

9138 昆虫の塩味受容の分子機構

木島 博正(名古屋大学)

センチニクバエの唇弁には約 200本の味覚毛が存在し、その基部には糖受容細胞、一価陽イオンに応答すると思われる塩受容細胞、水受容細胞及び役割の不明な細胞の4種の味細胞が存在する。各味細胞は感覚突起を味覚毛先端まで伸ばして、先端の小孔から入ってくる味物質溶液を受容する。昆虫の味細胞は一次感覚細胞であり、刺激を受け取るとまず受容器電位が発生し、それにほぼ比例して発生したインパルスが軸索を通じて中枢に送られる。塩受容細胞や水受容細胞のトランスダクションの機構についてはまだほとんど不明のままであるが、塩受容細胞の塩刺激に伴って受容器電流が1ms以下の短い潜時で発生することなどから、糖受容細胞と同じ様にレセプター・イオンチャネル複合体が複数種存在して、トランスダクションを行っていることが推定される。

本研究ではこの塩受容細胞の情報変換の分子機構を解明すると共に、糖受容細胞・水受容細胞に対するいろいろな塩の効果も明らかにして、昆虫の味覚に対する塩の効果を経合的に理解することを目指した。

1) 塩刺激によって流れる受容器電流のゆらぎの解析。

唇弁大型化学感覚毛中の塩受容器を、先端から0.5MのNaClで刺激した。インパルスの発生を調べたところ、塩受容器のみが応答し刺激0.2秒後から1.2秒後迄の1秒間に約40発のインパルスを発生した。感覚毛の外腔に2本の電極を刺入する方法によって刺激によって発生する受容器電流とその揺らぎを2電極間の電圧降下として観測した。感覚毛先端をTTX処理することによってインパルスの発生は完全に抑制されたが、受容器電流は処理前と同じ大きさで発生し、揺らぎの増大が観測された。受容器電流は刺激後1ミリ秒以下の潜時で非常に速く発生したので、糖受容器の場合と同様に塩によって直接開口するチャネルが塩味の情報変換を行っていることが推定された。0.5M塩化コリンはどの味細胞も刺激しないので、これで刺激したときの揺らぎを対照として塩刺激によって活性化されたトランスダクションイオンチャネルの開閉を反映した受容器電流揺らぎの増大を解析した。揺らぎの増大分の自己相関関数はほぼ単一の指数関数で表され、その時定数は約10msであった。このイオンチャネルの開閉は糖受容細胞に存在するピラノース部位の糖作動性イオンチャネルより開閉がゆっくりしており、フラノース部位の糖作動性イオンチャネルの開閉に近いものであった。このイオンチャネルの性質は現在詳しく調べている。

2) 単離味細胞にパッチクランプ法を適用した研究。

羽化前2~3日の蛹から唇弁を取り出し、キチナーゼとプロテアーゼで処理して単離味細胞を得た。これにパッチクランプ法と全細胞クランプ法を適用して単離味細胞の諸性質と応答を調べている。

9138 昆虫の塩味受容の分子機構

木島 博正 (名古屋大学)

研究目的

昆虫もヒトと同様に塩をバランス良く摂取することは生理的な恒常性の維持に必須であり、味覚器中に特別に分化した塩受容細胞を持っている。

センチクバエの唇弁には約 200本の味覚毛が存在し、その基部には糖受容細胞、一価陽イオンに応答すると思われる塩受容細胞、水受容細胞及び役割の不明な細胞の4種の味細胞が存在する。各味細胞は感覚突起を味覚毛先端まで伸ばして、先端の小孔から入ってくる味物質溶液を受容する。昆虫の味細胞は一次感覚細胞であり、刺激を受け取るとまず受容器電位が発生し、それにほぼ比例して発生したインパルスが軸索を通じて中枢に送られる。

