

アルギニンの中和によって付加される塩味感受性の性差の起源の解析

鈴木 恵雅¹, 佐古 隆之², 宮本 武典¹

¹ 日本女子大学理学部, ² 日本女子大学家政学部

概要 苦味と甘味, うま味の複雑な混合味を呈する塩基性アミノ酸としてのアルギニン(Arg)は, 興味深いことに中和することで(中和アルギニン, nArg), 更に塩味加わる(塩味付加)。nArg における塩味付加のメカニズムや性差を含む感受性の個体差および塩味付加による嗜好性の変化を解析することを本研究の目的とした。

今回は, マウス有郭乳頭味蕾スライス標本に加えて味蕾由来細胞(TBD 細胞)にカルシウムイメージング法を適用することによって, Arg および nArg に対する味蕾細胞の応答性を検証した。雌マウスから得られた味蕾細胞の Arg 応答は, すべてホスホリパーゼ C(PLC)阻害剤である U73122 によって抑制されたが, 雄の Arg 応答の 20%は抑制されなかったため, 雄には PLC 非依存型応答発現機構が存在する可能性がある。ほとんどの TBD 細胞では, NaCl 応答と nArg 応答が観察され, 電位依存性 Ca²⁺チャネル阻害剤であるベラパミルで抑制された。NaCl 応答と nArg 応答は交叉順応したため, 共通の刺激受容機構を介して生じると考えられる。

官能評価においては, Arg の中和後(nArg)で生じる塩味に対する感受性には, 性差と言うよりは高濃度で感受性と非感受性の被験者が存在することが明らかになった。感受性の被験者では, テストされたすべての濃度範囲で, nArg によって生じる塩味感受性は, 濃度依存的に上昇し, イノシン酸(IMP)によって感受性が増強された。一方, nArg の苦味は IMP 添加によって濃度依存的に抑制され, 快感が増強された。これらの nArg の塩味, 苦味および快感の官能評価の結果と, 近赤外分光法(NIRS)による前頭前野の脳血流変化量の測定結果との間の有意な相関は, 主として側方部の領域で観察された。しかし, IMP 添加後は, 相関部位は内側部にシフトした。

以上の結果は, nArg の応答は NaCl の塩味受容とは共通のメカニズムを持ち, nArg の塩味には, 雌雄差というよりは高濃度に対して感受性と非感受性の個体が存在すること, IMP による nArg の塩味と快感の増強は苦味の抑制によること, また, nArg と IMP の刺激情報は中枢内の別個の経路を介して処理されるという可能性を示唆する。

1. 研究目的

マウス有郭乳頭味蕾スライス標本を用いた前年度の助成研究により, 味蕾細胞の各味液に対する応答性から, Arg 型, nArg 型, 両応答型の 3 タイプの存在が明らかになった。味受容器である味蕾は, I ~IV 型細胞の 4 種類の細胞で構成され, 一般的に, I 型細胞は味蕾細胞の 50 ~70%でイオンチャネル型受容体を持ち, II 型細胞は 15 ~30%で代謝型受容体を持ち, III 型細胞は 5 ~15%でイオンチャネル型受容体を持つと考えられている⁽¹⁾。このことから, 細胞数が最も多かった Arg 型が I 型細胞, 最も少なかった nArg 型が III 型細胞, Arg および nArg のどちらにも

応答する両応答型が II 型細胞ではないかと考えられた。そして, III 型細胞のみに発現する VCaC⁽²⁾の阻害剤であるベラパミルによって, 両応答型の nArg の応答が抑制されたことから, 少なくとも両応答型は III 型細胞であることが示唆された。以上の結果から, Arg 型および nArg 型は, I 型あるいは II 型細胞のいずれかであり, nArg の塩味受容は, nArg 型あるいは両応答型のいずれかの細胞によることが示唆された。

最近の研究では, 低濃度の塩味はイオンチャネル型受容体, 高濃度あるいは NaCl 以外の塩味は代謝型受容体を介すると報告されている⁽³⁾。Arg は基本的には L-アミノ

酸受容体である T1R1/R3 を介して、II 型細胞に存在する代謝型受容体によって受容される⁽⁴⁾が、Arg を中和して生じる塩味は、どのタイプの細胞によって受容されるのかは明らかでない。

TBD 細胞では、五基本味の受容関連分子の発現が確認されている^(5,6)が、イオンチャネル型受容メカニズムを介する味質にのみ応答を示すという特性が報告されている⁽⁷⁾。TBD 細胞を用いて nArg の応答を調べることにより、nArg の受容にイオンチャネル型受容メカニズムが介在しているかどうかを検証でき、味蕾細胞応答の結果と比較することにより、末梢レベルの性差の起源を探ることが可能である。

