

9253 成長、老化にともなう塩受容体機構の変化

助成研究者:吉井 清哲(九州工業大学 情報工学部)

塩受容体機構の成長、老化にともなう変化を測定するためには、各ステージの動物の塩応答を細胞レベルで調べる必要がある。さらに、塩受容体機構を解明するためには、受容膜と基底膜を異なるイオン環境下に置くことが望ましい。本研究において、以下のようにこの目的にかなう実験系を開発し、塩受容体機構に関する予備的結果を得た。

舌上皮剥離標本の作成；1～80週令 ddv マウス舌にコラゲナーゼを注入し味蕾を含む剥離標本を作成した。標本は、各ステージのマウスから同様に作成することができた。予備実験として、4週令マウス標本の塩受容体機構を調べた。

測定用チェンバーおよび電位固定実験；剥離した上皮をバリアーとして受容膜と基底膜を独立にかん流できるチェンバーを開発した。このチェンバーにセットした舌上皮は中の味細胞は、正立顕微鏡下でギガシール法を用い電位固定した。nystatin を電極内液にを加え、細胞内メッセンジャー、の拡散を防止した。

電位依存性電流；-50mV に電位固定した味細胞は脱分極によって一過性内向き電流と遅延性外向き電流を生じた。

塩刺激に対する応答；味細胞を -50mV に電位固定し、蒸留水に順応した受容膜を 100 mM NaCl, KCl, CaCl₂ で刺激すると内向き電流が生じた。この味細胞は、100 mM グリシンには応答しなかった。

塩によって生じる電流の電位依存性；NaCl, CaCl₂ によって生じる電流は線形の電位依存性を示し、逆転電位はいずれも -20 mV 付近にあった。KCl によって生じる電流は、-20 mV 付近に逆転電位をもつ線形の成分と、-50 mV 付近から内向き整流特性を示す非線形成分から構成されていた。コンダクタンスは、いずれの塩によって生じる線形成分も KCl によって生じる内向き整流特性も、基底膜で生じることが示唆された。さらに受容膜の刺激によって細胞内メッセンジャーが生じる可能性が示唆された。

9253 成長、老化にともなう塩受容体機構の変化

助成研究者:吉井 清哲(九州工業大学 情報工学部)

研究目的

ヒトの食塩感受性は、老化と共に変化する。老年者は、若年者、中年者よりも高濃度の食塩を好むようになる。また、食塩に対するいき値濃度も上昇する。ラットの塩応答も、成長と共に変化的ことが電気生理学的に明らかにされている。このような塩感受性の変化は、味細胞レベルで受容体機構に変化に由来する可能性がある。

塩応答の発現における受容体機構については、不明の点が多い。シュークロースなど電氣的に中性な物質は、刺激物質としてのみ作用する。しかし、NaCl, KCl等の塩は刺激物質であると同時にカレントキャリアーとしても働く可能性があるため、塩応答の解析は複雑となる。このため、塩に対する受容体機構については、様々な仮説が提案されているが、不明の点が多い。

本研究では、プロジェクトの最初のステップとして1) 成長、老化の各ステージにある動物から同一の方法で塩応答が測定できること、2) 受容器電位発生機構が議論できること、など本計画に必要な条件を満たす実験系の開発を行った。その結果、舌上皮剥離標本が有効であること見いだした。また、予備的結果ではあるが、本標本を用いた実験から、NaClとKClの受容体機構が異なることが示された。

研究方法

舌表皮剥離標本の作成

1週令～80週令ddY マウスを断頭し、取り出した舌にMistrettaの方法にしたがってコラゲナーゼ(4 mg/ml)を注入した。舌は、Tyrode液中に5分～20分間置いた後、舌先端部の上皮を剥離し、測定用チェンバーに固定した。本実験では、電氣的測定に4週令マウスを用いた。

測定用チェンバーおよび電位固定実験

Fig. 1Aは、測定用チェンバーの背面図を示している。チェンバー上には、通常5～10個の茸状乳頭が含まれる。上面が剥離面、下面が受容膜を含む舌表面となるようにセットする。したがって、舌上皮がバリ

アーとなり、味細胞受容膜と味細胞基底膜を異なるイオン環境におくことができる。

電位固定実験は、Fig. 1Bのように行った。測定用チェンバーは、正立型顕微鏡下に置き味細胞基底膜側を細胞外液、味細胞受容膜側を蒸留水あるいは各種刺激液でかん流した。ガラス電極を用い味細胞基底膜にギガシールを作成し、味細胞の電位を固定した。

各種溶液組成

コラゲナーゼ溶液 ; 100 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 8.4 mM Na₂HPO₄, 10 mM glucose, 25.2 mM HEPES-KOH, 0.42 mM Ca(NO₃)₂, pH 7.4.

