

9745 食塩に含まれるうま味情報の味細胞による抽出機構

助成研究者：宮本 武典 (長崎大学 歯学部)

共同研究者：藤山 理恵 (長崎大学 歯学部)

通常塩味を呈すると考えられている食塩も、その濃度によっては甘味や酸味を呈することが知られている。食塩に対する応答はアミロライドに感受性成分と非感受性成分からなる。マウスでは食塩の忌避濃度の閾値に系統差があり、アミロライドに対する感受性と強い相関関係がある。たとえば、アミロライド感受性の系統であるC57BL/6と比較して、アミロライド低感受性であるBALB/cは食塩に対して有意に高い忌避濃度閾値を示す。このことは、アミロライド感受性のトランスダクション経路が主に食塩刺激に含まれる警告的な情報の伝達に関与しているのに対し、非感受性の経路はある種のうま味に類似した好ましい味覚情報の伝達に関与していることを示唆する。本研究では、食塩刺激によって起動されるアミロライド非感受性のトランスダクション経路を味細胞レベルで明らかにすることにより、食塩に含まれるうま味成分の味細胞による抽出経路を検討した。

食塩刺激が味受容膜以外に作用しないように局所味刺激法と非単離味細胞標本を用い、パッチクランプ法によって単一味細胞からのNaCl応答を記録した。0.5 M NaCl刺激によって平均17 mVの応答が得られ、これは50 μ Mアミロライドによって可逆的に抑制された。しかし、抑制は部分的であり、アミロライド作用後でも平均3 mVの非感受性成分が残った。また、NaCl応答がアミロライド非感受性の細胞も存在した。アミロライド感受性細胞と非感受性細胞の出現率には系統差が見られた。味細胞を標準細胞外液順応した場合に、NaCl刺激前後の電流電圧関係の差を取ると、約50%の細胞では負の電圧領域では内向き電流が誘発されているにも関わらず、正の電圧領域では外向き整流性のK⁺電流が抑制された(タイプI)。このほかに、内向き電流のみ誘発されるタイプ(タイプII)および外向き電流の抑制のみ生じるタイプ(タイプIII)が存在した。タイプIIIの応答はBALB/cの味細胞からだけ記録された。10 mM Ba²⁺の局所投与によって、マウス味細胞の味受容膜にはK⁺チャンネルは存在しないことが分かった。また、膜透過性のcAMP類似物質、8cpt-cAMP (500 μ M)によって外向き整流性のK⁺電流の抑制が観察された。また、電流固定下では8cpt-cAMP投与によって膜電位は活動電位を生じながら脱分極した。甘味刺激は味受容膜の受容体と結合し、その結果産生されたcAMPが蛋白キナーゼAを介して基底外側膜にあるK⁺チャンネルをリン酸化によって遮断するとする説が甘味のトランスダクション機構として提唱されている。食塩も同様な経路を活性化して、塩味以外の甘味あるいはうま味様の呈味成分を生じると考えられる。

9745 食塩に含まれるうま味情報の味細胞による抽出機構

助成研究者：宮本 武典 (長崎大学 歯学部)

共同研究者：藤山 理恵 (長崎大学 歯学部)

1. 研究目的

通常塩味を呈すると考えられている食塩も、その濃度によっては甘味や酸味を呈することが知られている^{1, 2)}。少量の食塩はいわゆる隠し味として調理には欠かせない。ラットの食塩に対する応答 (NaCl応答) は利尿剤の1種であるアミロライドに感受性の成分と非感受性成分からなり^{3, 4, 5)}、舌咽神経ではアミロライド感受性成分が欠如している⁶⁾。マウスでは食塩の忌避濃度の閾値に系統差があり、この系統差とアミロライドに対する感受性との間には強い相関関係がある。たとえば、アミロライドに強い感受性を示す系統であるC57BL/6と比較して、アミロライド低感受性である系統BALB/cは食塩に対して有意に高い忌避濃度閾値を示す⁷⁾。このことは、アミロライド感受性のトランスダクション経路が主に食塩刺激に含まれる警告的な情報の伝達に関与しているのに対し、非感受性の経路はある種のうま味に類似した好ましい味覚情報の伝達に関与しており、低濃度の食塩刺激では忌避信号を相殺する可能性を示唆する。

本研究では、食塩刺激によって起動されるアミロライド非感受性のトランスダクション経路を味細胞レベルで明らかにすることにより、食塩に含まれるうま味成分の味細胞による抽出経路を検討した。