一方、前年度の助成研究により、官能評価実験において、女性の方が男性より Arg と nArg の塩味感受性が有意に高いことがわかった。近赤外分光法 (NIRS) を用いて前頭前野における脳血流量変化を計測したところ、Arg と nArg の塩味感受性に同様の性差が観察された。このことを再検証することが本研究の目的の一つである。また、我々は先行研究で、イノシン酸二ナトリウム (Inosine monophosphate disodium, IMP) が Arg や nArg の嗜好性を改善することを、マウスを用いた行動実験で明らかにしてきた⁽⁸⁾。ヒトでも同様の効果が見られるかどうかを検証した。

2. 研究方法

2.1 カルシウムイメージング法

本研究では、ヒトと似た塩味、うま味感受性を持つと言われている近交系マウス (*Mus musculus*, C57BL/6; 三協ラボサービス) の雄、8 週齢以上を用いた。マウス購入後は温度 23°C、湿度 70%、明期 7:00~19:00、暗期 19:00~7:00 の恒温室 (環境生理物性複合解析室、動物環境制御用チャンバー) で飼育した。なお、マウスは大型ケージ (縦 38.5 cm×横 23.5 cm×高さ 14.5 cm) で飼育した。ケージには床敷き (パルソフト 10 kg/箱; オリエンタル酵母) を入れた。固形飼料 (MF 20 kg/袋; オリエンタル酵母) および飲料水 (蒸留水) は自由摂取とした。本研究では上記の飼育環境に 24 時間以上慣らしたマウスを実験に用いた。なお、実験動物の管理および実験の実施にあたっては日本女子大学動物実験規定に従って行った。

味細胞が味応答する際、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇 (Ca^{2+} 応答) する。

蛍光強度変化を指標に $[Ca^{2+}]_i$ を測定する方法であるカルシウムイメージング法を、マウス味蕾スライス標本に適用することで、Arg と nArg の味応答を測定し、マウス味蕾細胞における Arg と nArg の応答様式を細胞レベルで検証した。10%ネンブタール (大日本住友製薬) 1 ml による深麻酔下で、マウスから舌を摘出し、Normal Tyrode 液中で振とうしながら、30 分インキュベートした。舌から有郭乳頭部分をトリミングし、リニアスライサー (堂阪イーエム) にて、有郭乳頭の味溝 (Trench) がはっきりと分かる 100 μ m 厚の味蕾スライスを作成した。1 M 塩酸 (和光純薬) 処理によって洗浄したカバーガラスを、Cell-Tak (Becton Dickinson 社) でコーティングし、味蕾スライスを接着した。

舌切片を接着したカバーガラスに Normal Tyrode 液を添加した。5 mM Fluo-4 AM および 5 mM Fura-Red AM (Invitrogen; Life Technologies Co.) を混合後、ピペッティングし、0.05%ウシ血清アルブミン (BSA) 入り Normal Tyrode 液を勢いよく注ぎ、ボルテックスで攪拌し、色素液を調製した。カバーガラスから Normal Tyrode 液を取り除き、色素液を分注した。アルミホイルで遮光し、4°C で 1 時間インキュベートし、色素を導入した。

TBD 細胞は 100 mm セルカルチャーディッシュ (FALCON, Becton Dickinson and Company) を用いて、5% CO₂ インキュベーター (ワケンビーテック) 内で維持した (継代培養)。細胞培養用培地を 1 ディッシュ当たり 9 mL 添加した。細胞培養用培地 (Sigma) の組成は表 1 に示した。細胞がディッシュの底面積の約 80% から 100% の密度に増殖したコンフルエント状態に達した際は、細胞培養用培地を除去し、 Ca^{2+} と Mg^{2+} を除いたリン酸緩衝液 (以下 PBS (-), 和光純薬) で細胞を洗浄後、0.05%トリプシン-0.02% EDTA (Sigma) 含有 PBS (-) 1 mL を添加し、5% CO₂, 37°C 条件下で 5 分インキュベートし、細胞を回収した。この細胞を細胞培養用培地で 10% の密度で、継代培養を繰り返し、細胞を維持した。

50 ml のシリンジに呈示液を入れ、切片を接着したカバーガラスを貼り付けたレコーディングチャンバー (Warner Instruments) を蛍光倒立顕微鏡 (倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX81, オリパス) にセッティングした。呈示液を 1 ml/秒で灌流し、各味液 (Arg, nArg, NaCl) を 30 秒間呈示した。Fluo-4 AM は蛍光ミラーユニット U-MNIBA3, Fura-Red AM は蛍光ミラーユニット U-MWIG で検出した。

