕三　教授

九州大学大学院歯学研究院

口腔常態制御学講座口腔機能解析学分野

目次

発表論文……1

要旨……4

序論……6

第 1 章

マウスのうま味受容機構のグルタミン受容体アンタゴニストを用いた

行動学的解析

緒言……8

材料と方法……11

結果……15

考察……35

第 2 章

うま味感受性の多様性とヒト T1r1 と T1r3 の遺伝子多型性についての解析

緒言……39

材料と方法……41

結果……47

考察……59

謝辞……63

参考文献……64

発表論文

本研究の一部は下記の論文において発表する予定である。

Noriatsu Shigemura, Shinya Shirosaki, Keisuke Sanematsu, A.A. Shahidul Islam, Yoko Ogiwara, Misako Kawai, Ryusuke Yoshida and Yuzo Ninomiya

Genetic and molecular basis of individual differences in human umami taste perception

Proc Natl Acad Sci USA.（投稿中）

本研究の一部は下記の論文に報告した。

城崎慎也、川東由利子、中島清人、重村憲徳、安松啓子、吉田竜介、Robert F Margolskee、二ノ宮裕三

T1R3-KO マウスにおけるうま味物質に対する条件付け味覚嫌悪学習

日本味と匂学会誌 14(3) 379-382(2007)

城崎慎也、川東由利子、中島清人、重村憲徳、安松啓子、吉田竜介、Robert F Margolskee、二ノ宮裕三

mGluR アンタゴニスト混合うま味溶液に対する T1R3-KO マウスおよび C57BL/6 マウスの行動学的解析

日本味と匂学会誌 15(3) 293-296(2008)

中島清人、勝川秀夫、城崎慎也、重村憲徳、二ノ宮裕三

グルタミン酸受容体アンタゴニスト添加うま味物質で嫌悪条件づけしたマウス

の各種味物質に対する般化

日本味と匂学会誌 15(3) 653-656(2008)

また、本文の内容の一部は下記の学会において発表した。

日本味と匂学会第 41 回大会、東京、2007 年 7 月

第 49 回歯科基礎医学会学術大会、札幌、2007 年 8 月

日本味と匂学会第 42 回大会、富山、2008 年 9 月

その他の発表論文

Yamada A, Nakamura Y, Sugita D, Shirosaki S, Ohkuri T, Katsukawa H, Nonaka K, Imoto T, Ninomiya Y.

Induction of salivary kallikreins by the diet containing a sweet-suppressive peptide, gurmarin, in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* Jul 28;346(2):386-92 (2006)

Nakamura Y, Sanematsu K, Ohta R, Shirosaki S, Koyano K, Nonaka K, Shigemura N, Ninomiya Y.

Diurnal variation of human sweet taste recognition thresholds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes* Oct 57(10): 2661-5(2008)

中村由紀、太田理恵、山口登、城崎慎也、山下善久、古谷野潔、野中和明、重村憲徳、二ノ宮裕三

ヒト血漿レプチン濃度と甘味感受性との相関

日本味と匂学会誌 12(3): 247-250(2005)

重村憲徳、小島博文、A.A. シャヒダル イスラム、中村由紀、城崎慎也、

二ノ宮裕三

ヒト甘味感受性の多様性と遺伝子多型性についての解析

日本味と匂学会誌 12(3): 311-314(2005)

城崎慎也、重村憲徳、吉田竜介、安松啓子、Robert F. Margolskee、二ノ宮裕三

Trpm5-KO マウスのキニーネに対する行動応答の解析

日本味と匂学会誌 12(3): 373-376(2005)

城崎慎也、重村憲徳、吉田竜介、安松啓子、Robert F Margolskee、二ノ宮裕三

T1R3-KO マウスの甘味物質に対する行動応答の解析

日本味と匂学会誌 13(3): 347-350(2006)

要旨

うま味は、グルタミン酸 Na（mono sodium glutamate: MSG）などが受容体を刺激することにより起こる基本味のひとつである。受容体候補として、現在までに G-タンパク質結合型の T1r1/T1r3、mGluRs（taste-mGluR4、brain-mGluR4、taste-mGluR1、brain-mGluR1）などが提唱されているがその機能はまだ明確ではない。T1r3-KO マウスを用いた研究では、うま味応答は消失するという報告と、低下するが消失はしないという報告に分かれており、前者はうま味受容体が T1r1/T1r3 のみであると主張し、後者は複数のうま味受容体の存在を主張している。そこで、本研究では、まず、1）T1r3-KO マウスのうま味応答が残存するか、もし残存すればその応答が mGluRs に由来しているかどうかについて、条件付け味覚嫌悪学習による行動学的実験により調べた。さらに、2）ヒトにおける T1Rs の関与について、うま味感受性と T1rs の遺伝子多型性との連関と、アミノ酸変異体の機能解析について、ヒト腎性胚細胞を用いた *T1rs* 遺伝子導入味細胞再構築系を用い解析した。

その結果、1）T1r3-KO マウスもうま味物質に対する条件付け味覚嫌悪が獲得すること、また、うま味物質に mGluR1、mGluR4 のアンタゴニストを混合させると嫌悪応答（リック数の低下）が減弱することが明らかとなり、T1r1/T1r3 以外に mGluR1、mGluR4 がうま味受容体として機能している可能性が示唆された。2）ヒトの実験では、T1r1 では、39.2%のアレル頻度で起こるアミノ酸変異（*T1r1*-Thr372Ala）が、T1r3 では 9.0%の頻度のアミノ酸変異（*T1r3*-Arg757Cys）がヒトうま味感受性に影響する可能性が示唆された。またその機能解析の結果から、*T1r1*-372Thr 変異体は-372Ala より感受性の高いうま味受容体を形成すること、*T1r3*-757Cys 変異体は-757Arg より感受性の低い受容体を形成することが

明らかとなり、ヒト T1r1/T1r3 はうま味受容体として機能し、そのアミノ酸変異はうま味感受性に影響することが示唆された。

序論

味覚は、食物中の成分が、生体にとって必要な物質なのか、有害な物質なのかを区別し、食物選択の最終決定をおこなう感覚として重要な役割を果たしている。現在では、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の 5 種の基本味に分類されている。L-グルタミン酸 Na（MSG）は、肉、魚や野菜など多くの食品に含まれている（Ninomiya., 2002）。ヒトやある種の動物において、MSG は甘味、塩味、酸味および苦味とは異なる「うま味」と呼ばれる独特の味を呈する（Yamaguchi., 1967; Ninomiya and Funakoshi, 1989; Hellekant and Ninomiya, 1991）。MSG の呈するうま味は、イノシン酸 Na（IMP）やグアニル酸 Na（GMP）のような核酸関連物質と相乗効果を示すことを特徴とする（Ninomiya and Funakoshi, 1989; Yamaguchi., 1991）。

近年、分子生物学の進展に伴って、うま味の受容体候補が同定されている。最初に発見されたのは、脳に発現する IV 型代謝型グルタミン酸受容体（brain-mGluR4）のバリアント・taste-mGluR4 である。このバリアントは、舌後方にあって舌咽神経支配下の有郭乳頭（ラット）で発現が認められ、通常の mGluR4 に比べ、基質との結合領域とされる N 末端領域が短い。そのため、グルタミン酸との親和性は低下していると考えられている（Chaudhari *et al.*, 1996, 2000）。その後、免疫組織化学染色を用いて、brain-mGluR4 が味蕾先端部（味孔部）に発現していること（Toyono *et al.*, 2002）、舌後方の有郭乳頭において brain-mGluR1 が発現していること（Toyono *et al.*, 2003）、さらに有郭乳頭で N 末端短鎖の taste-mGluR1 も発現していることが明らかにされてきた（San Gabriel *et al.*, 2005）。その他のうま味受容体の候補としては、T1r1/T1r3 のヘテロ二量体があげられている（Nelson *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002）。ヒト胎児由来腎臓細胞

（HEK293 細胞）の強制発現系を用いた実験では、マウス型 T1r1/T1r3 はさまざまなアミノ酸に応答するが、ヒト型ではグルタミン酸に特異的に応答し、その応答は IMP によって増強されることが分かった（Nelson *et al*., 2002; Li *et al*., 2002）。このようなグルタミン酸に対する味覚受容体の配列決定ならびに機能解析により、ヒトのうま味受容・認識におけるメカニズムが分子レベルで初めて示された。しかし、T1r3 を欠損したマウスを用いた実験結果は矛盾を抱えており、意見が分かれている。すなわち、あるグループの研究では T1r3-KO マウスの MSG に対する嗜好性と舌前方を支配する鼓索神経応答が完全に消失したことから（Zhao *et al*., 2003）、T1r1/T1r3 のみが MSG の受容・認識に関わっていると結論づけている。しかし、当研究室が共同でおこなった研究では MSG に対する嗜好性は減少するものの完全には消失しなかった（Damak *et al*., 2003）。さらに神経応答解析では、鼓索神経応答における MSG と IMP 間の相乗効果は消失したが、MSG そのものに対する応答は鼓索神経、舌咽神経のいずれにおいても大きな減少は見られなかった。さらに、当研究室の味細胞におけるルーズパッチ法を用いた解析では、MSG に最もよく応答する細胞（M-type）のうま味応答が mGluR1 および mGluR4 のアンタゴニストにより抑制された（Yasuo *et al*., 2008）。これらの結果は複数のうま味受容体の存在を示唆している。そこで、本研究では、T1r1/T1r3 および mGluRs を含んだ複数の受容体がうま味受容体として機能しているかどうかを調べるため、第 1 章では、T1r3-KO マウスおよびその野生型 C57BL/6J マウスを用いうま味物質に対する行動応答を、第 2 章では、ヒトうま味感受性とうま味受容体遺伝子多型性との関係を調べた。

第 1 章

マウスのうま味受容機構のグルタミン受容体アンタゴニストを用いた行動学的解析

緒言

序論にあるように、うま味受容に複数の受容体が関与するのかどうかについて議論が分かれているのは、T1r3-KO マウスを用いた二つの研究結果の差に由来する（Zhao *et al*., 2003; Damak *et al*., 2003）。また、これらの報告におけるうま味に対する感受性とそれに関連する嗜好性に関わる情報の舌部位差も大きく関与している。たとえば、T1r3-KO マウスのうま味物質に対する嗜好性と鼓索神経応答は、MSG と IMP の相乗効果を含め、大きく抑制される。このことは、舌前方で形成されるうま味嗜好性と相乗効果に T1r1/T1r3 が主要な役割を果たしていることを示している。これらの知見は、マウスの舌前方にある茸状乳頭の味細胞で T1r1 が T1r3 と共発現していることや（Kim *et al*., 2003）、強制発現系を用いた応答解析で T1r1/T1r3 はグルタミン酸をはじめとするさまざまなアミノ酸応答で IMP もしくは GMP と相乗効果を示す（Nelson *et al*., 2002）こととも一致している。これらの点においては、両報告に著しい矛盾は見られない。しかし、両報告における最も明確な差異は、一方は鼓索神経の解析のみを行い上記の結果を得ているが、当研究室が共同実験を行ったもう一方の報告（Damak et *al*., 2003）では、T1r3 欠損で舌咽神経のうま味応答がほとんど影響を受けなかった点にある。すなわち、後者の報告では、舌前部のうま味応答は相乗効果のみが消失し、うま味応答そのものは残存する。さらに、舌後部のうま味応答は全く影響を受けない。また、さらに最近の電気生理学的研究でもうま味応答は T1r3-KO で抑制されないことが示されている（Yasumatsu *et al*., 2006; Maruyama *et*

al., 2006）。たとえば、Maruyama らはマウス有郭乳頭の味細胞におけるうま味応答を Ca^{2+}イメージングで調べたところ、野生型に比べて応答強度は小さいものの、T1r3-KO マウスでもうま味物質に対する Ca^{2+}応答は観察されたと報告している（Maruyama *et al*., 2006）。さらに、我々の研究室では、マウス鼓索神経においてうま味物質に応答する単一神経線維は、ショ糖に最も感受性が高い S-type とうま味物質に最も感受性が高い M-type とに分類できることを明らかにした。S-type は MSG もしくは MPG 応答に対して IMP が大きな相乗効果を示す。T1r3-KO マウスでは、S-type の応答特性を示す神経線維は見られなくなるが、M-type は存在した（Yasumatsu *et al*., 2006）。以上の結果は、T1r3-KO マウスは MSG で誘発される舌前方からの情報を欠損させていることを示唆しており、この情報はうま味非特異的で甘味物質で誘発される味覚情報に似ているものと考えられる。MSG によって誘発される舌前方からの情報は、マウスの MSG 嗜好性に重要な役割を果たしているのかもしれない。

うま味受容体の下流で機能すると考えられる G タンパク質・ガストデューシン（$G\alpha_{gust}$）やトランスデューシン（$G\alpha_t$）（He *et al*., 2004）、III 型 IP_3 受容体（IP_3R_3; Hisatsune *et al*., 2007）もしくは TRP チャネル（TRPM5; Talavera *et al*., 2005; Damak *et al*., 2006）を欠損させたマウスにおいても、うま味物質に対する行動応答および神経応答がほとんど抑制されないことが報告されている。これらの KO マウスは、T1r3-KO マウスと同様に、鼓索神経のうま味応答は抑制され、相乗効果は消失するが、舌咽神経のうま味応答は変化しない。C57BL ではなく 129/BALB を遺伝的背景に持つ $G\alpha_{gust}$-KO マウスでも同様の傾向がすでに報告されている（He *et al*., 2004）。これらの結果は、T1R3、$G\alpha_{gust}$、IP_3R_3 および TRPM5 は舌前方におけるうま味物質の受容に関わる分子であり、これらとは別のうま味情報伝達経路が舌前方・後方の両方に存在することを支持するものである。

以上のことから T1r1/T1r3 以外のうま味受容体が存在し、うま味受容を担っている可能性を考えるとその候補として mGluRs もしくは mGluR/T1r1 ヘテロマーがあげられる。そこで本研究では T1r3-KO マウスおよびその野生型 C57BL/6J マウスを用い、味覚嫌悪学習を利用し（Ninomiya *et al*., 1989）、うま味物質に対する mGluR アンタゴニスト混合の影響を解析した。

材料と方法

動物

実験動物には野生型 C57BL/6J ［B6、8-22 週齢、体重 20-32g、34 個体］（Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME）、T1r3-KO マウス［T1r3-KO、8-22 週齢、体重 23-34g、29 個体］（マルゴルスキー研より贈与された親系統を繁殖維持）を用いた。用いたすべての実験動物とそれらを用いた実験方法は、九州大学 （福岡、日本） の実験動物取り扱い委員会九州大学大学院歯学研究院、大学院歯学府、歯学部および歯学府付属病院動物委員会の許可のもとで、動物実験に関する指針に基づき遂行した。

実験器具

実験器具には、特別に作成したプラスチック製のテストゲージ ［240（D）×170（W）×120（H）mm］を用いた。箱の側壁には、長径 5mm の円形の窓があり、一本のドリンキングチューブ（プラスチック製）がセットできるようになっており、チューブ先端付近に光センサのファイバーの発光側と受光側が向き合うようにセットされている。この光軸を遮る行動、例えばチューブ中の溶液を摂取しようとマウスの舌がチューブの先端に触れるとリック記録システム（ユタカ電子製作所、岐阜、日本）がカウントしてレコーダに記録される。

条件刺激および試験溶液

条件刺激溶液として、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド（和光、大阪、日本）を蒸留水に溶かして用いた。試験溶液には、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド、mGluR1 を含むグループⅠ型 mGluR のアンタゴニストである 0.03-1.0 mM（*RS*）

-1-aminoindan-1、5-dicarboxylic acid （AIDA）（Tocris Cookson、Ballwin、MO）（Moroni *et al*., 1997）、mGluR4 を含むグループⅢ型 mGluR のアンタゴニストである 0.03-1.0 mM（*RS*）-a-cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine（CPPG）（Tocris Cookson、Ballwin、 MO）（Toms *et al*., 1996）、0.03-1.0 mM AIDA＋0.03-1.0 mM CPPG および 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドとそれぞれ 0.03-1.0 mM AIDA、0.03-1.0 mM CPPG、0.03-1.0 mM AIDA＋0.03-1.0mM CPPG を混合し、蒸留水に溶かして用いた。また、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドとそれぞれ 0.03-1.0 mM AIDA、0.03-1.0 mM CPPG および 0.03-1.0 mM AIDA＋0.03-1.0 mM CPPG を混合し、蒸留水に溶かして用いた。AIDA、CPPG は 1 N-NaOH で pH 6-7 に調整した。

条件付け味覚嫌悪学習を用いた検索

短時間（10 秒間）リックテストをおこなった。C57BL/6J および T1r3-KO マウスに対して、条件付け味覚嫌悪学習（conditioned taste aversion：CTA）を用いた検索をおこなった（Ninomiya *et al*., 1989）。

各系統のマウスは、固形飼料ゲージ内で自由に摂取できる環境下で飼育したが、実験開始 1 日前から開始後 5 日目まで 23 時間絶水条件下においた。すべてのトレーニングとテストは一日における明／暗周期のうち明期に行った。実験初日はテストゲージ内でリック記録システム（ユタカ電子製作所、岐阜、日本）を介して自由に蒸留水を飲むトレーニングを 1 時間行った。2-5 日目まではトレーニング時間を 1 時間から 30 分減らし、10 秒間蒸留水を与えた後、20 秒間間隔をあけるスケジュールを 30-50 回行った。10 秒間の飲水リック数が安定した個体を実験に用いた。6 日目に C57BL/6J マウスと T1r3-KO マウスの各グループに新奇なうま味物質である 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド（条件刺激：CS）を

