

9443 ソルト味覚トランスダクション機序におけるGTP結合蛋白質の役割

助成研究者：岡田 幸雄 (長崎大学 歯学部)

共同研究者：宮本 武典 (長崎大学 歯学部)

藤山 理恵 (長崎大学 歯学部)

内田 昌徳 (長崎大学 歯学部)

味刺激が味細胞先端の受容膜上のリセプター蛋白に結合すると、細胞内の一連の生化学的反応が進み、味細胞の脱分極及び細胞内Ca²⁺濃度の上昇が起こる。細胞内Ca²⁺レベルの上昇は味細胞からの伝達物質の放出を促し、味覚情報を味覚神経に伝達する。GTP結合蛋白質を活性化すると考えられるアルギニンバソプレシン(AVP)は、塩味と酸味に対する味覚神経応答を増強する。従って、このホルモンは味覚応答を修飾している可能性がある。本研究では、塩味受容トランスダクション機序におけるバソプレシン及びGTP結合蛋白質の役割を、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に検討した。

実験には、ウシガエルを用いた。舌を摘出し、パパイン処理により単離味細胞を得た。味細胞は、ロッド型細胞とウィング型細胞に分けられた。アムホテリシン-Bを使用した穿孔全細胞クランプ法を用いて味細胞の膜電位を固定し、バソプレシン刺激で誘発される膜電流変化を測定した。味細胞の膜電位を-50mVに保持しバソプレシン(40mU/ml)でロッド型味細胞を刺激すると、内向き電流の発生(14細胞中4細胞)、外向き電流の抑制(14細胞中3細胞)、外向き電流の増強(14細胞中2細胞)といった3種類の応答が観察された。一方、AVPは、ウィング型味細胞に対してはほとんど効果がなかった。以上の結果より、ロッド型味細胞にはバソプレシンまたはこれに類似するペプチドのリセプターが存在し、味覚応答を修飾していることが示唆された。さらにロッド型細胞がAVPに対して様々な応答様式を示すことは、味細胞には異なる複数のリセプターが存在し、その分布状況は細胞ごとに異なることが想像された。しかしながら、AVPによって誘発された3種類の味細胞応答の内、どの応答が味神経応答に対応するのかはよくわからない。

ロッド型味細胞はAVPに対して3種類の応答を示し、これらの応答の発生機序は異なると考えられる。細胞外液および細胞内液のイオン交換実験等を行い各発生機序を同定する必要がある。バソプレシンは哺乳類のホルモンであり両生類であるカエルには存在しないと考えられる。両生類の本来のホルモンであるバソトシンの効果を検討することも興味深い課題である。

9443 ソルト味覚トランスダクション機序におけるGTP結合蛋白質の役割

助成研究者：岡田 幸雄 (長崎大学 歯学部)

共同研究者：宮本 武典 (長崎大学 歯学部)

藤山 理恵 (長崎大学 歯学部)

内田 昌徳 (長崎大学 歯学部)

研究目的

味刺激が味細胞先端の受容膜上のリセプター蛋白に結合すると、細胞内の一連の生化学的反応が進み、味細胞の脱分極及び細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を誘発する。細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇は味細胞からの伝達物質の放出を促し、味覚情報を味覚神経に伝達する。味細胞由来の膜分画試料を甘味を有するショ糖で刺激するとcAMPレベルが上昇するが、苦味を有するデナトニウムに対しては IP_3 レベルが上昇する。これらの応答はGTP依存性を示し、GTP結合蛋白質の関与を示唆する。一方ソルト味覚においては、受容膜先端に存在すると考えられているアミロライド抑制性の Na^+ チャネルまたはアミロライド非感受性のカチオンチャネルを通過して Na^+ が細胞内に入り味細胞を脱分極させる。味細胞は上皮細胞から分化し、他の上皮細胞と同様にそのイオンチャネルはアルドステロンやバソプレシンなどのホルモンによる修飾を受けている可能性がある。バソプレシンは、その V_1 リセプターを介して細胞内の Ca^{2+} レベルを上昇させ、 V_2 リセプターを介してcAMPレベルを増加させるが、おそらくこれらの応答にはGTP結合蛋白質が関与する。一方、バソプレシンは塩味と酸味に対する味神経応答及び味細胞応答を増強するが^{1,2)}、甘味と苦味刺激に対する応答には効果がない。本研究では、塩味受容トランスダクション機序におけるバソプレシン及びGTP結合蛋白質の役割を、パッチクランプ法を用いて電気生理学的に検討する。

