

## 鳥類および哺乳類のモデル動物を用いた味覚受容および味覚修飾機構に関する研究

川端, 由子

<https://hdl.handle.net/2324/4475045>

---

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (歯学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :



鳥類および哺乳類のモデル動物を用いた味覚受容および  
味覚修飾機構に関する研究

川 端 由 子

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

重 村 憲 徳 教 授

九州大学大学院歯学研究院  
口腔機能解析学分野

## 目 次

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 発表論文                                        | 2  |
| 要旨                                          | 4  |
| 序論                                          | 5  |
| 第一章                                         | 7  |
| ニワトリの脂肪味受容における口腔リパーゼと脂肪酸受容体の関与              |    |
| 緒言                                          | 8  |
| 材料と方法                                       | 10 |
| 結果                                          | 14 |
| 考察                                          | 23 |
| 第二章                                         | 25 |
| 抗不整脈薬フレカイニドはマウスにおいて Otopetrin 1 を介して酸味を増強する |    |
| 緒言                                          | 26 |
| 材料と方法                                       | 28 |
| 結果                                          | 33 |
| 考察                                          | 42 |
| 総括                                          | 45 |
| 謝辞                                          | 46 |
| 参考文献                                        | 47 |

## 発表論文

本研究の一部は下記の論文に報告した。

Yuko Kawabata, Fuminori Kawabata, Shotaro Nishimura, Shoji Tabata,  
Oral lipase activities and fat-taste receptors for fat-taste sensing in chickens.  
Biochemical and Biophysical Research Communications. 495(1). 131-135. 2018.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17321058>

また、本文の内容の一部は下記の学会において発表した。

- 日本畜産学会第 121 回大会, 東京, 2016 年 3 月
- ISOT2016 The 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 神奈川, 2016 年 6 月
- 日本味と匂学会第 51 回大会, 兵庫, 2017 年 9 月
- The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 福岡, 2017 年 11 月
- 第 60 回 歯科基礎医学会学術大会, 福岡, 2018 年 9 月
- 日本味と匂学会第 52 回大会, 埼玉, 2018 年 10 月
- 日本味と匂学会第 53 回大会, 高知, 2019 年 9 月
- 第 61 回 歯科基礎医学会学術大会, 東京, 2019 年 10 月
- ISOT2020 The 18th International Symposium on Olfaction and Taste, Virtual meeting, (アメリカ), 2020 年 8 月
- 第 62 回 歯科基礎医学会学術大会, オンライン開催 (鹿児島), 2020 年 9 月

## 要 旨

味覚受容機構の基礎的研究として、まず鳥類のモデル動物であるニワトリを用いて脂肪味の受容に関する研究を行った。ニワトリの口腔組織に機能的な脂肪酸受容体 G-protein coupled receptor 120 (GPR120)が存在していること、ならびにニワトリは行動試験において脂肪味を認識できることが報告されていた。しかしながら、トリグリセリドは GPR120 のような脂肪酸受容体によって認識されるために遊離脂肪酸に消化される必要があるものの、脂質消化酵素リパーゼの活性がニワトリの口腔組織に存在するかどうかは依然として不明であった。本研究では、はじめに脂肪味受容体候補遺伝子である *GPR120* および *cluster of differentiation 36 (CD36)*に着目し、塩基配列の決定、遺伝子発現解析および受容体機能解析を行った。ニワトリ口蓋から *CD36* をクローニングし、塩基配列を決定した。また、RT-PCR を用いて、*GPR120* と *CD36* がニワトリ口腔および消化管組織に幅広く発現していることを確認した。さらに、ニワトリ GPR120 に作用する脂肪酸をスクリーニングし、新たに 2 種類の脂肪酸でも濃度依存的な活性を示すこと、またこの活性化はマウス GPR120 アンタゴニストである AH7614 により濃度依存的に阻害されることを明らかにした。次に、RT-PCR によって、いくつかのリパーゼ遺伝子が口腔および消化管組織の両方で発現していることを確認した。最後に、リパーゼの基質として蛍光トリグリセリドアナログを用いて口腔組織のリパーゼ活性を解析したところ、腺胃や脾臓と同様に口腔組織において機能的なリパーゼが存在することを見出した。

次に、味覚の修飾に起因するような薬剤性味覚障害に関する研究を哺乳類のモデル動物であるマウスを用いて行った。薬剤性味覚障害は生活の質を低下させるが、薬剤が味覚障害を引き起こすメカニズムはまだ解明されていない。本研究では、抗不整脈薬であるフレカイニドの味覚機能への影響を調べた。フレカイニドを単回投与されたマウスは、酸味物質に対する忌避性の増加および味覚神経応答の上昇を示した。フレカイニドは、酸味受容体であるマウス otopetrin 1 (Otop1)を発現する HEK293T 細胞の HCl に対する応答を増強した。さらに、フレカイニドは味蕾オルガノイドの成長を抑制した。これらの結果は、フレカイニドがマウス Otop1 と直接相互作用して、酸味物質に対する味細胞の応答を増強し（短期的効果）、味細胞の成長を阻害する（長期的効果）ことを示唆している。

## 序 論

味覚は、動物にとって食物の摂取をはじめ、個体の成長や健康維持に欠かせない感覚である。その情報は、甘い（糖質）・塩辛い（ミネラル）・苦い（毒物）等の味質（栄養素・毒物等）の認知や、おいしい・もっと食べたいといった情動だけでなく、唾液・消化液・消化管ホルモン分泌の反射的調節や咀嚼・嚥下運動を調節する起点となる。最近、味覚受容体が口腔をはじめ、全身の幅広い臓器に発現していることが報告され、味覚が臓器関連し生体恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきているが、依然として個別の味質レベルの味覚受容機構には不明な点が多い。

また、味覚が異常をきたした“味覚障害”は、quality of life (QOL)の低下や咀嚼・嚥下運動の障害を引き起こすなど全身の変調につながる可能性が示唆されている。味覚障害は患者数が多く（24万人、2006年日本口腔・咽頭科学会）、年代別発症率は加齢に伴って増加し、60歳以上が全体の64%に上る。発症要因は多種あるが、中でも薬剤性は約20%と多くを占める。この“薬剤性味覚障害”は、約280種類もの薬剤添付文書に味覚異常を起こす可能性が記載されているものの（平成23年厚生労働省）、原因分子の同定や発症の分子機構はほとんど未解明のままであり、これらは超高齢化社会における喫緊の課題といえる。

以上のことから、本研究では、動物における味覚受容機構（第一章）、さらには味覚器あるいは味覚受容体における味受容を修飾することで引き起こされる薬剤性味覚障害（第二章）の発症機構を明らかにすることを目的とした。

### 第一章 ニワトリの脂肪味受容における口腔リパーゼと脂肪酸受容体の関与

ニワトリは、長年進化・発生研究等に多用されてきたモデル動物である。しかし、ニワトリを始め鳥類を用いた味覚研究は1800年代から行動学や形態学レベルで行われてきたものの、分子レベルではほとんど不明であり、どの味質をどのように受容するかについては科学的根拠が乏しかった。最近になって、ニワトリゲノム情報を用いた味覚受容体の遺伝子発現解析、その受容体強制発現細胞系による機能解析、および味行動解析を用いたアプローチにより、ニワトリの味覚受容機構が明らかになりつつある。脂肪味に関しては、機能的な脂肪酸受容体 G-protein coupled receptor 120 (GPR120)が口腔組織に存在していること、また行動試験において脂肪味を認識できることが報告されている。しかし、脂肪味（脂肪酸）受容体への結合には、摂取した油脂（トリグリセリド）が消化され脂肪酸の構造をとる必要があると考えられるものの、ニワトリの口部における消化酵素リパーゼの存在についてはほとんど未解明であった。そこで本研究では、脂肪味受容体候補遺伝子である *GPR120* および *cluster of differentiation 36 (CD36)* について、塩基配列、遺伝子発現解析およびカルシウムイメージングによる機能解析、およびニワトリ口部における脂質消化酵素リパーゼ遺伝子の発現解析、ならびに酵素活性を調べた。

## 第二章 抗不整脈薬フレカイニドはマウスにおいて Otopetrin 1 を介して酸味を増強する

薬剤の服用により味覚障害が生じることはよく知られている。例えば、アミロライド（利尿薬、上皮性 Na チャネル (ENaC) 遮断薬）は、Na<sup>+</sup>や Li<sup>+</sup>塩および甘味料の味覚強度を低下させ<sup>1</sup>、アセタゾラミド（炭酸脱水酵素阻害剤）は、発泡性ミネラルウォーターにおける塩味の認知を低下させ、甘味および苦味を高めること<sup>2</sup>が報告されている。しかしこれらの味覚障害発症の分子基盤についてはほとんど不明である。そこで本研究では、臨床的に味覚障害を引き起こすことが報告されている抗不整脈薬のフレカイニドについて、マウスを用いて味行動、味神経、味細胞、および味受容体レベルで解析することにより、味覚系への作用を検討した。

## 第一章

ニワトリの脂肪味受容における口腔リパーゼと脂肪酸受容体の関与  
Oral lipase activities and fat-taste receptors for fat-taste sensing in chickens

## 緒 言

油脂は、炭水化物とタンパク質と共に、食物における三大栄養素の一つである。油脂の口腔内における化学受容は、主に物性感覚と嗅覚によるものと広く考えられてきた<sup>3,4</sup>。しかし、近年になり、長鎖脂肪酸の検知に味覚が関与していることが明らかになってきている。最初に、遅延性整流性 K チャネルの阻害薬を用いた実験<sup>5</sup>から、II 型味細胞が遊離脂肪酸 (FFA) の刺激により興奮することが明らかになった。現在までに、脂肪味受容体として、CD36、GPR40、GPR120、およびその他の GPRs が報告されている。また、脂肪酸トランスポーターである CD36 が味蕾に発現していること<sup>6</sup>、さらに CD36 遺伝子欠損マウスでは、リノレン酸や大豆油に対する嗜好性行動が減弱する<sup>7,8</sup>ことが報告された。脂肪酸受容体 GPR40 が有郭乳頭の I 型味細胞に、GPR120 が有郭乳頭と茸状乳頭の II 型味細胞に発現し、脂肪酸の検出に関与している可能性が報告されている。一方で、GPR40 がラットやマウスの味蕾に発現しないとする報告<sup>9</sup>や、野生型 (C57BL6J) マウスと GPR120 遺伝子欠損マウス間で脂肪酸の摂取量に差が認められないことが報告されている<sup>10,11</sup>。短鎖脂肪酸や中鎖脂肪酸に応答する候補 G-protein coupled receptor (GPCR) としては、GPR41 や GPR43 (短鎖脂肪酸)<sup>12</sup>、GPR84 (中鎖脂肪酸)<sup>13</sup>が報告されている。これらが齧歯類の味覚乳頭に発現することが報告されている<sup>14</sup>が、機能については不明なままである。

脂質の口腔感覚の分子メカニズムは、ニワトリにおいてほとんど不明である。このメカニズムを詳細に解明することは、ニワトリにおける味受容の基本的な情報を提供することにつながり、新しい飼料を開発することにおいても役立つと考えられる。これまでに、ニワトリの口腔組織から *GPR120* をクローニングし、ニワトリ GPR120 (cGPR120) 発現細胞がニワトリ飼料において主な脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸によって活性化されること、またニワトリが行動試験においてオレイン酸とリノール酸を多量に含むコーン油に嗜好性を示すことを明らかにした<sup>15</sup>。

GPR120 ノックアウトマウスは、口腔 FFA 刺激に対して味神経応答の減少を示し、また野生型マウスと比較してリノール酸に対する嗜好性が低下した<sup>16</sup>。さらに、脂肪酸トランスポーターである CD36 のノックアウトマウスは、5 分間リック試験においてリノール酸に対する嗜好性およびリノール酸を検出する能力を欠いていた<sup>17</sup>。GPR120 および CD36 は共に齧歯類およびヒトの味細胞に発現していることが知られている<sup>6,9,18,19</sup>。したがって、GPR120 および CD36 は共に齧歯類とヒトにおいて脂肪味受容体である可能性が高い。しかしニワトリにおいては、これらの脂肪味受容体候補の発現様式は解析されていない。

GPR120 および CD36 のアゴニストは長鎖脂肪酸であるので、食物あるいは飼料に含まれるトリグリセリドは口腔リパーゼによって長鎖脂肪酸に消化されなければ口腔内 GPR120 および CD36 に結合できない。Kawai らは、全トリグリセリドのうち少数がラットの有郭乳頭に 1 秒接触しただけで FFA に消化されることを見出したことから機能的な口腔リパーゼがラットの口腔組織に存在していることを明らかにした<sup>20</sup>。ヒトにおいて認識

される脂肪味が口腔リパーゼ活性を阻害することによって減少することも報告されている<sup>21</sup>。これらの知見は、脂肪味センサーの存在や口腔リパーゼ活性が脂肪味を検出するために重要であることを示唆している。しかしながら、ニワトリにおいて、リパーゼ活性が口腔組織に存在しているかどうかはまだ不明である。

本研究において、口腔および消化管組織における二つの推定される脂肪味センサーGPR120とCD36、および、いくつかのリパーゼ遺伝子の発現パターンに焦点を当てた。また、GPR120の機能解析やニワトリの口腔リパーゼ活性の解析を行った。その結果、GPR120に作用する新たな脂肪酸を同定することができた。二つの脂肪味センサー遺伝子とリパーゼ遺伝子は口腔組織で発現していること、およびニワトリも口腔組織において機能的なリパーゼを有していることを見出した。これらの発見は、ニワトリが口腔組織で脂肪味を検出する機能的なメカニズムを持つことを示唆している。

## 材料 および 方法

### 動物

ロードアイランドレッド種 1-2 週齢のニワトリヒナを使用した。本研究は、九州大学動物実験指針、動物愛護と管理に関する法律（法律第 105 号、1973 年 10 月 1 日）、および、日本政府動物飼養および保管に関する通知に従い実施された（通知第 6 号; 1980 年 3 月 27 日）。

### 化合物

以下の通りである。リノール酸 (L1376、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、オレイン酸 (O1008、Sigma-Aldrich)、パルミチン酸 (P0500、Sigma-Aldrich)、 $\alpha$ -リノレン酸 (L2376、Sigma-Aldrich)、ステアリン酸 (S4051-5G、Sigma-Aldrich)、AH7614 (RSD5256/10、R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)、ATP (A2383、Sigma-Aldrich)、G418 (G8168、Sigma-Aldrich)。

### ニワトリ CD36 の構築と塩基配列の同定

ニワトリの口蓋 (図 1-1) から total RNA を単離し、SuperScript IV First-strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。推定されるニワトリ CD36 (cCD36) のタンパク質コード読み枠 open reading frame (全長 ORF) を KOD -plus- Neo (東洋紡、大阪、日本) を用いた nested-PCR により 2 段階で増幅した。PCR のプログラムを次に示した：94°C; 2 分、98°C; 10 秒 > 1 分; 68°C を 25 + 20 サイクル。PCR 反応溶液は全量 20  $\mu$ l で、組成は次の通りである：

10 $\times$ KOD バッファー、各プライマーペア (0.2  $\mu$ M)、dNTP mixture (各 0.2 mM)、MgSO<sub>4</sub> (1 mM)、cDNA (20 ng)、および 0.4 U DNA ポリメラーゼ (KOD -Plus- Neo、東洋紡)。PCR プライマーは cCD36 のゲノム情報 (NM\_001030731.1) に基づき、エクソンを挟んで設計した。全長 ORF の PCR 産物は、In-Fusion HD cloning Kit (Takara Bio、大津、日本) を用いて、pcDNA3.1(+) 発現ベクターとの in-Fusion 反応に供した。In-Fusion 産物は、ECOS DH5  $\alpha$  (Takara Bio) に形質転換し、LB/アンピシリン寒天培地に播種し、37°C、一晩培養した。EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (Takara Bio) を用いて、コロニーチェックを行った。目的サイズの遺伝子の挿入が確認されたコロニーを 1.5 ml TB/アンピシリン液体培地で 37°C、8 時間前培養した後、200 ml LB/アンピシリン液体培地にスケールアップし、37°C、一晩培養した。培養液から、メーカーマニュアルに従い QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN-Japan、東京、日本) を用いて cCD36/pcDNA3.1(+) プラスミ

