

9547 ソルト味覚トランスダクション機序における細胞内 $Ca^{2+}$ 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)

藤山 理恵 (長崎大学)

内田 昌徳 (長崎大学)

味物質が味細胞の細胞膜上のリセプターに結合すると、細胞内の連続した反応が進み、味細胞の脱分極及び細胞内 $Ca^{2+}$ レベルの上昇を誘発する。シナプス前終末での $Ca^{2+}$ 濃度の上昇は味細胞からの神経伝達物質の放出を促し、味覚情報を味覚神経に伝達する。ソルト味覚においては、アミロライド抑制性の $Na^+$ チャネル又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と考えられている。我々は、微小電極法を用いてカエル味細胞の $NaCl$ に対する受容器電位の発生機序を解析し、応答の大部分を占める成分はアミロライド非感受性であることを明らかにした。本研究では、ソルト味覚トランスダクション機序における細胞内 $Ca^{2+}$ 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。舌を摘出し酵素処理により単離味細胞を得た。味細胞は、ロッド型細胞とフォーク型細胞に分けられた。通常及び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、各種薬剤で誘発される膜電流を測定した。味細胞の膜電位を $-50\text{ mV}$ に保持しながら $Ca^{2+}$ イオノフォアであるイオノマイシン( $3\text{ }\mu\text{M}$ )で刺激すると、味細胞は平均して約 $200\text{ pA}$ の内向き電流を発生した。この内向き電流の発生により、味細胞の静止電位は脱分極し、コンダクタンスは増大した。ロッド型細胞とフォーク型細胞の間に応答性の違いは認められなかった。電極内液の $Ca^{2+}$ 緩衝剤を $1\text{ mM EGTA}$ から $10\text{ mM BAPTA}$ に交換すると、イオノマイシン誘発電流は大きく抑制された。従って、イオノマイシンはあくまで細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させた結果内向き電流を誘発したと考えられた。電極内液から細胞内に $1\text{ mM }Ca^{2+}$ または $50\text{ }\mu\text{M }1,4,5\text{-IP}_3$ を灌流しても、味細胞は同様な内向き電流を示した。さらに穿孔全細胞クランプ法を適用して、酸味を呈する酢酸で味細胞を刺激すると、コンダクタンスの減少は起こらず、むしろコンダクタンスの上昇を伴う内向き電流を発生した。以上の結果をまとめて考察すると、カエル味細胞を酸で刺激すると細胞内 $IP_3$ レベルの上昇が起こり、増加した $IP_3$ は細胞内貯蔵部位から $Ca^{2+}$ を放出させ細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度は上昇する。細胞内 $Ca^{2+}$ は非選択性カチオンチャネルを活性化するので味細胞は脱分極するといったトランスダクション機序のスキームが考えられる。また、このカチオンチャネルは、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が静止レベルでもある程度開口しておりソルト味覚の発生機序の一因とも考えられる。今後、味細胞を塩や酸で刺激すると本当に細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が上昇するかをfura-2などの蛍光指示薬を用いて光学的に解析する予定である。



9547 ソルト味覚トランスダクション機序における細胞内 $Ca^{2+}$ 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）

藤山 理恵（長崎大学）

内田 昌徳（長崎大学）

## 研究目的

呈味物質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、細胞内の連続した反応が進み、味細胞の脱分極及び細胞内 $Ca^{2+}$ レベルの上昇を誘発する<sup>1)</sup>。シナプス前終末での $Ca^{2+}$ 濃度の上昇は味細胞からの神経伝達物質の放出を促し、味刺激の質や強さなどの味覚情報を味覚神経に伝達する。味蓄試料を甘みを呈するショ糖で刺激するとcAMPレベルが上昇するが<sup>2)</sup>、サッカリン（人工甘味料）やデナトニウム（苦味物質）に対しては $IP_3$ レベルが上昇する<sup>3,4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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 $Na^+$ チャネル又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<sup>6)</sup>。ソルト味覚に対するアミロライドの抑制効果の程度には動物により差があり、同じ動物においても抑制される成分と抑制されない成分が存在する。我々は、微小電極法を用いてカエル味細胞のNaClに対する受容器電位の発生機序を解析し、応答の大部分を占める成分はアミロライド非感受性であることを明らかにした<sup>7,8)</sup>。本研究では、ソルト味覚トランスダクション機序における細胞内 $Ca^{2+}$ 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。

## 研究方法

## 味細胞の単離

実験には200～500gのウシガエルを用いた。脊髄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<sup>9)</sup>。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本のフォーク型細胞に分けることができた。