摂取させた。うま味溶液に 30 μM アミロライドを混合した理由は、MSG はうま味成分以外に Na イオンの味を含むので、Na 応答を抑制させるためである（Heck *et al*., 1984; Hellekant *et al*., 1988; Hellekant and Ninomiya, 1991; Hettinger and Frank, 1990; Herness., 1987; Ninomiya *et al*., 1984a, 1989; Spector *et al*., 1996; Yasumatsu *et al*., 2003）。その後、すぐに 0.24 M 塩化リチウム（LiCl）を 230 mg/kg 腹腔内投与（無条件刺激：US）し、味覚嫌悪条件付け（CTA）を行った。7 日目は回復期間としたが、30 分間の水飲みトレーニングはおこなった。8-10 日目は、テスト期間とし、蒸留水と 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドを交互に 5 回繰り返して、リック数が 10 以下になったマウスに試験溶液をあたえた。データは 3 日間計測した平均値を用いた。

データ解析

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J および T1r3-KO マウスの行動応答の解析は、3 日間計測した試験溶液に対する平均リック数±SE を用いた。各 mGluR アンタゴニストのリック数と各濃度間のリック数、0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対するリック数の AIDA＋CPPG 混合による影響と AIDA 混合および CPPG 混合による影響、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドのリック数と各 mGluR アンタゴニト混合による影響、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対するリック数の AIDA＋CPPG 混合による影響と AIDA 混合および CPPG 混合による影響の有意差検定には two-factor factional ANOVA を用いた。ANOVA の交互作用項に有意差が得られたとき、*post hoc* として Tukey-Kramer 法を用いた。また、0.1 M MSG＋30 μM アミロライドのリック数と各 mGluR アンタゴニスト混合による影響の有意差検定には、one-way ANOVA に続き、Student’t-test を用いた。有意差水準には $p < 0.05$

を採用した（Stat View、Abacus Concept、Berkeley、CA）。

結果

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスについて各 mGluR アンタゴニスト（AIDA、CPPG、AIDA＋CPPG）に対するリック数およびうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 1）。two-factor factional ANOVA で各 mGluR アンタゴニスト（AIDA、CPPG、AIDA＋CPPG）と各濃度（0.03-1.0 mM）の平均リック数を比較した結果、有意差は認められなかった [F(2、4) = 2.64、$p > 0.05$]（図 1A）。one-way ANOVA で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA 混合後のリック数を比較した。0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA において有意差がみられた [F(4、65) = 11.8、 $p < 0.001$]（図 1B）。さらに Student’t-test で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA の平均リック数を比較した結果、有意な上昇がみとめられた （0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1-0.3 mM AIDA vs CS、 $p < 0.01$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA vs CS、 $p < 0.001$、Student’t-test）（図 1B）。one-way ANOVA で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと CPPG 混合後のリック数を比較した。0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG において有意差がみられた [F(4、65)] = 11.8、$p < 0.0001$]（図 1C）。さらに Student’t-test で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG の平均リック数を比較した結果、有意な上昇がみとめられた （0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG vs CS、$p < 0.05$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.3-1.0 mM CPPG vs CS、$p < 0.001$、

Student’t-test）（図 1C）。one-way ANOVA で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA＋CPPG 混合後のリック数を比較した。0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG において有意差がみられた [F(4、25)] = 15.2、$p < 0.0001$]（図 1D）。さらに Student’t-test で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG の平均リック数を比較した結果、有意な上昇がみとめられた （0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs CS、$p < 0.05$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.3-1.0 mM AIDA＋0.3-1.0 mM CPPG vs CS、$p < 0.001$、Student’t-test）（図 1D）。

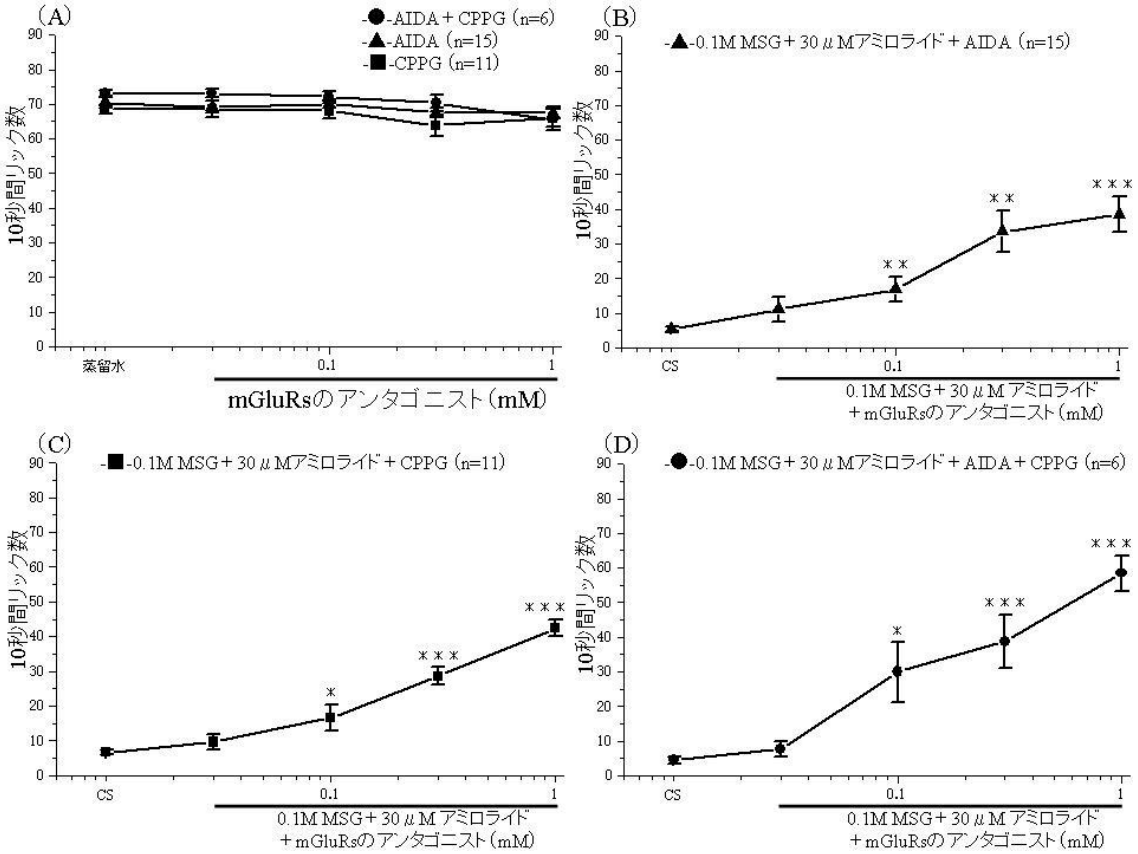

図 1　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスの各 mGluR アンタゴニストおよびうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.各 mGluR アンタゴニストに対するリック数を表す。データは±SE で示した（n = 6-15）。

B.うま味物質と AIDA との混合溶液に対するリック数。データは±SE で示した（n = 15）。（＊＊$p < 0.01$、＊＊＊$p < 0.001$ vs CS、one-way ANOVA、Student’t-test）

C.うま味物質と CPPG との混合溶液に対するリック数。データは±SE で示した（n = 11）。（＊$p < 0.05$、＊＊＊$p < 0.001$ vs CS、one-way ANOVA、Student’t-test）

D.うま味物質と AIDA＋CPPG との混合溶液に対するリック数。データは±SE で示した（n = 6）。（＊$p < 0.05$、＊＊＊$p < 0.001$ vs CS、one-way ANOVA、Student’t-test）

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスについて各 mGluR アンタゴニスト（AIDA、CPPG、AIDA＋CPPG）に対するリック数およびうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 2）。two-factor factional ANOVA で各 mGluR アンタゴニスト（AIDA、CPPG、AIDA＋CPPG）と各濃度（0.03-1.0 mM）の平均リック数を比較した結果、有意差は認められなかった [F(2、4) = 2.93、$p > 0.05$]（図 2A）。one-way ANOVA で 0.1M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA 混合後のリック数を比較した。0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA において有意差がみられた [F(4、30)] = 63.9、$p < 0.0001$]（図 2B）。さらに Student’t-test で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA の平均リック数を比較した結果、有意な上昇がみとめられた（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1-1.0 mM AIDA vs CS、$p < 0.001$、Student’t-test）（図 2B）。one-way ANOVA で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと CPPG 混合後のリック数を比較した。0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG において有意差がみられた [F(4、25) = 14.6、$p < 0.0001$]（図 2C）。さらに Student’t-test で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG の平均リック数を比較した結果、有意な上昇がみとめられた （0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG vs CS、$p < 0.01$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.3-1.0 mM CPPG vs CS、$p < 0.001$、Student’t-test）（図 2C）。one-way ANOVA で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA＋CPPG 混合後のリック数を比較した。0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG において有意

差がみられた [F(4、33)] = 18.9、$p < 0.0001$]（図 2D）。さらに Student’t-test で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG の平均リック数を比較した結果、有意な上昇がみとめられた（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG vs CS、$p < 0.05$、0.1M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1-1.0 mM AIDA＋0.1-1.0 mM CPPG vs CS、$p < 0.001$、Student’t-test）（図 2D）。

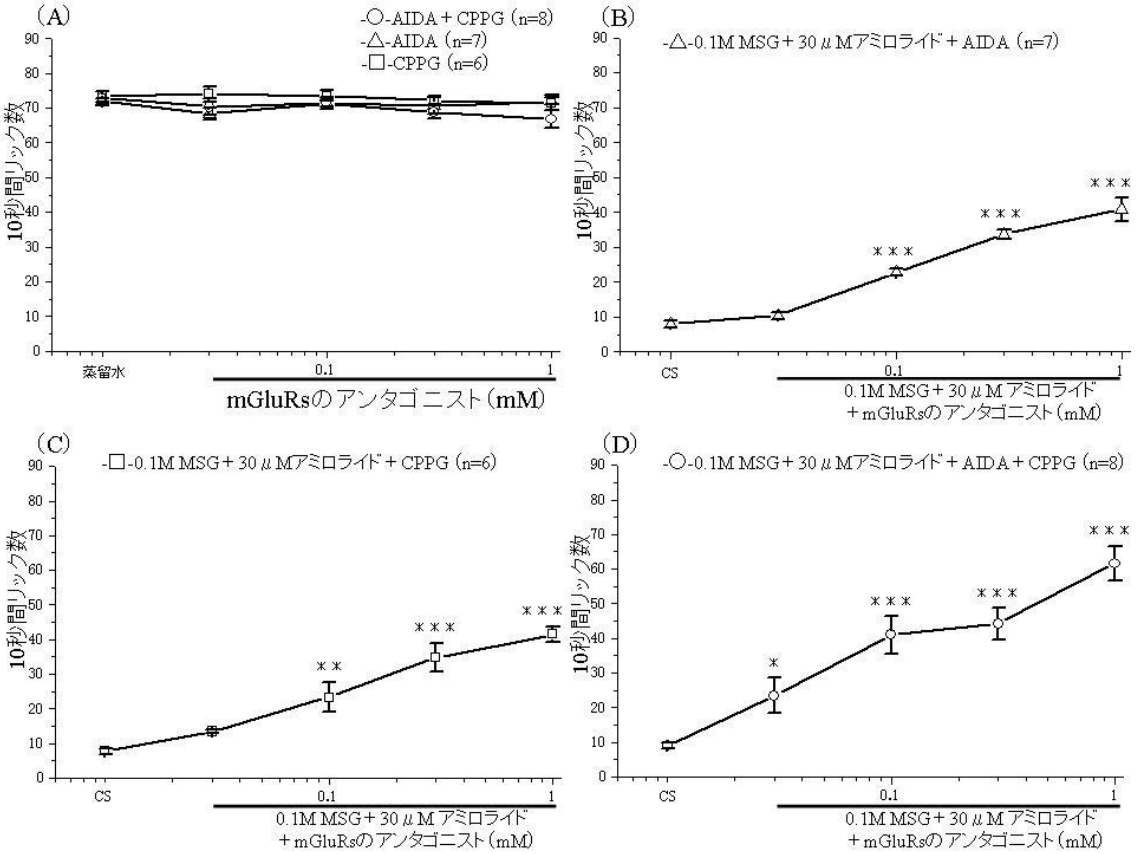

図 2　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスの各 mGluR アンタゴニストおよびうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.各 mGluR アンタゴニストに対するリック数を表す。データは±SE で示した（n = 6-8）。

B.うま味物質と AIDA との混合溶液に対するリック数。データは±SE で示した（n = 7）。（＊＊＊$p < 0.001$ vs CS、one-way ANOVA、Student’t-test）

C.うま味物質と CPPG との混合溶液に対するリック数。データは±SE で示した（n = 6）。（＊＊$p < 0.01$　＊＊＊$p < 0.001$ vs CS、one-way ANOVA、Student’t-test）

D.うま味物質と AIDA＋CPPG との混合溶液に対するリック数。データは±SE で示した（n = 8）。（＊$p < 0.05$、＊＊＊$p < 0.001$ vs CS、one-way ANOVA、Student’t-test）

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスおよび T1r3-KO マウスについてうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 3）。

C57BL/6J マウスにおいては、うま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）と各濃度（0.03-1.0 mM）の平均リック数を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた ［F（2、4）= 3.1、$p < 0.05$］（図 3A）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG とそれぞれ 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA および 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG の平均リック数を比較した結果、有意差がみとめられた（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA＋1.0 mM CPPG vs 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA、$p < 0.05$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA＋1.0 mM CPPG vs 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM CPPG、$p < 0.05$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 3A）。

次に T1r3-KO マウスについて検索した。うま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.1 M MSG＋30μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）と各濃度（0.03-1.0 mM）の平均リック数を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた ［F（2、4）= 16.8、$p < 0.001$］（図 3Ｂ）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG とそれぞれ 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA および 0.1 M MSG＋30 μM アミロラ

イド＋CPPGの平均リック数を比較した結果、有意差がみとめられた（0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1-0.3 mM AIDA＋0.1-0.3 mM CPPG vs 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1-0.3 mM AIDA、$p < 0.05$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA＋1.0 mM CPPG vs 0.1 M MSG ＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA、$p < 0.01$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM AIDA＋1.0 mM CPPG vs 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋1.0 mM CPPG、$p < 0.05$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 3B）。

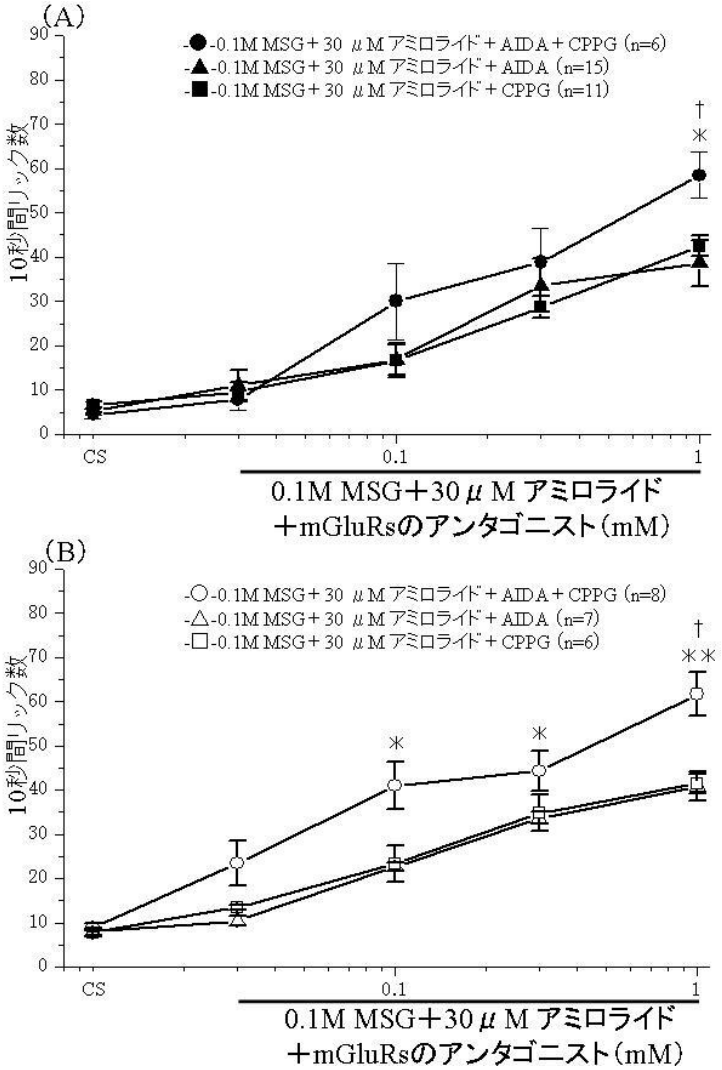

図 3　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスおよび T1r3-KO マウスのうま味物質と各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.C57BL/6J マウスにおける、うま味物質に対するリック数の各 mGluR アンタゴニスト混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-15）。（AIDA＋CPPG vs AIDA、$^{*}p < 0.05$、AIDA＋CPPG vs CPPG、$^{\dagger}p < 0.05$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*）