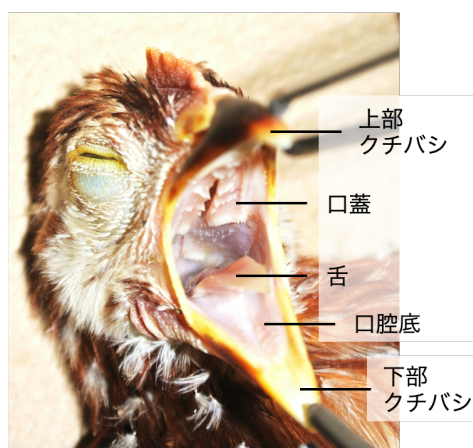


図1-1. ロードアイランドレッド種 1週齢ヒナ口部組織図

## RT-PCR

逆転写酵素の存在下または非存在下で一本鎖 cDNA 合成反応を進めた。プライマーは The US National Center for Biotechnology Information の遺伝子データベースにより設計した (表 1-1)。PCR 反応溶液は全量 10  $\mu$ l で、組成は超純水、5x PrimeSTAR GXL バッファー、dNTP Mixture (各 2.5 mM)、各プライマーペア (0.2  $\mu$ M)、cDNA (1–6 ng) および PrimeSTAR GXL DNA ポリメラーゼ (0.25 units) (Takara Bio) である。下記の条件で PCR に供した：98°C; 10 秒、55°C あるいは 60°C; 15 秒、68°C; 1 kb あたり 1 分を 40 サイクル。PCR 産物 5  $\mu$ l を、ゲル電気泳動 (1.8 あるいは 2.3% TAE アガロースゲル with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium、California、CA、USA)) に供して、UV 照射下で検出した。

## カルシウムイメージング

クチバシ

口蓋

口腔底

舌尖

嗦囊

腺胃

筋胃

空腸

回腸

直腸

十二指腸

図1-2. ニワトリの口腔および消化管組織模式図

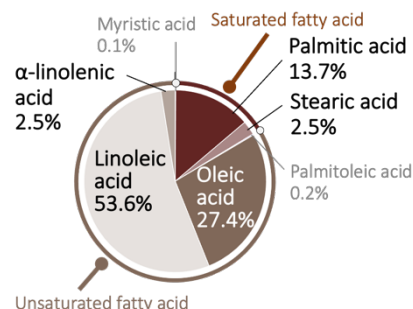


図1-3. 飼料中の脂肪酸組成

日本標準飼料成分表 (2001年版)  
中央畜産会 94-95 (2001)

児血清 (FBS、GE Healthcare、Buckinghamshire、UK)を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 高グルコース、043-30085、FUJIFILM Wako Pure Chemical、大阪、日本) で、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。cGPR120 タンパク質を発現させるため、エレクトロポレーション装置 NEPA21 (NEPAGENE、市川、日本)を用いて、Opti-MEM I Reduced-Serum Medium, Liquid (Gibco、Waltham、MA、USA)中で、cGPR120 cDNA を HEK293T 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞は、ポリ-D-リジン (168-19041、FUJIFILM Wako Pure Chemical)でコーティングされた 96 ウェルブラックボトム マイクロプレート (3514、Coaster、AZ、USA)に約 31,000 細胞/ウェルで播種され、10% FBS を含む DMEM 培地に置換し、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°C、48 時間培養した。48 時間の培養後、1 ウェルあたり Fura 2-AM (5  $\mu$ M) (Calcium Kit II-Fura 2、CS33、同仁化学、熊本)溶液を負荷した。全量 10 ml Fura 2-AM 溶液の組成を次に示した：5 ml Quenching Buffer、Hank's HEPES Buffer ( $\times 10$ )、Pluronic F-127 (0.08%)、Probenecid (2.5 mM)、および Fura 2-AM (5  $\mu$ M)。測定前に 5% CO<sub>2</sub>、37°Cで 1 時間培養した。Infinite F200 PRO (TECAN、Männedorf、Switzerland)を用いて、25°C恒温下、1.7 秒間隔で蛍光強度の継時変化 (励起波長 340/380 nm、蛍光波長 510 nm)を測定した。ベースラインを 20 秒間読み取った後、7.7 倍濃度の試験溶液 (最終濃度 0.1–3 mM リノール酸、0.1–3 mM オレイン酸、0.1–3 mM パルミチン酸、0.1–3 mM  $\alpha$ -リノレン酸、0.1–3 mM ステアリン酸、および、100  $\mu$ M リノール酸と 10–100  $\mu$ M AH7614 (GPR120 アンタゴニスト))を溶解した 1x Bath solution を添加し、さらに 60 秒間測定した。1x Bath solution の組成は次の通りである：140 mM NaCl、5 mM KCl、10 mM HEPES、2 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、および 10 mM Glucose (pH 7.0 に調整)。応答値は、340/510 の値を 380/510 の値で割った蛍光相対値を用いて、最大値と最小値との差を取り、蛍光変化値 ( $F_{\text{max-min}}$ )として算出した(図 1-4)。

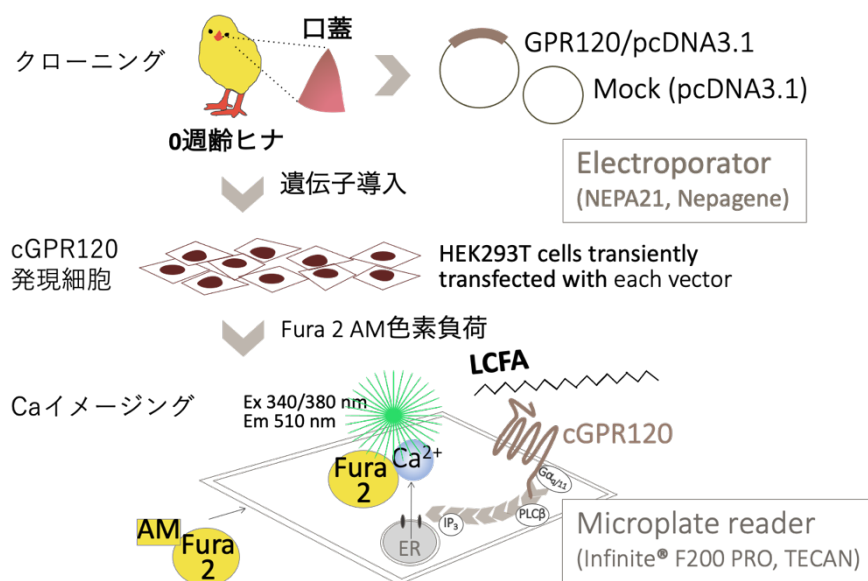


図1-4. GPR120活性測定系の概略図

## cGPR120 安定的発現培養細胞系の構築

GPR120 活性測定において、一過的強制発現細胞は短期的に簡便に結果を得ることができるが、実験のたびにトランスフェクションを行う必要があり、多量のプラスミド DNA や導入試薬等、手間やコストがかかる。一方で安定的発現培養細胞では構築するには長期間を費やすが、構築できてしまえば GPR120 が恒常的に発現するため継代培養を行うだけでよく、実験効率が向上する。そこで、cGPR120 安定的発現培養細胞の構築を行った。

まず ScreenFect A (2999-73203、FUJIFILM Wako Pure Chemical)を用いて cGPR120/pcDNA3.1(+)を HEK293T 細胞に遺伝子導入した。その後、10% ウシ胎児血清 (FBS、GE Healthcare)を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 高グルコース、043-30085、FUJIFILM Wako Pure Chemical)で、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下 48 時間培養した。500 µg/ml G-418 硫酸塩含有 DMEM 培地で 4 週間選択培養を行った。生存した単クローン株をクローニングリングにより移植し、クローンごとに異なるディッシュで培養した。問題なく増殖する細胞株について、カルシウムイメージングにより GPR120 活性を測定し、脂肪酸に対する応答性の高い株を取得した。

## リパーゼ活性

ヒナを安楽死させ、口蓋、舌尖、クチバシ (上下クチバシの混合物)、腺胃および脾臓をすぐに収集した。これらの各組織から 200 mg を秤量・採取し、破碎した。その後冷 PBS で洗浄し、バッファー (1 ml 冷 20 mM Tris、pH 7.5 および 150 mM NaCl)でホモジナイズした。10,000×*g*、4°Cで 10 分間遠心後、上清を回収して、リパーゼアッセイに使用した。Fluorometric Lipoprotein

Lipase (LPL) Activity Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA)を用いて、メーカーマニュアルに従い、各組織のリパーゼ活性を測定した。なお、本キットでは LPL のみでなく、他の内皮および肝リパーゼ活性も含めて検出された。また、本キットではリパーゼ基質として蛍光トリグリセリドアナログを用いた。リパーゼによって加水分解されていない場合、基質は非蛍光で消光された状態のままだが、加水分解されることにより、蛍光産物が生成される。Infinite200PRO 蛍光マイクロプレートリーダー (Tecan Group)を用いて蛍光産物を測定した (図 1-5)。

## 統計解析

値は平均±SEM として表した。リパーゼ活性データは Tukey 検定によって解析した。カルシウムイメージングは、unpaired t-test を使用した。統計解析には、IGOR Pro ソフトウェアパッケージ (Version 6.34J; WaveMetrics、Portland、OR、USA)を用いた。 $P < 0.05$  で統計的に有意であるとみなした。

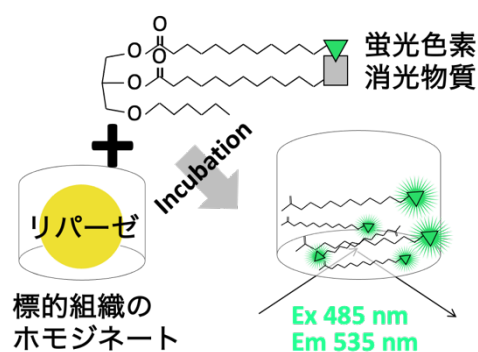


図1-5. リパーゼ活性測定の原理

## 結果

## ニワトリ口蓋からの CD36 のクローニングおよび塩基配列の決定

まず、RT-PCR によってニワトリの口蓋で *cCD36* mRNA を検出した（データ示さず）。次に、ニワトリ口蓋から *cCD36* 遺伝子をクローニングした。大腸菌中で培養・増幅した後、クローニングした *cCD36* cDNA の配列が、2 つの塩基を除いて NCBI データベース（NM\_001030731.1）のセキショクヤケイ（*Gallus gallus*）ゲノム配列の cDNA 配列と一致することを確認した（図 1-6）。セキショクヤケイはニワトリの祖先種と考えられている。クローニングした *cCD36* 遺伝子の翻訳産物は、2 つのアミノ酸を除いてデータベース（NM\_001030731.1）と一致した。-

# 口腔および消化管組織における CD36 および GPR120 の遺伝子発現解析

RT-PCRによりヒナ3羽の *CD36* と *GPR120* の発現を解析した。ヒナ1羽における代表データを図1-7に示した。*GPR120* mRNAは、口蓋、口腔底、嗦嚢、腺胃、筋胃、十二指腸、空腸、回腸、および結腸で発現していた。*CD36* mRNAは、上クチバシ、下クチバシ、口蓋、口腔底、舌尖、嗦嚢、腺胃、筋胃、十二指腸、空腸、回腸、および結腸で発現していた。調べた組織のいずれにおいても、逆転写酵素を含まないネガティブコントロール反応 (RT-) では、2つの遺伝子のいずれにもバンドは観察されなかった (データ示さず)。

## GPR120 に作用する脂肪酸の探索

cGPR120 一過的発現 HEK293T 細胞において、オレイン酸濃度依存的 (0.1-3 mM) に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加した (図 1-8A)。また空ベクターを発現させた Mock 細胞と比較して、cGPR120 発現細胞では、リノール酸 (LA, 0.1-3 mM)、オレイン酸 (0.1-3 mM)、パルミチン酸 (0.1-3 mM)、および  $\alpha$ -リノレン酸 (0.1-3 mM) に対して濃度依存的に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇した (図 1-8B-E)。一方、ステアリン酸 (0.1-3 mM) に対しては変化しなかった (図 1-8F)。

次にマウス GPR120 の阻害剤として知られる AH7614 による cGPR120 への影響を調べた。cGPR120 安定的発現細胞株の構築に成功し、これを用いてリノール酸 (LA) と AH7614 の混合溶液を添加した結果、LA (0.1 mM) による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は AH7614 濃度依存的 (0–100  $\mu\text{M}$ ) に抑制された (図 1-9A)。また、遺伝子導入をしていない HEK293T 細胞と比較して、cGPR120 安定的発現細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、AH7614 濃度依存的 (0–100  $\mu\text{M}$ ) に減少した (図 1-9B)。

口腔および消化管組織におけるリパーゼ遺伝子の遺伝子発現解析

RT-PCRによりヒナ3羽におけるリパーゼ遺伝子の発現を解析した。ヒナ1羽における代表データを図1-10に示した。ニワトリの味蕾が密集している口蓋では、*LPL*、*LIPG*、*LIP1*、*LIPH*、*CEL*、*ATGL*のmRNAが検出された。*LPL*、*LIPG*、*LIPH*、*ATGL*

の遺伝子は口腔や消化管組織で広く発現していた。*LIPI*は脳、クチバシ、口腔底、舌尖、または空腸では発現していなかったが、他の組織では *LIPI*を発現していた。*CEL*はクチバシを除くすべての組織で発現していた。調べた組織のいずれにおいても、逆転写酵素を含まないネガティブコントロール反応 (RT-)では、これらリパーゼ遺伝子のバンドは観察されなかった (データは示さず)。

#### **ニワトリ口腔組織におけるリパーゼ活性測定**

本研究で調べた全ての組織でリパーゼ活性が検出された (図 1-11)。興味深いことに、口腔組織間で有意差はなかったが、クチバシのリパーゼ活性が最も高かった。口腔組織のリパーゼ活性は腺胃とほぼ同じレベルで、脾臓より低値を示した (20-50%の活性)。