ディスクスリット・ユニット (DSU) 法による擬似共焦点画像法、画像解析ソフトウェア (MetaMorph; モレキュラーデバイスジャパン) を用いて、Ca²⁺ 蛍光指示薬の蛍光強度を測定し、画像化した。また、蛍光強度比 (Δ Ratio = Fluo-4 AM の蛍光強度 / Fura-Red AM の蛍光強度) を算出し、応答の継時的変化をグラフ化した。

2. 2 近赤外分光法 (NIRS)

健常な大学生 12 人 (男子 6 人 22.7 ± 0.2 歳, 女子 6 人 21.8 歳 ± 0.2 歳, 非喫煙者) を対象とした。被験者には事前に、前頭前野にあたる部位に近赤外光分光装置のプローブを装着し生体に近赤外光を通すこと、味液の呈示および官能評価を行うことを説明し、書面にて参加の同意を得た。実験条件として、脳血流量への影響を考慮し、前日の過度の飲酒を禁止し、味覚異常 (味蕾細胞の破壊や味覚神経の損傷) を誘起する可能性を避けるために、当日の強い刺激物 (トウガラシ等) の摂取を禁止した。また、測定直前の食事は実験開始 1 時間前までに済ませるように指示をした。

神経活動時の局所脳血流の変化は、oxyHb の変化と強い相関を示すことが報告されている。本実験においても oxyHb の変化を指標とし、実験開始後 30 秒間の安静状態から味液呈示時間終了までの期間を解析データとして用いた。また、oxyHb 変化量は、安静時を 0 とした時の最大値を用いた。各被験者から得られた全 3 回の測定データを平均し、4 種類の味液についての被験者の生データの平均値およびウォーターテスト平均値を算出した。各味液の生データからウォーターテストのデータを差し引き、味液データとした。

2. 3 官能評価

NIRS を用いた実験の終了後、五基本味の強度、快・不快度、新奇性について VAS (Visual Analogue Scale) 法による官能評価を実施した。五基本味の強度は、最大値を +6、最小値 0 として評価した。快・不快度および新奇性は、最大値を +3、最小値を -3 として評価した。味液 5 ml を盲検法で呈示し、それぞれ濃度の低い順に評価を行った。この際、味液呈示の方法は脳血流測定時と同様に、飲み込まずに吐き出すこととした。

2. 4 統計処理

味蕾スライス標本での味応答の大きさは平均 ± 標準誤差で示し、*t* 検定を行った脳血流変化量は NIRS による測

定により得られた oxyHb 変化量の最大値を算出した。

官能評価の値は、性別、味および性別と味の交互作用について二元配置分散分析 (ANOVA) を行い、交互作用が認められた場合には Bonferroni 法による事後検定を行った。なお、すべての検定において有意水準を 5% 未満 ($p < 0.05$) とした。

3. 研究結果

3. 1 有郭乳頭味蕾スライス標本における Arg および nArg に対する応答の再検討:

前年度の報告書において、有郭乳頭味蕾標本では、Arg にだけ応答する細胞 (Arg 型細胞)、nArg にだけ応答する細胞 (nArg 型細胞)、両方に応答する細胞 (両応答型細胞) の 3 応答タイプの細胞が存在すること、また、III 型細胞にのみ存在すると考えられている電位依存性 Ca²⁺ チャンネル (VCaC) の非特異的阻害剤であるベラパミル (500 μM) によって、少なくとも Arg 型の Arg の応答、両応答型の nArg の応答は抑制されることを報告した。しかし、両応答型の Arg の応答、nArg 型の nArg の応答については未確認であった。

今年度はこれをさらに詳細に調べたところ、Table 1 のような結果になった。Arg 型の応答には、ベラパミル感受性 & 非感受性の応答が見られたが、nArg 型の応答は全てベラパミル感受性であった。一方、両応答型では Arg 応答も nArg 応答もベラパミル感受性であった。これらの結果から、(1) Arg 型のベラパミル非感受性応答以外は、III 型細胞によると考えられること、(2) III 型細胞には 3 つのサブタイプが存在すること、(3) Arg 応答にも 2 種類の受容メカニズムが存在することが示唆された。

雌マウスから得られた味蕾細胞の Arg 応答は、すべてホスホリパーゼ C (PLC) 阻害剤である U73122 によって抑制されたが、雄の Arg 応答の 20% は抑制されなかったもので、雄には PLC 非依存型応答発現機構が存在するかも知れない。両応答型細胞のベラパミル感受性 Arg 応答が、これに相当する可能性がある。