B. T1r3-KO マウスにおける、うま味物質に対するリック数の各 mGluR アンタゴニスト混合のよる影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-8）。（AIDA＋CPPG vs AIDA、$^{*}p < 0.05$、$^{**}p < 0.01$、 AIDA＋CPPG vs CPPG、$^{\dagger}p < 0.05$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*）

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスにおいて、うま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 4）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA 混合による平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差はみとめられなかった [F(2、5) = 3.1、$p > 0.05$]（図 4A）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと CPPG 混合による平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差はみとめられなかった [F(2、5)] = 1.9、$p > 0.05$]（図 4B）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA＋CPPG 混合による平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差はみとめられなかった [F（2、5）] = 2.0、$p > 0.05$]（図 4C）。

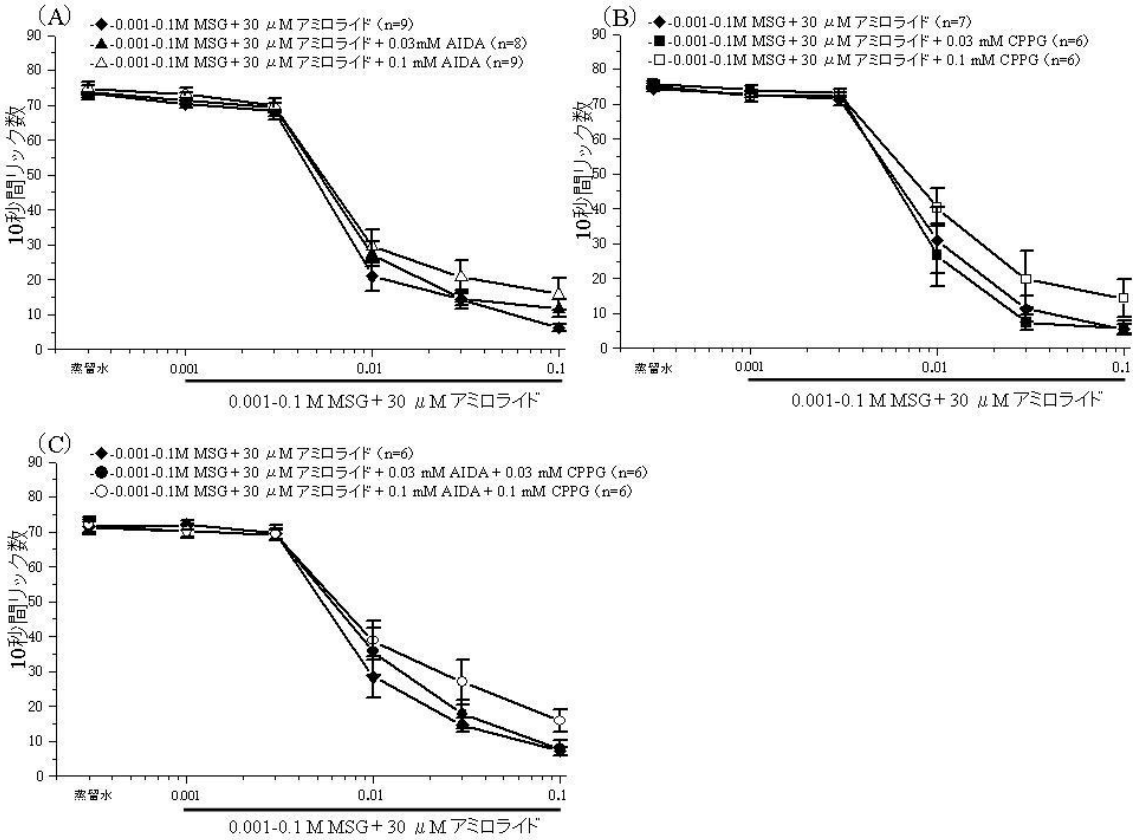

図 4　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスのうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.うま味物質に対するリック数の AIDA 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 8-9）。

B.うま味物質に対するリック数の CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-9）。

C.うま味物質に対するリック数の AIDA＋CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6）。

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスついて、うま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 5）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA 混合による平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた [F(2、5) = 14.4、$p < 0.01$]（図 5A）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA の平均リック数を比較した結果、有意差がみとめられた（0.01 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.01 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、$p < 0.01$、0.03 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、$p < 0.01$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 5A）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと CPPG 混合による平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた [F(2、5)] = 13.4、$P < 0.01$]（図 5B）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.001-0.1M MSG＋30 μM アミロライドと 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋CPPG の平均リック数を比較した結果、有意差が認められた（0.01 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.01 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG、$p < 0.01$、0.03 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG、$p < 0.01$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 5B）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと AIDA＋CPPG 混合による平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた [F（2、5）= 71.9、$p < 0.01$]（図 5C）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライドと 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋AIDA＋CPPG の平均リック数を

比較した結果、有意差がみとめられた （0.01 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.01 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG、$p < 0.01$、0.03 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG、$p < 0.01$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 5C）。

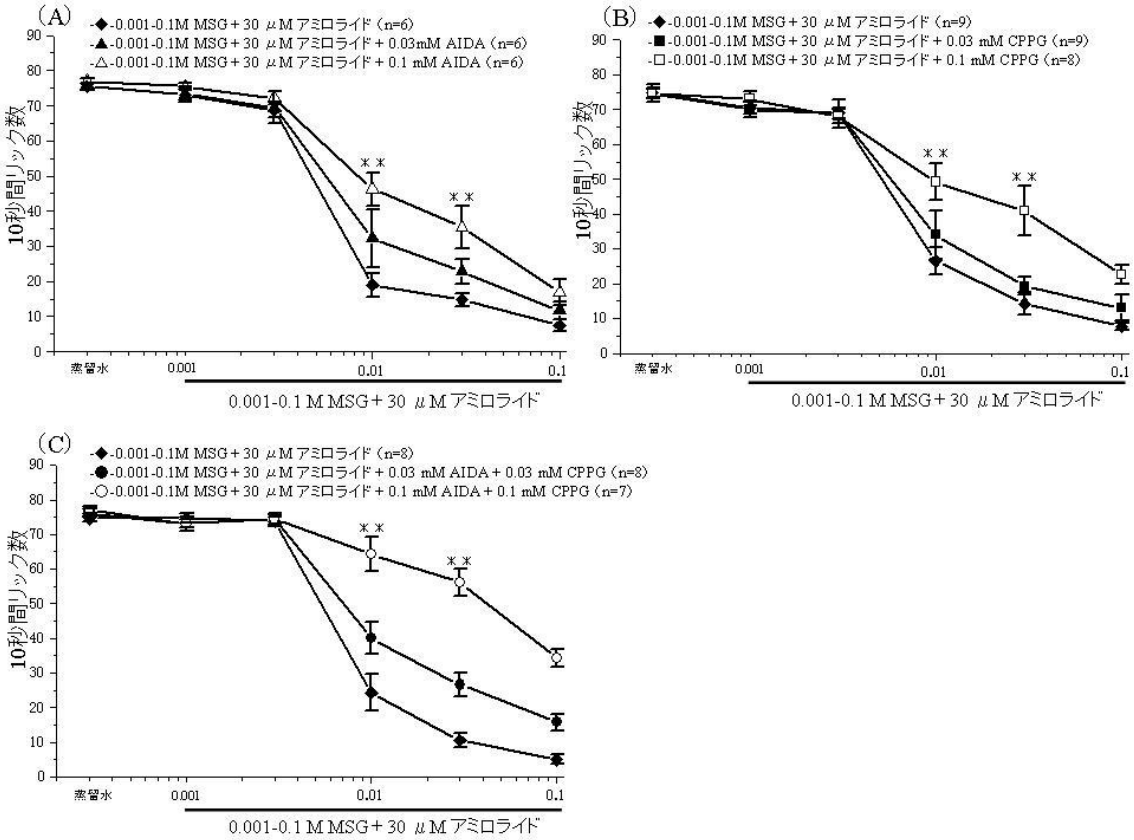

図 5　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスのうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.うま味物質に対するリック数の AIDA 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6）。（0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、＊＊$p < 0.01$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*）

B.うま味物質に対するリック数の CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 8-9）。（0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG、＊＊$p < 0.01$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*）

C.うま味物質に対するリック数の AIDA＋CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 7-8）。（0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド vs 0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG、＊＊$p < 0.01$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*）

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスついて、うま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03-0.1 mM AIDA、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03-0.1 mM CPPG、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03-0.1 mM AIDA＋0.03-0.1 mM CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 6）。C57BL/6J マウスについて 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG と 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA および 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM CPPG の平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差はみとめられなかった [F（3、5）= 1.6、$p > 0.05$]（図 6A）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG と 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA および 0.001-0.1M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG の平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差はみとめられなかった [F（3、5）= 1.4、$p > 0.05$]（図 6B）。

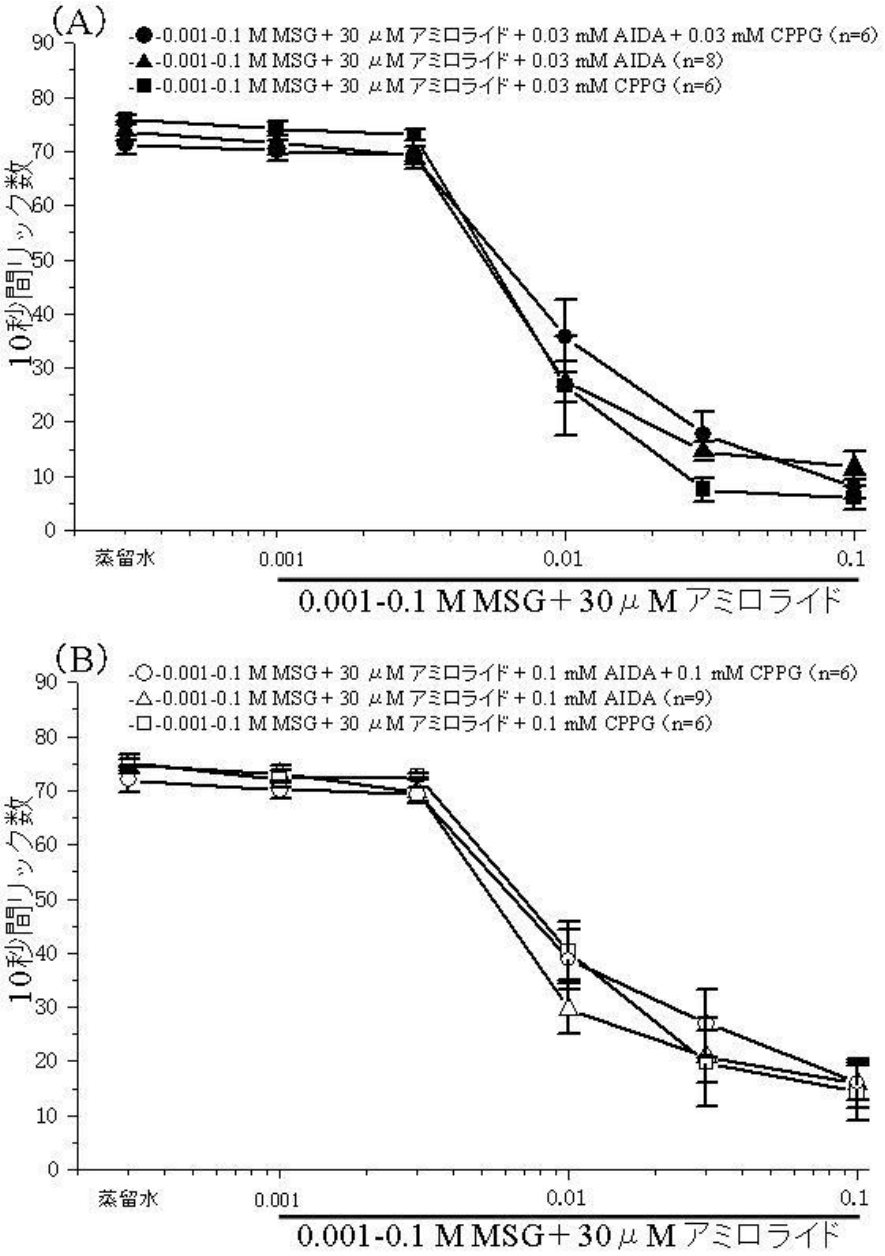

図 6　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した C57BL/6J マウスのうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.うま味物質に対するリック数の 0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG、0.03mM AIDA および 0.03 mM CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-8）。
B.うま味物質に対するリック数の 0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG、0.1 mM AIDA および 0.1 mM CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-9）

0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスついて、うま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合（0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03-0.1 mM AIDA、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03-0.1 mM CPPG、0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03-0.1 mM AIDA＋0.03-0.1 mM CPPG）によるリック数の影響を検索した（図 7）。T1R3-KO マウスについて 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG と 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA および 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM CPPG の平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた [F(3、5) = 26.0、$p < 0.01$]（図 7A）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG と 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA および 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM CPPG の平均リック数を比較した結果、有意差がみとめられた（0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG vs 0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA、$p < 0.01$、0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG vs 0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM CPPG,、$p < 0.01$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 7A）。0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG と 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA および 0.001-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG の平均リック数の影響を two-factor factional ANOVA で比較した結果、有意差がみとめられた [F(3、5) = 21.7、$p < 0.01$]（図 7B）。さらに Tukey-Kramer 法で 0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG と 0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA および 0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロラ

イド＋0.1 mM CPPG の平均リック数を比較した結果、有意差が認められた（0.01 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs 0.01 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、$p < 0.01$、0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs 0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、$p < 0.05$、0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、$p < 0.01$、0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs 0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG、$p < 0.01$、Tukey-Kramer *post hoc test*）（図 7B）

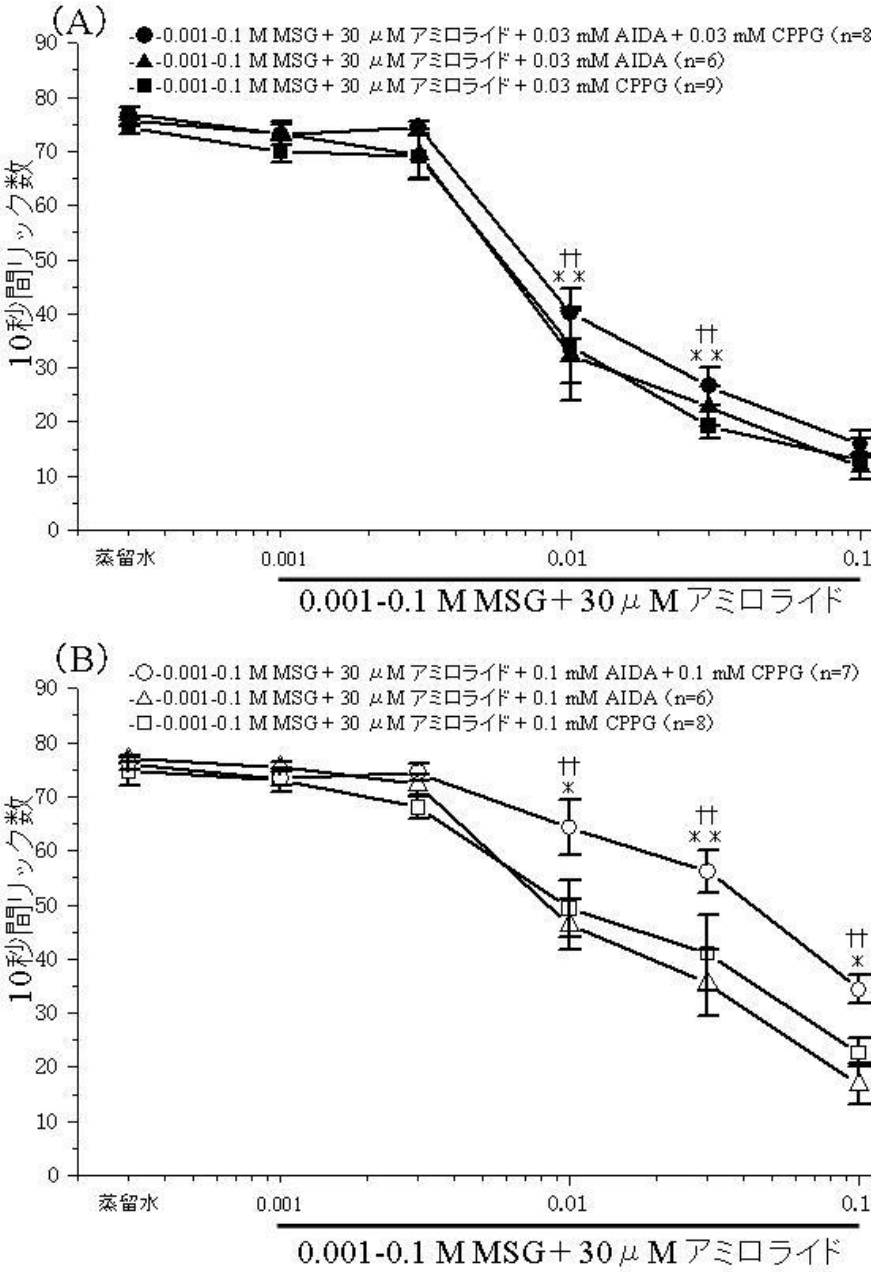

図 7　0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに対する味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスのうま味物質に対する各 mGluR アンタゴニスト混合による味覚濃度応答曲線