我々のグループは、これまで主として糖受容細胞について、レセプターの種類と特異性に関する研究^{1,2)}や、受容器電流のゆらぎの解析³⁾や単離味細胞に対するパッチピペットを用いた全細胞クランプ法の適用によるトランスダクション(味分子の化学信号を神経の電気信号に変えること)の分子機構についての研究⁴⁾などを行ってきた。その結果糖受容細胞の感覚突起先端部の受容膜上には糖に対する特異性の高いレセプターとイオンチャネルの複合体が数種存在していて糖で刺激されるとイオンチャネルが急速に開いて細胞外から陽イオン(主にNa⁺)が流入することによって受容器電位が発生することが明らかになった。即ちこの複合体型イオンチャネルがトランスダクションを行っている。

塩受容細胞や水受容細胞のトランスダクションの機構についてはまだほとんど不明のままであるが、塩受容細胞の塩刺激に伴って受容器電流が1ms以下の短い潜時で発生すること、及び1,6-アンヒドロ糖やジブチリルcGMPのような有機分子がこの細胞を刺激できることから、糖受容細胞と同じ様にレセプター・イオンチャネル複合体が複数種存在して、トランスダクションを行っていることを推定している。

本研究ではこの塩受容細胞の情報変換の分子機構を解明すると共に、糖受容細胞・水受容細胞に対するいろいろな塩の効果も明らかにして、昆虫の味覚に対する塩の効果を総合的に理解することを目的とした。

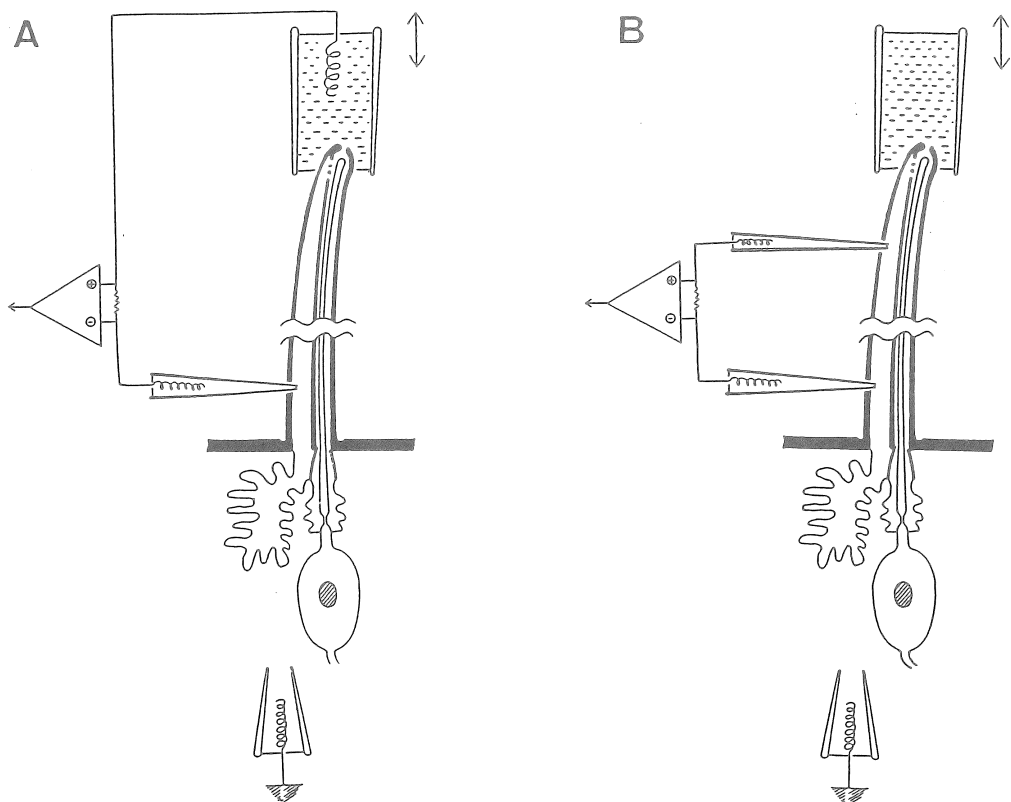


図1. 受容器電流とその揺らぎを測定する2つの方法。
A: 先端側壁法。 B: 側壁2電極法。

研究方法

センチニクバエは、ブタ腿肉のミンチと発酵させたラット固形飼料を餌とし、 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ で飼育した。