表 1-1. RT-PCR に用いたプライマー<sup>22</sup>

| Target gene                           | Abbreviation  | Accession no.  | Primer forward          | Primer reverse        | Product size (bp) |
|---------------------------------------|---------------|----------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>G-protein coupled receptor 120</i> | <i>GPR120</i> | XM_003641481.2 | AGTGTCACCTGGTGAGGAGATT  | AACACAATGAGGGCTCGGAA  | 254               |
| <i>Cluster of differentiation 36</i>  | <i>CD36</i>   | NM_001030731.1 | TGCACCCTGTCAAAGGAGAG    | GTTCAAAACGGGCAGCGTTA  | 389               |
| <i>Lipoprotein lipase</i>             | <i>LPL</i>    | NM_205282.1    | CCGATCCCGAAGCTGAGATGA   | AGAGCCTCGAGTGTAGGTGT  | 572               |
| <i>Endothelial lipase</i>             | <i>LIPG</i>   | XM_424455.5    | TTGCCACCAACTCTACACC     | AGGGTCCAAGCCTGTGATTCT | 206               |
| <i>Lipase I</i>                       | <i>LPI</i>    | XM_416675.4    | AGGAGGAGTCATGAATTGCAGAA | CCGCTGGATCAAGACCTGTA  | 726               |
| <i>Lipase H</i>                       | <i>LIPH</i>   | XM_015277163.1 | TCAATTCGACAGCCTCCAAGT   | AGTGGTAGAGGCAAAATGGCT | 822               |
| <i>Carboxyl ester lipase</i>          | <i>CEL</i>    | NM_001012997   | ATCACTGCGAGCGATGTCTA    | GGTTGTCACCCCACAACCTCT | 109               |
| <i>Adipose triglyceride lipase</i>    | <i>ATGL</i>   | NM_001113291.1 | TGGACTCCGCTTGGAACATC    | TGCCTCCAAAAGAGCTTGGT  | 935               |
| <i>β-Actin</i>                        | <i>ACTB</i>   | NM_205518.1    | CCGGACTGTTACCAACACC     | CACTTTACTCCTAGACTGTGG | 515               |

```

atgacttgttaacagaagctgtgggctcctcactggggctgtcattggtgctgtgctggccatctttggaggagtctgtataccagttgga 90
M T C N R S C G L L T G A V I G A V L A I F G G V L I P V G
gataacctataaacagagcaataaaaaaggatgctgtcatttcaaatgggtaccattgcatatgataattggcttgtgccagggaagctct 180
D N L I N R A I K K D A V I S N G T I A Y D N W L V P G S S
gtttacaggcagttttggatctttaatgtggaaaatccatcagacgttttgaactttggagcacgtccaaagcttgacaaagaggacct 270
V Y R Q F W I F N V E N P S D V L N F G A R P K L E Q R G P
tacacatacagggtcagatatttacccaaagaaaatatcacagaaaacctaattggcacaatatcgtacatgctgcctaacgctgcccggt 360
Y T Y R V R Y L P K E N I T E N P N G T I S Y M L P N A A R
tttgaacctgatattgtctgttggacagaaaatgacaccatcacgtgcctcaacctgctgttgttgcacacctgccctctataaaaac 450
F E P D M S V G T E N D T I T C L N L A V V A A P A L Y K N
aatttcacccaactacttttaataactctggattaaatcttctaatacaaacatgctgcagaaacagaacagtgaaagaaatactgtgggga 540
N F I Q L L L N T W I L I K S S K S N M L Q N R T V K E I L W G
tacaagagccccttcttaaaccaagggttccctttcccttggacccagttctgggagtccttctaccgataatgggacatctgatggactt 630
Y K D P F L N K V P F P L D P V L G V F Y P Y N G T S D G L
tacagagtgatactgggaaagaagacataagcaaacagcaataattgaaagttataaaaacaaagggaatcttcttactgggaaggt 720
Y R V Y T G K E D I S K T A I I E S Y K N K R N L S Y W E G
tactgcgatttgggttaattggcactgatggggcatcatttctcatttgttaagaagaatcagggtactgcgcttcttctcctctgacatt 810
Y C D L V N G T D G A S F P P F V K K N Q V L R F F S S D I
tgcagatccatctatggagtttaccagaccagtaagaccgtgaaggggaattccactgtatcgtttcacagttcctcggaagcatttgca 900
C R S I Y G V Y Q T S K T V K G I P L Y R F T V P R E A F A
tcaccgattgatgttggagataactattgcttctgtacagatcagggtcatatcacagaactgcacactggctggagtcctagacattagc 990
S P I D V G D N Y C F C T D Q V I S Q N C T L A G V L D I S
tcctgcaaagcaggaaggccagtgatatctctctccacatcttctcatgcaagtgaatctatattgcatgatgttgaaggtctgagc 1080
S C K A G R P V Y I S L P H F L H A S E S I L H D V E G L S
ccaaatgaggaggagcatgagacatttctagatgtagagcctaccactggttttacactgcaatttgccaaaagactgcaagtaaacctc 1170
P N E E E H E T F L D V E P T T G F T L Q F A K R L Q V N L
cttgtgacaccttcaaaaaaattgaggctttatcaaaagttcaaaaaccttatgttttccctatttcttgggttaaatgagctctgctgtt 1260
L V T P S T K I E A L S K V Q K P Y V F P I L W L N E S A V
attggagatgaaaaagcagaaatgttcagaaataaagtcaccggtcgggtccagttactgggtgtggtgcagatgggtattaatcatcgca 1350
I G D E K A E M F R N K V T G R V Q L L G V V Q M V L I I A
ggttctgtgctgttctcgcattcatgggttcctatttcatatgcagatcgagaattgaaataa 1416
G S V L F L A F M G S Y F I C R S K K L K *

```

図 1-6. ニワトリ CD36 の塩基およびタンパク質配列<sup>22</sup>。

クローニングされた cCD36 の cDNA 塩基配列は、2 塩基（黒四角）を除き、NCBI のデータベース（NM\_001030731.1）配列と一致した。一方、タンパク質配列は、二つのアミノ酸（緑四角）を除き、データベース（NM\_001030731.1）と一致した。

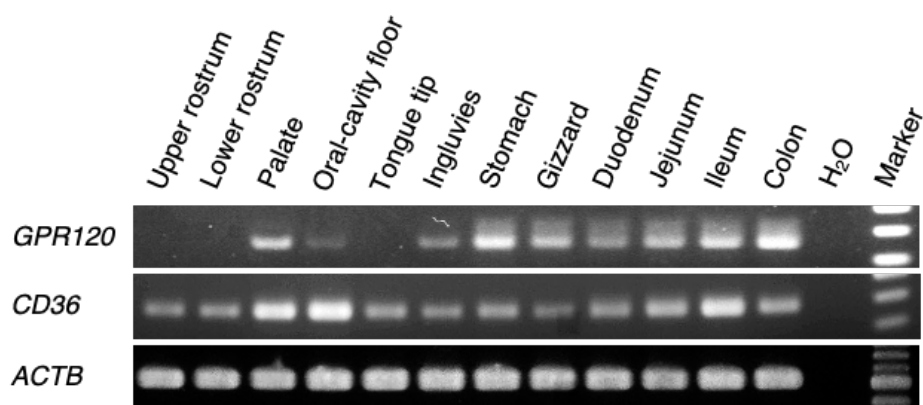
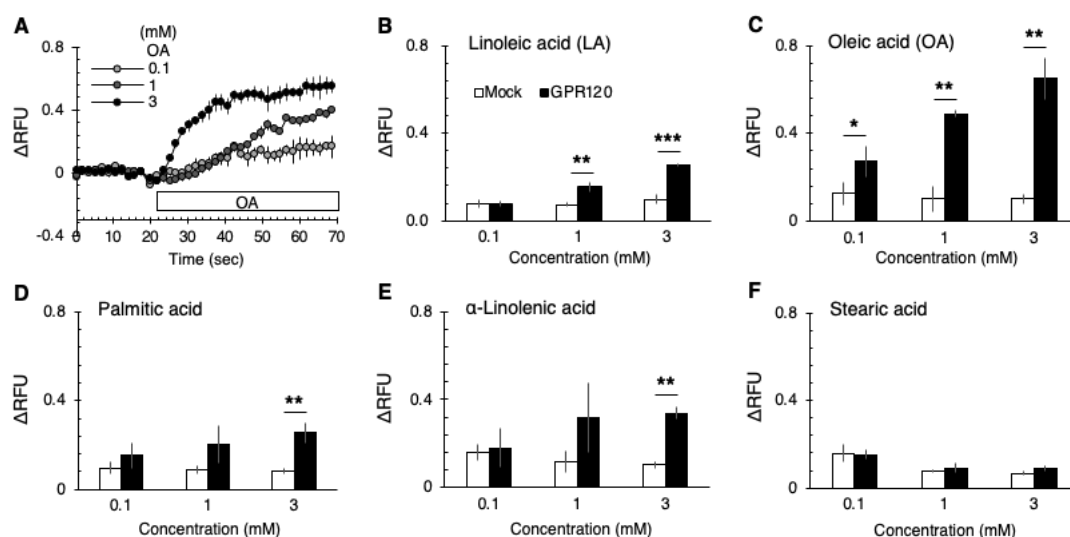


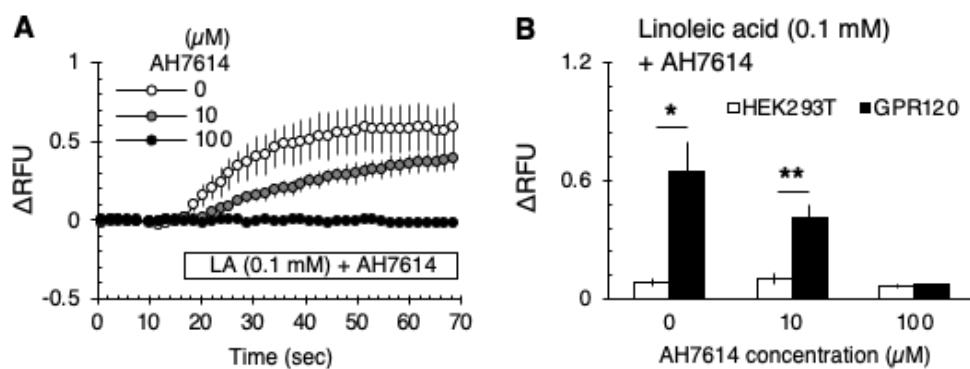
図 1-7. RT-PCR によるニワトリ口腔および消化管組織における脂肪味受容体候補遺伝子 *GPR120* および *CD36* とハウスキーピング遺伝子 *ACTB* の発現<sup>22</sup>。

*GPR120* の発現は口蓋、口腔底、嚙嚢、腺胃、筋胃、十二指腸、空腸、回腸および結腸で観察された。CD36 の発現は、全ての組織で観察された。水は鋳型（コントロール）がないことを意味する。逆転写酵素なしのネガティブコントロール反応においてバンドはなかった（データ示さず）。*ACTB* のバンドは図 1-10. のものと同様である。



**図 1-8.** 各種脂肪酸に対するニワトリ GPR120 発現細胞の蛍光強度変化 (relative fluorescein unit, RFU)。

(A) オレイン酸 (OA) (0.1–3 mM) に対する  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の経時変化。(B–F) 各種脂肪酸に対する Mock 細胞および GPR120 一過的発現細胞の濃度応答のピーク値における Mock 細胞と GPR120 細胞の比較。リノール酸 (LA) (0.1–3 mM) (B)、オレイン酸 (OA) (0.1–3 mM) (C)、パルミチン酸 (0.1–3 mM) (D)、 $\alpha$ -リノレン酸 (0.1–3 mM) (E)、およびステアリン酸 (0.1–3 mM) (F)。平均値  $\pm$  SEM、 $n = 3$  wells。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (対応のない  $t$  検定)。



**図 1-9.** GPR120 阻害剤 AH7614 に対するニワトリ GPR120 発現細胞の蛍光強度変化。  
**(A)** GPR120 安定的発現細胞における 0.1 mM リノール酸 (LA) の応答に対する 10–100 μM AH7614 の阻害作用を蛍光強度値の経時変化で示した。**(B)** (A) のピーク値を Mock 細胞および GPR120 発現細胞で比較した。平均値 ± SEM、n = 4 wells。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (対応のない  $t$  検定)。

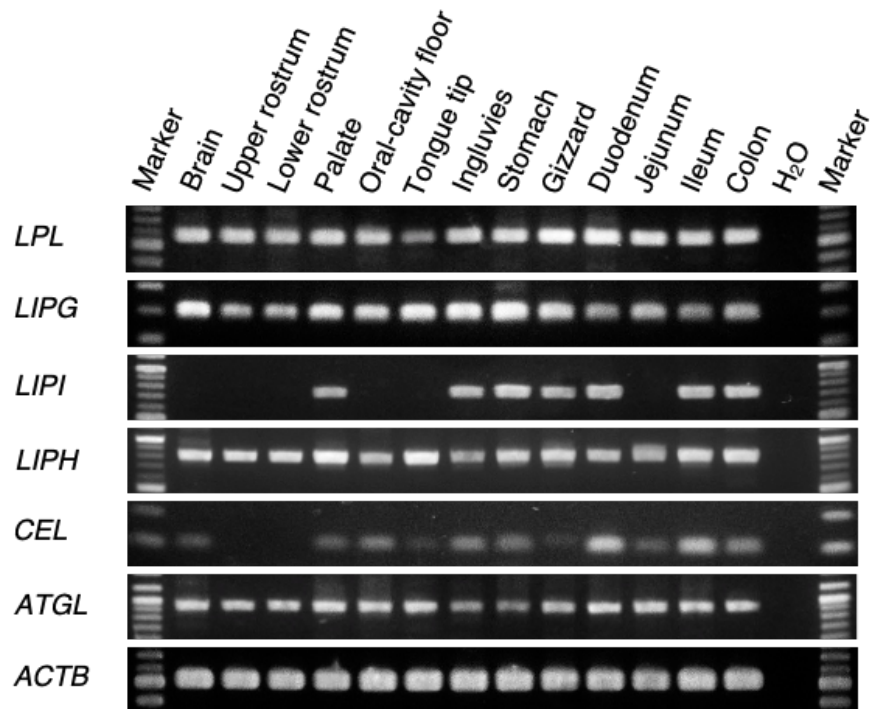


図 1-10. RT-PCR によるニワトリ口腔および消化管組織におけるリパーゼ遺伝子 (*LPL*、*LIPG*、*LIPI*、*LIPH*、*CEL* および *ATGL*) と、ハウスキーピング遺伝子 *ACTB* mRNA の発現<sup>22</sup>。

水は鋳型 (コントロール)がないことを意味する。逆転写酵素なしのネガティブコントロール反応においてバンドは検出されなかった (データ示さず)。

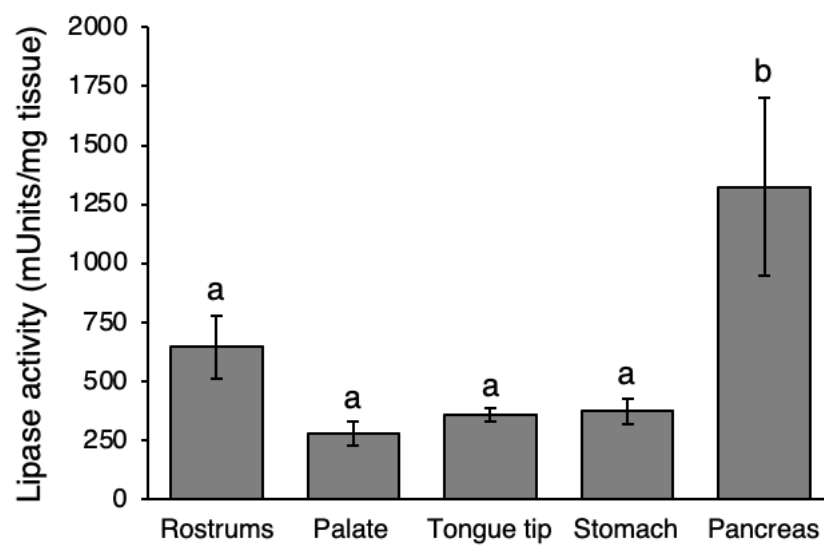


図 1-11 ニワトリにおけるクチバシ、口蓋、舌尖、腺胃および膵臓のリパーゼ活性<sup>22</sup>。  
 平均値±SEM、ニワトリ羽数 = 3。異符号間に有意差あり;  $P < 0.01$  by Tukey's test。

## 考察

本研究では、まず *CD36* 遺伝子のクローンを作製し、その塩基配列を決定した。次に、RT-PCR を用いて、2 つの脂肪酸センサー遺伝子 (*CD36* および *GPR120*) がニワトリの口腔および消化管組織で広く発現していることを明らかにした。また、*GPR120* が飼料中に含まれる数種類の脂肪酸で活性化されることを示した。さらに、いくつかのリパーゼ遺伝子がニワトリの口腔および消化管組織で広く発現していることを示した。最後に生化学的分析によりリパーゼ活性がクチバシ、口蓋、および舌尖などの口腔組織に存在することを明らかにした。これらの結果は、ニワトリが口腔組織に 2 つの脂肪酸センサーと機能的なリパーゼを有していること、またニワトリに脂肪味を検出する基本的なメカニズムがあることを示唆している。

