

**High salt recruits aversive taste pathways.**Okamoto Y<sup>1</sup>, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJ, Zuker CS.**抄録**

舌では、味覚受容細胞の異なるクラスが5つの基本的な味（甘味、酸味、苦味、ナトリウム塩およびうま味）を検出する。これらの性質の中でも、苦味と酸味の刺激は本質的に嫌悪であるのに対し、甘味とうま味は食欲を増進し、動物には魅力的なものである。塩味は独特の性質を持ち、濃度が増すと、魅力的な刺激は強力で嫌悪感のあるものになる。この「食欲—嫌悪」のバランスは、適切な塩消費の維持に役立ち、そして液体と電解質の恒常性の重要な部分を表す。我々は、NaClに対する食欲応答が、上皮性ナトリウムチャンネル ENaC を発現する味覚受容体細胞によって媒介されることを以前に示したが、塩嫌悪に対する細胞基質は未知であった。ここでは、高濃度の塩を拒絶することにつながる細胞および分子の基礎を調べる。高塩が酸味と苦味を感知する細胞を活性化することによって、2つの主要な嫌悪的な味の経路を動員することを示す。我々はまた、これらの経路の遺伝子サイレンシングが、塩の魅力を増やさず、濃い塩への嫌悪行動を廃止することを示す。注目すべきことに、塩嫌悪経路を欠くマウスは、非常に高濃度の NaCl にも、妨げられずに連続的に誘引される。酸味と苦味の神経経路の「共同選択」は、高レベルの塩が確実に強固な拒絶反応をトリガーし、健康への潜在的に有害な影響を防止することを保証する手段として進化した。

**本文** ナトリウムは必須イオンであり、動物は味覚システムの顕著な検出器を含む、塩感知システムを進化させてきた。哺乳類の塩味は、2つの相反する行動反応を引き起こす可能性がある。低濃度の塩（100mM 未満の NaCl、「低塩」とする）は概して魅力的であり、誘発性行動を誘発するが、高濃度の塩（「高塩」とする）は嫌悪的であり、強い拒絶反応（行動）を引き起こす。特に、魅力的な塩経路はナトリウムに対して選択的に応答する。一方で、嫌悪な塩経路は広範な塩類の非選択的検出器として機能する。

長年にわたり、利尿薬アミロライドの ENaC（上皮性ナトリウムチャンネル、SCNN1 としても知られている）の感受性は、ENaC 機能をブロックし、塩経路が食欲と嫌悪のどちらであるかを区別する強力な手段として用いられている。我々は、高塩感受性経路のための（アミロライドと）同等の薬理学的ブロッカーを同定することができれば、高塩分の味の細胞学の基礎を解明する貴重なツールを提供するものと考えた。

**サマリー（私的）**

- マウスの塩味に対する応答には2種ある：低塩（ナトリウム塩に特異的、3mM〜応答あり）に対する誘因性の応答&高塩（ナトリウムやカリウム塩など多種非特異的、150mM〜応答）に対する忌避性の応答
- 低塩による誘因経路：上皮性ナトリウムチャンネル依存性 →アミロライドが阻害剤

本研究の目的：高塩による忌避経路の阻害剤を見つけること

**I. 苦味細胞に受容される経路の発見、阻害剤 AITC の発見：（図1、図2、補足図4）**

●高塩による忌避経路は AITC で阻害される。

アリルイソチオシアネート（AITC）で舌を処理すると、上記誘因経路に影響を与えずに高塩応答だけを低下させることを発見（図1）。でも最大で50%までしか阻害しない（図2）。

→AITC 非感受性の他の経路が存在する。（高塩の受容は1経路ではないことが分かった。）

●AITC 感受性の高塩応答は苦味細胞により受容される。

- AITC は苦味応答を完全抑制した

→つまり、高塩と苦味の両方の応答を阻害した→同一の苦味細胞による受容されているのでは

- 苦味シグナル伝達のための重要なタンパク質 TRPM5 チャンネルと PLC b 2 を欠損させたマウスを用いて検証

- 高塩応答は野生型に比べ有意に低下した。残った応答は AITC 非感受性であった。
- PLC b2 欠損マウスの苦味細胞にのみ PLC b2 を発現させ機能を復元させると、両応答も回復(図 2)。
- カルシウムイメージングで、単一細胞レベルで味蕾における味応答を可視化。: GFP により標識された苦味受容体を発現した味細胞は苦味物質と高塩の両方により活性化された(補足図 4)。