2. 研究方法

2. 1. 標本作製・電気的記録

10～15週齢の近交系マウス (C57BL/6、BALB/c) を用いた。ペントバルビタール (30 mg/kg) の腹腔内注入によって不動化後、舌を基部より切除した。舌上皮下に「イスターゼ」 (2 mg/ml, Boehringer Mannheim) を注入し、30℃の標準細胞外液 (mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, 1 pyruvate, pH 7.4) 中での30分間インキュベートにより、味蕾を伴う舌上皮を容易に剥離することができた。剥離上皮を10℃以下の2価イオン除去細胞外液で20分間処理した後、先端直径約100μmのガラス・ピペットで吸引することにより、周辺に上皮片を伴う味蕾標本を得た。まず、味孔が視野の左側に見えるように、実験チェンバー内に味蕾標本を置き、その外縁の上皮片を標本固定用のガラス・ピペットで軽く吸引することで標本を固定した。次に、パッチ電極を味蕾の基底膜側から近づけて味蕾内の細胞にホールセル・クランプを施した。刺激用ピペットは味孔近傍に置かれ、圧力注入によって刺激液や阻害液を投与した。細胞外液を味蕾の基底膜側から味孔

側へ灌流することで味刺激や阻害剤が基底外側膜に作用するのを防ぐことができた⁸⁾。

パッチクランプ法に関しては、Hamil et al (1981)による方法に準じた⁹⁾。NaCl応答前後の電流電圧関係は-80から80 mVへのランプ電圧変化(100 mV/s)によって誘発された電流変化から得られた。パッチクランプ用データ解析プログラムであるpCLAMP(アクソン社)を用いて、電流あるいは電圧信号をデジタル化し、パソコン内のハードディスクに保存した。不関電極にはAg-AgCl電極を用いた。

2. 2. 溶液

味刺激液としては0.5 M NaCl(脱イオン水(DW)に溶解)を用いた。Na⁺による順応効果を除くために、Na⁺-free細胞外液(標準細胞外液中のNa⁺をNMDG⁺(*N*-methyl-D-glucamine⁺)で置換)を用いた。電極内液としては高K⁺液(mM: 120 KCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 11 EGTA, 10 HEPES (pH 7.2))を用いた。アミロライドはDWに溶解し10 mMの濃縮液として-20 °Cで保存し、使用直前に細胞外液にて融解・希釈して用いた。

2. 3. 味細胞の同定

パッチ・ピペットに細胞内液に溶解した蛍光色素ルシファー・イエロー(2 mg/ml、2カリウム塩、Sigma)を充填することで、実験終了後記録した細胞の形状や位置を蛍光顕微鏡で観察することができた。電位依存性のNa⁺電流を有し、紡錘形で先端が味孔に達している細胞を味細胞とした。ルシファー・イエローは味細胞の電氣的応答には影響しなかった。

3. 研究結果

3. 1. 味受容膜のアミロライド感受性電流の系統差

味細胞膜の静止電位は、標準細胞外液に順応した場合-12から-84 mV(平均±標準誤差=-37±4 mV, *n*=26)と広範囲に及んだ。入力抵抗と膜容量はそれぞれ2.6±0.4 GΩ (*n*=26)および5.3±0.4 pF (*n*=26)であった。

前述の味蓄標本と刺激・記録法を用いて、Na⁺-free細胞外液に順応中に、味孔付近に局所的に0.5 M NaClを投与したときに生じた味細胞の応答と50 μMアミロライドによる抑制効果を図1に示す。電流固定下において0.5 M NaClの局所投与によって、速い立ち上がりを示す約20 mVの脱分極応答(17±2 mV)が生じ、この応答は50 μMアミロライドによって可逆的に抑制された(図1A)。-80 mVでの電圧固定下でも0.5 M NaClに対する同様な電流応答とアミロライドによる抑制が観察された(図1B)。しかし、アミロライドによる抑制は部分的であり、アミロライド作用後でも平均約20%の非感受性成分が残った。このことは単一の味細胞の

NaCl応答にアミロライド感受性と非感受性の応答が混在していることを示す。また、0.5 M NaCl応答にはアミロライド投与による電流変化が観察されない場合（アミロライド非感受性応答）も存在した（図1C）。0.5 M NaCl応答のアミロライドによる抑制率には系統差が存在した。アミロライド感受性の系統であるC57BL/6マウスでは64%の味細胞（14個中9個）のNaCl応答がアミロライドによって抑制されたが、アミロライド低感受性のBALB/cマウスでは36%の味細胞（11個中4個）のNaCl応答が抑制された。

