

# 博士論文

マウス味蕾細胞におけるヘミチャネルの機能的な  
発現割合と物質透過性

九州工業大学大学院 生命体工学研究科

岩本 正史

## 本論文の構成と概要

本論文は、序論、実験方法、結果、考察、結論から構成され、以下に概要を記述する。

### 【序論】

私たちが認識できる「味」は、口腔内に分布する味蕾により検知される。味蕾は、IからIVに分類される味蕾細胞が集団を形成することで機能する。II型細胞は、甘味、旨味、苦味、一部の塩味の検知を行い、III型細胞は酸味の検知を行う。味蕾細胞の先端に味物質を検知する受容体があり、そこに味物質が結合すると、その情報が味蕾細胞から味神経へ伝達され、最終的に脳で私たちは味を認識する。

味蕾細胞から味神経への味情報伝達には、アデノシン三リン酸 (ATP) が必須であることが、2005年に報告された。その後、ATPの放出機構として、細胞膜の電位が正の方向に変化した時、つまり脱分極した時に開口するパネキシン (Px) やコネキシン (Cx) へミチャネルの存在が報告された。へミチャネルとは、分子量1200程度の物質を細胞外へ放出できる膜タンパク質である。さらに、II型細胞には、脱分極および細胞外カルシウム濃度の低下時に開口する Calcium Homeostasis Modulator (CALHM) チャネルの発現が報告された。CALHMノックアウトマウスを用いた研究では、甘味、旨味、苦味への感受性が顕著に低下したことから、CALHMがATPの放出に最も関与しているチャネルであると考えられている。

私は、CALHMに加えPxもしくはCx、またどちらもがATP放出に関与しているのではないかと考えた。理由は、CALHMノックアウトマウスの実験で、特に、旨味、苦味への味神経応答が完全に消失しないこと、CALHMのmRNAはII型細胞の80%に発現すること、ATP放出能があるPx、CxもCALHMが開く脱分極した時には開くこと、などからである。単一味蕾におけるCALHMおよびへミチャネルの機能的な発現割合を調べた報告はなく、味情報伝達機構の解明に重要だと考え、本研究では、物質の取込実験および薬理学的手法を用いて、①味蕾細胞におけるCALHMの機能的な発現割合、および、②Px、Cxの機能的な発現割合を解明することを目的とした。

ATPは負電荷である。ATP以外にも、中性電荷のアドレナリン、正電荷のアセチルコリンなどが細胞間の情報伝達に関与するが、その放出経路は不明である。へミチャネルから、中性、正電荷の物質が取り込まれるかを調べることで、それらの物質の放出にへミチャネルが関与するのかわかることができると考え、本研究では更に、③味蕾細胞が取込む物質の電荷依存性を明らかにすることを目的とした。

### 【実験方法】

細胞が放出するATP量の測定から、へミチャネルの機能的発現割合を求めることは困難である。そこで、細胞外液に加えたbioctinが、何個の味蕾細胞に取り込まれるかを定量的に測定する方法を考えた (取込実験)。Bioctinの取込条件を変えることで、CALHMの

みを開口させることが可能である。取込条件および阻害剤を用いることで、CALHM、Cx、Px の機能的な発現割合を求めた。細胞型は、細胞型特異的に発現しているタンパク質の免疫染色法で同定した。共焦点レーザー顕微鏡で取得した連続光学切片像を用いることで、biocytin 取込細胞数および免疫陽性細胞数を計数し、取込率を求めた。また、取り込まれる物質の電荷の影響は、中性物質の biocytin、1 価の正電荷を持つ biotin 誘導体、2 価の正電荷を持つ propidium iodide を用いた。

### 【結果】

主に、以下の 6 つの点の実験から明らかとなった。

1. CALHM が開く 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  の条件では約 50% の II 型細胞に biocytin が取り込まれた。
2. 電気生理学実験では、0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  に約 40% の細胞が応答した。
3. 脱分極、細胞外カルシウム濃度低下なしの条件である 5 mM  $[K^+]_{out}$ 、2 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  であっても、約 20% の II 型細胞に biocytin が取り込まれた。
4. Px、Cx が開口する脱分極 (150 mM  $[K^+]_{out}$ ) 条件では 100% の II 型細胞に biocytin が取り込まれた。ごく一部の I 型細胞も取込んだが、III 型細胞は取込まなかった。
5. 脱分極条件での biocytin の取り込みは、Px の阻害剤である、DIDS、probenecid、10Panx で抑制されなかった。
6. II 型味蓄細胞には、中性の biocytin および 1 価の正電荷を持つ biotin 誘導体を取り込まれたが、2 価の正電荷を持つ propidium iodide は取り込まれなかった。

### 【考察】

約 30~40% の II 型細胞に CALHM が、全ての II 型細胞に Px 以外のヘミチャネル (Cx または未知のチャネル) が機能的に発現していることを明らかにした。II 型において ATP 放出に関するヘミチャネルが異なることは、遠心性情報伝達により ATP 放出量を細胞ごとに制御することが可能である。II 型細胞に発現する味物質受容体とヘミチャネルサブタイプの間関係を明らかにすることで、味情報の修飾に関する知見が得られることが期待できる。また、ヘミチャネルは、陰イオンに加え、中性および一価の正電荷の物質の放出が可能であることから、ヘミチャネルは、味蓄における多様な味情報伝達経路に関与することが考えられる。

### 【結論】

II 型細胞は、発現する味物質受容体は異なるが、細胞内のシグナル伝達経路は共通と考えられていた。しかし、本研究により、II 型細胞をヘミチャネル発現の違いにより、II 型サブタイプに分類可能であることを初めて示した。ヘミチャネル発現の違いによる II 型細胞の多様性が、味情報伝達や味蓄機能の維持にどのように関与するのかを今後明らかにする必要がある。

## 目次

第1章 序論.....	1
1-1 研究背景.....	2
1-1-1 味蕾構造と味蕾細胞の分類.....	2
1-1-2 味蕾細胞から味神経への情報伝達.....	4
1-1-3 II型細胞における味情報伝達.....	4
1-2 ヘミチャネルの特徴.....	11
1-2-1 コネキシン.....	11
1-2-2 パネキシン.....	14
1-2-3 CALHM.....	14
1-3 本研究の目的.....	20
第2章 実験方法.....	22
2-1 実験動物.....	23
2-2 標本調製方法.....	23
2-3 溶液組成.....	24
2-4 Biocytin 取り込み実験.....	27
2-4-1 Biocytin 取り込み実験.....	27
2-4-2 阻害剤を用いた場合.....	27
2-4-3 阻害剤 10Panx および Gap26 を用いた場合.....	29
2-4-4 Biocytin 取り込み実験における取り込み時間の最適化.....	29
2-4-5 Biocytin 浸漬後の洗浄時間について.....	30
2-5 免疫組織化学染色.....	31
2-6 データ解析方法.....	32
2-6-1 Biocytin 取込の判定.....	32
2-6-2 細胞型の判定.....	32
2-6-3 Biocytin 取り込み率の計算.....	33
第3章 結果.....	35

3-1	味蓄細胞への biocytin の取り込み .....	36
3-2	細胞膜損傷による biocytin の細胞内蓄積の可能性.....	37
3-3	取り込み率と時間の関係.....	38
3-4	CALHM が開口する条件での biocytin 取り込み割合と阻害剤の効果.....	43
3-5	細胞外カルシウム濃度低下による電位依存性外向き電流の増加.....	47
3-6	Px、Cx が開口する条件での biocytin の取り込み割合と阻害剤の効果 .....	50
3-7	電気生理学実験での阻害剤の効果 .....	56
3-8	II型細胞以外で biocytin が取り込まれる細胞について .....	56
3-9	脱分極条件における細胞内から細胞外への負電荷物質の放出 .....	60
3-10	Biotin 誘導体を用いた取り込まれる分子の電荷の影響.....	62
3-11	同一細胞での biocytin と LY の取り込み量の比較.....	64
第4章 考察.....		66
4-1	Biocytin の取り込み経路.....	68
4-1-1	味蓄細胞間ギャップ結合による biocytin 拡散の可能性.....	68
4-1-2	低カルシウム外液 (5 mM $[K^+]_{out}$ 、0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin 取り込み経路 .....	70
4-1-3	高カリウム外液 (150 mM $[K^+]_{out}$ 、2 mM $Ca^{2+}]_{out}$ ) 外液での biocytin 取り込み経路 .....	72
4-1-4	Normal 外液 (5 mM $[K^+]_{out}$ )、2 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin 取り込み経路 ..	74
4-2	II型細胞におけるヘミチャネルの役割.....	76
4-3	Cx(脱分極で開く Px 以外の)ヘミチャネルの役割 .....	76
4-4	I型細胞 (II型、III型マーカーで染色されない biocytin 取り込み細胞) の役割	79
4-5	ATP 以外で、ヘミチャネルから放出される低分子の可能性.....	81
第5章 結論.....		83
謝辞.....		84
参考文献 .....		85

## 図目次

図 1	マウスの舌における味蕾の分布と呼称.....	7
図 2	味蕾の模式図.....	7
図 3	味蕾の透過光顕微鏡写真.....	8
図 4	味蕾細胞の分類.....	9
図 5	味蕾細胞の情報伝達の仕組み.....	10
図 6	II型味蕾細胞に発現しているヘミチャネル.....	16
図 7	CALHM の発現割合の測定.....	20
図 8	味蕾細胞の情報伝達にかかわっている低分子.....	21
図 9	標本調製方法.....	24
図 10	Biocytin の取り込み実験.....	27
図 11	阻害剤を用いた 150 mM $[K^+]_{out}$ での取り込み実験.....	28
図 12	阻害剤を用いた 0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ での取り込み実験.....	28
図 13	阻害剤 10Panx および Gap26 を用いた場合の取り込み実験.....	29
図 14	LY が normal 外液で排出される様子.....	30
図 15	Biocytin が取り込まれた細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像.....	32
図 16	味蕾細胞を味孔から基底膜側に向かって光学切片を連続で撮影した画像.....	33
図 17	biocytin 取り込み率の計算式.....	34
図 18	Biocytin が取り込まれかつ PLC $\beta$ 2 で染色された細胞の共焦点顕微鏡画像..	34
図 19	高カリウム外液(150 mM $[K^+]_{out}$ )および normal 外液での biocytin の取り込み.....	36
図 20	Propidium iodide の構造式.....	37
図 21	剥離舌上皮標本の propidium iodide を用いた細胞膜損傷の確認.....	37
図 22	高カリウム外液 (100 mM $[K^+]_{out}$ ) での LY を用いた色素の取り込み速度の測定.....	39
図 23	高カリウム外液 (30 mM $[K^+]_{out}$ ) での biocytin の取り込み画像.....	41
図 24	高カリウム外液 (150 mM $[K^+]_{out}$ および 30 mM $[K^+]_{out}$ ) での II 型細胞の biocytin 取り込み率と浸漬時間の関係.....	42

図 25	低カルシウム外液 (0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) および 2 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ での biocytin の取り込みの蛍光顕微鏡画像.....	44
図 26	低カルシウム外液 (0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin の取り込み率の時間依存性および Ca キレート剤による影響.....	45
図 27	低カルシウム外液 (0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin 取り込み率への阻害剤の影響 蛍光顕微鏡画像 .....	46
図 28	低カルシウム外液 (0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin 取り込みにおける阻害剤の影響.....	47
図 29	II 型細胞での normal 外液および 0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ での外向き電流測定.....	48
図 30	II 型細胞での normal 外液および 0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ での外向き電流測定結果まとめ .....	49
図 31	低カルシウム外液 (0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での外向き電流の活性化時定数 .....	50
図 32	高カリウム外液 (150 mM $[K^+]_{out}$ ) での biocytin 取り込みにおける阻害剤の効果.....	54
図 33	高カリウム外液 (150 mM $[K^+]_{out}$ ) での II 型細胞の biocytin 取り込み割合と阻害剤の効果まとめ .....	55
図 34	免疫染色法による C43 の味蕾内でのタンパク質発現の有無.....	55
図 35	外向き電流、テール電流に対する阻害剤の効果 .....	56
図 36	II 型マーカーで染色されない 0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ で biocytin が取り込まれた細胞 .....	58
図 37	II 型マーカーで染色されない 150 mM $[K^+]_{out}$ で biocytin が取り込まれた細胞 .....	59
図 38	高カリウム外液 (100 mM $[K^+]_{out}$ ) での細胞に取り込まれた LY の蛍光強度の変化.....	61
図 39	ROI 1~3 における LY の蛍光強度変化.....	62
図 40	高カリウム外液 (150 mM $[K^+]_{out}$ ) での biotin ED の取り込み.....	63
図 41	Biocytin と biotin ethylenediamine の構造式.....	64
図 42	Biocytin と LY の細胞内濃度の比較.....	65
図 43	ヘミチャネルの発現の違いによる II 型細胞の分類.....	67
図 44	ホールセルパッチクランプ電極内に加えた biocytin により染色された細胞	69
図 45	Biocytin の取り込み経路.....	69

図 46	Biocytin の構造式と計算される長さ.....	71
図 47	Goldman-Hodgkin-Katz の式.....	73
図 48	DIDS の構造式.....	74
図 49	II 型細胞での Cx ヘミチャネルによる ATP 放出の調節.....	77
図 50	味蕾細胞と神経の関係 labelled-line 仮説と across-fiber 仮説.....	79
図 51	II 型細胞をロックアウトした味蕾での III 型細胞からの酸味応答.....	81
図 52	取込み実験に用いた物質の構造式.....	82

## 表目次

表 1	Cx ヘミチャネルから放出されることが報告されている物質とその細胞.....	13
表 2	ヘミチャネルの特性まとめ.....	17
表 3	Cx、Px1 および CALHM1 の阻害剤.....	18
表 4	味蕾細胞に発現している Cx、Px のサブタイプと開口確率の細胞外カルシウム依存性.....	19
表 5	1 次抗体および 2 次抗体.....	31
表 6	高カリウム (30 mM $[K^+]_{out}$ ) 外液での biocytin 取り込みデータまとめ.....	42
表 7	高カリウム (150 mM $[K^+]_{out}$ ) 外液での biocytin 取り込みデータまとめ.....	42
表 8	各種細胞外液での biocytin が取り込まれた細胞の割合.....	57

## 略語表

5-HT :	5-hydroxytryptamine、別名serotonin
AF353 :	5-[5-iodo-4-methoxy-2-(1-methylethyl)phenoxy]-2,4-pyrimidinediamine
AKT :	serine/threonine-specific protein kinase、別名protein kinase B (PKB)
AMPK :	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
ANOVA :	Analysis on variance(分散分析)
ATP :	Adenosine triphosphate
CALHM :	Calcium homeostasis modulator
cAMP:	Cyclic adenosine monophosphate
CBX :	Carbenoxolone
Cx :	Connexine(コネキシン)
DIDS :	4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid
EDTA :	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA :	Ethylene glycol tetraacetic acid
ENaC :	Epithelial sodium channel
GABA :	Gamma( $\gamma$ )-aminobutyric acid
GLAST :	Glutamate-aspartate transporter
GPCR :	G-protein coupled receptor (G タンパク質連結型受容体)
HEPES :	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IC50 :	50 % inhibitory concentration(50 %阻害濃度)
IP <sub>3</sub> :	Inositol 1, 4, 5-trisphosphate (イノシトールトリスリン酸)
IP <sub>3</sub> R3 :	Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor Type 3 (3 型 IP3 受容体)
LY :	Lucifer yellow
MFA :	Meclofenamic acid
mRNA :	Messenger ribonucleic acid
mTOR :	Mechanistic target of rapamycin(ラパマイシン標的タンパク質)
NA :	Not analyzed
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamide adenine dinucleotide
ND :	No data
NPPB :	5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid
NTPDase2 :	Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2
Otop1 :	Otopetrin1 (オトペトリン 1)
PBS :	Phosphate buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PI :	Propidium iodide
PLC $\beta$ 2 :	Phospholipase C $\beta$ 2 (ホスホリパーゼ C $\beta$ 2)
Px :	Pannexine(パネキシン)
ROI :	Region of interest (対象領域)
RT-PCR :	Reverse transcription polymerase chain reaction
RuR :	Ruthenium red
SD :	Standard deviation (標準偏差)
SNAP-25 :	Synaptosomal-associated protein, 25kDa
TEA :	Tetraethylammonium
TRPM5 :	Transient receptor potential melastatin 5
TTX :	Tetrodotoxin

# 第 1 章 序論

味蕾の概要および最新の研究で明らかとなった味蕾細胞から味神経への ATP を介した情報伝達の仕組みを研究背景として概説するとともに、本研究の目的について説明する。

## 1-1 研究背景

細胞同士の情報伝達は化学物質を介して行われる化学シナプスとギャップ結合を介して膜電位変化を伝達する電気シナプスにより行われる。化学物質を介した情報伝達は、神経細胞間や神経細胞と受容細胞間などでみられる。例えば、神経細胞間の化学シナプス結合では、ドナー側の細胞がセロトニンなど、極性を持つために細胞膜を透過しない物質をシナプス小胞として脂質膜で包むことで細胞外へ放出することが知られている。細胞内からの情報伝達物質の放出機構は、上述のシナプス小胞を用いた方法とイオンチャンネルを用いた方法に大別される。情報伝達物質の放出を担うイオンチャンネルとしてヘミチャンネルが知られている。ヘミチャンネルは6つのユニットが集まりチャンネルを形成し、分子量1200程度以下の物質、例えば、ATP (Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002)、cAMP (Valiunas, 2013)、NAD<sup>+</sup> (Bruzzone, Guida, Zocchi, Franco, & Flora, 2001)などを通過させることができる。哺乳類細胞に発現しているヘミチャンネルとして、パネキシン、コネキシン、CALHMが報告されている。コネキシンは、情報伝達物質の放出だけではなく、細胞間でギャップ結合を形成し、細胞間の物質輸送を行うことも分かっている。これらのヘミチャンネルは、ヒトにおいても様々な臓器を形成する細胞に発現していることが報告され (Willebrords, et al., 2016)、情報伝達物質の放出に加え、発生や成長段階で重要な役割を担っている。

味の受容細胞である味蕾細胞にもヘミチャンネルが発現していることが確認されており、味情報伝達に重要な役割をしていることが最近の研究で明らかとなった。味蕾の分布および味蕾細胞の分類や細胞型別の機能の違いについて概説したのち、II型細胞の情報伝達におけるヘミチャンネルの役割について説明する。

### 1-1-1 味蕾構造と味蕾細胞の分類

五感の一つである味覚は、脊椎動物（哺乳類、鳥類、爬虫類、両棲類、魚類）(Ogawa, 1987)、無脊椎動物（節足動物 (Yarmolinsky, Zuker, & Ryba, 2009)、軟体動物)の幅広く生物が備えており、生物が生きていくうえで欠かせない機能である。味覚の検知を行う際に、最初に味物質に触れる器官が味蕾である。哺乳類の味蕾は、主に舌上皮に広く分布しており、マウスにおいては発現部位ごとに3つに分類される。舌の根本に環状に味蕾が集積している有郭乳頭、舌根元近くの左右のひだ内に分布している葉状乳頭、舌中央から舌尖端にかけて点在している茸状乳頭である (図 1)。舌上皮には味孔と呼

ばれる小さな穴があり、そこから味蕾細胞の先端が舌表面へ露出している (図 2)。舌上皮を受容膜とよび、味蕾細胞の細胞体側を基底膜 (側) と呼ぶ。味蕾細胞を基底膜側から顕微鏡観察すると図 3 に示すような構造をしており、細胞が集団を形成している。味蕾は、I 型から IV 型に分類される細胞が 50 から 100 個集まり構成される (Ohtubo & Yoshii, 2011; Ogata & Ohtubo, 2020)。I から III 型の味蕾細胞はアピカルと呼ばれる特徴的な細胞先端構造を持ち、縦長の細胞であり、約 30 から 45  $\mu\text{m}$  ほどの長さがある。IV 型細胞は、I から III 型細胞へ分化する幹細胞である (Miura, et al., 2004; Miura, Scott, Harada, & Barlow, 2014)。それぞれの細胞型ごとの特徴を図 4 と以下に示す。

I 型細胞は、支持細胞として、細胞間の恒常性維持に関与していると考えられている。細胞膜に ATP 分解酵素である NTPDase2 (Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2) を発現しており、II 型細胞から放出された ATP を速やかに分解することで、味情報の調整を行っていると考えられる (Bartel, Sullivan, Lavoie, Sévigny, & Finger, 2006)。また、glutamate を取り込む glutamate-aspartate transporter (GLAST) を発現しており、脳のグリア細胞や視細胞でみられるように、神経伝達物質の glutamate の再取り込みを行っていると考えられている (Lawton, Furness, Lindemann, & Hackney, 2000)。Amiloride 感受性  $\text{Na}^+$  チャネル (ENaC; Epithelial sodium channel) をノックアウトしたマウスで、塩味への応答が消失したこと (Chandrashekar, et al., 2010)、I 型細胞が ENaC を発現していることから、塩味に応答する細胞と考えられている (Vandenbeuch, Clapp, & Kinnamon, 2008)。ただし、最新の研究では、ENaC が機能するために必要な 3 つのユニット ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) が味蕾細胞においては同一の細胞に共発現していないという報告もあり、ENaC が塩味の検知にかかわっているかは確定していない (Lossow, Hermans-Borgmeyer, Meyerhof, & Behrens, 2020)。

II 型細胞は甘味、旨味、苦味に応答する受容体である T1R および T2R ファミリータンパク質を持つ (Hoon, et al., 1999; Nelson, et al., 2001)。T1R1/T1R3 は旨味に応答し、T1R2/T1R3 は甘味に応答する (Zhao, et al., 2003)。T2R は苦味に応答する (Mueller, et al., 2005)。最近の報告では、II 型細胞の一部が、塩味にも応答すると考えられている (Nomura, Nakanishi, Ishidate, Iwata, & Taruno, 2020)。

III 型細胞は酸味と amiloride 非感受性の塩味に応答することが分かっており (Chang, Waters, & Liman, 2010; Lewandowski, Sukumaran, Margolskee, & Bachmanov, 2016)、

情報伝達物質としてセロトニンを放出する機構に関与する SNAP25 (Synaptosomal-associated protein 25kDa)、神経と細胞接着にも関与する NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) を発現している。

茸状乳頭においては、味蕾当たり平均 41 個の味蕾細胞で構成され、約 25%の割合で II 型細胞、約 5%の割合で III 型細胞、70%の割合で I 型および IV 型細胞が発現している (Ohtubo & Yoshii, 2011)。

哺乳類が検知できる味物質は、塩味、甘味、旨味、苦味、酸味の 5 つである。それらの五味がどの細胞型で検知され、どのように情報が神経に伝達されているのかを最新の報告をもとに、以下に述べる。

### 1-1-2 味蕾細胞から味神経への情報伝達

II 型および III 型味蕾細胞は、舌上皮から露出している細胞先端の受容体で味物質を検知したのち、その情報を中枢神経に伝達する。II 型細胞は、甘味 (T1R2 + T1R3)、旨味 (T1R1 + T1R3)、苦味 (T2Rs) に応答する受容体を持っており (Hoon, et al., 1999; Nelson, et al., 2001; Zhao, et al., 2003; Mueller, et al., 2005)、III 細胞は、味孔先端のイオンチャネルから H<sup>+</sup>を取り込むことで酸味に応答すること (Chang, Waters, & Liman, 2010) が報告されている (図 4)。塩味は amiloride 感受性と非感受性の応答に分けられ、I ~ III 型のいずれか、またはすべての細胞で検知されている可能性があり、確定していない。III 型細胞では、電子顕微鏡観察からシナプス結合があることが分かっており、小胞に包んだセロトニンを放出することで中枢への情報伝達が行われている (Kaya, Shen, Lu, Zhao, & Herness, 2004; Huang Y.-J., et al., 2005)。しかし、II 型細胞には小胞に包み物質を細胞外に放出する機構が備わっておらず、また、セロトニン受容体をノックアウトしたマウスにおいて甘味、旨味、苦味への応答が正常マウスと変わらなかったことから (Finger, et al., 2005)、別の情報伝達経路が存在することが考えられた。

### 1-1-3 II 型細胞における味情報伝達

味蕾細胞には、cholecystokinin (Herness S., Zhao, Lu, Kaya, & Shen, 2002)、adrenaline (Herness S., et al., 2002)、acetylcholine (Ogura, 2002)、GABA (Huang,

Pereira, & Roper, 2011)、noradrenaline (Huang, Maruyama, & Roper, 2008)、glutamate (Vandenbeuch & Kinnamon, 2016)、ATP の受容体が発現していることが報告されている。また、味神経にはセロトニン受容体 (Larson, et al., 2015)、ATP 受容体 (Bo, et al., 1999; Kim, Bobkov, & Kolesnikov, 2000; Rong & Spyer, 2000; Kataoka, Toyono, Seta, Ogura, & Toyoshima, 2004) が発現していることが報告されている。このように、味蕾細胞及び味神経に様々な化学物質に対する受容体が発現していることから、味蕾細胞間での情報伝達の可能性や II 型細胞から神経細胞への化学物質を介した情報伝達の可能性が考えられた。ATP 受容体である P2X<sub>2</sub> および P2X<sub>3</sub> をノックアウトしたマウスにおいて、味神経でのすべての味覚応答が消失し、行動観察実験において、甘味、旨味、苦味への反応が顕著に減ったことから、ATP が II 型細胞から味神経細胞への情報伝達に強く関与していることが示唆された (Finger, et al., 2005)。また、II 型細胞から放出される ATP は周囲の ATP 受容体 P2X および P2Y ファミリーを発現している III 型味蕾細胞を活性化させることも報告されている (Baryshnikov, Rogachevskaja, & Kolesnikov, 2003; Kataoka, Toyono, Seta, Ogura, & Toyoshima, 2004; Bystrova, Yatzenko, Fedorov, Rogachevskaja, & Kolesnikov, 2006; Hayato, Ohtubo, & Yoshii, 2007; Huang, Dando, & Roper, 2009; Huang, Pereira, & Roper, 2011)。味情報伝達において重要な役割をしている ATP が、どのように II 型細胞から放出されるかについては不明であり、これまでに様々な研究がおこなわれてきた。

II 型味蕾細胞は、ヘミチャネルであるパネキシン (Pannexin 1)、コネキシン (Cx26、Cx30、Cx 30.3、Cx31.1、Cx32、Cx43、Cx45、Cx46、Cx47)、CALHM (1、2、3) の mRNA が発現していることが報告されており、これらが ATP を放出するヘミチャネルと考えられた。アフリカツメガエルの卵母細胞での発現系の研究から、Px1 は ATP を放出することができるチャネルとして報告された (Bao, Locovei, & Dahl, 2004)。それを受け、味蕾細胞においても ATP の放出経路として最初に検討された。Px1 が II 型味蕾細胞のほとんどに発現しており、また、Px1 の阻害剤である carbenoxolone の低濃度暴露により、味刺激で放出される ATP が減ることが報告されている (Huang Y.-J. , et al., 2007; Murata, et al., 2010)。このことから、ATP は Px 1 から放出されていると考えられた。しかし、Px1 をノックアウトしたマウスにおいても ATP の放出が確認されたこと、Px1 ノックアウトマウスが正常マウスと比較して味物質応答に対して何ら違いがないこと (Vandenbeuch, Anderson, & Kinnamon, 2015) から、現在では Px は、味情報伝達のための ATP 放出経路ではないと考えられている。後の研究で、Px1 の阻害剤である

carbenoxolone により ATP 放出が減ったのは、carbenoxolone がミトコンドリアの膜電位を低下させ、ATP の産生を妨げたためであると考えられている (Romanov, et al., 2018)。次に多くのサブタイプの発現が確認されているコネキシン (Cx) が ATP の放出機構ではないかと考えられた (Romanov R. A., et al., 2007)。2013 年になり、3 つ目の候補となる CALHM1 および CALHM1/3 複合体チャンネルが ATP 放出に関わっていることが報告された (Taruno, et al., 2013)。CALHM は主に II 型細胞に発現しており、ノックアウトマウスを用いた行動観察実験で、甘味、旨味、苦味の検知を損なう結果となったことより、CALHM1 が味情報伝達にかかわる ATP 放出チャンネルだと考えられた。しかし、CALHM1 欠失マウスにおいても完全に味覚を失わない結果は、複数のチャンネルが ATP 放出に関わっている可能性を示唆している。CALHM チャンネルからの ATP 放出には、通常とは異なるミトコンドリア (atypical mitochondria) が関与していることが報告されている (Romanov, et al., 2018)。通常ミトコンドリアに比べ大きく、また、CALHM チャンネルが発現している細胞膜近傍にミトコンドリアが位置しており、CALHM チャンネルとミトコンドリアの距離は非常に近く、20~30 nm であった。Atypical mitochondria が CALHM に近接することでイオン選択性が低い CALHM チャンネルが開いた時でも細胞外からのカルシウム流入を抑えていると考えられている。II 型味蕾細胞での ATP 放出には、主に CALHM1、CALHM3 および CALHM1/3 複合体が関与していると考えられている (Taruno, et al., 2013; Ma, et al., 2018) が Cx の関与を否定する研究データは報告されていない (図 5)。

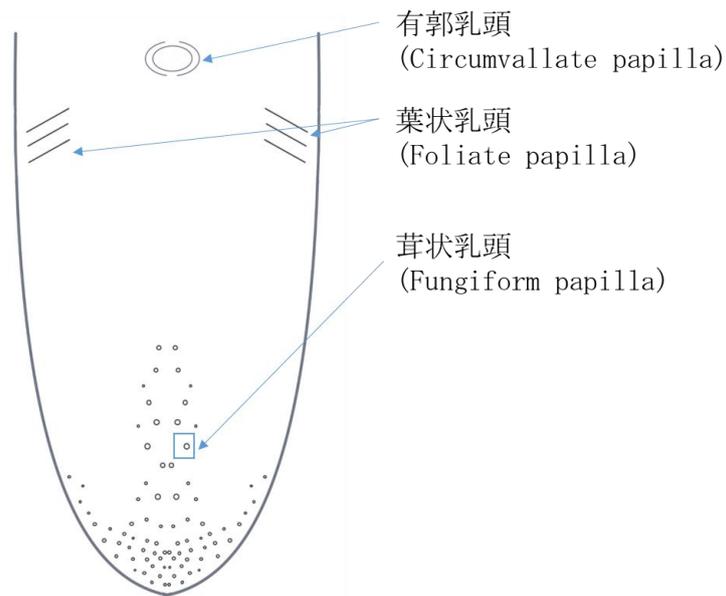


図 1 マウスの舌における味蕾の分布と呼称

発現部位により、味蕾の大きさや味蕾を形成する細胞数が異なる。茸状乳頭では、舌の中央に発現している味蕾ほど、先端に発現しているものよりも大きい。

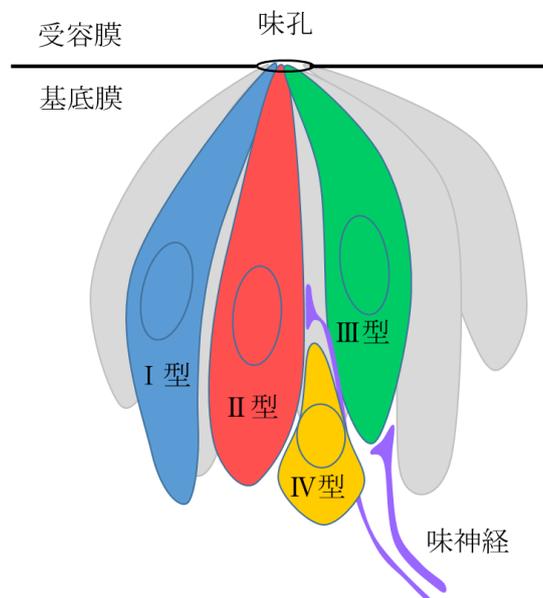


図 2 味蕾の模式図

有郭乳頭味蕾では個、葉状乳頭味蕾では個、有郭乳頭味蕾では個の細胞集団から一つの味蕾が形成されている。II型およびIII型細胞は味神経との情報伝達がおこなわれている。