A.うま味物質に対するリック数の 0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG、0.03mM AIDA および 0.03 mM CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-9）。(0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG vs 0.01- 0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA、＊＊$p < 0.01$、0.01-0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM AIDA＋0.03 mM CPPG vs 0.01- 0.03 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.03 mM CPPG、††$p < 0.01$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*)

B.うま味物質に対するリック数の 0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG、0.1 mM AIDA および 0.1 mM CPPG 混合による影響を表す。データは±SE で示した（n = 6-8）。（0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs 0.01- 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA、$^{*}p < 0.05$、$^{**}p < 0.01$、0.01-0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM AIDA＋0.1 mM CPPG vs 0.01- 0.1 M MSG＋30 μM アミロライド＋0.1 mM CPPG、$^{\dagger\dagger}p < 0.01$、two-factor factional ANOVA、Tukey-Kramer *post hoc test*）

考察

本研究では、T1r1/T1r3 以外に、mGluR を含む複数のうま味受容体が機能しているかどうかを調べるため味覚嫌悪学習を利用し、うま味物質に対するリック応答の mGluR アンタゴニスト混合による影響について検討した。

MSG はうま味成分以外に Na イオンの味を含むので、本実験では Na 応答の抑制剤であるアミロライドをくわえた 0.1 M MSG＋30 μM アミロライドを条件刺激として味覚嫌悪条件付けをおこなった（Heck *et al*., 1984; Hellekant *et al*., 1988; Hellekant and Ninomiya, 1991; Hettinger and Frank, 1990; Herness., 1987; Ninomiya *et al*., 1984a, 1989; Spector *et al*., 1996; Yasumatsu *et al*., 2003）。その結果、T1r3-KO マウスと野生型 C57BL/6J マウスは、ともにうま味物質に対する味覚嫌悪条件付けを獲得した。過去の C57BL/6 系統のサブライン（C57BL/6N と C57BL/6CrSlc）における味覚嫌悪条件つけによる汎化パターンの解析から（Nakashima *et al*., 2001; Ninomiya *et al*., 1991; 2000）、アミロライドを加えない MSG 単独溶液に対する嫌悪条件付けが、0.1-0.3 M の高濃度の場合 0.1 M NaCl に汎化することが示唆されている。したがって、本実験においては、この効果はアミロライドにより消去されており、MSG に対する嫌悪条件付けはうま味物質に対して起こっていることが推定される。したがって、T1r3 を欠損するマウスでうま味に対する嫌悪条件付けが獲得された事実は、T1r1/T1r3 以外の他のうま味受容体が機能している可能性を示唆する。そこで、つぎに、他のうま味受容体候補として過去に報告のあった mGluR1 と mGluR4 に着目し、それらが関与しているかどうか検討した。味覚嫌悪条件付けを獲得した T1r3-KO マウスと野生型 C57BL/6J マウスに AIDA（mGluR1 を含むグループ I 型アンタゴニスト）、CPPG（mGluR4 を含むグループⅢ型アンタゴニスト）をそれぞれ与え、その影響を検索した。T1r3-KO

マウスと野生型 C57BL/6J マウスはいずれも 0.03-1.0 mM AIDA および 0.03-1.0 mM CPPG に対し蒸留水と同様のリック数を示した。これらのアンタゴニストは 1.0 mM 付近からそれ自身が味物質として作用し、ごくわずかではあるが鼓索神経および舌咽神経に応答を起こすことがわかっているが（Yasuo *et al.*, 2008）、その味に対してマウスは忌避しないことがわかった。次に、0.1 M MSG＋30 μM アミロライドにそれぞれこれらアンタゴニストを混合させると濃度依存的にリック数が上昇し、うま味に対する抑制効果がみられた。その効果は、両アンタゴニストで、それ自身は全く刺激効果のない 0.1 mM からみられた。さらに、0.1 M MSG＋30 μM アミロライドに AIDA＋CPPG を混合させると AIDA 混合や CPPG 混合のときよりもさらにリック数が上昇し、より大きなうま味に対する抑制効果があらわれた。また、閾値も 0.03 mM と単独の場合の 0.1 mM より低い値を示した。したがって、両マウス系統において、うま味応答に mGluR が少なくとも一部関与することが示唆された。しかし、この 0.1 M MSG の濃度条件下では C57BL/6J マウスと T1r3-KO マウス間では有意差がなく、野生型と比較し、甘味、うま味の両種の味に共通する受容体コンポーネントである T1r3 を欠損させた T1r3-KO マウスの方がより大きな mGluR アンタゴニストの抑制効果がみられるという予想は裏切られる結果となった。そこで、低濃度の試験溶液についても検討した。その結果、0.001-0.1 M MSG に AIDA、CPPG、AIDA＋CPPG を混合させると野生型 C57BL/6J マウスは明確なアンタゴニストの濃度依存的なリック数の上昇は得られなかったが、T1r3-KO マウスは低濃度の 0.01-0.03 mM MSG でリック数の上昇がみられた。したがって、MSG の低濃度領域では、その抑制効果は T1r3-KO マウスのみにみられ、T1r3-KO マウスにおいては、mGluR1 および mGluR4 がともにうま味受容体として機能し、野生型と比べより大きく寄与をしていることが強く示唆された。

mGluR1 および mGluR4 はともに taste 型および brain 型が味細胞に発現していることが示唆されている。それらの閾値の差は taste 型が mM レンジで、brain 型で μM レンジであることが知られている（Chaudhari *et al*., 2000）。本実験では、使用した最低濃度が 1.0 mM であることと、条件付けした MSG 濃度が 0.1 M と高かったこともあり、低濃度 MSG への汎化がおこらなかったため、mGluRs のどちらのタイプが関与しているか明確な解析ができなかった。しかし、少なくとも taste 型の関与は示唆された。最近、Nakashima ら（2004）は、C57BL/6 マウスに 0.03 M MSG の嫌悪条件付けすると、0.001 mM まで汎化し、そのリック応答が CPPG と AIDA で抑制されることから、brain 型も関与する可能性を報告している。したがって、taste 型、brain 型の両方の mGluRs がうま味応答に関与している可能性がある。

うま味応答の細胞内伝達過程では、受容体の下流に位置する分子群では、少なくとも、$G\alpha_{gust}$、$PLC\beta_2$、IP_3R_3 および TRPM5 が機能していると考えられている。この下流に位置する $G\alpha_{gust}$、IP_3R_3 あるいは TRPM5 を欠損させたマウスでは、うま味物質に対する神経応答および行動応答が解析されており、T1r3-KO マウスと同様に、鼓索神経のうま味の相乗効果が消失し、嗜好行動が大きく減少されることがわかっている（He *et al*., 2004; Hisatsune *et al*., 2007; Taravela *et al*., 2005; Yasuo *et al*., 2008)。しかも、驚いたことに、舌咽神経のうま味応答はいずれの KO マウスも有意な抑制がみられないことも共通している。したがって、鼓索神経領域の相乗効果をもたらす情報経路として、以下のような情報伝達経路が示唆される。すなわち、うま味物質が T1r1/T1r3 に作用することで $G\alpha_{gust}$（He *et al*., 2004）もしくは $G\alpha_i$（Kusakabe *et al*., 2000）を活性化し、Gβγを切り離して $PLC\beta_2$（Zhang *et al*., 2003）に作用する。$PLC\beta_2$ の活性化で PIP_2 が IP_3 とジアシルグリセロールに加水分解される（Chaudhari *et al*., 2006）。IP_3 は Ca^{2+} 小胞体の IP_3R_3

に作用して Ca^{2+}放出を促し（Hisatsune *et al*., 2007）、TRPM5 を開口する。TRPM5 を介して Na^{+}が流入することで味細胞は脱分極し、活動電位を発生する（Talavera *et al*., 2005）。また、さらに最近の研究では、味覚受容体 T1Rs や T2Rs、甘味・苦味・うま味に共通した細胞内情報伝達分子が発現する味細胞（II 型細胞）は、ヘミチャネルを介して ATP を放出することが分かってきた（Romanov *et al*.,2007; Huang *et al*., 2007）。また、ATP 受容体（$P2X_2$/$P2X_3$）を欠損したマウスでは機械刺激や温度刺激に対して正常に応答するが、味覚応答は消失することから、ATP が味細胞と味神経をつなぐ神経伝達物質であると考えられる（Finger *et al*., 2005）。この経路は、受容体以外は甘味、苦味とも共通している。mGluRs が関与する伝達経路はこれらの主要経路とは異なることが予想される。なぜならば、その主要経路に関わる分子の欠損型でもおこるうま味応答に関与すると考えられるからである。しかし、現在のところ、その経路は全く不明である。今後の研究の進展を待つ必要がある。

以上まとめると、本研究の結果や、他のグループによる研究結果は、うま味受容体と情報伝達経路が複数存在することを示唆しており、T1r1/T1r3 により伝達される情報と mGluRs により伝達される情報はそれぞれ異なる役割を担っている可能性がある。すなわち、前者は舌前方からの情報で主に嗜好性に関与する。一方、後者は主に舌後方からの情報で T1R3-、$G\alpha_{gust}$ -、IP_3R_3-および TRPM5-KO でも機能していることから、うま味と他の味質との識別に寄与しているものと考えられる。

第 2 章

うま味感受性の多様性とヒト T1r1 と T1r3 の遺伝子多型性についての解析

緒言

ヒトのうま味感受性は個人差があることが報告されている。MSG の味覚閾値の分布は 2 峰性を示し、高感受性と低感受性グループではその閾値の平均値が約 5 倍差がある（Lugaz *et al*., 2002）。しかしながら、ヒトにおける詳細なうま味受容メカニズムや、うま味感受性の多様性の原因についてはほとんど明らかではない。

これまでに、味覚感受性の多様性と味覚受容体遺伝子多型性との間に相関があることが報告されている。具体的には、甘味受容体にはマウス系統間で差がある（Fuller *et al*., 1974）。甘味受容体は T1r3 と T1r2 とのヘテロダイマーであることが報告されている（Damak *et al*., 2003; Nelson *et al*., 2001; Li *et al*., 2002; Xu *et al*., 2004; Zhao *et al*., 2003）。人工甘味料であるサッカリンに高嗜好性または低嗜好性を示すマウス系統間の遺伝子多型性を比較解析したところ、T1r3 の 60 番目のアミノ酸をコードする一塩基多型性（single nucleotide polymorphism: SNP）により Ile が Thr に置換していることがその低感受性の原因であることが培養細胞を用いた実験により明らかにされた（Bachmanov *et al*., 2001; Kitagawa *et al*., 2001; Max *et al*., 2001; Montmayeur *et al*., 2001; Nie *et al*., 2005; Sainz *et al*., 2001）。ネコは甘味物質に対してほとんど嗜好性を示さない。DNA 解析の結果、T1r2 のコーディング領域の一塩基欠失により premature stop codon が生じたために機能的 T1r2 タンパク質が合成されないことが明らかにされてきた（Li *et al*., 2005）。ヒトにおいて最も研究が進んでいるのが、「味盲」で知られる苦味物質 propylthiouracil（PROP）や phenylthiocarbamide（PTC）に対する感受性の違いである。その味

覚閾値分布は二峰性を示し、PROP と PTC の味覚閾値は高感受性と低感受性グループでは約 1000 倍の差がある（Balakeslee *et al*.,1935; Fox *et al*., 1931）。近年、苦味受容体 T2r38 の遺伝子多型が PTC や PROP の味覚感受性に影響していることが明らかにされた。49、262、296 番目のアミノ酸を決める 3 つの SNP により、5 つの受容体ハプロタイプが決まる（Kim *et al*., 2003）。HEK293 細胞を用いた受容体強制発現系においてハプロタイプ PAV（49Pro、262Ala、296Val）が最も感受性が高く、AVI（49Ala、262Val、296Ile）が最も感受性が低く、その他のタイプは中間の感受性をもつ受容体であることが明らかにされてきた（Bufe *et al*., 2005）。

うま味受容体として推定されている T1r1/T1r3 に関しては、human genome SNP database（NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/）上に複数の SNP が報告されている: T1r1（2 synonymous and 7 non-synonymous、Gene ID = 80835）、T1r3（2 synonymous and 5 non-synonymous、Gene ID = 83756）。Kim らもまた T1r1 と T1r3 のコード領域を解析し、上記の NCBI database 上のデータに加えてその他の SNP を報告している: T1r1（2 synonymous and 10 non-synonymous）、T1r3（5 synonymous and 5 non-synonymous）（Kim *et al*., 2006）。もし、T1r1/T1r3 がうま味受容体として本当に機能するならば、T2r38 が PROP や PTC 苦味感受性に影響するように、T1r1/T1r3 の遺伝子変異もうま味感受性に影響する可能性がある（Bufe *et al*., 2005; Kim *et al*., 2003）。 そこで本研究では、(1) 健康成人 254 名の MSG、IMP、MSG＋0.5 mM IMP の味覚認知閾値、（2）T1r1 と T1r3 のコード領域の SNP およびアミノ酸変異、（3） 味覚認知閾値と T1r1/T1r3 遺伝子型との相関、そして最後に（4）HEK293 細胞を用いた強制発現系を用いて T1r1/T1r3 変異体の機能解析をおこなった。本研究のゴールは、T1r1/T1r3 がヒトにおいてうま味受容体として機能しているかどうか、そして、うま味感受性の個人差の原因を分子レベ

ルで明らかにすることである。

材料と方法

被験者

被験者には 254 名のボランティア健康成人（男性／女性：141／113、年齢：26－36、BMI：16.5－24.8）にご協力頂いた。はじめに実験の目的、方法、手段について説明をおこない同意を得た（インフォームドコンセント）。すべてのプロトコールは、九州大学生命倫理委員会の承認のもとにおこなった。被験者には、テスト前日のアルコール摂取がないことを確認し、当日のカフェインならびにテスト中の食物の摂取禁止をお願いした。また口腔衛生状態が良好で非喫煙者、規則的な運動や食事、睡眠をおこなっている者を検査対象者とした。

味覚検査

MSG は Na^+を含んでいるため、MSG（うま味）と NaCl（塩味）の検知閾値（水と識別できる最低値）測定では味質が識別できていない可能性がある。そこで我々は味覚検査にうま味、甘味、塩味、酸味、苦味の 5 基本味をもちいて、それぞれの認知閾値（味質を識別できる最低値）を測定した。試験味溶液にはうま味：0.2 - 400 mM グルタミン酸ナトリウム（MSG）、0.02 - 40 mM イノシン酸ナトリウム（IMP）、0.003 - 12.5 mM MSG＋0.5 mM IMP、甘味：0.2 - 400 mM シュクロース（Suc）、塩味：0.2 - 400 mM 塩化ナトリウム（NaCl）、酸味：0.02 - 40 mM 塩酸（HCl）、苦味：0.001 - 2.0 mM フェニルチオカルバミド（PTC）を使用した。溶液の濃度は 0.3 log step-wise increase（1 段階ごとに濃度が 2.0 倍上昇）で設定した。すべての溶液は蒸留水で溶かして作成し、室温のものを使用した。検査の方法はステアケース法を改良した方法を使用した（Pasquet *et al.*, 2002,

2006)。被験者には 7 つすべての味物質に対してテストをおこなった。測定前にはそれぞれの高濃度の味物質を用いて味質の確認をおこなった。各試験味溶液は濃度の低い順に全口腔法にて 2 ml ずつ口腔内にピペットで与えた。被験者に溶液は飲み込まないように指示し、それぞれの溶液間は蒸留水に充分にうがいをさせた。被験者には味質を返答させた。最初に味質がわかった時点から 1 段階高濃度の溶液で確認を行い、2 回続けて正確に味質が返答されたら、再度 2 段階低濃度の溶液に戻り上昇法にて検査した。(first reversal)。味覚閾値検査を低濃度から高濃度、高濃度から低濃度を 5 回繰り返し（five reversal)、後半の 4 回の平均値を認知閾値とした。

ジェノタイピング

味覚検査終了後、DNA サンプルは頬粘膜細胞を採取し、genomic DNA purification kit（Gentra systems）を用いて抽出した。T1r1 と T1r3 の翻訳領域は PCR プライマーで増幅し（テーブル 1)、10 pmol のフォワードおよびリバースプライマーでシークエンスをおこなった。シークエンス解析とコンティグアセンブリーは AssemblyLIGN（v.1.09, Oxford Molecular Group）でおこなった。それぞれの領域をシークエンスした数は少なくとも 50 ある。