## 膜電流の記録

パッチクランプ用増幅器（日本光電 CEZ-2300）を用いて味細胞の膜電位を全細胞クランプ法で固定し<sup>10)</sup>、各種薬剤で誘発される膜電流を測定した。時には、電極内液にアムホテリシンB（133 $\mu$ g/ml）を加えて穿孔全細胞クランプ法を用いた<sup>11)</sup>。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パイレックスガラスキャピラリーから作製した。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5～10 M $\Omega$ 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、水圧式マイクロマンピュレータ(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 5~20 G $\Omega$  のシール抵抗を達成した。10 mV の過分極性パルスを送りながらパッチ電極を強く吸引すると容量性の電流成分が急速に増大し、通常的全細胞クランプ状態の達成を確認した。アムホテリシンBを電極内液に加えた場合、G $\Omega$  レベルのシール抵抗を達成後次第に容量性電流が増大し、1~3 分間で穿孔全細胞クランプの状態になった。膜容量と直列抵抗を適切に補正した。電流シグナルは、pCLAMP 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、0.25 Hz 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。pCLAMP 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。

#### 溶液の組成

正常リンガー液の組成(mM)は、115 NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 20 glucose, 10 HEPES-Tris (pH 7.2)であった。通常電極内液の組成(mM)は、100 KCl, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES-Tris (pH 7.2)であった。イオノマイシン(Calbiochem)は、1 mM の濃度で DMSO に溶かして保存し、実験時最終濃度が 3  $\mu$ M になるように細胞外液に加えた。イノシトール1,4,5-三リン酸(IP<sub>3</sub>, 50  $\mu$ M, Sigma)は、電極内液に加えた。Ca<sup>2+</sup>注入の実験の時、電極内液から EGTA を除き 1 mM CaCl<sub>2</sub> を加えた。全ての実験は、室温(20~25°C)で行った。

#### 研究結果

##### イオノマイシンに対する応答

カエル味細胞の膜電位を -50 mV に保持しながら -100~100 mV の間のランプ電位変化(167 mV/s)に対して流れる膜電流を測定し、電流-電圧関係(I-V 関係)を求めた。ロッド型細胞とフォーク型細胞は、それぞれ、S字状と釣り鐘状の I-V 関係を示した(図省略)。電極内液に 1 mM EGTA を加えて静止時の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を約 17 nM とし、細胞外液に Ca<sup>2+</sup>イオノフォアであるイオノマイシン(3  $\mu$ M)を加えると、ロッド型細胞は -50 mV の保持電位で  $-230 \pm 20$  pA (mean  $\pm$  SE, n=8)の内向き電流を発生した(図1)。この内向き電流の発生によりロッド型細胞の静止電位は  $-49 \pm 3$  mV から  $-7 \pm 1$  mV に脱分極し、入力抵抗は  $4.8 \pm 0.7$  G $\Omega$  から  $0.2 \pm 0.1$  G $\Omega$  に減少した。この内向き電流は、外液に 2 mM Cd<sup>2+</sup>を加えると部分的に抑制された。フォーク型細胞もイオノマイシンに対して同様な内向き電流 ( $-184 \pm 23$  pA, n=15)を示した。電極内液の Ca<sup>2+</sup>緩衝剤を 10 mM BAPTA(Ca<sup>2+</sup>濃度, 16 nM)に換えることにより細胞内の Ca<sup>2+</sup>緩衝力を増大させた状態で味細胞をイオノマイシンで刺激すると、味細胞は刺激後5分間以内ではほとんど内向き電流を発生せず、むしろランプ電位変化で誘発される外向き電流の減少を示した(図省略)。従って、イオノマイシンは細

胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させることにより内向き電流を発生させたのであり、直接チャネルを活性化したりイオノフォアをイオンが通過して電流が流れたのではないと考えられた。イオノマイシン誘発電流は細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$ を除いても  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下（図1）と同様に観察され（図2A）、この応答には細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入は必要ではないと考えられた。細胞外の  $\text{Na}^+$ を除くとイオノマイシンはコンダクタンスを増大させたが、 $-50\text{ mV}$ での内向き電流の大きさは  $\text{Na}^+$ 存在下の値の16%に減少した（図2B）。しかしながら、外液中の  $\text{Na}^+$ と  $\text{Ca}^{2+}$ を同時に除くとイオノマイシン誘発電流は完全に消失した。細胞内の  $\text{K}^+$ を  $\text{Cs}^+$ に又は  $\text{Cl}^-$ を gluconateに置換しても応答には影響しなかった。以上の結果より、カエル味細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は非選択性カチオンチャネルの開口を誘発すると結論された。