研究方法

単離味細胞の作製

実験には200gから500gのウシガエルを用いた。脊髓を破壊した動物から舌を摘出し、酵素処理により単離味細胞を得た^{3,4)}。 Ca^{2+} 一欠如リンガー液中で舌から200～400個の味覚円盤を切り出した。EDTA(2mM)を含む Ca^{2+} 一欠如リンガー液中に10分間保持し、その後L-システイン(8mM)によって活性化したババイン(10 U/ml)を含む Ca^{2+} 一欠如リンガー液で10分間処理した。上清を正常リンガー液に交換し、先端を滑らかにしたバスツールパイペットを用いて組織片を細かくした。単離味細胞はその形態学的特徴から他の細胞と容易に区別できた。味細胞は、細胞体より先端の突起が1本

のロッド型細胞と突起が2~3本のウィング型細胞に分けることができた (図 1)。

膜電流の記録

パッチクランプ法の全細胞クランプ法を用いて味細胞の膜電位を固定し、バソプレシン刺激で誘発される膜電流を測定した⁵⁾。アムホテリシン-B (133 μ g/ml, Sigma A-4888)を電極内液に加え穿孔全細胞クランプの状態にした⁶⁾。この方法を用いることによって細胞内のATPやGTPなどの濃度を自然の状態に保つことができた。パッチ電極は、二段引きプラー (成茂 PD-5)を用いて中芯入りの肉厚のガラスキャピラリー (サミットメディカル、外径 1.4 mm) から作製した。パッチ電極の先端は、マイクロフォージ (成茂 MF-83)を用いて滑らかにした。電極内液を満たした状態での電極抵抗は3~6 M Ω であった。倒立顕微鏡 (オリンパス IMT-2)のステージ上に固定した実験容器内をリンガー液で満たし、底に沈んだ単離味細胞の応答を記録した。パッチ電極は、水圧式マイクロマニピュレーター (成茂 WR-88)で操作した。パッチ電極によって味細胞を軽く吸引しG Ω レベルのシール抵抗を達成すると、アムホテリシン-Bの作用により次第に電気膜容量が増大し1~3分間で穿孔全細胞クランプの状態になった。膜容量補正後、電位固定下でパッチクランプ用増幅器 (日本光電CEZ-2300)を使いながら全細胞電流を測定した。電流シグナルは、pCLMPソフトウェア (Axon)を用いながら5 kHzより高い周波数成分を除き、125 kHzでデジタル化し、0.5~10Hzのサンプリング率で取得し、IBM-PC互換のパソコン内のハードディスクに保存した。pCLMPは、電位固定時のパルス作製にも使用した。不関電極には、塩化銀銀線を用いた。約80%の補正後の直列抵抗は、3~5 M Ω であった。

溶液の組成

正常リンガー液の組成 (mM)は、115 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl₂, 20 glucose, 10 HEPES-Tris (pH 7.2)であった。電極内液の組成 (mM)は、100KCl, 0.1CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES-Tris (pH 7.2)であった。バソプレシン (Sigma V5501)は、最終濃度が40 mU/ml (1 μ M)となるようにマイクロバイペットで実験容器内に加えた。全ての実験は、室温(20~25°C)で行った。

研究結果

アムホテリシン-Bを含むK⁺-電極内液をパッチ電極内に満たして穿孔全細胞クランプをカエル味細胞に適用した。ロッド型細胞は、 -46.4 ± 2.2 mV (Mean \pm SE, N=14)の静止電位、7.3 \pm 0.7 G Ω の入力抵抗及び6.2 \pm 0.5 pFの膜容量を示した。一方、ウィング型細胞は、 -46.7 ± 1.3 mV (N=7)の静止電位、7.2 \pm 1.3 G Ω の入力抵抗及び12.7 \pm 1.3 pFの膜容量を示した。全ての味細胞は、-80mVの保持電位からの脱分極パルスによって一過性の内向き電流と持続性の外向き電流を発生した (図 2)。内向き電流はNa電流であり外向き電流はK電流であることは既に報告した⁷⁾。