3. 2. アミロライド非感受性成分：外向き整流性K⁺電流の抑制

標準細胞外液順応時に、味受容膜への0.5 M NaCl刺激により誘発された味応答中（図2A、B）の電流電圧関係は味刺激前より正方向へシフトした（図2C）。NaCl投与前後の電流電圧関係の差を取ると、負の電圧領域では内向き電流が誘発されているにも関わらず、正の電圧領域では外向き整流性のK⁺電流が抑制されていることが分かった（図2D）。負領域で生じる内向き電流はアミロライド感受性あるいはカチオン電流による応答であると考えられる。K⁺チャンネルのブロッカーであるBa²⁺（10 mM）を味受容膜に直接投与しても外向き整流性K⁺電流は変化しなかった（図3A）が、細胞外液中に投与するとK⁺電流は可逆的に抑制された（図3B）。これは味受容膜にはK⁺チャンネルが存在しないことを示唆する。膜透過型のcAMPである8cpt-cAMP（500 μM）を細胞外液に投与すると味細胞膜は活動電位を発しながら脱分極した（図4A）。8cpt-cAMP投与前後の電流電圧関係では外向き電流の顕著な抑制が観察された（図4B、C）。

3. 3. アミロライド非感受性成分の系統差

標準細胞外液順応時におけるNaCl応答は3つのタイプに分かれた（図5A、B、C）：（1）負電圧領域で内向き電流が誘発され、正電圧領域で外向き電流が抑制されるタイプ（タイプI）；（2）内向き電流のみ誘発されるタイプ（タイプII）；（3）外向き電流の抑制のみ生じるタイプ（タイプIII）である。この3つのタイプの出現率にも系統差が見られた（図5D）。C57BL/6ではタイプIとタイプIIで応答の80%を占めたが、BALB/cでは60%であった。一方、タイプIIIはBALB/cだけで観察された。

4. 考 察

NaCl応答はアミロライド感受性成分と非感受性成分から構成されてお^{3、4、5}、味神経応答の研究からアミロライド感受性成分には系統差が存在することが知られている⁷。また、間接的な方法ながら味細胞のNaCl応答自体のアミロライ

ド感受性も報告されてきた^{10、11)}。しかしながら、味受容膜にだけ与えられたNaCl刺激に対する味細胞の膜電位または膜電流応答へのアミロライドの抑制効果を直接的に実証したのは本研究が初めてである。予想されたように、アミロライド感受性味細胞と非感受性味細胞が存在しその出現率に系統差が存在した。一方、予想に反して、アミロライド感受性味細胞のNaCl応答にも非感受性成分が含まれることが分かった。単一味神経応答のレベルでもアミロライド感受性NaCl応答はアミロライドで完全には抑制されない¹²⁾ことと一致する。また、本実験では味細胞のアミロライド感受性に系統差が見られたにも関わらず、その差は予想されたほどには大きくなかった。これらの結果は、アミロライド感受性味細胞の情報はアミロライド感受性単一味神経に、非感受性NaCl応答の情報は非感受性単一味神経応答に収束していることを示唆する。BALB/cでは未知のメカニズムによって、アミロライド感受性の味細胞応答が味神経に伝達されないのかも知れない。

一方、アミロライド非感受性成分についても系統差が観察された。標準細胞外液順応中のNaCl応答は内向き整流性電流の誘発と外向き整流性K⁺電流の抑制の2成分からなる場合(タイプI)、前者だけ(タイプII)あるいは後者だけ(タイプIII)からなる場合の3タイプに分類された。興味深いことに、このうちタイプIIIはアミロライド低感受性の系統であるBALB/cだけで観察された。本実験の結果やこれまでの報告¹²⁾で示唆されたように、哺乳類の味細胞味受容膜にはK⁺チャンネルは存在しないと考えられるので、味受容膜へのNaCl刺激によるK⁺電流の抑制は何らかのセカンドメッセンジャーを介して生じるのであろう。標準細胞外液順応時のNaCl応答で観察されたのと類似した外向き整流性K⁺電流の抑制が、cAMPの膜透過性類似物質、8cpt-cAMPによっても生じた。電流固定下では8cpt-cAMPの投与によって脱分極が生じ、活動電位の誘発も観察された。味刺激に結合した味受容膜の受容体が、G蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、その結果産生されたcAMPが蛋白キナーゼAを介して基底外側膜にあるK⁺チャンネルをリン酸化によって遮断するとする説が甘味のトランスダクション機構として提唱されている^{13、14)}。アミロライド感受性味細胞と単一味神経との関係で示唆されたように、アミロライド非感受性NaCl応答として外向き整流性K⁺電流の抑制だけを示す味細胞(タイプIII)が特定の単一味神経にだけ情報伝達を行っているとする、BALB/cにはNaCl刺激中に含まれる甘味あるいはうま味要素を伝達し、しかもC57BL/6には存在しないであろう特別の味覚情報伝達経路の存在が予想される。