Tyrode溶液 ; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10 mM glucose, 10 mM HEPES-NaOH 10 mM Na pyruvate, pH 7.4.

電極内液 ; 140 mM CsF, 5 mM MES-KOH, nystatin 300 µg/ml, pH 7.0

各種刺激液 ; 各種塩類を脱イオン水に溶かして調整した。

研究結果

舌上皮標本の作成

舌表皮は、1週令から80週令のマウスから剥離することができた。マウスの寿命は2~3年とされているため、80週令は完全な老化のステージにあるとはいえない。今後、飼育期間をさらに延長し実験を行う必要がある。

電位依存性電流

剥離舌上皮中の味細胞は、各種の電位依存性コンダクタンス変化を示した。Fig. 2は、脱分極によって生じる一過性うつ向き電流を示している。詳しい研究が必要だが、電位依存性Na電流と考えられる。Fig. 3は、脱分極によって生じる遅延性外向き電流を示している。技がシール作成直後は、大きな外向き電流が観測される(A)が、時間と共に電流は減少する(B)。したがって、この電流は遅延性Kチャンネルを流れるK電流であり、記録電極内Csの細胞内への流入によって抑制されたと考えられる。これらの電位依存性電流は、杉本がマウス単離味細胞で記録した結果と良く一致している。

塩刺激によって生じる電流

受容膜を脱イオン水に順応した味細胞は、各種塩溶液に応答した。Fig. 4は、-50 mVに電位固定した味細胞の各種塩刺激によって生じた電位固定電流を示している。100 mM KCl, NaCl, CaCl₂刺激によって、いずれもゆっくりとした内向き電流の増加が観測される。各塩溶液を蒸留水で洗い去ると電流は元のレベルを回復している。この味細胞は、100 mM グリシンには応答していない。

塩応答電流の膜電位依存性

KCl刺激によって生じる電流の電位依存性を測定し (Fig. 4に示した各電位固定電流中の大きなノイズ)、Fig. 5に示した。過分極側でゆっくり発達する内向き整流が観測される。この電流-電圧関係の初期値と定常値をFig. 5Bにプロットした。

初期値は、線形の電圧依存性を示している。これに対して定常値は、 -50 mV以下で明らかな内向き整流特性を示している。逆転電位は、初期値、定常値ともに同一であり、 -20 mV付近にある。

Fig. 6およびFig. 7は、それぞれNaCl、CaCl₂に対する応答を示している。NaClに対する電流-電圧関係の初期値、定常値は、ともに線形ではほぼ同一である。逆転電位はいずれも -20 mV付近にある。CaCl₂に対する電流-電圧関係の初期値、定常値もNaClの場合と同様、ともに線形ではほぼ同一であり、逆転電位はいずれも -20 mV付近である。

考察

記録電極周囲の溶液のイオン組性が変化すると電極電位が変化するため、塩応答の記録はこれまで困難であった。舌上皮および味蕾を形成する細胞は互いにタイトジャUNCTIONによって結合しており、溶液の侵入を阻止している。事実、基底膜側に電位記録用電極を置き、受容膜側のイオン組成を変化させても、電位記録電極が上皮を突き破るまで電位に変化は生じなかった。したがって、本実験では記録電極周囲の塩環境は変化せず、測定された電気現象は味細胞受容膜に由来すると考えられる。すなわち、塩応答を測定するシステムとして本方法は、有効であることがわかった。

味細胞とともに味蕾内味蕾を構成する基底細胞は、味細胞とシナプス結合をもつため味覚応答を示す。本実験では、塩応答測定後細胞を引き出し形態を観察した。応答を記録した細胞は、いずれも味細胞に特徴的な長いデンドライトををもっていた。機械的ストレスによる変形の可能性は除外できないが、これらの細胞は味細胞と推定される。基底細胞の多くは、剥離の操作によって除かれると考えられる。

各種の塩刺激に対して線形な電位依存性を示すコンダクタンスの逆転電位は、いずれの塩に対しても -20 mV付近にあった。これらが単一のチャンネルの開口によると仮定すると、逆転電位が同一であることから、これらのチャンネルは基底膜に存在することになる。細胞内KはCsによって置換され、 10 mM程度に減少している可能性がある。したがって、このチャンネルはKイオンに選択性をもつ可能性がある。