3. 2 TBD 細胞における nArg に対する応答:

150 mM NaCl と 50 mM nArg を続けて呈示すると、nArg 液に対する応答の加重は起きず、交叉順応が観察された。また、上皮性 Na⁺ チャンネル阻害剤の 10 μM アミロライドによって NaCl 応答も nArg 応答もほぼ完全に抑制された。

Table 1. Subtypes of three taste cell types revealed by verapamil-sensitivity of Arg and nArg responses

応答 応答タイプ	Arg 応答	nArg 応答	予想される 味蕾細胞タイプ
Arg 型	—	NR	I 型または II 型
	+	NR	III a 型
nArg 型	NR	+	III b 型
両応答型	+	+	III c 型

+: Verapamil-sensitive responses; -: Verapamil-insensitive responses; NR: No response to Arg or nArg. Note that Type III cell may be divided into three subtypes by verapamil, a nonspecific voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker in adaptation under both Normal Tyrode solution (n=25) and Na^{+} -free Tyrode solution (n=22).

一方、塩基性アミノ酸特異的な受容体である GPRC6A の阻害剤であり、カルシウム受容体 CaSR にも作用すると考えられている 5 μ M カリンドール⁹⁾の NaCl 応答と nArg 応答への有意な作用は観察されなかった。

3. 3 Arg と nArg に対する味覚感受性の官能評価:

全被験者の官能評価(五基本味強度、快・不快度、新奇性)の平均値を男女間で比較し、再検討した結果、性別と nArg の塩味感受性に交互作用は認められなかった。一方、男女間ではなく、むしろ男女いずれにおいても、nArg の塩味に関する高感受性と低感受性の個体が存在することが観察された (Fig. 1A)。

nArg の塩味は IMP の添加により増強される傾向を示し、高感受性、低感受性のどちらの個体群でも同様な傾向がみられたが、この傾向は高感受性群でより顕著であった (Fig. 1B)。

全ての官能評価では、快度、塩味強度、苦味強度について濃度間での有意差が認められた ($p < 0.0001$)。

塩味強度で二元配置 ANOVA を行ったところ、10 mM、50 mM において nArg+IMP が nArg よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

苦味強度および快度では、50 mM において nArg が nArg+IMP よりも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

一方、甘味強度、酸味強度、うま味強度では、濃度間でも、Arg と nArg+IMP 間でも、有意差は見られなかった。

3. 4 脳血流変化量と官能評価の相関関係:

全 16 個のチャンネルでの脳血流変化量と、官能評価で評価を行った五基本味の強度、快度、新奇性との相関関係を調べた。官能評価と脳血流変化量との間の相関関係は、IMP 添加によって変化のあるチャンネルとないチャンネルが存在した。塩味、苦味、うま味、快度において nArg に IMP を添加した際、相関のあるチャンネルの分布が類似していたが、甘味と酸味については同様の傾向はみられなかった。さらに、官能評価で有意差の認められた 3 つの味質について、nArg、nArg+IMP を呈示した際に相関関係のあったチャンネルを比較した。その結果、IMP 添加によって相関のあったチャンネルが減少した。なかでも、苦味、快度においては主に前頭前野左外側部で減少し、塩味においては左右外側部で相関のあったチャンネルで減少がみられた。

4. 考 察

4. 1 味蕾細胞の nArg 応答性:

III 型細胞に特異的に発現している VCaC の阻害剤であるベラパミルを用いた測定を行った。後述するように、ベラパミルにより応答が抑制された細胞は、III 型細胞であると考えられる。これらの III 型細胞は 3 つのサブタイプに分けられるため、それぞれを III a 型細胞、III b 型細胞、III c 型細胞と呼ぶこととした。