5. 今後の課題

セカンドメッセンジャーがcAMPであるという積極的な証拠を得る必要がある。また、免疫組織学的方法やボルタメトリーなどを駆使して、どのようなメカニズムで単一味神経

が特定の味細胞の情報を抽出するのかを明らかにする必要がある。

6. 引用文献

- 1) Ossebaad, C. A. and Smith, D. V. (1995) Effect of amiloride on the taste of NaCl, Na-gluconate and KCl in humans: Implications for Na⁺ receptor mechanisms. *Chem. Senses* 20, 37-46.
- 2) Ossebaad, C. A. and Smith, D. V. (1996) Amiloride suppresses the sourness of NaCl and LiCl. *Physiol. Behav.* 60, 1317-1322.
- 3) Sato, T., Miyamoto, T. and Okada, Y. (1994) Comparison of gustatory transduction mechanisms in vertebrate taste cells. *Zool. Sci.* 11, 767-780.
- 4) Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiol. Rev.* 76, 719-766.
- 5) Stewart, R. E., DeSimone, J. A. and Hill, D. L. (1997) New perspectives in gustatory physiology: transduction, development, and plasticity. *Am. J. Physiol.* 272, C1-C26.
- 6) Formaker, B. K. and Hill, D. L. (1991) Lack of amiloride sensitivity in SHR and WKY glossopharyngeal taste responses to NaCl. *Physiol. Behav.* 50, 767-769.
- 7) Ninomiya, Y., Sako, N. and Funakoshi, M. (1989) Strain differences in amiloride inhibition of NaCl responses in mice, *Mus musculus*. *J. Comp. Physiol. A* 166, 1-5.
- 8) Miyamoto, T., Miyazaki, T., Okada, Y. and Sato, T. (1996) Whole-cell recording from non-dissociated taste cells in mouse taste bud. *J. Neurosci. Methods* 64, 242-252.
- 9) 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.
- 10) Avenet, P. and Lindemann, B. (1991) Noninvasive recording of receptor cell action potentials and sustained currents from single taste buds maintained in the tongue: The response to mucosal NaCl and amiloride. *J. Membr. Biol.* 124, 33-41.
- 11) Doolin, R. E. and Gilbertson, T. A. (1996) Distribution and characterization of functional amiloride-sensitive sodium channels in rat tongue. *J. Gen. Physiol.* 107, 545-554.
- 12) Ninomiya, Y. & Funakoshi, M. (1988) Amiloride inhibition of responses of single rat chorda tympani fibers to chemical and electrical tongue stimulation. *Brain Res.* 451, 319-325.
- 13) Tonosaki, K. and Funakoshi, M. (1988) Cyclic nucleotides may mediate taste transduction. *Nature* 331, 354-356.
- 14) Striem, B. J., Naim, M. and Lindemann, B. (1991) Generation of cyclic AMP in taste buds of the rat circumvallate papilla in response to sucrose. *Cell. Physiol. Biochem.* 1, 46-54.