味細胞の膜電位を-50 mVに保持しながら-100~100 mVの間のランプ電位変化に対応して流れる膜電流を測定し電流—電圧関係を求めた。40 mU/ml (1 μ M)のアルギニンバソプレシン(AVP)をロッド型細胞に作用させると、ある細胞は一過性の外向き電流の増大の後、持続性の内向き電流を発生した(図 3)。逆に内向き電流発生の後、外向き電流が大幅に増大する細胞も見られた。内向き電流の発生は14細胞中4細胞で観察された。AVPは-50 mVでの内向き電流を 120 ± 55 pA (N=4)増大させた。内向き電流の逆転電位は0 mV近くに存在した。別の細胞は、AVPによって外向き電流がかなり抑制されたが(図 4)、静止電位と入力抵抗の大きさは全く変化しなかった。このタイプの応答は、14細胞中3細胞で見られた。AVPは50 mVでの外向き電流を 85 ± 8 pA(N=3)減少させた。さらにAVPに対して外向き電流の増大を示す細胞も見られた(図 5、14細胞中2細胞)。14細胞中5細胞はAVPに対して何の応答も示さなかった。

ウィング型細胞にAVPを作用させると1細胞だけが外向き電流の増大を示したが、残りの6細胞は全く何の応答も示さなかった(図 6)。

考察

本実験において、カエル味細胞をバソプレシン(AVP)で刺激すると、ロッド型細胞は3種類の応答をしめしたがウィング型細胞はほとんど応答しなかった。おそらく、ロッド型細胞にはバソプレシンまたはこれに類似したペプチドのリセプターが存在するが、ウィング型細胞には存在しないと考えられる。バソプレシンは、GTP結合蛋白質と共役した V_1 リセプターに結合して細胞内 Ca^{2+} レベルを上昇させ、 V_2 リセプターに結合して細胞内cAMPレベルを増加させると考えられている。一方、カエル味細胞においては、細胞内 Ca^{2+} レベルの上昇は内向き電流を誘発する場合と外向き電流を増大させる場合がある⁸⁾。細胞内cAMP濃度の増加は、外向き電流の一成分である静止 K^+ 電流を抑制することによりカエル味細胞を脱分極させる⁹⁾。バソプレシンは、味細胞の基底側膜に存在すると考えられる V_1 またはこれに類似するリセプターに結合し細胞内 Ca^{2+} レベルを上昇させ内向きまたは外向き電流を誘発したのかもしれない。また、別の細胞では V_2 またはこれに類似するリセプターに結合し増加したcAMPによるリン酸化作用により外向き電流を抑制したのかもしれない。従って、バソプレシンのリセプターの分布状況に関しても味細胞は異なった集団から構成されていることが示唆される。

血管灌流法を用いてカエル味細胞にバソプレシンを作用させると、塩味と酸味に対する味神経応答の大きさは増大したが、自発性の発火頻度は変化しなかった¹⁾。現時点では、味細胞のバソプレシンに対する3種類の応答の内、どの応答が味神経に対する効果と対応するのかが明らかではない。cAMPは味神経応答を抑制するので^{1,10)}、バソプレシンの効果をcAMP濃度上昇に原因を求めることはできない。

IP₃-Ca²⁺系及びcAMP系の活性化以外の効果をバソプレシンが有する可能性も否定できない。たとえば、バソプレシンによるGTP結合蛋白質の活性化は、直接イオンチャネルの開閉を修飾するかもしれない。

味覚のトランスダクション機序において、リセプター蛋白が介在する可能性が高い味刺激は、ショ糖などの甘味刺激である。しかしながら、カエルの甘味刺激に対する応答性はあまり強くない。従って、カエル味細胞にGTP結合蛋白質が存在するとしても、それは味物質のリセプターへの結合を介さない味覚トランスダクション機序やホルモンによる修飾作用における役割等が想定される。

今後の課題

本実験において、バソプレシンは、ロッド型カエル味細胞に3種類の応答すなわち内向き電流の発生、外向き電流の増強及び抑制を誘発した。これらの応答の発生機序は当然異なると考えられ、細胞外液及び内液のイオン組成の置換を行い、そのバソプレシン応答への影響を調べる必要がある。

バソプレシンは異なる応答を味細胞に誘発するので、各味細胞は異なるリセプターを持っている可能性がある。従って、V₁及びV₂リセプターの特異的アンタゴニストの効果を調べる必要がある。

バソプレシンは哺乳類のホルモンであり、両生類であるカエルにはほとんど存在しないと考えられる。両生類の類似のホルモンであるバソトシンのカエル味細胞に対する効果等を検討することも興味深い課題である。