CD36 ノックアウトマウスを用いた研究では、CD36 が脂肪味センサーの 1 つであることが報告されている<sup>7</sup>。本研究では、ニワトリにおいて味蕾が豊富な口蓋から *CD36* 遺伝子をクローニングすることができた<sup>23,24</sup> (図 1-6)。また *CD36* の mRNA が口腔組織で広く発現していたことから (図 1-7)、CD36 は GPR120<sup>15</sup> に加えて、ニワトリの脂肪味センサーの 1 つである可能性がある。cCD36 が脂肪酸を検出できるかどうか、およびニワトリ味細胞が CD36 を介して活性化されるかどうかを明らかにするには、さらなる研究が必要である。

*GPR120* の mRNA は、口蓋、口腔底、嚥嚅嚢、腺胃、筋胃、十二指腸、および下部消化管で発現していた（図 1-7）。*CD36* よりも *GPR120* を発現する組織は少なかった。Hirasawa らは、長鎖脂肪酸（LCFA）が腸で発現する GPR120 を活性化し、腸管上皮細胞からの GLP-1 の放出を引き起こし、放出された GLP-1 が膵臓からのインスリン分泌を増強することを報告している<sup>25</sup>。この LCFA/GPR120/GLP-1 軸は、マウス味細胞でも確認されている<sup>26</sup>。本研究では、下部消化管と同様に *GPR120* は味蕾が密集している口蓋と口腔底で発現していたため、ニワトリの口腔および消化管組織に LCFA/GPR120/GLP-1 軸が存在する可能性がある。実際、これまでにニワトリ GLP-1 ELISA キットを使用して、ニワトリ口腔組織に GLP-1 が含まれていることを確認している（未発表データ）。また、Furuse らは、マウスと同様に GLP-1 がニワトリにおいて摂食を抑制することを報告している<sup>27</sup>。GLP-1 は FFA によって活性化される GPR120 を介してニワトリ味細胞から放出され、摂食を抑制している可能性がある。

飼料中に含まれる脂肪酸のうち、不飽和脂肪酸であるリノール酸およびオレイン酸、また飽和脂肪酸であるパルミチン酸および $\alpha$ -リノレン酸が GPR120 に作用し、このうちパルミチン酸および $\alpha$ -リノレン酸が新たな作用物質として同定された。一方で、飽和脂肪酸のステアリン酸については応答が見られなかった。ステアリン酸は融点が高く、水系で難溶解性を示し、細胞に添加すると培養液中で固化してしまうため、正確に測定できなかったと考えられる。今後の課題として取り組んでいきたい。さらに、本研究では GPR120 安定的発現細胞株の構築に成功した。0.1 mM リノール酸による蛍光強度の上昇を図 1-8 と図 1-9 で比較すると、約 2 倍異なっていたが、これは一過的発現細胞と安定的

発現細胞株における GPR120 の発現量の差によるものと考えられる。また、AH7614 により濃度依存的にリノール酸に対する GPR120 応答が阻害されたことから、AH7614 がニワトリ GPR120 の阻害剤であることも同定された。今後、本細胞株を用いた、より簡便で正確な GPR120 の機能解析が期待される。

本研究では、ニワトリのリパーゼ遺伝子の包括的な解析により、リパーゼ遺伝子がニワトリの口腔および消化管組織で広く発現していることを見出した。これまで、ニワトリの各リパーゼタンパク質のリパーゼ活性に関する研究はなく不明なままであったが、ニワトリの口腔組織ホモジネートが、トリグリセリドを FFA に消化するためのリパーゼ活性を示すことがわかった。本研究で調べた臓器の中で、膵臓のリパーゼ活性が最も高いことが確認できた。この発見は非常に合理的であるように思われる。興味深いことに、消化液を分泌する主要な器官の 1 つである腺胃のリパーゼ活性は、口蓋や舌尖のリパーゼ活性と同レベルの高さであった。さらに驚くべきことに、その差に統計的な有意差はないが、クチバシのリパーゼ活性は腺胃のリパーゼ活性よりもかなり高かった。これらの結果は、ニワトリの口腔組織にトリグリセリド/口腔リパーゼ/LCFA/GPR120 および CD36 軸がある可能性を示唆している。RT-PCR 解析により、CD36 がクチバシで発現していることが示されたため、クチバシは CD36 を介して脂肪味を検出できる可能性がある。しかし、ニワトリのクチバシに味細胞があるかどうかは不明である。この問題を明らかにするには、さらなる組織学的研究が必要である。興味深いことに、本研究では舌尖でもリパーゼ活性が観察された。ニワトリの舌尖には味蕾が少ないため<sup>23,24</sup>、舌尖は直接味覚受容器としての機能はほとんど持たないかもしれないが、口腔リパーゼを分泌することで味覚器官として機能する可能性がある。

本研究では、脂肪味受容体候補の 2 つの遺伝子、GPR120 と CD36 がニワトリの口腔組織で発現していることを示した。また、GPR120 の新たな作用物質および阻害物質を同定した。さらに、いくつかのリパーゼ遺伝子が口腔組織でも発現していることを見出し、口腔組織が実際にリパーゼ活性を持つことを確認した。これらの結果は、飼料中の油脂が口腔リパーゼによって部分的に FFA に消化され、その FFA がニワトリの口腔組織の GPR120 や CD36 などの脂肪味受容体を活性化することを示唆している。

## 第二章

抗不整脈薬フレカイニドはマウスにおいて Otopetrin 1 を介して酸味を増強する  
Antiarrhythmic drug flecainide enhances sour taste responses via Otopetrin 1 in mice

## 緒 言

現在、250 以上の薬がその副作用により味覚に変調をきたす、いわゆる薬剤性味覚障害を引き起こす可能性があることが報告されている。たとえば、カプトプリル（アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害薬）とロサルタン（アンジオテンシン受容体 1 型（AT）遮断薬）は、一時的な味覚消失を引き起こし<sup>28,29</sup>、アミロライド（利尿薬、上皮性 Na チャネル（ENaC）遮断薬）は、Na<sup>+</sup>や Li<sup>+</sup>塩および甘味料の味覚強度を低下させ<sup>1</sup>、アセタゾラミド（炭酸脱水酵素阻害剤）は、発泡性ミネラルウォーターにおける塩味の認知を低下させ、甘味および苦味を高めることが報告されているように<sup>2</sup>、化学治療薬は、味覚の減弱または鈍化の原因となることがよく知られている<sup>30</sup>。薬剤性味覚障害は、生活の質の低下を引き起こすだけでなく、栄養機能障害、栄養失調、および治療計画の実施を困難にすることにつながる可能性がある。しかし、これら薬物性味覚障害の背景にある分子メカニズムについてはほとんど知られていない。

フレカイニドは、副作用として味覚障害を引き起こすことが知られている抗不整脈薬である。フレカイニドは、上室性および心室性不整脈、発作性心房細動および粗動を予防するために使用されている<sup>31</sup>。フレカイニドの主な抗不整脈薬作用は、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル（Nav1.5、SCN5A 遺伝子によりコードされる）の阻害により、心臓内の電気インパルスの伝導を遅くし、心室筋細胞の不応期を延長することであると考えられている<sup>32</sup>。フレカイニドはまた、心臓 K<sup>+</sup>チャネル（Kv2.1、KCNB1）を遮断し、遅延整流 K 電流に寄与し<sup>33</sup>、心臓の不応期を延長する。さらに、フレカイニドはリアノジン受容体 2（RyR2）チャネルを阻害することにより、心筋細胞の Ca<sup>2+</sup>波を抑制し、マウスとヒトのカテコールアミン作動性多形性心室頻拍を予防することが報告されている<sup>34</sup>。上室性頻拍の治療におけるフレカイニドの長期的な有効性と安全性を調べた研究では、一部の患者が視覚障害（症例の約 20%）、神経質（4%）、めまい（2.4%）、味覚異常（5%）のような中枢神経系の副作用を経験したことが示されている<sup>35</sup>。さらに、一部の患者が「不快または悪い味」をフレカイニドの副作用として説明している<sup>36,37</sup>。しかし、フレカイニドの味覚系に及ぼす副作用に起因する分子メカニズムは不明なままである。

味蕾は、味神経と相互作用する 50–100 個の味覚細胞からなるタマネギ型の構造である。最近の分子研究により、5 基本味の候補受容体が発見された<sup>38–42</sup>。これらの受容体は、甘味、苦味、うま味を識別する G タンパク質共役型受容体（GPCR）と、塩味と酸味を識別するチャネル型受容体の 2 種類に分けられる。甘味受容体：1 型味覚受容体（taste receptor type 1 member 2, T1R2）+ T1R3、苦味受容体：2 型味覚受容体（taste receptor type 2, T2R）、塩味受容体：上皮性 Na<sup>+</sup>チャネル（epithelial sodium channel, ENaC）、酸味受容体：オトペトリン 1（Otopetrin 1, Otop1）<sup>43</sup> は、味蕾中の異なる集団の味細胞に発現している。これは、味細胞レベルで味質のコーディングが行われていることを示唆している。実際に多数の味細胞は 5 基本味の刺激の 1 つに応答する。味細胞による味刺激は、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇および活動電位の生成を経て、神経伝達物質である ATP を介して味情報として最終的に味神経へと伝達される。甘味、苦味、またはうま味の

GPCRs を発現する味細胞は、伝達カスケードにおいて、結合 G タンパク質とホスホリパーゼ C- $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2)、イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体タイプ 3 (IP<sub>3</sub>R3)、一過性受容体電位依存性陽チャネルサブファミリー M メンバー 5 (TRPM5)、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル (SCN2A、SCN3A、および SCN9A)、および電位依存性 K<sup>+</sup>チャネル (KCNQ1) と協調している<sup>44,45</sup>。他の Otop1 チャネルを発現する味細胞は、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル (SCN2A)、および K<sup>+</sup>チャネル (KCNQ1、Kir2.1) だけでなく、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル ( $\alpha$ 1A) と協調する<sup>46-50</sup>。さらに、L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルは、マウス味細胞のリアノジン受容体と相互作用すると考えられている<sup>51</sup>。これらの味細胞型特有の分子は、異なる味細胞の興奮性の調節において重要な役割を果たしている。

これらのことから、我々は、味細胞に発現する特定のイオンチャネルがフレカイニドの分子標的であり、味覚系におけるフレカイニドの副作用の背景にある分子メカニズムに関与する可能性があるかと推測した。この可能性を探るために、味刺激に対するマウスの味行動および味神経応答、Otop1 発現 HEK293T 細胞の膜電位、およびマウス有郭乳頭由来の味蕾オルガノイドの増殖におけるフレカイニドの影響を調べた。予期せぬことに我々は、フレカイニドが酸味受容体 Otop1 と直接相互作用し、マウスの酸味応答を特異的に増強することを見出した。このフレカイニドによる酸味特異的な増強作用が、抗不整脈薬の副作用としての味覚障害の一因となっている可能性が示唆された。

## 材料 および 方法

### 動物

マウスの飼育およびすべてのマウスの実験は九州大学の倫理ガイドラインおよび弘前大学の動物実験規則に従い実施された。すべての実験プロトコルおよび手順は、米国国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針の下、九州大学実験動物管理使用委員会（承認番号 A19-286-0）および弘前大学動物研究委員会（承認番号 A18002、A19002、および A19009）によって承認された。C57BL/6J マウスは、チャールズリバーラボラトリーズジャパン（横浜、日本）および CLEA ジャパン（東京、日本）から購入した。すべてのマウスは、23°C で 12/12 時間の明/暗サイクルで飼育され、水とペレット餌（CE-2、CLEA Japan、東京、日本）を自由に摂取できた。味蓄オルガノイドアッセイでは、8-12 週齢の雌雄両方を使用した。他の実験では、雄のみを使用した<sup>52</sup>。

### 味物質および薬剤

本研究で用いた味溶液を次に示す。酢酸、クエン酸、HCl、NaCl（アミロライド有無）、KCl、スクロース（キニーネ塩酸塩（QHCl）あり）、QHCl、MPG（グルタミン酸カリウム）および NH<sub>4</sub>Cl。これらの味物質はすべて超純水に溶解した（45）。MPG を除くこれらの味物質はすべて、FUJIFILM Wako Pure Chemical（大阪、日本）から購入した。MPG は、Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）から購入した。抗不整脈薬には、アミオダロン（A2530、Tokyo Chemical Industry、東京、日本）、フレカイニド（F6777、Sigma-Aldrich）、あるいはプロパフェノン（P2301、Tokyo Chemical Industry）を用いた。すべての薬剤をジメチルスルホキシド（FUJIFILM Wako Pure Chemical）に溶解しストック溶液とした。行動および神経応答実験では、フレカイニドをストック溶液から溶媒（5% グルコース溶液）で希釈して使用直前に最終濃度にし、腹腔内投与に使用した。投与量は、薬添付文書に記載されているフレカイニド（商品名 ダンボコール）のヒトの処方量を参照して決定した。

### 短時間リック試験

本試験は、通法に従って行った<sup>52-54</sup>。マウスは 12 時間周期の明期/暗期のサイクルでエサは固形飼料を自由摂取できる環境で飼育した。すべての訓練および試験は明期に、23 時間の絶水後、固定された水飲み台を設置したテストケージ内で行った。訓練 1 日目は、水（超純水）を 1 時間、自由に摂取させた。訓練 2-5 日目は、水を 10 秒間提示した後、20 秒間のインターバルを開け、また 10 秒間水を提示するという訓練を 30 分間行った。6 日目に、各味溶液を用いた試験溶液と水のリック回数を、最初に舐めた 1 回目のリックから 10 秒間、リックメーター（Yutaka Electronics、対馬）を用いてカウントした。フレカイニドの腹腔内投与 30 分後のリック回数の測定は以下の 4 つの投与群に対して行った。[1] コントロール群として溶媒（5% グルコース）を投与、[2] 2 mg/体重 kg（ヒトの 1 日あたりの最大投与量）のフレカイニドを溶媒に溶解し投与<sup>34</sup>、[3] 溶媒の 30 日間反復投与、およ

び[4] フレカイニド (2 mg/体重 kg)を 30 日間反復投与。反復投与群では、最終投与日の翌日に測定を行った。各試験日の最初に提示される溶液は水とした。次に、試験刺激 (mM) (1-50 酢酸、1-30 クエン酸、1-30 HCl、30-1000 NaCl (30  $\mu$ M アミロライド有無)、10-300 KCl、30-1000 スクロース (+ 0.1 QHCl)、0.003-3 QHCl、1-1000 MPG)をランダムな順序で与えて試験した。水に対する味物質の割合としてリック比率を求め、その平均は各マウスの各試験溶液に対する値から算出した。

## 2 瓶選択嗜好試験

23 時間の絶水後、マウスに水と 150 mM スクロース (すべてのマウスが確実に好む濃度)を 2-5 分間提示して、好ましい溶液の方を選択するように訓練した。本試験では、23 時間の絶水後、マウスに 2 分間 2 本のボトルを提示した。一方は水 (超純水)、もう一方は試験溶液とした。試験溶液には、1 mM HCl、60 mM NaCl、および 150 mM スクロースを用いた。試験溶液の嗜好比率は、試験溶液の飲水量を総飲水量で割ったもので表した<sup>55-57</sup>。