## II. 残る経路：酸味受容細胞による経路の発見 (図 3、補足図 5)

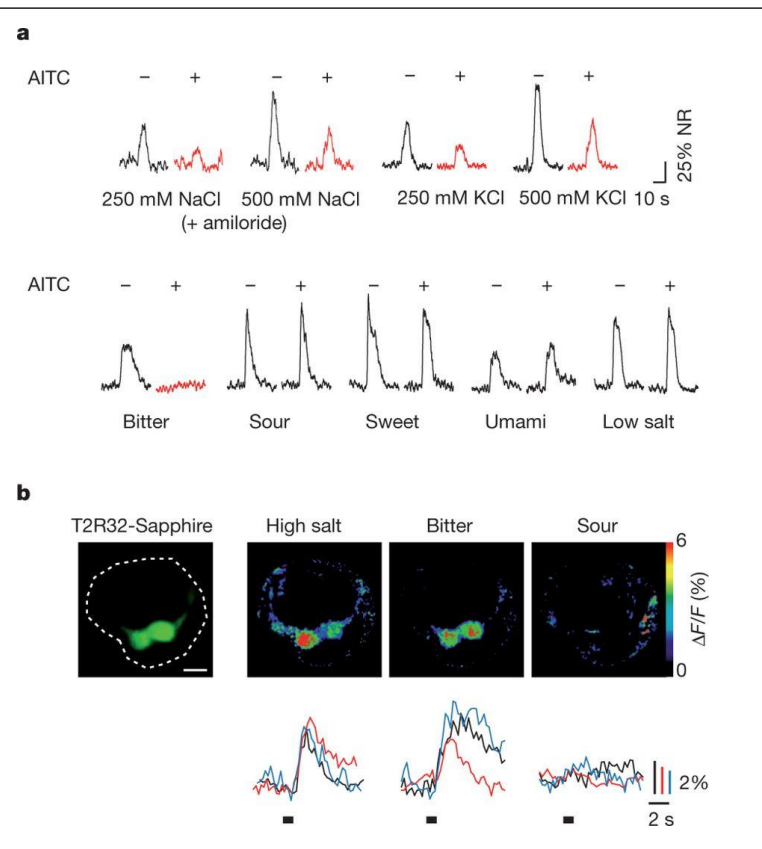
- 苦味の味覚経路を欠失したマウスは苦味に対する忌避行動を示さないが、依然として高塩への嫌悪を示した。→酸味受容に関わる経路か？
- 酸味細胞に神経毒素である破傷風毒素  $\alpha$  サブユニットを特異的に発現させ、神経伝達を不活性化させたマウスで高塩応答をみた。→酸味応答の消失+高塩応答の低下あり、応答分は AITC 処理で完全に抑制された。

## III. 上記 2 つの変化が個体レベルでの塩応答に及ぼす影響を嗜好性試験で検証した。(図 4、補足図 6・7)

- 苦味の経路と酸味の経路を両方欠失させたマウスでは、低塩応答には影響せず高塩への応答が完全に消失した。
- 野生型マウスは脱水状態で水への強い摂取行動あり→高塩への嗜好性は有意に低下
- 両経路のノックアウトマウスでは高塩への嗜好性は水同様
- 一つの経路のみのノックアウトでは、高塩への忌避を示し、野生型と同程度の高塩への嗜好性の低下あり。(つまり、片方が残っていれば安全ということ)

## I. 苦味細胞に受容される経路の発見、阻害剤 AITC の発見

イオンチャネル機能に影響を及ぼすことが知られている種々の化合物(補足表 1)の存在下/非存在下で鼓索神経の味応答を記録し、マスタード油の成分であるアリルイソチオシアネート(AITC)は、低濃度の NaCl に対する応答に影響を与えずに、高濃度の NaCl に対する応答を有意に抑制した(図 1a、上図)。高塩経路を選択的に活性化する KCl については、同一の抑制が観察された(図 1a および補足図 1)。興味深いことに、AITC は他の味覚に有意な影響を及ぼさずに苦味刺激に対する反応も阻害した(図 1a、下図、補足図 2)。これらの結果は、苦味に対する味覚受容細胞(TRC)が AITC の標的であり、高塩感知経路の構成要素であることを示唆した。したがって次に、苦味感知細胞が高塩刺激によって活性化されるか否かをみた→(図 1b、補足図 4)。