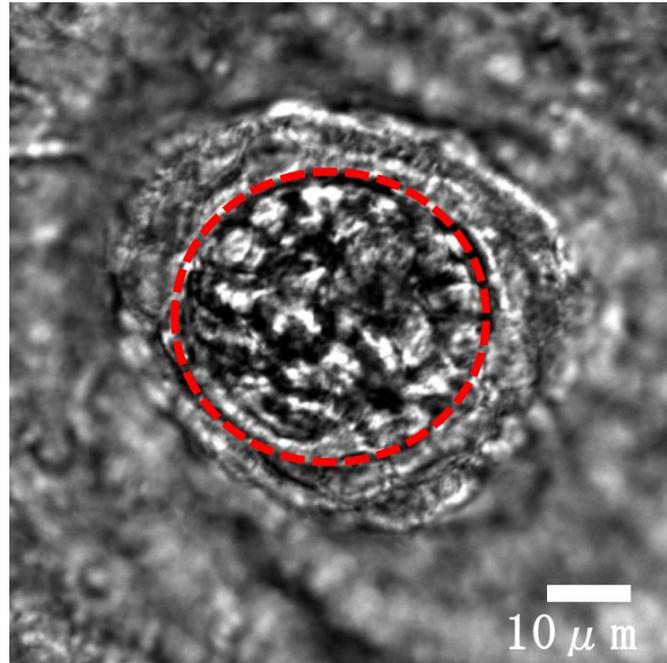


図 3 味蕾の透過光顕微鏡写真

味蕾を基底膜側から撮影した透過光顕微鏡写真。赤の破線の内側が味蕾で約 50～100 個の 4 つの異なる細胞で構成される。

	電子顕微鏡 (アピカル構造)	免疫染色 (タンパク質)	特徴
I 型	 Tall microvilli	GLAST	支持細胞
II 型	 Short microvilli	T1Rs, T2Rs, PLC $\beta$ 2, IP <sub>3</sub> R3, Gustducin, G $\gamma$ 13, TRPM5	甘味、旨味、 苦味、塩味 に応答
III 型	 Single, tall, thick microvilli	NCAM, SNAP-25, Otop1	酸味に応答 神経とシナプ ス結合あり
IV 型	アピカル無		I ~ III 型の幹細胞

GLAST (Glutamate and Aspartate Transporter), NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), TRPM (Transient Receptor Potential Melastatin), Otop (Otopetrin)

#### 図 4 味蕾細胞の分類

それぞれの細胞型は、電子顕微鏡観察による味蕾先端部位の構造の違いや明暗の見え方の違いによって、I からIVに分類された (Paran, Mattern, & Henkin, 1975; Royer & Kinnamon, 1988; Yang, et al., 2020)。その後、電子顕微鏡での構造による分類と、免疫染色法により細胞型ごとに発現している特定のタンパク質が結び付けられた。

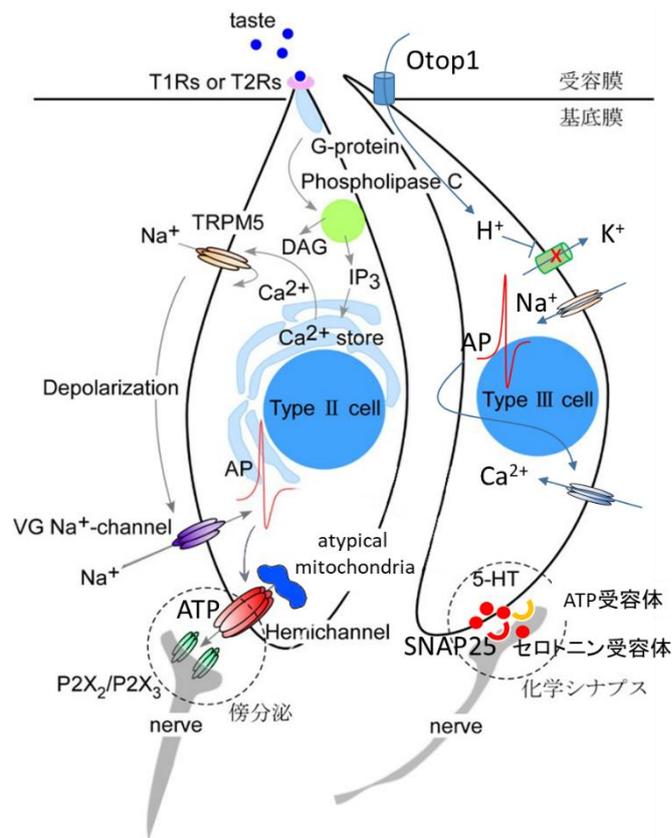


図 5 味蕾細胞の情報伝達の仕組み

II型細胞では、味孔に発現している G タンパク質共役型受容体 T1Rs や T2Rs で甘み、旨味、苦みの物質を検知すると、phospholipase C を介したカスケードにより、IP<sub>3</sub> 受容体を持つ細胞内カルシウムストアである ER-Ca<sup>2+</sup> (Endoplasmic Reticulum) からカルシウム放出され (Clapp, Yang, Stoick, Kinnamon, & Kinnamon, 2004)、TRPM5 (Transient Receptor Potential Melastatin 5) の活性化に伴いナトリウムやカルシウムイオンが細胞内へ流入し脱分極が起き (Pérez, Margolskee, Kinnamon, & Ogura, 2003; Prawitt, et al., 2003)、それに続く活動電位により、電位依存性ヘミチャネルが開口し、ATP が放出される。放出された ATP は味神経上に発現している P2X<sub>2</sub> および P2X<sub>3</sub> 受容体にて検知され味情報が脳へ伝達される。III型細胞は味神経との間に従来のシナプス結合を形成していることが報告されている (Royer & Kinnamon, 1988)。酸味に応答することが分かっており、味孔に発現した Otop1 チャネルからの H<sup>+</sup> の流入が起点となり (Teng, et al., 2019; Zhang, et al., 2019)、SNAP-25 が関与した小胞のエキソサイトーシスによりセロトニンを放出する。放出されたセロトニンは、味神経上に発現している 5-HT<sub>3A</sub> を活性化して脳への味情報伝達がおこなわれる (Larson, et al., 2015)。

## 1-2 ヘミチャネルの特徴

味蕾細胞に発現していることが報告されている、コネキシン、パネキシン、CALHM ヘミチャネルの特徴を以下にまとめる。

### 1-2-1 コネキシン

コネキシン (Cx) は細胞膜に発現している膜貫通タンパク質であり、脊椎動物では様々な細胞で広く発現し、機能していることが報告されている。Willebrords らは、Cx や Px を発現している細胞をまとめており、その報告によると、脳、心臓、血管、肝臓、腹腔内、皮膚、腎臓、肺、眼、免疫細胞、膵臓、骨格筋および骨髄で発現している (Willebrords, et al., 2016)。Cx の役割は発現している部位でそれぞれ異なるが、以下のような報告がある。心筋に発現しているコネキシンは細胞膜電位の協調的な伝播により、心臓の収縮活動を制御している。また、Cx は癌の発生とも密接にかかわっていることが最近の研究で報告されている (Aasen, et al., 2019)。Cx ヘミチャネルから放出される ATP により活性化された AKT/AMPK/mTOR 経路により癌細胞が増殖することが報告されている。造血細胞に発現している Cx43 ヘミチャネルから放出された ATP はパラクリンシグナルとして、炎症カスケードを励起し、癌の増殖を抑制している。

味蕾においても II 型細胞に特異的に発現していることが Romanov らのグループおよび Huang らのグループにより報告されている (Huang Y.-J. , et al., 2007; Romanov R. A., et al., 2007)。Cx は、21 つの異なるサブタイプが存在することが報告されている。チャネルは 6 つのコネキシンが合わさって形成されコネクソン呼ばれ、単一のコネキシンのみから形成される場合もあれば、複数のコネキシンから形成される場合もある。Cx は 2 つが合わさってギャップ結合をつくり細胞間のコミュニケーションの役割を担うこともあれば、それ単体として細胞膜にヘミチャネルの状態で存在し、細胞外への情報伝達物質の放出に関与することが報告されている (Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002)。放出される物質としては、ATP、グルコース、グルタチオン、アスコルベート、NAD<sup>+</sup>、グルタメート や プロスタグランジンが報告されている (Bruzzone, Guida, Zocchi, Franco, & Flora, 2001; Ahmad & Evans, 2002; Sáez, Retamal, Basilio, Bukauskas, & Bennettb, 2005; Rana & Dringen, 2007; Retamal, et al., 2007) (表 1)。また、カルシウムなどのイオンも通過することが報告されている。Cx は分子量 1200 以下の低分子を通すことができ、Cx のサブタイプにより、電荷の影響によ

る分子の透過度は異なる。アフリカツメガエルの卵母細胞に単一の Cx を発現させた実験より、Cx30 は 2 価の正電荷を帯びた物質である YO-PRO および propidium iodide を透過することが確認されている (Hansen, et al., 2014)。また、Cx45 も propidium iodide を透過することが確認されている (Valiunas, 2002)。一方、Cx36 および Cx43 は正電荷を帯びた分子 (YO-PRO や propidium iodide) を通過しないことが報告されている (Hansen, et al., 2014)。チャンネルのサイズは、サブタイプにより Cx26 (14 Å (Maeda, et al., 2009))、Cx43 (12.6 Å (Wang & Veenstra, 1997))、Cx40 (13.2 Å (Beblo & Veenstra, 1997))、Cx32 (12 -14 Å (Oh, et al., 1997)) と若干異なるが約 14 Å である。

Cx ヘミチャンネルの開口は pH、電位及び細胞外カルシウム濃度の影響を受けることが報告されている (Srinivas, Calderon, Kronengold, & Verselis, 2006)。ネイティブなコネキシンヘミチャンネルの開口確率は、通常の生体内での細胞外カルシウム濃度条件下 (2 mM) では、減少する (Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。細胞外カルシウムが低下した条件では、より低い電位でも開口確率が上昇することが報告されている。細胞外カルシウムによる IC<sub>50</sub> は、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた Cx46 では、380 μM である。細胞外マグネシウムに対しては、5.3 mM である。Cx50 での細胞外カルシウムによる IC<sub>50</sub> は、100 μM であると報告されている (Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。細胞内カルシウム濃度の上昇によりギャップ結合の開口確率が低下することが報告されている。細胞内カルシウムによる IC<sub>50</sub> は、HeLa 細胞に発現させた Cx43 ギャップ結合では 360 nM であると報告されている (Lurtz & Louis, 2007)。

また、機械的刺激によりチャンネルが開口し ATP を放出することも報告されている (Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002)。刺激がない場合でも ethidium bromide が Cx43 を発現させた HeLa 細胞でまれに取り込まれることが報告されている (Contreras, Sáez, Bukauskas, & Bennett, 2003)。Cx の興味深い特徴としては、半減期はわずか数時間しかなく、頻繁に新しく作られた Cx と入れ替わりが起きている (Laird, 2006)。

表 1 Cx ヘミチャネルから放出されることが報告されている物質とその細胞

細胞	放出される物質
アストロサイト	ATP、Glutamate、グルタチオン
骨細胞	プロスタグランジン
マクロファージ	ATP
線維芽細胞	NAD <sup>+</sup>

Cx ヘミチャネルを阻害する物質として Gd<sup>3+</sup> (Poon, et al., 2014)、MFA (Liu, Hashimoto-Torii, Torii, Ding, & Rakic, 2010)、疑似ペプチドである Gap19、Gap26、Gap27 (Wang, et al., 2013; Abudara, et al., 2014)などが知られている。Cx ギャップジャンクションを阻害する物質として probenecid および CBX が知られている (Sahu, Sukumaran, & Beraa, 2014)。Cx の阻害物質として heptanol (Sahu, Sukumaran, & Beraa, 2014) および Trovafloxacin (Poon, et al., 2014) が知られている。リコンビナント Cx43 は、100  $\mu$ M NPPB、200  $\mu$ M La<sup>3+</sup> と 150  $\mu$ M Gd<sup>3+</sup> で阻害されることが報告されているが、II 型味蕾細胞の電流測定においては、ヘミチャネルに由来していると考えられる外向き電流の抑制は、これらの阻害剤では見られず、同様の評価においては、Gap26 および octanol のみが顕著な外向き電流の抑制がみられたと報告されている (Romanov R. A., et al., 2007)。Cx43 のギャップジャンクションの阻害剤として CBX が報告されている (Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。ただし、CBX は、より低濃度 (5  $\mu$ M) で Px もブロックするため (Patel, Zhang, & Veenstra, 2014) Px を発現している味蕾においては選択的な阻害剤としては不向きである。疑似ペプチドの Gap26 と Gap27 も阻害剤として報告されているがキメラタイプには効果が弱く、Px1 も阻害する。Px1 の疑似ペプチドである 10Panx1 も部分的に Cx46 を阻害する (Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。

### 1-2-2 パネキシン

Px は 3 つのサブタイプ、Px1、Px2、Px3 が存在し、様々な組織で広く発現していることが確認されている (Panchina, et al., 2000; Baranova, et al., 2004)。Cx ではみられる 2 つの細胞間のヘミチャネルが結合して作るギャップ結合は、Px では機能的なギャップ結合を形成しないとする報告 (Sosinsky, et al., 2011; Penuela, et al., 2007) と機能的なギャップ結合を形成するという報告 (Bruzzone, Hormuzdi, Barbe, Herb, & Monyer, 2003; Fabien, et al., 2006; Ishikawa, et al., 2011) があり、議論が分かれる。

Px1 は脱分極、細胞外カリウム濃度、浸透圧上昇や陰圧などの機械的刺激で開口するが、細胞外カルシウムおよびマグネシウムはチャネルの開口に影響を与えない (Hansen, et al., 2014; Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。細胞内カルシウムの上昇で開口確率が上がることが報告されている (Murali, Zhang, & Nurse, 2014)。チャネルサイズは、17-21 Å であると見積もられており (Ambrosi, et al., 2010)、チャネルのイオン選択性については、いまだ議論の余地がある (Chiu, Ravichandran, & Bayliss, 2014)。正電荷の物質である propidium iodide (PI) を透過するとの報告もある (Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。Px1 はアポトーシスを起こしている細胞において細胞死の初期段階で「find-me」シグナルとして ATP や UTP を放出し、phagocyte を引き寄せる機能があることが報告されている (Chekeni, et al., 2010)。

Px の選択的ブロッカーとして報告されている probenecid の  $IC_{50}$  は  $150 \mu M$  で Brilliant Blue FCF の  $IC_{50}$  は  $0.27 \mu M$  である (Sahu, Sukumaran, & Beraa, 2014)。BB FCF は  $100 \mu M$  では、Cx32/43 複合体および Cx46 を阻害しない。CBX (Wang, et al., 2013; Poon, et al., 2014; Sahu, Sukumaran, & Beraa, 2014)、Trovafloracin (Poon, et al., 2014)、10Panx (Pelegriin & Surprenant, 2006) が阻害剤として報告されている。10Panx は Px の構造を模倣したペプチドで、選択的な阻害剤とされている。

### 1-2-3 CALHM

CALHM (calcium homeostasis modulator) は 6 量体からなるチャネルで、サブタイプとして CALHM1~6 までの 6 つが存在することが報告されている (Siebert, et al., 2013)。CALHM チャネルは、人の遺伝子を網羅解析した時に発見された。海馬で優先的に発

現し、アルツハイマー病の感受性遺伝子座に位置するヒト遺伝子として以前は FAM26C と呼ばれていた (Dreses-Werringloer, et al., 2008)。CAHLM1 のチャネル開口は電位および細胞外の 2 価のイオンである  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  依存的に行われ、脱分極することで正の影響を受け、細胞外の 2 価イオン濃度の上昇により負の影響を受ける (Ma, et al., 2012)。 $\text{Mg}^{2+}$  による影響は  $\text{Ca}^{2+}$  の 10 分の 1 である (Ma, et al., 2012)。細胞外カルシウムが 1.5 mM の場合は、約 0 mV の膜電位であってもチャネルは閉じている (Ma, et al., 2012)。

イオン選択性について、電気生理実験結果から  $P_{\text{Na}} / P_{\text{K}} / P_{\text{Cl}} = 1 : 1.14 : 0.52$  (0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  の場合)、 $1 : 1.46 : 0.88$  (2 mM Ca 外液の場合) であり、一価の陽イオン間では Na の透過性を 1 とした場合、 $P_{\text{Na}} / P_{\text{Li}} / P_{\text{K}} / P_{\text{Rb}} / P_{\text{Cs}} = 1 : 0.77 : 1.54 : 1.57 : 1.53$ 、二価の陽イオン間では Na の透過性を 1 とした場合、 $P_{\text{Na}} / P_{\text{Mg}} / P_{\text{Ca}} / P_{\text{Ba}} = 1 : 3.1 : 13.8 : 8.6$  と報告されている (Siebert, et al., 2013)。また、このイオン選択性は Cx40 および Cx43 と非常によく似ている (Beblo & Veenstra, 1997; Wang & Veenstra, 1997)。蛍光色素である Lucifer yellow, LY (Mw. 443、電荷-2)、Alexa 350 (Mw. 350、電荷-1)、Alexa 488 (Mw. 570、電荷-2) は容易に透過するが、Alexa 594 (Mw 760、電荷-2) はわずかに透過し、Alexa 633 (Mw. 1150、電荷不明) はまったく透過しなかったことから有効なチャネルの直径は Alexa 594 の約 14 Å であると見積もられている (Siebert, et al., 2013)。Cx, Px と構造的に非常によく似ているがギャップ結合は形成しない (Siebert, et al., 2013)。

CALHM1 は脳で発現しており、細胞外カルシウム濃度の低下によって誘発される皮質ニューロンの興奮性に関与している (Ma, et al., 2012)。味蕾では II 型味蕾細胞の基底膜側に CALHM1、CALHM2、CALHM3 および CALHM1/3 複合体が発現していることが報告されている (Moyer, et al., 2009; Romanov, et al., 2018; Kashio, Wei-qi, Ohsaki, Kido, & Taruno, 2019; Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)。II 型味蕾細胞において、ATP を細胞外に放出することで神経へ味情報伝達を行う重要な役目をしているチャネルであると考えられている (Taruno, et al., 2013; Ma, et al., 2018)。

CALHM に対する阻害効果がある薬剤として、RuR (Ma, et al., 2012; Dreses-Werringloer, et al., 2013; Taruno, et al., 2013)、 $\text{Gd}^{3+}$  (Ma, et al., 2012; Dreses-Werringloer, et al., 2013)、 $\text{Zn}^{2+}$  (Ma, et al., 2012; Dreses-Werringloer, et al., 2013)、Heptanol (Taruno, et al., 2013) がある。阻害効果がないことが確認されてい

る薬剤として、Probenecid (Taruno, et al., 2013)、CBX (Ma, et al., 2012)、TTX (Ma, et al., 2012)、TEA (Ma, et al., 2012)、1-octanol (Ma, et al., 2012)が報告されている。RuRはCALHMのチャンネルの開口を阻害するが、チャンネルが完全に閉じるのではなく、開口部が狭くなることが分かっている (Choi, Clemente, Du, & Lü, 2019)。

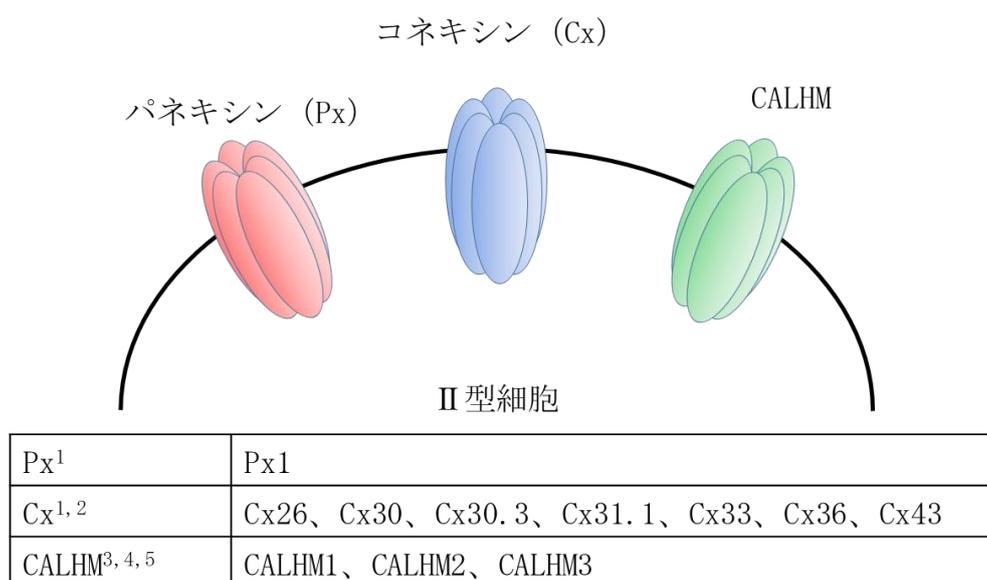


図 6 II型味蕾細胞に発現しているヘミチャンネル

II型味蕾細胞に発現していることが確認されているヘミチャンネル。右上の数字は参考文献を表す。<sup>1</sup> (Huang Y.-J. , et al., 2007)、<sup>2</sup> (Romanov R. A., et al., 2007)、<sup>3</sup> (Moyer, et al., 2009)、<sup>4</sup> (Taruno, et al., 2013)、<sup>5</sup> (Ma, et al., 2018)。

表 2 ヘミチャネルの特性まとめ

	パネキシン (Px)	コネキシン (Cx)	CALHM
チャンネルサイズ (Å)	17-21	12-14	約 14
イオン選択性	未確定、弱い	弱い	弱い
機能的なギャップ結合形成能	「あり」とする報告と、「ない」とする報告がある	あり	なし
電位依存性	あり	あり	あり
細胞外カルシウム依存性	なし	あり 0 mM Ca外液かつ正に脱分極で開口	あり 0 mM Ca外液で開口
ATP放出	可能	可能(脱分極)	可能(0 mM Ca外液)
細胞外からの物質の取り込み	可能	可能	不明

Px では機能的なギャップ結合を形成しないとする報告 (Sosinsky, et al., 2011; Penuela, et al., 2007)と機能的なギャップ結合を形成するという報告 (Bruzzone, Hormuzdi, Barbe, Herb, & Monyer, 2003; Fabien, et al., 2006; Ishikawa, et al., 2011)がある。

表 3 Cx、Px1 および CALHM1 の阻害剤

阻害剤	Cx (ヘミチャネル)	Px1 (ヘミチャネル)	CALHM1
RuR	ND	ND	+ 1,2,8
Gd <sup>3+</sup>	+ 5	ND	+ 1,2
Zn <sup>2+</sup>	ND	ND	+ 1,2
Probenecid	+ 3*	+ 3	- 8
DIDS	ND	+ 7	ND
CBX	+ 3*	+ 3,4,5	- 2
TTX	ND	ND	- 2
TEA	ND	ND	- 2
1-octanol	ND	ND	- 2
Heptanol	+ 3	- 3	- 8
Trovafloxacin	- 5	+ 5	ND
MFA	+ 9	ND	ND
Gap19	+ 4,6	ND	ND
Gap26	+ 6	ND	ND
Gap27	+ 6	ND	ND
10Panx	ND	+ 4	ND

プラス (+) は、それぞれの物質で阻害されることが報告されており、マイナス (-) はそれぞれの物質で阻害されないことが報告されている。右上の数字は参考文献を意味する。<sup>1</sup> (Dreses-Werringloer, et al., 2013)、<sup>2</sup> (Ma, et al., 2012)、<sup>3</sup> (Sahu, Sukumaran, & Beraa, 2014)、<sup>4</sup> (Wang, et al., 2013)、<sup>5</sup> (Poon, et al., 2014)、<sup>6</sup> (Abudara, et al., 2014)、<sup>7</sup> (Ma, Hui, Pelegrin, & Surprenant, 2009)、<sup>8</sup> (Taruno, et al., 2013)、<sup>9</sup> (Liu, Hashimoto-Torii, Torii, Ding, & Rakic, 2010)。\*については、ヘミチャネルではなくギャップジャンクションでの阻害が報告されている。ND:報告されているデータなし。

表 4 味蕾細胞に発現している Cx、Px のサブタイプと開口確率の細胞外カルシウム依存性

Cxサブタイプ	Romanovら	Huangら	チャンネル開口確率の $[Ca^{2+}]_{out}$ 依存性
26	+	NA	+
30	NA	+	NA
30.2	NA	-	NA
30.3	+	NA	NA
31.1	+	NA	NA
32	-	-	+
33	+	-	NA
36	+	-	NA
43	+	+	+
45	-	-	NA
46	NA	-	+
47	-	NA	NA
50	NA	-	+
Px1	NA	+	NA

Cx43 のみが、2つの異なる研究グループにより、味蕾細胞に発現していることが確認されている（黄色）。Cx26, 30, 30.3, 31.1 については一方のグループでのみ発現が確認されている（緑）。Cx33 および 36 は片方のグループでは発現が確認されたが、一方のグループでは、発現していないという結果であった（青）。Romanov らは II 型細胞一つを採取して PCR を行った (Romanov R. A., et al., 2007) のに対し、Huang らは味蕾全体を採取して PCR を行った (Huang Y.-J., et al., 2007)。その手法の違いにより、Huang らの測定では、発現量が比較的少ない Cx が検出されなかったのではないかと考えられる。

### 1-3 本研究の目的

#### 単一味蕾における CALHM チャンネルの機能的な発現割合

これまでの研究から、CALHM が ATP の放出機構として最も有力と考えられているが、CALHM をノックアウトしたマウスであっても、甘味、旨味、苦味に対する神経応答が完全に消失していないこと (Taruno, et al., 2013)、II 型細胞すべてに mRNA が発現しているわけではないこと (有郭乳頭において II 型細胞マーカーである TRPM5 を発現している細胞の約 80% で CALHM の mRNA が確認されている (Taruno, et al., 2013; Moyer, et al., 2009)、さらに、CALHM が開く脱分極条件では Cx や Px も ATP を放出できることから、CALHM が II 型細胞での ATP 放出にどの程度重要かについては議論の余地がある。CALHM の II 型細胞での機能的な発現割合を調べるためには、放出される ATP を測定しても分からない。そのため、CALHM が開口する条件において細胞外から biocytin が取り込まれた II 型細胞数を測定することで、CALHM を機能的に発現する II 型細胞の割合を明らかにする (図 7)。

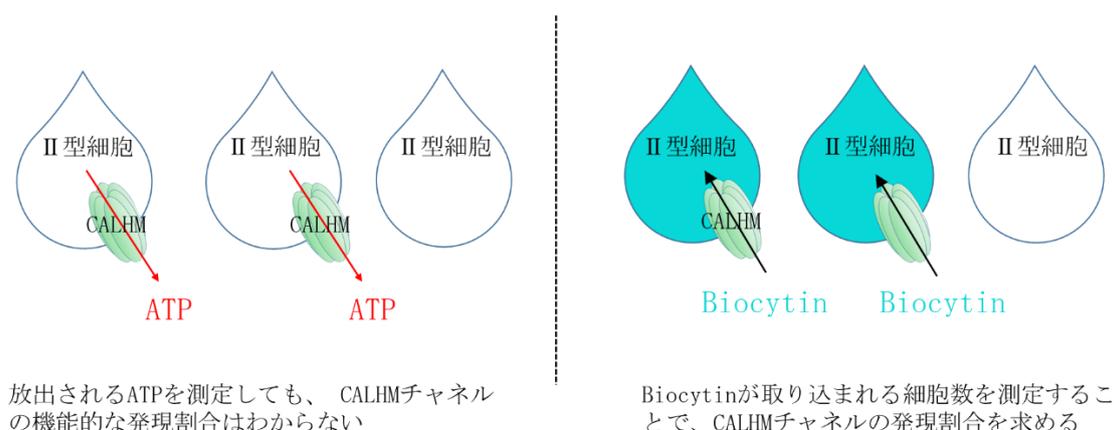


図 7 CALHM の発現割合の測定

Biocytin 取り込み実験では、II 型細胞にける機能的な CALHM 発現割合を求めることができる。

#### 味蕾細胞に機能的に発現しているヘミチャンネルの同定

味蕾細胞には、Px と Cx のサブタイプの mRNA が発現していることが報告されている (Huang Y.-J., et al., 2007; Romanov R. A., Rogachevskaja, Khokhlov, & Kolesnikov, 2008; Taruno, et al., 2013)。一部の Cx サブタイプについては免疫染色

によりタンパク質が発現していることも確認されているが、mRNA の発現とタンパク質の発現は必ずしも一致しない。そのため、本研究では、味蕾細胞に Px と Cx が機能的に発現しているかを明らかにする。また、ヘミチャネルが発現している細胞の細胞型についても明らかにする。

### ヘミチャネルを通過する物質の電荷の影響

II型細胞では負電荷の物質が取り込まれることが報告されているが (Takeuchi, Seto, Ohtubo, & Yoshii, 2011)、中性電荷の物質と正電荷の物質が透過できるかは不明である。味蕾細胞での情報伝達に負電荷、中性電荷、正電荷の低分子がかかわっていることが分かっている (図 8)。放出経路がいまだ解明されていない中性物質である adrenaline や正電荷の物質である acetylcholine について、特に、これらの電荷の物質の放出が可能かを調べることは重要である。II型細胞に中性物質の biocytin (分子量 372)、正電荷物質の biotin 誘導体 (分子量 286) が取り込まれるかを調べることで、II型細胞に発現しているヘミチャネルを通過できる物質の電荷の影響を明らかにする。

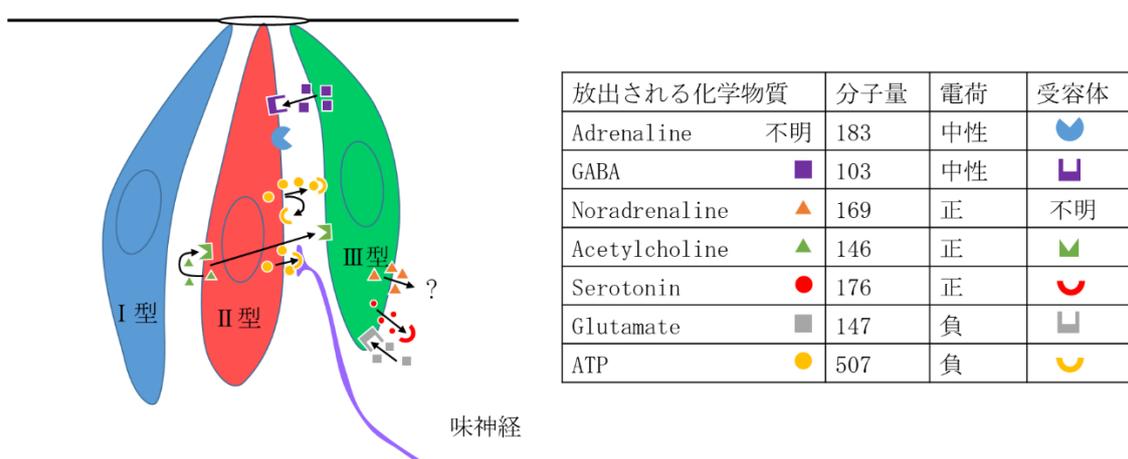


図 8 味蕾細胞の情報伝達にかかわっている低分子

味蕾細胞では右の表に報告されている様々な電荷をもつ物質が左の図に示すような細胞間や細胞と神経の間での情報伝達に関与している。Adrenaline は放出される細胞型が不明である。Noradrenaline の受容体が発現している部位は不明である。