内向き整流特性は、KCl刺激によってのみ観測された。内向き整流Kチャンネルは、Kの逆転電位付近で開くことが知られている。この内向き

整流特性がKチャンネルであると仮定すると、このチャンネルも、基底膜に存在することになる。

このように、塩刺激によって基底膜コンダクタンスが増加することが示唆された。受容膜が塩刺激を受けることによって細胞内メッセンジャーが生成されるのかもしれない。

今後の課題

本研究から、塩応答における受容体機構が示唆された。今後、さらに定量的実験を行い、本予備結果を確認する必要がある。舌上皮剥離標本中の味細胞に対するギガシールの作成は、困難であった。基底膜を酵素処理あるいは流水で洗浄するなどしてギガシール作成の効率をあげる必要がある。

本実験では、4週令マウスを用いて味応答を測定した。1週令マウスおよび80週令マウス舌上皮も同様に剥離できることは、確認している。今後、本実験で開発した方法を利用し、1週令あるいは200週令マウスなどさらに広範な成長、老化の各ステージの受容体機構を明らかにする。

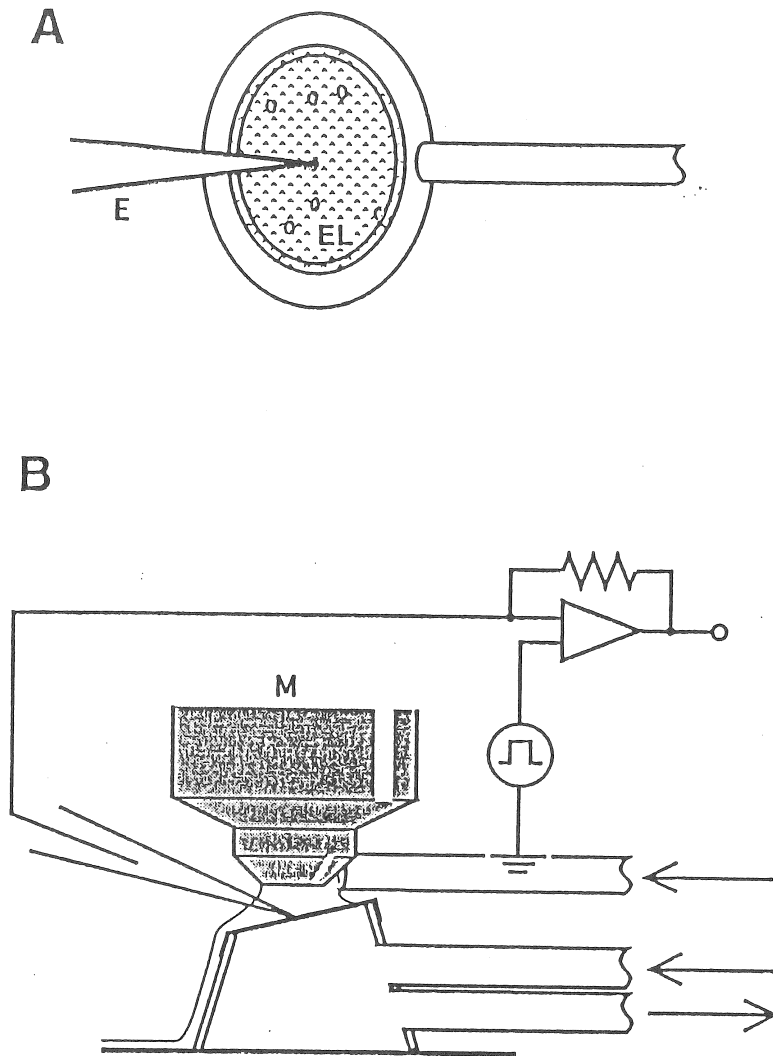


Fig. 1. Experimental set up.

