

9444 マウス味細胞のNaCl受容機構

助成研究者：吉井 清哲(九州工業大学 情報工学部)

共同研究者：仁川 純一(九州工業大学 情報工学部)

電位非依存性Naチャンネルに対するブロッカー、アミロライドがNaCl応答を抑制したことから、味細胞受容膜の拡散電位変化がNaCl応答を発現すると報告された。しかしアミロライドは、1) 低濃度のNaClに対する応答を抑制せず、2) NaCl以外の味物質に対する応答も抑制するため、Naチャンネル以外の受容機構を阻害して応答を抑制した可能性がある。

味細胞は、受容膜あるいは基底膜で受容器電位を発生する。NaCl受容機構を解明するためには、受容膜およびそれ以外の味細胞膜(基底膜)のイオン機構をそれぞれ調べる必要がある。また、NaCl受容機構に関連するタンパク質を明らかにするためには、単一味細胞由来cDNAライブラリー作成が有効である。我々は、イオン機構解明のためマウス剥離舌上皮標本を用いて、味蕾細胞基底膜のイオンチャンネルを電位固定下および電流固定下で測定した。また、単一味細胞由来cDNAライブラリー作成の準備として、培養マウス海馬神経細胞一個からのcDNA作成およびPCR法によるcDNAの増幅が可能であることを確認した。

剥離舌上皮標本では、in situ同様に、舌上皮が受容膜と基底膜を分離しているため、受容膜と基底膜を異なる溶液でかん流できる。また、味蕾内での味蕾細胞の位置を確認できる。この長所を利用し、味蕾細胞受容膜を蒸留水、基底膜を生理的塩類溶液でかん流し、成熟味細胞が集まると考えられる味蕾中央部の味蕾細胞基底膜の性質を電位固定法で調べた。すべての味細胞は、脱分極によってTTX感受性一過性内向き電流および各種外向き電流を発生した。これら味細胞は、外向き電流の飽和性(1型、22%)、不活性化(2型、17%)および持続性(3型、61%)を基準に3グループに分類できた。2型および3型味蕾細胞は、過分極によって持続性内向き電流を発生した。一過性内向き電流、不活性化を持つ外向き電流は、それぞれ基底膜に1 μ M TTXおよび10 mM TEAを与えると抑制された。

これらの味蕾細胞の静止電位は、 -51.3 ± 14.7 mV ($n = 13$)であった。味蕾細胞の中には、電流固定下で自発的に活動電位を反復発射するものがあつた。自発性発火を示さない味蕾細胞も、脱分極性通電によってオーバーシュート、40 mV、後電位、-60 mVをもつ活動電位を反復発射した。活動電位の発火頻度は、-50 mV~-25 mVの範囲で線形に増加した。反復発射の持続時間は、この膜電位の範囲では、~ 200 msecであつた。

味蕾細胞は、 2×30 μ mの長いアピカルポーションをもっている。活動電位は、アピカルポーションの先端の受容膜から基底部のシナプス部位まで味覚情報を伝達するために必要なのかもしれない。しかし、電気刺激で生じる味細胞活動電位の反復発射時族時間は、味神経応答の持続時間よりはるかに短い。今後、味刺激による味細胞活動電位の発生を詳しく調べる必要がある。

9444 マウス味細胞のNaCl受容機構

助成研究者：吉井 清哲 (九州工業大学 情報工学部)

共同研究者：仁川 純一 (九州工業大学 情報工学部)

研究目的

NaCl応答は、電位非依存性Naチャンネルに対するブロッカー、アミロライドで抑制されることから、Naイオン濃度変化による受容膜の拡散電位変化がNaCl応答を引き起こすと報告された(1)。しかしアミロライドは、a) 低濃度のNaClに対する応答を抑制せず、b) Naイオン以外の味応答も抑制するため、Naチャンネル以外の受容機構を阻害して応答を抑制している可能性がある(2)。糖は、細胞内メッセンジャーを介して基底膜(受容膜以外の味細胞膜)の拡散電位を変化させ、受容器電位を発生する(3)。NaClは複数の受容機構を持ち、その一部は糖と同様の応答機構を利用しているのかもしれない。