引用文献

- 1) Okada, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. (1991) Vasopressin increases frog gustatory neural responses elicited by NaCl and HCl. *Comp. Biochem. Physiol. A* 100, 693-696.
- 2) Gilbertson, T.A., Roper, S.D. and Kinnamon, S.C. (1993) Proton currents through amiloride-sensitive Na⁺ channels in isolated hamster taste cells: Enhancement by vasopressin and cAMP. *Neuron* 10, 931-942.
- 3) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1988) Membrane properties of isolated frog taste cells: three types of responsivity to electrical stimulation. *Brain Res.* 449, 369-372.
- 4) Okada, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. (1994) Activation of a cation conductance by acetic acid in taste cells isolated from the bullfrog. *J. Exp. Biol.* 187, 19-32.
- 5) Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.
- 6) Rae, J., Cooper, K., Gates, P. and Watsky, M. (1991) Low-access resistance perforated

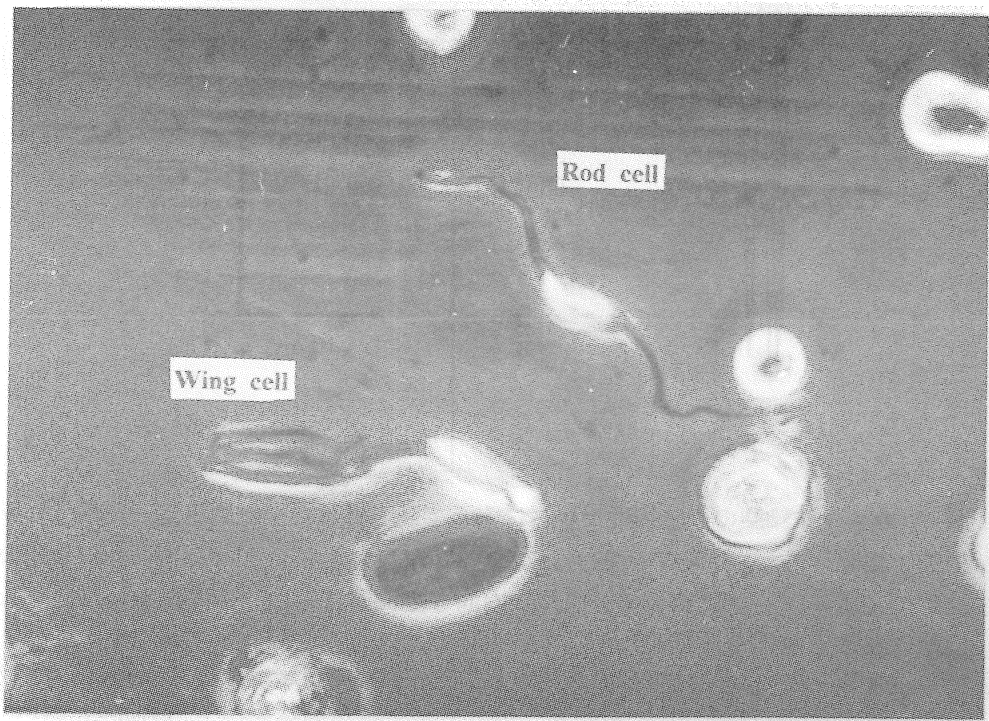
recordings using amphotericin B. *J. Neurosci. Methods* 37, 15-26.

7) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1991) Voltage-gated membrane current of isolated bullfrog taste cells. *Zool. Sci.* 8, 835-845.

8) 岡田幸雄、藤山理恵、内田昌徳、宮本武典、佐藤俊英 (1994) カエル味細胞膜特性に対する細胞内 Ca^{2+} の効果. *日本味と匂い学会誌* 1, 212-215.

9) Avenet, P., Hoffman, F. and Lindemann, B. (1988) Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature* 331, 351-354.

10) Nagahama, S. and Kurihara, K. (1985) Norepinephrine as a possible transmitter involved in synaptic transmission in frog taste organs and Ca dependence of its release. *J. Gen. Physiol.* 85, 431-442.