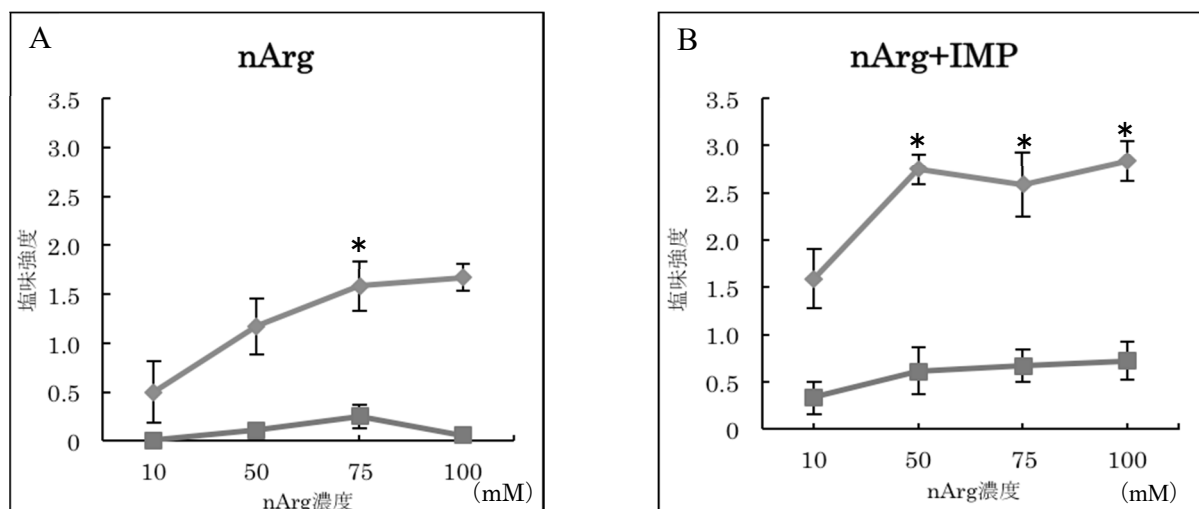


Figure 1. Sensitive and insensitive types to saltiness of nArg and nArg+IMP

A. Comparison of sensitivity to saltiness of nArg. B. Comparison of sensitivity to saltiness of Arg+NaCl. Both types showed enhancement of saltiness of nArg by IMP. (*: $p < 0.05$)

Arg型では、ベラパミルの作用により抑制されない応答と、抑制される応答の2つの応答性が存在した。応答が抑制されなかったArg型は、III型細胞以外、すなわちI型細胞もしくはII型細胞であると考えられる。I型細胞である場合、I型細胞には脱リン酸化酵素であるNTPD2が存在する⁽¹⁰⁾ことから、生じた応答はcAMPシグナル伝達の受容経路で生じた応答であると考えられる。II型細胞である場合、アミノ酸であるArgが呈するうま味や苦味の応答であると考えられる。II型細胞にはArgの受容体の一つとして考えられているT1R1/R3の他に、同じくArgを受容すると考えられている細胞外の Ca^{2+} 濃度を感知するGタンパク質共役型の Ca^{2+} -sensing receptor(CASR)が発現している⁽¹¹⁾。ベラパミルにより応答が抑制されないArg型の応答は、これらの受容体を介する受容経路で生じた応答であることが示唆された。一方、ベラパミルにより応答が抑制されたArg型はIII型細胞であると考えられる。これをIIIa型細胞とした。

本研究において、Arg型には Na^+ 刺激により $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する塩味応答を示す細胞が存在する可能性が考えられ、また雄のマウスにおいてArg応答にはPLC β 非依存性の応答が存在することが明らかになった。IIIa型細胞には、VCaCを介するArg受容経路が存在し、PLC β 非依存性の応答のうちの一つの受容経路として考えられる。

また、IIIa型細胞において、nArgに対する負の応答が

ベラパミルの添加により有意に抑制された。nArgに対する負の応答の要因として、溶液に含まれるCl⁻濃度の変化が考えられる。nArgはArgをHClによって中和したものであるため、nArg溶液を呈示した際、細胞外のCl⁻濃度が上昇する。もし、nArgによってCl⁻チャンネルが開いたとすると、過分極が生じる。それによって既に開いているVCaCが閉じ、nArgに対する負の応答が生じると考えられる。一方、ベラパミルを添加した測定では、ベラパミルを含む順応液を用いて味細胞を順応させているため、刺激前の味細胞はVCaCが既に阻害されている状態である。そのためnArgとベラパミルによる刺激では負の応答は生じないと考えられる。

nArg型では、ベラパミルの作用によりnArg応答が完全に抑制された。このことからnArg型はIII型細胞であり、nArg応答はVCaCを介する受容メカニズムであることが示唆された。これをIIIb型細胞とした。IIIb型細胞のnArg応答は、前述したようにNormal Tyrode液順応で応答が観察されなかったため、NaCl応答に交叉順応している可能性がある。そのため、IIIb型細胞はnArgの塩味応答に関与していると考えられる。

付け加えると、Normal Tyrode液順応下と Na^+ -free Tyrode液順応下でのArg応答およびnArg応答を、先行研究の結果と比較したところ、 Na^+ -free Tyrode液順応下でのIIIb型細胞のArgに対する応答に有意な差があった。