テーブル1. シークエンスとジェノタイピングにもちいたPCRプライマー

遺伝子	アクセス No.	名前	Forward	Reverse
T1r1	NT_01937	r1-Ex1	TCACAGAGCGTGGACAGAAC	AGCACTTAGGTGGCAAGTGG
		r1-Ex2	CTGGACCGATGACCTCAAAG	AAGAGCAGTGACCACCCAAG
		r1-Ex3a	CTTCGCAGGTGATTTGTCAG	GCTTCTTCAAACGCCTTCAG
		r1-Ex3b	TGCTTTCAAGGACATCATGC	TTTATCCCCCTTGGCATTTAG
		r1-Ex4	CTCCTCTCAGGAGGTTGGTG	CTCGCCTACGGAGTGTCTTC
		r1-Ex5	ACCACCACTCTACCCATCCTG	CCCAGTGGCTGATTCTCTTG
		r1-Ex6a	ATCTTGCAGGCCCCTATTTC	AGAGGAAGGCCAGTATGAAGC
		r1-Ex6b	CTAACTTGGCTGGTGGTGTG	AGGCTCTGGGTTCAGACTTG
T1r3	NT_077913	r3-Ex1	CTGACGCGCACAAACTTTC	CAGAGCAGGCCGTTTGAG
		r3-Ex2	CATCTGCGGTTCTGTGTGG	AAGAAGGAGGGGAAGGTCTCC
		r3-Ex3a	TGTCAGGAGATGCCTCTTGG	GGTGCGTCTTCACGTACTGG
		r3-Ex3b	CACCAGGTGAACCAGAGCAG	CACGTGGAAGGTCAGGTT
		r3-Ex4	ACCACGCCTGAGCTGGAG	CCCACGGGAGACTGGAAC
		r3-Ex5	TGGAGTACGACCTGAAGCTG	ACTCATCCTGGCCACAAAAG
		r3-Ex6a	GAGCCCACAGGGTACAAGAC	GAAAGTGCCCAGGAAGCAG
		r3-Ex6b	TCAGAACTGCCTCTGAGCTG	GAGACACGGGTCATTGCTG

G タンパク質と T1r1/T1r3 変異体の準備

イントロンを含まない T1Rs と Gα16 の発現コンストラクトは pEE-DEST51 Gateway vector（invitorogen）をもちいて作成した。それぞれの遺伝子の 5'末端に Kozak cassette を導入した。Gα16 キメラはこれまでの報告に基づき mutagenic PCR プライマーをもちいて作成した（Li *et al*., 2002, Ueda *et al*., 2003）。Gα16 の C 末端の 5 アミノ酸残基（EINLL）を Gαi3（ECGLY; Gα16-i3）、Gα gustducin（DCGLF; Gα16gust）に置換した（Li *et al*., 2002）。Gα16-gust44 は Gα16 の C 末端の 44 アミノ酸残基を Gα gustducin の 44 対応残基に置換した（Ueda *et al*., 2003）。すべての DNA コンストラクトの遺伝子配列は、シークエンシングにより確認した。T1Rs のポイントミューテーションは、Gα16 キメラ同様に mutagenic PCR プライマーをもちいて作成した。予備実験の結果、Gα16-i3 が Gα16、Gα16-gust、Gα16-gust44 と比較して再現性と信頼性のある応答を示したので、Gα16-i3 をすべての実験で用いた。

HEK293 細胞をもちいた T1r1/T1r3 変異体の機能解析

HEK293 細胞は、10%fetal bovine serum を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium 中に 37℃、5%CO_2 下にて培養を行った。再現性のある細胞を維持するために 100%コンフルエンスにならないように 2 日毎に継代し、また 2 ヶ月毎に凍結保存している新しい細胞を起こし実験にもちいた。カルシウムイメージングの測定を行うため、細胞を 35 mm 測定デイッシュもしくは poly-D-lysine coated 96-well black-wall、clear-bottom 測定プレートに播き、37℃、24 時間後の 60 - 70％コンフルエント時に GlutaMAX-Ⅰ（invitrogen）を添加した OptiMEM medium で洗浄後、発現ベクターを Lipofectamine2000regent（invitrogen）（2.0 μl / DNA 1.0 μg ）を用いて細胞にトランスフェクションした（T1Rs と Gα16 発現ベ

クターDNA はそれぞれ 0.09 と 0.06 μg / well of 96-well、1.5 と 1.0 μg / 35 mm ディッシュ）。トランスフェクション効率は T1r3 の免疫染色で 55~55%だった（図 13）。免疫染色またはカルシウムイメージングはトランスフェクション後、36-40 時間後におこなった。

カルシウムイメージング

本実験では 2 つのイメージングシステムをもちいた。ひとつは還流システム、もうひとつは 96 サンプルを同時解析できる FlexStationII をもちいた。はじめに還流式では、35 mm ディッシュ上の HEK 細胞を Hank's balanced salt solution（HBSS）含 10 mM HEPES（pH 7.4）で洗浄し、3.0 μM Fluo-4 acetoxymethyl ester（invitrogen）を 1.0 時間（37℃）ロードした後、Ca イメージング測定をおこなった。味物質は HBSS で希釈し、ペリスタポンプ（1.5 ml/分流速）還流しながら 30 秒間刺激した。蛍光イメージは S Fluor ×20/0.75 対物レンズ（Nikon）via a cooled-CCD camera （C6790、Hamamatsu Photonics） fitted to a TE300 microscope（Nikon）で取得した。イメージ解析は AquaCosmos software （v. 1.3、Hamamatsu Photonics）をもちいた。味物質による刺激は脱感作を防止するために 3 分のインターバルをおいた。細胞応答の解析は各味刺激に対して少なくとも 30 細胞をもちいた。刺激溶液には、うま味物質 : MSG （20、50 mM）、IMP （1、10 mM）、MSG + 0.5 mM IMP （20、50 mM）、天然糖：スクロース （Suc、50 mM）、グルコース （Glc、50 mM）、人工甘味料 : サッカリン（Sac、1 mM）、SC45647（SC、0.3 mM）、塩味 : NaCl（50 mM）をもちいた。イソプレテレノール（ISO、10 μM）内因性 β-adrenergic receptors のアゴニスト、Gα16 依存性のシグナル伝達経路を活性化させる（Bufe *et al*., 2002; Li *et al*., 2002）をポジティブコントロールとしてもちいた。

もうひとつのシステム FlexStstionII は T1Rs 変異体の機能解析にもちいた。96-well プレート上のトランスフェクションした HEK 細胞は HBSS で洗浄後、50 µl of FLIPR Calcium 4 （Molecular Devices）in HBSS 含 20 mM HEPES （pH 7.4）を 1 時間 （37℃）ロードし、FlexStation II で測定をおこなった。 蛍光変化（excitation at 485 nm、emission at 525 nm、cutoff at 515 nm） は 2 秒間隔で記録した。HBSS で 2 倍濃度に希釈した味物質 50 µl を、測定開始 30 秒後に添加し、開始から 120 秒間測定をおこなった。蛍光強度は刺激溶液投与 20 ~ 30 秒後のピークからベースライン蛍光を差し引き、10 µM ISO の強度に対する相対値として表した。ネガティブコントロールには mock transfected Gα16 cells（T1Rs なし、Gα16-i3 なし）をもちいた。これらの細胞では Ca 濃度上昇はみられなかった。刺激溶液には MSG （1、3、5、10、20、30、50 mM）、MSG + 0.5 mM IMP （0.1、0.3、1、3、5、10、20、30、50 mM）をもちいた。 また、T1r1/T1r3 応答の特異性の確認のために Lactisole（5 mM、T1r1/T1r3 または T1r2/T1r3 のインヒビター）（Jiang *et al*., 2004, 2005; Xu *et al*., 2004）をもちいた。

免疫染色

トランスフェクションした HEK293 細胞を phosphate-buffered saline （PBS）で洗浄後（5 分、3 回、室温）、4 % paraformaldehyde で 5 分間固定した。PBS 洗浄後、ブロッキング溶液（含 0.5 % blocking reagent （Roche）と 0.1 % tween20）を 1 時間（室温）、続いて T1r3 抗体（sc-22458、1 : 50 希釈、Santa Cruz）を一晩（4℃）反応させた。PBS 洗浄後、alkaline phosphatase-conjugated anti-goat secondary antibody（Jackson ImmunoResearch）を 1 時間（室温）、PBS 洗浄、alkaline phosphatase buffer（含 100 mM Tris/HCl （pH 9.5）、100 mM NaCl、50 mM $MgCl_2$ ）を 5 分（室温）、そしてシグナルを nitroblue-tetrazolium chloride と 5-bromo - 4-chloro – 3

- indolylphosphate をもちいて可視化した。T1r3 タンパク質のシグナル特性はネガティブコントロールとして mock-transfected HEK 細胞をもちいて確認した。

データ解析

Student's *t*-test は認知閾値分布の男女差の有意差検定にもちいた。χ^2 テストは、ジェノタイプの頻度分布とアリルの頻度分布との関係がランダムであることを確認するための Hardy-Weinberg Equilibrium（HWE）を確認するため、ジェノタイプ頻度（もしくはアリル頻度）と味覚認知閾値との相関を解析するため T1r1/T1r3 ハプロタイプ（*T1r1*-372A/*T1r3*-757R homozygotes、*T1r1*-372T/*T1r3*-757R homozygotes、homo and heterozygotes containing *T1r3*-757C）それぞれの味覚認知閾値分布に有意差があるか検討するためにもちいた。また N が 10 未満の場合には Yates' χ^2 テストをもちいた。T1r1/T1r3 ハプロタイプ のそれぞれの味覚認知閾値の平均は、gauss fit function of Origin 5.0 （OriginLab Corp）をもちいて算出した。Ca^{2+}イメージング解析では、Ca シグナル強度は 10 μM ISO の相対値として表し、平均値は 5 ~ 9 回の独立実験からもとめた。EC_{50} values は濃度応答曲線を sigmoid fit functions of Origin 5.0 をもちいて算出した。 5、20、50 mM MSG と 0.3、5、50 mM M+I における *T1r1*/*T1r3* 変異体間の応答値の有意差を解析するために ANOVA をもちい、さらに有意差があった場合、post hoc Fisher's PLSD もしくは *t*-テストで変異体間の有意差を解析した。値は平均値±SE で表し、有意レベルは 0.05 とした。

結果

うま味物質に対する味覚認知閾値分布

MSG、IMP、MSG + 0.5 mM IMP （M+I）の味覚認知閾値は（図 8）に示した。MSG、IMP と M+I それぞれの平均値（± S.E.）は 7.66 ± 0.43、2.15 ± 0.12、0.20 ± 0.016 であった。男女間の有意差は認められなかった （MSG: male vs. female = 8.27 ± 0.60 vs. 6.91 ± 0.62、p = 0.12; IMP: 2.17 ± 0.17 vs. 2.11 ± 0.17、p = 0.80; M+I: 0.20 ± 0.02 vs. 0.19 ± 0.02、p = 0.81、t-test)。それゆえ男女のデータは混合して用いた。分布パターンは MSG と IMP は単峰性の、一方 M+I は二峰性のパターン（0.048 と 0.098 mM 間に落ち込みをもつ）を示した。

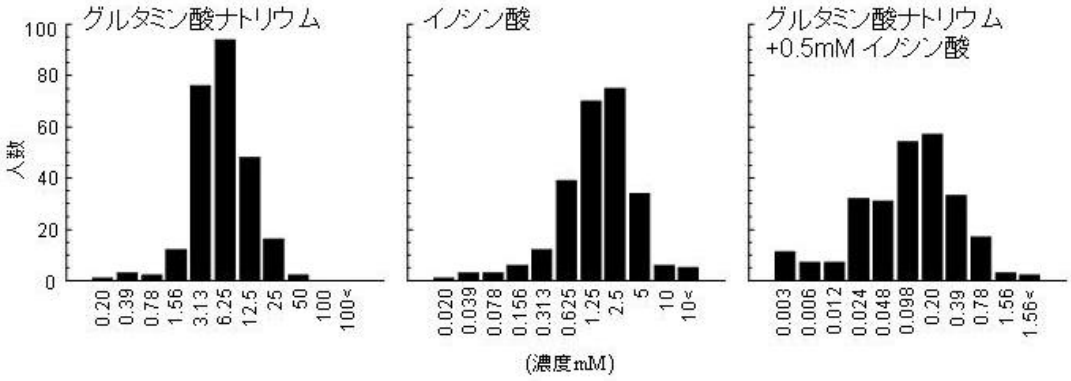

図 8 グルタミン酸ナトリウム（MSG）、イノシン酸ナトリウム（IMP）、グルタミン酸ナトリウム+ 0.5 mM イノシン酸ナトリウムの味覚認知閾値分布（日本人 254 名）。濃度幅は 0.3 log units で設定した。100 mM MSG、10 mM IMP、1.56 mM MSG + 0.5 mM IMP より高い濃度を 100 <、10 <、1.56 <でそれぞれ示した。

ヒト *T1r1* と *T1r3* における SNP とジェノタイプおよびアリル頻度解析

SNP は、*T1r1*（2526 bps）、*T1r3*（2559 bps）の全コード領域をシークエンシングにより解析し、結果をテーブル 2 に示した。*T1r1* には 7 SNPs （2 synonymous and 5 non-synonymous）、*T1r3* には 10 SNPs（6 synonymous and 4 non-synonymous）が明らかとなった。Hardy-Weinberg Equilibrium （HWE） では全ての SNP で有意差は認められなかったため、DNA サンプリングはランダムに行われたことが確認された。*T1r1* と *T1r3* の全 SNP 中、6 SNPs （amino acid position 191、347、372 in *T1r1* および 416、757、813 in *T1r3*） は dbSNP of NCBI で報告されていた。また 7 SNPs（191、347、372 in *T1r1* および 416、573、659、757 in *T1r3*）は Kim らによって報告されていた（Kim *et al.*, 2006）。一方、 9 SNPs （12、85、139、173 in *T1r1* および 74、110、551、690、751 in *T1r3*）に関しては本研究により新たに見つかった。アミノ酸置換を伴う 9 SNPs 中、6 SNPs はマイナーアリル頻度 1.5 %以下であった。一方、3 SNPs（amino acid position 12、372 in *T1r1* および 757 in *T1r3*）はマイナーアリル頻度 5.0 %以上（それぞれ 6.3、39.2、9.0 %）であった。この中で *T1r1*-372 と *T1r3*-757 のマイナーアリル頻度は dbSNP database で報告されている頻度とほぼ同じであった［それぞ 35.6 % （ss68757616）と 8.0% （ss1867265）］。これらの結果から、マイナーアリル頻度の高い 3SNPs（*T1r1*-Q12H、-A372T と *T1r3*-R757C）は日本人に共通の SNPs である可能性が示唆されたため、これらについてさらに解析を進めた。

テーブル2. ヒトT1r1とT1r3におけるSNPsとジェノタイプ頻度およびアリル頻度

遺伝子	部位 mRNA	部位 アミノ酸	部位 dbSNP rs#	塩基	アミノ酸	ジェノタイプ頻度			HWE *p*	アリル頻度 (%)	
T1r1 NM_138697	36	12		G	Gln	G/G	G/C	C/C		G	C
				C	His	236	32	1	0.94	93.7	6.3
	255	85		G	Glu	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Glu	100	1	0	0.96	99.5	0.5
	416	139		C	Thr	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Met	98	3	0	0.88	98.5	1.5
	519	173		C	Ser	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Ser	104	1	0	0.96	99.5	0.5
	572	191	rs61744700	A	Asn	A/A	A/G	G/G		A	G
				G	Ser	104	1	0	0.96	99.5	0.5
	1039	347	rs10864628	G	Glu	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Lys	119	1	0	0.96	99.6	0.4
	1114	372	rs34160967	G	Ala	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Thr	96	106	43	0.15	60.8	39.2
T1r3 NM_152228	220	74		C	Leu	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Leu	166	16	1	0.38	95.1	4.9
	329	110		T	Met	T/T	T/C	C/C		T	C
				C	Thr	187	1	0	0.97	99.7	0.3
	1248	416	rs3813210	C	Pro	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Pro	54	7	0	0.63	94.3	5.7
	1652	551		G	Ser	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Asn	51	1	0	0.94	99.0	1.0
	1719	573		C	Leu	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Leu	55	5	0	0.74	95.8	4.2
	1977	659		C	Phe	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Phe	54	1	0	0.95	99.0	1.0
	2070	690		G	Leu	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Leu	103	1	0	0.96	99.5	0.5
	2253	751		G	Val	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Val	113	1	0	0.96	99.6	0.4
	2269	757	rs307377	C	Arg	C/C	C/T	T/T		C	T
				T	Cys	205	36	4	0.11	91.0	9.0
	2438	813	rs34810828	G	Arg	G/G	G/A	A/A		G	A
				A	Lys	103	1	0	0.96	99.5	0.5

味覚認知閾値と *T1r1* および *T1r3* の 3SNP との相関解析

味覚認知閾値分布上の統計的区分［MSG と IMP では平均値± half a standard deviation より高もしくは低閾値、M+I では 0.048、0.098 mM にみられた落ち込み］により、被験者を低閾値グループと高閾値グループに分け［MSG：低閾値（0.2 ~ 3.13 mM、n = 86 ~ 91）vs. 高閾値（12.5 ~ 50 mM、n = 63 ~ 67）、IMP：低閾値（0.02