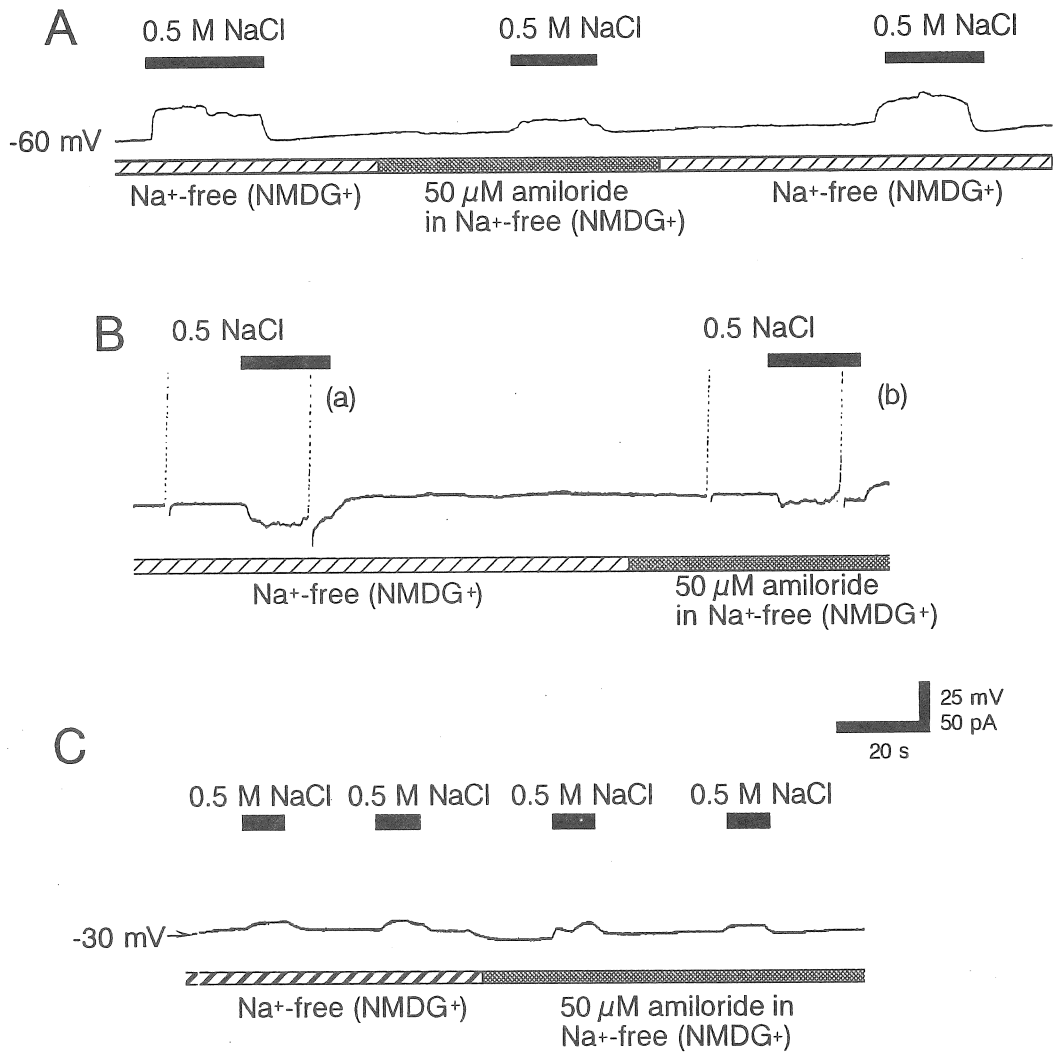


図1 0.5 M NaClによる味受容膜刺激でホールセルクランプ下の味細胞に誘発された塩味応答とアミロライドによる抑制効果。A: 電流固定下での電圧応答。50 μMアミロライドで可逆的に抑制された。B: 電圧固定下での電流応答とアミロライドによる抑制。アミロライドによる抑制は部分的であることに注意。C: 電流固定下でのアミロライド非感受性電圧応答。