## 第2章 実験方法

標本作成、細胞外液調製、取り込み実験および取り込み実験における条件設定、データ解析手法について記述する。

## 2-1 実験動物

生後 5～8 週齢のオスの ddY マウスを使用した。マウスは日本エスエルシーまたは九動株式会社から入手した。

すべての実験は九州工業大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：生-H25-017、生-H26-014、生-H27-002、生-H28-004、生-H29-001、生-H30-005）。

## 2-2 標本調製方法

実験には、味蕾構造が保存されている剥離舌上皮標本を用いた。剥離舌上皮は、過去に報告されている Furue らの方法を用いて作成した（Furue & Yoshii, 1997; Furue & Yoshii, 1998）。マウスを二酸化炭素で麻酔した後、断頭し、舌を切り出した。切り出した舌に、1 mg / mL の濃度のエラストーゼを 40～60  $\mu$ L 注入し、混合ガス（95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>）を飽和させておいた earle' s 外液中で 4～6 分間酵素処理を行った。その後舌上皮を剥離し、基底膜側が上を向くように測定用のチェンバーに固定した（図 9）。



ddYマウス  
5~8週齢  
CO<sub>2</sub>麻酔後断頭



舌を有郭乳頭あたりから切断



舌の裏側から、3か所にエラスターゼを注入



25 °C、4~6分の酵素処理後、舌上皮を剥離



専用台に、基底膜側を上にして固定

## 図 9 標本調製方法

オスの ddY マウス 5~8 週齢を用いた。CO<sub>2</sub>で麻酔をしたのち、断頭し、舌を有郭乳頭あたりから切り出した。舌を裏返し、顕微鏡上で位置を確認しながら、舌が膨らむ程度 (40~60 μL) 酵素溶液を注入した。25 °Cで4~6分間処理したのち、顕微鏡下で舌の上皮を剥いだ。基底膜側が上になるように専用台に固定した。舌の中央から前よりの茸状乳頭部分を使用し、4~6 個程度の味蕾が固定領域に収まるよう調整した。

## 2-3 溶液組成

以下に示した溶液は、すべて脱イオン水に溶かして調製した。使用した試薬は特に記述のない限り、Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan から購入した。

パラホルムアルデヒド溶液:パラホルムアルデヒドが4%となるようにPBSに溶かした。

Normal 外液は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 150 NaCl、 5 KCl、 2 CaCl<sub>2</sub>、 0.5 MgCl<sub>2</sub>、 10 glucose、 5 HEPES、 pH 7.4 / NaOH。

高カリウム外液(30 mM [K<sup>+</sup>]<sub>out</sub>)は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 125 NaCl、 30 KCl、 2 CaCl<sub>2</sub>、 0.5 MgCl<sub>2</sub>、 10 glucose、 5 HEPES、 pH 7.4 / NaOH。

高カリウム外液(100 mM [K<sup>+</sup>]<sub>out</sub>)は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 55 NaCl、 100 KCl、 2 CaCl<sub>2</sub>、 0.5 MgCl<sub>2</sub>、 10 glucose、 5 HEPES、 pH 7.4 / NaOH。

高カリウム外液(150 mM [K<sup>+</sup>]<sub>out</sub>)は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 5 NaCl、 150 KCl、 2 CaCl<sub>2</sub>、 0.5 MgCl<sub>2</sub>、 10 glucose、 5 HEPES、 pH 7.4 / NaOH。

低カルシウム外液(0 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>)は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 150 NaCl、 5 KCl、 0.5 MgCl<sub>2</sub>、 10 glucose、 5 HEPES、 pH 7.4 / NaOH。

EGTA 低カルシウム外液(0 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>)は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 150 NaCl、 5 KCl、 0.5 MgCl<sub>2</sub>、 0.5 EGTA、 10 glucose、 5 HEPES、 pH 7.4 / NaOH。

ブロッキング溶液は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 3% Donkey、 1% BSA、 0.1% Triton in PBS。

エラスターゼ溶液は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : normal 外液中に 1 mg/mL エラスターゼ。

Earle' s 溶液は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 116 mM NaCl、 26.2 mM NaHCO<sub>3</sub>、 5.4 mM KCl、 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>、 1.0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>。

PBS 溶液は、以下の成分を含む水溶液である (mM) : 137 mM NaCl、 2.7 mM KCl、 8.1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、 pH 7.4。

LY 溶液は、lucifer yellow CH dilithium salt、SIGMA-ALDRICH 製、cat# L0259-25MG、分子量 457.25 を、任意の細胞外液 1 mL あたり 0.457 mg 加え 0.88 mM 濃度に調製した。

Biocytin 溶液は、biocytin、SIGMA-ALDRICH 製、分子量 372.46 を、任意の細胞外液 1 mL あたり 2 mg 加え 5.37 mM 濃度に調製した。

Biocytin ethylenediamine 溶液は、SIGMA-ALDRICH 製、分子量 367.3 を、任意の細胞外液 1 mL あたり 1.97 mg 加え 5.37 mM 濃度に調製した。

Propidium iodide 溶液は、SIGMA-ALDRICH 製、分子量 668.39 を、150 K 外液 1 mL あたり 0.67 mg 加え、その溶液を 150 K 外液で 100 倍に希釈して、10  $\mu$ M に調製した。

RuR 溶液は、cat#174-00331、分子量 858.41 を、1.7 mg を 100  $\mu$ L の超純水に溶解し、その溶液 10  $\mu$ L を 10 mL の任意の細胞外液に溶解し、20  $\mu$ M に調製した。

Probenecid 溶液は、分子量 285.36 を、0.3 M KOH 10 mL に 285.36 mg を加えた (100 mM)。高カリウム外液 (150 mM  $[K^+]_{out}$ ) で 100 倍に希釈したのち HCl にて pH を調整した。Probenecid の最終濃度は 1 mM に調製した。100  $\mu$ M、10  $\mu$ M の溶液はそれぞれさらに、10 倍希釈、100 倍希釈して調製した。

DIDS 溶液は、TOCRIC および SIGMA-ALDRICH 製、分子量 498.48 を、2.49 mg を 150 mM  $[K^+]_{out}$  に溶解し、1000 倍希釈して 5  $\mu$ M に調製した。

GdCl<sub>3</sub> 溶液は、GdCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O SIGMA-ALDRICH 製、分子量 371.70 を、3.72 mg 計り取り任意の細胞外液 1 mL に溶解し、それを 100 倍希釈して 100  $\mu$ M に調製した。

ZnCl<sub>2</sub> 溶液は、分子量 136.32、1.36 mg 計り取り、150 mM  $[K^+]_{out}$  1 mL に溶解し、最終濃度が 300、100、10  $\mu$ M となるように調製した。

## 2-4 Biocytin 取り込み実験

Biocytin の取り込み実験の流れをいくつかの場合に分けて以下の図に示す。実験はすべて室温で行った。

### 2-4-1 Biocytin 取り込み実験

高カリウム外液(150 mM  $[K^+]_{out}$ )で biocytin 取り込み実験を行った方法を示す (図 10)。基底膜側を外側とした標本を、1 分間 150 mM  $[K^+]_{out}$  に 2 度浸漬し、細胞外液を完全に 150 mM  $[K^+]_{out}$  に置換した。その後、5 分間 biocytin を加えた外液に浸漬した。細胞表面に非特異的に付着した biocytin を除くため、10 秒間 normal 外液で洗浄し、4% ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン固定は、最低 12 時間行った。全く同様の方法を用いて 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  での取込実験も行った。

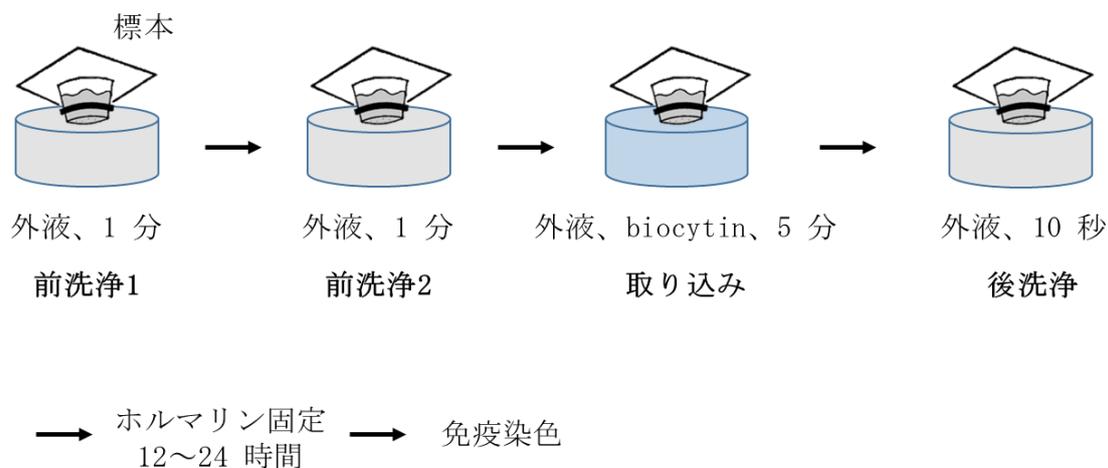


図 10 Biocytin の取り込み実験

上記の図に示す流れで取り込み実験を行った。

### 2-4-2 阻害剤を用いた場合

阻害剤が完全に作用した状態で biocytin の取り込み率を調べるために、阻害剤を加えた normal 外液に 1 分間ずつ、2 度浸漬した後、阻害剤存在下で biocytin を取込ませた (図 11)。低カルシウム外液(0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$ )での阻害剤の影響を調べる場合は、

normal 外液からのカルシウムの持ち込みを減らす目的で、biocytin 取り込みの前に、阻害剤を加えた 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  に 10 秒間浸漬した (図 12)。その後、阻害剤および biocytin を加えた外液へ 5 分浸漬した。細胞表面に非特異的に付着した biocytin を除くため、10 秒間 normal 外液で洗浄し、4%ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン固定は、最低 12 時間行った。

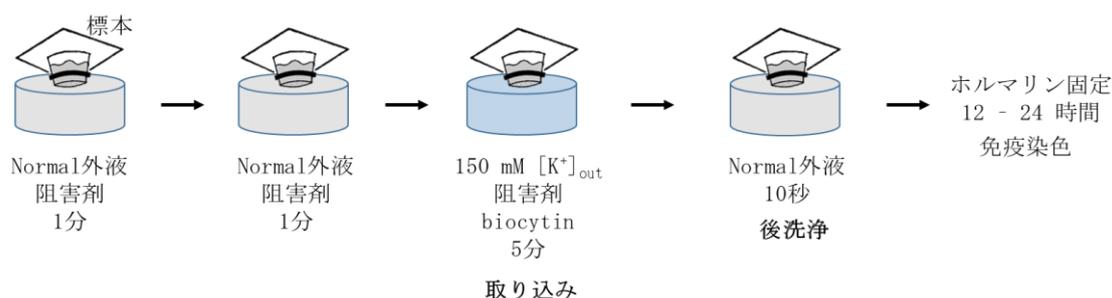


図 11 阻害剤を用いた 150 mM  $[K^+]_{out}$  での取り込み実験

阻害剤は「取り込み」前に、2 分間それぞれ作用させて、biocytin を加えた 150 mM  $[K^+]_{out}$  に浸漬し、取り込み実験を行った。

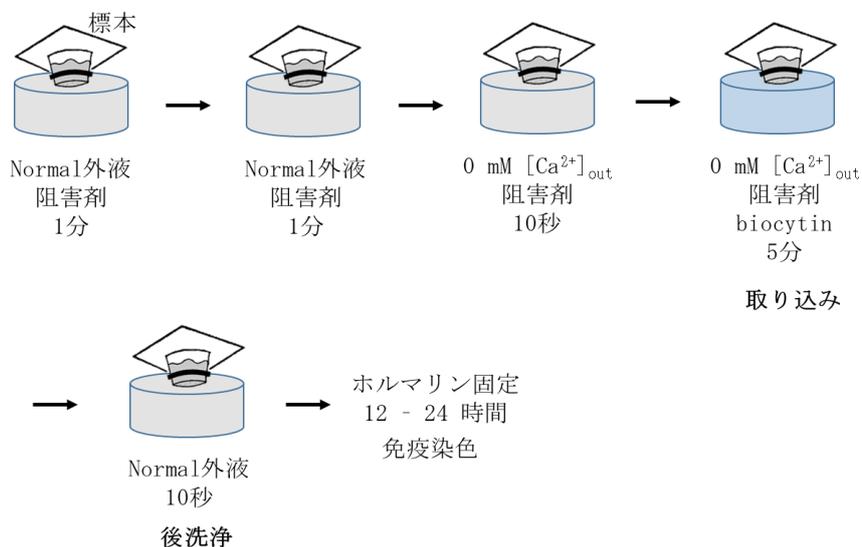


図 12 阻害剤を用いた 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  での取り込み実験

阻害剤は「取り込み」前に、2 分間それぞれ normal 外液中で作用させ、normal 外液からの Ca 持ち込みを防ぐため、短時間 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  で洗浄し、biocytin を加えた 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  に浸漬し、取り込み実験を行った。

### 2-4-3 阻害剤 10Panx および Gap26 を用いた場合

ペプチド阻害剤である 10Panx および Gap26 は効果が現れるまでに 15 分程度かかるため (Hawat, Benderdour, Rousseau, & Baroudi, 2010; Wang, et al., 2012)、biocytin 取り込み前に、それぞれの阻害剤を加えた normal 外液へ 20 分間浸漬した (図 13)。その後、阻害剤および biocytin を加えた外液に 5 分間浸漬した。細胞表面に非特異的に付着した biocytin を除くため、10 秒間 normal 外液で洗浄し、4%ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン固定は、最低 12 時間行った。10Panx TOCRIS (cat# 3348 batch 5B) 分子量 1242.37 は、300  $\mu\text{M}$  で使用した。Gap26 TOCRIS (cat# 1950 batch 5A) 分子量 1550.79 は、300  $\mu\text{M}$  で使用した。

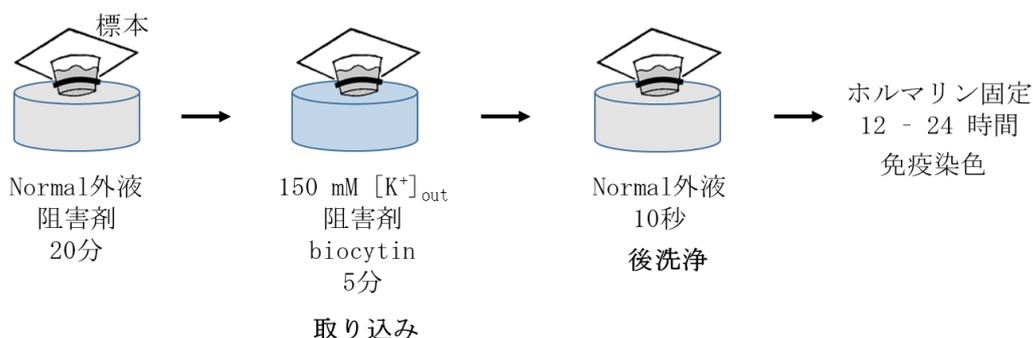


図 13 阻害剤 10Panx および Gap26 を用いた場合の取り込み実験

阻害剤の効果が出る時間を考慮して「取り込み」前に、20 分間阻害剤を加えた normal 外液に浸漬した。

### 2-4-4 Biocytin 取り込み実験における取り込み時間の最適化

特に記載していない場合は、biocytin 取り込み時間は 5 分で行った。理由は、5 分の取り込み時間で取り込み率が飽和に達したからである。詳細は、「3-3 取り込み率と時間の関係」で説明する。

### 2-4-5 Biocytin 浸漬後の洗浄時間について

Biocytin を含む各種細胞外液へ浸漬したのち、ホルマリン固定前に、細胞表面に非特異的に付着する biocytin を除くため、洗浄した。LY を用いた実験から、1 分以上洗浄すると一部の細胞（図 14 cell 2）で、LY が細胞外へ排出される現象が確認されたため、約 10 秒程度の短時間洗浄とした。

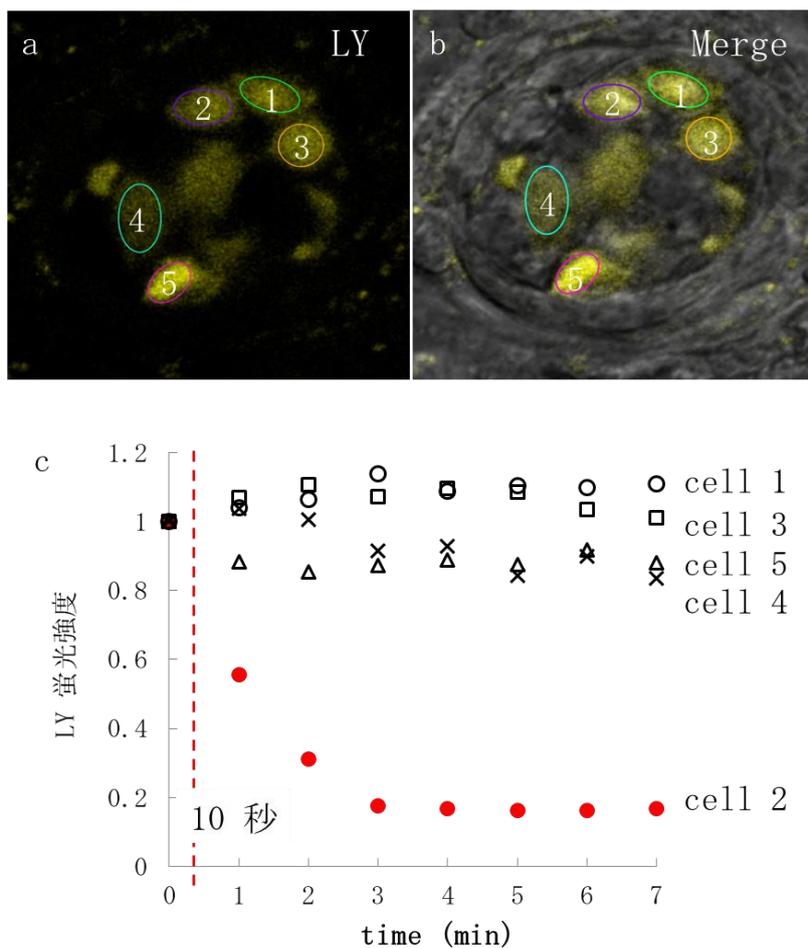


図 14 LY が normal 外液で排出される様子

LY を加えた 100 mM  $[K^+]_{out}$  に味蕾を 3 分間浸漬したのち、normal 外液に置換し、LY の蛍光強度の変化を測定した。a) normal 外液へ置換直後の蛍光測定 b) 透過光画像との重ね合わせ画像。c) cell 1、3、5、4 は蛍光強度が変化しなかった細胞。Cell 2 は蛍光強度が経時的に変化し、約 3 分間でほぼ LY の蛍光が観察されなくなった。

## 2-5 免疫組織化学染色

免疫染色は1次抗体、2次抗体からなる間接法を用いた。パラホルムアルデヒド溶液で固定した標本をPBS中で10分間の洗浄を3回行った。クエン酸緩衝液中で20分間、85℃の加熱処理を行い、抗原の賦活化を図った。室温で15～30分冷却した後、10分間の洗浄を3回行い、ブロッキング液に2時間浸けてブロッキングを行った。ブロッキングを終えた標本を、1次抗体を溶かしたブロッキング液に浸け、室温で2時間置いて1次抗体を反応させた。反応後、標本を6回10分間ずつPBSで洗浄し、2次抗体と蛍光標識したstreptavidinを溶かしたブロッキング液に浸け、4℃で1晩反応させた。10分間の洗浄を6回行った後、上皮を退色防止剤である0.1 mg / ml PPDAを溶かした50%グリセロールで、スライドガラスとカバーガラスの間に包埋した。細胞型を調べるために、II型細胞マーカーとしてIP<sub>3</sub>R3、G $\gamma$ 13、PLC $\beta$ 2を用い、III型細胞マーカーとしてSNAP25を用いた(表5)。蛍光測定はレーザー共焦点顕微鏡(Leica Microsystems)を用いて行い、味蕾細胞の連続断面画像を得た。

表5 1次抗体および2次抗体

Antiserum	Type of antibody	Coupled to	Dilution	Origin
1次抗体				
PLC $\beta$ 2 (human)	Rabbit	-	1:100	1
G $\gamma$ 13	Goat	-	1:50	1
IP <sub>3</sub> R3	Mouse	-	1:50	2
SNAP25	Rabbit	-	1:500	3
Streptavidin		Alexa Fluor 633	1:100	4
-----				
2次抗体				
Anti Rabbit IgG	Donkey	Alexa Fluor 546	1:400	4
Anti Rabbit IgG	Donkey	Alexa Fluor 488	1:400	4
Anti Goat IgG	Donkey	Alexa Fluor 488	1:400	4

1 = Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; 2 = BD Transduction Laboratories, KY, USA; 3 = Sigma-Aldrich, MO, USA; 4 = Molecular Probes, Eugene, OR.

## 2-6 データ解析方法

共焦点顕微鏡での測定画像は、LAS X (Leica Application Suite X, ver3. 4. 2. 18368、Leica Microsystems) ソフトウェアを用いて行った。

### 2-6-1 Biocytin 取込の判定

Biocytin が取り込まれているかは、以下の判定基準により判断した。蛍光測定画像で染色されたいる部分に ROI (Region of interest) を設定 (A とする) し、また、味蕾内かつ染色されていない部位にも ROI を設定 (B とする) した。B に対して A の蛍光強度が 5 倍以上高い場合、biocytin を取り込んだ細胞と判断した。以下に示す一例の場合では、B の蛍光強度は 0.1 で、A は ROI 1 から ROI 8 に相当し、それぞれの蛍光強度は図 15b のとおりである。B に対して 5 倍以上の蛍光強度であったことから、ROI 1 から ROI 8 の細胞には biocytin が取り込まれたと判定した。

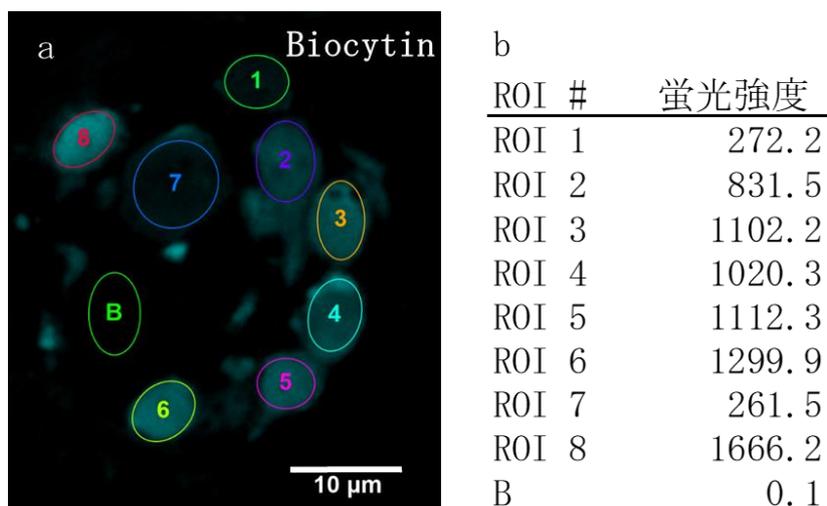


図 15 Biocytin が取り込まれた細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像

Biocytin は蛍光標識された streptavidin にて標識され、画像内のシアンで表された部位に存在することが分かる。

### 2-6-2 細胞型の判定

細胞型の判定について、II 型細胞を例に説明する。味蕾細胞は細胞型ごとに特異的に発現するタンパク質が存在する。特異的に発現するタンパク質を免疫染色法により、染色することで細胞型を判定した。免疫染色では、非特異的な染色がみられるため、特

異的な染色と区別する必要がある。図 16 の 1、2、3 の写真に示すように、II 型細胞マーカーで染色されている画像が 3 枚以上連続的に続き、切れ目なく円を描いていることを判断基準とした。共焦点レーザー顕微鏡での撮影間隔は、 $1.5 \mu\text{m}$  であるため 3 枚連続で続くことは少なくとも  $4.5 \mu\text{m}$  の細胞の長さに相当する。味蕾細胞の核の長さが  $6 \sim 8 \mu\text{m}$  であることから、核の部分が明確に免疫陽性であることを確認し、1 個の細胞と判断した。

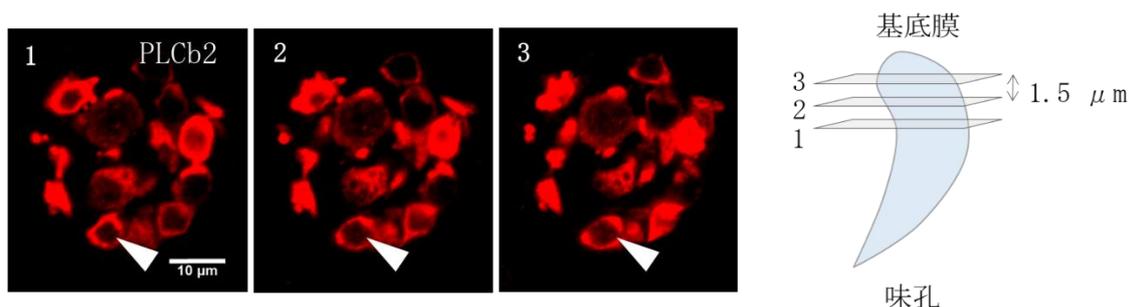


図 16 味蕾細胞を味孔から基底膜側に向かって光学切片を連続で撮影した画像

画像 1 が味孔側で画像 3 が基底膜側で、共焦点レーザー顕微鏡を用いて連続して  $1.5 \mu\text{m}$  間隔で光学スライス画像を取得した。赤は II 型細胞マーカーである PLC  $\beta$  2 の局在を表す。矢印で示した細胞のように、連続する 3 枚の画像で切れ目のない円状に PLC  $\beta$  2 が局在していることから、特異的な染色と判断した。

### 2-6-3 Biocytin 取り込み率の計算

II 型細胞における biocytin の取り込み率の計算方法について説明する。II 型細胞のマーカー分子である PLC  $\beta$  2 を指標とし、単一味蕾に含まれる II 型細胞の数を測定した。図 13 は味蕾のあるピント面で撮影した共焦点画像である。このピント面では、目印“\*”を付けた 6 つの細胞を II 型細胞と判定した。また、その 6 つの細胞すべてで biocytin が取込まれたと判定されたため、以下の計算式をもとに取り込み率は  $6$  (biocytin かつ II 型マーカーで染色された細胞数) /  $6$  (II 型マーカーで染色された細胞数) で 100% と計算された。解析はピント面を変え単一味蕾全体に対して行った。図 18 の例では、PLC  $\beta$  2 陽性細胞数が 12 細胞で、この全てが biocytin を取込んでいたことから、取り込み率は  $12/12$  で 100% であった。このような計算方法を用いて、単一味蕾に含まれる biocytin 取込率を求め、各種実験条件で比較した。

$$\text{Biocytin取り込み率(\%)} = \frac{\text{BiocytinかつII型マーカーで染色された細胞数}}{\text{II型マーカーで染色された細胞数}}$$

図 17 biocytin 取り込み率の計算式

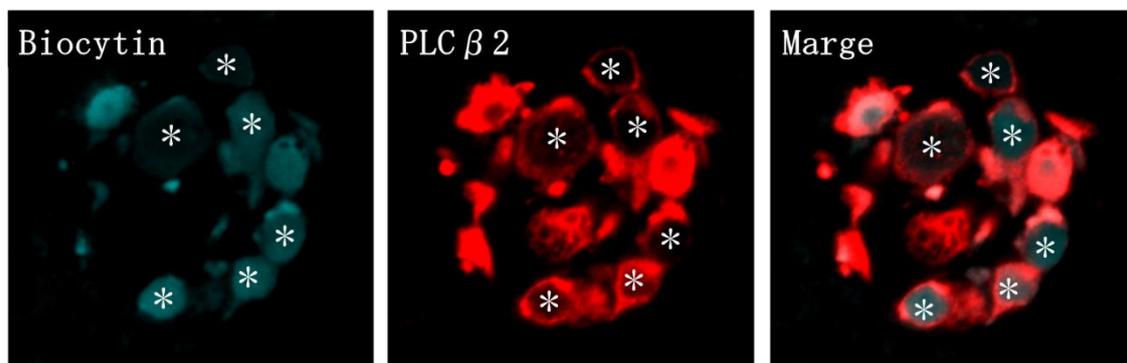


図 18 Biocytin が取り込まれかつ PLC β 2 で染色された細胞の共焦点顕微鏡画像

細胞体を確認できるピント面で解析を行い、ピント面を変えることで、味蕾全体に対して解析を行った。

## 第3章 結果

中性物質である biocytin が取込実験で有用であること、単一味蕾に発現する 30～40% の II 型細胞が CALHM チャネルを機能的に発現すること、II 型細胞の全てが脱分極により ATP を放出可能であること、ヘミチャネルは陰性物質に加え、中性、1 価の正電荷を持つ物質を通すことを、実験結果から記述する。

### 3-1 味蕾細胞への biocytin の取り込み

ATP は Px、Cx もしくは CALHM ヘミチャネルを通して細胞外に放出されていると考えられている。ヘミチャネルが開く条件で、細胞外液に biocytin を加えておけば、チャネルが開いた際、biocytin は濃度勾配により細胞内へ拡散すると考えた。細胞膜を脱分極させた場合、ATP と同じく負電荷の物質である LY が細胞外から細胞内に取り込まれることが報告されている (Takeuchi, Seto, Ohtubo, & Yoshii, 2011)。細胞膜を脱分極させるために、細胞外液を 150 mM K とした条件における biocytin の取り込みを調べた。免疫染色の結果、biocytin が味蕾細胞内に局在していた。つまり、味蕾細胞に biocytin が取り込まれた (図 19 a)。また、normal 外液でも biocytin が取り込まれた細胞が観察された (図 19 b)。取り込まれる細胞は主に II 型細胞であった。