### $\text{Ca}^{2+}$ 注入に対する応答

EGTAを除き  $1\text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ を加えた電極内液で細胞内を灌流すると、ある味細胞はコンダクタンス上昇を伴う内向き電流だけを発生したが（11細胞中5細胞、図省略）、別の味細胞は外向き電流増大の後内向き電流に反転した（11細胞中4細胞、図3）。この内向き電流は、イオノマイシン誘発電流と同様に  $\text{Cd}^{2+}$ によって抑制された。応答の潜時は、1~180秒の広範囲に渡った。ロッド型細胞とフォーク型細胞の間に応答性の違いは認められなかった。

### $\text{IP}_3$ 注入に対する応答

電極内液に  $50\text{ }\mu\text{M}$   $1,4,5\text{-IP}_3$ を加え膜を破り全細胞クランプの状態にすると、急速な内向き電流を示す細胞（36細胞中13細胞、図4）と外向き電流の増大を示す細胞（36細胞中4細胞）が見られた。残りの19細胞は何の応答も示さなかった。 $\text{IP}_3$ に対する応答性には、細胞のタイプによる違いは認められなかった。内向き電流は  $\text{Cd}^{2+}$ によって抑制され（図4）、外向き電流は  $\text{Ba}^{2+}$ によって抑制された。応答の潜時は、1~100秒の範囲に渡った。

### 酸刺激に対する応答

アムホテリシンBを電極内液に加え穿孔全細胞クランプ法を味細胞に適用した。細胞外液である正常リンガー液から pH 緩衝剤を除き酸味刺激である酢酸を加えると、ある細胞は一過性の内向き電流を示しその後外向き電流が増大したが（12細胞中7細胞、図5）、別の細胞は外向き電流だけの増大を示した（12細胞中4細胞、図省略）。酢酸に対する応答性にも、細胞のタイプによる違いは認められなかった。

### 考察

本実験の結果から、 $\text{Ca}^{2+}$ -イオノフォアであるイオノマイシンを細胞外液に加えてカエル味細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を強制的に上昇させると、非選択性カチオンチャネルが活性化さ

れ味細胞は脱分極することがわかった。このチャンネルを  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  及び  $\text{Ca}^{2+}$  が通過することはシングルチャンネルの測定実験でも確認されている<sup>12)</sup>。電極内からの  $\text{Ca}^{2+}$  注入及び  $\text{IP}_3$  注入も同様な内向き電流をカエル味細胞に誘発した。 $\text{IP}_3$  は、一般に細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させると考えられている<sup>13)</sup>。さらに、カエル味細胞は酸刺激によっても同様な内向き電流を示し脱分極した。この結果は、微小電極法で得られた知見と一致する<sup>14)</sup>。一方、ネクテルスの味細胞は、酸刺激によりコンダクタンス低下を伴う脱分極を示す<sup>15)</sup>。同じ両生類であるにもかかわらずカエルとネクテルスでは、酸に対する受容器電流の発生機序が全く異なることは大変興味深いことである。哺乳類のハムスターにおいては、アミロライド感受性の  $\text{Na}^+$  チャンネルを  $\text{H}^+$  が通過して酸応答が起こると云う考えも提出されている<sup>16)</sup>。

本実験では、通常、細胞外液として正常リンガー液を用いたので、実験中ずっと  $\text{NaCl}$  (ソルト) で刺激していたともみることができる。実際、正常リンガー液中の  $\text{Na}^+$  を  $\text{NMDG}^+$  で置換すると味細胞の静止電位は過分極した。従って、正常リンガー液灌流時、カチオンチャンネルはある程度開いていたと考えられる。この細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇によって活性化されるチャンネルは、ソルト味覚の発生機序の一因とも考えられる。

イオノマイシン刺激と  $\text{Ca}^{2+}$  注入は、味細胞の外向き電流を増大させた後内向き電流を発生させる場合があった。一方、酸刺激は、多くの場合、まず内向き電流を誘発しその後外向き電流に反転させた。酸刺激に対するカエル味神経応答は一過性に起こり刺激を続行しても持続した応答の大きさは非常に小さい。酸に対する味細胞応答の時間経過は味神経のそれと矛盾しないと考えられ、味細胞の脱分極に起因して味神経の興奮が発生すると考えられる。この一種の順応現象の詳細は明らかではないが、酸などの自然刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇はマイルドであり、一旦上昇した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞内緩衝作用によって元のレベルに回復されるものと考えられる。また、自然刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の時間的空間的变化は、イオノマイシンによる変化とはかなり異なると想像される。

#### 今後の課題

fura-2 などの蛍光指示薬を用いて細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定し、塩や酸刺激によって誘発される味細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の時間的空間的变化を解析する予定である。

#### 引用文献

- 1) Sato, T., Okada, Y. and Miyamoto, T. (1995) Molecular mechanisms of gustatory transductions in frog taste cells. *Prog. Neurobiol.* 46, 239-287.
- 2) Striem, B.J., Pace, U., Zehavi, U., Naim, M. and Lancet, D. (1989) Sweet tastants stimulate adenylate cyclase coupled to GTP-binding protein in rat tongue mechanisms. *Biochem. J.* 260, 121-126.