50 μ m

図 1. ウシガエル舌から単離した味細胞。

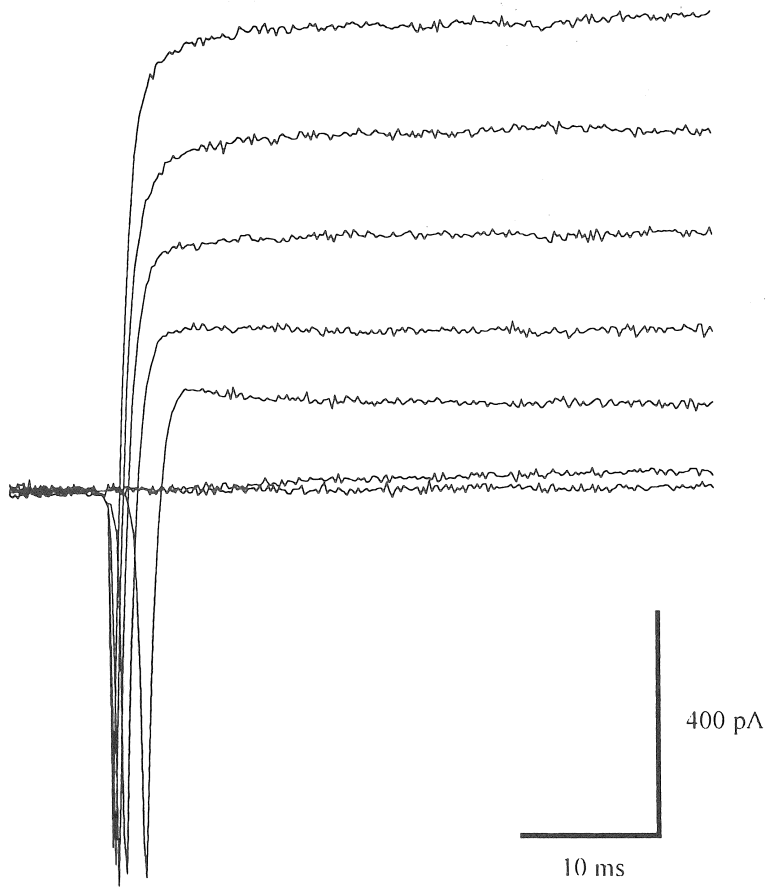


図 2. カエル味細胞の脱分極性パルスによって誘発された全細胞電流。記録はロッド型味細胞から得た。 -80mV の保持電位から 20mV の大きさで -60mV から 60mV の間の電位への電圧ステップによって一過性の内向き電流と持続性の外向き電流が発生した。漏洩性及び容量性電流は記録から差し引いてある。細胞外液及び細胞内液は、それぞれ正常リンガー液と K^+ 電極内液であり、この条件は以下の図でも同様である。