## 鼓索神経応答記録

味物質の舌への投与に対するマウスの全神経線維束応答は、通法に従い、鼓索 (chorda tympani; CT)神経から記録した<sup>52-54</sup>。CT 神経を剖出するため、ペントバルビタール麻酔下 (50-60 mg/体重 kg)、ヘッドホルダーでマウスを仰臥位に固定して、気管にカニューレを装着した。内側翼突筋を除去した後、右翼突筋を周囲の組織から切り離し、鼓室への侵入点直前の鼓室胞辺りで切断し、周囲の組織から分離、露出させた。神経全体を銀塩化銀電極に乗せた。不関電極は周囲組織に装着した。舌への味刺激に対する神経応答は増幅器 (K-1; Iyodenshikagaku、名古屋、日本)およびオーディオモニターを介して、オシロスコープにて観察した。全神経線維束応答はインテグレーター (時定数=1.0 秒)にて積分し、PowerLab システム (PowerLab/sp4; ADInstruments、NSW、AU)を使用して、コンピューターに記録した。味溶液 (mM) (100  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、3-50 酢酸、1-30 クエン酸、1-30 HCl、30-1000 NaCl、100 KCl、30-1000 スクロース、20 QHCl、および 100 MPG)を用いて、重力流により舌の各部分を 30 秒間刺激した。刺激と刺激の間は、約 1 分間、舌を超純水で洗浄した。一連の標準刺激に対する応答を記録した後、マウスに溶媒 (5% グルコース)に溶解した 2 mg/体重 kg フレカイニドを単回腹腔内投与した。Watanabe らは、フレカイニドの有効性は、マウスへの 2 mg/体重 kg 腹腔内投与後 15-30 分で観察されたと報告している<sup>34</sup>ため、本研究でも腹腔内投与後 15-30 分の値を分析した。データ分析では、安定した応答データのみを使用した。全神経束の積分応答値は、刺激開始後 30 秒間測定され、最初の 5 秒と最後の 5 秒の値を省いた 5-25 秒までの 20 秒間の大きさの平均値を求め、基準として 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  応答を 1.0 とした相対値で算出した。これら相対応答値を統計解析に用いた。

## マウス Otop1 の構築

マウスの腎臓から total RNA を単離し、SuperScript IV First-strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて 1 本鎖 cDNA を合成し、マウス Otop1 (mOtop1)の推定タンパク質コード読み枠 (全長 ORF)を PrimeSTAR MAX (Takara Bio, 草津、日本)を用いた nested-PCR により 2 段階で増幅した。プライマーは、mOtop1 の NCBI 遺伝子データベース (accession no. NM\_172709.3)に基づいて、複数のエクソンを挟み設計した (表 2-1)。全長 ORF の PCR 産物は、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio)を用いて、pcDNA5/FRT 哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。mOtop1 の全塩基配列は、BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)によって確認した。

## RT-PCR

Total RNA は、HEK293T 細胞、Mock 細胞 (空のベクターpcDNA5/FRT/TO を遺伝子導入された HEK293T 細胞)、または mOtop1 一過的発現 HEK293T 細胞から単離し、1 本鎖 cDNA を SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific)で合成した。PCR のプログラムを次に示した：98°C; 10 秒、55°C; 30 秒、72°C; 40 秒を 35 サイクル。PCR 反応溶液は全量 10  $\mu$ l で、組成は次の通りである：10×ExTaq バッファー (2 mM Mg<sup>2+</sup>を含む)、各プライマーペア (1  $\mu$ M)、dNTP mixture (0.2 mM)、および、cDNA (10 ng)、および 0.5 U Ex Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq HS, Takara Bio)。増幅産物は、ゲル電気泳動 (2% TBE アガロースゲル with GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, Hayward, CA, USA)に供して、UV 照射下で検出した。すべてのプライマーペアは、各プライマーが異なるエクソン由来となるように設計した (表 2)。この Otop1 プライマーは、マウスとヒト両方の Otop1 を増幅できるように設計した。

## 膜電位測定

Otop1 ノックアウトマウスは酸味物質の味神経応答を消失していることが報告されていることから<sup>58</sup>、我々はフレカイニドによる酸味受容の修飾における Otop1 の関与に焦点を当てた。ヒト胎児腎臓 (human embryonic kidney (HEK))由来の 293T (HEK293T)細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 高グルコース, 043-30085, FUJIFILM Wako Pure Chemical)で、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下培養された。mOtop1 タンパク質を発現させるため、ScreenFect A (2999-73203, FUJIFILM Wako Pure Chemical)を用いて mOtop1 cDNA を HEK293T 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞は、ポリ-D-リジン (168-19041, FUJIFILM Wako Pure Chemical)でコーティングされた 96 ウェルブラックボトムマイクロプレート (165305, Thermo Scientific Nunc, NY, USA)に約 33,000 細胞/ウェルで播種され、10% FBS を含む DMEM 中の 5% CO<sub>2</sub>存在下、37°C、48 時間培養された。48 時間の培養後、遺伝子導入細胞に等量の膜電位アッセイキット青色色素 (FLIPR 膜

電位アッセイキット; R8042、Molecular Devices、CA、USA)を添加し、実験前に 37°C、30 分間培養した。FlexStation 3 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて、37°C恒温下、1.5 秒間隔で蛍光強度の経時変化 (励起波長 530 nm、蛍光波長 560 nm)を測定した。ベースラインを 16 秒間読み取った後、5 倍濃度の試験溶液 (最終濃度 0.3–5 mM HCl、0.3–5 mM 酢酸、0.3–3 mM クエン酸、1–15  $\mu$ M フレカイニド、および 10–30 mM  $\text{ZnCl}_2$ )を溶解した 1x HBSS バッファー (Thermo Fisher Scientific)を添加し、さらに 54 秒間測定した。応答値は、ベースライン値との差として計算された相対蛍光単位 ( $\Delta$ RFU)として算出した。最大応答%は、コントロールの最大濃度 (5 mM HCl、3 mM 酢酸、および 2 mM クエン酸)のピーク応答値に対する各濃度のピーク応答値を用いて算出した。

### 免疫細胞化学染色

mOtop1/pcDNA5/FRT/TO または pcDNA5/FRT/TO と EGFP/pCAGGS を、ScreenFect A を用いて HEK293T 細胞にコトランスフェクトした。ポリ-D-リジンでコーティングしたカバースリップにこれらの細胞を播種し、10% FBS を含む DMEM 中で、37°C、5%  $\text{CO}_2$  存在下、48 時間培養した。48 時間の培養後、遺伝子導入された細胞を 1x PBS (10 $\times$  PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  不含)、314-90185、FUJIFILM Wako Pure Chemical)で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (26126-54、Nakalai Tesque、京都、日本)/ 1 $\times$  PBS で室温下、15 分間固定した。次に、それらを Tris-NaCl-Tween (TNT)バッファーで洗浄し、Blocking One-P 溶液 (Nakalai Tesque)で 1 時間ブロッキングした。次に、一次抗体 (抗 OTOPI 抗体、1:50、ヒト抗 OTOPI 抗体、HPA035599、Sigma-Aldrich)を用いて、4°C、一晩インキュベートした。TNT バッファーで洗浄後、細胞を二次抗体 (Alexa Fluor 488 標識 AffiniPure ロバ抗ウサギ IgG (H + L)、Jackson Immuno Research Laboratories、PA、USA)で室温、2 時間インキュベートし、再度洗浄した。カバースリップは、Fluoro-Keeper with DAPI 退色防止試薬 (Nakalai Tesque)でスライドガラスに封入した。標識された遺伝子導入細胞の免疫蛍光は、レーザー走査型顕微鏡 (FV-3000、Olympus、東京)を用いて観察された。画像は Fluoview ソフトウェア (Olympus)を用いて取得した。

### 味蕾オルガノイド

三次元味蕾オルガノイドは通法に従い調製した<sup>50,51</sup>。C57BL/6J マウス (8–12 週齢、 $25.1 \pm 1.8$  g、1 回の作製で 9 匹のマウスを用いた)の有郭乳頭 (circumvallate papillae: CV)組織を、トリプシン消化およびろ過し、24 ウェル超低吸着培養プレート (CLS3473、Corning、Corning、NY、USA)に播種し、条件培地 (CM、500  $\mu$ l/ウェル)中で培養した。使用した培地は次の通りである：20% DMEM/F12 培地 (11320033、Life Technologies、OR、USA)、50% Wnt3a CM (Wnt3a 産生細胞株から作製、Hans Clevers 博士から譲与して頂いた、DMEM/F12 培地中で 125  $\mu$ g/ml ゼオシンにより選択培養した)、20% R-spondin CM (R-spondin 細胞株から作製、Jeffery Wittsett 博士から譲与して頂いた、DMEM/F12 培地中で 600  $\mu$ g/ml ゼオシンにより選択培養した)、および 10%

noggin CM (pEAK-Rapid 細胞株から作製、Peihua Jiang 博士から譲与して頂いた、DMEM/F12 培地中で 400 µg/ml ゼオシンにより選択培養した)、EGF (50 ng/ml; 315-09, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、N21-MAX インスリンフリー培地サプリメント (2% vol/vol; AR010, R&D Systems, Minneapolis, MIN, USA)、B-27 サプリメントマインスインスリン (2% vol/vol; A1895601, Life Technologies)、およびペニシリン-ストレプトマイシン (1×; 15140122, Thermo Fisher Scientific) プラス 5% 冷却マトリゲル (356231, Corning)。新たに分離した単一 CV 細胞においては、Y-27632 (10 µM; Y0503, Sigma-Aldrich) を培地に添加して、分離したことによって誘導されるアポトーシスを防止した。アミオダロン (0.5 µM)、フレカイニド (15 µM)、またはプロパフェノン (10 µM) を CM に添加し培養した。これらの薬剤濃度は、ヒトへの処方濃度を参照して設定した<sup>59,60</sup>。CM は 7 日目から 18 日目まで毎日交換された。オルガノイドの明視野画像は CKX-41 (Olympus、東京) によって取得され、ImageJ ソフトウェア (NIH, MD, USA) で解析した。

## 統計解析

データは平均±SEM として示した。短時間リック試験、鼓索神経応答記録、および一部の膜電位測定は、繰り返しのある二元配置分散分析に先行する事後検定として対応のない t 検定を用いた。2 瓶選択嗜好試験、一部の膜電位測定、および、味蕾オルガノイドは、対応のない t 検定、および、一元配置分散分析に先行する事後検定として Turkey の一段階多重比較解析を用いて対応のない t 検定によって分析した。膜電位の継時変化測定の解析は、反復測定二元配置分散分析法に先行する事後検定として対応のない t 検定により行った。 $P < 0.05$  で統計的に有意であるとみなした。

## 結 果

### 味刺激に対するマウスの味溶液摂取行動応答におけるフレカイニドの短期的な影響

短時間リック（舐め）試験により、マウスの味行動応答におけるフレカイニドの影響を調べた。フレカイニド群では、コントロールマウスと比較して、HCl に対するリック比率は有意に減少した（図 2-1A）。一方で、NaCl、NaCl + アミロライド、KCl、スクロース + QHCl、QHCl、MPG、さらには弱酸（酢酸とクエン酸）などの他の味溶液のリック比率は変化しなかった（図 2-1B-I）。

次に、2 瓶選択嗜好試験により、味嗜好性におけるフレカイニドの影響を調べた。リック試験と同様に、フレカイニド群ではコントロールマウスと比較して HCl の飲水量が有意に減少したが、他の溶液（NaCl およびスクロース）では変化しなかった（図 2-2）。

### 味刺激に対するマウスの味神経応答におけるフレカイニドの短期的な影響

様々な味刺激に対する味神経応答におけるフレカイニドの影響を調べた。我々は、酸味刺激に関与する舌の前部を支配する鼓索（CT）神経応答に焦点を当てた<sup>61</sup>。溶媒投与と比較して、HCl に対する CT 神経応答はフレカイニド投与により有意に増強された（図 2-3A, B）。一方で、酢酸、クエン酸、NaCl、KCl、ショ糖、QHCl、MPG などの他の味溶液に対する CT 神経応答に変化はなかった（図 2-3A, B）。HCl に対する応答は、フレカイニドによって HCl の濃度依存的に増強された（図 2-3C）。一方で、酢酸、クエン酸、NaCl、およびスクロースに対する応答は、全濃度において変化がなかった（図 2-3D-G）。

### Otop1 発現 HEK293T 細胞の応答におけるフレカイニドの影響

フレカイニドによって、味行動および味神経における HCl 応答の変化が見られたため、酸味受容体である Otop1 チャネルの関与を調べた<sup>43,58,61</sup>。Mouse Otop1/pcDNA5 コンストラクトを構築し、mOtop1 を一過的に発現する HEK293T 細胞を作製した。膜電位アッセイ色素を負荷した後、試験化合物を各ウェルに添加し、膜電位の変化を測定した。

mOtop1 mRNA の発現を確認するため、RT-PCR に供したところ、mOtop1/pcDNA5 を遺伝子導入された細胞では mOtop1 の発現を認めたが、Mock 細胞では認められなかった（図 2-4A）。さらに、空の pcDNA5 と EGFP/pCAGGS をコトランスフェクトし、mOtop1/pcDNA5 と EGFP/pCAGGS をコトランスフェクトした HEK293T 細胞における Otop1 タンパク質の発現を解析した。Otop1 が導入され EGFP を発現する細胞において Otop1 の免疫反応ははっきりと認められたが、Mock 細胞では認められなかった（図 2-4B）。

膜電位測定では、空ベクター（pcDNA5/FRT/TO）を導入された Mock 細胞では HCl に対する応答は検出されなかった（図 2-4C）。Otop1 発現 HEK293T 細胞における HCl に対する細胞応答（および ZnCl<sub>2</sub>（Otop1 阻害剤）の影響）を調べた結果、各濃度の HCl を添加することにより蛍光値が濃度依存的に増加し（図 2-4D）、5 mM HCl に対する

応答は  $\text{ZnCl}_2$  の濃度依存的に有意に阻害された (図 2-4E)。これらの結果は、このアッセイが Otop1 の応答変化を捉えることが可能なことを示唆している。本アッセイ法を用いて、我々はフレカイニドが Otop1 の 5 mM HCl に対する活性を濃度依存的に増強することを確認した (図 2-4F)。さらに、本膜電位測定により、フレカイニドが mOtop1 発現細胞における HCl の影響を変化させるかどうかを調べた。5 mM HCl に対する応答は、フレカイニドを添加した細胞では、添加していないコントロールと比較して大きかった (図 2-4F)。さらに、フレカイニドは強酸 (5 mM HCl) および弱酸 (2 mM 酢酸および 2 mM クエン酸) の両者に対する応答を増加させた (図 2-4G-L)。

#### 味刺激に対するマウスの味溶液摂取行動応答におけるフレカイニドの長期的な影響

フレカイニドが味行動応答に及ぼす長期的な影響を、30 日間フレカイニドを連続腹腔内投与したマウスを用いて調べた。フレカイニド単回投与の結果と同様に、HCl に対するリック比率は、コントロールマウスと比較して有意に減少した (図 2-5A)。一方で、他の味溶液に対しては、NaCl、NaCl + アミロライド、KCl、スクロース + QHCl、QHCl、MPG、さらには弱酸 (酢酸およびクエン酸) も変化を示さなかった (図 2-5B-I)。

#### 味蕾オルガノイドの増殖におけるフレカイニドの影響

フレカイニドの長期投与が味蕾細胞の増殖に及ぼす影響を調べるために、マウスの有郭 (CV) 乳頭由来の味蕾オルガノイドを用いた。オルガノイドコロニーの増殖は、フレカイニド (15  $\mu\text{M}$ ) を添加した群で、コントロール群と比較して培養 18 日目に有意に抑制された (図 2-6A-C)。さらに、薬添付文書に記載されている副作用として何らかの味覚異常を誘発することが報告されている他の抗不整脈薬であるアミオダロンおよびプロパフェノンについても同様に調べた。結果として、アミオダロンおよびプロパフェノンの投与は、培養 18 日目のオルガノイドコロニーのサイズに影響を与えなかった (図 2-6B, C)。これらの結果から、フレカイニドの長期投与が、HCl に対する一過性の味細胞応答にだけでなく、マウスの Otop1 を介した味細胞の増殖にも影響を与える可能性が示唆された。