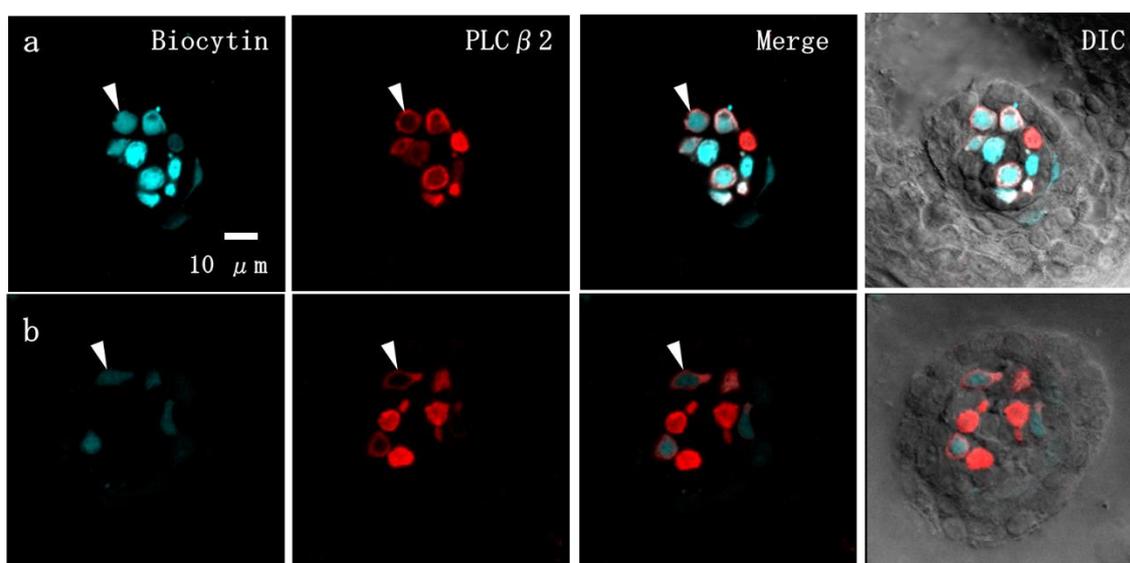


図 19 高カリウム外液(150 mM  $[K^+]_{out}$ )および normal 外液での biocytin の取り込み

味蕾細胞を基底膜側より撮影した共焦点顕微鏡画像である。a) biocytin を加えた 2 mM Ca 外液、150 mM  $[K^+]_{out}$  溶液に 5 分間味蕾を浸漬させた時の取り込み実験結果。シアンで染色されている部位に biocytin が局在していることが分かる(矢印)。また、PLC β 2 の免疫染色より、II 型細胞に biocytin が局在していることが分かる。b) biocytin を加えた 2 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$ 、5 mM  $[K^+]_{out}$  に 5 分間味蕾を浸漬させた時の取り込み実験結果。a) と同様に II 型細胞内に biocytin が局在していることが分かる。

### 3-2 細胞膜損傷による biocytin の細胞内蓄積の可能性

標本調製過程での細胞膜が損傷し、その損傷部位から biocytin が取り込まれた可能性が考えられる。そこで、細胞膜損傷の確認に汎用される propidium iodide (分子量 415) を用いて細胞膜損傷の有無を調べた。Propidium iodide は図 20 に示すように 2 価の正電荷を持つ分子であり、過去の研究から 2 価の正電荷の物質は脱分極条件では取り込まれないことが分かっている (Takeuchi, Seto, Ohtubo, & Yoshii, 2011) ため、本目的には適切である。5 つの味蕾で 62 個の II 型細胞を測定したが、いずれも propidium iodide で染色された細胞は観察されなかった (図 21)。味蕾を取り囲む周辺細胞や上皮細胞では、propidium iodide で染色される細胞が観察された。これらの細胞は、標本調製する際に細胞膜が損傷した細胞であると考えられる。Biocytin 取り込み実験を行った  $150 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$  で、II 型細胞は propidium iodide で染まらなかったため、細胞膜の損傷がなかったことが確認された。

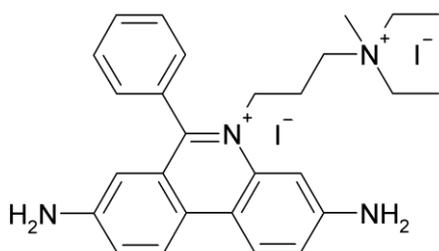


図 20 Propidium iodide の構造式

ヨウ素を除いた上記構造式の分子量は、415 である。

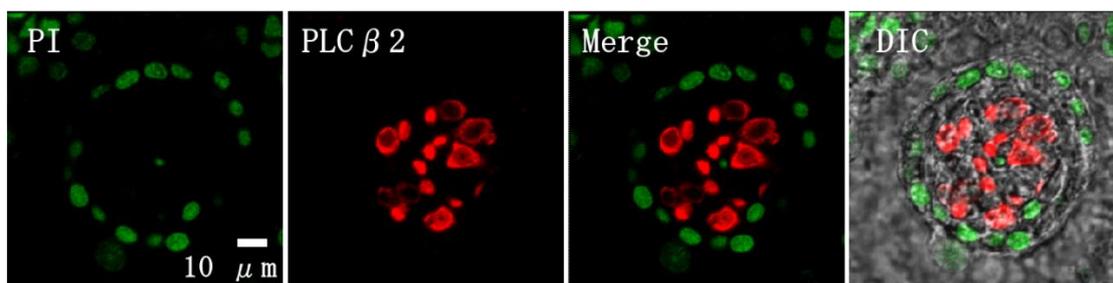


図 21 剥離舌上皮標本の propidium iodide を用いた細胞膜損傷の確認

Propidium iodide (PI、 $10 \mu\text{M}$ ) を溶解させた  $150 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$  に、味蕾細胞を 5 分間浸漬した。細胞型マーカーとして PLC  $\beta$  2 を使用した。味蕾の周辺細胞や上皮細胞で PI 陽性細胞が確認できるが、II 型細胞 (赤) は染色されなかった。

### 3-3 取り込み率と時間の関係

Biocytin が味蕾細胞に取り込まれることが分かったので、取り込み率と浸漬時間の関係について調べた。細胞膜を脱分極させた場合での最大取り込み率を調べる目的で、取り込み率が飽和に達する浸漬時間を2つの方法にて測定した。一つは、LYを用いて、それぞれの細胞におけるLYの取り込み量をリアルタイム計測し浸漬時間との関係を調べる方法である。もう一つは、biocytinを用いた免疫染色との組み合わせによりII型細胞における取り込み率が浸漬時間に対してどのように変化していくかを測定する方法である。

LYを加えた100 mM  $[K^+]_{out}$ に味蕾を浸漬し、細胞内の蛍光強度の変化から取り込みの時間依存性を調べた。その結果、2分で細胞内の蛍光強度の増加が定常に達した(図 22)。

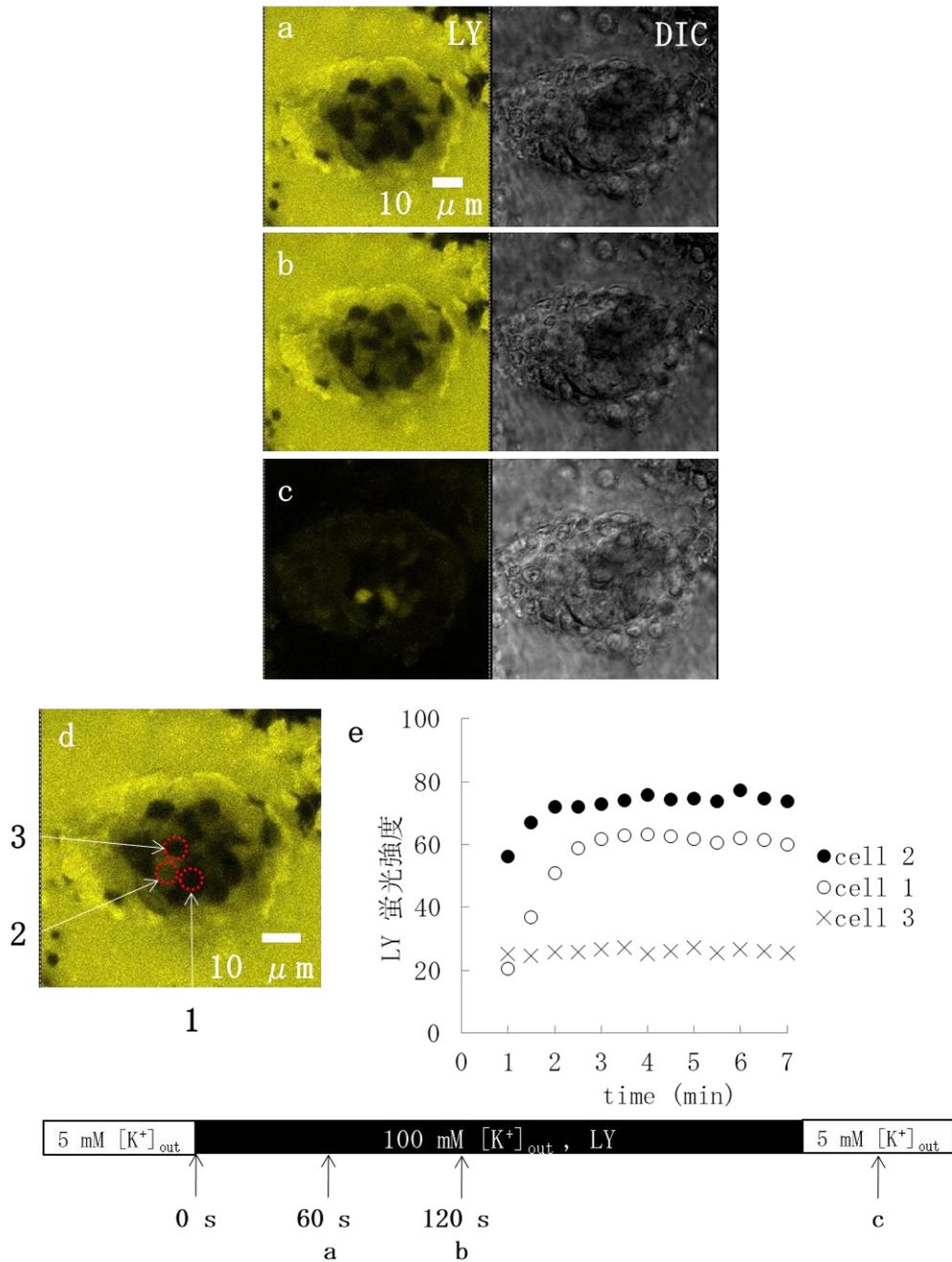


図 22 高カリウム外液 ( $100 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$ ) での LY を用いた色素の取り込み速度の測定

a) LY 添加 60 秒後に測定した蛍光顕微鏡画像。b) LY に浸漬 120 秒後の測定画像。c) LY を washout した後の測定画像。d) Cell 1~3 に対して蛍光強度をプロットした e) 細胞外液を LY が加えられた  $100 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$  に変更し、60 秒後に蛍光強度の測定を開始した。Cell 1 および Cell 2 では、蛍光強度の時間依存的な上昇がみられた後、一定となった。Cell 3 においては蛍光強度の上昇は見られなかった。

Biocytin 取り込み実験と免疫染色法を組み合わせⅡ型細胞における取り込み率を測定する方法では、150 mM  $[K^+]_{out}$  もしくは 30 mM  $[K^+]_{out}$  に浸漬する時間を 1、5、10、20 分と変化させ、取り込み率が浸漬時間に応じて変化するか調べた。取り込み率は、細胞外液のカリウム濃度により異なった。高濃度の 150 mM  $[K^+]_{out}$  では、浸漬時間が 5 分の場合、ほぼすべての細胞へ biocytin が取り込まれたのに対し、30 mM  $[K^+]_{out}$  では約 40%の細胞に取り込まれた (表 6、図 23)。この方法においても、2分程度で取り込み率は定常となった (図 24)。つまり、biocytin の浸透時間は 2 分で飽和に達すると結論し、以下の実験を実施した。

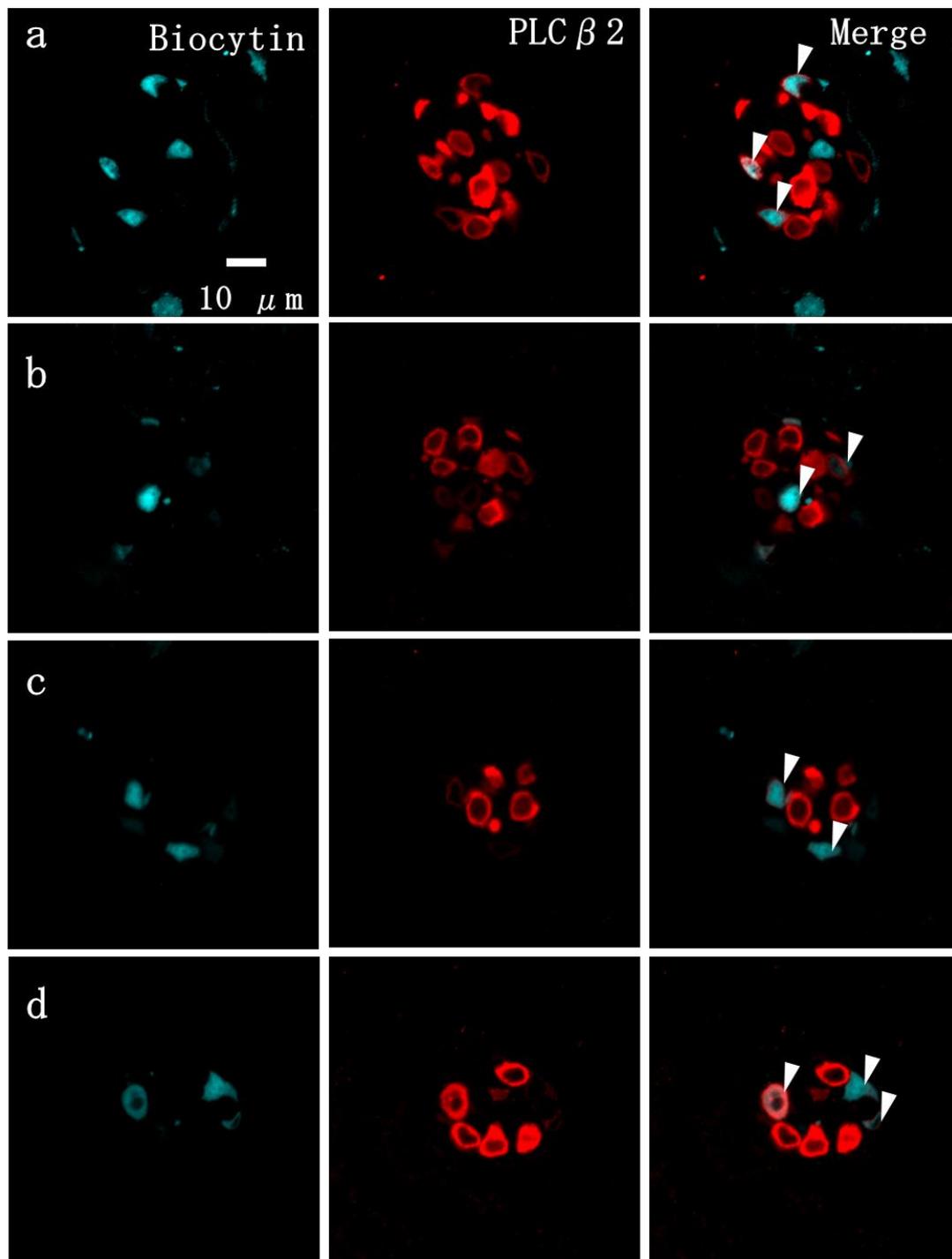


図 23 高カリウム外液 (30 mM  $[K^+]_{out}$ ) での biocytin の取り込み画像

a から d の順に biocytin への浸漬時間 1、5、10、20 分である。図中の白矢印で記した細胞は、II 型細胞マーカーである PLC  $\beta$  2 で染色されており、かつ biocytin を取り込んだ細胞である。

表 6 高カリウム (30 mM  $[K^+]_{out}$ ) 外液での biocytin 取り込みデータまとめ

浸漬時間 (分)	1	2	5	10	20
平均の取り込み率 $\pm$ SD (%)	25 $\pm$ 12	ND	41 $\pm$ 21	38 $\pm$ 10	36 $\pm$ 13
測定味蓄数	8	ND	7	8	6

SD: 標準偏差、ND : データなし

表 7 高カリウム (150 mM  $[K^+]_{out}$ ) 外液での biocytin 取り込みデータまとめ

浸漬時間 (分)	1	2	5	10	20
平均の取り込み率 $\pm$ SD (%)	ND	95 $\pm$ 7	100 $\pm$ 0	99 $\pm$ 3	ND
測定味蓄数	ND	5	9	5	ND

SD: 標準偏差、ND : データなし

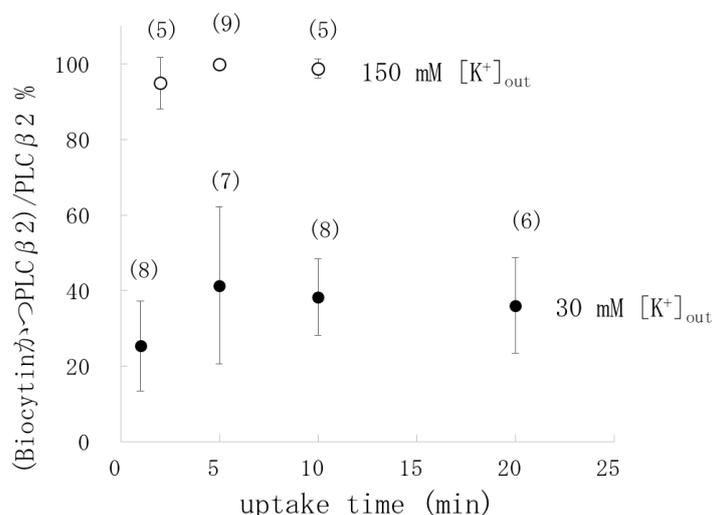


図 24 高カリウム外液 (150 mM  $[K^+]_{out}$  および 30 mM  $[K^+]_{out}$ ) での II 型細胞の biocytin 取り込み率と浸漬時間の関係

高カリウム条件である 150 mM  $[K^+]_{out}$  および 30 mM  $[K^+]_{out}$  どちらの場合においても biocytin の取り込み率が飽和に達するのは、約 2 分であった。また、150 mM  $[K^+]_{out}$  ではほぼすべての II 型細胞が取り込むのに対して、30 mM  $[K^+]_{out}$  では、約 40% で飽和した。( ) 内は測定味蓄数を示している。

### 3-4 CALHM が開口する条件での biocytin 取り込み割合と阻害剤の効果

Taruno らは、細胞外カルシウム濃度の低下に伴い、CALHM の開口確率が上昇し、それに応じて ATP の放出量が増加することを HeLa 細胞に発現させた CALHM1 チャネルの実験から明らかにした (Taruno, et al., 2013)。細胞外カルシウム濃度の減少により開口するチャネルが味蕾細胞に機能的に発現しているのかを調べた。その際、チャネルの開口確率を最大限に上げるために、0.5 mM の ethylene glycol tetraacetic acid (以下、EGTA) を細胞外液に加えた。細胞外 Ca 濃度を 0 mM にし、EGTA を加えた条件下で、味蕾細胞は biocytin を取込むことを明らかにした (図 26)。取込んだ細胞の細胞型を同定したところ、II 型細胞であることが分かった。定量的解析により、II 型細胞の  $50.9 \pm 11.2\%$  (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 75 / 148、11 味蕾、平均±SD) が biocytin を取込んだ。Normal 外液では、 $21.8 \pm 19.2\%$  (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 23 / 101、12 味蕾、平均±SD) であり、II 型細胞における biocytin 取込細胞の割合は、有意に大きかった ( $P < 0.0001$ 、等分散における t-検定)。

EGTA を加えていない 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  では、II 型細胞の  $54.2 \pm 15.3\%$  (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 40 / 70、6 味蕾、平均±SD) で biocytin が取り込まれていた (図 26)。統計解析により、EGTA の有無による取り込み率を解析したところ、有意差は見られなかった ( $P > 0.075$ 、等分散における t-検定)。結果、EGTA の有無は biocytin の取り込み率に影響を与えなかった。つまり、0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  (EGTA なし) において、細胞外カルシウム濃度は十分低下し、細胞外カルシウム依存性チャネルの開口確率への影響が少ないことを示している。

次に、biocytin 取込率の浸漬時間依存性を調べた。浸漬時間を 5 分から 10 分とした場合、II 型細胞の  $45.3 \pm 20.6\%$  (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 74 / 147、11 味蕾、平均±SD) が biocytin を取込んだ。統計解析の結果、5 分と 10 分では取り込み率に有意な差がみられなかった ( $P > 0.17$ 、等分散における t-検定)。つまり、5 分間の取り込み時間で、細胞外カルシウム依存性チャネルからの取り込み率が最大になることが分かった。

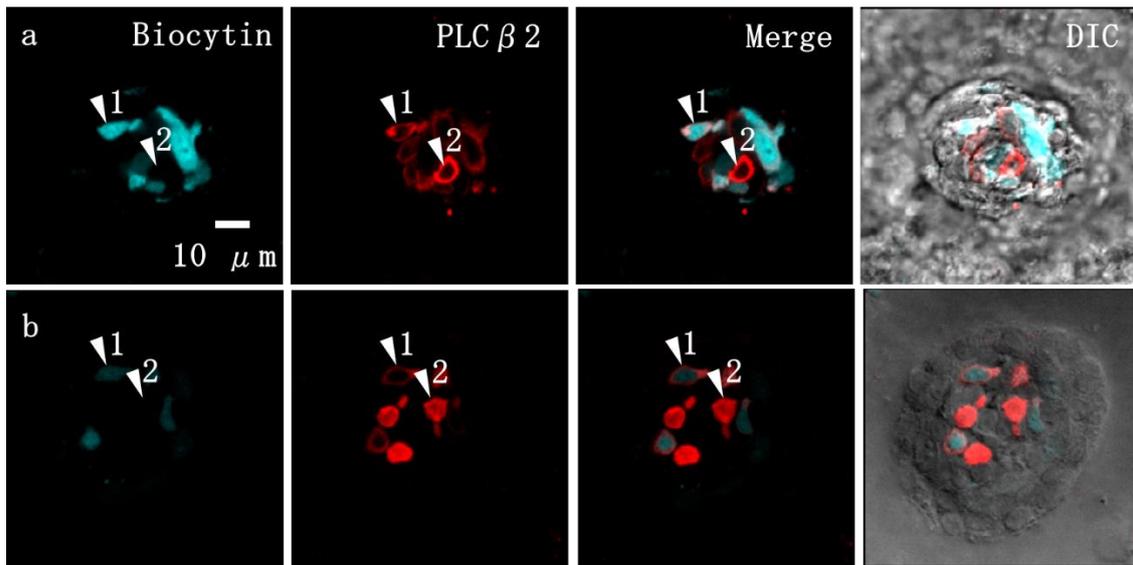


図 25 低カルシウム外液 ( $0 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ ) および  $2 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  での biocytin の取り込みの蛍光顕微鏡画像

a)  $0 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  における蛍光顕微鏡写真。b)  $2 \text{ mM Ca}$  外液における蛍光顕微鏡写真。矢印 1 は、biocytin が取り込まれた II 型細胞。矢印 2 は biocytin が取り込まれなかった II 型細胞。

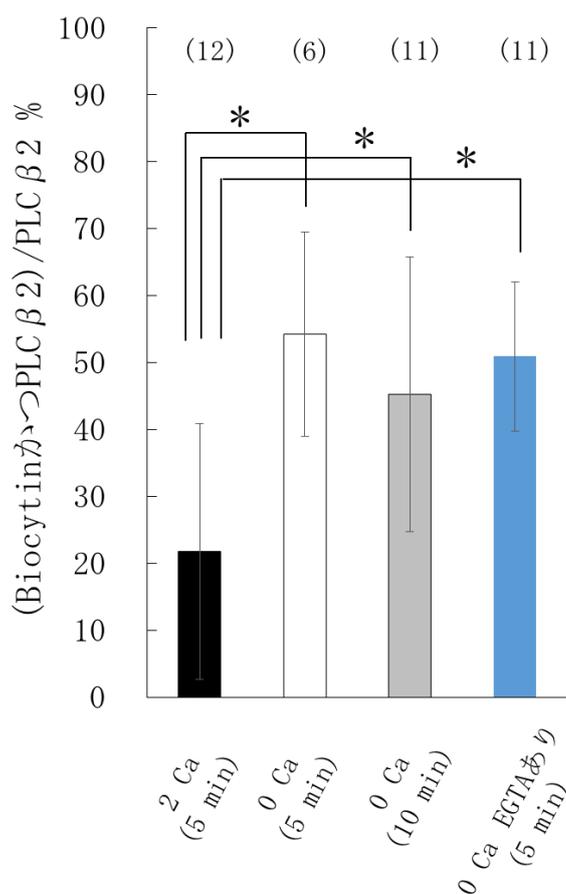


図 26 低カルシウム外液 (0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin の取り込み率の時間依存性および Ca キレート剤による影響

Normal 外液である 2 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  (2 Ca)と比較すると細胞外液にカルシウムを加えていない 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  (0 Ca) 取り込み時間 5 分、0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  (0 Ca) 取り込み時間 10 分、0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  (0 Ca EGTAあり) 取り込み時間 5 分は有意差あり。浸漬時間が 5 分 10 m 分の間、および EGTA ありの間では取り込み率に有意差なし。( ) 内は測定味蓄数を表す。

さらに、CALHM1 の非選択的な阻害剤として報告されている RuR、 $Gd^{3+}$ を作用させた場合の取り込み率の変化を調べた。RuR (20  $\mu$ M) は、hCALHM1 を発現させた HeLa 細胞において、細胞外カルシウムを除くことで生じる ATP の放出を 100%阻害する (Taruno, et al., 2013)。味蓄に発現する細胞外カルシウム濃度低下で開口するチャネルの薬理的性質を調べるため、20  $\mu$ M RuR 存在下で biocytin の取込実験を行った。RuR 存在下での取り込み率は  $52 \pm 14\%$  ( II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞

= 52 / 104、11 味蓄測定、平均±SD) となり、有意な阻害効果は無かった ( $P > 0.45$ 、等分散における t-検定)。一方、 $300 \mu\text{M Gd}^{3+}$ を用いた場合、取り込み率は  $32 \pm 21\%$  (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 42 / 116、11 味蓄測定、平均±SD) となり有意に biocytin の取り込みを抑制した ( $P < 0.001$ 、不等分散における t-検定) (図 28)。つまり、非選択的な阻害剤であるが、 $\text{Gd}^{3+}$ により biocytin 取込が有意に抑制されたこと、細胞外カルシウム濃度の減少 ( $0 \text{ mM}$ ) により biocytin が透過できるチャネルが開くことから、biocytin の取込は、CALHM チャネルを介して生じていると考えた。

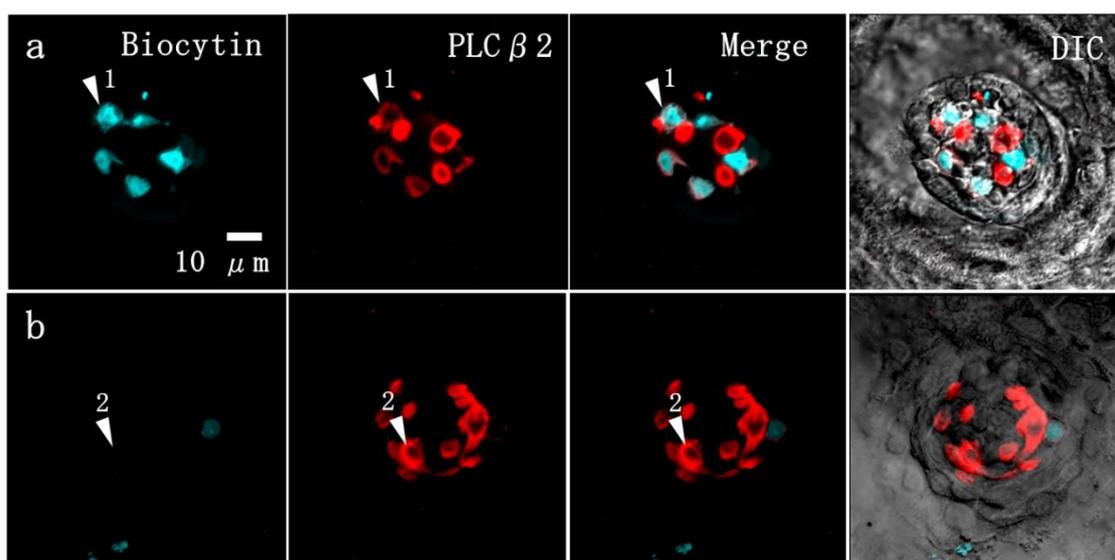


図 27 低カルシウム外液 ( $0 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ ) での biocytin 取り込み率への阻害剤の影響  
蛍光顕微鏡画像

a)  $20 \mu\text{M RuR}$  を阻害剤として加えた場合、b)  $300 \mu\text{M GdCl}_3$  を阻害剤として加えた場合の取り込み実験の蛍光顕微鏡画像。矢印 1 は biocytin が取り込まれた II 型細胞、矢印 2 は biocytin が取り込まれなかった II 型細胞。

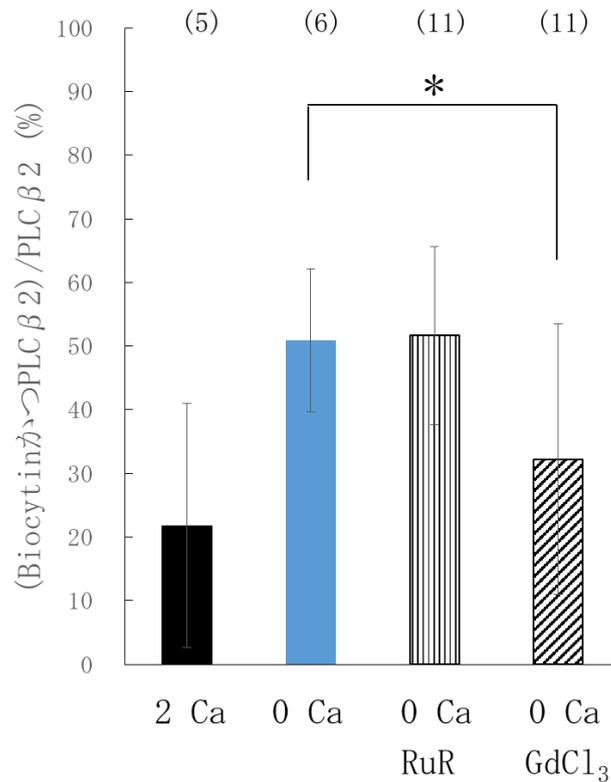


図 28 低カルシウム外液 (0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin 取り込みにおける阻害剤の影響

阻害剤である 20  $\mu$ M RuR に暴露させた環境においても II 型細胞の biocytin の取り込み率には影響がなかった。一方、阻害剤である 300  $\mu$ M GdCl<sub>3</sub> に暴露させた環境においては、優位に、II 型細胞の biocytin 取り込み率が減少した。( ) 内は測定味蕾数を表す。

### 3-5 細胞外カルシウム濃度低下による電位依存性外向き電流の増加

細胞外カルシウム濃度を低下させた場合、biocytin が通るチャネルが開口することがこれまでの結果から明らかになった。チャネルが開口するということは、チャネル電流を測定することが可能である。このことを確認するため、パッチクランプ法を用いて味蕾細胞の電位依存性電流を調べた。具体的には、normal 外液と細胞外 Ca 濃度を 0 mM にしたときの条件下で、電位依存性電流を測定し、比較した、II 型細胞の電位依存性外向き電流は、TEA および Cs イオン非感受性電流が主成分である (Ohtubo, Iwamoto, & Yoshii, 2012; Kimura, et al., 2014)。従って、電極内液には CsCl が主成分となる組成で実験を行った。