味細胞間および味細胞-舌上皮細胞間にはタイトジャンクションが発達しているため、受容膜側の溶液は、基底膜側には侵入しない。そのため、味物質と接する受容膜上のイオン環境が著しく変化しても、基底膜上のイオン環境は常に一定である。したがって、受容膜と基底膜のイオン環境それぞれコントロールすることで受容膜、基底膜のどちらで受容器電位が発生するかを明らかにできる。

味覚受容機構の研究には単離味細胞が広く使われ、多くの成果が得られてきた。しかしながら、単離味細胞には受容膜と基底膜の仕切がないため、受容膜と基底膜を異なるイオン環境に置きそれぞれの膜のイオン機構を調べることは困難である。また、味物質は受容膜だけでなく基底膜にも作用するため、水のような浸透圧の低い溶液や糖溶液のような浸透圧の高い溶液は、味細胞を破壊する。これらの欠点を克服するため、我々はソルトサイエンス財団の助成を受け、剥離舌上皮標本および測定用チェンバーを開発した(4)。本標本では舌上皮細胞や味蕾細胞間のタイトジャンクションが機能しているため、舌上皮を利用して受容膜と基底膜のイオン環境を独立にコントロールできる。基底膜への味物質の浸入を心配せずに受容膜だけを刺激することもできる。また、標本作製時に、受容膜にタンパク分解酵素が作用しにくいため、味受容体/イオンチャンネルの損傷が少ない。さらに、本システムでは、直接味蕾細胞を観察しながら測定するため、味蕾細胞の味蕾内位置が確認できる。

本研究では、このマウス剥離舌上皮標本システムを用いてNaCl応答機構解明を試

みたが、信頼できるNaCl応答は記録できなかった。このため、基礎研究として味蕾細胞基底膜のイオンチャネルの性質を電位固定下および電流固定下で測定した。その結果、味蕾細胞は、基底膜に電位依存性NaおよびKチャネルを持つこと、脱分極刺激によって活動電位を継続的に発射することを見いだした。

NaCl受容機構に関連するタンパク質を明らかにするためには、単一味細胞由来cDNAライブラリー作成が有効である。この点に関して、我々は、単一味細胞由来cDNAライブラリー作成の準備として、単一培養神経細胞からcDNAを作成し、PCR法でこのcDNAを増幅できることを確認した。

研究方法

味神経とシナプスしている細胞を味細胞と定義する。本実験で用いた細胞の味神経とシナプスは不明なので、味細胞とは呼べない。そこで、本実験で測定した味蕾内に分布し味細胞と形態の似た細胞を味蕾細胞と呼ぶことにする。

エーテル麻酔下で断頭した4-6週齢のddyマウスの舌をコラゲナーゼ処理し、舌上皮を剥離した。剥離した舌上皮は、剥離面を上に向けてチェンバーにセットし水浸対物レンズをもつ顕微鏡下に置き、味蕾細胞受容膜面(下面)を蒸留水、基底膜面(上面)を生理的塩類溶液でかん流した(図1)。