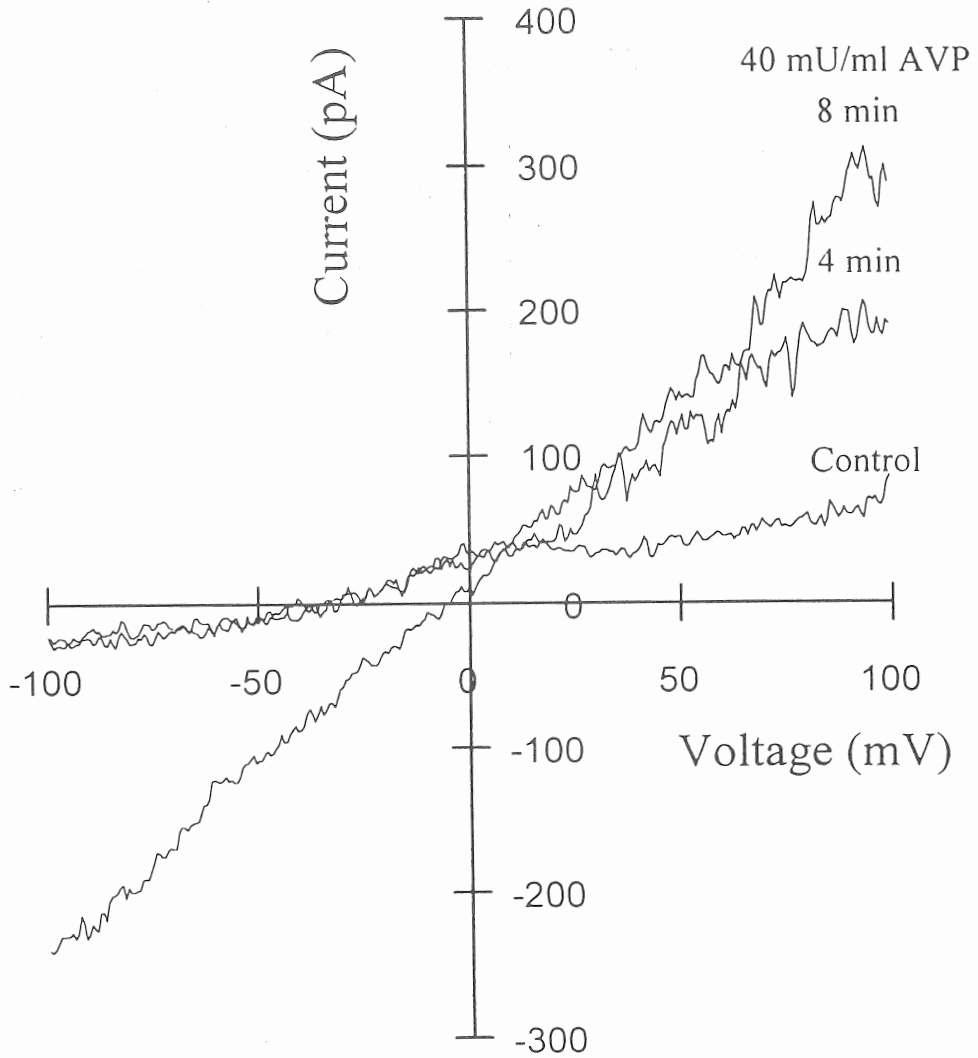


図 3. ロッド型味細胞におけるアルギニンバソプレシン (AVP, 40mU/ml) によって誘発された内向き電流の全細胞電流—電圧関係。電流は-100~100mVの間のランプ電位変化(167 mV/s)によって発生させた。

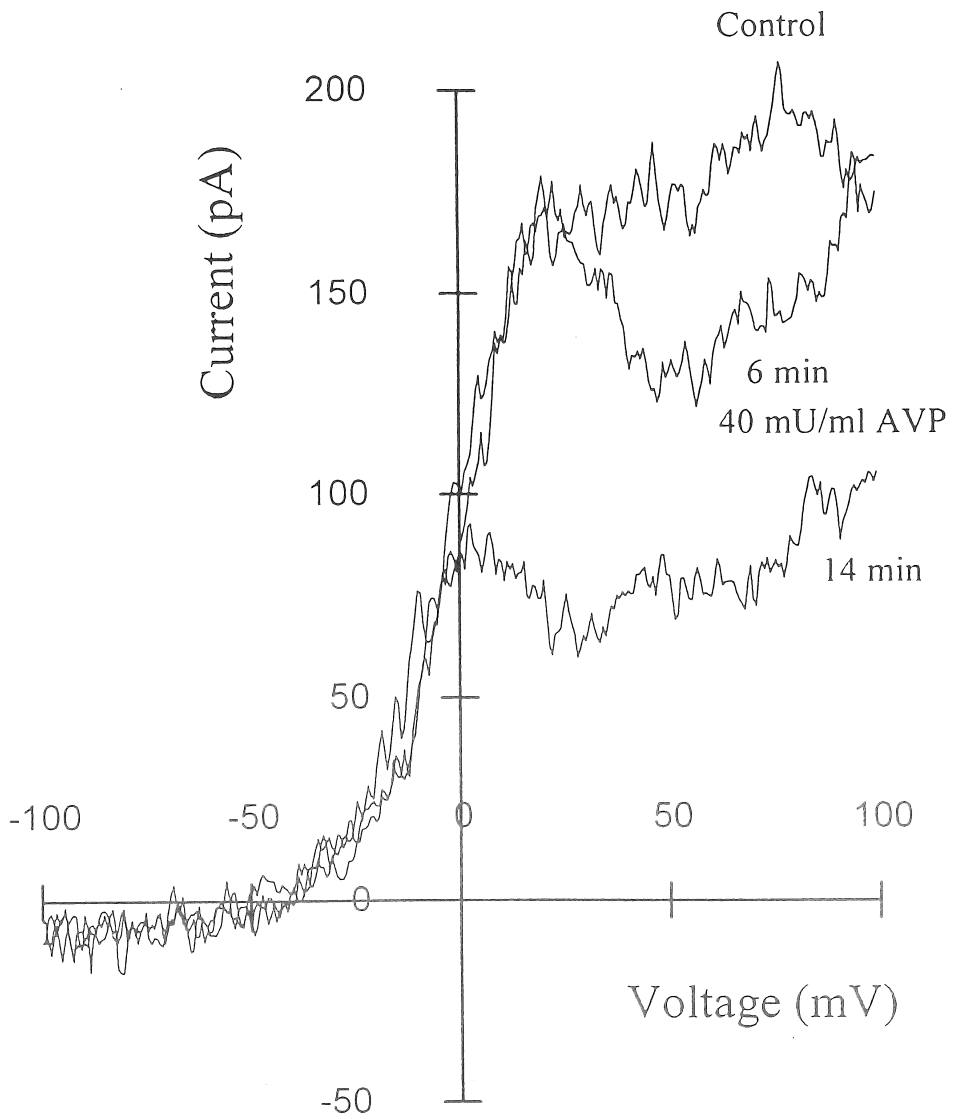


図 4. ロッド型味細胞におけるAVP(40 mU/ml)によって抑制された外向き電流の全細胞電流—電圧関係。電流は、-100~100mVの間ランプ電位変化(167mV/s)によって発生させた。