A. Top view of experimental chamber. E, electrode; EL, epithelium

B. Experimental chamber under microscope. M, microscope.

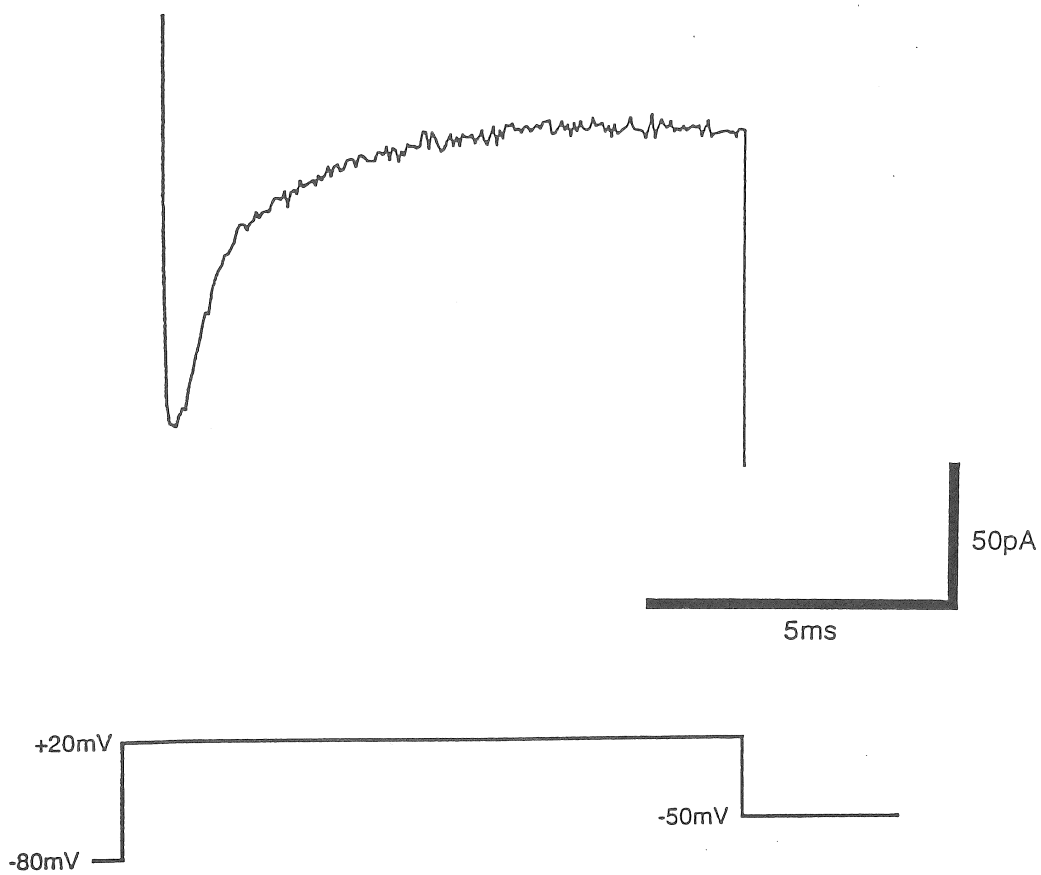


Fig. 2. Transient inward current (upper trace) elicited by a depolarization pulse (lower trace).