これまではⅢb型細胞のArgに対する応答は報告されていなかったが、本研究ではⅢb型細胞のArgに対する負の応答が観察された。Ⅲb型細胞におけるnArg受容メカニズムは、nArgが受容されることでイオンチャネルが開口し、脱分極することでVCaCを介して細胞外からCa²⁺が流入するというメカニズムが予想される。それに対して、Arg応答はベラパミルにより抑制されないことから、細胞内外でのCa²⁺の出入りによって生じる応答ではないと考えられる。小胞体に存在するCa²⁺ポンプがArgにより活性化し、細胞内のCa²⁺が小胞体内へ移行することで[Ca²⁺]_iが減少する可能性がある。

両応答型ではベラパミルによりArgの応答は部分的に抑制され、nArgの応答が完全に抑制されたため、両応答型もⅢ型細胞であると考えられる(Table 1)。これをⅢc型細胞とした。Argの応答が部分的に抑制されたことから、Arg受容にはVCaCを介する受容経路とVCaCを介さない別の受容経路が存在すると考えられる。一方、nArg型と同様に両応答型のnArg応答が抑制されたことから、nArg受容にはVCaCが関与していると考えられる。

以上の結果から、ベラパミルにより応答が抑制されないArg型はI型、応答が抑制されるArg型、nArg型および両応答型はⅢ型細胞であると示唆され、Ⅲ型細胞にはサブタイプが存在すると考えられる。nArgに応答するⅢ型細胞のうち、150 mM NaClを含むNormal Tyrode液順応で応答がみられなかったⅢb型細胞で観察されたnArgによる塩味応答が、NaClと同様のメカニズムを介して生じることが示唆された。

4.2 nArgの塩味受容メカニズム:

本研究の官能評価の結果より、nArgの塩味受容メカニズムに高感受性と低感受性の受容体が存在することが示唆された。最近、GPRC6Aの存在が知られるようになった⁽¹²⁾。この受容体は、アンドロゲン的一种であるテストステロンの受容体としても知られており⁽¹³⁾、前年度の結果からは、GPRC6AによるArg受容が性差を生じる原因の一つであると考えられた。しかしながら阻害剤であるカリンドールによる効果が見られなかったため、この受容体の関与の可能性はないと考えられる。

一方、イオンチャネル型受容メカニズムだけが機能的発現をすると考えられるTBD細胞でnArg応答が観察されたこと、NaCl応答とnArg応答が交叉順応し、いずれも

アミロライドで抑制されたことから、NaClとnArgの塩味受容メカニズムには共通点が存在する可能性が示唆された。NaClはイオンチャネル型受容体であるENaCを介して受容されるとされている。nArgがどのような受容メカニズムで受容されるかは現段階では明らかとなっていないが、Argの甘味、苦味、うま味は代謝型受容体を介して受容されると考えられる。したがって、nArgで生じる塩味は、Argの受容メカニズムとは全く異なるメカニズムを介することが示唆される。味蕾細胞スライスの結果と考え合わせると、TBD細胞はⅢb型細胞に相当すると考えられる。

4.3 nArgの塩味感受性の個体差:

前年度の報告において、官能評価およびNIRSで測定した前頭前野血流変化量と官能評価との相関関係に性差があることを報告した。しかし、本研究の結果によると性差は見られなかったが、被験者は高感受性タイプと低感受性タイプに分かれることが明らかになった。したがって、前年度に観察された結果は、協力を仰いだ被験者の男女に偏りがあったためと推察される。一方、高感受性、低感受性のいずれにおいても、nArgの塩味はIMPによって増強された。

マウスを用いた行動実験からはnArgにIMPを添加した場合、nArgに比べて嗜好性が高くなることが報告されている⁽⁸⁾。nArgにIMPを添加したときのヒトの味覚感受性を官能評価とNIRSを用いて検証した。官能評価の結果では、nArgとnArg+IMPともに、塩味強度および苦味強度は濃度依存的に増加した。一方、快感においては濃度依存的な減少がみられた。nArgにIMPを添加することで、塩味強度は増強、苦味強度は抑制され、不快度は抑制される傾向がみられた。また、官能評価とNIRSで測定した前頭前野血流変化量との相関関係を検討した。その結果、塩味強度、苦味強度、快感では、nArgを呈示したときに相関のあった領域は前頭前野全体に位置していたが、nArg+IMPでは前頭前野内側部で相関が現れ、外側部で相関がみられなくなった。以上の結果から、nArgにIMPを添加することで、前頭前野内側部が活性化し、nArgの不快情動を伴う味覚刺激を処理する脳領域およびそれに至る経路が抑制されるという可能性が示唆された。