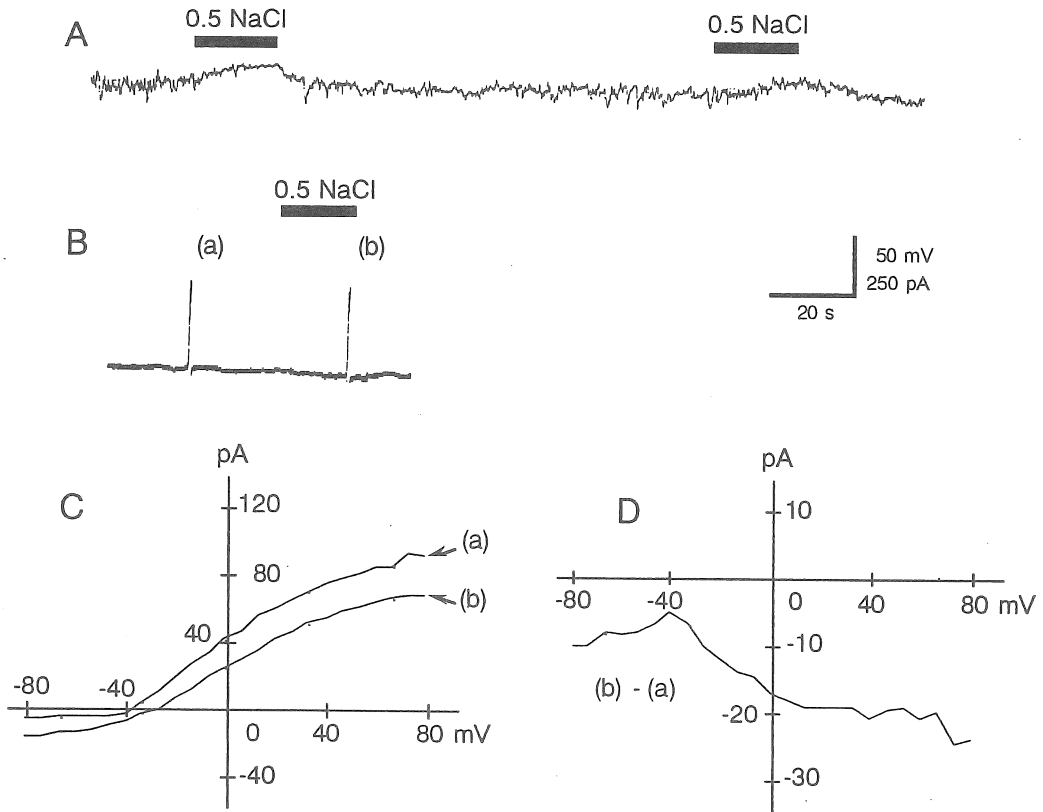


図2 標準細胞外液順応時に0.5 M NaClによって誘発された味応答。A: 電圧応答。B: 電流応答。C: (B)の味刺激前(a)と刺激中(b)での電流電圧関係の比較。刺激中に電流電圧関係が正電圧側(右方)にシフトしている。D: 刺激前と刺激中との電流電圧関係の差((b) - (a))。-40 mVより負電圧では内向き電流が生じ、正電圧側では外向き電流の抑制が見られる。

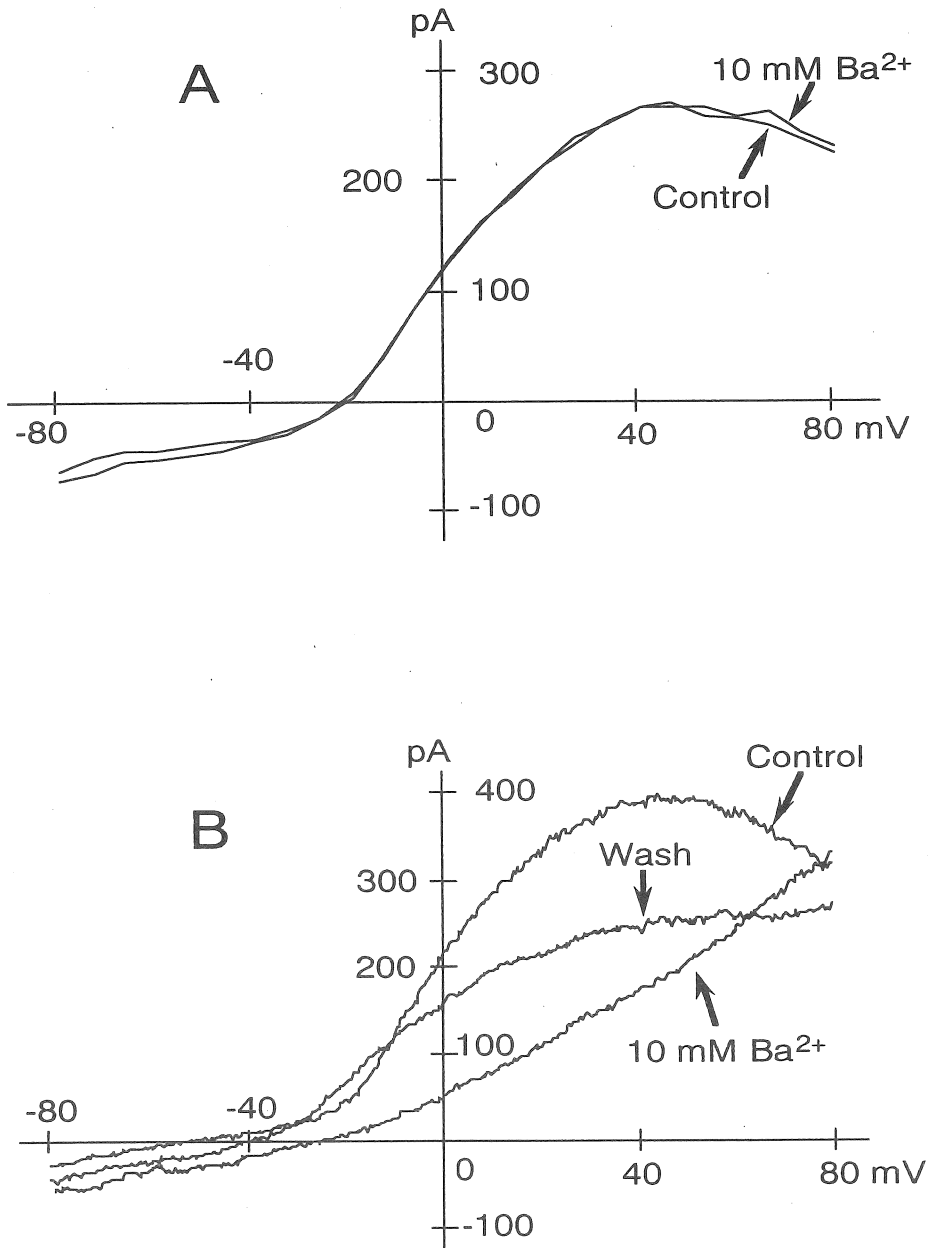


図3 非選択性K⁺チャンネル遮断剤であるBa²⁺による外向き電流の抑制。A: 10 mM Ba²⁺の味受容膜への局所投与。外向き電流はほとんど影響を受けない。B: 10 mM Ba²⁺の灌流液中への投与。外向き電流は可逆的に抑制された。