細胞外 Ca 濃度低下により、電位依存性外向き電流が増加する細胞と、変化が少ない

細胞が存在した (図 29)。II型細胞 10 細胞から記録をおこない、4 つの細胞が細胞外 Ca 濃度低下により、外向き電流の増加が生じた (図 30)。つまり、イオンチャネルが開口したことを示す。一方、残り 6 つの細胞では、大きな電流増加は観測できなかった。電依存性電流の測定から、40%の II型細胞が細胞外 Ca 濃度低下により、イオンチャネルの開口確率が上昇していることを明らかにした。なお、電位依存性電流の測定は、共同研究者である高島と共同で実施した (Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)。

細胞外 Ca 感受性電流が活性化される時定数は、25 ms (+ 50 mV)であった。(図 31) アフリカツメガエルの卵母細胞に CALHM1 を発現させた場合の活性化時定数は 9 s (+ 50 mV)、CALHM1/3 複合体を発現させた場合は 2 s (+50 mV)と報告されている (Ma, et al., 2018)。

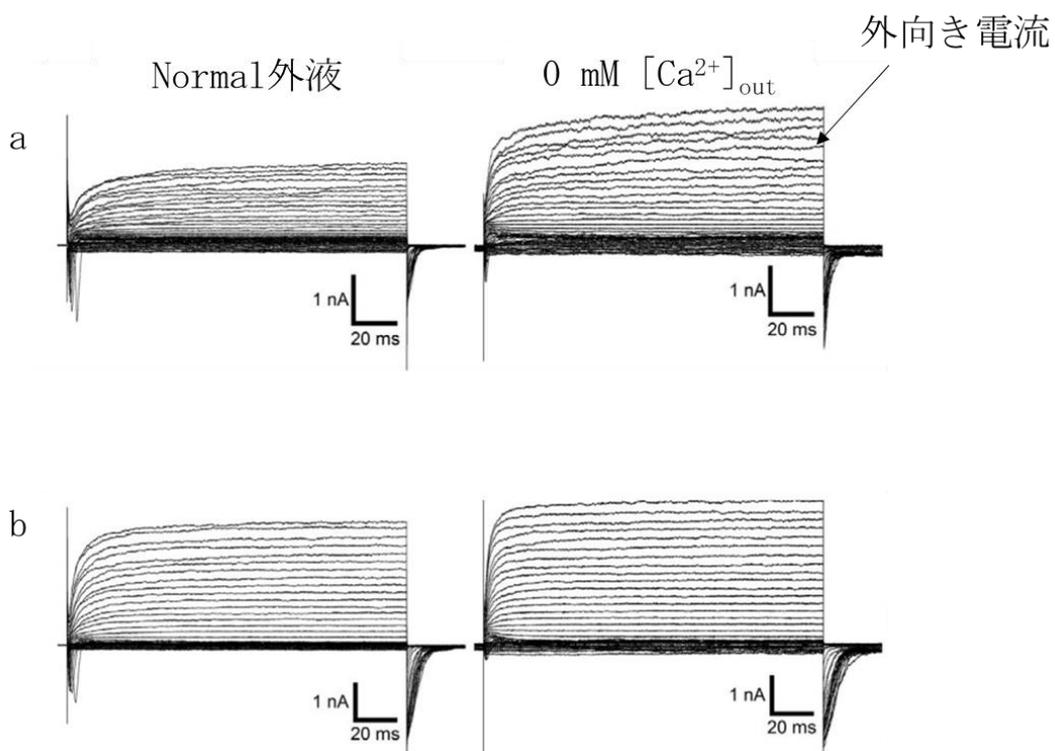


図 29 II型細胞での normal 外液および 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  での外向き電流測定

ホールセルパッチクランプにて電極内溶液の K を Cs に置き換えて電気測定を行った。左が normal 外液中、右が 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  での電流測定結果; a) 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  で外向き電流が増加した細胞 b) 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  で外向き電流がほぼ変化しなかった細胞。(Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)

同様の実験を 10 個の II 型細胞に対して行ったところ、4 つの II 型細胞、つまり 40% の II 型細胞で外向き電流が 0 Ca 外液により上昇した (図 30)。

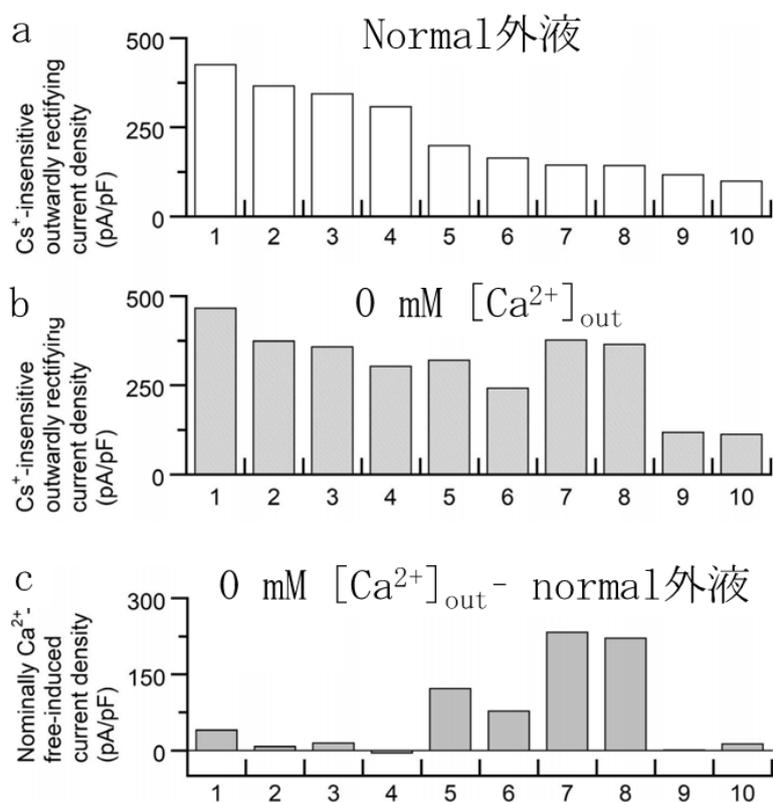


図 30 II 型細胞での normal 外液および 0 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> での外向き電流測定結果まとめ

a) normal 外液中での外向き電流 b) 0 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> 中での外向き電流 c) 0 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub> 中で増加した外向き電流から normal 外液中での外向き電流を引いた値。細胞外カルシウム濃度を 0 とすることで 10 個の II 型細胞中 4 個で外向き電流の増加がみられた。(Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)

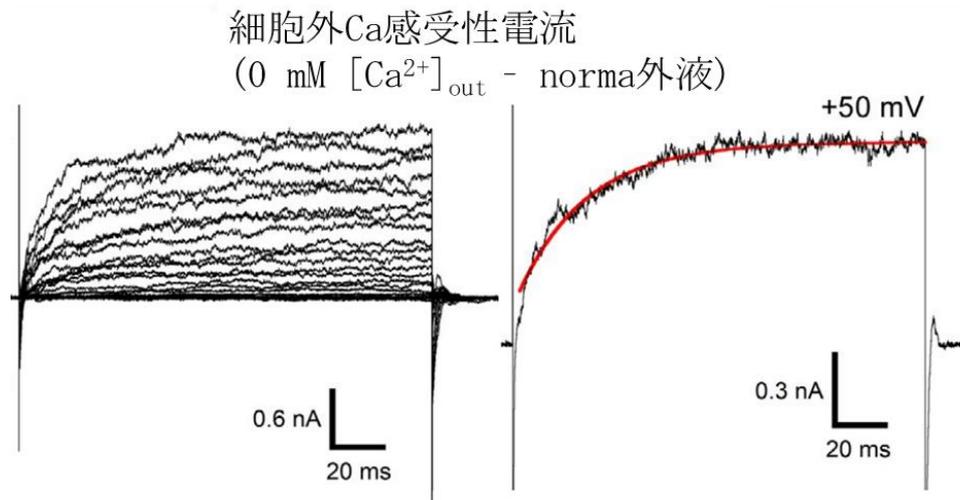


図 31 低カルシウム外液 (0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での外向き電流の活性化時定数

左：電流測定結果は、0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  での電流値を normal 外液での電流値から引いた細胞外 Ca 感受性電流である。右：+ 50 mV における細胞外 Ca 感受性電流を表示。一次の指数関数でカーブフィッティングを行い、時定数を求めた (n=1)。 (Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)

### 3-6 Px、Cx が開口する条件での biocytin の取り込み割合と阻害剤の効果

細胞外カリウム濃度を上昇させること (高カリウム刺激) は、細胞の脱分極を引き起こす。味蕾細胞に発現する Cx、Px および CALHM はいずれも脱分極で開口するチャネルであることが報告されている (Taruno, et al., 2013; Patel, Zhang, & Veenstra, 2014)。しかし、N2A 細胞に発現させた CALHM1 チャネルは細胞外カルシウムが 1.5 mM 存在する条件では、0 mV に脱分極させてもチャネルが開かないことが実験で確認されている (Ma, et al., 2012)。つまり、150 mM  $[K^+]_{out}$ 、2 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  では、Px および Cx チャネルが開口すると考えることができる。この高カリウム条件下に、Px、Cx に対する阻害剤を用いることで、どちらのヘミチャネルが biocytin の取込に関与しているのかを調べた。

前述の結果のように、高カリウム刺激により、味蕾細胞は biocytin を取込む (図 19)。Cx チャネルの阻害剤である  $Gd^{3+}$  および  $Zn^{2+}$  存在下で高カリウム刺激をおこなうと、どちらにおいても濃度依存的に取込率が抑制された。(図 32、図 33)。Biocytin の取り込み率は、100  $\mu$ M  $Gd^{3+}$  を加えた場合  $72 \pm 27\%$  (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれ

た細胞 / II型細胞 = 145 / 192、12 味蕾測定、平均±SD) で、300  $\mu$ M Gd<sup>3+</sup>を加えた場合 21 ± 32% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 24 / 91、9 味蕾測定、平均±SD) であった。統計解析結果、300  $\mu$ M と 100  $\mu$ M の間、300  $\mu$ M と阻害剤なしの間で有意差が認められた (one-way analysis of variance followed by scheffe's test、P < 0.01)。また、10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>を加えた場合 98 ± 5% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 135 / 139、9 味蕾測定、平均±SD) で、100  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>を加えた場合 18 ± 13% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 26 / 152、12 味蕾測定、平均±SD) で、300  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>を加えた場合 4 ± 5% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 6 / 151、15 味蕾測定、平均±SD) であった。統計解析結果、300  $\mu$ M と阻害剤なしの間、100  $\mu$ M と阻害剤なしの間で有意差が認められた (one-way analysis of variance followed by scheffe's test、P < 0.01)。

Probenecid は、Cx ヘミチャネルの阻害剤ではなく、ギャップジャンクションの阻害剤として報告されており、また Px1 の阻害剤としても報告されている (Sahu, Sukumaran, & Beraa, 2014)。Biocytin の取り込み率は、1 mM probenecid を加えた場合、96 ± 5% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 114 / 119、7 味蕾測定、平均±SD) で、0.01 mM probenecid を加えた場合、97 ± 5% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 114 / 118、10 味蕾測定、平均±SD) であった。加えていない場合と比較して有意差は見られなかった (one-way analysis of variance followed by scheffe's test、P>0.5)。

RuR は、CALHM1 および 2 の阻害剤として報告されている (Ma, et al., 2012; Dreses-Werringloer, et al., 2013; Taruno, et al., 2013; Choi, Clemente, Du, & Lü, 2019)。Cx および Px に対する阻害剤としての作用を調べた報告はされていない。Biocytin の取り込み率は、20  $\mu$ M RuR を加えた場合、96 ± 6% (II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 73 / 76、6 味蕾測定、平均±SD) であった (図 32、図 33)。加えていない場合と比較して有意差は見られなかった (P>0.08、t-検定)。

DIDS (4,4' -diisothiocyano-2,2' -stilbenedisulfonic acid) は、Px の阻害剤とし

てマウスにおける IC<sub>50</sub> は 9 ± 2 μM であると報告されている (Ma, Hui, Pelegrin, & Surprenant, 2009)。Takeuchi らは、5 μM DIDS により LY の取り込みがほぼ抑制 (取り込み率約 10%) されたと報告している (Takeuchi, Seto, Ohtubo, & Yoshii, 2011)。著者の実験では完全に異なる結果となり、biocytin の取り込み率は、5 μM DIDS を加えた場合、TOCRIC 製および SIGMA 製どちらにおいても、100% (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 46 / 46、3 味蓄測定 (TOCRIC 製)、II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 41 / 41、4 味蓄測定 (SIGMA 製)、平均 ± SD) であった。加えていない場合と比較して有意差は見られなかった (等分散における t-検定)。

10Panx は、Px1 の特異的な阻害剤として知られており、Px1 を発現させた HEK 細胞において、200 μM の 10Panx に 10 分暴露させることで Px1 を阻害剤し、ATP 放出および 60 mV の脱分極下での電流が減少することが報告されている (Pelegrin & Surprenant, 2006; Wang, et al., 2013)。Biocytin の取り込み率は、300 μM 10Panx を加え 20 分間処理した場合、99 ± 3% (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 67 / 68、5 味蓄測定、平均 ± SD) であった。10Panx を加えず同様の取り込み実験を行った場合の取り込み率は、95 ± 6% (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 46 / 48、4 味蓄測定、平均 ± SD) であった。10Panx による biocytin 取り込み抑制効果は、加えていない場合と比較して有意差は見られなかった (P>0.14、等分散における t-検定)。10Panx による biocytin 取り込み抑制効果がみられなかったことは、これまでに報告されている電気生理学実験の結果とも一致する (Romanov R. A., Rogachevskaja, Khokhlov, & Kolesnikov, 2008; Takeuchi, Seto, Ohtubo, & Yoshii, 2011)。

Gap26 は、Cx43 の特異的な阻害剤として、300 μM 作用させることで、II 型味蓄細胞の外向き電流を顕著に抑制したとの報告がある (Romanov R. A., Rogachevskaja, Khokhlov, & Kolesnikov, 2008)。また、160 μM の Gap26 に 30 分暴露させることで HeLa 細胞に発現させた Cx43 を阻害することが報告されている (Boitano & Evans, 2000)。Biocytin の取り込み率は、300 μM Gap26 を加え 20 分間処理した場合、94 ± 7% (II 型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II 型細胞 = 129 / 136、12 味蓄測定、平均 ± SD) であった。Gap26 を加えず同様のとりこみ実験を行った場合の取り

込み率は、 $98 \pm 6\%$ （Ⅱ型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / Ⅱ型細胞 = 57 / 58、5 味蕾測定、平均±SD）であった。Gap26 による biocytin 取り込み抑制効果は、加えていない場合と比較して有意差は見られなかった ( $P > 0.2$ 、等分散における t-検定)。また、Cx43 が味蕾内に発現しているか調べるため、免疫染色を行ったが、味蕾内には Cx43 の局在が確認されなかった (図 34)。つまり、biocytin の取込に Cx43 は関与していないと考えた。

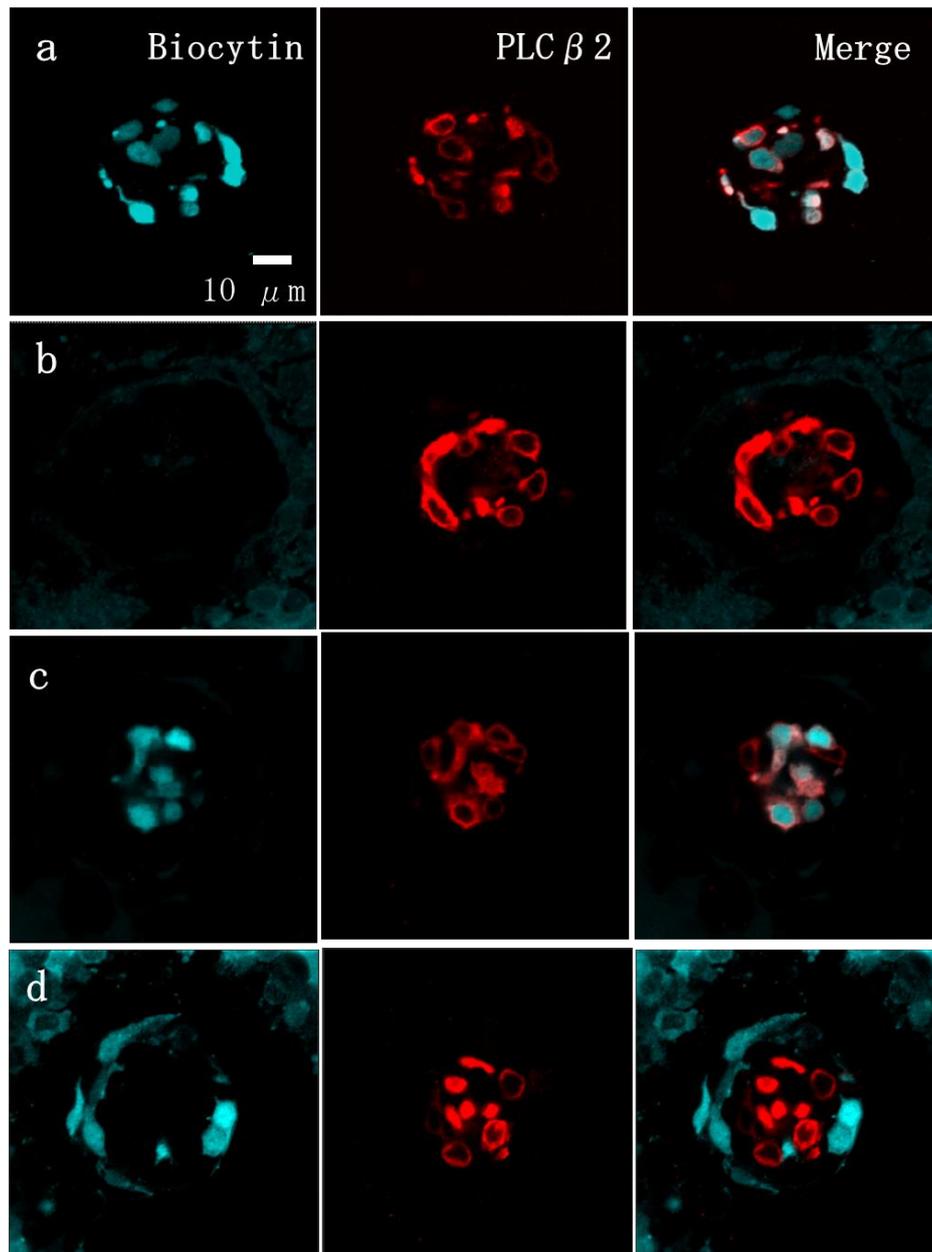


図 32 高カリウム外液 (150 mM  $[K^+]_{out}$ ) での biocytin 取り込みにおける阻害剤の効果

- a) RuR (20  $\mu$ M) を加えた条件での biocytin の取り込み結果。b) 300  $\mu$ M  $Gd^{3+}$  c) 100  $\mu$ M  $Gd^{3+}$  を加えた条件での biocytin の取り込み結果。d) 300  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  を加えた条件での biocytin の取り込み結果。b、c および d の画像に示すように、biocytin の取り込みは全く取り込まない細胞と、取り込む細胞で蛍光強度の差が明確に表れた。

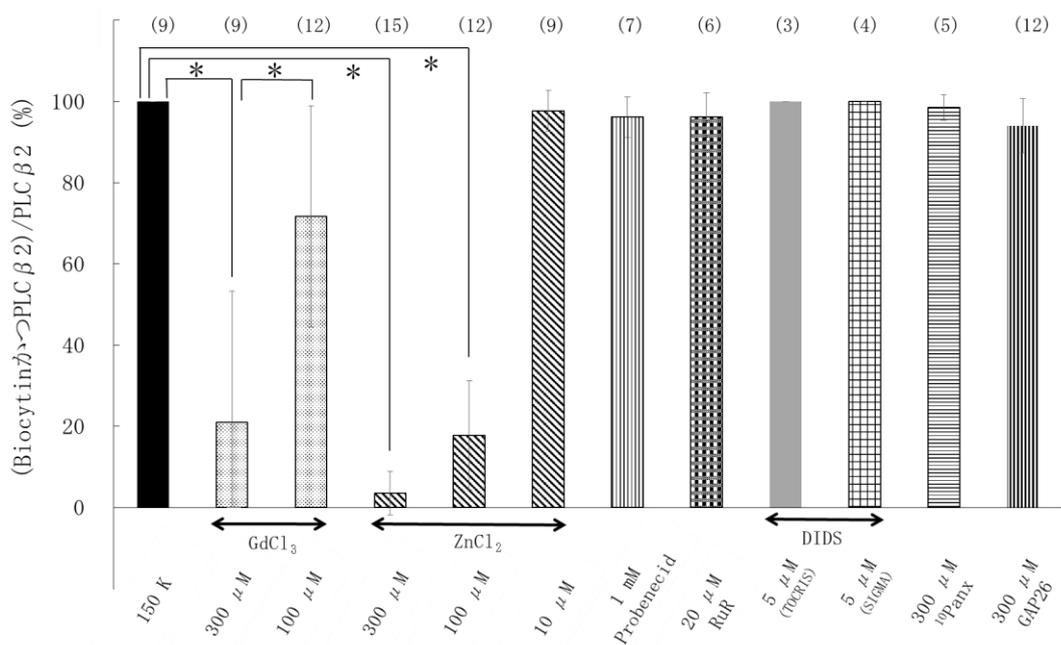


図 33 高カリウム外液 (150 mM  $[K^+]_{out}$ ) での II 型細胞の biocytin 取り込み割合と阻害剤の効果まとめ

高カリウム外液 (150 mM  $[K^+]_{out}$ ) では、ほぼすべての II 型細胞が biocytin を取り込んだ。Cx の阻害剤である  $Gd^{3+}$  および  $Zn^{2+}$  に対しては濃度依存的に取り込みが阻害された。一方、Px1 阻害剤である probenecid、DIDS、10Panx、CALHM1 および 2 の阻害剤である RuR、Cx43 阻害剤である Gap26 では取り込み率の低下は見られなかった。( ) 内は測定味蕾数を表す。

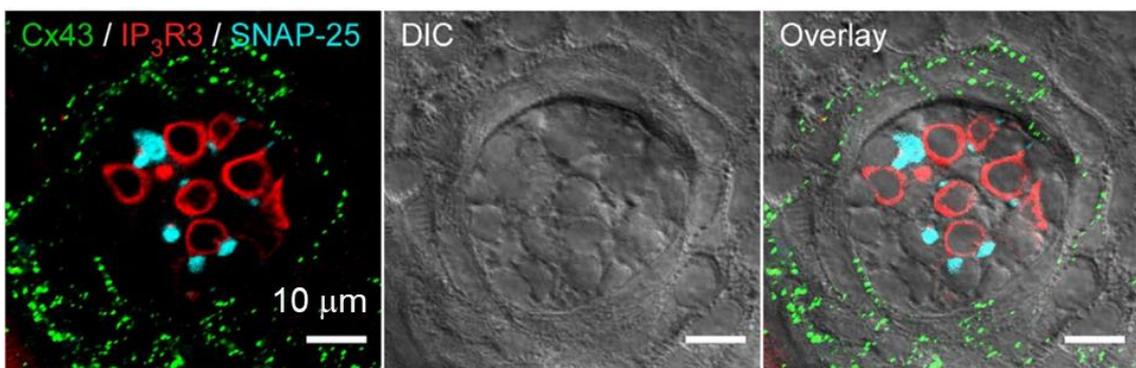


図 34 免疫染色法による C43 の味蕾内でのタンパク質発現の有無

Cx43 の抗体を用いて、味蕾細胞の免疫染色を行ったが、味蕾内には Cx43 (緑) の蛍光が確認されなかったことから、Cx43 はタンパク質として発現していないことが明らかとなった。(Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)

### 3-7 電気生理学実験での阻害剤の効果

Biocytin 取り込み実験にて、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{GdCl}_3$ のみが取り込みを阻害する結果となった。電気生理学実験でも、ヘミチャネルを通るイオンによる外向き電流が、それらの阻害剤に対して変化するかを調べた。ホールセルパッチクランプにて電極内溶液の K を Cs に置き換えて電気測定を行った。結果、150 mM  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  での取り込み実験の結果同様、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{GdCl}_3$  では顕著な抑制効果が外向き電流の減少として測定されたが、RuR では測定されなかった。

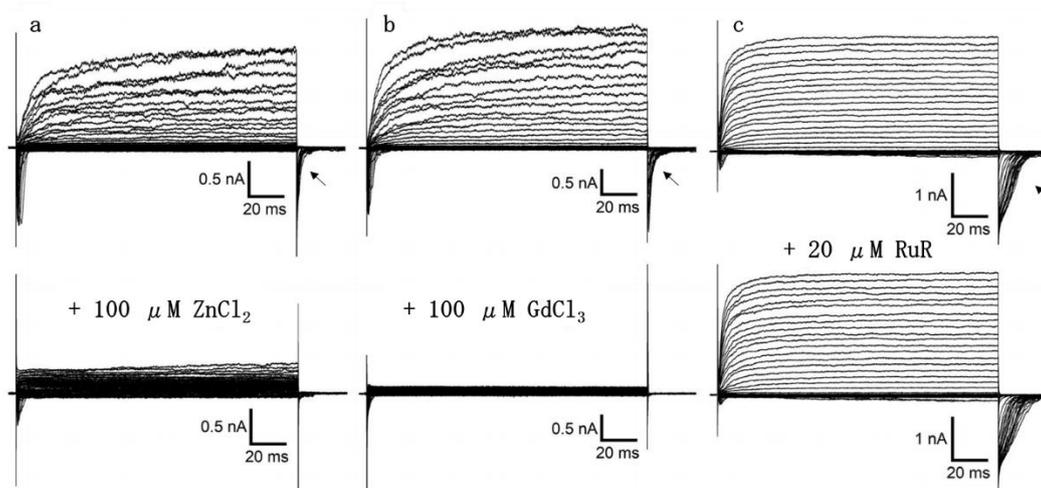


図 35 外向き電流、テール電流に対する阻害剤の効果

a)  $\text{ZnCl}_2$  を阻害剤として用いた場合、外向き電流およびテール電流(矢印)の抑制がみられた。b)  $\text{GdCl}_3$  を阻害剤として用いた場合、外向き電流およびテール電流(矢印)の抑制がみられた。c) RuR を阻害剤として用いても、外向き電流およびテール電流(矢印)の抑制がみられなかった。a、b、c はそれぞれ異なる細胞。(Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)

### 3-8 II型細胞以外で biocytin が取り込まれる細胞について

先にも述べたように、150 mM  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  では、biocytin は主にII型細胞に取り込まれていた。一部、II型細胞マーカーで染色されず biocytin が取り込まれた細胞が観察された。筆者がおこなった修士課程の研究では、200 mM  $[\text{K}^+]_{\text{out}}$  での取り込み実験において、III型細胞マーカー (SNAP25) で染色された細胞で biocytin が取り込まれた細胞は 0 個 (22 味蕾中の 53 個のIII型細胞)であった (岩本修士論文 2007 年)。

0 Ca 外液で biocytin が取り込まれた細胞は、主に II 型細胞であった。III 型細胞マーカーで染色された細胞は、8 味蕾のうち 12 個あり、かつ biocytin が取り込まれた細胞は 0 個であった。II 型細胞マーカーで染色されず biocytin が取り込まれた細胞は 7 味蕾中 11 個であった。

Normal 外液においても biocytin が取り込まれた細胞は、主に II 型細胞であることが確認された。取り込み率は、12 味蕾のうち 101 個の味蕾細胞が PLCβ2 で染色され、かつ biocytin が取り込まれた細胞は 23 個であったので、率は  $22 \pm 19\%$  であった。III 型細胞マーカーで染色された細胞は、5 味蕾のうち 9 個あり、かつ biocytin が取り込まれた細胞は 0 個であった。II 型細胞マーカーで染色されず biocytin が取り込まれた細胞は 5 味蕾中 4 個であった。

上記の 3 つの外液環境下すべてで、biocytin が取り込まれる細胞は、主に II 型細胞で、III 型細胞は全く取り込まれなかった。一部で II 型、III 型細胞マーカーで染色されない細胞で取り込みがみられた。細胞体が味孔まで伸びていたことから、IV 型ではなく、I 型であると考えた。

表 8 各種細胞外液での biocytin が取り込まれた細胞の割合

細胞外液条件	II 型細胞の取り込み率 (%)	III 型細胞の取り込み率 (%)	II 型、III 型細胞マーカーで染色されなかった細胞数
2 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ , 150 mM $[K^+]_{out}$	100 (99/99)	0 (0/53)	9 味蕾中 9 個
0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ , 5 mM $[K^+]_{out}$	$49 \pm 18$ (40/70)	0 (0/12)	7 味蕾中 11 個
2 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ , 5 mM $[K^+]_{out}$	$22 \pm 19$ (23/101)	0 (0/9)	5 味蕾中 4 個

カッコ内は、biocytin が取り込まれかつ細胞型マーカーで染色された細胞数/細胞型マーカーで染色された細胞数を表す。取り込み率は平均±SD で表している。II 型、III 型細胞マーカーで染色されず、biocytin が取り込まれた細胞は 1 味蕾あたり約 1 つ、いかなる細胞外液条件においても観察された。