**図 1：苦味受容細胞は高塩の味応答を媒介する**

AITC は、苦味および高塩味の応答の選択的阻害剤として作用する。

**a.** AITC の適用前 (-) および適用後 (+) の味覚刺激への鼓索神経の応答

AITC は、苦味応答 (0.1mM シクロヘキサミド) を完全に阻害し、高塩応答 (250 or 500mM NaCl +アミロライド [アミロライドを使用して、ENaC 依存性の低塩経路の寄与を選択的に排除] および 250 or 500mM KCl; 赤色で強調表示) を有意に抑制したが、低塩 (60mM NaCl) や他の味覚には影響しなかった; 複数の動物からの代表的な反応を示す。(→平均化した応答は補足図 1 参照) \*NR: 正規化

b. 味覚細胞応答のカルシウムイメージングでは、T2R32-サファイア陽性味細胞が苦味刺激（1mM シクロヘキサミド、1mM キニーネおよび 10mM デナトニウムの混合物）および高塩（500mM KCl）に反応するが、酸刺激（100mM クエン酸）には応答しなかった。

3つの画像：サファイアの蛍光（点線の円、左）で覆われた味蕾、および高塩、苦味および酸味刺激に対する応答をそれぞれ示す。スケールバーは 10 μm。画像パネルの下は、3つの追加の T2R32-サファイア陽性細胞からのこれらの味物質の代表的な ΔF/F トレースである。トレースの下にある黒いバーは、味刺激を示す。

(Suppl. Fig. 4) 合計で、15 および 12 個の T2R32-サファイア陽性細胞が苦味および KCl によってそれぞれ活性化された； これらのうち 11 細胞は両方の化合物によって活性化されたが、酸味刺激によっては活性化されなかった。

高塩が苦味感知細胞を活性化するという、高塩および苦味刺激が共に AITC によって阻止されるということは、苦味および塩味が共通経路（例えば、T2R 経路を介して）を共有し得ることを示唆する。このことから、苦味シグナル伝達の重要な構成要素である Trpm5 またはホスホリパーゼ Cβ2 (Plcb2) をノックアウトすると、高塩は検出できないのではないかと考え、検証した。図 2 で立証される。