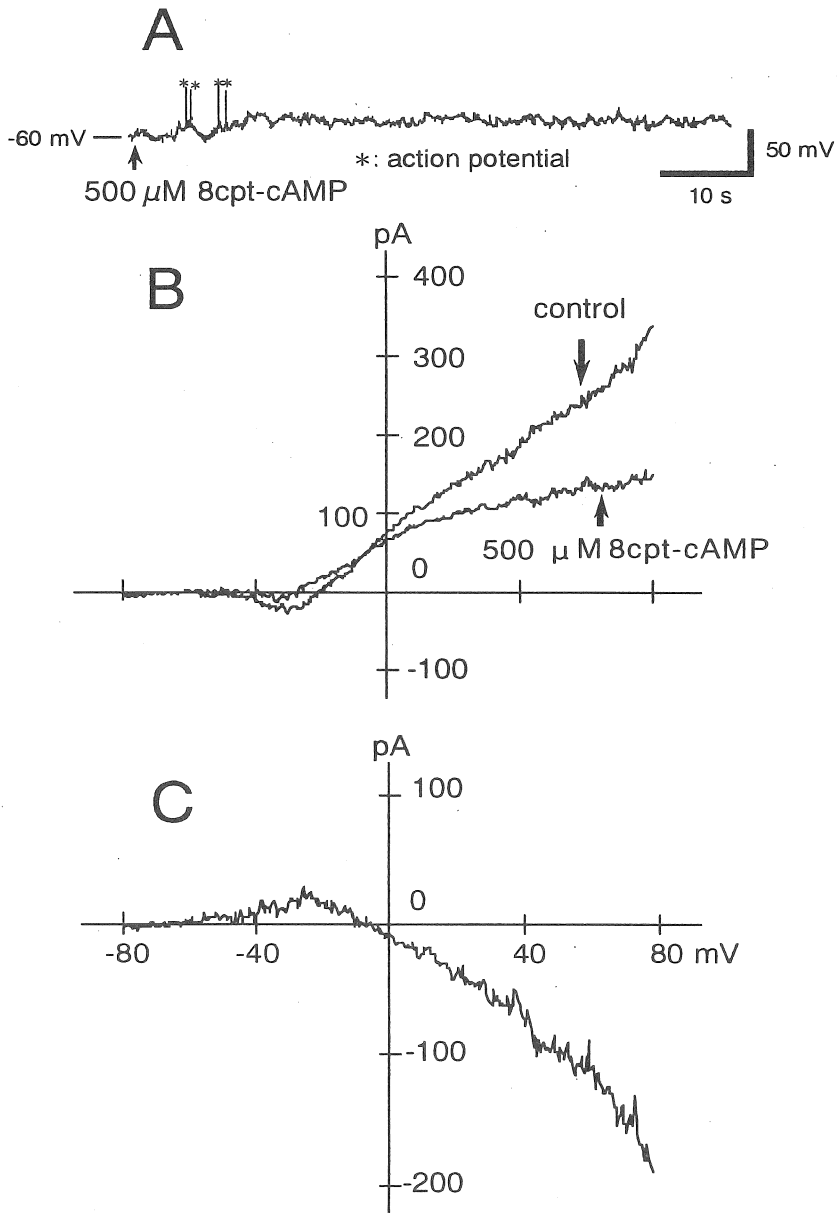


図4 膜透過性cAMP類似物質である8cpt-cAMPの作用。
 A: 電流固定下での500 μM 8cpt-cAMP投与(矢印)による脱分極と活動電位の誘発。
 B: 500 μM 8cpt-cAMP投与前後の電流電圧関係の比較。
 C: 500 μM 8cpt-cAMP投与前後の電流電圧関係の差。外向き電流の顕著な抑制が見られる。