( ) 内は、biocytin が取込まれかつ型マーカーで染色された細胞 / 型マーカーで染色された細胞である。

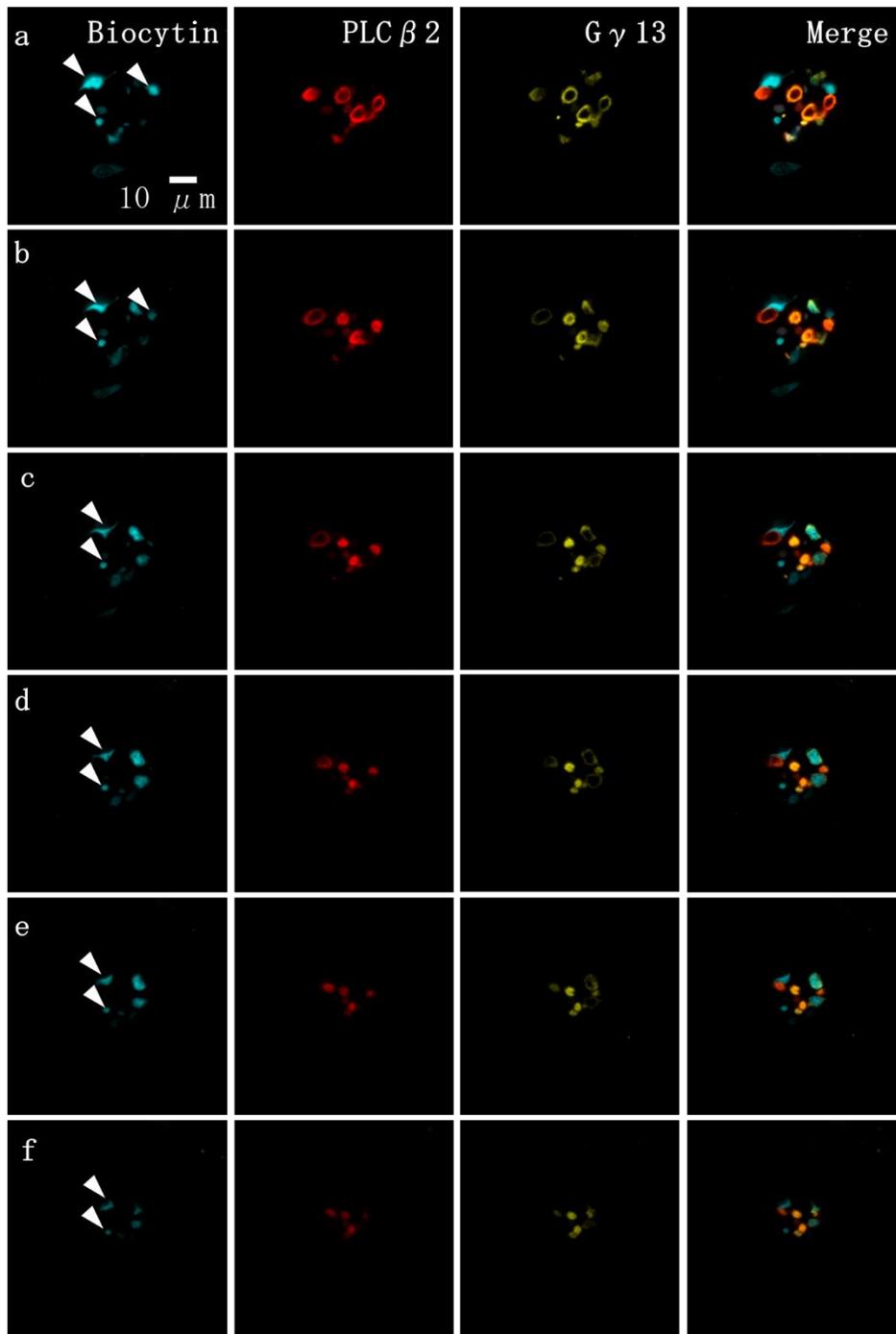


図 36 II型マーカーで染色されない  $0 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  で biocytin が取り込まれた細胞 a) が基底膜側で f) が味孔側であり、z 軸方向（基底膜側から味孔方向）に  $3.0 \mu\text{m}$  間隔で光学スライスされた共焦点レーザー顕微鏡での撮影画像。矢印で示した 3 つの細胞は、II型細胞マーカーである、PLC  $\beta 2$  および G  $\gamma 13$  で染色されなかった。細胞体は、味孔まで伸びていることが確認された。

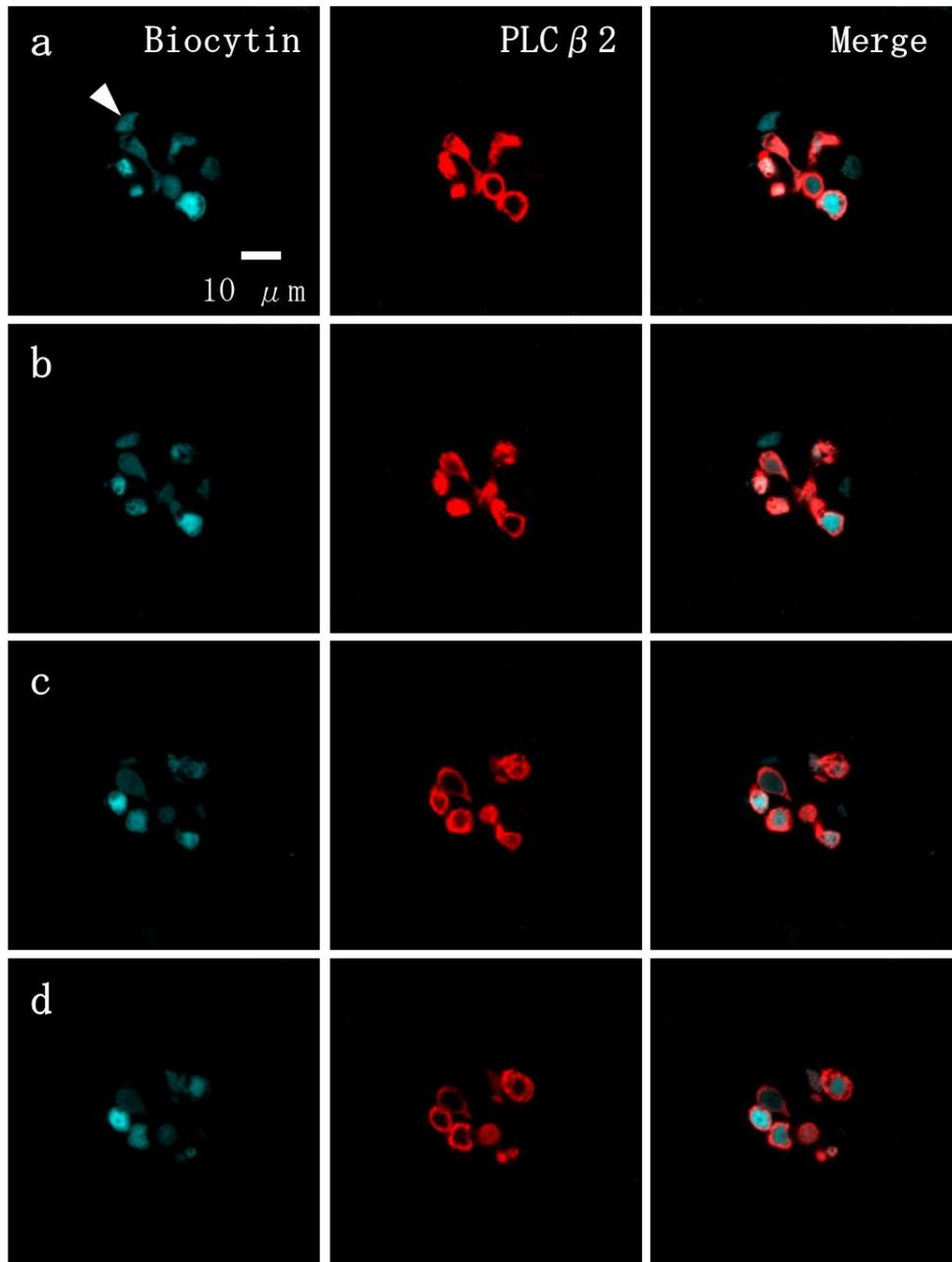


図 37 II型マーカーで染色されない  $150 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$  で biocytin が取り込まれた細胞

a) が基底膜側で d) が味孔側であり、z 軸方向（基底膜側から味孔方向）に  $3.0 \mu\text{m}$  間隔で光学スライスされた蛍光観察画像。矢印で示した細胞は、II型細胞マーカーである、PLC  $\beta 2$  で染色されなかった。細胞体は、味孔まで伸びていることが確認された。

### 3-9 脱分極条件における細胞内から細胞外への負電荷物質の放出

味蕾細胞では、脱分極刺激により、負電荷をもつ ATP が細胞外へ放出されることが分かっている (Huang Y.-J. , et al., 2007; Romanov R. A., et al., 2007; Taruno, et al., 2013)。脱分極刺激により、同じく負電荷をもつ LY が細胞内から細胞外へ放出されるかを調べた。つまり、これまでは、細胞外からの細胞内への物質 (LY や biocytin) の取込を測定していたが、逆方向の物質の移動を測定することで、ヘミチャネルの細胞内から細胞外への物質透過性を知ることができる。

高カリウム外液 (100 mM  $[K^+]_{out}$ ) に味蕾を 5 分間浸漬し細胞に LY が取り込まれたことを確認した。その後、LY を含まない 100 mM  $[K^+]_{out}$  での蛍光強度の変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 1 分おきに測定し、蛍光強度の変化を測定した (図 38)。取り込まれた LY は、100 mM  $[K^+]_{out}$  に味蕾をさらすことで、7 分後には、ほぼすべての LY の蛍光強度が減少した (図 39)。これは、高カリウムによる脱分極でヘミチャネルが開口し、細胞内から細胞外へ LY が流出したことによるものである。一方、LY を取込ませた後、通常の外液中に味蕾を曝した場合は、多くの味蕾細胞中の LY の蛍光強度には変化がなかった。つまり、生理条件では細胞外に排出されないことが分かった (図 14)。一部の味蕾細胞では、通常外液中でも LY が排出されたが、これは通常外液中でも一部の細胞が biocytin を取り込む現象が測定されたのと同じように、通常外液中では、一部のヘミチャネルが自発的に開口していることによると考えた。これらのことから、脱分極刺激により開口するヘミチャネルを通して、細胞内の色素が可逆的に細胞外に排出されることが確認された。

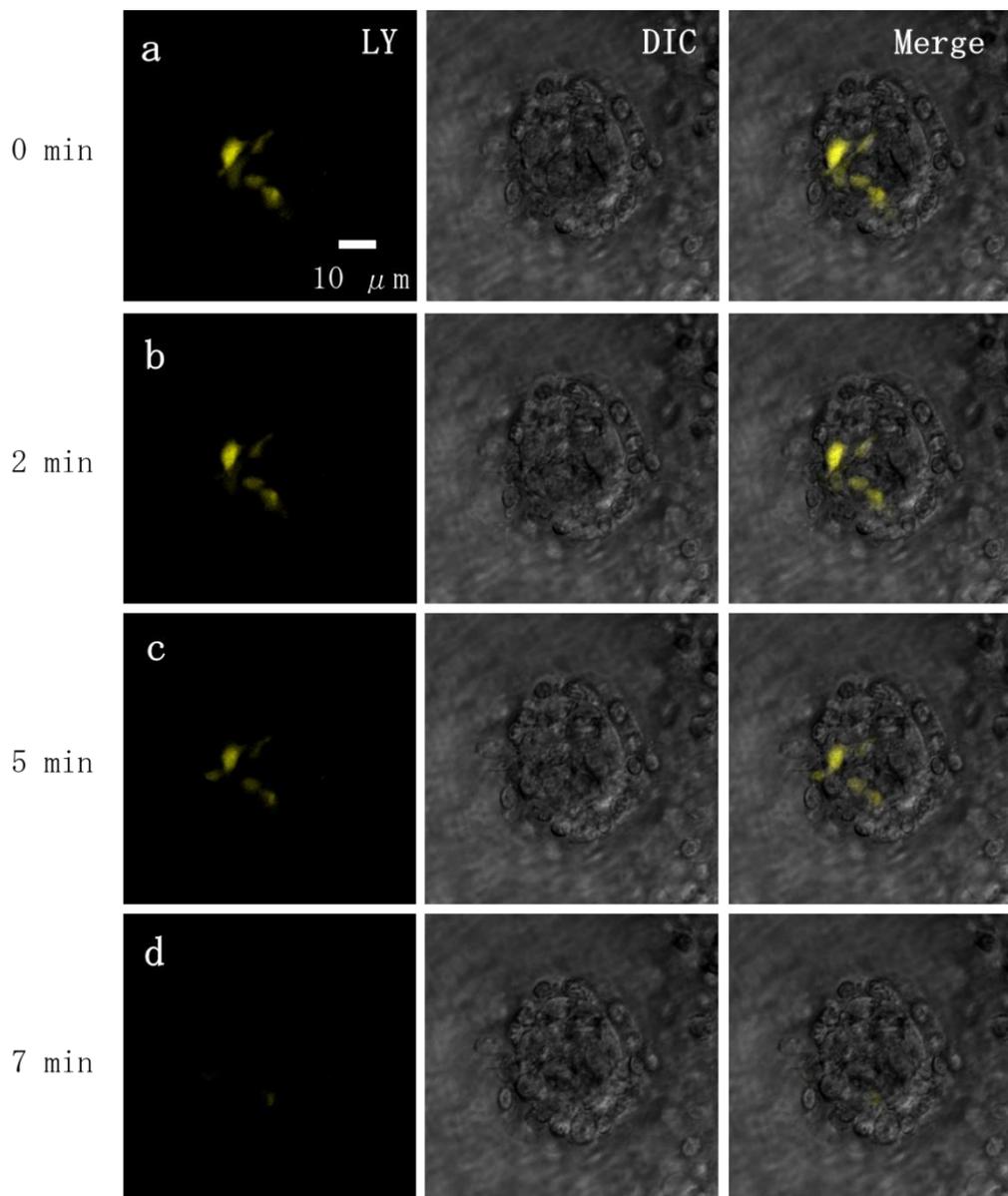


図 38 高カリウム外液 (100 mM  $[K^+]_{out}$ ) での細胞に取り込まれた LY の蛍光強度の変化

画像 a から d の順に洗浄開始直後 (0 分) から、2 分、5 分、7 分後の画像。実際の測定は、1 分おきに行っているが、3 分、6 分の画像は表示していない。

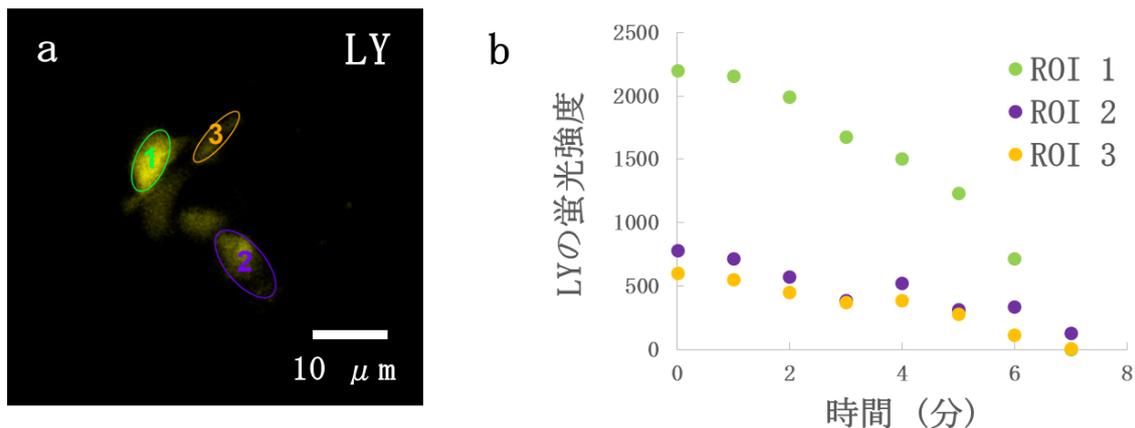


図 39 ROI 1~3 における LY の蛍光強度変化

a) 蛍光強度変化を測定した細胞の ROI。b) LY の蛍光強度の時間変化を測定するため、画像中に示す 1~3 の領域の蛍光強度の領域内の平均値を 0 分から 7 分まで 1 分ごとに求めた。高カリウム外液 (100 mM  $[K^+]_{out}$ ) に浸漬し 7 分後には、ROI 1~3 の細胞及びその他の細胞も LY の蛍光強度がほぼ 0 となった。

### 3-10 Biotin 誘導体を用いた取り込まれる分子の電荷の影響

II 型味蕾細胞からは、負の電荷をもつ ATP が放出されることが既に報告されており、(Huang Y.-J. , et al., 2007; Romanov R. A., et al., 2007; Romanov R. A., Rogachevskaja, Khokhlov, & Kolesnikov, 2008; Taruno, et al., 2013; Ma, et al., 2018)、同じく負電荷をもつ LY が細胞内から細胞外へ放出されることを示した。Cx および CALHM チャンネルのポアサイズはそれぞれ約 12 - 14 Å、約 14 Å と報告されており (Beblo & Veenstra, 1997; Oh, et al., 1997; Wang & Veenstra, 1997; Maeda, et al., 2009) (Siebert, et al., 2013)、非常に近い値である。透過する物質の電荷の影響についてもどちらも弱い選択性を持ち Cx では正電荷を持つ物質は、分子量が 1200 以下であっても制限されるという報告がある (Hansen, et al., 2014)。電荷が負である LY が取り込まれ、電荷が正である rhodamine B (分子量 479、電荷+1) は取り込まれないことが分かっていた (Takeuchi, Seto, Ohtubo, & Yoshii, 2011)。本研究で中性電荷の biocytin が取り込まれることを明らかにした。Biocytin と比較した場合、1 価の正電荷を持ち、かつ構造に近い biotin ethylenediamine (以下 Biotin ED) (図 41) で取り込まれるかを調べた。

結果、biotin ED は  $150 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$  で  $91.5 \pm 8.5\%$  ( II型細胞かつ biocytin が取り込まれた細胞 / II型細胞 = 64 / 70、9 味蕾、平均 $\pm$ SD) で取り込まれることが分かった (図 40)。biocytin がほぼ 100% の II 型細胞に取り込まれることと比較すると有意に ( $P < 0.01$ 、不等分散における t-検定) 取り込み率は低下したが、差は 10% 程度と小さかった。

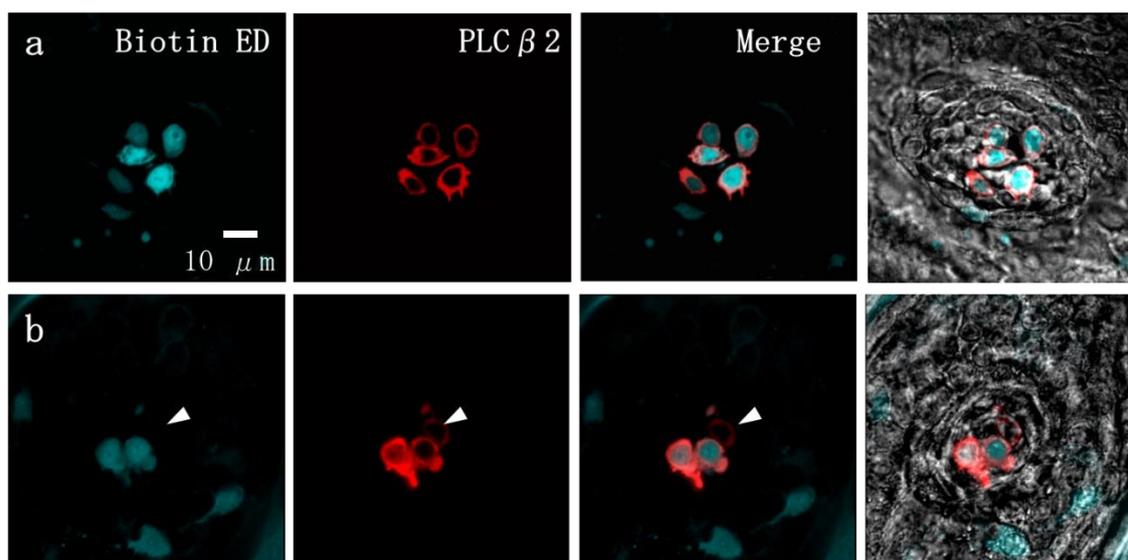


図 40 高カリウム外液 ( $150 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$ ) での biotin ED の取り込み

a)、b) の画像ともに、biotin ED の取り込みにおける免疫染色画像。多くの II 型細胞に biotin ED は取り込まれたが、一部画像 b 中に矢印で示した II 型細胞のように biotin ED が取り込まれなかった細胞が観察された。

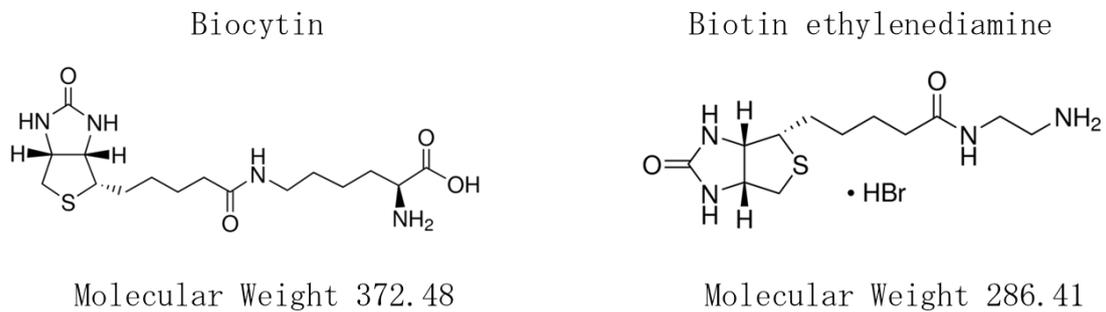


図 41 Biocytin と biotin ethylenediamine の構造式

Biocytin はカルボン酸とアミノ基を持ち、電荷的に中性である。一方 biotin ED はアミノ基のみを持ち、pH 7.4 バッファー中では正電荷を持つ。1 級アミンの例えば 1-propylamine の pKa は 10.2 である。

### 3-11 同一細胞での biocytin と LY の取り込み量の比較

電荷をもたない biocytin および 1 価の正電荷を持つ biocytin ethylenediamine が II 型細胞に取り込まれることが分かった。電荷をもたない biocytin と負電荷をもつ LY の取り込まれる量を比較するため、biocytin と LY が取り込まれた細胞において、それぞれの物質の細胞内濃度を測定した。Biocytin と LY を加えた 150 mM  $[K^+]_{out}$  に味蕾を浸漬し、biocytin と LY の蛍光強度から、取り込み量を比較した (図 42)。相関係数は 0.668 であり、biocytin と LY が取り込まれる濃度には有意な相関がみられた (無相関検定、 $p < 0.001$ )。つまり、biocytin をより多く取り込む細胞は、LY も多く取り込むことが分かった。

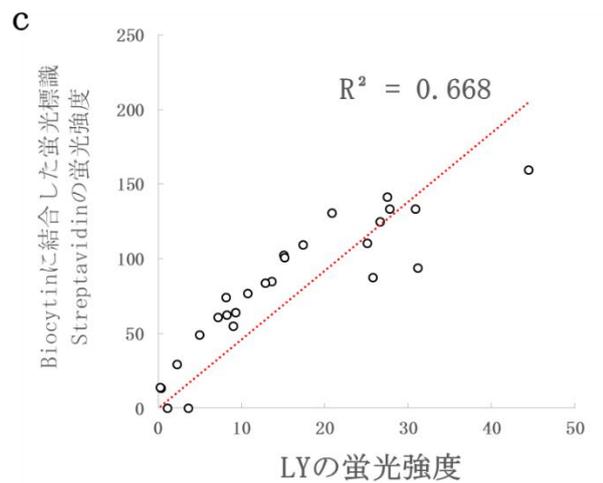
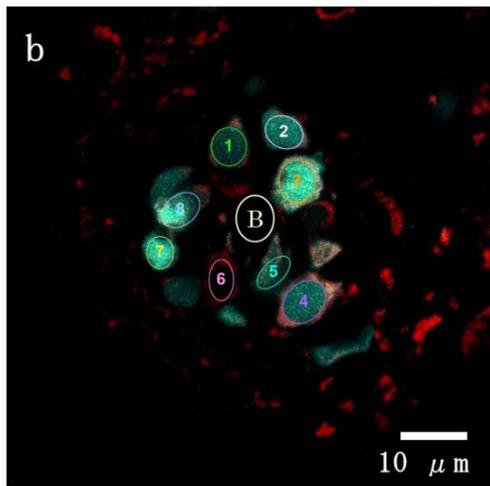
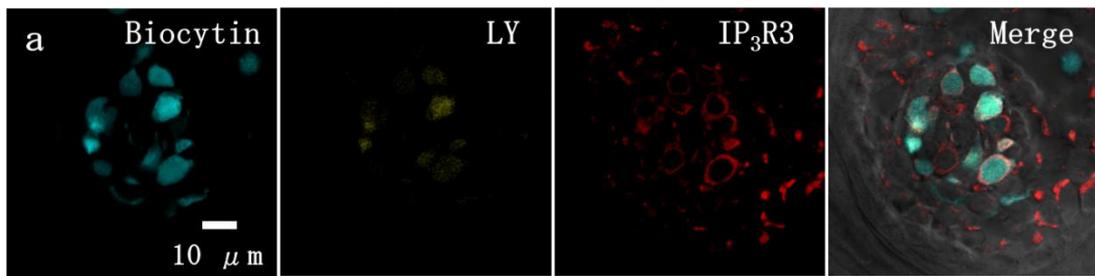


図 42 Biocytin と LY の細胞内濃度の比較

a) Biocytin と LY を同時に取り込んだ細胞の共焦点顕微鏡写真。b) IP<sub>3</sub>R3 で染色された II 型細胞内における biocytin と LY の濃度を解析するため、図中に示すように細胞内に ROI を設定し、味蕾内で biocytin および LY で染色されていない部位をバックグラウンド (図中 B) として蛍光強度を補正した。c) 横軸を LY の蛍光強度、つまり LY の濃度を、縦軸を biocytin の濃度としてそれぞれの細胞の蛍光強度をプロットした。26 味蕾細胞、3 味蕾を解析した。

## 第4章 考察

II型細胞の一部に発現する CALHM チャンネルの役割、II型細胞以外での biocytin 取込細胞の味情報伝達における役割、多様な荷電物質を通すヘミチャンネルの味情報伝達における役割などを考察する。

細胞外カルシウム濃度低下で開くチャネルがⅡ型細胞の30~40%に機能的に発現していることを、電気生理学実験、および取り込み実験の両方から明らかにした。また、脱分極刺激のみで biocytin がすべてのⅡ型細胞に取り込まれたことから、複数のヘミチャネルがⅡ型細胞に発現していることが明らかとなった。つまり、Ⅱ型細胞は味情報の伝達経路であるヘミチャネルの発現の違いによりサブタイプに分類できる (図 43)。本章では、味情報におけるヘミチャネルの役割について考察した。さらに、取り込まれる物質の電荷の影響、また、biocytin を取り込むⅠ型細胞の役割についても考察した。

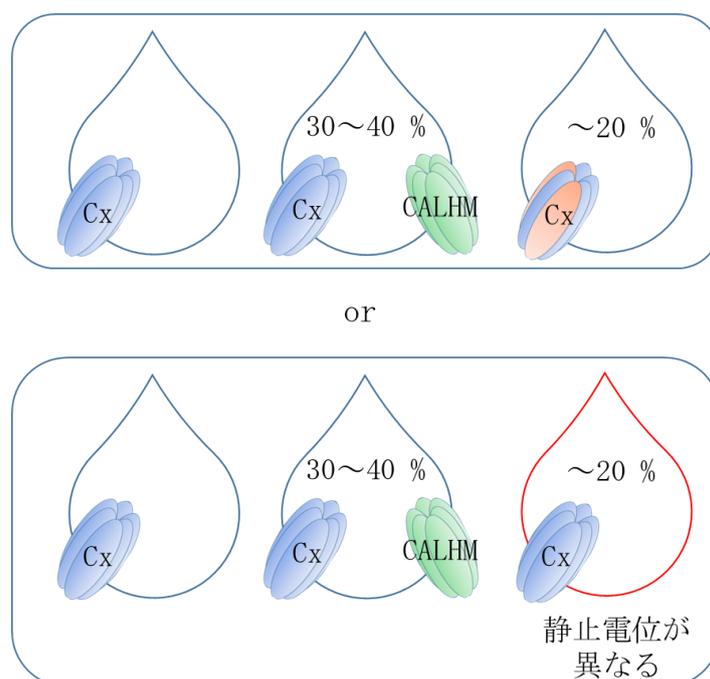


図 43 ヘミチャネルの発現の違いによるⅡ型細胞の分類

Ⅱ型細胞は上記の図のいずれかに、ヘミチャネルの発現の違いから分類できる。上 (ヘミチャネルの発現の違いから、3つに分類) : Ⅱ型細胞のすべてに Cx が発現している。Ⅱ型細胞の30~40%には、Cx と CALHM の両方が発現している。Cx 発現細胞の約20%は、より低い脱分極で開口する Cx のヘテロタイプが発現している。下 (ヘミチャネルの発現の違いから、2つに分類) : Ⅱ型細胞のすべてに Cx が発現している。Ⅱ型細胞の30~40%には、Cx と CALHM の両方が発現している。Cx 発現細胞の約20%は、Cx が自発的に開口できる程度の浅い静止電位状態にある。

## 4-1 Biocytin の取り込み経路

### 4-1-1 味蕾細胞間ギャップ結合による biocytin 拡散の可能性

本研究では、biocytin の取込実験からヘミチャネルの機能的な発現割合を測定した。ヘミチャネルとは、細胞内外での物質の移動を可能にするチャネルである。一方、ヘミチャネルが2つ合わさり形成されるギャップ結合は、細胞間で物質の移動を可能にするチャネルである。Biocytin の細胞外からの取り込み率から、機能的なヘミチャネルの発現割合を測定する手法は、ギャップ結合により細胞間での biocytin の移動が生じる場合は使えない。例えば、ヘミチャネルが発現した1個の細胞において、細胞外からヘミチャネルを通り biocytin が取り込まれる場合、ヘミチャネル発現細胞は1個である。もし、この細胞が5個の味蕾細胞とギャップ結合を形成している場合、ヘミチャネル発現細胞は1個であるが、biocytin 取込細胞は6個となり、ヘミチャネル発現細胞数の測定に誤りが生じることになる。

パッチクランプのガラス電極内液にマーカーとして加えた biocytin が他の細胞に移動しなかったことから、II型細胞がギャップ結合を形成していないと考えられる。取り込み実験と同一の方法で調製した単一味蕾細胞標本を用いて、電気測定を行い、その後 streptavidin を用いて biocytin を染色した画像が図 44 である。Biocytin を16個のII型細胞に注入したが、2つ以上の細胞が染色されることはなかった。全16データのうち、6例は Ohtubo らの結果 (Ohtubo, Iwamoto, & Yoshii, 2012)、10例は Iwamoto らの結果 (Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020) である。つまり、味蕾細胞間のギャップ結合は極めて少ない。従って、本研究で、biocytin を取込んだ細胞数は、ヘミチャネルを発現している細胞数を反映していると考えられる (図 45)。

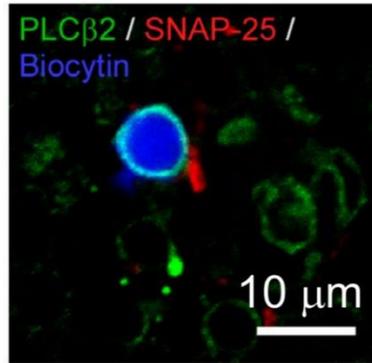


図 44 ホールセルパッチクランプ電極内に加えた biocytin により染色された細胞  
 ホールセルパッチクランプ電極内に biocytin を加え、単一味蕾細胞に注入した。画像にあるように、一つの細胞のみに biocytin が局在している。  
 (Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)