受容器電流の揺らぎの解析には、羽化後3～8日の成虫を用いた。ハエの頭部をハエのRinger液を含むガラスキャピラリーの先端に固定し、大型化学感覚毛先端からTTXを作用させて活動電位の発生を抑えた。感覚毛の先端を塩や糖などで刺激したとき外腔中を先端に向かって流れる受容器電流とその揺らぎを測定するのに図1に示した2つの方法を用いた。その1つは‘先端側壁法’（図1A）で、この化学感覚毛の側壁から外腔に1本の微小電極を刺入し、外腔を流れる受容器電流によって生ずる、この電極と感覚毛先端の間の電圧降下を測定した。もう1つは‘側壁2電極法’（図1B）で外腔に2本の電極を刺入し、その間の電圧降下を測定した。揺らぎは自己相関関数とパワースペクトルを計算して解析した。

羽化前2～3日の蛹から唇弁を取り出し、薄片にしてからキチナーゼとプロテアーゼで処理して先端部に味細胞を持つ神経束を得た。これをポリリジンでコートしたガラス面上に展開して単離味細胞を得た。これにパッチクランプ法と全細胞クランプ法を適用して単離味細胞の諸性質と応答を調べた。

研究結果

1) 塩刺激によって流れる受容器電流の揺らぎの解析。

上に述べた方法によって唇弁大型化学感覚毛中の塩受容器を、先端から0.5MのNaClで刺激した。TTX処理前にインパルスの発生を調べたところ、塩受容器のみが応答し刺激0.2秒後から1.2秒後迄の1秒間に約40発のインパルスを発生した。外腔に2本の電極を刺入する方法によって刺激によって受容器電流が発生するのが観測された。TTX処理後はインパルスの発生は完全に抑制されたが、受容器電流は図1の内挿図に示すように処理前と同じ大きさで発生し、揺らぎの増大が観測された。受容器電流は刺激後1ミリ秒以下の潜時で非常に速く発生したので、糖受容器の場合と同様に塩によって直接開口するチャンネルが塩味の情報変換を行っていることが推定された。0.5M塩化コリンはどの味細胞も刺激しないので、これで刺激したときの揺らぎを対照として塩刺激によって活性化されたトランスダクションイオンチャンネルの開閉を反映した受容器電流揺らぎの増大を解析した。図1に示したように揺らぎの増大分の自己相関関数はほぼ単一の指数関数で表されその時定数は約10msであった。このイオンチャンネルの開閉は糖受容細胞に存在するピラノース部位の糖作動性イオンチャンネルより開閉がゆっくりしており、フラノース部位の糖作動性イオンチャンネルの開閉に近いものであった。このイオンチャンネルの性質は現在詳しく調べている。

IE0= 15.
IEZ= 14.