快感と前頭前野血流変化量との相関関係において、IMPを添加したとき前頭前野外側部の抑制がみられた。NIRSを用いた先行研究より、官能評価において「不快」と

評価された味を呈示した際、前頭前野で脳血流変化量が増加し、特に外側部での反応が顕著であることが報告されている。また、官能評価と脳血流変化量での快度の間に負の相関関係が認められた⁽¹⁴⁾。以上のことより、IMP 添加によって nArg の不快度の抑制とともに前頭前野外側部の抑制がおきたことが示唆できる。

本研究では nArg に IMP を添加することで前頭前野内側部の活性化がみられた。グルタミン酸ナトリウム (MSG) に IMP を添加したときと IMP を添加していないときを比較して、内側部で活性化した領域が拡大したことが報告されている⁽¹⁵⁾。従って、IMP は前頭前野内側部の活性化を誘導する効果があると考えられる。また、ヒトが好ましいと感じる甘味を呈示したときの脳の活動状態を NIRS で測定した先行研究では、右内側部の活性化がみられた⁽¹⁶⁾。以上より、嗜好性の高い溶液を呈示すると内側部の活性化がおこることが考えられる。

眼窩前頭皮質外側部は過去の報酬系に関する応答の抑制に、眼窩前頭皮質内側部は報酬に基づく選択とその応答の保持に関与していることが報告されている^(17,18)。すなわち、眼窩前頭皮質は食物に対する報酬系に重要な関わりがあると言える。

本研究で IMP 添加による nArg の不快度の抑制および、前頭前野内側部の活性化がおきた要因の一つとして、眼窩前頭皮質の報酬系が活性化したことが挙げられる。

以上の結果は、nArg の応答は NaCl の塩味受容とは共通のメカニズムを持ち、nArg の塩味には、雌雄差というよりは感受性と非感受性の個体が存在すること、IMP による nArg の塩味と快度の増強は苦味の抑制によること、また、nArg と IMP の刺激情報は中枢内の別個の経路を介して処理されるという可能性を示唆する。

5. 今後の課題

本研究において、nArg の塩味感受性には性差と言うよりは、高感受性と低感受性が存在することが示唆された。マウスの味蕾細胞および TBD 細胞を用いた実験により、nArg の塩味応答には NaCl の塩味応答と類似のメカニズムを含む複数のメカニズムが介在することが示唆された。高感受性と低感受性の違いは、これら複数の受容体の存在比率に起因する可能性がある。これらの複数のメカニズムを明らかにすることで、塩味応答の全貌に迫ることがで

きるかもしれない。

また、nArg と IMP の刺激情報は中枢内の別個の経路を介して処理され、IMP の情報は好ましくない味覚情報を抑制するという可能性が示唆された。このことは、IMP に特異的な受容メカニズムと神経経路が存在することを意味するため、IMP 特異的受容体の探索を行う必要がある。

6. 引用文献

1. Vandenbeuch A, Clapp TR and Kinnamon SC Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci* 9, 1-13 (2008)
2. Rebello MRI, Maliphol AB and Medler KF Ryanodine Receptors Selectively Interact with L Type Calcium Channels in Mouse Taste Cells. *PLoS One* 8, e68174 (2013)
3. Oka Y, Butnaru M, von Buchholtz L, Ryba NJ and Zuker CS High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494, 472-475 (2013)
4. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan, V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y and Margolskee RF Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301, 850-853 (2003)
5. Sako H, Hori M, Masuho I, Saitoh O, Okada, A and Tomooka Y Establishment of clonal cell lines of taste buds from a p53^{-/-} mouse tongue. *In Vitro Cell Develop. Biology Anim.* 47, 333-340 (2011)
6. Nishiyama M, Yuki S, Fukano C, Sako H, Miyamoto T and Tomooka Y Attempt to Develop Taste Bud Models in Three-Dimensional Culture. *Zool. Sci.* 28, 623-632 (2011)
7. 勝又絵理, 後藤玲美衣, 森下ひとみ, 西山美也子, 宮本武典, 友岡康弘 マウス味蕾由来株細胞の酸味受容のメカニズムの解析. *味と匂誌* 20, 231-232 (2013)
8. 阿久津晴香, 吉本恭子, 徳見明, 藤原宏子, 佐藤亮平, 宮本武典 塩基性アミノ酸の中和によって生じる塩味付加機構の解析 *日本味と匂学会誌* 16, 385-388 (2009)
9. Ray K, Tisdale J, Dodd RH, Dauban P, Ruat M and Northup JK Calindol, a positive allosteric modulator of