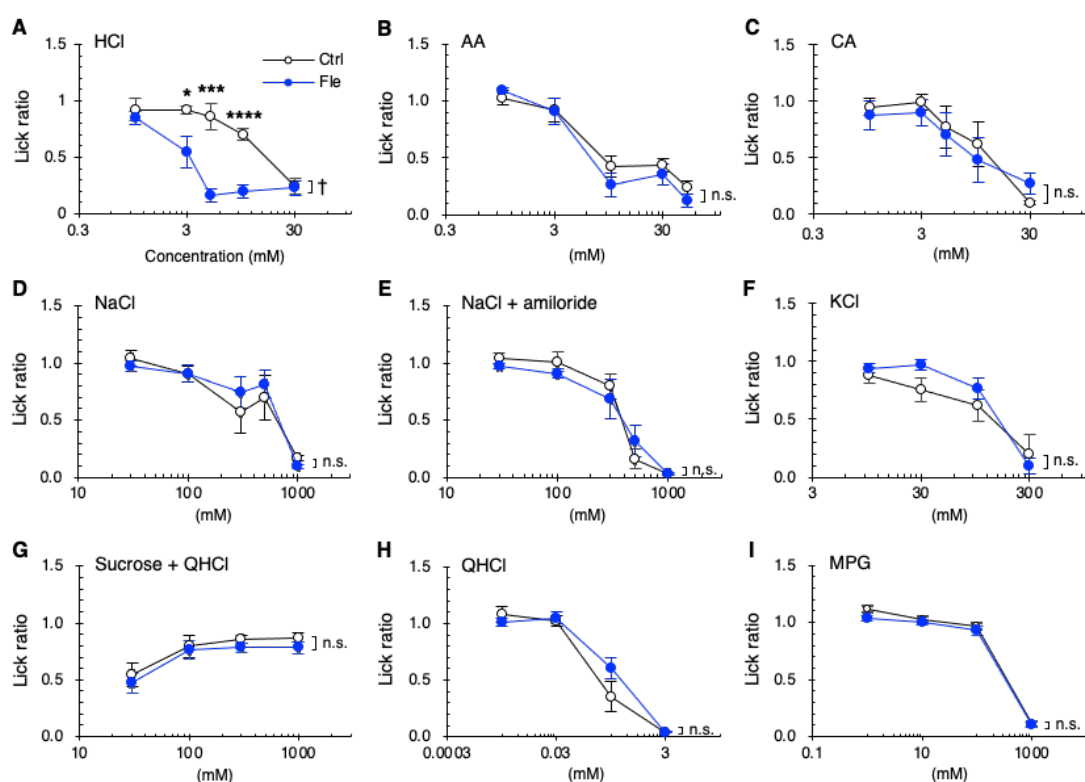


図 2-1. フレカイニド単回投与は HCl に対する味溶液摂取行動応答を増強する。

溶媒 (白丸) または 2 mg/体重 kg フレカイニド (青丸) を腹腔内投与して 30 分後の様々な濃度の HCl (A)、酢酸 (AA) (B)、クエン酸 (CA) (C)、NaCl (D)、NaCl + 30  $\mu$ M アミロライド (E)、KCl (F)、スクロース + 0.1 mM QHCl (G)、QHCl (H)、および MPG (I) に対する応答。超純水に対する各試験溶液のリック比率を示した ( $n = 5-8$ )。アスタリスクは有意差を示す (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; two-way ANOVA, post hoc unpaired  $t$ -test; n.s. not significant, † $P < 0.05$ , two-way ANOVA)。すべてのデータは平均  $\pm$  SEM として表した。

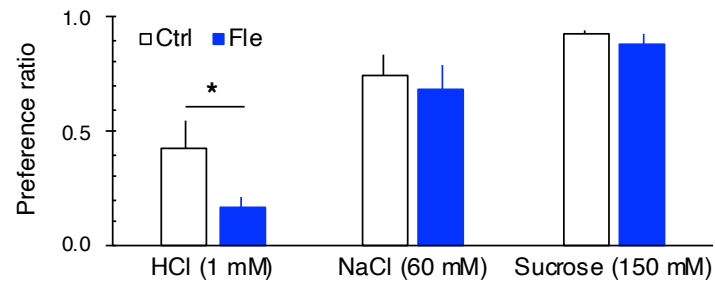


図 2-2. フレカイニドは、HCl に対する味行動応答を増強する。

腹腔内投与 30 分後の 2 分間 2 瓶選択嗜好試験における平均嗜好比率（味溶液飲水量あたりの味溶液飲水量+水飲水量）。溶媒投与（白棒）または 2 mg/体重 kg フレカイニド投与（青棒）（n = 7-8）。アスタリスクは有意差を示す（\* $P < 0.05$ ; unpaired  $t$ -test）。すべてのデータは平均  $\pm$  SEM として表した。

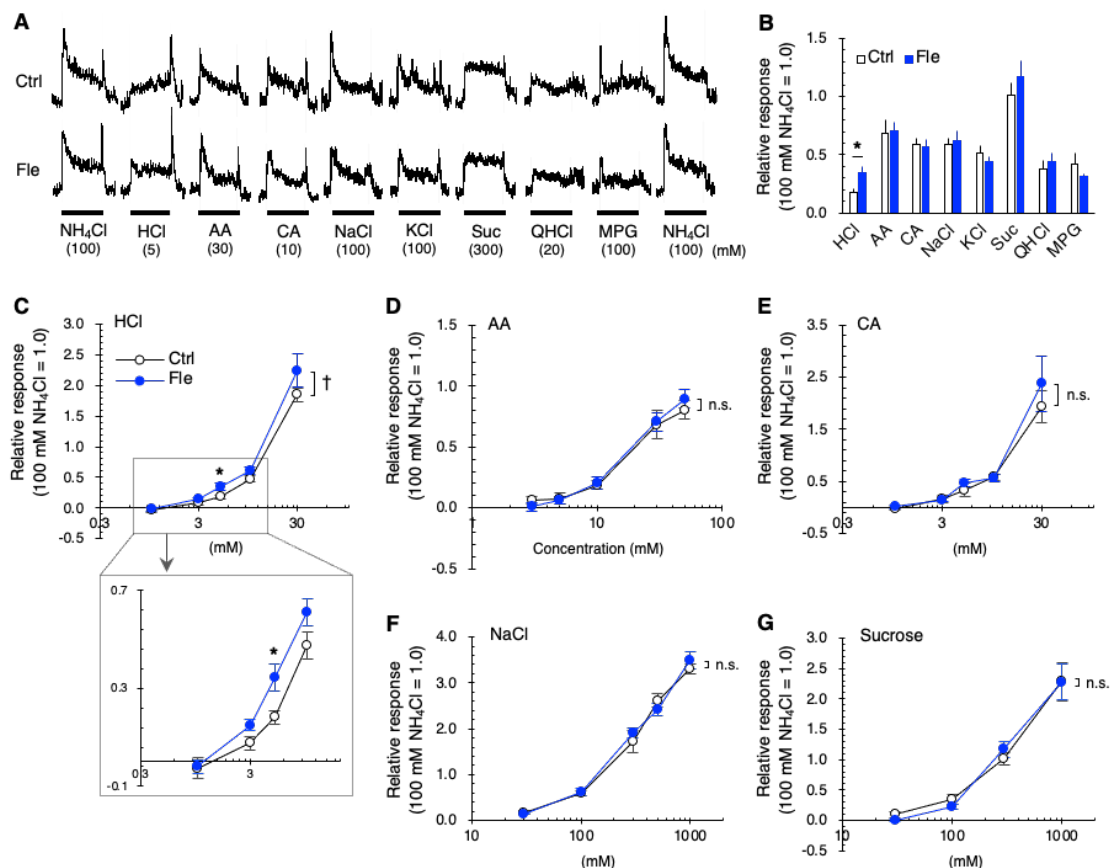
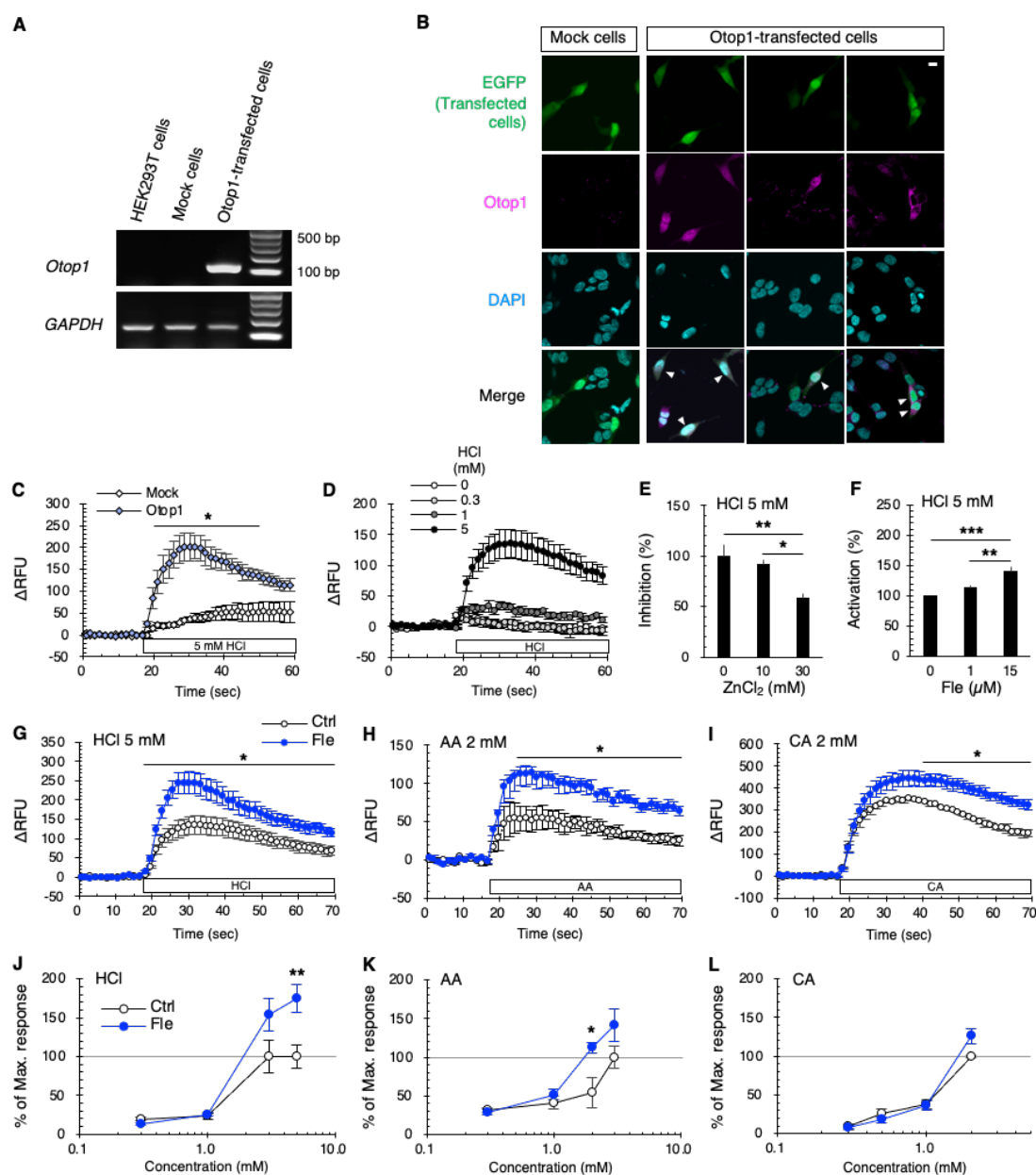


図 2-3. フレカイニド単回投与は、HCl に対する鼓索神経応答を増強する。

(A) 2 mg/体重 kg のフレカイニド (Fle、下段)と溶媒コントロール (Ctrl、上段)の腹腔内投与の影響を示す鼓索神経応答の代表例。(B) コントロール (白棒)または 2 mg/体重 kg Fle (青棒)を投与後 15–30 分の酸味 (HCl、5 mM HCl; AA、30 mM 酢酸; CA、10 mM クエン酸)、塩味 (NaCl、100 mM NaCl; KCl、100 mM KCl)、甘味 (Suc、300 mM スクロース)、苦味 (QHCl、20 mM キニーネ-HCl)、および、うま味 (MPG、100 mM グルタミン酸カリウム)化合物に対する鼓索神経応答 (100 mM NH<sub>4</sub>Cl を標準として用いた) (n = 6–10)。(C–G) Ctrl (白丸)または Fle 2 mg/体重 kg (青丸)の投与後 15–30 分の HCl (C)、AA (D)、CA (E)、NaCl (F)、および Suc (G)に対する濃度依存性応答 (n = 4–10)。アスタリスクは有意差を示す (\**P* < 0.05; unpaired *t*-test (B), \**P* < 0.05 post hoc unpaired *t*-test following two-way ANOVA; n.s. not significant, †*P* < 0.05, two-way ANOVA (C–G))。すべてのデータは平均 ± SEM として表した。



**図 2-4.** フレカイニドは、マウス Otop1 発現 HEK293T 細胞の膜電位変化を増強する。  
(A, B) EGFP/pCAGGS と pcDNA5/FRT/TO をコトランスフェクトした HEK293T 細胞 (Mock 細胞)、および、EGFP/pCAGGS と Otop1/pcDNA5/FRT/TO をコトランスフェクトした HEK293T 細胞 (Otop1 導入細胞) の電気泳動 (A)、および Otop1 免疫染色後の共焦点顕微鏡画像 (B)。RT-PCR は HEK293T 細胞、Mock 細胞および Otop1 導入細胞における Otop1 あるいは GAPDH (内部標準) の mRNA 発現を示した (A)。Mock 細胞および Otop1 導入細胞における EGFP、Otop1 (マゼンタ)、DAPI および重ね合わせ画像。スケールバー: 10 μm (B)。(C) Mock 細胞あるいは Otop1 発現細胞におけるベースラインからの膜電位感受性色素の相対蛍光値の変化 (n = 3 wells; mean ± SEM). \**P* < 0.05。溶液の投与は白箱で示した。同様の

結果は3回の実験で得られた。(D) Otop1 発現細胞における HCl 濃度依存的な RFU の変化 (n = 5–8 ウェル)。(E, F) 各  $\Delta$ RFU の最大値を用いた Otop1 発現細胞における 5 mM HCl 応答の ZnCl<sub>2</sub> 濃度依存的な抑制 (E)、および、Otop1 発現 HEK293T 細胞における 5 mM HCl 応答の フレカイニド濃度依存的な活性化 (F) (Data was analyzed by post hoc Tukey's test following one-way ANOVA (n = 3–7 wells; mean  $\pm$  SEM). \* $P$  < 0.05; \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001)。(G–I) Otop1 発現細胞における HCl (G)、酢酸 (AA) (H)、クエン酸 (CA) (I) に対する RFU の変化。(\* $P$  < 0.05 by unpaired  $t$ -test (n = 4–5 wells; 平均  $\pm$  SEM) (J–L) HCl (J)、AA (K)、C A (L) に対する濃度応答変化。各酸刺激の最大濃度の平均応答を 100% として表した。\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 by post hoc  $t$ -test following two-way ANOVA (n = 3–4 wells; 平均  $\pm$  SEM)。

表 2-1. mOtop1 コンストラクションのプライマー

|                     | Forward primer                           | Reverse primer                               | Product size |
|---------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| 1 <sup>st</sup> PCR | GGGGACCAGACTGGAAGATG                     | GGCAACTCCAGACAGTCAGA                         | 1954         |
| 2 <sup>nd</sup> PCR | GTTTAAACTTAAGCTTGGGGACCAGACTG<br>GAAGATG | CAGCGGGTTTAAACGGGCCCGGCAACTC<br>CAGACAGTCAGA | 1990         |

表 2-2. RT-PCR のプライマー

| Gene  | Forward primer       | Reverse primer        | Product size | Accession No.                              |
|-------|----------------------|-----------------------|--------------|--------------------------------------------|
| OTOP1 | ATGAGCACAAGGAACGGC   | TACTCTATGTTGAAGGGGTA  | 151          | NM_172709.3 (mouse)<br>NM_177998.3 (human) |
| GAPDH | AGGTCGGAGTCAACGGATTG | GGAATTGCCATGGGTGGAATC | 156          | NM_002046.7 (human)                        |