- 3) Berhardt, S.J., Naim, M., Zehavi, U., and Lindemann, B. (1996) Changes in IP<sub>3</sub> and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J. Physiol.* 490, 325-336.
- 4) Spielman, A.J., Nagai, H., Sunavala, G., Dasso, M., Breer, H., Boekhoff, I., Huque, T., Whitney, G. and Brand, J.G. (1996) Rapid kinetics of second messenger production in bitter taste. *Am. J. Physiol.* 39. C926-C931.
- 5) McLaughlin, S.K., McKinnon, P.J. and Margolskee, R.F. (1992) Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transduction. *Nature* 357, 563-568.
- 6) Sato, T., Miyamoto, T. and Okada, Y. (1994) Comparison of gustatory transduction mechanisms in vertebrate taste cells. *Zool. Sci.* 11, 767-780.
- 7) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1989) Ionic basis of salt-induced receptor potential in frog taste cells. *Comp. Biochem. Physiol. A* 94, 591-595.
- 8) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1993) Cationic and anionic channels of apical receptive membrane in a taste cell contribute to generation of salt-induced receptor potential. *Comp. Biochem. Physiol. A* 106, 489-493.
- 9) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1991) Voltage-gated membrane current of isolated bullfrog taste cells. *Zool. Sci.* 8, 835-845.
- 10) Hamil, 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.
- 11) Rae, J., Cooper, K., Gates, P. and Watsky, M. (1991) Low-access resistance perforated recording using amphotericin B. *J. Neurosci. Methods* 37, 15-26.
- 12) Fujiyama, R., Miyamoto, T. and Sato, T. (1994) Cation channels in bullfrog taste cell membrane. *Jpn. J. Physiol.* 44(Suppl.), S200.
- 13) Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- 14) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1988) Ionic basis of receptor potential of frog taste cells induced by acid stimuli. *J. Physiol.* 405, 699-711.
- 15) Kinnamon, S.C. and Roper, S.D. (1988) Evidence for a role of voltage sensitive apical K<sup>+</sup> channels in sour and salt taste transduction. *Chem. Senses* 13, 115-121.
- 16) Gilbertson, T.A., Roper, S.D. and Kinnamon, S.C. (1993) Proton current through amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in isolated hamster taste cells: Enhancement by vasopressin and cAMP. *Neuron* 10, 931-942.