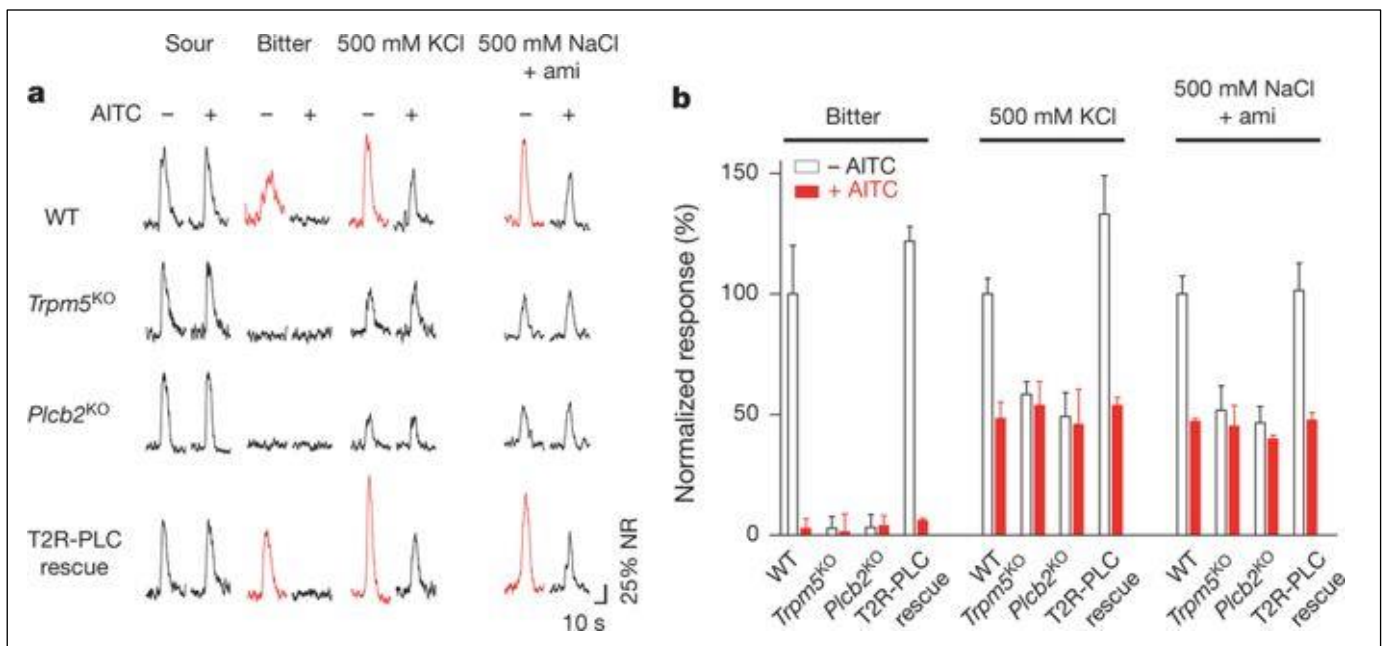


図 2：苦味受容細胞における高塩への応答は、TRPM5- and PLC-β2-依存性である。

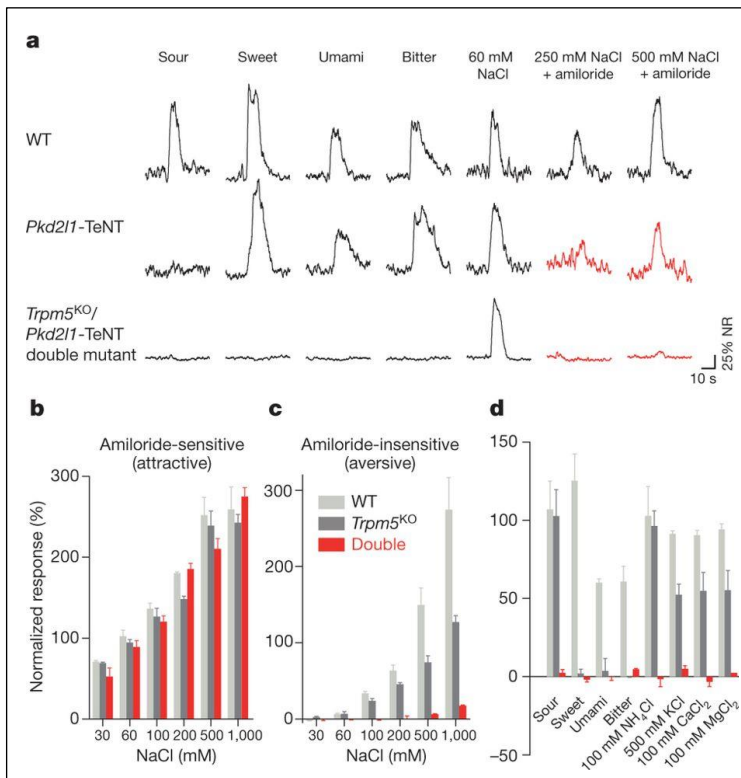
a. 代表的な鼓索神経応答、コントロール (WT)、Trpm5 ノックアウト (Trpm5<sup>KO</sup>)、Plcb2 ノックアウト (Plcb2<sup>KO</sup>) および T2R32-PLC-β2 レスキュー (T2R-PLC レスキュー) AITC の適用前 (-) および後 (+)。Trpm5<sup>KO</sup> および Plcb2<sup>KO</sup> の両方で、AITC に対する感受性ととも、苦味および高塩に対する応答が有意に低下。TRPM5 および PLC-β2 依存性高塩応答が苦味受容体細胞によって媒介されることを確認するために、PLC 機能が Plcb2 ノックアウトマウスの苦味受容体細胞のみに回復する選択的レスキュー実験を行った。Plcb2<sup>KO</sup> の苦味感知細胞で PLC-β2 を発現させる (T2R-PLC レスキュー) と、正常な苦味および塩への応答と、AITC 感受性 (赤色のトレースで示される) が WT と同等レベルまで回復した。\* 500mM NaCl + アミロライド (ami) に対する応答は、異なる動物由来 (別個体)。b. 応答を正規化、定量化した値、AITC の適用前 (オープンバー) および適用後 (赤バー)、(平均±標準誤差、n≥3 マウス)。AITC 処置は、コントロールおよび T2R-PLC レスキュー動物 (Student's t-test、P<0.05) において、0.1mM シクロヘキサミドに対する応答をほとんど完全に抑制し、500mM KCl および 500mM NaCl に対する応答を半分減少させた。

これらの結果は、苦味感受性細胞が PLC-β2 依存性に高塩応答を媒介し、苦味感受性経路の活性化によって高塩に対する嫌悪が部分的に媒介されるという仮説を支持する。