~ 0.625 mM、n = 57 ~ 62）vs. 高閾値（5.0 ~ 40 mM、n = 43 ~ 45）、M+I：低閾値（0.003 ~ 0.048 mM、n = 80 ~ 85）vs. 高閾値（0.098 ~ 12.5 mM、n = 151 ~ 160）］、2 つのグループ間の度数分布差を χ^2 テストで調べた。この検定結果をテーブル 3 にしめす。*T1r1*-12 においてはジェノタイプ頻度およびアリル頻度に有意差は見られなかった［MSG、IMP、M+I（χ^2 = 0.0005 ~ 0.12、p = 0.83 ~ 0.98）］。一方、*T1r1*-372 においては MSG と M+I のジェノタイプ頻度［MSG（χ^2 = 14.6、p = 0.0007）と M+I（χ^2 = 6.19、p = 0.04）］に、また *T1r3*-757 においては IMP のアリル頻度［IMP（χ^2 = 6.19、p = 0.01）］に有意差が見られた。

テーブル3. うま味味覚認知閾値とヒトT1r1とT1r3におけるジェノタイプ頻度およびアリル頻度

遺伝子	アミノ酸部位	味溶液	閾値 (mM)	ジェノタイプ頻度			χ2	p	アリル頻度		χ2	p
T1r1	12	グルタミン酸ナトリウム		G/G	G/C	C/C			G	C		
			~3.125	76	11	0	0.04	0.98	163	11	0.009	0.93
			12.5~	59	7	1			125	9		
		イノシン酸		G/G	G/C	C/C			G	C		
			~0.625	54	8	0	0.12	0.94	116	8	0.05	0.83
			5.0~	40	4	1			84	6		
		グルタミン酸ナトリウム		G/G	G/C	C/C			G	C		
		+ 0.5 イノシン酸	~0.05	74	10	0	0.12	0.94	158	10	0.0005	0.98
			0.098~	143	17	1			303	19		
	372	グルタミン酸ナトリウム		G/G	G/A	A/A			G	A		
			~3.125	43	26	22	14.6	0.0007*	112	70	0.19	0.66
			12.5~	19	40	7			78	54		
		イノシン酸		G/G	G/A	A/A			G	A		
			~0.625	26	23	12	2.38	0.3	75	47	0.23	0.63
			5.0~	13	24	6			50	36		
		グルタミン酸ナトリウム		G/G	G/A	A/A			G	A		
		+ 0.5 イノシン酸	~0.05	34	29	22	6.49	0.04*	97	73	1.72	0.19
			0.098~	64	74	22			202	118		
T1r3	757	グルタミン酸ナトリウム		C/C	C/T	T/T			C	T		
			~3.125	78	6	2	3.94	0.14	162	10	2.76	0.09
			12.5~	50	12	1			112	14		
		イノシン酸		C/C	C/T	T/T			C	T		
			~0.625	52	4	1	5.38	0.07	108	6	6.19	0.01*
			5.0~	31	11	2			73	15		
		グルタミン酸ナトリウム		C/C	C/T	T/T			C	T		
		+ 0.5 イノシン酸	~0.05	70	8	2	2.74	0.25	148	12	0.91	0.34
			0.098~	122	29	1			273	31		

T1r1/*T1r3* ハプロタイプの味覚認知閾値分布

次に、味覚認知閾値との間に相関が示唆された2つのアミノ酸変異［*T1r1*-A372T（Ala vs. Thr）、*T1r3*-R757C（Arg vs. Cys）］の影響を調べるために、

被験者をT1r1/T1r3 ハプロタイプにより3グループに分け、それぞれの味覚認知閾値分布を調べた。3グループは、（1）AR homozygotes（*T1r1*-372A/*T1r3*-757R、n = 84）、（2）TR homozygotes（*T1r1*-372T/*T1r3*-757R、n = 37）、（3）*T1r3*-757Cs［homo- and heterozygotes containing *T1r3*-757C、n = 39［ACとTC homozygotes の数が少なかったため（それぞれn = 0と1）、*T1r3*-757Cを含むグループとした｛AC/TC（n = 2）、AR/AC（n = 14）、TR/TC（n = 5）、AR/TC（n = 17）｝］。これらの分布を図9に示す。 χ^2 テストの結果、MSGに対するTRと*T1r3*-757Csと分布間に有意差がみられた（χ^2 = 17.0、p = 0.048）。しかし、その他では有意差はみられなかった［AR vs. TR in MSG、IMP、M+I（χ^2 = 0.68 ~ 6.6、 p = 0.67 ~ 0.99）、AR vs. *T1r3*-757Cs in MSG、IMP、M+I（χ^2 = 6.61 ~ 10.0、p = 0.34 ~ 0.69）、TR vs. *T1r3*-757Cs in IMP、 M+I（それぞれχ^2 = 5.1、6.7、p = 0.82、0.66）］。しかし、gaussian fit analysis で算出したMSGとM+Iの認知閾値の平均値は3グループ間で差があることが分かった［MSG: TR（4.38 ± 0.29 mM）＜ AR（7.51 ± 0.44）＜ *T1r3*-757Cs（8.60 ± 0.20）、M+I：TR（0.069 ± 0.01）＜ AR（0.13 ± 0.009）＜ *T1r3*-757Cs（0.22 ± 0.026）. 一方、IMPの認知閾値の平均値は、TRはARとほぼ同じで（TR: 1.73 ± 0.13、AR: 1.77 ± 0.06）、*T1r3*-757Cs（3.40 ± 0.19）はTRまたはARより高いことが明らかとなった。これらの結果から、*T1r1*-372Thr は372Ala よりMSGの感受性が高く、IMP感受性には影響しない受容体を形成し、また*T1r3*-757Cysは 757ArgよりMSGとIMPの両方に感受性が低い受容体をつくる可能性が示唆された。その他の味質（sucrose、NaCl、HCl 、PTC）では、このような分布の差はみられなかった（図10）。

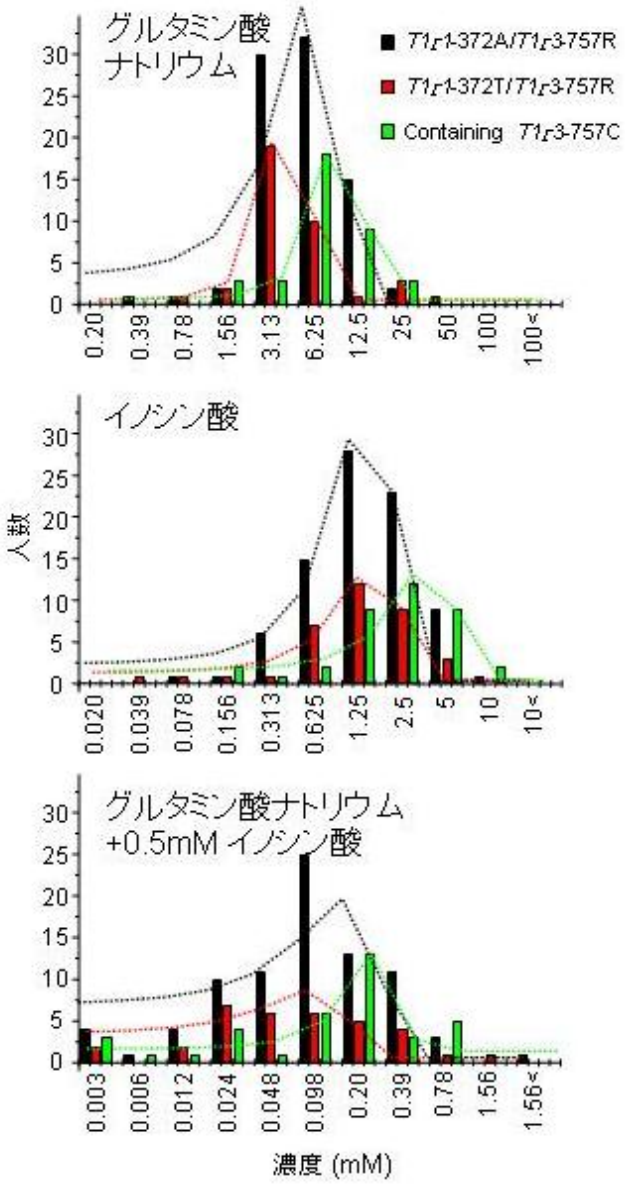

図9 *T1r1*-372 / *T1r3*-757ハプロタイプにおけるグルタミン酸ナトリウム（MSG）、イノシン酸（IMP）とグルタミン酸ナトリウム+ 0.5 mM イノシン酸 の味覚認知閾値分布。黒、赤、緑バーは、それぞれ*T1r1*-372A（Ala）/*T1r3*-757R（Arg）homozygotes（n = 84）、*T1r1*-372T（Thr）/*T1r3*-757R homozygotes（n = 37）、homo and heterozygotes containing the *T1r3*-757C（Cys）allele（n = 39）を示す。黒、赤、緑破線は、gaussian fit analysisで得られたそれぞれ*T1r1*-372A/*T1r3*-757R homozygotes、*T1r1*-372T/*T1r3*-757R homozygotes、 homo and heterozygotes containing the *T1r3*-757C alleleのカーブを示す。濃度幅は0.3 log unitsで設定した。100 mM MSG、10 mM IMP、1.56 mM MSG + 0.5mM IMP以上の濃度は それぞれ100＜、10 ＜ 、1.56 ＜で示した。

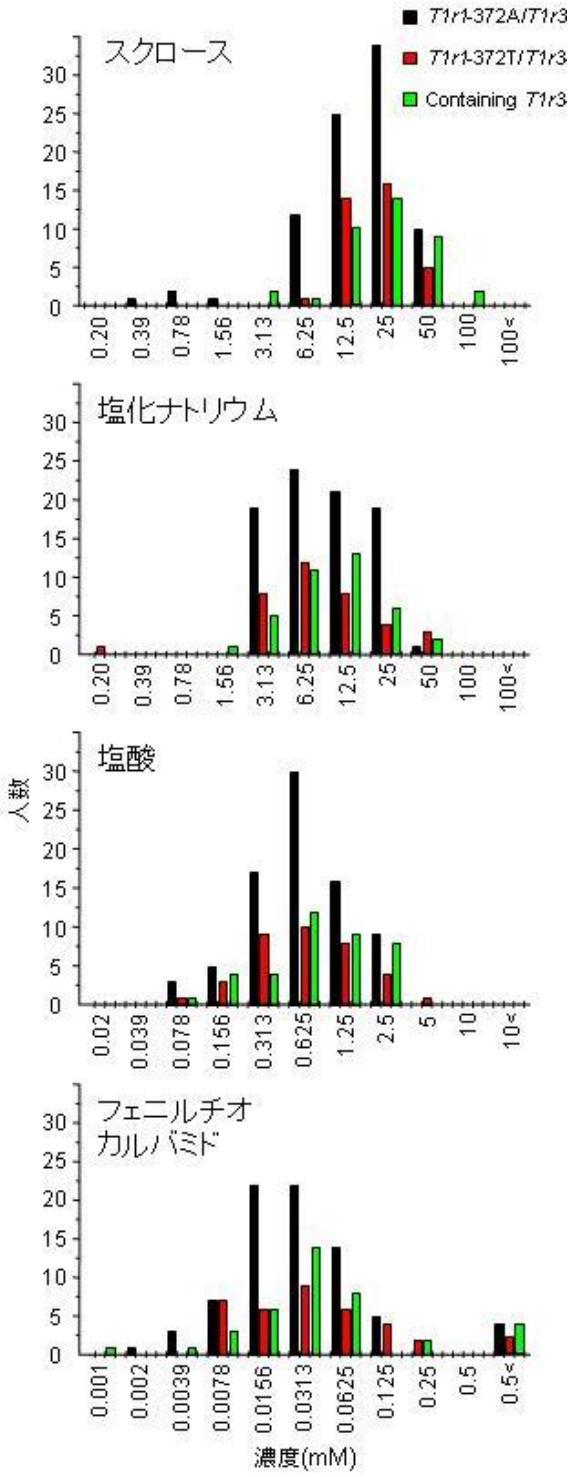

図10 *T1r1*-372 / *T1r3*-757 ハプロタイプにおけるスクロース（suc）、塩化ナトリウム（NaCl）、塩酸（HCl）と フェニルチオカルバミド（PTC）の味覚認知閾値分布。黒、赤、緑バーは、それぞれ*T1r1*-372A（Ala）/*T1r3*-757R（Arg）homozygotes（n = 84）、*T1r1*-372T（Thr）/*T1r3*-757R homozygotes（n = 37）、homo and heterozygotes containing the *T1r3*-757C（Cys）allele（n = 39）を示す。濃度幅は0.3 log unitsで設定した。100 mM MSG、10 mM IMP、1.56 mM MSG + 0.5 mM IMP以上の濃度は それぞれ100 <、10 <、1.56 <で示した。

ヒト*T1r1 / T1r3*を発現させた人工うま味応答細胞の構築

T1r1-A372Tと*T1r3*-R757Cのアミノ酸置換の影響を分子レベルで解析するために、human embryonic kidney 293（HEK）に*T1r1*/*T1r3*を強制発現させた（Bufe *et al*., 2005; Li *et al*., 2002; Nelson *et al*., 2002; Xu *et al*., 2004）人工うま味応答細胞の構築を試みた。T1r1/T1r3の最も頻度の高い*T1r1*-372Aと*T1r3*-757RをHEK細胞にG α16-i3とともに一時的にトランスフェクションし、味刺激に対する細胞内Ca濃度上昇をモニターした（図11A）。MSG（20、50 mM）刺激により一時的なCa濃度上昇がみられた。MSGとIMPとの混合によるうま味相乗効果は、うま味に特異的にみられる現象である（Yamaguch ., 1970; Yoshii *et al*., 1986）。IMP（1、10 mM）単独刺激では細胞内Ca濃度上昇はみられなかったが、0.5 mM IMPの添加は20 mM MSG（M+I）の応答を増強した（図11A、B）。Mock-transfected HEK細胞（without the three genes、G α16-i3 alone、G α16-i3/*T1r1* without *T1r3*、G α16-i3/*T1r3* without *T1r1*）ではMSGとM+I刺激による応答はみられなかった。また50 mM sucrose、50 mM glucose、1 mM saccharin、0.3 mM SC45647、50 mM NaCl刺激でも応答はみられなかった（図11A）。さらに甘味とうま味のインヒビターであるLactisole（Jiang *et al*., 2005; Xu *et al*., 2004）による抑制効果もみられた（図13B）。以上のことから我々の*T1r1*/*T1r3*発現細胞はうま味刺激に対して特異的に応答する細胞であることが確認された。

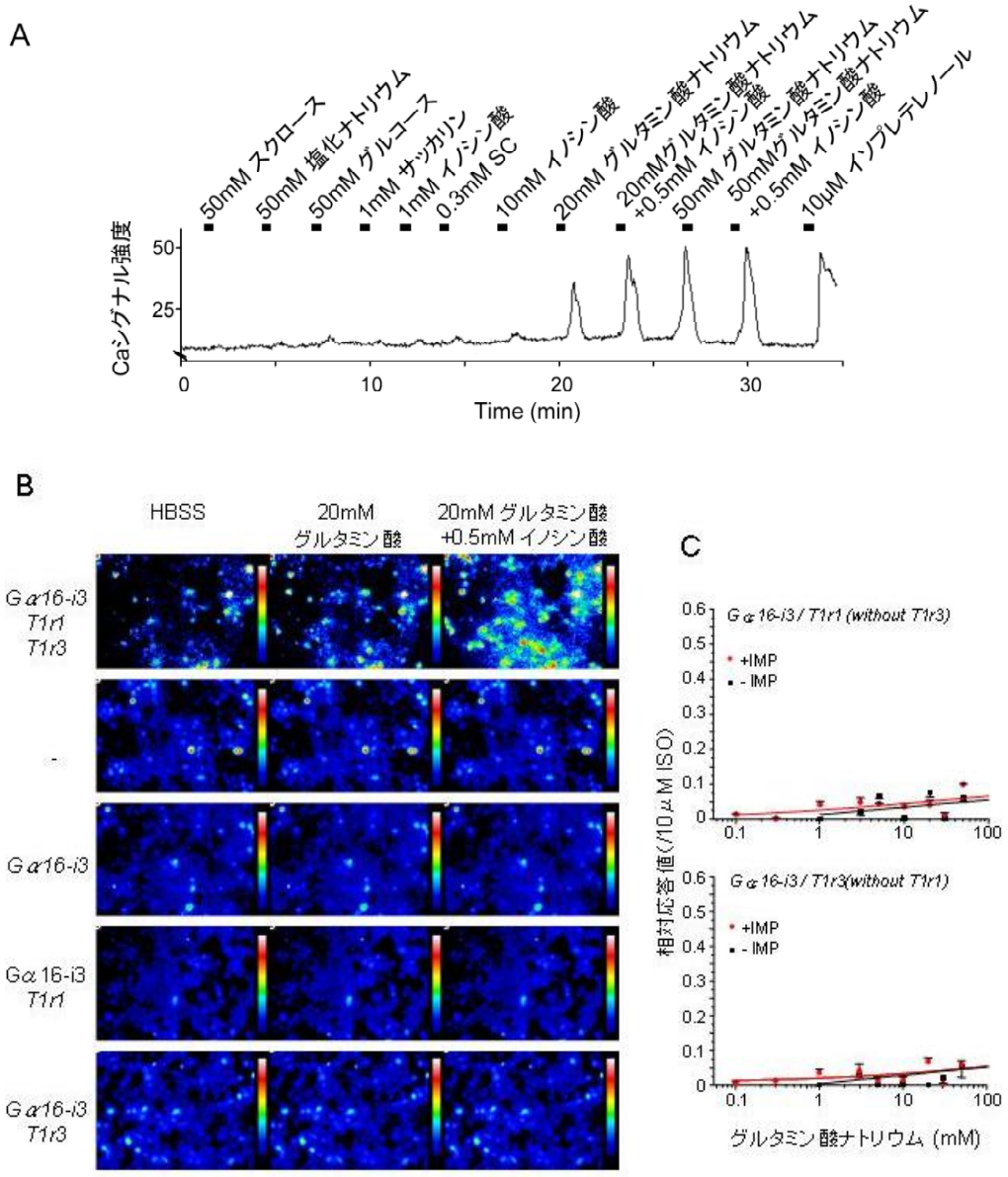

図11　ヒト*T1r1*（372A）、*T1r3*（757R）、Gα16-i3をトランスフェクションした HEK293細胞における細胞内Ca濃度上昇。（A）ヒト*T1r1*、*T1r3*、Gα16-i3をトランスフェクションした HEK293細胞ではグルタミン酸（MSG） および MSG + 0.5 mM イノシン酸（IMP）刺激で細胞内Ca濃度上昇がみられた。しかし、スクロース（Suc）、グルコース（Glc）、サッカリン（Sac）、 SC45647（SC）、塩化ナトリウム（NaCl）ではみられなかった。IMP（1、 10 mM） 単独刺激では*T1r1*/*T1r3*を活性化しなかったが、0.5 mM IMP添加により20 mM MSGの応答が増強された。10 μM イソプレテレノール （ISO） はポジティブコントロールとしてもちいられた（内因性 βadrenergic receptorのリガンド）。横線は刺激期間を示す。（B）20 mM MSGに対する応答と0.5 mM IMP添加20 mM MSGに対する応答増強は*T1r1*、*T1r3*、Gα16-i3トランスフェクション時のみみられた。（C）*T1r1*もしくは*T1r3*欠損