図2は、チェンバーにセットした味蕾の低倍率

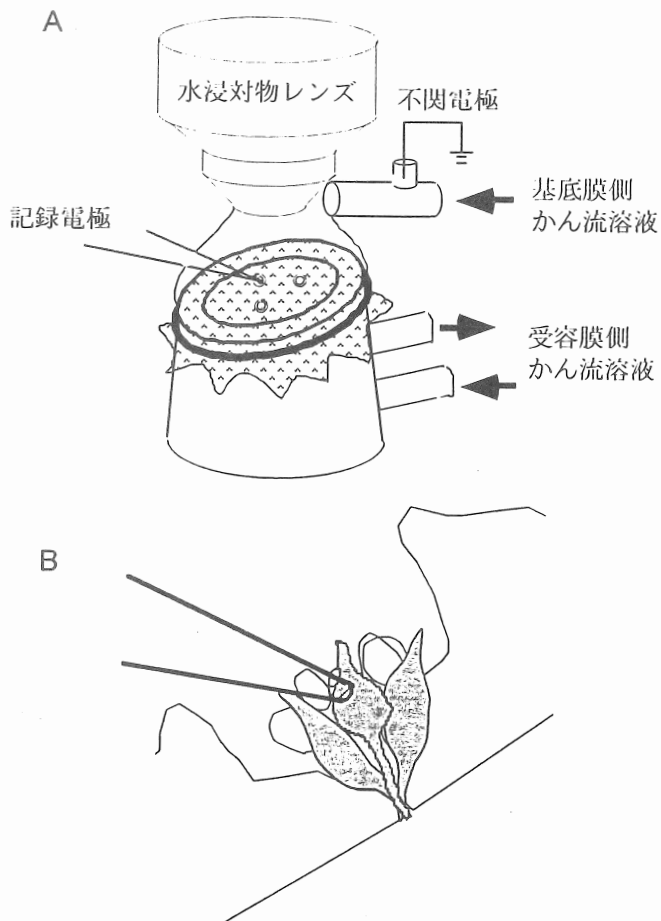


図1 剥離マウス舌上皮味蕾細胞測定システム
A 測定用チェンバーにセットした剥離舌上皮
B 剥離舌上皮の断面図(記録電極部分)