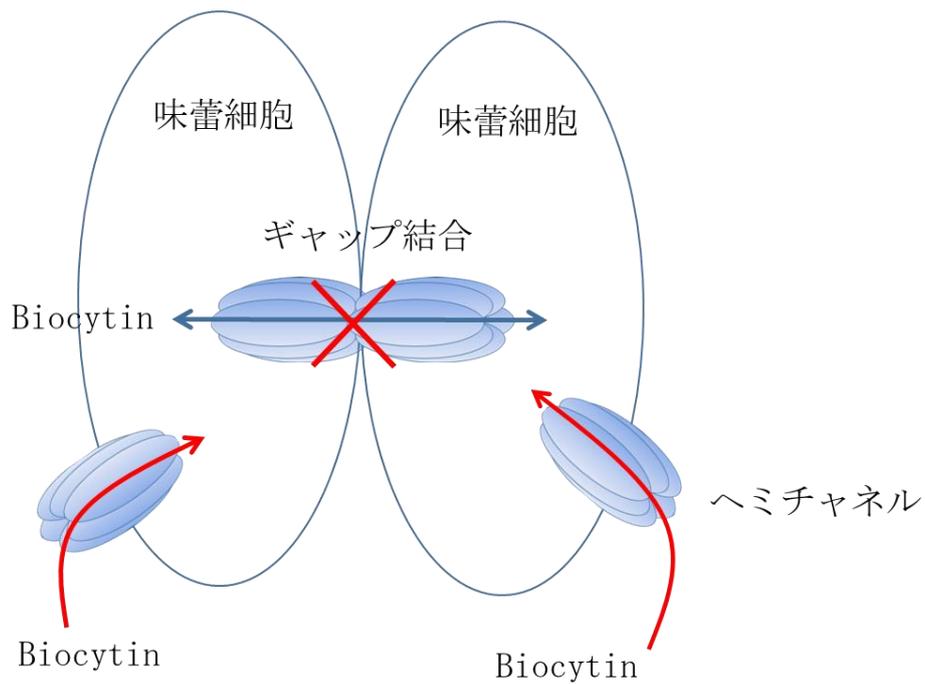


図 45 Biocytin の取り込み経路

Biocytin はヘミチャネルから取込まれ、その biocytin がギャップ結合を通して多数の細胞に拡散することは無いと考えられる。

#### 4-1-2 低カルシウム外液 (5 mM $[K^+]_{out}$ 、0 mM $[Ca^{2+}]_{out}$ ) での biocytin 取り込み経路

細胞外液を 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  にした場合には、Px チャンネルの開口にはカルシウム依存性がないため、Cx もしくは CALHM1 から取り込まれたと考えられる。Cx は 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  のみでは開口せず、脱分極が必要であるが、今回の条件では細胞外液カリウム濃度が 5 mM であることから、CALHM チャンネルから取り込まれたと考えられる。

RuR は CALHM1 の阻害剤として報告されているが、取り込み実験において阻害効果は見られなかった。このことは、CALHM を否定する結果ではないと考えている。RuR は CALHM を完全に閉じるのではなく、チャンネルの口径を狭めるように阻害することが報告されており (Choi, Clemente, Du, & Lü, 2019)、そのことから biocytin の取り込みが阻害されず、また biocytin よりもさらに小さなイオンから構成される電流に影響を与えなかったと考えられるからである。

CALHM1 の近傍には、通常とは異なるミトコンドリアが接近しており、細胞膜とミトコンドリアの距離が 20~30 nm との報告がある。Biocytin が細胞外から細胞質および核内まで取込まれるには、チャンネルを通った後に、この隙間を通り抜けなければならない。Biocytin がその隙間を通り細胞質へ移動できるのかは、以下の計算から求められる。炭素の単結合距離が 0.15 nm であること、最大に伸長した場合の結合角が 120 度であることから、計算すると biocytin の最大長は 2 nm であると求められる。周囲の環境により分子の形は影響を受け、水溶液中で最大に伸長していることはまれであるため、約 1 nm 程度であると考えるのが妥当である。よって、biocytin は大きさの観点からは、チャンネルサイズが 1.4 nm である CALHM1 チャンネルを通過し、かつ細胞質へ移動することは十分可能であると考えられる。

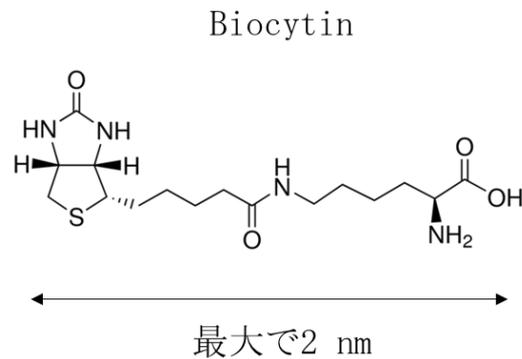


図 46 Biocytin の構造式と計算される長さ

上記のように直鎖に伸びた最長の構造をとっていた場合でも、全体の長さは 2 nm ほどで、観察された CALHM とミトコンドリアの距離 20~30 nm と比較して十分小さい。

実験から、約 50%の II 型細胞が細胞外カルシウムを 0 mM にした場合に、biocytin を取り込んだ。Normal 外液でも biocytin が取り込まれる細胞が 20%程度観察されたため、その分を除いた残りの 30%程度が 0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$  で biocytin を取り込んだと考えられる。電気生理学実験においても、10 個の II 型細胞を測定したところ、4 個の II 型細胞で細胞外カルシウム濃度低下に伴い、Cs 非感受性外向き電流の増加がみられた。II 型細胞の 40%が細胞外カルシウム依存的なチャネル開口があるという結果で、これは、biocytin 取り込み実験における約 30%と近い値であった (Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)。つまり、本研究により、II 型細胞の 30~40%が CALHM チャネルを機能的に発現していると結論した。

本研究の実験条件 (0 mM  $[Ca^{2+}]_{out}$ ) では、発現している CALHM の開口確率は最大に達しており (図 26)、II 型細胞における機能的に発現している細胞数は、以下の理由からすべて測定できたと考えた。アフリカツメガエルの卵母細胞への CALHM を発現させ ATP 放出量の測定を行った実験では、細胞外カルシウム濃度が 1  $\mu$ M 以下で放出量が飽和に達していることから (Taruno, et al., 2013)、CALHM チャネルは、細胞外液のカルシウム濃度を 1  $\mu$ M 以下とすると開口確率が最大となる。Biocytin 溶液への浸漬を行う前に、標本調製で使用した normal 外液からのカルシウムの持ち込みや外液調製に用い

た試薬からのカルシウム混入を考慮しても十分  $1 \mu\text{M}$  以下のカルシウム濃度とするために、 $0.5 \text{ mM}$  の EGTA を加えた。EGTA は ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) よりも、2 価の特に  $\text{Mg}^{2+}$  よりも  $\text{Ca}^{2+}$  に対してのキレート定数が高く、系中からカルシウムを除くのに適するキレート剤である。細胞外液にカルシウムを加えていない  $0 \text{ mM}$   $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  において、細胞外液調整に用いた試薬中すべてを合わせて  $155 \mu\text{M}$  (細胞外液調製のために使用した試薬に  $1/1000$  の量、カルシウムが含まれていたと仮定した場合) 含まれていたとしても、EGTA のカルシウムとのキレート定数から計算すると、EGTA を加えた場合での外液のカルシウム濃度は、 $50 \text{ nM}$  以下と計算される。 $0.5 \text{ mM}$  の EGTA を加えた  $0 \text{ mM}$   $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  でも取り込み率の上昇がみられなかったこと、EGTA を加えていない  $0 \text{ mM}$   $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$  での取り込み時間を 5 分から 10 分とした場合でも取り込み率の上昇がみられなかった (図 26) ことから、CALHM チャネルの開口確率は最大であったと考えられる。

CALHM の mRNA が 80% の II 型細胞に発現していたという先行研究 (Moyer, et al., 2009; Taruno, et al., 2013) とは割合に違いがある。その理由は、1) 茸状乳頭 (本研究) と有郭乳頭 (先行研究) の部位の違い、2) 味蕾構造が保持されている単一味蕾に含まれる割合 (本研究) とスライス標本のあるスライス面の複数味蕾から求めた割合 (先行研究) といった解析方法の違い、また、mRNA の発現量とタンパク質の発現量は、必ずしも一致しないという報告が多数あり (Abreu, Penalva, Marcotte, & Vogel, 2009; Reikvam, et al., 2015)、本研究では機能的な CALHM タンパク質の発現割合を調べた初めての報告であり、先行研究では mRNA の発現量を測定していることなどが理由であると考えられる。

#### 4-1-3 高カリウム外液 ( $150 \text{ mM} [\text{K}^+]_{\text{out}}$ 、 $2 \text{ mM} [\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ ) 外液での biocytin 取り込み経路

細胞外液を  $150 \text{ mM} [\text{K}^+]_{\text{out}}$  にした場合、全ての II 型細胞とごく一部の I 型細胞が biocytin を取込んだ。高カリウム外液 ( $150 \text{ mM} [\text{K}^+]_{\text{out}}$ ) は細胞膜を脱分極させる。本結果は、単一味蕾に含まれる全ての II 型細胞は、脱分極によりヘミチャネルを開口させ、物質を通すこと、つまり ATP を放出できることを示している。高カリウム外液 ( $150 \text{ mM} [\text{K}^+]_{\text{out}}$ ) における biocytin の取込経路について、以下のように考えた。

細胞外液を  $150 \text{ mM} [\text{K}^+]_{\text{out}}$  とした場合の味蕾細胞の静止電位は Goldman-Hodgkin-Katz の式 (図 47) より、 $-9.4 \text{ mV}$  と計算される。細胞内のイオン濃度は、 $\text{Na}^+$  が  $5 \text{ mM}$ 、 $\text{Cl}^-$  が

10 mM であると仮定し、また  $P_K : P_{Na} : P_{Cl}$  をそれぞれ 1 : 0.04 : 0.45 として計算した。

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}$$

図 47 Goldman-Hodgkin-Katz の式

細胞外液に 2 mM の  $Ca^{2+}$  が存在すると、CALHM1 チャンネルは 0 mV 付近でも開かないという報告と併せて考えると、150 mM  $[K^+]_{out}$  では、CALHM1 チャンネルの開口確率は非常に低いと考えられる。そのため、電位依存的にチャンネルが開口する Px もしくは Cx により biocytin が取り込まれたと考えられる。Px1 のチャンネル開口は  $Gd^{3+}$  にて阻害されないが (Hansen, et al., 2014)、Cx のチャンネル開口は  $Gd^{3+}$  により阻害されることが報告されており (Poon, et al., 2014)、図 33 に示すように 150 mM  $[K^+]_{out}$  での取り込みは  $Gd^{3+}$  により強く抑制されたこと、Px の阻害剤である probenecid、DIDS、10Panx が効かなかったことから、II 型細胞に取り込まれた biocytin は Cx を通過したと考えられる。電気生理学実験の結果からも、 $Gd^{3+}$  による抑制効果がみられなかった (図 35) ため、Px の機能的な発現はないと考えられる。Cx43 の抗体を用いた免疫染色では、Cx43 の味蕾内での局在は観察されなかった (Iwamoto, Takashima, & Ohtubo, 2020)。また、Cx43 の阻害剤である Gap26 を用いた場合でも、biocytin の取り込み率が低下しなかった (図 32)。このことから、Cx43 以外で味蕾細胞に発現している Cx26, 30, 30.3, 31.1, 33, 36 のいずれかを biocytin が通過したと考えられる。Cx 以外のチャンネルの可能性としては、ATP 放出に関与することが報告されているマキシアニオンチャンネル (Maxi-Cl) などが関与している可能性もある (Sabirov & Okada, 2004; Liu, Toychiev, Takahashi, Sabirov, & Okada, 2008; Okada, Okada, Islam, & Sabirov, 2018)。Cx サブタイプに特異的ブロッカーを用いた実験や、Maxi-Cl の味蕾細胞での発現などを今後調べる必要がある。

DIDS の阻害効果が先行研究と全く異なる結果となった原因は、Takeuchi らの実験で

は DIDS 存在下で LY の蛍光測定をするために励起光を照射したことで DIDS からラジカルが発生し、細胞内 pH が低下したことがヘミチャネルの活性を阻害したと考えられる。Wang らは、腹膜好中球に DIDS を作用させた際に、顕著にフリーラジカルの増加がみられたが、細胞内カルシウムストアからのカルシウム流出がなかったことより、DIDS から生じるラジカルにより細胞内 pH 低下を伴いスーパーオキシドが発生したと考えている (Wang, Chen, Liu, & Lin-Shiau, 2000)。

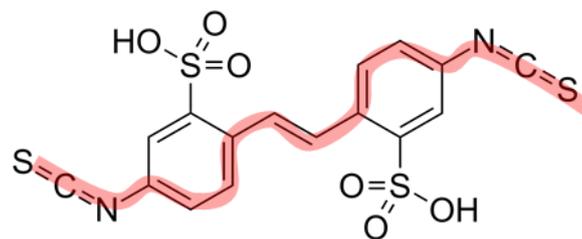


図 48 DIDS の構造式

$\pi$  共役結合が長くつながっており (赤線)、蛍光色素などにみられる構造と同様、光によって励起されやすく、基底状態から遷移状態になった際にラジカルが発生する。

#### 4-1-4 Normal 外液 (5 mM [K<sup>+</sup>]<sub>out</sub>)、2 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>) での biocytin 取り込み経路

生理的条件下 (5 mM [K<sup>+</sup>]<sub>out</sub>)、2 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>out</sub>) でも約 20%の味蕾細胞が biocytin を取り込んだ (図 26、図 28)。CALHM1 は 2 mM カルシウム存在下かつ脱分極しない条件では、ATP の放出が検出されなかったことから (Taruno, et al., 2013)、CALHM1 チャネルの開口確率は非常に低いと考えられる。Cx を発現させた HeLa 細胞でも約 10%が生理的条件下で取り込む現象が確認されていることから (Contreras, Sáez, Bukauskas, & Bennett, 2003)、Cx から取り込まれたと考えられる。単一味蕾には、約 10 個の II 型細胞が存在するが、各 II 型細胞の静止膜電位は不明である。例えば、いくつかの II 型細胞が比較的高い静止電位を持つ場合、Cx が自発的に開口し、そこから biocytin が取込まれた可能性がある。静止電位と biocytin 取り込みの関係を明らかにすることが、生理

的条件下のヘミチャネル開口の生理学的意義の解明につながるかもしれない。

または、味蕾細胞には複数種類のCxサブタイプのmRNAが確認されているため、20%には別のサブタイプが発現している可能性、ヘテロヘミチャネルを形成している可能性がある。Cxはサブタイプにより開口する電位依存性が異なることから、ヘテロヘミチャネルの電位依存性も異なることが予想できる。静止膜電位付近で開口可能なヘテロヘミチャネルが自発的に開口することで、biocytinを取込んだ可能性もある。Single-cell RT-PCRを用いることで、単一II型細胞に何種類のCxサブタイプが発現するのか明らかにすることで、この可能性について議論が可能と考える。

## 4-2 II型細胞におけるヘミチャネルの役割

電気生理学実験から、細胞外 Ca 感受性電流の活性化時定数が味情報伝達を行うのに十分早い(25 ms)ことを明らかにした。遠心性の刺激により Cx、CALHM の発現量の調節、つまり ATP 放出量の調整で、味応答に“修飾”を加えている可能性も考えられる。味神経から味蕾細胞へ放出される物質としては、glutamate が報告されている程度で (Vandenbeuch, Clapp, & Kinnamon, 2008)、まだ不明な点が多くあり、今後の研究が必要である。CALHM はノックアウト動物実験より、味情報伝達に必須の ATP 放出を行っていると考えられているが (Taruno, et al., 2013)、今回、機能的な発現が明らかとなった Cx(脱分極で開く Px 以外のヘミチャネル)の役割について次の節で考察した。

## 4-3 Cx(脱分極で開く Px 以外の)ヘミチャネルの役割

本研究で、脱分極により開口するヘミチャネルがII型細胞のすべてに機能的に発現していることを明らかにした。阻害剤を用いた取り込み実験の結果より、Px ではなく、Cx が機能的に発現していると考えるのが妥当である。Cx は他の組織において ATP を放出することが確認されている。例えば、II型細胞にも発現が確認されている、Cx26 (Nhieu, et al., 2003)、Cx30 (Essenfelder, et al., 2004)、Cx43 (Stout, Costantin, Naus, & Charles, 2002)は HeLa 細胞に発現させた場合、いずれも ATP を放出することが報告されている。味蕾では、ATP は CALHM から放出され味情報伝達がおこなわれていると考えられているため、Cx が味蕾内でどのような役割をしているのかについて考察した。

Cx は CALHM チャネルと非常によく似た性質をしており、特に CALHM チャネルが開く活動電位による脱分極条件で、同時に開いていることが強く推測される。II型細胞の約 30~40%では、Cx と CALHM チャネルが協調して働き、味情報伝達を調整している可能性がある。ATP 受容体である P2X<sub>2</sub>は味神経のみでなく、III型細胞にも発現している (Yang, Montoya, Bond, Walton, & Kinnamon, 2012)。同じく ATP 受容体で、P2X<sub>2</sub>と協調して働く P2X<sub>3</sub>も III型細胞に発現していると考えられている (Ishida, et al., 2009)。Cx から放出される ATP は味神経ではなく、III型細胞へ向けて傍分泌されているのかもしれない (図 49 ①)。II型細胞自身にも P2X 受容体が発現している (Hayato, Ohtubo, & Yoshii, 2007; Huang, et al., 2011)。Hayato らは、細胞外からの ATP 刺激により味蕾あたり平均 1 個の細胞が LY を取り込むことも報告している (ATP 刺激では平均 2 個の味蕾細

胞が LY を取り込み、ATP 刺激なしでも平均 1 個の味蕾細胞が取り込こんだことから、ATP 刺激での取り込みは平均 1 つと結論付けている)。さらに、細胞外からの ATP 刺激に対し濃度依存的に応答する細胞が増えた(1  $\mu$ M の ATP 刺激に対し、味蕾あたり平均 2 個の細胞で細胞内カルシウムが上昇、3 mM の ATP 刺激に対し、味蕾あたり平均 5 個の細胞で細胞内カルシウム上昇)と報告している。II 型細胞では細胞内カルシウム上昇は、脱分極を引き起こし、ATP をより放出する正のフィードバックである。しかし、Cx の開口確率だけでみれば、細胞内カルシウム濃度の上昇は負のフィードバックになる。細胞内カルシウムが上昇すると Cx は閉じることが分かっており、Cx 43 の IC<sub>50</sub> は 360 nM であると報告されている (Lurtz & Louis, 2007)。CALHM の開口確率に及ぼす細胞内カルシウム濃度の影響は調べられていない。Cx は CALHM と協調して働き、味受容体が検知したわずかな味物質の情報を増幅したり、ヘミチャネルのような大きなチャネルが開き続けるのを防ぐために、負のフィードバックをかけたりする役目があるのではないかと考えられる (図 49 ②)。

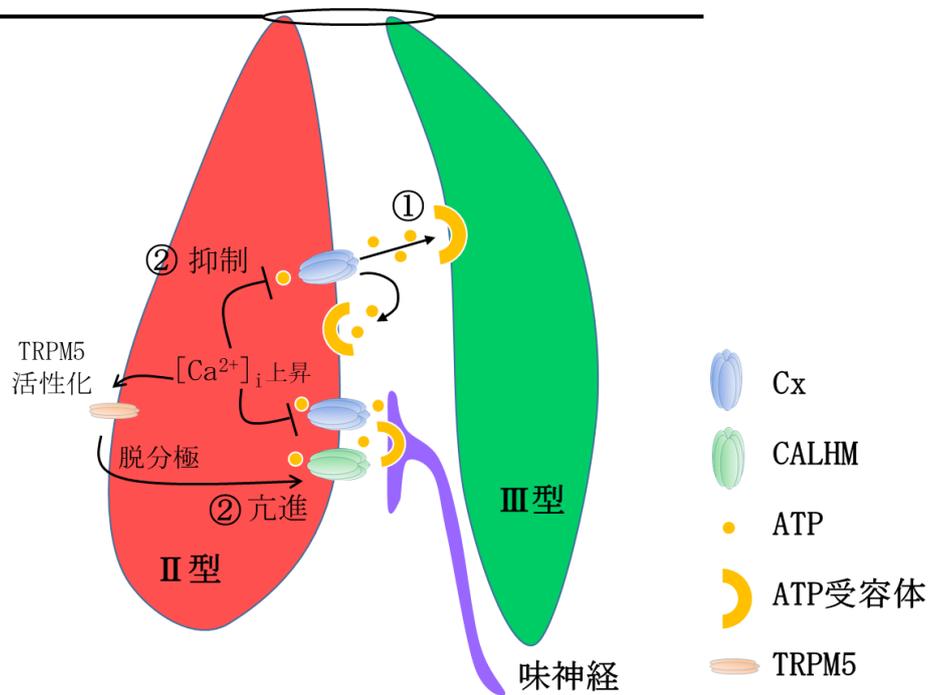


図 49 II 型細胞での Cx ヘミチャネルによる ATP 放出の調節

Normal 外液条件でも biocytin が取り込まれる II 型細胞が 20% 観察されたが、その II

型細胞に発現している Cx の役割について考察する。II 型細胞には、甘味受容体、旨味受容体、苦味受容体はそれぞれ独立に別々の II 型細胞に発現していることが報告されている (Zhang, et al., 2003; Zhao, et al., 2003; Mueller, et al., 2005; Angela L. Huang, et al., 2006; Yarmolinsky, Zuker, & Ryba, 2009; Lee, Macpherson, Parada, Zuker, & Ryba, 2017)。II 型細胞が甘味、旨味、苦味物質を受容した場合、その情報はどの味であっても ATP の放出により味神経へ伝達される。そのため、味情報を受取る味神経側で違いを認識する機構が必要となる。一部の例外を除いては、特定の味物質に応答する細胞は特定の味神経と結合していることが報告されている (Barretto, et al., 2015; Lee, Macpherson, Parada, Zuker, & Ryba, 2017) (図 50)。また、II 型細胞の半減期は約 8 日と入れ替わりが常に生じている (Perea-Martinez, Nagai, & Chaudhari, 2013)。そのため、新生した II 型細胞は、その細胞に発現する味物質受容体と同じ味質を伝える味神経と特異的な接続を形成しなければならない。生理的細胞外液環境下、つまり、 $5 \text{ mM } [K^+]_{\text{out}}$   $2 \text{ mM } [Ca^{2+}]_{\text{out}}$  においても 20% 程度の II 型細胞が biocytin を取り込んだことから (図 26、図 28)、これらの II 型細胞は ATP およびその他の低分子を自発的に放出している可能性がある。この自発的に放出される物質が味神経誘導にかかわっていると考えられる。例えば、アポトーシスを起こしている細胞は、ATP を放出し、phagocyte を引き寄せる Find-me シグナルを出している (Chekeni, et al., 2010)。特定の細胞と神経の結合は生体内では広く行われているが、そのメカニズムについて不明な点が多い。味物質を受容する細胞が絶えず新生している味蕾において、味情報の検出を安定しておこなうための分子機構の解明は、重要な研究テーマである。本研究で、自発的な物質放出が行われている可能性を示したことは、味神経誘導機構の研究への発展が期待できる。

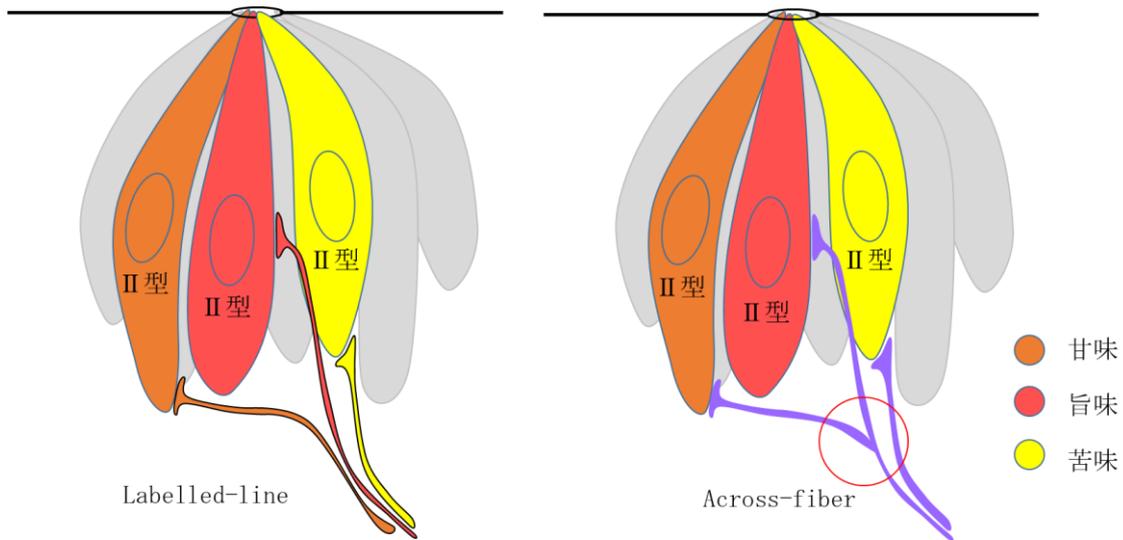


図 50 味蕾細胞と神経の関係 labelled-line 仮説と across-fiber 仮説

II型細胞にはそれぞれ別々の甘味、旨味、苦味受容体が発現していることが分かっている。味蕾細胞と神経の接続は、不特定の神経が味蕾細胞と結合している(右図、Across-fiber)のではなく、それぞれ特定の味神経が特定のII型細胞と結合していることが分かっている(左図、Labelled-line)。共通するATPという味情報から3つの味質を区別するためには、左に示したLabelled-lineのように、味神経側でも甘味、旨味、苦味それぞれに対応する神経が必要である。

#### 4-4 I型細胞(II型、III型マーカーで染色されない biocytin 取り込み細胞)の役割

BiocytinはII型およびIII型細胞以外にも、ごく一部の細胞で取込まれた。II型細胞マーカーであるPLC $\beta$ 2で染色されず他のII型細胞マーカー(IP $_3$ R3、gustducin、TRPM5)で染色される細胞がわずかにいる(Ohtubo & Yoshii, 2011)。今回観察されたPLC $\beta$ 2で染色されず、biocytinが取り込まれた細胞が他のII型細胞マーカーで染色される可能性について考察した。PLC $\beta$ 2で染色されず、他のII型細胞マーカーであるIP $_3$ R3で染色される細胞が1~3%存在する。II型細胞マーカーで染色されずかつbiocytinを取り込んだ細胞が1味蕾あたり1つ観察された。II型細胞は1味蕾あたり10個程度あることを考えると、PLC $\beta$ 2で染色されないII型細胞は10味蕾を観察して1~3個程度となる。このことから、今回観察されたbiocytinを取り込みかつPLC $\beta$ 2で染色されなかった細

胞は、他のⅡ型マーカーで染色される可能性は低く、タンパク質の発現による細胞型の分類からは、Ⅱ型以外にも biocytin が取り込まれたと考える。Ⅲ型細胞マーカーである SNAP-25 では染色されないことから、Ⅰ型もしくはⅣ型細胞であると考えられる。顕微観察からは、味孔まで細胞体が伸びていることが確認される細胞もあったため (図 36、図 37)、biocytin は、Ⅱ型細胞に加え、一部のⅠ型細胞にも取り込まれたと考える。

Ⅰ型細胞と考えた場合に、どのような役割があるのかを考察する。Ⅰ型細胞は、Ⅱ型やⅢ型細胞を取り囲むように発現し、glutamate を取り込む glutamate-aspartate transporter (GLAST) を発現しており、脳のグリア細胞や視細胞で同様の機構がみられるように、神経伝達物質の再取り込みを行っている支持細胞と考えられている (Lawton, Furness, Lindemann, & Hackney, 2000)。Ⅰ型細胞の別の役目として、Ⅲ型細胞の情報伝達を補佐する可能性を考えた。遺伝子操作によりⅡ型細胞を含まない味蕾を用いて、ATP の味情報伝達に関する研究がおこなわれた (Larson, Vandenbeuch, Anderson, & Kinnamon, 2020)。Ⅱ型細胞を発現しないマウスでも、酸味応答はワイルドタイプマウスと同程度であった。プリン受容体の阻害剤である AF353 を用いると酸味と塩味に対する応答をワイルドタイプと同様消失したことから、Ⅲ型細胞が酸味の味情報を伝達するのに ATP が必要と考えられるが、ATP を唯一放出すると考えられているⅡ型細胞が存在しないため、どこから ATP が放出されたのか分かっていない (図 51)。Romanov らは、センサー細胞を用いた実験でⅠ型、Ⅲ型細胞からの ATP 放出は検出されなかったと報告している (Romanov R. A., et al., 2007)。Ⅲ型細胞がセロトニンを小胞に包んで放出する際に ATP もその小胞に含まれて放出された可能性も Romanov らの結果からは否定される。今回筆者が観察した biocytin を取り込むⅠ型細胞が ATP の放出を担い、Ⅲ型細胞の酸味応答を支持する細胞ではないかと考えられる (図 51)。このⅠ型細胞は、1 味蕾あたり一つ程度と数が少ないが、Ⅲ型細胞も 1 味蕾あたり 1~2 個程度しか発現していないことを考えると、Ⅲ型細胞の近傍に特殊なⅠ型細胞が発現している可能性が考えられる。このⅠ型細胞は、細胞外カリウムやカルシウム濃度に依存せず、開孔した。どのようなチャネルが関与しているのか、またどのような刺激で開口するのは不明であるため、今後のさらなる研究が必要である。

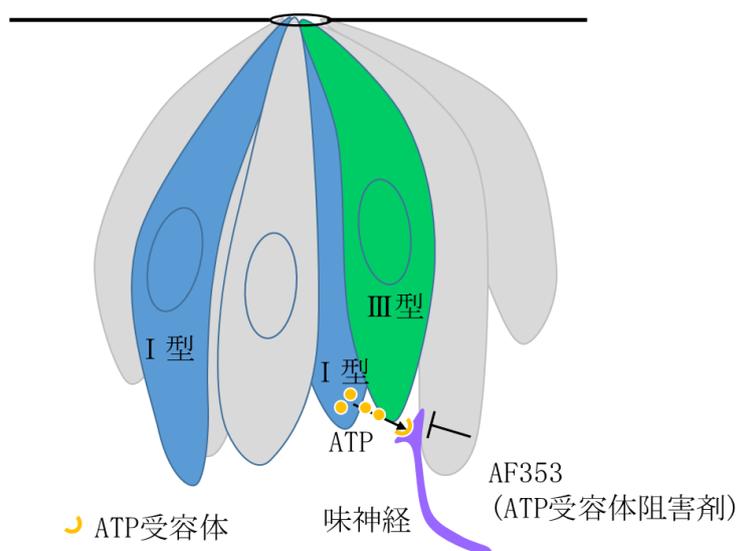


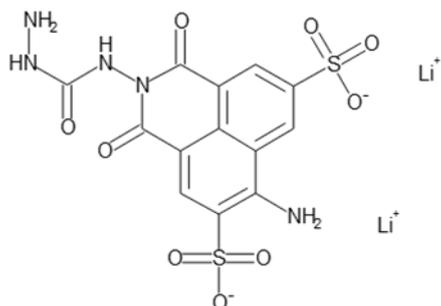
図 51 II型細胞をロックアウトした味蕾でのIII型細胞からの酸味応答

III型細胞における酸味の情報伝達には、セロトニンに加え、ATP が必須である。しかし、ATP を味蕾細胞で唯一放出することが確認されている II 型細胞をロックアウトしているため、ATP の供給源が不明となっている。本研究結果から、I 型細胞の一部に biocytin が取り込まれたと考えられ、その I 型細胞が ATP の供給源の可能性があると考えられる。