時の濃度−応答曲線。細胞内Ca濃度上昇はみられなかった。値はISO（10 μM）に対する相対値の平均値（± S.E.）で表した（n = 3）。

ヒト*T1r1 / T1r3*変異体の機能解析

次に、上記で使用した*T1r1*-372Aと*T1r3*-757Rに加えて２つの変異体（1）*T1r1*-372T（372Ala → Thr）、（2）*T1r3*-757C（757Arg → Cys）を作成し解析した。これらの濃度−応答曲線を図12に示す。 全ての*T1r1*/*T1r3*変異体はMSGに対して応答し、またIMP添加による相乗作用を示した（図12A）。それぞれのEC_{50}（half maximal effective concentrations）を解析した結果、以下の3つのことが明らかとなった： （1）MSGに対する応答で*T1r1*-372T/*T1r3*-757R（TR、21.0 mM）は他の変異体（AR、AC、TC、32.8 ～ 33.5 mM）に比べて約1.5倍低い（左方シフト）EC_{50} を示した、（2）M+Iに対する応答で *T1r1*-372Tは*T1r1*-372Aに比べて約1.5 ~ ２倍低い（左方シフト）EC_{50} を示した（AR vs. TR、AC vs. TC）、（3）M+Iに対する応答で *T1r3*-757C は*T1r3*-757R（AR vs. AC、TR vs. TC）に比べて約2 ~ 2.5倍高い（右方シフト）EC_{50} を示した。次に、4つの*T1r1*/*T1r3*変異体：*T1r1*-372A/*T1r3*-757R（AR）、TR、AC 、TC について、味覚感受性（特に味覚認知閾値）との対応をみるためにMSGでは低濃度（5 mM: 閾値付近）、中濃度（20 mM: EC_{50}付近）、高濃度（50 mM: 最大応答値付近）、M+Iでは低濃度（0.3 mM: 閾値付近）、中濃度（5 mM: EC_{50}付近）、高濃度（50 mM: 最大応答値付近）の統計解析を行った（図12B）。ANOVAでは、4つの*T1r1*/*T1r3*変異体間で5、20 mM MSGと0.3、5 mM M+Iで有意差がみられた [5 mM MSG: 平均値±S.E.: 0.88±0.008 ~ 0.145±0.018、$F(3, 58) = 3.651$、$p < 0.05$; 20 mM MSG: 0.139±0.013 ~ 0.216±0.014、$F(3, 58) = 5.313$、$p < 0.01$; 0.3 mM M+I: 0.082±0.01 ~ 0.135±0.022、$F(3, 58) = 3.19$、$p < 0.05$; 5 mM M+I: 0.185±0.018 ~ 0.271±0.027、F（3、56）

= 3.70、$p < 0.05$]。しかし、50 mM MSGとM+Iでは有意差はみられなかった[50 mM MSG: 0.258±0.022 ~ 0.302±0.046、F（3、59）=0.45、$p > 0.05$; 50 mM M+I 0.321 ±0.031 ~ 0.403±0.032、F（3、60）= 1.615、$p > 0.05$]。さらにPost-hoc Fisher's PLSDをおこなった結果、有意差が5 mM MSG: AR vs. TR、TR vs. AC、TC; 20 mM MSG: TR vs. AC、TC; 0.3 mM M+I: AR vs. TR、TR vs. AC、TC; 5 mM M+I: TR vs. AC、TCでみられた（$p < 0.05$、Fisher's PLSD *post hoc*）。

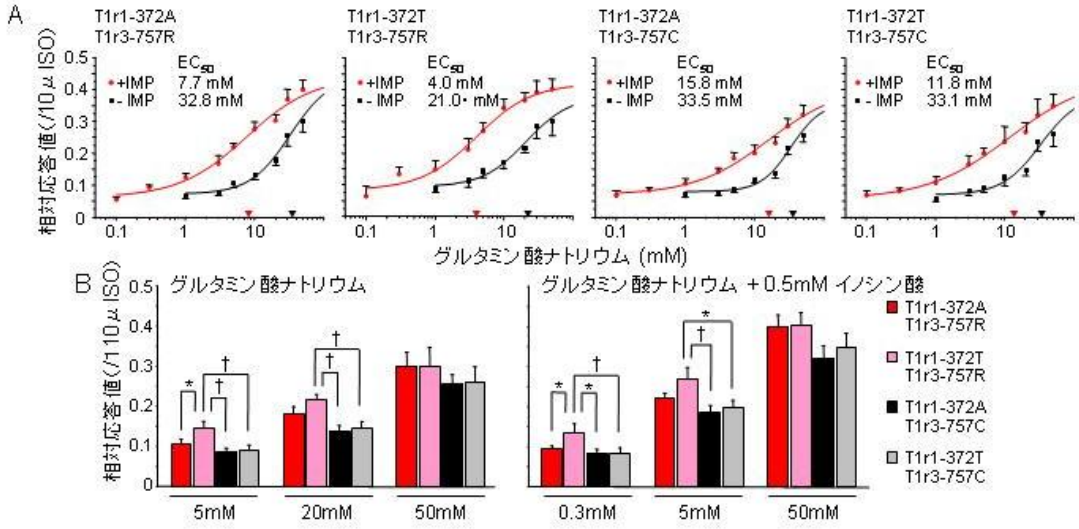

図12　ヒト*T1r1* / *T1r3*変異体をトランスフェクションした HEK293 細胞の味溶液濃度と細胞内Ca濃度上昇（応答）との関係。（A）グルタミン酸（MSG）とMSG+0.5 mMイノシン酸　（IMP）に対する濃度−応答曲線。*T1r1*/*T1r3* 変異体は以下のものを使用した［*T1r1*−372A（Ala）、-372T（Thr）、*T1r3*-757R（Arg）、-757C（Cys）］。黒および赤線はそれぞれMSG単独刺激およびM+I刺激時の応答曲線を示す。値は、isoproterenol（10 μM）に対する相対値で表した。それぞれの平均値は（± S.E.）で表した（n=5~9）。Half maximal responses（EC_{50}）は濃度応答曲線からsigmoid fit analysisをもちいて算出した。X軸の三角はMSG（黒）と MSG + 0.5m M IMP（赤）のEC_{50} valuesを示す。（B）*T1r1*/*T1r3*変異体の5、20、50 mM MSGと0.3、5、50 mM M+Iにおける応答。それぞれの平均値は（± S.E.）で表した（n=10~18）。アスタリスク（＊）および短剣符（†）は有意差を示す（$p < 0.05$、Fisher's PLSD）。

上記で認められた差の原因が、タンパク質の発現の違いによるのかどうかについて免疫染色法をもちいて調べた（図13A）。*T1r3*のタンパク発現率は、*T1r3*-757Rと -757C間では明らかな違いはみられなかった（50 ~ 55%）。*T1r1*については抗体がないため解析できなかった。

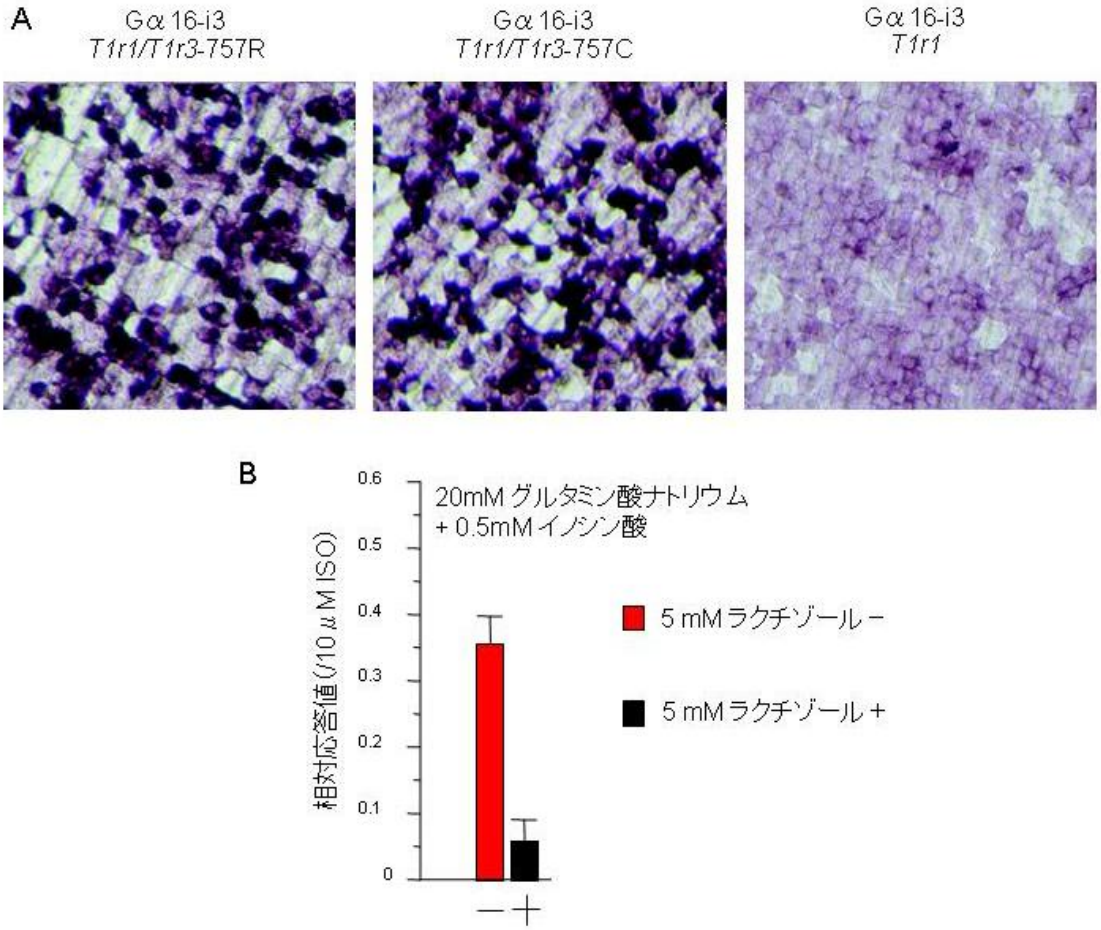

図13　（A）*T1r3* 変異体タンパク質の発現率解析。免疫染色で*T1r3*-757R と -757Cの発現率は明らかな差はみられなかった（50 ~ 55%）。ネガティブコントロールは*T1r3* をトランスフェクションしていないHEK細胞をもちいた。（B）ラクチゾール（Lactisole：甘味とうま味のインヒビター）によるT1r1/T1r3応答抑制効果。T1r1/T1r3発現細胞でラクチゾールによる抑制効果がみられた。応答値は10 μM ISOで相対値化し、それぞれの平均値は（± S.E.）で表した（n = 3）。

考察

MSG、IMP とM+I 味覚認知閾値分布は広い濃度レンジで広がっており（0.2 ~ 50 mM for MSG、0.02 ~ 20 mM for IMP、0.003 ~ 3.13 mM for M+I）、うま味感受性は個人差が大きい感覚であることがあらためて確認された。T1r1-372（Ala or Thr）/ T1r3-757（Arg or Cys）ハプロタイプで分類した3グループのMSGとM+I味覚認知閾値分布は、それぞれ平均値が異なるカーブを示した（図9）。その平均値は、*T1r1*-372T/*T1r3*-757R homozygotes < *T1r1*-372A/*T1r3*-757R homozygotes < homo and heterozygotes containing *T1r3*-757Cであった。 このことから、図8で示したMSG と M+I味覚認知閾値分布は、これら3つのカーブが合わさった物であると考えられる。なぜならばT1r1/T1r3の日本人に見いだされたSNPの中でアミノ酸置換を伴い、マイナーアリル頻度が高く、味覚認知閾値と相関があったSNPsは、*T1r1*-372と*T1r3*-757の2つのみだったからである。 Lugaz らは、MSG味覚検知閾値分布が2峰性であることを報告していた（Lugaz *et al*., 2002）。 我々の結果と異なる理由はいくつか考えられるが、まず味覚閾値の測定方法が異なる。Lugaz らは検知閾値をもちいたのに対して我々は認知閾値を測定した。また、設定した factor of step-wise increase（濃度幅、Lugaz: 1.365 vs. 本研究：2.0）、被験者数（Lugaz: 171 vs. 本研究: 254）の違いが関与しているかもしれない。

興味深いことに、T1r1/ T1r3-757ハプロタイプで分類した3グループのIMPの味覚認知閾値の平均値（TR ≒ AR < *T1r3*-757Cs）は、MSGとM+I（TR < AR < *T1r3*-757Cs）とは異なっていた（図9）。これらの結果は、372 in *T1r1* は、IMPではなくMSGの結合サイトと関連しており、MSGとIMPの結合サイトはそれぞれ別の領域である可能性を示唆する。以前報告されたT1r2/T1r3甘味受容体の変異体機能解析で、このヘテロ二量体受容体は少なくとも3つ異なるリガンド結合領

域がある可能性が示唆されている（Xu *et al*., 2004; Jiang *et al*., 2004, 2005）。このことは、うま味物質の結合領域が複数存在する可能性を支持するかもしれない。757 in h*T1r3*についてはMSGのみならずIMP感受性にも影響することから、リガンド結合領域というよりは受容体の構造変化といったよりマクロな影響（下記参照）を与えている可能性が示唆された。

味覚閾値と閾値上感受性との関係は明らかではない（Amerine *et al*., 1965; Bartoshuk *et al*., 2000）。例えば、味溶液濃度が上がっていくに連れて、PROPに対しては、味を強く感じていく正の相関がみられ、同じ苦味物質キニーネ塩酸塩に対しては負の相関がみられる。さらにカフェインでは相関がみられないことが報告されている（Keast and Roper, 2007）。それゆえ本実験のHEK細胞を用いた機能解析では、EC_{50} values のみならず、味覚認知閾値に対応する低濃度領域（5、20 mM MSGと0.3、5 mM M+I）でも変異体の有意差解析を行った。この結果、これらの低濃度領域でもMSGに対しては*T1r1*-372Thr は-372Alaに比べて感受性の高いうま味受容体を形成すること、一方、*T1r3*-757Cys は-757Argに比べて感受性の低い受容体を形成することが明らかとなった。

このように本実験で味覚認知閾値とT1r1/T1r3変異体との有意な相関が確認された。IMP味覚認知閾値と*T1r3*-R757Cのアリル頻度との相関については、変異体機能解析においてIMP単独刺激で応答が確認されなかったため、現時点ではなにもいえない。本研究が参考にした過去の報告でも、*T1r1*/*T1r3* 発現HEK細胞においてIMP単独刺激では細胞内Ca濃度上昇がみられないことを報告している（Li *et al*., 2002; Nelson *et al*., 2002; Xu *et al*., 2004）。IMPの明らかなうま味は、唾液に含まれる少量のグルタミン酸（約18 μM）による相乗作用により生じているのではないかと推論している（Yamaguchi., 1991）。