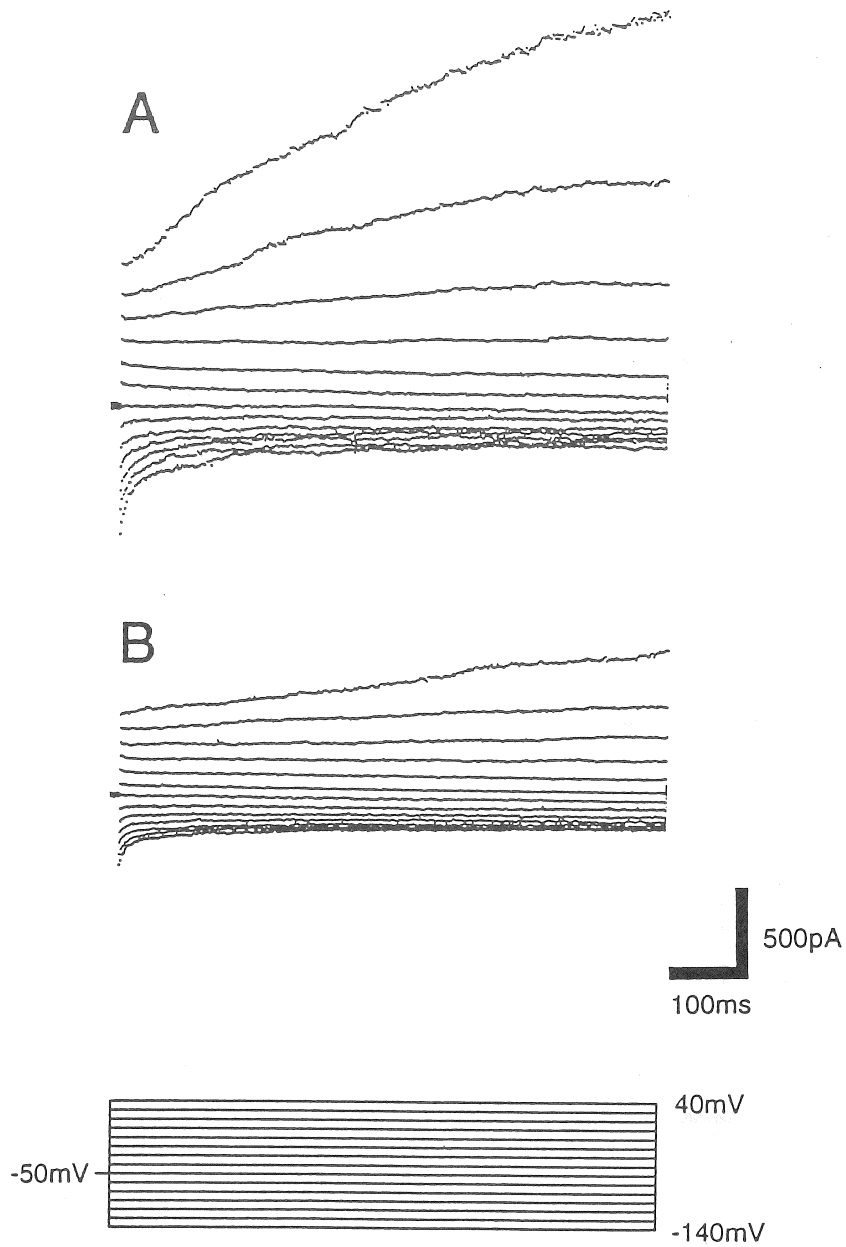


Fig. 3. Delayed outward currents elicited by a series of command pulses just after (A) and 3 min after giga seal formation.