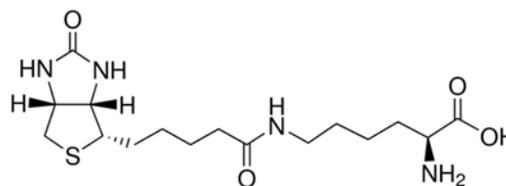
#### 4-5 ATP 以外で、ヘミチャネルから放出される低分子の可能性

負電荷の LY、中性電荷の biocytin、1 価の正電荷を持つ biotin 誘導体が味蕾細胞にヘミチャネルを通り取り込まれ(図 19、図 40)、一方、2 価の正電荷を持つ propidium iodide は取り込まれなかった(図 21、図 52)。また、一つの II 型味蕾細胞において、負電荷の LY と中性電荷の biocytin は同等程度取り込まれることが分かった(図 42)。味蕾細胞では、図 8 で示したように負電荷から正電荷の物質が細胞間、および細胞と神経の間での情報伝達に関与していることが明らかとなっている。中性電荷の adrenaline はどの型の味蕾細胞から放出されているか明らかとなっていない。また、acetylcholine は、II 型細胞から放出されることが分かっているがその機構については不明である。負電荷の LY が細胞外に放出されることが確認されたことから(図 39)、それらの物質がヘミチャネルを通り細胞外に放出されている可能性があるのではと考えられる。中性電荷、正電荷の物質が取り込まれるだけでなく、放出もされるのかの確認が今後の研究で必要である。特定の物質に応答するよう改変したセンサー細胞を用いる方法などが考えられる。例えば、センサー細胞として、細胞膜に ATP 受容体を発現させ、細胞外の ATP に対し、センサー細胞内のカルシウムが上昇することを利用し、II 型細胞からの ATP 放

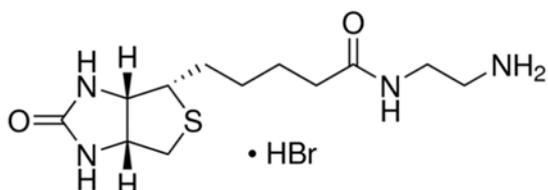
出を検出した手法が考えられる (Romanov R. A., et al., 2007)。Acetylcholine や adrenaline などそれぞれ応答する、同様のセンサー細胞を用いた研究などで II 型細胞から放出される ATP 以外の物質について明らかにできるのではないかと考えられる。



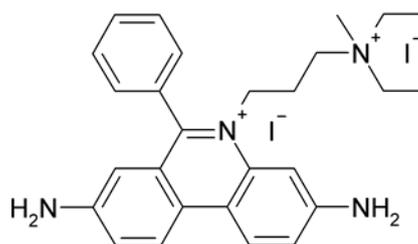
Lucifer Yellow  
(MW 444) **-2**



Biotin(MW 372) **±0**



Biotin ethylenediamine  
(MW 286) **+1**



Propidium iodide  
(MW 415) **+2**

図 52 取込み実験に用いた物質の構造式

Lucifer yellow、biotin、biotin ethylenediamine は味蕾細胞に取込まれた。Propidium iodide は取込まれなかった。赤字は、物質の電荷を表す。

## 第5章 結論

本研究により、30~40%のⅡ型細胞が CALHM チャンネルを、全てのⅡ型細胞が Px 以外の biocytin 透過性ヘミチャンネル (Cx の可能性が高い) を機能的に発現していることを明らかにした。また、約 20%のⅡ型細胞は、自発的に biocytin を取込んでいた。これらの結果は、Ⅱ型細胞は、ヘミチャンネルの発現の違いにより複数種類に分類可能であることを意味する。

Ⅱ型細胞が発現する味物質受容体は、細胞ごとに異なるが、細胞内のシグナル伝達経路は共通であると考えられていた。しかし、本結果で、シグナル伝達経路の最下流であるヘミチャンネルの発現の違いにより、Ⅱ型細胞をサブタイプに分類できることを示した。味受容体の発現とヘミチャンネル発現の関係解明は今後の課題だが、もし、特定の味質に特定のヘミチャンネルが発現している場合、遠心性の神経伝達物質により、ヘミチャンネルの開口、つまり ATP 放出が調節可能となる。末梢器官で、味の“修飾”が可能となる。味の修飾という観点で本研究の発展が期待できる。

生理的条件下での自発的なヘミチャンネルの開口は、各種伝達物質の放出を可能とする。味蕾細胞は絶えず新生細胞が生じる代謝が早い器官にも関わらず、安定した味情報伝達を可能としている。自発的な伝達物質の放出により、Ⅱ型細胞から味神経へ何らかの情報が送られることで、味蕾細胞は適切な味神経を誘導しているのかもしれない。神経誘導機構の観点からも本研究の発展が期待できる。

一部のⅠ型細胞にも自発的に開口するヘミチャンネルがあることを明らかにした。Ⅲ型細胞の酸味応答に必要な ATP の放出を担っている可能性も考えられるが、今後のさらなる研究が必要である。

本研究では、味蕾細胞のヘミチャンネルが、負電荷から1価の正電荷を持つ物質が透過できることも明らかにした。味蕾には、様々な神経伝物質の候補が存在する。ATP 以外の低分子がヘミチャンネルを介して味蕾細胞から放出されている可能性がある。

味蕾は細胞集団で機能する。ヘミチャンネルの違いによりⅡ型細胞に多様性があること、ヘミチャンネルが多様な低分子を放出可能であることなどから、多種多様な細胞が集まるのが、味の情報伝達に重要なかもしれない。単純な化学受容体だけなら、単一細胞でも、その機能を発現できる。本研究が、細胞集団における味覚受容機構解明の一助となることを期待する。

## 謝辞

本研究の計画段階から実験手法、実験結果の議論を何度も重ね、投稿論文の執筆、学位論文の執筆において多大なご指導をしていただいた九州工業大学 大学院 生命体工学科の大坪義孝准教授に大変感謝申し上げます。修士課程でご指導いただき、博士課程の1年目の指導教官をしてくださった退官された吉井教授に大変感謝申し上げます。予備審査会で多くの貴重なご助言をくださいました九州工業大学 大学院 生命体工学科 夏目季代久教授、立野勝巳准教授に大変感謝申し上げます。公聴会では、主査を務めていただいた夏目先生、また、審査を行っていただいた立野先生、大坪先生、および埼玉工業大学の熊澤隆教授に大変感謝申し上げます。

また、社会人学生であったため大学に行く機会が限られており、実験動物の管理や研究室の維持に十分貢献できない私に代わり行ってくださった高島さんはじめ大坪研究室の学生および動物実験室の管理をしていただいた伊藤さんに感謝申し上げます。

途中の休学も含め8年間の博士研究を通して、実験操作、記録、仮説の立て方、データの解釈の仕方、多くの同分野の過去の研究結果を踏まえた自身の研究結果の解釈と表現方法など科学研究に対する知識と考えがより深まったと感じています。今後の仕事での活用にとどまらず、人生を通して活用できる大切なものを学ぶことができたと思います。

最後に、何とか仕事の合間にも、本研究を行う時間が取れたことに対して妻に感謝しています。

## 参考文献

- Aasen, T., Leithe, E., Graham, S. V., Kameritsch, P., Mayán, M. D., Mesnil, M., et al. (2019). *Connexins in cancer: bridging the gap to the clinic*. *Oncogene*: 38, 4429-4451.
- Abreu, R. d., Penalva, L. O., Marcotte, E. M., & Vogel, C. (2009). *Global signatures of protein and mRNA expression levels*. *Mol. Biosyst.*: 5, 1512-1526.
- Abudara, V., Bechberger, J., Freitas-Andrade, M., Bock, M. D., Wang, N., Bultynck, G., et al. (2014). *The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes*. *Front. Cell Neurosci.*: 8, 306.
- Ahmad, S., & Evans, W. H. (2002). *Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions*. *Biochem. J.*: 365, 693-699.
- Ambrosi, C., Gassmann, O., Pranskevich, J. N., Boassa, D., Smock, A., et al. (2010). *Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other*. *J. Biol. Chem.*: 285, 24420-24431.
- Angela L. Huang, X. C., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). *The cells and logic for mammalian sour taste detection*. *Nature*: 442, 934-938.
- Bao, L., Locovei, S., & Dahl, G. (2004). *Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP*. *FEBS Lett.*: 572, 65-68.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., et al. (2004). *The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins*. *Genomics*: 83, 706-716.
- Barretto, R. P., Gillis-Smith, S., Chandrashekar, J., Yarmolinsky, D. A., Schnitzer, M. J., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2015). *The neural representation of taste quality at the periphery*. *Nature*: 517, 373-376.
- Bartel, D. L., Sullivan, S. L., Lavoie, E. G., Sévigny, J., & Finger, T. E. (2006). *Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds*. *J. Comp. Neurol.*: 497, 1-12.
- Baryshnikov, S. G., Rogachevskaja, O. A., & Kolesnikov, S. S. (2003). *Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells*. *J. Neurophysiol.*: 90, 3283-3294.
- Beblo, D. A., & Veenstra, R. D. (1997). *Monovalent cation permeation through the*

- connexin40 gap junction channel. Cs, Rb, K, Na, Li, TEA, TMA, TBA, and effects of anions Br, Cl, F, acetate, aspartate, glutamate, and NO3.* J. Gen. Physiol.: 109, 509-522.
- Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I., Ford, A., & Burnstock, G. (1999). *Localization of ATP-gated P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor immunoreactive nerves in rat taste buds.* Neuroreport: 10(5):1107-1111.
- Boitano, S., & Evans, W. H. (2000). *Connexin mimetic peptides reversibly inhibit Ca<sup>2+</sup> signaling through gap junctions in airway cells.* Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.: 279, 623-630.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S. G., Barbe, M. T., Herb, A., & Monyer, a. H. (2003). *Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain.* PNAS: 100, 13644-13649.
- Bruzzone, S., Guida, L., Zocchi, E., Franco, L., & Flora, A. D. (2001). *Connexin 43 hemichannels mediate Ca<sup>2+</sup>-regulated transmembrane NAD<sup>+</sup> fluxes in intact cells.* FASEB J.: 15, 10-12.
- Bystrova, M. F., Yatzenko, Y. E., Fedorov, I. V., Rogachevskaja, O. A., & Kolesnikov, S. S. (2006). *P2Y isoforms operative in mouse taste cells.* Cell Tissue Res.: 323, 377-382.
- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2010). *The cells and peripheral representation of sodium taste in mice.* Nature: 464, 297-301.
- Chang, R. B., Waters, H., & Liman, E. R. (2010). *A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells.* PNAS: 107, 22320-22325.
- Chekeni, F. B., Elliott, M. R., Sandilos, J. K., Walk, S. F., Kinchen, J. M., Lazarowski, E. R., et al. (2010). *Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis.* Nature: 467, 863-867.
- Chiu, Y.-H., Ravichandran, K. S., & Bayliss, D. A. (2014). *Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel.* Channels: 8, 103-109.
- Choi, W., Clemente, N., Du, W. S., & Lü, a. W. (2019). *The structures and gating mechanism of human calcium homeostasis modulator 2.* Nature: 576, 163-167.
- Clapp, T. R., Yang, R., Stoick, C. L., Kinnamon, S. C., & Kinnamon, J. C. (2004). *Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway.* J. Comp. Neurol.: 468, 311-321.
- Contreras, J. E., Sáez, J. C., Bukauskas, F. F., & Bennett, M. V. (2003). *Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels.* PNAS: 100, 11388-11393.

- Dreses-Werringloer, U., Lambert, J.-C., Vingtdeux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., et al. (2008). *A polymorphism in CALHM1 influences Ca<sup>2+</sup> homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk*. *Cell*: 133, 1149-1161.
- Dreses-Werringloer, U., Vingtdeux, V., Zhao, H., Chandakkar, P., Davies, P., & Marambaud, P. (2013). *CALHM1 controls the Ca<sup>2+</sup>-dependent MEK, ERK, RSK and MSK signaling cascade in neurons*. *J. Cell Sci.*: 126, 1199-1206.
- Essenfelder, G. M., Bruzzone, R., Lamartine, J., Charollais, A., Blanchet-Bardon, C., Barbe, M. T., . . . Waksman, G. (2004). *Connexin30 mutations responsible for hidrotic ectodermal dysplasia cause abnormal hemichannel activity*. *Hum. Mol. Genet.*: 13, 1703-1714.
- Fabien, V. A., Gabriel, B., Dmitri, G., Benjamin, B., Yuri, V. P., et al. (2006). *Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1*. *J. Cell Biol.*: 174, 535-546.
- Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L., Vigers, A. J., Stone, L., et al. (2005). *ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves*. *Science*: 310, 1495-1499.
- Furue, H., & Yoshii, K. (1997). *In situ tight-seal recordings of taste substance-elicited action currents and voltage-gated Ba currents from single taste bud cells in the peeled epithelium of mouse tongue*. *Brain Res.*: 776, 133-139.
- Furue, H., & Yoshii, K. (1998). *A method for in-situ tight-seal recordings from single taste bud cells of mice*. *J. Neurosci. Methods*: 84, 109-114.
- Hansen, D. B., Ye, Z.-C., Calloe, K., Braunstein, T. H., Hofgaard, J. P., et al. (2014). *Activation, Permeability, and Inhibition of Astrocytic and Neuronal Large Pore (Hemi)channels*. *J. Biol. Chem.*: 289, 26058-26073.
- Hawat, G., Benderdour, M., Rousseau, G., & Baroudi, G. (2010). *Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury*. *Pflugers Arch*: 460, 583-92.
- Hayato, R., Ohtubo, Y., & Yoshii, K. (2007). *Functional expression of ionotropic purinergic receptors on mouse taste bud cells*. *J. Physiol.*: 584, 473-488.
- Herness, S., Zhao, F.-l., Kaya, N., Lu, S.-g., Shen, T., & Sun, X.-D. (2002). *Adrenergic signalling between rat taste receptor cells*. *J. Physiol.*: 543, 601-614.
- Herness, S., Zhao, F.-L., Lu, S.-g., Kaya, N., & Shen, T. (2002). *Expression and physiological actions of cholecystinin in rat taste receptor cells*. *J. Neurosci.*: 22, 10018-10029.

- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (1999). *Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity*. *Cell*: 96, 541-551.
- Huang, Y. A., Dando, R., & Roper, S. D. (2009). *Autocrine and Paracrine Roles for ATP and Serotonin in Mouse Taste Buds*. *J. Neurosci.*: 29, 13909-13918.
- Huang, Y. A., Maruyama, Y., & Roper, S. D. (2008). *Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds*. *J. Neurosci.*: 28, 13088-13093.
- Huang, Y. A., Pereira, E., & Roper, S. D. (2011). *Acid Stimulation (Sour Taste) Elicits GABA and Serotonin Release from Mouse Taste Cells*. *PLoS One*: 6, 25471.
- Huang, Y. A., Stone, L. M., Pereira, E., Yang, R., Kinnamon, J. C., Dvoryanchikov, G., et al. (2011). *Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds*. *J. Neurosci.*: 31, 13654-13661.
- Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2007). *The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds*. *PNAS*: 104, 6436-6441.
- Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Lu, K.-S., Pereira, E., Plonsky, I., Baur, J. E., et al. (2005). *Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter*. *J. Neurosci.*: 25, 843-847.
- Ishida, Y., Ugawa, S., Ueda, T., Yamada, T., Shibata, Y., & Hondoh, &. (2009). *P2X<sub>2</sub><sup>-</sup> and P2X<sub>3</sub><sup>-</sup> positive fibers in fungiform papillae originate from the chorda tympani but not the trigeminal nerve in rats and mice*. *J. Comp. Neurol.*: 514, 131-144.
- Ishikawa, M., Iwamoto, T., Nakamura, T., Doyle, A., Fukumoto, S., & Yamada, Y. (2011). *Pannexin 3 functions as an ER Ca<sup>2+</sup> channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation*. *J. Cell Biol.*: 193, 1257-1274.
- Iwamoto, M., Takashima, M., & Ohtubo, Y. (2020). *A subset of taste receptor cells express biocytin-permeable*. *Eur. J. Neurosci.*: 51, 1605-1623.
- Kashio, M., Wei-qi, G., Ohsaki, Y., Kido, M. A., & Taruno, A. (2019). *CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral membrane of epithelial cells including taste cells*. *Scientific Reports*: 9, 2681.
- Kataoka, S., Toyono, T., Seta, Y., Ogura, T., & Toyoshima, K. (2004). *Expression of P2Y<sub>1</sub> receptors in rat taste buds*. *Histochem. Cell Biol.*: 121, 419-426.
- Kaya, N., Shen, T., Lu, S.-G., Zhao, F.-L., & Herness, S. (2004). *A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*: 286, 649-658.

- Kim, Y. V., Bobkov, Y. V., & Kolesnikov, S. S. (2000). *Adenosine triphosphate mobilizes cytosolic calcium and modulates ionic currents in mouse taste receptor cells*. *Neurosci. Lett.*: 290, 165-168.
- Kimura, K., Ohtubo, Y., Tateno, K., Takeuchi, K., Kumazawa, T., & Yoshii, K. (2014). *Cell-type-dependent action potentials and voltage-gated currents in mouse fungiform taste buds*. *Eur. J. Neurosci.*: 39, 24-34.
- Laird, D. W. (2006). *Life cycle of connexins in health and disease*. *Biochem. J.*: 394, 527-543.
- Larson, E. D., Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., & Kinnamon, S. C. (2020). *Function, Innervation, and Neurotransmitter Signaling in Mice Lacking Type-II Taste Cells*. *eNeuro*: 7(1).
- Larson, E. D., Vandenbeuch, A., Voigt, A., Meyerhof, W., Kinnamon, S. C., & Finger, T. E. (2015). *The Role of 5-HT<sub>3</sub> Receptors in Signaling from Taste Buds to Nerves*. *J. Neurosci.*: 35, 15984-15995.
- Lawton, D. M., Furness, D. N., Lindemann, B., & Hackney, C. M. (2000). *Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds*. *Eur. J. Neurosci.*: 12, 3163-3171.
- Lee, H., Macpherson, L. J., Parada, C. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. (2017). *Rewiring the taste system*. *Nature*: 548, 330-333.
- Lewandowski, B. C., Sukumaran, S. K., Margolskee, R. F., & Bachmanov, A. A. (2016). *Amiloride-Insensitive Salt Taste Is Mediated by Two Populations of Type III Taste Cells with Distinct Transduction Mechanisms*. *J. Neurosci.*: 36, 1942-1953.
- Liu, H.-T., Toychiev, A. H., Takahashi, N., Sabirov, R. Z., & Okada, Y. (2008). *Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture*. *Cell Res.*: 18, 558-565. .
- Liu, X., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Ding, C., & Rakic, P. (2010). *Gap Junctions/Hemichannels Modulate Interkinetic Nuclear Migration in the Forebrain Precursors*. *J. Neurosci.*: 30, 4197-4209.
- Lossow, K., Hermans-Borgmeyer, I., Meyerhof, W., & Behrens, M. (2020). *Segregated Expression of ENaC Subunits in Taste Cells*. *Chem Senses.*: 45, 235-248.
- Lurtz, M. M., & Louis, a. C. (2007). *Intracellular calcium regulation of connexin43*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*: 293, 1806-1813.
- Ma, W., Hui, H., Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2009). *Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*:

328,409-18.

- Ma, Z., Siebert, A. P., Cheung, K.-H., Lee, R. J., Johnson, B., Cohen, A. S., et al. (2012). *Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) is the pore-forming subunit of an ion channel that mediates extracellular Ca<sup>2+</sup> regulation of neuronal excitability*. PNAS: 109, 1963-1971.
- Ma, Z., Taruno, A., Ohmoto, M., Jyotaki, M., Lim, J. C., Miyazaki, H., et al. (2018). *CALHM3 Is Essential for RapidIon Channel-Mediated PurinergicNeurotransmission of GPCR-Mediated Tastes*. Neuron: 98, 547-561.
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., & Tsukihara, T. (2009). *Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution*. Nature: 458, 597-602.
- Miura, H., Kato, H., Kusakabe, Y., Tagami, M., Miura-Ohnuma, J., Ninomiya, Y., & Hino, A. (2004). *A strong nerve dependence of sonic hedgehog expression in basal cells in mouse taste bud and an autonomous transcriptional control of genes in differentiated taste cells*. Chem. Senses: 29, 823-831.
- Miura, H., Scott, J. K., Harada, S., & Barlow, L. A. (2014). *Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells*. Dev. Dyn.: 243, 1286-1297.
- Moyer, B. D., Hevezi, P., Gao, N., Lu, M., Kalabat, D., Soto, H., et al. (2009). *Expression of genes encoding multi-transmembrane proteins in specific primate taste cell populations*. PLoS One: 4(12).
- Mueller, K. L., Hoon, M. A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. (2005). *The receptors and coding logic for bitter taste*. Nature: 434, 225-229.
- Murali, S., Zhang, M., & Nurse, C. A. (2014). *Angiotensin II mobilizes intracellular calcium and activates pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells via AT1 receptors*. J. Physiol.: 592, 4747-4762.
- Murata, Y., Yasuo, T., Yoshida, R., Obata, K., Yanagawa, Y., Margolskee, R. F., & Ninomiya, Y. (2010). *Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels*. J. Neurophysiol.: 104, 896-901.
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). *Mammalian sweet taste receptors*. Cell: 106, 381-390.
- Nhieu, G. T., Clair, C., Bruzzone, R., Mesnil, M., Sansonetti, P., & Combettes, L. (2003). *Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of Shigella in epithelial cells*. Nat. Cell Biol.: 5, 720-726.

- Nomura, K., Nakanishi, M., Ishidate, F., Iwata, K., & Taruno, A. (2020). *All-Electrical Ca<sup>2+</sup>-Independent Signal Transduction Mediates Attractive Sodium Taste in Taste Buds*. *Neuron*: 106, 816-829.
- Ogata, T., & Ohtubo, Y. (2020). *Quantitative Analysis of Taste Bud Cell Numbers in the Circumvallate and Foliate Taste Buds of Mice*. *Chem. Senses*: 45, 261-273.
- Ogawa, K. (1987). *Comparative morphological studies on surface ultrastructures of taste buds in the vertebrates*. *日耳鼻*: 90, 240-257.
- Ogura, T. (2002). *Acetylcholine increases intracellular Ca<sup>2+</sup> in taste cells via activation of muscarinic receptors*. *J. Neurophysiol.*: 87, 2643-2649.
- Oh, S., Ri, Y., Bennett, M. V., Trexler, E. B., Verselis, V. K., & Bargiello, T. A. (1997). *Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease*. *Neuron*: 19, 927-938.
- Ohtubo, Y., & Yoshii, K. (2011). *Quantitative analysis of taste bud cell numbers in fungiform and soft palate taste buds of mice*. *Brain Res.*: 1367, 13-21.
- Ohtubo, Y., Iwamoto, M., & Yoshii, K. (2012). *Subtype-dependent postnatal development of taste receptor cells in mouse fungiform taste buds*. *Eur. J. Neurosci.*: 35, 1661-1671.
- Okada, Y., Okada, T., Islam, M. R., & Sabirov, R. Z. (2018). *Molecular Identities and ATP Release Activities of Two Types of Volume-Regulatory Anion Channels, VSOR and Maxi-Cl*. *Curr. Top. Membr.*: 81, 125-176.
- Panchina, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N., & Lukyanov, S. (2000). *A ubiquitous family of putative gap junction molecules*. *Curr Biol.*: 10, 473-474.
- Paran, N., Mattern, C. F., & Henkin, R. I. (1975). *Ultrastructure of the taste bud of the human fungiform papilla*. *Cell and Tissue Research*: 161, 1-10.
- Patel, D., Zhang, X., & Veenstra, a. R. (2014). *Connexin hemichannel and pannexin channel electrophysiology: How do they differ?* *FEBS Lett.*: 588, 1372-1378.
- Pelegri, P., & Surprenant, A. (2006). *Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X<sub>7</sub> receptor*. *EMBO J.*: 25, 5071-5082.
- Penuela, S., Bhalla, R., Gong, X.-Q., Cowan, K. N., Celetti, S. J., et al. (2007). *Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins*. *J. Cell Sci.*: 120, 3772-3783.
- Perea-Martinez, I., Nagai, T., & Chaudhari, N. (2013). *Functional Cell Types in Taste*

- Buds Have Distinct Longevities*. PLoS One.: 8, 5339.
- Pérez, C. A., Margolskee, R. F., Kinnamon, S. C., & Ogura, T. (2003). *Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells*. Cell Calcium: 33, 541-549.
- Poon, I. K., Chiu, Y.-H., Armstrong, A. J., Kinchen, J. M., Juncadella, I. J., Bayliss, D. A., & Ravichandran, K. S. (2014). *Unexpected link between an antibiotic, pannexin channels and apoptosis*. Nature: 507, 329-334.
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., & Penner, R. (2003). *TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>*. PNAS: 100, 15166-15171.
- Rana, S., & Dringen, R. (2007). *Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes*. Neurosci. Lett.: 415, 45-48.
- Reikvam, H., Rynningen, A., Sæterdal, L. R., Nepstad, I., Foss, B., & Bruserud, Ø. (2015). *Connexin expression in human acute myeloid leukemia cells: identification of patient subsets based on protein and global gene expression profiles*. Int. J. Mol. Med.: 35, 645-652.
- Retamal, M. A., Froger, N., Palacios-Prado, N., Ezan, P., Sáez, P. J., Sáez, J. C., & Giaume, C. (2007). *Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia*. J. Neurosci.: 27, 13781-13792.
- Romanov, R. A., Lasher, R. S., High, B., Savidge, L. E., Lawson, A., Rogachevskaja, O. A., et al. (2018). *Chemical synapses without synaptic vesicles: Purinergic neurotransmission through a CALHM1 channel-mitochondrial signaling complex*. Sci. Signal: 11, 1815.
- Romanov, R. A., Rogachevskaja, O. A., Bystrova, M. F., Jiang, P., Margolskee, R. F., & Kolesnikov, S. S. (2007). *Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells*. EMBO J.: 26, 657-667.
- Romanov, R. A., Rogachevskaja, O. A., Khokhlov, A. A., & Kolesnikov, S. S. (2008). *Voltage Dependence of ATP Secretion in Mammalian Taste Cells*. J. Gen. Physiol.: 132, 731-744.
- Rong, W., & Spyer, G. B. (2000). *P2X purinoceptor-mediated excitation of trigeminal lingual nerve terminals in an in vitro intra-arterially perfused rat tongue preparation*. J. Physiol.: 524, 891-902.
- Royer, S. M., & Kinnamon, J. C. (1988). *Ultrastructure of mouse foliate taste buds:*

- Synaptic and nonsynaptic interactions between taste cells and nerve fibers.* J. Comp. Neurol.: 270, 11-24.
- Sabirov, R. Z., & Okada, Y. (2004). *ATP-conducting maxi-anion channel: a new player in stress-sensory transduction.* Jpn. J. Physiol: 54, 7-14.
- Sáez, J. C., Retamal, M. A., Basilio, D., Bukauskas, F. F., & Bennettb, M. V. (2005). *Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms.* Biochim. Biophys. Acta.: 1711, 215-224.
- Sahu, G., Sukumaran, S., & Beraa, A. K. (2014). *Pannexins form gap junctions with electrophysiological and pharmacological properties distinct from connexins.* Sci. Rep.: 4, 4955.
- Siebert, A. P., Ma, Z., Grevet, J. D., Demuro, A., Parker, I., & Foskett, J. K. (2013). *Structural and Functional Similarities of Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) Ion Channel with Connexins, Pannexins, and Innexins.* J. Biol. Chem.: 288, 6140-6153.
- Sosinsky, G. E., Boassa, D., Dermietzel, R., Duffy, H. S., Laird, D. W., et al. (2011). *Pannexin channels are not gap junction hemichannels.* Channels: 5, 193-197.
- Srinivas, M., Calderon, D. P., Kronengold, J., & Verselis, V. K. (2006). *Regulation of connexin hemichannels by monovalent cations.* J. Gen. Physiol.: 127, 67-75.
- Stout, C. E., Costantin, J. L., Naus, C. C., & Charles, A. C. (2002). *Intercellular Calcium Signaling in Astrocytes via ATP Release through Connexin Hemichannels.* J. Biol. Chem.: 277, 10482-10488.
- Takeuchi, K., Seto, Y., Ohtubo, Y., & Yoshii, K. (2011). *Dye-permeable, voltage-gated channel on mouse fungiform taste bud cells.* Brain Res.: 1373, 17-24.
- Taruno, A., Vingtdoux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., et al. (2013). *CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes.* Nature: 495, 223-226.
- Teng, B., Wilson, C. E., Tu, Y.-H., Joshi, N. R., Kinnamon, S. C., & Liman, E. R. (2019). *Cellular and Neural Responses to Sour Stimuli Require the Proton Channel Otop1.* Curr. Biol.: 29, 3647-3656.
- Valiunas, V. (2002). *Biophysical Properties of Connexin-45 Gap Junction Hemichannels Studied in Vertebrate Cells.* J. Gen. Physiol.: 119, 147-164.
- Valiunas, V. (2013). *Cyclic nucleotide permeability through unopposed connexin hemichannels.* Front. Pharmacol.: 4, 75.

- Vandenbeuch, A., & Kinnamon, S. C. (2016). *Glutamate: Tastant and Neuromodulator in Taste Buds*. *Adv. Nutr.*: 7, 823-827.
- Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., & Kinnamon, S. C. (2015). *Mice Lacking Pannexin 1 Release ATP and Respond Normally to All Taste Qualities*. *Chem. Senses*: 40, 461-467.
- Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., & Kinnamon, S. C. (2008). *Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse*. *BMC Neurosci.*: 9, 1.
- Wang, B. S., Chen, Y. J., Liu, S.-H., & Lin-Shiau, S. Y. (2000). *An increase in free radical production by means of an anion channel blocker DIDS in mouse peritoneal neutrophils*. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B*: 24, 178-186.
- Wang, H.-Z., & Veenstra, R. D. (1997). *Monovalent Ion Selectivity Sequences of the Rat Connexin43 Gap Junction Channel*. *J. Gen. Physiol.*: 109, 491-507.
- Wang, N., Bock, M. D., Antoons, G., Gadicherla, A. K., Bol, M., Decrock, E., et al. (2012). *Connexin mimetic peptides inhibit Cx43 hemichannel opening triggered by voltage and intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation*. *Basic Res. Cardiol.*: 107, 304.
- Wang, N., Vuyst, E. D., Ponsaerts, R., Boengler, K., Palacios-Prado, N., Wauman, J., et al. (2013). *Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Basic Res. Cardiol.*: 108, 309.
- Willebrords, J., Yanguas, S. C., Maes, M., Decrock, E., Wang, N., et al. (2016). *Connexins and their channels in inflammation*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*: 51, 413-439.
- Yang, R., Dzowo, Y. K., Wilson, C. E., Russell, R. L., Kidd, G. J., et al. (2020). *Three-dimensional reconstructions of mouse circumvallate taste buds using serial blockface scanning electron microscopy: I. Cell types and the apical region of the taste bud*. *J. Comp. Neurol.*: 528, 756-771.
- Yang, R., Montoya, A., Bond, A., Walton, J., & Kinnamon, J. C. (2012). *Immunocytochemical analysis of P2X<sub>2</sub> in rat circumvallate taste buds*. *BMC Neurosci.*: 13, 51.
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. (2009). *Common sense about taste: from mammals to insects*. *Cell*: 139, 234-244.
- Zhang, J., Jin, H., Zhang, W., Ding, C., O'Keeffe, S., Ye, M., & S.Zuker, C. (2019). *Sour Sensing from the Tongue to the Brain*. *Cell*: 179, 392-402.
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., et al. (2003). *Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways*. *Cell*: 112, 293-301.

Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2003). *The receptors for mammalian sweet and umami taste*. *Cell*: 115, 255-266.