*T1r1*と*T1r3* は、G protein-coupled receptors（GPCR）であり、細胞外領域

（extracellular :EC） のシグナルをGタンパク質に伝える。*T1r* はGPCRのfamily Cに属し、metabotropic glutamate receptors（mGluRs）、$GABA_B$ receptor、the calcium-sensing receptor、some pheromone receptorsなどが含まれる（Pin *et al.*, 2003）。このファミリーの特徴は、リガンドと結合する長い細胞外領域をもつことである。この領域の他に、7回膜貫通領域（transmembrane: TM）と細胞内領域（intracellular regions）が区別される。細胞外領域はさらに、2つの領域、つまり“Venus flytrap module” と呼ばれるN-末端のリガンド結合領域、そして細胞外領域と膜貫通領域をつなぐcysteine-rich domain に分けられる。このファミリーに属するmGluR1の結晶構造が解析されている（Kunishima *et al.*, 2000; Tsuchiya *et al.*, 2002）。mGluR1はホモダイマーとして存在し、リガンド結合によりその構造をactive form - resting formと変化させる。リガンド結合領域は、2つのN末端のligand-binding region（LB）1とC末端側のLB2 でclam-shell-like shapeをつくる。T1r1のmGluR1との領域推定解析では、 *T1r1*-372はmGluR1のLB1 領域に存在している可能性が示唆された。mGluR1のこのLB1領域のMutation analysis で5つの主要なアミノ酸残基のひとつ120番目のアミノ酸をIleをAla置換したところ、受容体の活性が著しく低下することが報告されている（Sato *et al.*, 2003）。これらのことから、*T1r1*-Ala372Thr アミノ酸置換は、MSGに対するリガンド結合領域の構造変化を生じさせ感受性に影響している可能性が示唆された。

T1r3 の膜貫通領域は甘味料cyclamateとインヒビターlactisoleの結合に関わることが報告されている（Jiang *et al.*, 2004, 2005; Xu *et al.*, 2004）。またDocking and mutagenesis 解析で、膜貫通領域の-3、5、6番で結合ポケットを形成していることが予想された。-757 は、膜貫通領域に存在するが、その部位は膜貫通領域の-5 と6番でつくる細胞内ループ内であり、ポケット外であることが予想された。本実験の変異体機能解析において、*T1r3*-757Argから-757Cys変異により、細胞内

Ca濃度上昇は、低濃度（5 mM）から高濃度（20 mM）において低下がみられた。また、タンパク質の発現率では両者に差はみられなかった。以上のことから、*T1r3*-Arg757Cys アミノ酸変異は、*T1r1*と*T1r3*との二量体形成、リガンドが結合した場合の構造変化（active-form vs. resting-form）、タンパク質の膜移動に関わる可能性が示唆された。今後の解析が必要である。

我々の*T1r1*と*T1r3*ジェノタイプ解析は日本人を対象に行った。Kimらは、*T1rs*のSNPアリル頻度について様々な人種による違いを報告している（Kim *et al.*, 2006）。調べられている人種はCameroonian、Amerindian（native Americans）、North European、Japanese、Russian、Hungarian、Chinese、Pakistani である。この中で興味深いのは、*T1r1*-372 アリル頻度が*T1r1/T1r3*の全SNPで唯一、人種差があることであり（ratio of nucleotide G : A was as follows: 0.9 : 0.1 in Cameroonian; 1 : 0 Amerindian; 0.75 : 0.25 in North European; 0.65 : 0.35 in Japanese; 0.95 : 0.05 in Russian; 0.65 : 0.35 in Hungarian; 0.6 : 0.4 in Chinese; 0.94 : 0.06 in Pakistani）、中国人や日本人といったアジア人にうま味感受性が高い*T1r1*-372Thrの比率がたかいことがわかる。このことは、うま味感受性には個人差だけでなく人種差がある可能性を示唆する。生物は様々な異なった食環境の中で生き抜いてきた。この長い歴史の中で我々はアミノ酸摂取の鍵センサーである“うま味受容体”を変化させ適応してきたのかもしれない。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始研究に対する御懇篤なる御指導、御助言、論文の御校閲を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野
二ノ宮裕三教授に謹んで感謝申し上げます。貴重な遺伝子欠損マウスである
T1r3-KOマウスを譲与していただきました、米国マウントシナイ医科大学、
Robert F. Marglskee教授に厚く感謝申し上げます。また、行動学的実験および
分子遺伝学的実験に直接御指導をいただきました重村憲徳准教授に深く感謝申し上げます。最後に様々な面から御協力と御支援をいただきました安松啓子特任講師、吉田竜介助教、村田芳博特任助教、ならびに同教室の事務員の皆様、大学院生の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

Amerine M, Pangborn RM and Roessler E. Principles of sensory evaluation of f ood *New York: Academic Press*, 1965

Bachmanov AA, Li X, Reed DR, Ohmen JD, Li S, Chen Z, Tordoff MG, de Jo ng PJ, Wu C, West DB, Chatterjee A, Ross DA and Beauchamp G.K. Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chem Senses* 26: 925-93 3, 2001

Bartoshuk L. Comparing sensory experience across individuals: recent psychophys ical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chem Senses* 25: 4 47-460, 2000

Blakeslee AF and Salmon TN. Genetics of Sensory Thresholds: Individual Taste Reactions for Different Substances. *Proc Natl Acad Sci USA* 21: 84-90, 1935

Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim UK, Drayna D and Meyerhof W. The molecular basis of individual differences in phenylthioc arbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol* 15, 322-327, 2005

Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse JD and Meyerhof W. The human T AS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet* 32: 397-401, 2002

Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T and Roper S. Th e taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J Neurosci* 16: 3817-3826, 1996

Chaudhari N, Landin AM and Roper SD. A metabotropic glutamate receptor vari ant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci* 3: 113-119, 2000

Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ and Zuker CS. The receptors and cells for

mammalian taste. *Nature* 444: 288-294, 2006

Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Perez CA, Shigemura N, Yoshi da R, Mosinger B Jr, Glendinning JI, Ninomiya Y and Margolskee RF. Trpm5 n ull mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* 31, 253-264, 2006

Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y and Margolskee RF. Detection of sweet and umami taste in the ab sence of taste receptor T1r3. *Science* 301: 850-853, 2003

Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G and Kinnamon SC. ATP signaling is crucial for communication from taste buds t o gustatory nevers. Science 310: 1495-1499, 2005

Fox AL. Six in ten "Taste blindness" to bitter chemical. *Sci News Lett* 9: 249, 1931

Fuller JL. Single-locus control of saccharin preference in mice. *J Hered* 65: 33-36, 1974

Heck GL, Mierson S and DeSimone JA. Salt taste transduction occurs through a n amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223: 403-405, 1984

Hellekant G, Bubois GE, Roberts TW and van de Wel H. On the gustatory effec t of amiloride in the monkey (Macaca mulatta). *Chem Senses* 13: 89-93, 1988

Hellekant G and Ninomiya Y. On the taste of umami in chimpanzee. *Physiol Be hav* 49: 927-934, 1991

Hettinger TP and Frank ME. Specificity of amiloride inhibition of hamster taste responses. *Brain Res* 513: 24-34, 1990

Herness MS. Effect of amiloride on bulk flow and iontophoretic taste stimuli in the hamster. *J Comp Physiol [A]* 160: 281-288, 1987

He W, Yasumatsu K, Varadarajan V, Yamada A, Lem J, Ninomiya Y, Margolskee RF and Damak S. Umami taste responses are mediated by alpha-transduction and alpha-gustducin. *J Neurosci* 24: 7674-7680, 2004

Hisatune C, Yasumatsu K, Takahashi H, Ogawa N, Kuroda Y, Yoshida R, Ninom iya Y and Mikoshiba K. Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 i nositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 282: 37225-37231, 2007

Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N and Roper S D.The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communicati on in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6436-6441, 2007

Jakinovich W Jr. Stimulation of gerbil's gustatory receptors by methyl glycopyran osides. *Chem Senses* 10: 591-604, 1985

Jiang P, Cui M, Zhao B, Liu Z, Snyder LA, Benard LM, Osman R, Margolskee RF and Max M. Lactisole interacts with the transmembrane domains of human T 1R3 to inhibit sweet taste. *J Biol Chem* 280, 15238-15246, 2005

Jiang P, Cui M, Zhao B, Snyder LA., Benard LM, Osman R, Max M and Marg olskee RF. Identification of the cyclamate interaction site within the transmembra ne domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *J Biol Chem* 280: 3 4296-34305, 2005

Jiang P, Ji Q, Liu Z, Snyder LA, Benard LM, Margolskee RF and Max M. The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem* 279: 45068-45075, 2004

Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H and Ninomiya Y. Leptin as a m

odulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11044-11049, 2000

Keast RS and Roper J. A complex relationship among chemical concentration, de tection threshold, and suprathreshold intensity of bitter compounds. *Chem Senses* 32: 245-253, 2007

Kim MR, Kusakabe Y, Miura H, Shindo Y, Ninomiya Y and Hino A. Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Bioche m Biophys Res Commun* 312: 500-506, 2003

Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N and Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to pheny lthiocarbamide. *Science* 299: 1221-1225, 2003

Kim UK, Wooding S, Riaz N, Jorde LB and Drayna D. Variation in the human TAS1R taste receptor genes. *Chem Senses* 31, 599-611, 2006

Kitagawa M, Kusakabe Y, Miura H, Ninomiya Y and Hino A. Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 236-242, 2001

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanish i S, Jingami H and Morikawa K. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971-977, 2000

Kusakabe Y, Yasuoka A, Asano-Miyoshi M, Iwabuchi K, Matsumoto I, Arai S,E mori Y and Abe K. Comprehensive study on G protein alpha-subunits in taste b ud cells with special reference to the occurrence of Galphai2 as a major Galpha species. *Chem Senses* 25: 525-531, 2000

Li X, Li W, Wang H, Cao J, Maehashi K, Huang L, Bachmanov AA, Reed DR,

Legrand-Defretin V, Beauchamp G.K and Brand JG. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genet*: 127-35, 2005

Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M and Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4692-4696, 2002

Lugaz O, Pillias AM and Faurion A. A new specific ageusia: some humans can not taste l-glutamate. *Chem Senses* 27: 105-115, 2002

Maruyama Y, Pereira E, Margolskee RF, Chaudhari N and Roper SD. Umami res ponses in mouse taste cells indicate more than one receptor. *J Neurosci* 26: 2227 -2234, 2006

Max M, Shanker YG., Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Da mak S and Margolskee RF. Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is a llelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet* 28: 58-63, 2001

Montmayeur JP, Liberles SD, Matsunami H and Buck LB. A candidate taste rece ptor gene near a sweet taste locus. *Nat Neurosci* 4: 492-498, 2001

Moroni F, Lombardi G, Thomsen C, Leonardi P, Attucci S, Peruginelli F, Torregr ossa SA, Pellegrini-Giampietro DE, Luneia R and Pellicciari R. Pharmacological characterization of 1-aminoindan-1, 5-dicarboxylic acid, a potent mGluR1 antagoni st. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 721-729, 1997

Nakashima K, Katsukawa H, Sasamoto K and Ninomiya N. Behavioral taste simi larities and differences among monosodium L-glutamate and glutamate receptor a gonists in C57BL mice. *J Nute Sci Vitaminol* (Tokyo) 47: 161-166, 2001

Nakashima K, Shigemura N, Yasumatsu K, Yoshida R, Katsukawa H and Ninomi ya Y. Behavioral responses implicating brain-mGluR4 as a taste receptor for glut

amate in C57BL mice. *14 th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OLFACTION A ND SMELL* (abstract), 2004

Nakamura Y, Sanematsu K, Ohta R, Shirosaki S, Koyano K, Nonaka K, Shigem ura N and Ninomiya Y. Diurnal variation of human sweet taste recognition thres holds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes* 57: 2661-2665, 2008

Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ and Zuker CS. An amino-acid taste receptor. *Nature* 416: 199-202, 2002

Nelson G., Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ and Zuker CS. Mam malian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381-390, 2001

Nie Y, Vigues S, Hobbs JR, Conn G.L and Munger SD. Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr B iol* 15: 1948-1952, 2005

Ninomiya K. Umami: A universal taste. *Food Rev Int Natl* 18: 23-28, 2002

Ninomiya Y and Funakoshi M. Behavioral discrimination between glutamate and the four basic taste substances in mice. *Comp Biochem Physiol A* 92: 365-370, 1 989

Ninomiya Y and Funakoshi M. Peripheral neural basis for behavioural discrimina tion between glutamate and the four basic taste substances in mice. *Comp Bioch em Physiol A* 92: 371-376, 1989

Ninomiya Y, Mizukoshi T, Higashi T, Katsukawa H and Funakoshi M. Gustatory neural responses in three different strains of mice. *Brain Res* 302: 305-314, 1984 a.

Ninomiya Y, Nakashima K, Fukuda A, Nishino H, Sugimura T, Hino A, Danilov

a V and Hellekant G.. Responses to umami substances in taste bud cells innervat ed by the chorda tympani and glossopharyngeal nerves. *J Nutr 130* (4s Suppl): 9 50S-953S, 2000

Ninomiya Y, Sako N and Funakoshi M. Strain differences in amiloride inhibition of NaCl responses in mice, Mus musculus. *J Comp Physiol [A]* 166: 1-5, 1989

Ninomiya Y, Tanimukai T, Yoshida S and Funakoshi M. Gustatory neural respons es in preweanling mice. *Physiol Behav* 49: 913-918, 1991

Pasquet P, Monneuse MO, Simmen B, Marez A and Hladik CM. Relationship be tween taste thresholds and hunger under debate. *Appetite* 46: 63-66, 2006

Pasquet P, Oberti B, El Ati J and Hladik CM. Relationships between threshold-b ased PROP sensitivity and food preferences of Tunisians. *Appetite* 39: 167-173, 2 002

Pin JP, Galvez T and Prézeau L. Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98: 325-354, 2003

Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF and Ko lesnikov SS. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammaliant aste cells. *EMBO J* 26: 657-667, 2007

Sainz E, Korley JN, Battey JF and Sullivan SL. Identification of a novel membe r of the T1R family of putative taste receptors. *J Neurochem* 77: 896-903, 2001

San Gabriel A, Uneyama H, Yoshie S and Torii K. Cloning and characterization of a novel mGluR1 variant from vallate papillae that functions as a receptor for L-glutamate stimuli. *Chem Senses* 30: i25-i26, 2005

Sato T, Shimada Y, Nagasawa N, Nakanishi S and Jingami H. Amino acid muta

genesis of the ligand binding site and the dimer interface of the metabotropic gl utamate receptor 1: identification of crucial residues for setting the activated state. *J Biol Chem* 278: 4313-4321, 2003

Shigemura N, Ohta R, Kusakabe Y, Miura H, Hino A, Koyano K, Nakashima K and Ninomiya Y. Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by i nfluencing peripheral taste structures. *Endocrinology* 145: 839-847, 2004

Shin YK, Martin B, Golden E, Dotson CD, Maudsley S, Kim W, Jang HJ, Matt son MP, Drucker DJ, Egan JM and Munger SD. Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J Neurochem* 106: 455-463, 2008

Spector AC, Guagliardo NA and St. John SJ. Amiloride disrupts NaCL vs KCI discrimination performance: implications for salt taste coding in rats. *J Neurosci* 16: 8115-8122, 1996

Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, M argolskee RF and Nilius B. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivi ty of sweet taste. *Nature* 438: 1022-1025, 2005

Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Harada H, Morotomi T, Kawano S, Shigemoto R and Toyoshima K. Expression of the metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the taste hairs of taste buds in rat gustatory papillae. *Arch Histol Cytol* 65: 9 1-96, 2002

Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Kawano S, Shigemoto R and Toyoshima K. Expr ession of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae. *Cell Tissue Res* 313: 29-35, 2003

Toms NJ, Jane DE, Kemp MC, Bedingfield JS and Roberts PJ. The effects of (RS)-alpha-cyclopropyl-4-phosphonophenylglycine((RS)-CPPG) a potent and selecti

ve metabotropic glutamate receptor antagonist. Br J Pharmacol 119: 851-854, 199 6

Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N, Jingami H and Morikawa K. Structural vi ews of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd^{3+}. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2 660-2665, 2002

Ueda T, Ugawa S, Yamamura H, Imaizumi Y and Shimada S. Functional interact ion between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci* 23: 7376-7380, 2003

Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M and Li X. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci US A* 101: 14258‑14263, 2004

Yamaguchi S. The synergistic taste effect of monosodium glutamate and disodiu m 5’-inosinate. *J Food Sci* 32: 473-478, 1967

Yamaguchi S. The synergistic taste effect of monosodium glutamate and disodiu m 5'-inosinate. *J Food Sci* 32: 473-478, 1970

Yamaguchi S. Basic properties of umami and effects on humans. *Physiol Behav* 49: 833-841, 1991

Yasumatsu K, Katsukawa H, Sasamoto K and Ninomiya Y. Recovery of amilorid e-sensitive neural coding during regeneration of the gustatory nerve: behavioral-ne ural correlation of salt taste discrimination. *J Neurosci* 23: 4362-4368, 2003

Yasumatsu K, Yoshida R, Shigemura N, Damak S, Margolskee RF and Ninomiya Y. Multiple receptors transduction pathways and fiber types underline umami tast e in mice. *Chem Senses* 31: E88-E89 (abstract), 2006

Yasuo T, Kusuhara Y, Yasumatsu K and Ninomiya Y. Multiple receptor systems for glutamate detection in the taste organ. *Biol Pharm Bull* 31: 1833-1837, 2008

Yoshii K, Yokouchi C and Kurihara K. Synergistic effects of 5'-nucleotides on rat taste responses to various amino acids. *Brain Res* 367: 45-51, 1986

Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS and Ryba NJ. Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112: 293-301, 2003

Zhao G.Q, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ and Zuker CS. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115: 255-266, 2003