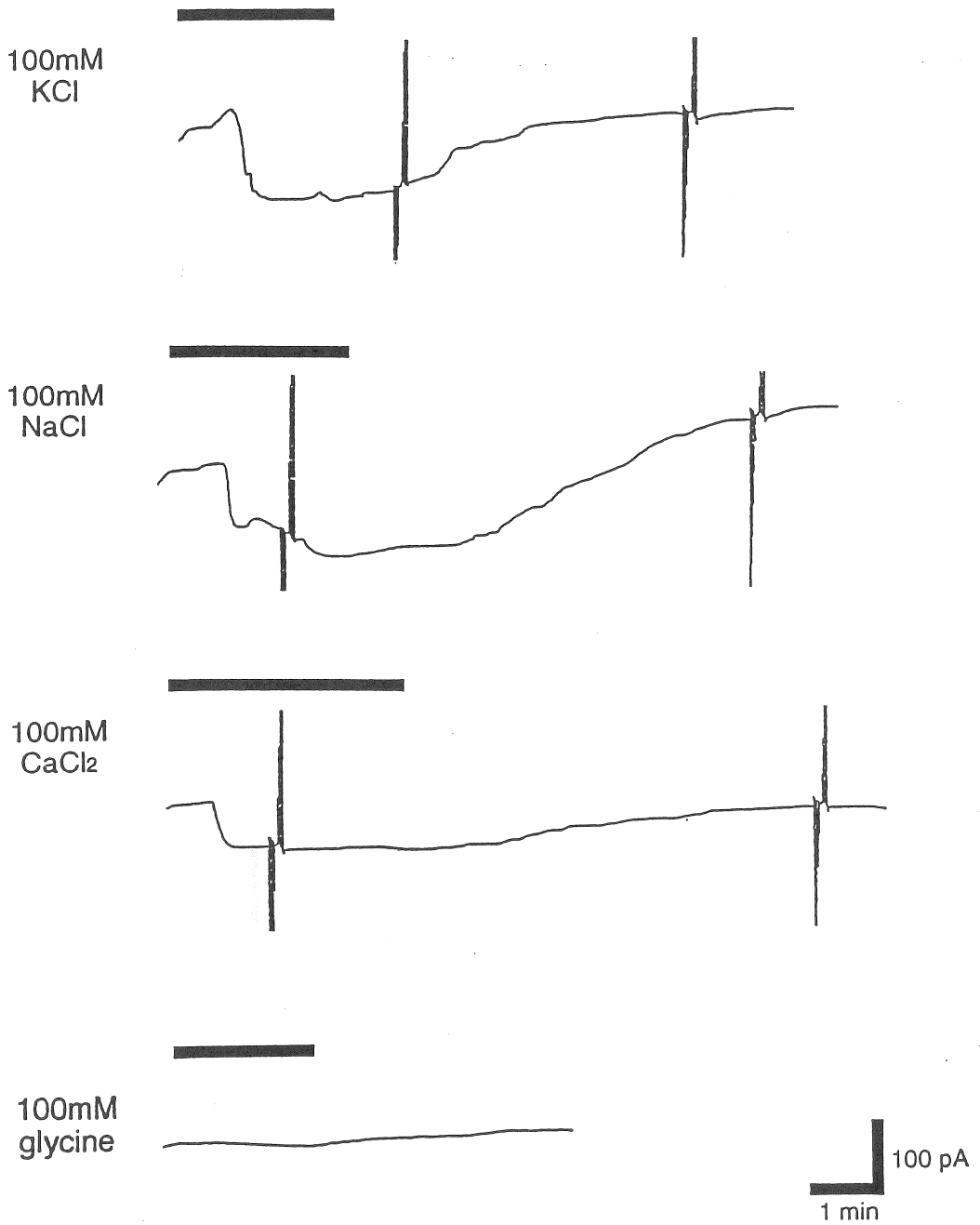


Fig. 4. Voltage-clamp currents elicited by applications of various salts. Holding potential, -50 mV; vertical noises, voltage-clamp currents elicited by a series of command steps.