- the human Ca^{2+} receptor, activates an extracellular ligand-binding domain-deleted rhodopsin-like seven-transmembrane structure in the absence of Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 280, 37013-37020 (2005)
10. Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J and Finger TE Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) is the ecto-ATPase of Type I cells in taste buds. *J. Comp. Neurol.* 497, 1-12 (2006)
 11. Maruyama Y, Kuroda M, Eto Y Kokumi Substances, Enhancers of Basic Tastes, Induce Responses in Calcium-Sensing Receptor Expressing Taste Cells *IP PLoS One* 7, e34489 (2012)
 12. Wauson ME, Rodriguez LA and Cobb HM. Nutrient sensing by G protein-coupled receptor. *Mol. Endocrinol.* 27, 1188-1197 (2013)
 13. Shaywitz BA, Shaywitz SE, Pugh KR, Constable RT, Skudlarski P, Fulbright RK, Bronen RA, Shankweiler DP, Katz L and Gore JC Sex differences in the functional organization of the brain for language *Nature* 373, 607 - 609 (1995)
 14. 佐古隆之, 伊藤里菜, 近藤 香, 松村娟美, 村上麻里, 宮本武典 味覚刺激が前頭前野血流量に及ぼす影響の近赤外分光法による解析 味と匂誌 18, 338-342 (2011)
 15. De Araujo IE, Kringelbach ML, Rolls ET and Hobden P Representation of Umami Taste in the Human Brain. *J. Neurophysiol.* 90, 313-319 (2003)
 16. Hu C, Kato Y and Luo Z Activation of Human Prefrontal Cortex to Pleasant and Aversive Taste Using Functional Near-Infrared Spectroscopy. *Food Nutr. Sci.* 5, 236-244 (2014)
 17. Elliott R, Dolan RJ and Frith CD Dissociable functions in the medial and lateral orbitofrontal cortex: evidence from human neuroimaging studies. *Cerebral Cortex* 10, 308-317 (2000)
 18. Small DM, Zatorre RJ, Dagher A, Evans AC and Jones-Gotman M Changes in brain activity related to eating chocolate: from pleasure to aversion. *Brain* 124, 1720-1733 (2001)

An Analysis of Mechanism Underlying Sex Difference of Sensitivity to Additive Salty Taste Induced by Neutralizing a Basic Amino Acid, Arginine

Ema Suzuki, Takayuki Sako, Takenori Miyamoto

Japan Women's University

Summary

A basic amino acid, arginine (Arg) represents complex taste qualities including sweet, bitter and umami. Furthermore, the additive salty taste is induced by neutralization of arginine (nArg). We examined responses of taste bud cells to Arg and nArg using Ca^{2+} -imaging method applied not only to slice preparations of mouse circumvallate papillae but also to taste bud derived cell line (TBD cells). Arg-induced responses obtained in all taste bud cells from female mice were completely suppressed by U73122, a phospholipase C (PLC) inhibitor, but Arg-induced responses in 20% of the taste bud cells from male mice were not suppressed, suggesting the presence of PLC-independent transduction mechanism of Arg-induced response only in male mice. In most of TBD cells, the verapamil-sensitive $[Ca^{2+}]_i$ elevation was elicited not only by NaCl but also by nArg, but not by Arg. The results of cross adaptation suggest the presence of a common transduction mechanism between NaCl and nArg responses.

The sensory rating experiments revealed that human sensitivity to salty taste of nArg is divided into the sensitive and insensitive types rather than sex difference. The sensitive subjects showed gradual increase of the sensitivity to saltiness induced by nArg in the dose-dependent manner and its enhancement by inosine monophosphate (IMP). Both the dose-dependent increase of bitterness and the dose-dependent decrease of pleasantness induced by nArg were suppressed by addition of IMP to nArg. The measurement of change of oxy-hemoglobin (oxy-Hb) using a near-infrared spectroscopy (NIRS) also represented similar tendency to the rating experiments in the prefrontal brain region. Significant correlations between the rating values and changing amount of oxy-Hb for saltiness and bitterness as well as pleasantness induced by nArg appeared chiefly in the lateral area of the prefrontal brain region, but the correlated area moved from the lateral area to the central area after addition of IMP to nArg. These results suggest a possibility that enhancement of saltiness and pleasantness are due to suppression of bitterness by synergic enhancing effect by addition of IMP to nArg through the interaction between different processing pathways for nArg and IMP respectively in the prefrontal brain region rather than due to differential pathways.