## II. 残る経路：酸味受容細胞による経路の発見

AITC、および Trpm5 または Plcb2 ノックアウトは、高塩に対する神経応答を約 50%しか減じない (図 2)。これらの動物は高塩類に対する強い嫌悪行動を依然として保持する。どんな細胞が残りの神経応答および行動を媒介するか？ 高塩が強い嫌悪感を与え、主要な嫌悪的な味覚経路の 1 つとすれば、残りの反応を仲介する可能性があるのは (嗜好的要素の強い甘味・うま味ではなく) 酸味であると考えた。

高塩検出における酸感受性細胞の関与を調べるために、酸味 TRC (PKD2L1 発現細胞) を不活性化した。破傷風毒素軽鎖 (TeNT) が PKD2L1 発現細胞に標的化された動物を設計し、次いで塩刺激に応答する味覚誘発性の神経活動を分析した。PKD2L1 を発現する細胞をサイレンシングすると、酸誘発味覚応答が消失する (図 3a)。しかし、図 3 に示すように、これらの動物はまた、高塩に対する電気生理応答を大幅に減少させ (図 3a、赤波)、さらに AITC を適応すると、残りの高塩 (KCl) 応答を効果的に廃止した (補足図 5)。したがって、高塩への味覚応答が、苦味および酸感受性細胞の複合作用によって媒介されると推論し、遺伝的に両方の経路を遮断することが高塩応答を消失すると考えた。実際に、Pkd211-TeNT を発現し、Trpm5 ノックアウトとする二重変異マウスは、1000mM という高い NaCl 濃度を含む様々な高塩類 (図 3) に対する電気生理学的味覚応答がほぼ完全に消失した。



**図 3：PKD2L1 発現細胞は、TRPM5-と PLC-β 2-非依存性の高塩に対する残った応答を媒介する。**

**a**、鼓索神経の記録は、サイレンシング PKD2L1 酸感受性細胞が高塩味応答に影響を及ぼすことを示す。Pkd211-TeNT マウスは、高塩に対する応答がなくなるが、Trpm5<sup>KO</sup>/Pkd211-TeNT 二重変異体動物は、アミロライド非感受性 NaCl (high-salt) 応答 (赤色の痕跡として強調される) を完全に失う。**b**、**c**、神経応答の定量は、二重変異マウス (double) が低塩 (**b**) に対しては正常な神経応答を示すが、高塩 (**c**) に対する応答はないことを示す。対照的に、単一の変異体 (Trpm5<sup>KO</sup>) は、高塩濃度への応答は部分的に消失するのみ。**d**、二重変異マウスは、甘味、苦味、酸味および旨味ならびに非ナトリウム塩に応答しない。データ (**b-d**) は、60mM NaCl の応答に対して正規化、平均±標準誤差。n ≥ 3 マウス

## III. I. II. の変化が個体レベルでの塩応答に及ぼす影響を嗜好性試験で検証した。

これら 2 つの細胞経路が高塩に対する嫌悪行動のメディエーターである場合、T2R および PKD2L1 発現細胞の同時サイレンシングは、濃縮塩溶液を拒否しなくなるはずである。図 4 および補足図 6 に示すように、単一変異マウス (Trpm5<sup>-/-</sup> または Pkd211-TeNT) は依然として高塩への強い嫌悪感を保持し、いずれかの経路の活性化が忌避行動を引き起こすのに十分であることを示す。しかしながら、二重変異動物は、コントロールマウスが強く反発する濃度にさえ、嫌悪を示さない。したがって、正常な条件下では、ナトリウム塩に対する動物の行動反応を集合的に調整する塩の appetitive-aversive のバランスが、魅力的な ENaC 経路 (苦い酸味のある二重突然変異体に残っている) と反発性 T2R および酸性経路の複合的な活動をつかさどっているに違いない。