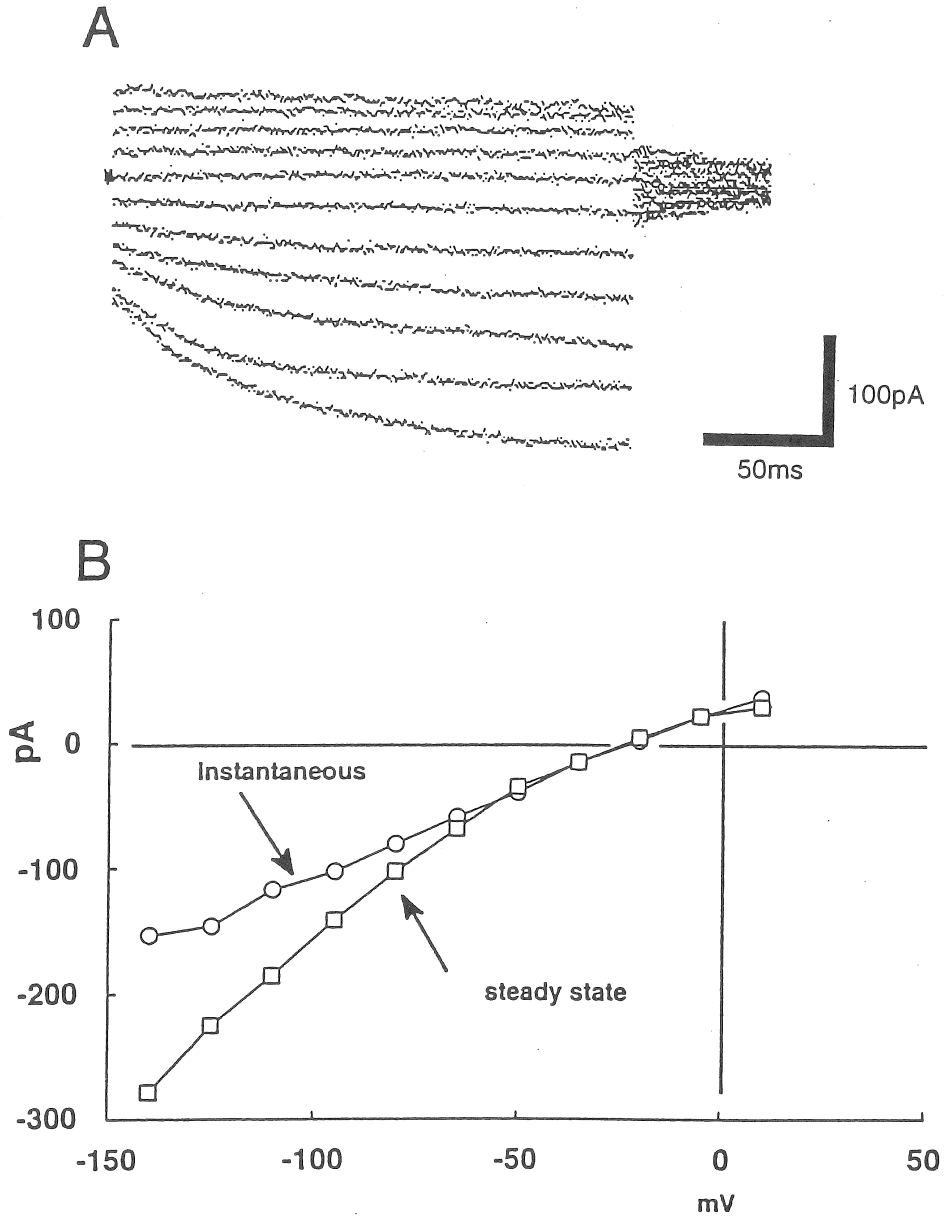


Fig. 5. Voltage dependence of KCl induced currents.

A

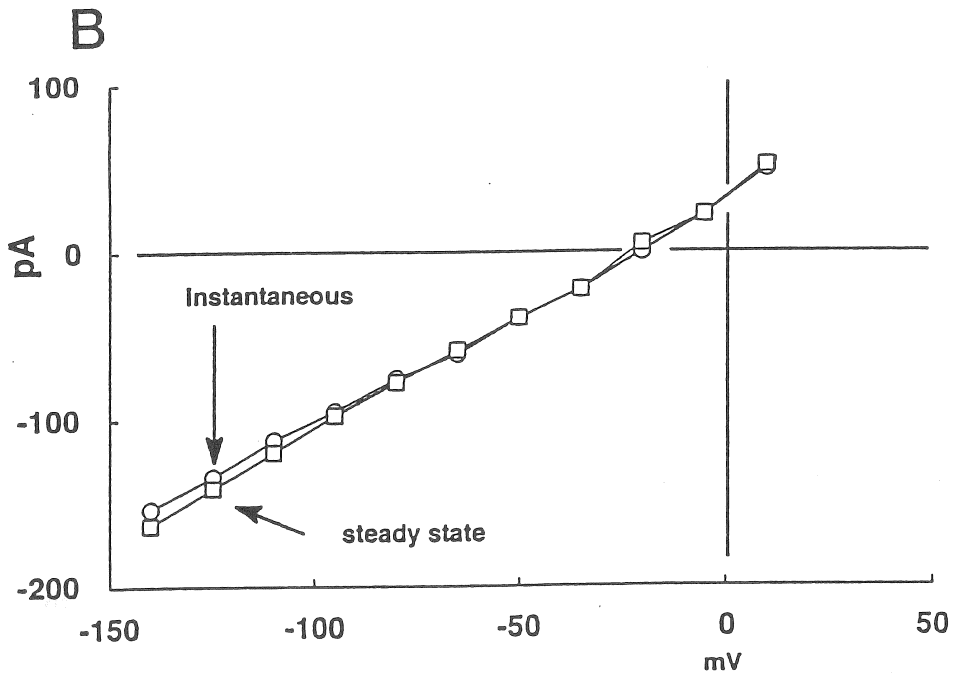
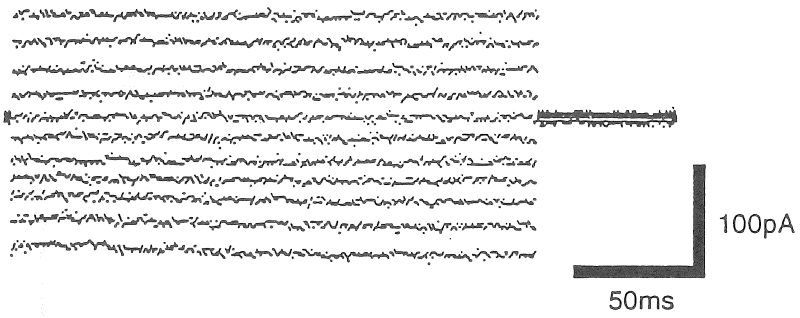
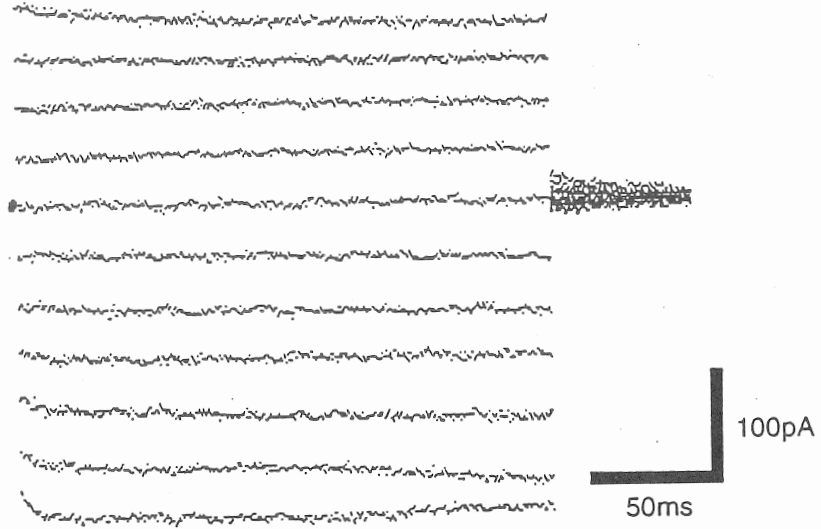