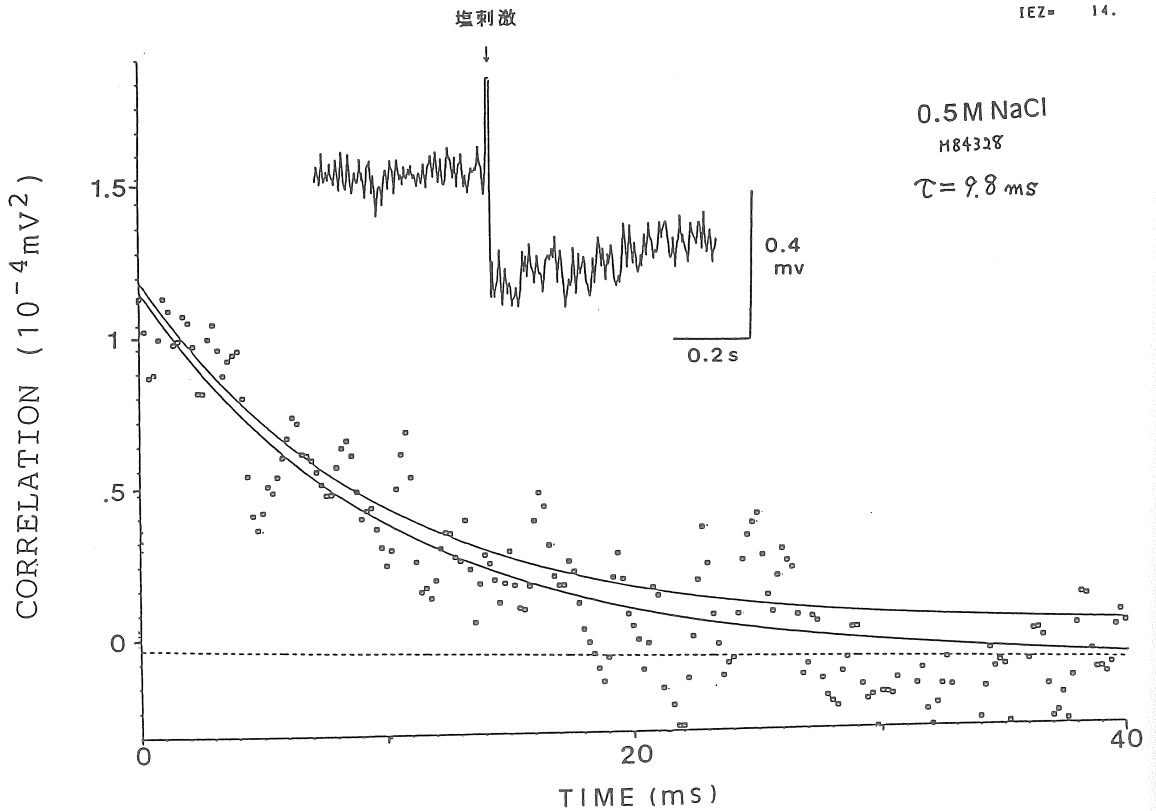


図2. 内挿図: 唇弁大型化学感覚毛に側壁2電極法(図1B)を適用して測定した受容器電流(刺激によって生じた下方への変位が受容器電流の大きさを表す)とその揺らぎ。
本図: 揺らぎの増大分の自己相関関数。時定数約10msの指数関数で表すことができる。

2) 単離味細胞にパッチクランプ法を適用した研究。

我々は羽化2日前の蛹から唇弁を取り出して薄く切りこれを酵素処理することによって神経束の先端につながった単離味細胞を得た。最近これにパッチピペットを用いた全細胞クランプに成功し、蔗糖に応答する細胞とジブチリルcGMPに対して応答のある細胞を見いだした。図2に味細胞を -40 mV に全細胞クランプして 50 mM 蔗糖を圧力噴出によって与えた時の電流応答の例を示す。蔗糖刺激によって内向き電流が発生し変化の速い揺らぎが増大した。この揺らぎの性質は1)の方法で得られた受容器電流の揺らぎの性質とよく一致した。

3) 水受容細胞の応答に対する塩の効果

水受容細胞は純水に最も強く応答し、これに塩や糖などを溶かすとその濃度が濃いほど応答が抑制される。したがって溶液の浸透圧のようなものに依存して応答が抑制されているのではないかと考えられてきた。しかし溶かす塩の種類によって抑制され方が非常に異なることが明かになった。即ち NaCl と塩化コリンを比べると塩化コリンの方が同じ濃度で抑制が強く、 NaCl とクエン酸ナトリウムと比べるとクエン酸ナトリウムの抑制が断然強い。図3に塩化コリンとクエン酸ナトリウムの水受容細胞の応答の抑制曲線を示す。クエン酸ナトリウムは同じモル数で比較すると塩化コリンの40倍も抑制効果が強い。この様に陽イオンの種類にも陰イオンの種類にも依存して抑制効果が異なることは、単純に浸透圧が抑制を決めているのではなく、色々なレセプターが存在して、レセプターへのイオンの結合によってイオンチャネルが閉まるメカニズムが示唆される。