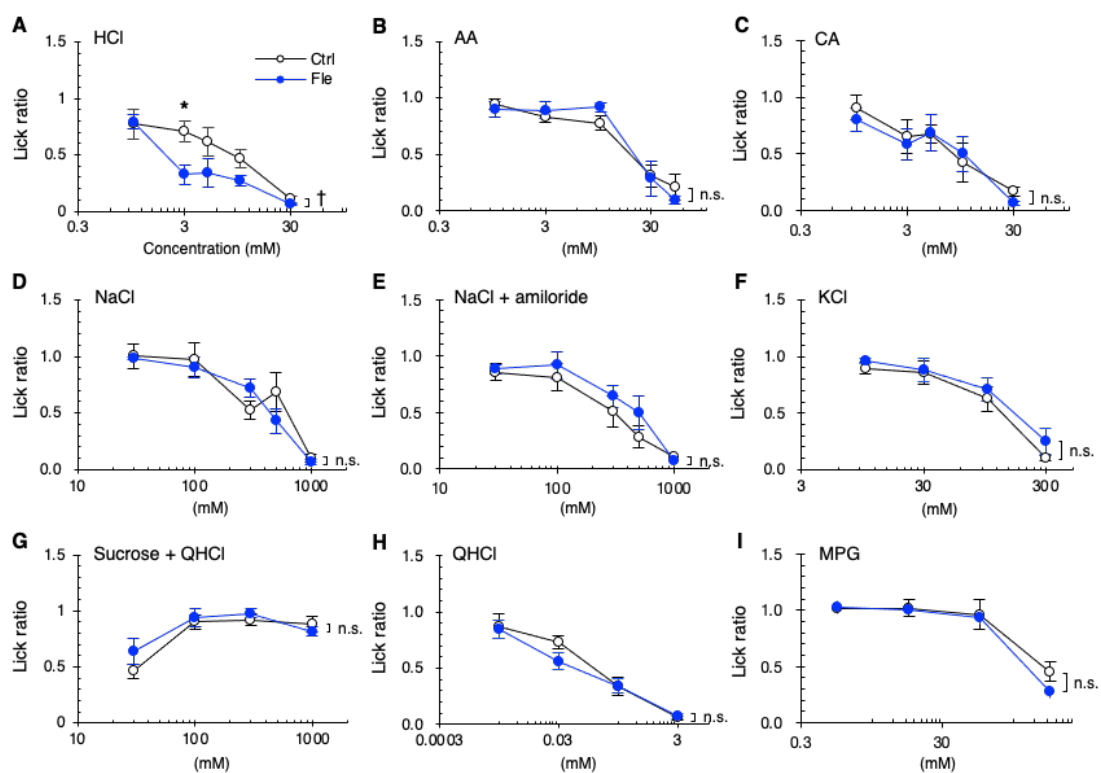


図 2-5. フレカイニド長期投与は HCl に対する味溶液摂取行動応答を増強する。

溶媒コントロール (Ctrl, 白丸)、あるいは 2 mg/体重 kg フレカイニド (Fle, 青丸) の 30 日間連続腹腔内投与後の HCl (A)、酢酸 (B)、クエン酸 (C)、NaCl (D)、NaCl + 30  $\mu$ M アミロライド (E)、KCl (F)、スクロース + 0.1 mM QHCl (G)、QHCl (H)、および、MPG (I) の様々な濃度に対する濃度応答変化。水に対するリック比率 ( $n = 5$ )。アスタリスクは有意差を示す (\* $P < 0.05$ ; two-way ANOVA, post hoc unpaired  $t$ -test; n.s. not significant, † $P < 0.05$ , two-way ANOVA)。すべてのデータは平均  $\pm$  SEM として表した。

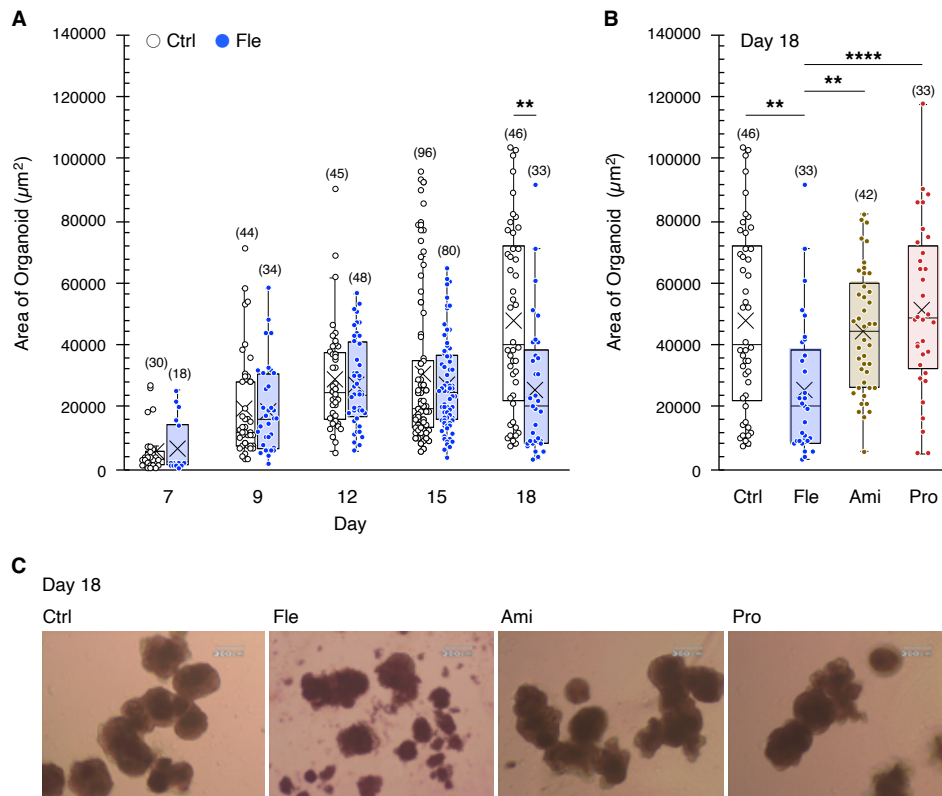


図 2-6. 味蕾オルガノイドの味細胞増殖におけるフレカイニドおよびその他の抗不整脈薬の影響。

(A) 培養 7、9、12、15 および 18 日目におけるコントロール (Ctrl, DMSO)あるいはフレカイニド (Fle; 15  $\mu\text{M}$ )を添加したマウス有郭乳頭組織由来味蕾オルガノイドコロニーのサイズを箱ひげ図に示した。アスタリスクは有意差を示す (\*\* $P < 0.01$ ; unpaired  $t$ -test)。すべてのデータは平均 $\pm$ SEMとして表した ( $n = 18-96$ , 詳細は各箱ひげプロットの上に示した)。(B) 培養 18 日目におけるコントロール (Ctrl)、フレカイニド (Fle; 15  $\mu\text{M}$ )、アミオダロン (Ami; 0.5  $\mu\text{M}$ )あるいはプロパフェノン (Pro; 10  $\mu\text{M}$ )を添加したオルガノイドコロニーのサイズ。アスタリスクは有意差を示す (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; one-way ANOVA, post hoc Tukey's test)。すべてのデータは平均 $\pm$ SEMとして表した ( $n = 33-46$ , 詳細は各箱ひげプロットの上に示した)。(C) 条件培地に Ctrl、Fle (15  $\mu\text{M}$ )、Ami (0.5  $\mu\text{M}$ )、または Pro (10  $\mu\text{M}$ )を添加培養した味蕾オルガノイドの培養 18 日目における代表的な明視野画像。スケールバー: 200  $\mu\text{m}$ 。

## 考 察

本研究では、フレカイニドによる味覚障害の背景にある分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。フレカイニドは、特定の電位依存性 Na<sup>+</sup>および/または K<sup>+</sup>チャネルを阻害することによって、活動電位の伝導を遅らせ、心臓の興奮性を低下させることが報告されている。したがって、我々は当初、味細胞に発現している電位依存性 Na<sup>+</sup>および/または K<sup>+</sup>チャネルを阻害することによって、フレカイニド誘発性の味覚障害が起こると予想していた。しかし、予期せぬことに、本研究ではフレカイニドが酸味受容体 Otop1 と直接相互作用し、マウスの酸味応答を特異的に増強することを発見した。

これまでに酸味受容体候補として、酸感受性イオンチャネル (ASIC)<sup>62</sup>、過分極活性化サイクリックヌクレオチド依存性 K<sup>+</sup>チャネル (HCN)<sup>63</sup>、K<sup>+</sup>チャネル<sup>64,65</sup>、多発性囊胞腎 2L1 (PKD2L1) + PKD1L3 ヘテロマー<sup>66-68</sup>、および Otop1<sup>61</sup> といった複数の分子が報告されている。最近、Otop1 をノックアウトすることで酸味受容細胞からの酸味応答が消失することが報告された。さらに、甘味受容細胞で Otop1 を発現するように設計されたマウスが甘味刺激および酸味刺激の両方に応答する味細胞を持つようになることが報告され<sup>58</sup>、Otop1 が酸味受容体として酸味受容において中心的な役割を果たしていることが示された。フレカイニドは、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル (*SCN5A*)<sup>32</sup>、リアノジン受容体 2 (*RyR2*)チャネル<sup>33</sup>、および心臓 K<sup>+</sup>チャネル (*KCNB1*)を阻害する働きを持つ<sup>34,69</sup>。味細胞では、*SCN5A* または *RyR2* を発現せず、*KCNB1* もほとんど発現していない。しかし、他の電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル *SCN2A*、*3A*、および *9A*、他の K<sup>+</sup>チャネル (*KCNQ1* および *Kir2.1*)、および *RyR1* が発現している<sup>47,49,70</sup>。したがって、味覚系におけるフレカイニドの主要な分子標的は、上記の Otop1 以外の酸味受容体候補や、Na<sup>+</sup>または K<sup>+</sup>チャネルではなく、酸味受容細胞に存在する Otop1 である可能性が高いことが示唆された。

mOtop1 一過的発現 HEK293T 細胞は、1–5 mM HCl、1 mM 酢酸、および 1 mM クエン酸に対して応答したが、Mock 細胞では応答しなかった。5 mM HCl に対する mOtop1 発現 HEK293T 細胞の応答は、10–30 mM ZnCl<sub>2</sub> (Otop1 阻害剤<sup>43,58</sup>)の濃度依存的に抑制された (図 2-4)。マウスにおける HCl、酢酸、クエン酸に対する CT 神経および味行動応答は、本研究 (図 2-1、3)、および、以前の研究<sup>71</sup>で、それぞれ 3 mM、5 mM、および 3 mM の濃度で観察された。したがって、酸味応答を誘発する濃度域は、mOtop1 発現 HEK293T 細胞とマウス CT 神経の間で非常に類似している。これは HEK293T 細胞実験での mOtop1 が、実際のマウスの酸味受容体と同様に機能することを示唆している。

*in vivo* 研究では、フレカイニドによる酸味応答の増強が、酢酸やクエン酸などの弱酸ではなく、強酸 (HCl)でのみ観察された。しかし対照的に、*in vitro* 実験の Otop1 発現細胞では、フレカイニドは、強酸と弱酸の両方に対して応答を増強した。フレカイニドによる *in vivo* と *in vitro* 実験間のこの不一致は、フレカイニドが *in vivo* においては Otop1 以外の分子も標的にしている可能性がある。たとえば、前述のように、フレカイ

ニドには複数の標的イオンチャネルがあることが報告されている<sup>32-34</sup>。さらに、Kir2.1 K<sup>+</sup>チャネルは、Otop1 チャネルと協調して、味細胞の強酸ではなく弱酸に対する応答を仲介することが報告されている<sup>50</sup>。したがって、フレカイニドは、Otop1 だけでなく Kir2.1 などの他の分子の興奮性にも影響を与えることにより、*in vivo*での弱酸味感受性に何らかの影響を与えることで *in vitro* との結果の不一致が生じた可能性が示唆された。

酸味の様々な修飾因子が以前に報告されている。たとえば、ノルアドレナリンは健康人の酸味の閾値を 22%、苦味を 39% 有意に減少させることがわかっている<sup>72</sup>。食欲促進ホルモンであるグレリン受容体欠損マウスは、酸味および塩味に対する味行動応答性の低下を示した<sup>73</sup>。さらに、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1、インスリン分泌を刺激するインクレチンホルモン)受容体欠損マウスは、行動試験で甘味感受性の低下とクエン酸の酸味感受性の増強を示した<sup>74</sup>。このように、複数の因子がヒトおよびマウスの酸味感受性を修飾することが見出されたが、それらは酸味に特異的ではなかった。これは、これら標的受容体が味蕾において非特異的に発現していることに起因する可能性がある。本研究では、フレカイニドが他の基本味に対する応答を変化させることなく、酸味を特異的に増強させることを示した。したがって、我々の研究は、酸味感受性が選択的に、特定の物質によって増強されるということを世界に先駆けて実証した研究であると考えられる。

興味深いことに、フレカイニドの投与は、短期的に酸味感受性を高めるだけでなく、長期的には味蕾オルガノイドの増殖を抑制した。Otop1 は、内耳の発生における耳胞の黄斑に発現している。2つの Otop1 変異モデルである Tilted (tlt) および Mergulhador (mlh) マウスは、耳石特異的な形態形成の障害を示し、重力および空間的方向性に対する知覚を欠いていた<sup>75</sup>。耳石が完全に脱落した内耳の前庭の欠陥は、Otop1 欠損ゼブラフィッシュでも見られた<sup>76</sup>。Otop1 は、成体マウスの支持細胞近くの細胞外 Ca<sup>2+</sup>濃度のセンサーとしても機能し<sup>77</sup>、Otop1 が生涯を通して内耳の耳石形成に適したイオン環境 (Ca<sup>2+</sup>や H<sup>+</sup>濃度)の維持に寄与する可能性があることを示している。これらの結果は、味蕾に発現する Otop1 が単に酸味を知覚しているだけでなく、味蕾の形態形成維持や、味蕾内のイオン環境の調節にも関与している可能性を示唆している。したがって、フレカイニドの長期投与による味蕾オルガノイドの成長抑制は、フレカイニドが味蕾の味細胞に発現する Otop1 に直接、長期にわたって作用することで、適切な形態維持に関わる細胞周囲イオンレベルの調節を妨げることで生じているのかもしれない。さらに興味深いことに、フレカイニドの別の副作用として目眩が報告されている。目眩は前庭の耳石にある有毛細胞の機能障害に関連している可能性がある<sup>78</sup>。本研究知見により、フレカイニドは、味蕾だけでなく内耳の Otop1 にも作用し、その活性を増強することで通常の間方向感知を妨害している可能性が推察された。このことはフレカイニド誘発性目眩発症の分子メカニズムを理解するための一助となるかもしれない。

結論として、フレカイニドは味細胞の Otop1 を介して酸味を増強することがわかった。本研究は、抗不整脈薬治療に伴う味覚の病態生理学的変化を理解するための実用的な知見を提供するものと考えられる。さらに、フレカイニドと Otop1 の分子レベルでの相互作用メカニズムを解明することにより、不整脈患者における味覚障害の不快感を軽減

し、薬の副作用を最小化する新薬、具体的には正負に制御可能な新規 Otop1 アロステリックモジュレーターの開発につながることが期待される。

## 総 括

本研究では、まず、鳥類のモデル動物であるニワトリを用いて脂肪味の受容について調べた（第一章）。次に、味覚修飾に起因するような薬剤性味覚障害の発症機構について、哺乳類のモデル動物であるマウスを用いて研究を行った（第二章）。

第一章では、脂肪味受容体候補の2つの遺伝子、GPR120 と CD36 がニワトリの口腔組織で発現していることを示した。また、GPR120 の新たな作用物質および阻害物質が同定された。さらに、いくつかのリパーゼ遺伝子が口腔組織でも発現していることを見出すとともに、口腔組織が実際にリパーゼ活性を持つことを確認した。これらの結果は、飼料中の油脂が口腔リパーゼによって部分的に FFA に消化され、その FFA がニワトリの口腔組織の GPR120 や CD36 などの脂肪味受容体を活性化する可能性を示唆している。