Fig. 6. Voltage dependence of NaCl induced currents.

A



B

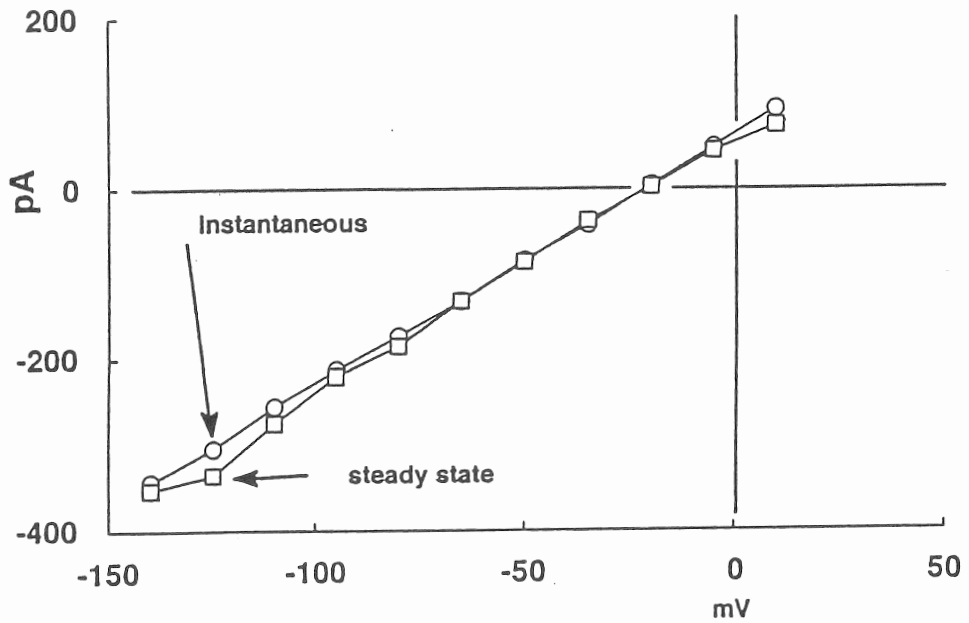


Fig. 7. Voltage dependence of CaCl_2 induced currents.

Receptor Mechanisms Of Mouse Taste Receptor Cells To Various Salts

KIYONORI YOSHII

Department of Biochemical Engineering and Science
Kyushu Institute of Technology

Summary

We investigated receptor mechanisms of mouse taste receptors to salts under voltage clamp conditions using a chamber which controlled ionic compositions on apical and basolateral membranes of taste cells in a peeled tongue epithelium separately. a) The tongue epithelia of mouse in a range of 2 ~ 80 weeks old were peeled with a hypodermic injection of collagenase into the tongue according to Misteretta (1971). The epithelium on the chamber prevented any diffusion of solutions applied on the receptor membrane to the basolateral membrane. Therefore, deionized water perfusing the receptor membrane did not dilute a physiological saline solution applied to the basolateral membrane. b) Depolarizing voltage steps produced transient inward currents followed by slow developing outward currents. and transient outward currents. The outward currents were blocked by Cs added into the patch electrode, indicating a delayed rectifier K channel may be responsible to the current. c) Application of either 100 mM NaCl, KCl, or CaCl₂ solutions on the apical membrane adapted to deionized water produced slow developing inward currents and increased the membrane conductance. Although the further experiments were needed, analyses of voltage dependence of the inward currents suggest that the salts increase conductance at the basolateral membrane. The present results indicate that this method is useful to investigate the receptor mechanisms.