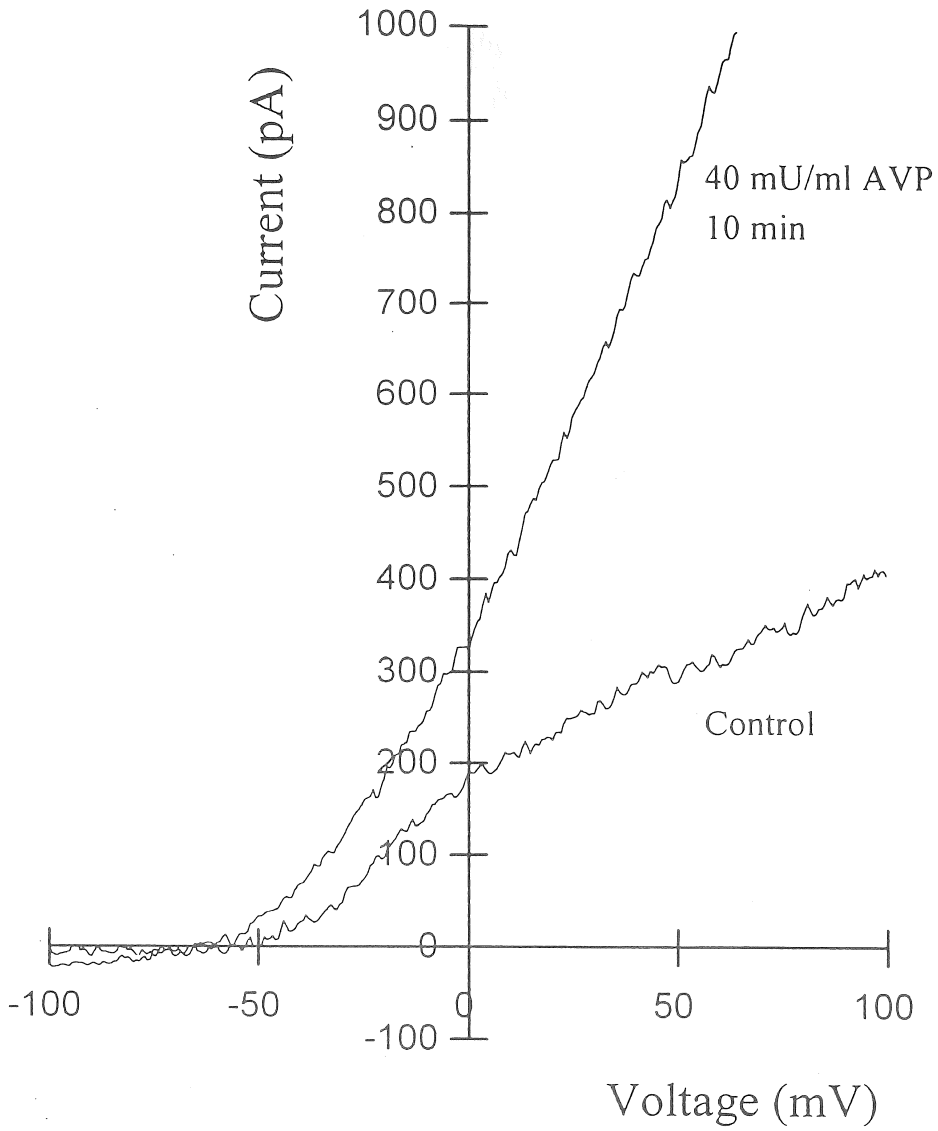


図 5. ロッド型味細胞におけるAVP(40 mU/ml)によって増強された外向き電流の全細胞電流-電圧関係。電流は、-100~-100 mVの間のランプ電位変化(167 mV/s)によって発生させた。