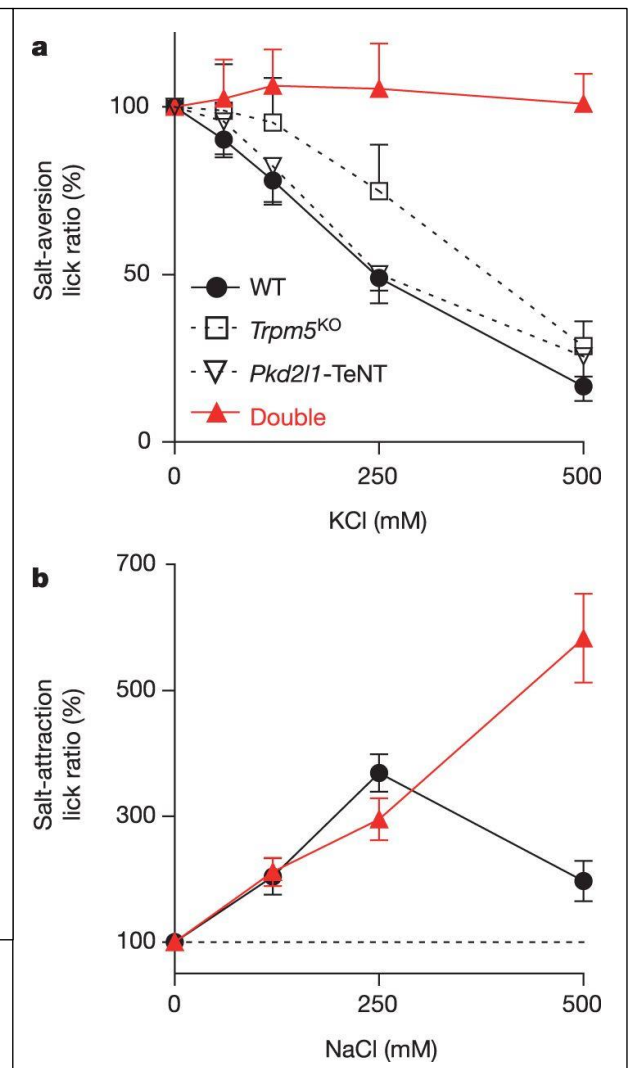
#### 図 4: *Trpm5*<sup>KO</sup>/*Pkd211*-TeNT double-mutant mice は、高塩への嫌悪を示さない。

KCl および NaCl に対する行動応答を測定するために、lick を分析。

a. 対照マウス (WT、黒実線) は、KCl 濃度の増加に対する用量依存性の強い行動嫌悪を示す。対照的に、*Trpm5*<sup>KO</sup>/*Pkd211*-TeNT 二重変異体は高濃度塩刺激を避けない。単一の変異体は、WT と同じような挙動。500mM KCl は二重変異体と他の遺伝子型 ( $P < 0.001$ ) との間に、250mM KCl では二重変異体と WT/*Pkd211*-TeNT マウスとの間に有意な差が認められた。

b. ナトリウム枯渇後、対照マウス (黒線) は NaCl に対する強力な誘引応答を示すが (補足図 7 も参照)、誘引行動は高濃度 (500mM) でかなり減少する。対照的に、二重変異動物 (赤線) は、500mM 程度の高い濃度でさえ、NaCl への誘引応答の連続的な増加を示す ((two-way ANOVA with post-hoc test,  $P < 0.001$ ))。

値は平均±標準誤差、 $n \geq 6$  マウス、b の横の破線はベースラインを示す。



#### 結論

我々の研究は、塩類が TRC の 3 つの異なるクラスを活性化することを明らかにする。食欲応答は、ナトリウム選択的 ENaC 経路 1 によって媒介されるが、高塩濃度の拒絶反応は、酸味および苦味感受性経路による。

将来的に、各経路の特異的阻害剤および活性化剤を用いる研究を追加していくことは、ENaC<sup>-</sup>、T2R<sup>-</sup>、PKD2L1 発現味覚細胞のヒト塩味への寄与に対処するのに役立つ、選択的受容体細胞調節因子の開発に役立つ、高塩濃度に対する強力な食欲を制御する (そして満足させる) や、多すぎる塩分により疾患を遠ざけることに役立つ。

#### ●炭酸脱水素酵素が酸感受性細胞において高塩濃度のセンサーとして機能している

(サマリーに入れていないが、補足図を用いて検証している項目)

酸感受性細胞に関する特徴の 1 つは、炭酸脱水素酵素の膜結合アイソフォームである炭酸脱水素酵素 4 (CA4) の顕著な発現である。CA4 は、味覚受容体細胞の周囲の pH を緩衝することに関与する ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ) 可能性が高いため、その活性は局所プロトン濃度および酸感受性に影響を及ぼし得る。高い塩濃度とその酵素活性を著しく阻害するとされ、炭酸脱水素酵素は、高イオン強環境 (high-ionic-strength environments) に敏感である。これは、CA4 が外部塩による局所的 pH 変化の「翻訳者」として機能するため、酸感受性細胞における高塩受容体の重要な成分として作用する可能性が高い。実際、補足図 8 および 9 に示される我々の結果は、舌の炭酸脱水素酵素の薬理的阻害または CA4 のノックアウトが、酸味受容体細胞による高塩感知を大きく損なうことを実証した。