考察

昆虫の味細胞は、受け取る味のモードによって受容細胞が明確にわかれていること、構造が単純なこと等から研究上有利な点が多く、高等動物の味覚受容のモデルとして重要な位置を占めている。我々のグループは其中でつねに世界をリードする研究を続けている。この研究によってその一部が解明できた昆虫の塩受容過程は全動物種におけるこの過程のよいモデルとなるばかりでなく、有害昆虫の駆除などにも大きく寄与できると考える。

今後の課題

受容器電流の揺らぎの解析によって昆虫の塩受容の基本的な分子機構を推定する事ができた。今後はこの方法と単離味細胞にパッチクランプ法を適用する方法の両方を用いてこの結果を確かなものにする必要がある。また単離した塩受容細胞内の Ca^{2+} イオン、 pH 、セカンドメッセンジャーなどの濃度の刺激に伴う変化をFura2のような蛍光指示薬を用いて測定し、これらによる塩受容過程の修飾機構を明らかにすることも重要であろう。

Bar: application of 50 mM sucrose by perfusion

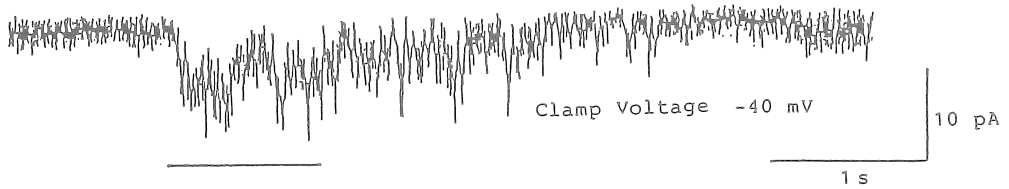


図3. 羽化前2~3日の唇弁から得られた単離味細胞にパッチピペットによる全細胞クランプ法によって得られた、蔗糖刺激によって生じた内向き電流の例。細胞は -40 mV に電位固定されており、横棒のところで 50 mM 蔗糖を圧力噴出によって細胞先端部に与えた。