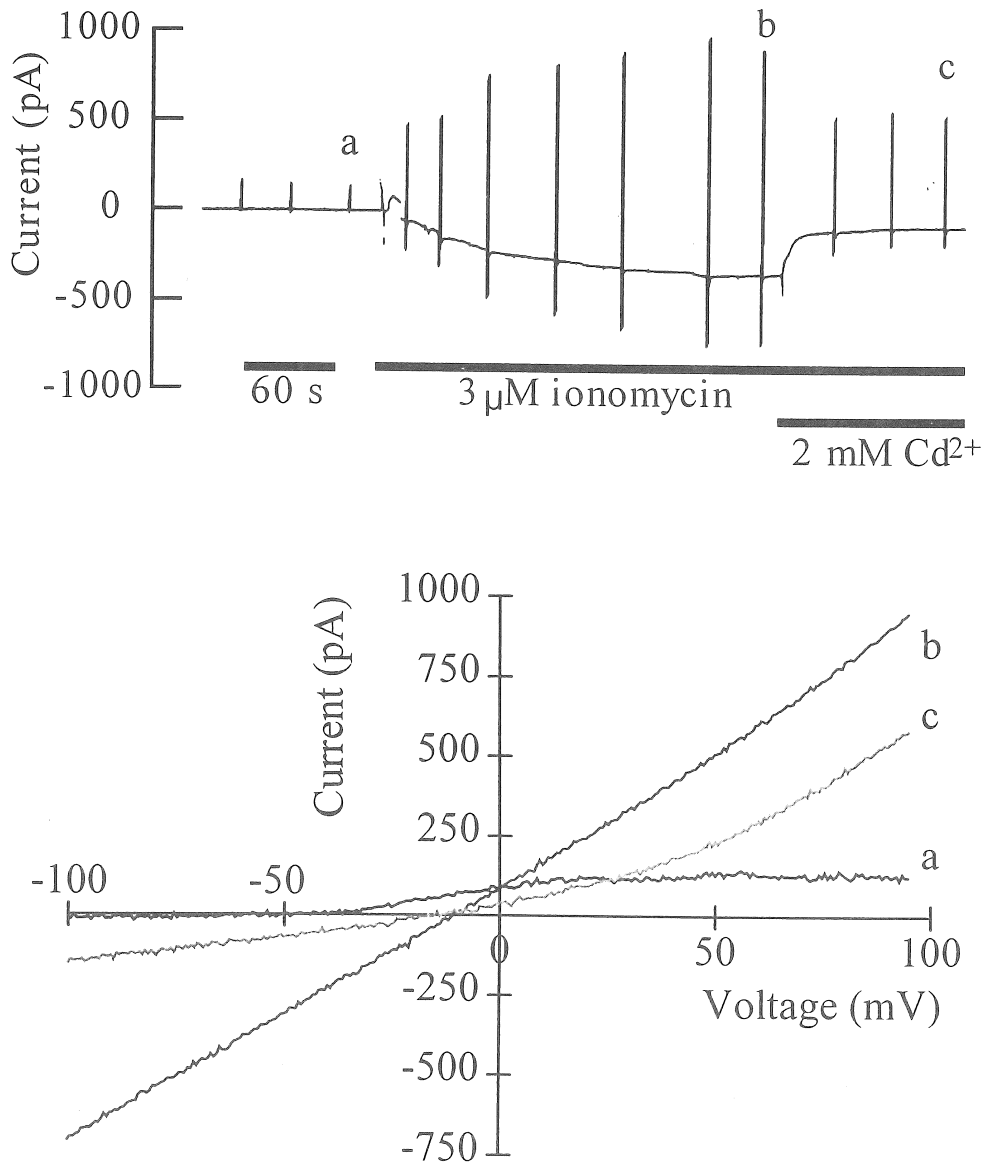
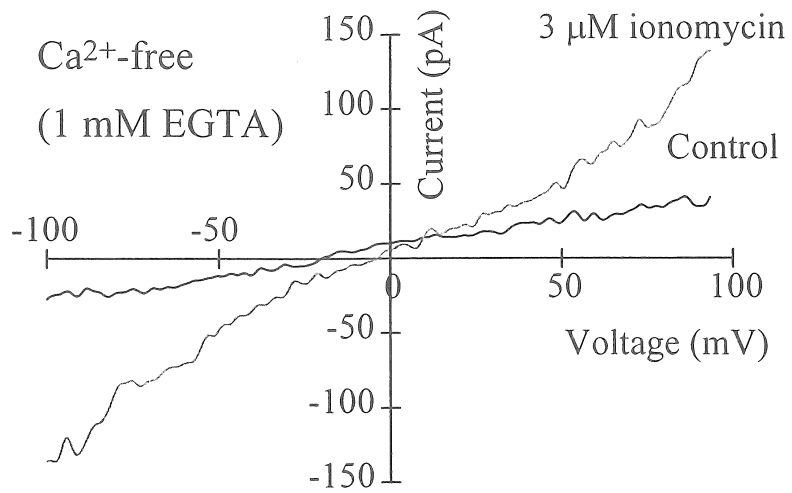


図1. カエル味細胞のイオノマイシンによって誘発された内向き電流。この図と図3~5において、図の上部に膜電位を-50 mV に保持した時の電流シグナルのペンレコーダ記録を示した。下のプロットは、-100~100 mV の間のランプ電位変化(167 mV/s)によって求めた全細胞電流—電圧関係である。電流—電圧関係の各 a,b,c のプロットは、ペンレコーダ記録上の a,b,c で示した時点で求めた。