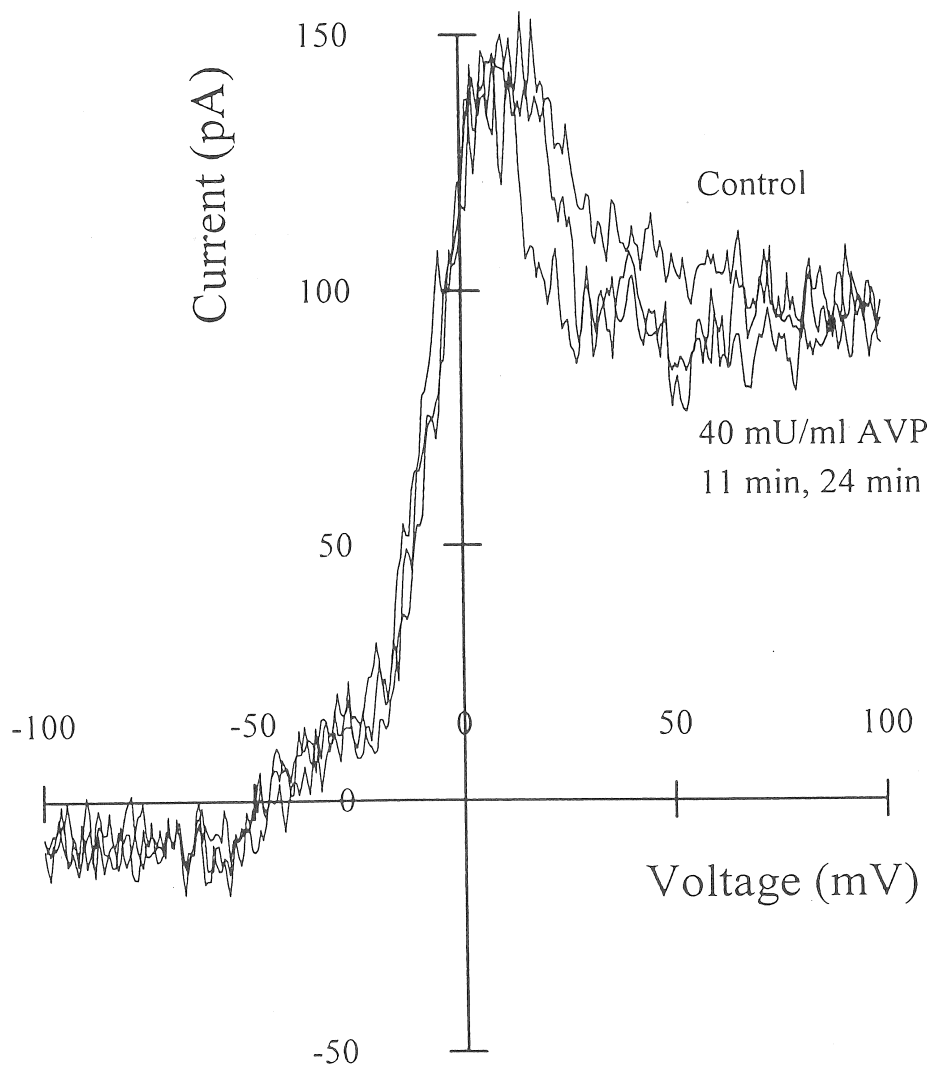


図 6. ウィング型味細胞の全細胞電流—電圧関係へのAVP(40 mU/ml)の影響。電流は、-100~100 mVの間のランプ電位変化(167 mV/s)によって発生させた。AVPは、何の応答もウィング型細胞に誘発しなかった。

Role of GTP-binding protein on salt taste transduction mechanism

Yukio Okada, Takenori Miyamoto, Rie Fujiyama and Yoshinori Uchida

Department of Physiology, Nagasaki University School of Dentistry

Summary

Taste stimuli interact with receptor proteins located in the receptor membrane, triggering a biochemical cascade that results in membrane depolarization and increase of intracellular Ca^{2+} level. Arginine vasopressin (AVP) which activates GTP-binding protein enhanced the neural responses elicited by NaCl and HCl in the frogs, suggesting that taste response could be modulated by the hormone. In the present study, we examined the effect of AVP on the membrane properties of taste cells isolated from bullfrog using a perforated whole-cell patch-clamp technique. Intracellular substances such as ATP and GTP were maintained naturally by the perforated method using amphotericin-B ($133 \mu\text{g/ml}$). Isolated frog taste cells were classified into two types of rod- and wing-cells. Under holding the membrane potential to -50 mV , AVP (40 mU/ml) induced three kinds of responses in rod cells: appearance of inward current (4 in 14 cells), decrease of outward current (3 in 14 cells) and increase of outward current (2 in 14 cells). The hormone was little efficacious against the membrane properties of wing cells. The results suggested that the receptor protein for AVP-related peptide may exist in rod cells, but that the receptor may not exist in wing cells. Frogs which belong to amphibians do not secrete vasopressin. Further analysis should be done using vasotocin which exists in frogs naturally.