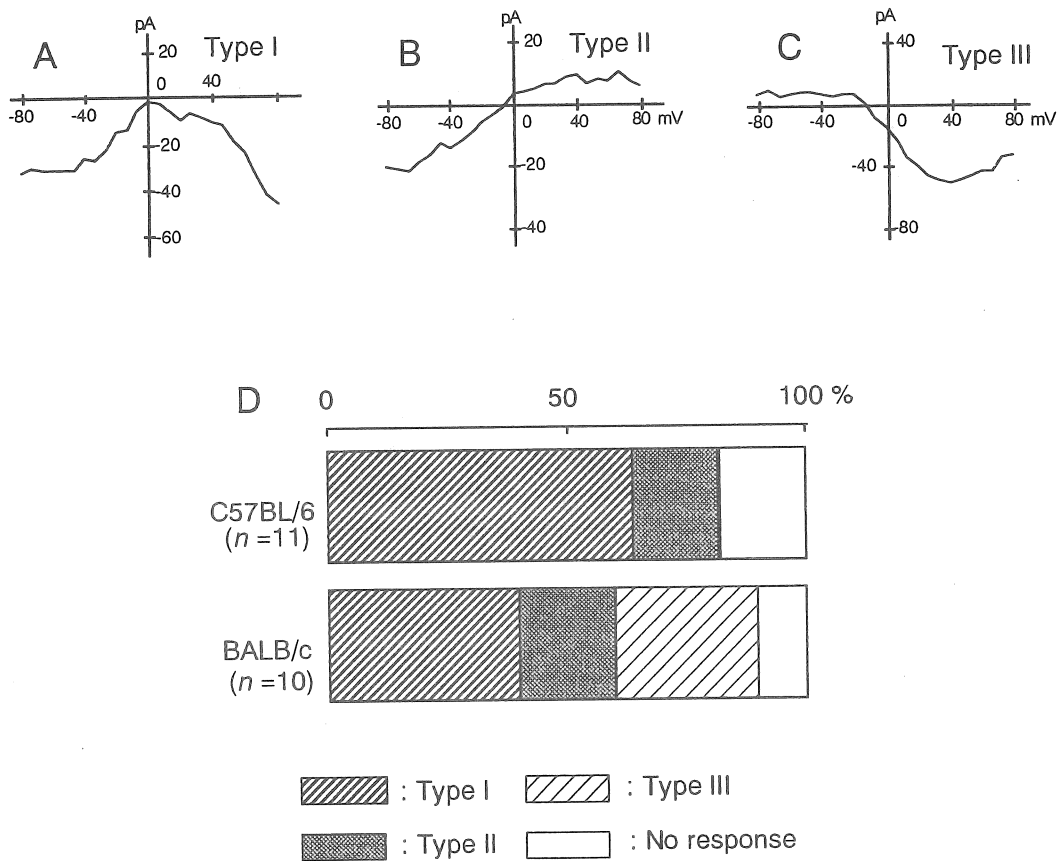


図5 標準細胞外液順応時のNaCl応答の3つのタイプとその系統差。A: 負電圧で内向き電流が生じ、正電圧で外向き電流が抑制されるタイプ(タイプI)。B: 負電圧で内向き電流のみ誘発されるタイプ(タイプII)。C: 正電圧で外向き電流の抑制だけが見られるタイプ(タイプIII)。D: 各タイプの出現率の系統間での比較。タイプIIIは、アミロライド低感受性のマウスの系統、BALB/cだけで観察された。

Transduction mechanism of umami-like taste involved in salt

Takenori Miyamoto and Rie Fujiyama

Department of Physiology, Nagasaki University School of Dentistry

Summary

We performed patch-clamp recordings from non-dissociated mouse taste cells within the taste bud while applying a taste stimulus to the pore. Under this condition, rapid responses to 0.5 M NaCl and suppression by 5~50 μ M amiloride were obtained. We could confirm the presence of amiloride-sensitive and -insensitive taste cells. Salt-induced responses of the amiloride-sensitive taste cells were not completely suppressed by amiloride. In adaptation to the standard extracellular solution, salt-induced responses in 50% of taste cells consisted of generation of the inward current at negative potential level and suppression of the outward current at the positive potential level (Type I). The rest of cells examined showed either generation of the inward current (Type II) or suppression of the outward current (Type III). Type III responses were obtained only from taste cells of BALB/c mice. The similar suppression of the outward current was obtained by 500 μ M 8cpt-cAMP, a membrane permeable analog of cAMP. The absence of K^+ channels was demonstrated by localized application of 10 mM Ba^{2+} to the pore. The suppression of stationary K^+ current by cyclic nucleotide via phosphorylation has been accepted in the transduction pathway of sweet taste. Therefore, the suppression of the outward current generated by salt may be a transduction pathway of the umami-like taste quality involved in salt.