### 〔補足図 8〕 炭酸脱水酵素 4 は、PKD2L1 発現細胞における塩感知に必要である。

酸反応性の味覚細胞に CA4 が顕著に発現していること、および炭酸脱水酵素活性が塩依存性であること（高イオン強度で酵素活性が低下する）を考慮すると、高塩による CA4 の阻害は、プロトンの局所的増加および付随する酸感受性経路の活性化の結果、引き起こされるものではないかと考えられる。したがって、この酵素が酸感受性細胞において高濃度塩のセンサーとして機能するかどうかを検証した。この仮説が真であれば、CA4 のノックアウトまたは pH を上昇させる（例えば、過剰な  $\text{HCO}_3^-$  の添加）または CA4 の阻害は、すべて PKD2L1 細胞からの高濃度塩応答を減少させるはずである。実際、結果はこれら 3 つの予測を立証した。

(a) CA4 のノックアウトは、酸味の感知細胞によって媒介される高塩応答を劇的に減少させる。

- ・ 対照 (WT) またはヘテロ接合体 (CA4 +/-、オープンバー) の応答の定量化を示す。
- ・ ホモ接合体 CA4 - / - マウス (赤バー) ; 塩味の苦味細胞成分を除去するために AITC 前処理を行った。
- ・ 高塩 (250mM KCl) に対する応答は、CA4 - / - マウスでは大幅に減少した。

(b) 過剰の CA4 基質 ( $\text{HCO}_3^-$ ) の添加により pH を上昇させることも、PKD2L1 細胞媒介の高塩への応答を抑制した。 TRPM5-KO マウスを使用して、酸感受性細胞の応答をみた ; 添加前 (オープンバー) および 30mM  $\text{KHCO}_3$  の添加後 (赤色バー)

(c) 強力な CA 阻害剤 (ドルゾラミド、DZA、0.5%w/v) による舌の炭酸脱水酵素の薬理的阻害もまた、酸味感受性の味覚細胞からの高塩誘発の応答を減少させた。上のパネルは、TRPM5-KO マウスにおける DZA で舌を処置する前 (黒) および処理後 (赤) の様々な塩に対する応答を示す。高塩 (および  $\text{CO}_2$ ) 応答は DZA 処理の影響を受けた。そして予想通り、酸味 (20mM クエン酸) および低塩 (NaCl、60mM) の味覚応答は DZA に影響されなかった。下のパネルは、PKD2L1-TeNT マウスの味覚応答が、DZA 処理に影響されないことは、炭酸脱水酵素活性の阻害が T2R 発現苦味細胞における高塩応答に影響しないことを実証する注 ; クエン酸について示されるトレースは、他の味に使用されるものとは異なる動物に由来する。

### 〔補足図 9〕 TRPM5-KO および PKD2L1-TeNT マウスにおける高塩応答に対する唾液 pH の影響。

CA4 が局所的な pH 変化への外部塩濃度の「翻訳者」として機能する場合、唾液 pH を低下させることは、酸性 (苦味のない) 細胞の高塩応答を増強するはずである。 (a) 500mM の KCl および 100mM の  $\text{CaCl}_2$  に対する標準化された応答の定量は、7.4 (正常人工唾液) から 5.5 への pH の低下が TRPM5-KO マウスにおける高塩への応答を有意に増強することを示す。 (b) 予想通り、高塩応答は PKD2L1-TeNT マウスでは唾液 pH の影響を受けず、苦味細胞の応答は pH 依存性ではないことが示された。 データを 60mM NaCl の応答に対して正規化、平均  $\pm$  s.e.m、n = 3

## Methods Summary + $\alpha$

### Mice

- Wild type、Trpm5<sup>KO</sup>、Plcb2<sup>KO</sup>、T2R32-PLC- $\beta$ 2 レスキュー、Pkd2l1-TeNT、Trpm5KO / Pkd2l1-TeNT 二重変異体
- T2R32-サファイアマウス : 苦味感知細胞を可視化する目的で作成。緑色蛍光タンパク質 (GFP) のサファイア変異体を T2R 陽性細胞に選択的に発現する T2R32-サファイアマウスを使用した (補足図 3) 味覚刺激に反応して、単一細胞で TRCs の機能的イメージングを可能にする剥離した上皮を用いて直接塩応答を調べた。茸状乳頭由来の TRC にカルシウム感受性色素であるカルシウム Green-1 を負荷し、次いで ex vivo で刺激し画像化した。