**A**



**B**

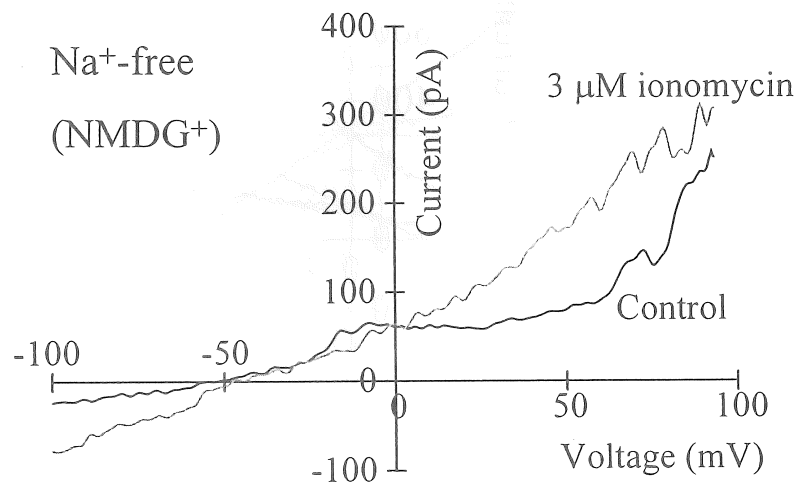


図2. イオノマイシン誘発電流に対する細胞外 Ca<sup>2+</sup>除去(A)及び Na<sup>+</sup>除去(B)の効果。

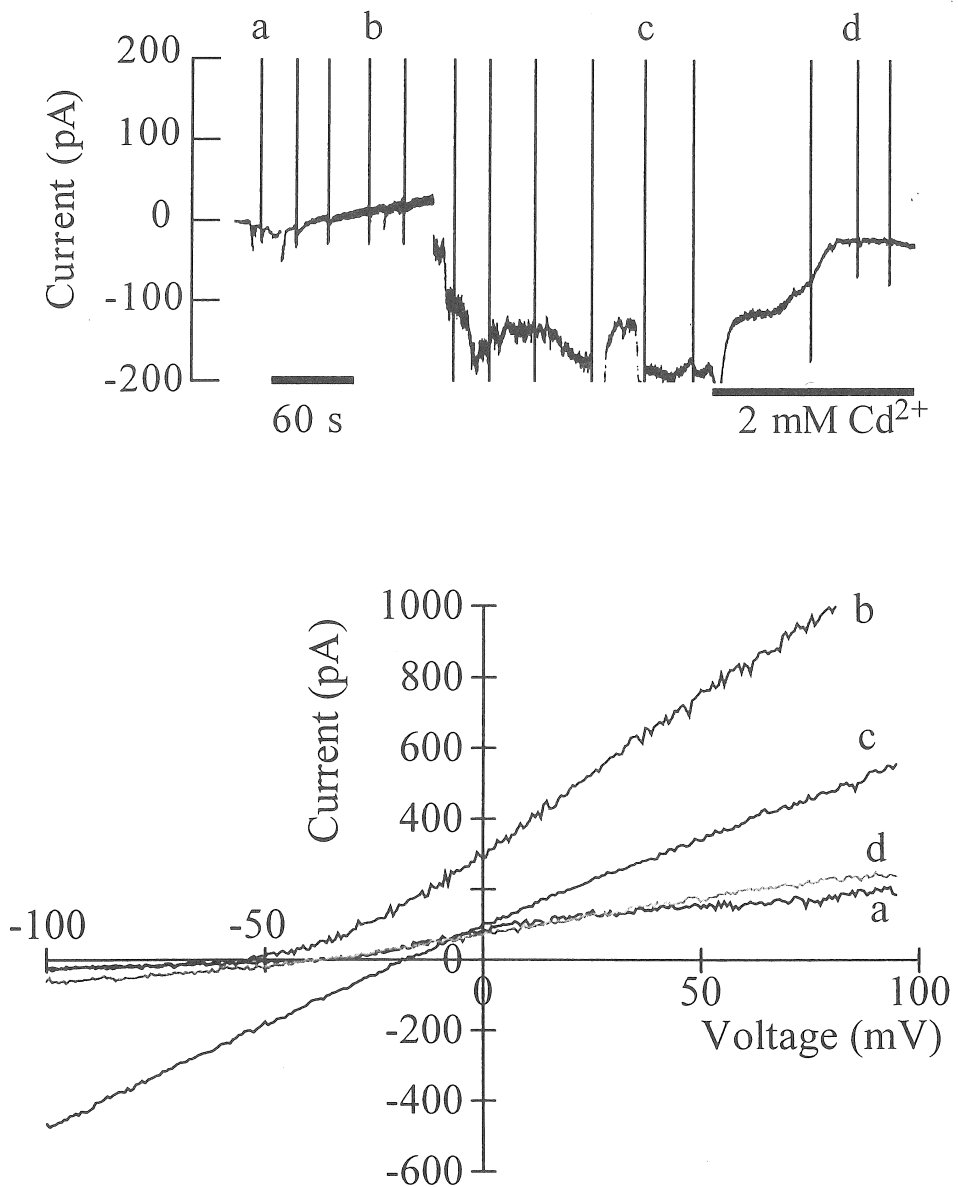


図3. Ca<sup>2+</sup>注入によって誘発された電流。パッチ電極内液は、1 mM Ca<sup>2+</sup>を含んでいた。ペンレコーダ記録のb,c,dの実際の振れは目盛りを越えている。