ニワトリは長年進化・発生研究等に多用されてきたモデル動物であると同時に、極めて重要な産業動物であり、その飼料消費量は全世界の家畜の総配合飼料消費量のほぼ半数を占めている。今後もニワトリの味覚受容機構の研究を進め、味覚生理学や進化生物学、ならびに飼料効率の改善等を通して畜産業の発展に貢献していきたい。

第二章では、抗不整脈薬であるフレカイニドの短期的および長期的な影響を調べた。味行動応答（リック試験と2瓶選択嗜好試験）では、フレカイニドを単回腹腔内投与されたマウスが、コントロールと比較して、基本的な味溶液である NaCl、キニーネ、スクロース、KCl およびグルタミン酸カリウムでは変化がなく、HCl に対して嗜好性の有意な減弱を示すことを明らかにした。また、フレカイニドを単回投与したマウスは、HCl に対して有意に高い味神経への応答を示したが、他の味溶液に対しては変化がなかった。興味深いことに、Otop1（マウスの酸味受容体）を一過的に強制発現させた HEK293T 細胞を用いた実験では、フレカイニドが濃度依存的に HCl に対する応答を増強することが示された。フレカイニドを1日1回30日間投与したマウスは、HCl のみに対して嗜好性の低下を示した。さらに、マウス有郭乳頭由来の味蕾オルガノイドにフレカイニドを添加するとコロニーサイズの増大が抑制された。これらの結果は、フレカイニドが Otop1 と直接相互作用し、短期的には味細胞の HCl に対する応答を選択的に増強し、長期的には味細胞の増殖を阻害する可能性があることを示唆している。

本研究は、フレカイニドが味覚障害を引き起こすメカニズムについて新たな考察を与え、治療および予防法開発への一助となると期待される。さらに、今回、酸味感受性が特定の物質によって選択的に増強される分子メカニズムを初めて見出すことができた。薬剤性味覚障害発症の分子機序、および酸味受容機構の研究のさらなる発展を目指して、今後も取り組んでいきたい。

## 謝 辞

九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野 重村 憲徳 教授には、本研究の遂行全般、および論文作成にあたり、終始懇切丁寧なご指導・ご鞭撻を賜り、研究の面白さ・厳しさを熱心にご指導頂きました。厚く御礼申し上げます。

第一章の研究の実施にあたり、多大なるご指導、ご助言を頂きました、九州大学大学院農学研究院家畜生体機構学分野 田畑 正志 教授、西村 正太郎 准教授に拝謝申し上げます。

第二章の研究を通して、実験、データ解析、および論文作成にあたり多くのご指導とサポートを頂きました 現 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔生理学分野 吉田 竜介 教授、九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野、實松 敬介 講師、高井 信吾 助教、岩田 周介 助教に心より感謝申し上げます。

出向先で温かいご指導を賜りました 弘前大学農学生命科学部国際園芸農学科家畜飼養学分野 松崎 正敏 教授、同学科家畜生理学分野 川端 二功 准教授に深謝申し上げます。

臨床の面から熱く貴重なご指導を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔医療連携学分野 山添 淳一 講師に心より感謝申し上げます。

日頃から互いに学び合い、励まし合い、有意義な大学院生活を共に送ってくださった九州大学大学院歯学府口腔機能解析学分野 同期の尾崎 礼奈 先生、渡邊 雄 先生に心より感謝申し上げます。

様々なご協力とご支援を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔機能解析学分野、九州大学大学院農学研究院家畜生体機構学分野、ならびに弘前大学農学生命科学部国際園芸農学科家畜飼養学分野・家畜生理学分野のスタッフ、大学院生、および学部学生の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、研究生生活を精神的、経済的に支えてくれた家族に感謝いたします。

令和3年2月吉日

川端 由子

## 参考文献

1. Schiffman, S. S., Lockhead, E. & Maes, F. W. Amiloride reduces the taste intensity of Na<sup>+</sup> and Li<sup>+</sup> salts and sweeteners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6136–6140 (1983).
2. Graber, M. & Kelleher, S. Side effects of acetazolamide: The champagne blues. *Am J Med* **84**, 979–980 (1988).
3. Rolls, B. J. & Bell, E. A. Intake of fat and carbohydrate: Role of energy density. *Eur J Clin Nutr* **53**, 166–173 (1999).
4. Verhagen, J. V., Rolls, E. T. & Kadohisa, M. Neurons in the primate orbitofrontal cortex respond to fat texture independently of viscosity. *J Neurophysiol* **90**, 1514–1525 (2003).
5. Gilbertson, T. A., Fontenot, D. T., Liu, L., Zhang, H. & Monroe, W. T. Fatty acid modulation of K<sup>+</sup> channels in taste receptor cells: Gustatory cues for dietary fat. *Am J Physiol - Cell Physiol* **272**, C1203–1210 (1997).
6. Fukuwatari, T. *et al.* Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett* **414**, 461–464 (1997).
7. Laugerette, F. *et al.* CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**, 3177–3184 (2005).
8. Sclafani, A., Ackroff, K. & Abumrad, N. A. CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **293**, 1823–1832 (2007).
9. Matsumura, S. *et al.* GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* **28**, 49–55 (2007).
10. Ancel, D. *et al.* The oral lipid sensor GPR120 is not indispensable for the orosensory detection of dietary lipids in mice. *J Lipid Res* **56**, 369–378 (2015).
11. Sclafani, A., Zukerman, S. & Ackroff, K. GPR40 and GPR120 fatty acid sensors are critical for postoral but not oral mediation of fat preferences in the mouse. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **305**, R1490–1497 (2013).
12. Brown, A. J. *et al.* The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* **278**, 11312–11319 (2003).
13. Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H. & Ling, L. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem* **281**, 34457–34464 (2006).
14. Gilbertson, T., Yu, T. & Shah, B. Gustatory Mechanisms for Fat Detection. *Front Neurosci* **Chapter 3**, 83–104 (2010).

15. Sawamura, R., Kawabata, Y., Kawabata, F., Nishimura, S. & Tabata, S. The role of G-protein-coupled receptor 120 in fatty acids sensing in chicken oral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **458**, (2015).
16. Cartoni, C. *et al.* Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci* **30**, 8376–8382 (2010).
17. Martin, C. *et al.* The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: Impact on spontaneous fat preference. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
18. Matsumura, S. *et al.* Colocalization of GPR120 with phospholipase-C $\beta$ 2 and  $\alpha$ -gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* **450**, 186–190 (2009).
19. Ozdener, M. H. *et al.* CD36- and GPR120-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in human taste bud cells mediates differential responses to fatty acids and is altered in obese mice. *Gastroenterology* **146**, 995–1005 (2014).
20. Kawai, T. & Fushiki, T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **285**, 447–454 (2003).
21. Pepino, M. Y., Love-Gregory, L., Klein, S. & Abumrad, N. A. The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J Lipid Res* **53**, 561–566 (2012).
22. Kawabata, Y., Kawabata, F., Nishimura, S. & Tabata, S. Oral lipase activities and fat-taste receptors for fat-taste sensing in chickens. *Biochem Biophys Res Commun* **495**, 131–135 (2018).
23. Kudo, K. I., Nishimura, S. & Tabata, S. Distribution of taste buds in layer-type chickens: Scanning electron microscopic observations. *Anim Sci J* **79**, 680–685 (2008).
24. Rajapaksha, P. *et al.* Labeling and analysis of chicken taste buds using molecular markers in oral epithelial sheets. *Sci Rep* **6**, 1–10 (2016).
25. Hirasawa, A. *et al.* Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* **11**, 90–94 (2005).
26. Martin, C. *et al.* Lipid-mediated release of GLP-1 by mouse taste buds from circumvallate papillae: Putative involvement of GPR120 and impact on taste sensitivity. *J Lipid Res* **53**, 2256–2265 (2012).
27. Furuse, M., Matsumoto, M., Okumura, J. I., Sugahara, K. & Hasegawa, S. Intracerebroventricular injection of mammalian and chicken glucagon-like peptide-1 inhibits food intake of the neonatal chick. *Brain Res* **755**, 167–169 (1997).
28. Vlasses, P. H. & Ferguson, R. K. Temporary ageusia related to captopril. *Lancet* **2**, 526 (1979).
29. Schlienger, R. G., Saxer, M. & Haefeli, W. E. Reversible ageusia associated with losartan. *Lancet* **347**, 471–472 (1996).

30. Wickham, R. S. *et al.* Taste changes experienced by patients receiving chemotherapy. *Oncol Nurs Forum* **26**, 697–706 (1999).
31. Mueller, R. A. & Baur, H. R. Flecainide: A new antiarrhythmic drug. *Clinical Cardiology* vol. 9 1–5 (1986).
32. Liu, H., Tateyama, M., Clancy, C. E., Abriel, H. & Kass, R. S. Channel openings are necessary but not sufficient for use-dependent block of cardiac Na<sup>+</sup> channels by flecainide: Evidence from the analysis of disease-linked mutations. *J Gen Physiol* **120**, 39–51 (2002).
33. Tamargo, J., Caballero, R., Gómez, R., Valenzuela, C. & Delpón, E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* **62**, 9–33 (2004).
34. Watanabe, H. *et al.* Flecaïnide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nat Med* **15**, 380–383 (2009).
35. Neuss, H. Long term use of flecaïnide in patients with supraventricular tachycardia. *Drugs* **29**, 21–25 (1985).
36. Muhiddin, K. A., Turner, P., Hellestrand, K. & Camm, A. J. Evaluation of the efficacy of flecaïnide acetate in the treatment of ventricular premature contractions. *Postgrad Med J* **61**, 489–496 (1985).
37. Kreeger, R. W. & Hammill, S. C. New antiarrhythmic drugs: tocainide, mexiletine, flecaïnide, encainide, and amiodarone. *Mayo Clin Proc* **62**, 1033–1050 (1987).
38. Lindemann, B. Receptors and transduction in taste. *Nature* **413**, 219–225 (2001).
39. Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P. & Zuker, C. S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**, 288–294 (2006).
40. Shigemura, N. & Ninomiya, Y. Recent Advances in Molecular Mechanisms of Taste Signaling and Modifying. *Int Rev Cell Mol Biol* **323**, 71–106 (2016).
41. Iwata, S., Yoshida, R. & Ninomiya, Y. Taste Transductions in Taste Receptor Cells: Basic Tastes and Moreover. *Curr Pharm Des* **20**, 2684–2692 (2014).
42. Taruno, A. *et al.* Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **473**, 3–13 (2021).
43. Tu, Y.-H. *et al.* An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science* **359**, 1047–1050 (2018).
44. Ohmoto, M., Matsumoto, I., Misaka, T. & Abe, K. Taste receptor cells express voltage-dependent potassium channels in a cell age-specific manner. *Chem Senses* **31**, 739–746 (2006).
45. Wang, H. *et al.* Expression of the voltage-gated potassium channel KCNQ1 in mammalian taste bud cells and the effect of its null-mutation on taste preferences. *J Comp Neurol* **512**, 384–398 (2009).

46. Medler, K. F., Margolskee, R. F. & Kinnamon, S. C. Electrophysiological characterization of voltage-gated currents in defined taste cell types of mice. *J Neurosci* **23**, 2608–2617 (2003).
47. Liu, L., Hansen, D. M., Kin, I. & Gilbertson, T. A. Expression and characterization of delayed rectifying K<sup>+</sup> channels in anterior rat taste buds. *Am J Physiol - Cell Physiol* **289**, C868-880 (2005).
48. DeFazio, R. A. *et al.* Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci* **26**, 3971–3980 (2006).
49. Gao, N. *et al.* Voltage-gated sodium channels in taste bud cells. *BMC Neurosci* **10**, 1–13 (2009).
50. Ye, W. *et al.* The K<sup>+</sup> channel KIR2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E229–E238 (2016).
51. Rebello, M. R., Maliphol, A. B. & Medler, K. F. Ryanodine Receptors Selectively Interact with L Type Calcium Channels in Mouse Taste Cells. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
52. Takai, S. *et al.* Glucagon-like peptide-1 is specifically involved in sweet taste transmission. *FASEB J* **29**, 2268–2280 (2015).
53. Yoshida, R. *et al.* Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 935–939 (2010).
54. Shigemura, N. *et al.* Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. *J Neurosci* **33**, 6267–6277 (2013).
55. Tordoff, M. G. & Bachmanov, A. A. Mouse Taste Preference Tests: Why Only Two Bottles? *Chem Senses* **28**, 315–324 (2003).
56. Kawai, T. & Fushiki, T. Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **285**, 447–454 (2003).
57. Matsumoto, I., Ohmoto, M., Narukawa, M., Yoshihara, Y. & Abe, K. Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci* **14**, 685–687 (2011).
58. Zhang, J. *et al.* Sour Sensing from the Tongue to the Brain. *Cell* **179**, 392-402.e15 (2019).
59. Jürgens, G., Graudal, N. A. & Kampmann, J. P. Therapeutic drug monitoring of antiarrhythmic drugs. *Clin Pharmacokinet* **42**, 647–663 (2003).
60. Kuo, C. C., Chen, R. S., Lu, L. & Chen, R. C. Carbamazepine inhibition of neuronal Na<sup>+</sup> currents: Quantitative distinction from phenytoin and possible therapeutic implications. *Mol Pharmacol* **51**, 1077–1083 (1997).
61. Teng, B. *et al.* Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1. *Curr Biol* **29**, 3647-3656.e5 (2019).
62. Ugawa, S. *et al.* Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *J Neurosci* **23**, 3616–3622 (2003).

63. Stevens, D. R. *et al.* Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* **413**, 631–635 (2001).
64. Lin, W., Burks, C. A., Hansen, D. R., Kinnamon, S. C. & Gilbertson, T. A. Taste receptor cells express pH-sensitive leak K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol* **92**, 2909–2919 (2004).
65. Richter, T. A., Dvoryanchikov, G. A., Chaudhari, N. & Roper, S. D. Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J Neurophysiol* **92**, 1928–1936 (2004).
66. Lopezjimenez, N. D. *et al.* Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd1l3 and Pkd2l1, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J Neurochem* **98**, 68–77 (2006).
67. Huang, A. L. *et al.* The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* **442**, 934–938 (2006).
68. Ishimaru, Y. *et al.* Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12569–12574 (2006).
69. Madeja, M., Steffen, W., Mesic, I., Garic, B. & Zhorov, B. S. Overlapping binding sites of structurally different antiarrhythmics flecainide and propafenone in the subunit interface of potassium channel Kv2.1. *J Biol Chem* **285**, 33898–33905 (2010).
70. Medler, M. R. R. and K. F. Ryanodine receptors selectively contribute to the formation of taste-evoked calcium signals in mouse taste cells. *Eur J Neurosci* **32**, 1825–1835 (2010).
71. Horio, N. *et al.* Sour taste responses in mice lacking pkd channels. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
72. Heath, T. P., Melichar, J. K., Nutt, D. J. & Donaldson, L. F. Human taste thresholds are modulated by serotonin and noradrenaline. *J Neurosci* **26**, 12664–12671 (2006).
73. Shin, Y. K. *et al.* Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsivity to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS One* **5**, 1–13 (2010).
74. Shin, Y. K. *et al.* Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J Neurochem* **106**, 455–463 (2008).
75. Hurle, B. *et al.* Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in tilted/mergulhador mice caused by mutations in otopenin 1. *Hum Mol Genet* **12**, 777–789 (2003).
76. Hughesa, I. *et al.* Otopenin 1 is required for otolith formation in the zebrafish *Danio rerio*. *Dev Biol* **276**, 391–402 (2004).
77. Kim, E. *et al.* Regulation of cellular calcium in vestibular supporting cells by otopenin 1. *J Neurophysiol* **104**, 3439–3450 (2010).

78. Andrade, L. R., Lins, U., Farina, M., Kachar, B. & Thalmann, R. Immunogold TEM of otoconin 90 and otolin - relevance to mineralization of otoconia, and pathogenesis of benign positional vertigo. *Hear Res* **292**, 14–25 (2012).