【補足図3】酸・甘ではなく「苦味」であることの裏付けを行っている。

(a) (左パネル、赤色ラベル) : サファイア、(中間パネル、緑色ラベル) : 苦味受容体 (20 個の T2R の混合物)、(右パネル、マージされた画像) : 広範囲に同時発現されている

2 つの T2R32 サファイアマウスの有茎乳頭を介した標識の定量、陽性細胞の少なくとも 75% が両方のプロンプトによって強く検出された。

(b、c) 上記と対照的に、酸味応答性細胞のマーカーである PKD1L3 (緑) (b)、および甘味とうま味受容体の成分である T1R3 (緑色) (c)、とサファイア (赤色) は共発現されなかった。

### Calcium imaging

- 調製物の先端表面を人工唾液中に浸し、味覚刺激を個々の味蕾に局所的に適用した。味覚刺激は 1 秒間。刺激間に最低 10 秒間は人工唾液に浸した。
- 個々の TRC について平均細胞蛍光強度 (F) を計算し、味覚適用の直前に 3 秒間の蛍光強度を平均化することによって各細胞に基底蛍光 (Fo) を割り当てた。  $\Delta F / F$  は  $(F - F_0) / F_0$  として計算した。味覚細胞は、味覚適用の 5 秒以内に  $\Delta F / F$  が Fo より 3 標準偏差を超えたときに応答したと考えた。

### Nerve recordings

- 舌の刺激および記録手順は、以前に記載されたように実施
- データ分析は、味覚刺激の 5 秒間に統合された応答を使用した。
- 神経記録に使用した化合物は、0.03-1M NaCl (アミロライド 10  $\mu$ M 有、無) または 0.03-1M KCl (塩味)、20mM アセスルファミン K (甘味)。50mM モノカリウムグルタミン酸+ 0.5mM イノシンリン酸 (うま味)、0.1mM のシクロヘキシサミド (苦味)、20mM のクエン酸 (酸性)。AITC (Aldrich) 施用前の 20mM クエン酸、60mM NaCl、250mM KCl (図 1& 補足図 1)
- アミロライド感受性塩成分を計算する : アミロライド使用前で応答を計算し、アミロライドによって阻害される応答の割合は、[アミロライド感受性成分=アミロライド非存在下の応答 - アミロライド存在下での応答] とした。
- AITC を用いた薬理的阻害をみる :
  - ① 一連の味覚刺激に対する応答を測定。
  - ② 3mM AITC を 6ml / 分の速度で 5 分間舌に適用。
  - ③ 舌を人工唾液で 1 分間洗浄し、①と同じ一連の味覚刺激に対する神経応答を測定。
  - ④ AITC の前後の応答を各動物について比較。
    - ☆ 回復の影響を最小限に抑えるために、AITC 後は、AITC 処置の 15 分以内に記録。
- 重炭酸塩を用いた薬理学的研究 :
  - 30mM KHCO<sub>3</sub> (炭酸水素カリウム) 3 (pH 7.4) の存在下または非存在下で味覚応答を測定。
  - ドルゾラミド (DZA : 炭酸脱水酵素阻害剤) 実験では、舌を 0.5%DZA (w / v) で 5 分間インキュベートする前後で反応をモニター。
  - 神経応答に対する pH の効果を調べるため、人工唾液 (7.4) の pH を塩酸で 5.5 に調整した。

### Behavioural assays : Lick 応答を測定

- salt-attraction (誘引) 試験のために、マウスにフロセミド (50mg kg<sup>-1</sup>) を注射し、試験前 3 時間食物または水なしでケージに入れた。
- 塩嫌悪試験のために、試験前 24 時間水を与えなかった。
- 塩誘引試験として 3 つまたは 4 つ、塩嫌悪試験として 2 つの異なる濃度の味物質および水が、各実験セッションで与えられた。

**Statistical analysis** : Bonferroni post-hoc 検定を用いた 2 元 ANOVA を用いて、ノックアウトマウスとコントロールマウスとの差異を統計的に分析した。