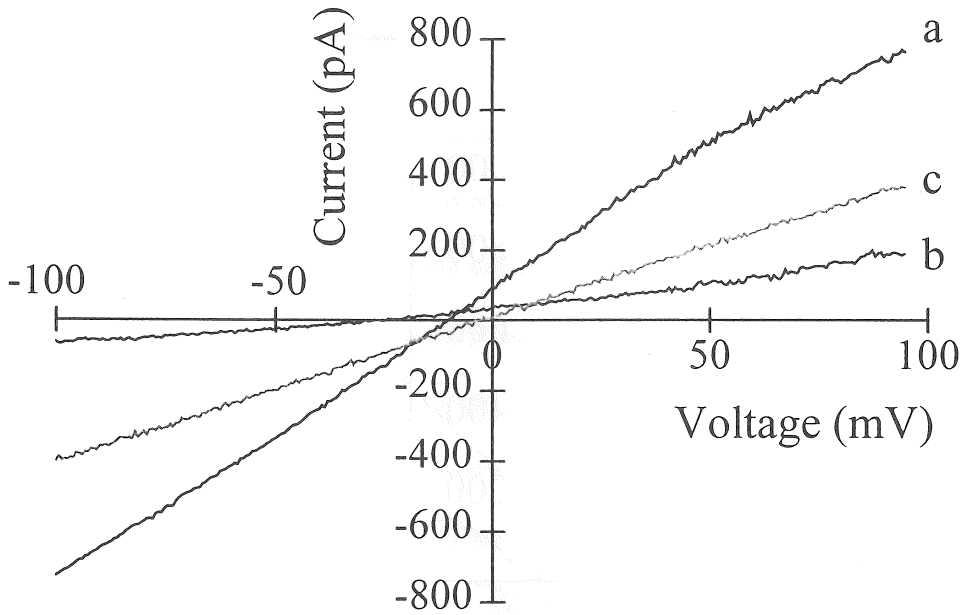
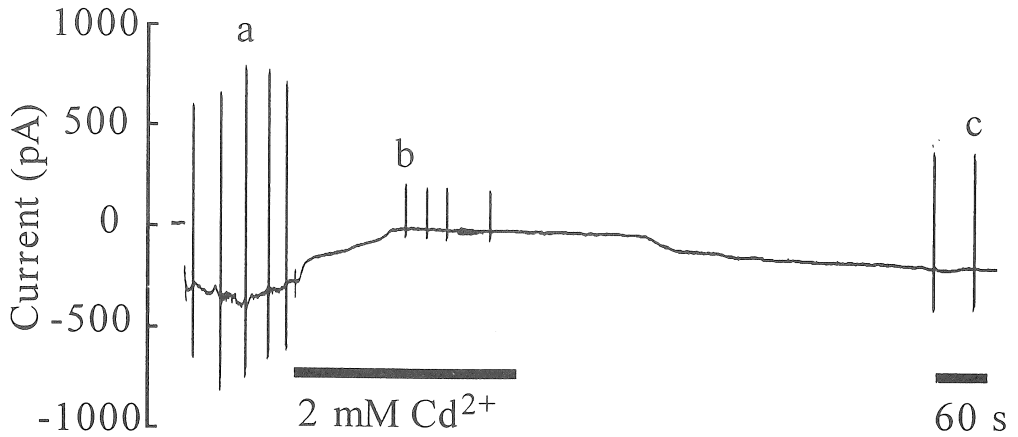