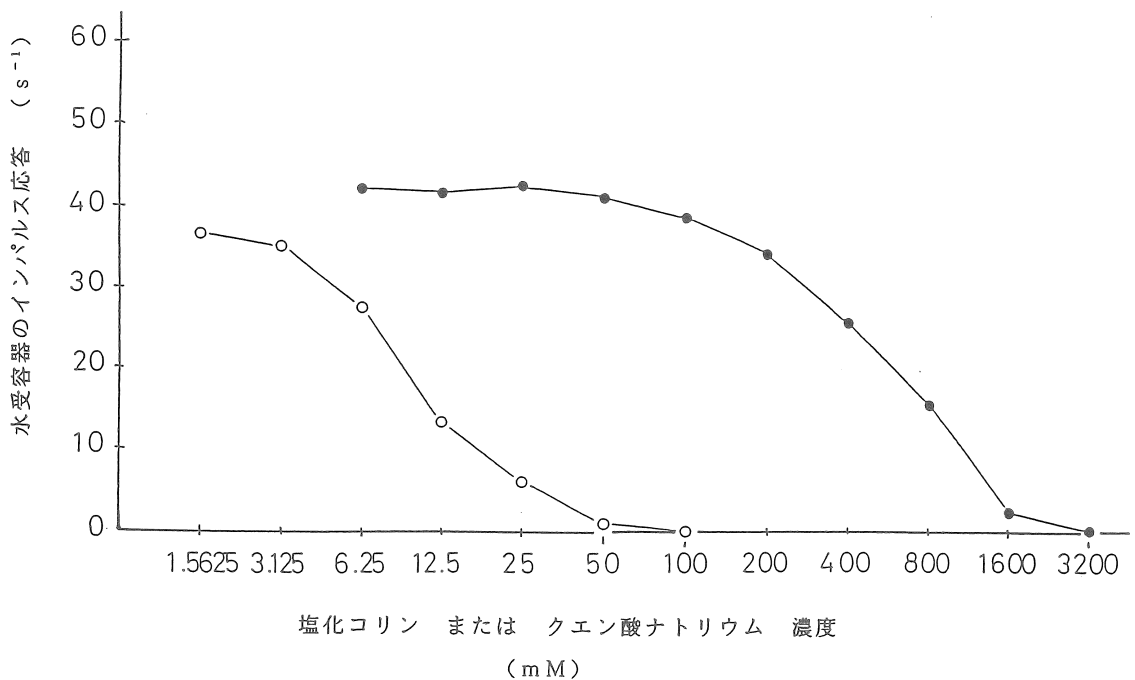


図4. 塩化コリンとクエン酸ナトリウムによる水受容器の応答の抑制。水受容器の応答は化学感覚毛先端を塩化コリンまたはクエン酸ナトリウムを含む溶液で刺激したときの、刺激0.2秒後から1秒間のインパルス数である。両者の濃度を変化させたときのインパルス数が示されている。

● : 塩化コリン、 ○ : クエン酸ナトリウム

文献

- 1) Shimada, I., Shiraishi, A., Kijima, H. and Morita, H. (1974) Separation of two receptor sites in a single labellar sugar receptor of the fleshfly by treatment with p-chloromercuribenzoate. *J. Insect Physiol.* 20, 605-621.
- 2) Morita, H. and Shiraishi, A. (1985) Chemoreception Physiology. // Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Ed. by Kerkert, G. A., Gilbert, L. I. Pergamon Press, Oxford. 6, 133-170.
- 3) Kijima, H., Nagata, K., Nishiyama, A. and Morita, H. (1989) Receptor current fluctuation analysis in labellar sugar receptor of the fleshfly. *J. Gen. Physiol.* 91(1), 29-47
- 4) Kijima, H., Nagata, K. and Yamane, S. (1990) Taste transduction in insect: Receptor current fluctuation analysis and patch clamp study. Proceedings of International Symposium on Olfaction and Taste X. ed. by K. B. Doving, GCS A/S, Oslo, Norway, p.314

MOLECULAR MECHANISMS OF SALT RECEPTION IN INSECT

Hiomasa Kijima, Shozo Iida and Shigeo Yoshino
Department of physics, Faculty of Science, Nagoya University

SUMMARY

The fleshfly, *Boetcherisca peregrina*, has about 200 taste sensory hairs on its labellum. Four taste neurons belong to a taste hair: they are a salt receptor, a sugar receptor, a water receptor and an unknown taste neuron. A taste hair has two lumina: outer and inner lumina. Each taste neuron sends its sensory dendrite through the inner lumen to the taste hair tip, where the distal part of the dendrite receives the taste stimulus which have diffused into the tip of the inner lumen through a small pore at the sensory hair apex.

We studied here the molecular transduction mechanisms of the salt receptor neuron, by examining the fluctuation of the receptor current which flows through the outer lumen from the base to the tip and flows into the tip of the sensory dendrite of the salt receptor neuron, when the neuron is stimulated by the salt solution. The receptor current was recorded as the potential drop between the two glass microelectrodes inserted into the distal and proximal part of the outer lumen, respectively. When the taste hair tip was treated with TTX solution for several minutes, impulse generation was completely depressed for hours, but the receptor current remained intact. The fluctuation of the receptor current, which reflected the open-close dynamics of the ion channels activated by the salt stimulation, was analyzed by computing autocorrelation function and power spectrum. The results of the analysis suggested that the cation directly activates the transduction ion channel of the salt sensation, located on the membrane of the sensory dendrite tip.

We also succeeded to isolate the taste neuron from the labellum of the pupa 2 - 3 days before eclosion.