図4. IP<sub>3</sub>注入によって誘発された電流。パッチ電極内液は、50 μM IP<sub>3</sub>を含んでいた。

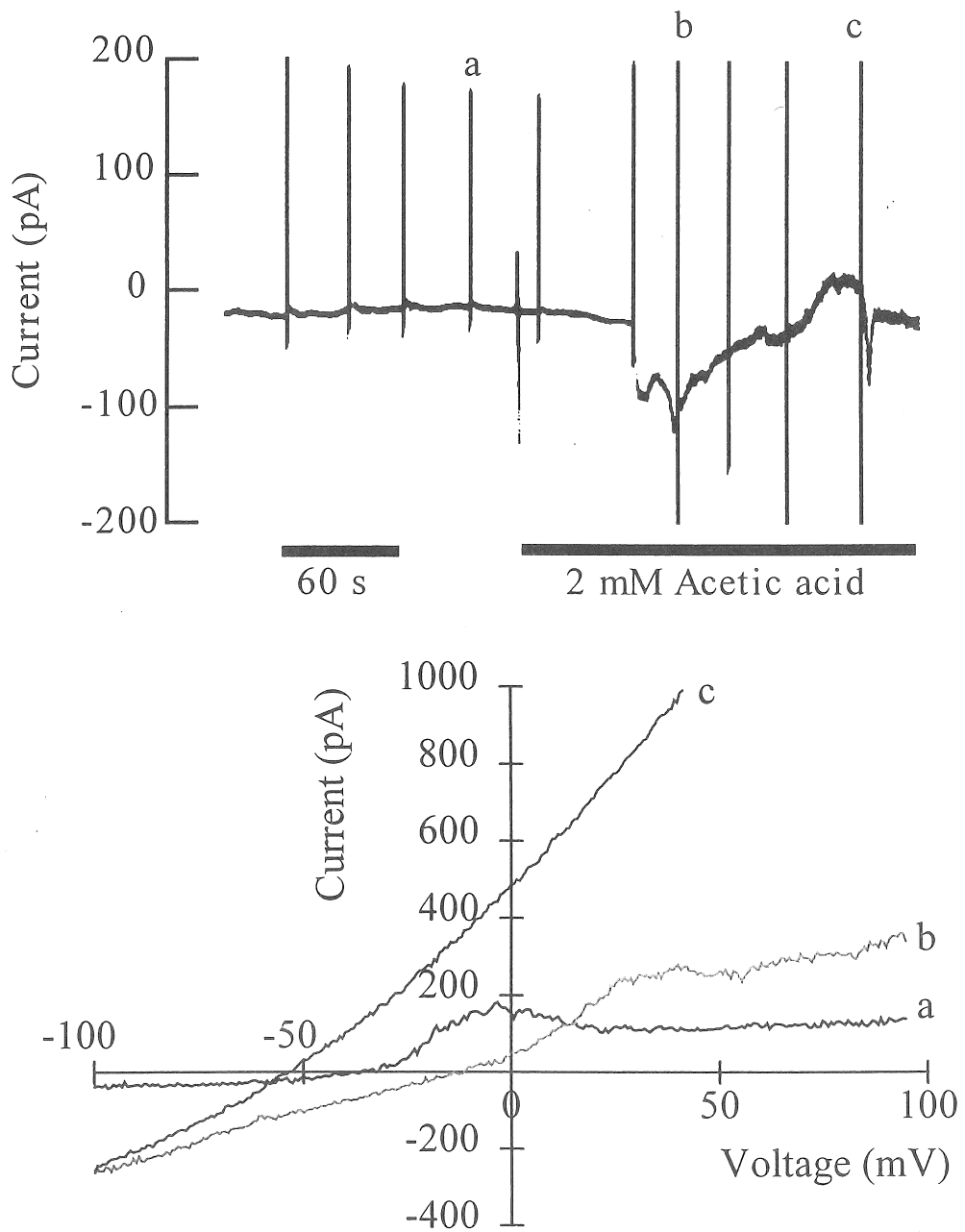


図5. 酸味刺激誘発電流の穿孔全細胞記録。パッチ電極内液は、アムホテリシンB(133  $\mu\text{g/ml}$ )を含んでいた。ペンレコーダ記録のbとcの実際の振れは目盛りを越えている。

Role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  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 bind to specific receptor proteins, triggering an intracellular cascade that results in membrane depolarization and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase. The increase of  $\text{Ca}^{2+}$  level at the presynaptic terminal elicits a secretion of neurotransmitter, communicating taste information to the gustatory nerve. Amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  channel and -insensitive cation channel have been proposed to be related to the salt taste transduction. In the present study, we examined the effect of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level on the membrane properties of taste cells isolated from bullfrogs using a whole-cell patch clamp technique. Under holding the membrane potential to  $-50$  mV,  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore, ionomycin ( $3 \mu\text{M}$ ) induced an inward current accompanied with conductance increase, resulting in membrane depolarization. Elimination of external  $\text{Na}^+$  hyperpolarized the resting potential, and decreased the magnitude of the ionomycin-induced current. Intracellular application of  $50 \mu\text{M}$  1,4,5- $\text{IP}_3$  from the patch pipette and acid stimulus ( $2$  mM acetic acid) also elicited a similar response in frog taste cells. The  $\text{Ca}^{2+}$ -activated conductance may be related to salt and acid taste transduction mechanisms. We would like to examine the effect of taste stimuli on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level measured using an optical method.