Mouse Taste Bud Cells

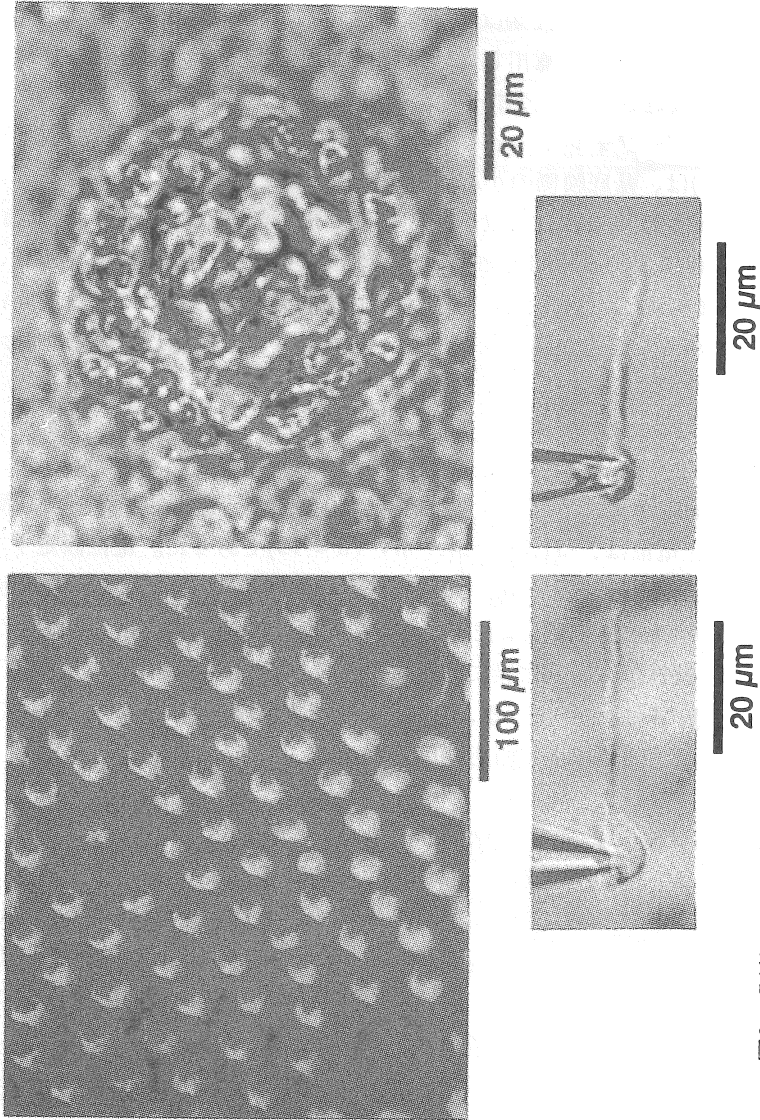


図2 剥離マウス舌上皮標本中の味蕾および味蕾細胞
A ; 舌上皮の基底膜側 多数の糸状乳頭と3個の茸状乳頭が観察できる。B ; 40倍水浸対物レンズで撮影した単一茸状乳頭 味蕾中央部の細胞のみを実験に使用した。CおよびD ; 記録電極に吸着させ、味蕾より引き出した味蕾細胞 長いアピカルポーションが特徴的である。記録電極は、細胞体にある。

(A)、高倍率(B)および測定後味蕾から引き出した味蕾細胞(C, D)を示している。味蕾細胞に特徴的である直径 $\sim 10 \mu\text{m}$ の細胞体からのびる長さ $\sim 30 \mu\text{m}$ 、直径 $\sim 1.5 \mu\text{m}$ の細長いアピカルポーションが保存され、よい標本であることがわかる。これらの味蕾細胞アピカルポーションの先端は、味孔に達しているのが確認できた。

顕微鏡下で味蕾基底部中央に露出している味蕾細胞基底膜に記録電極(5-10M Ω 、内液150mM KCl)を接近させ、ギガオームシールを形成した。必要に応じてアンフォテリシンBを用いたパーフォレイティドパッチクランプ法を用いた。不関電極(3M KCl agar; Ag/AgCl)は、基底膜側のかん流溶液中に固定した。

かん流溶液のイオン濃度を変化させ、液間電位変化を指標に受容膜および基底膜上のイオン環境変化に要する時間を測定した。溶液交換には、受容膜側 ~ 80 秒、基底膜側 ~ 120 秒必要であった。また、受容膜-基底膜間の溶液のもれによる液間電位変化は観察されなかったことから、タイトジャンクションは機能していると考えた。

研究結果

A) 味蕾細胞の分類

記録は、成熟味蕾細胞が集まると考えられる味蕾中央部から選択的に行った。測定した味蕾細胞の静止電位は、 $-51.3 \pm 14.7 \text{ mV}$ ($n = 13$)であった。電位固定下で測定したすべての味蕾細胞は、脱分極によって一過性内向き電流と各種外向き電流を発生した。一過性内向き電流は、基底膜側に与えたTTXで抑制されたことおよび以下に示す電流-電圧特性から、基底膜に分布する電位依存性Naチャネルの開口で生じたと結論した。図3、4および5に示すように外向き電流の性質を基準に味蕾細胞は、3種に分類できた。これらの細胞の出現頻度は、1型、22%；2型、17%；3型、61%であった。

1型味蕾細胞；脱分極によって一過性内向き電流と飽和する外向き電流を発生した味蕾細胞を1型とした。外向き電流は、Ca依存性K電流を含んでいると考えている。

2型味蕾細胞；脱分極によって一過性内向き電流と不活性化を持つ外向き電流を発生した味蕾細胞を2型とした。この外向き電流も、Ca依存性K電流を含んでいると考えている。2型味蕾細胞では、さらに、過分極で生じる内向き電流が記録できた。

3型味蕾細胞；脱分極によって一過性内向き電流と持続性外向き電流を発生した味蕾細胞を3型とした。この外向き電流は、遅延整流性Kチャネルを流れる電流と考えた。3型味蕾細胞でも、過分極で生じる内向き電流が記録できた。

B) 活動電位の継続的発射

受容器電位発生によって上記の各種イオンチャネルが演じる生理的役割を明らかにするため、味蕾細胞を脱分極性電流を与え、膜電位変化を電流固定下で測定し

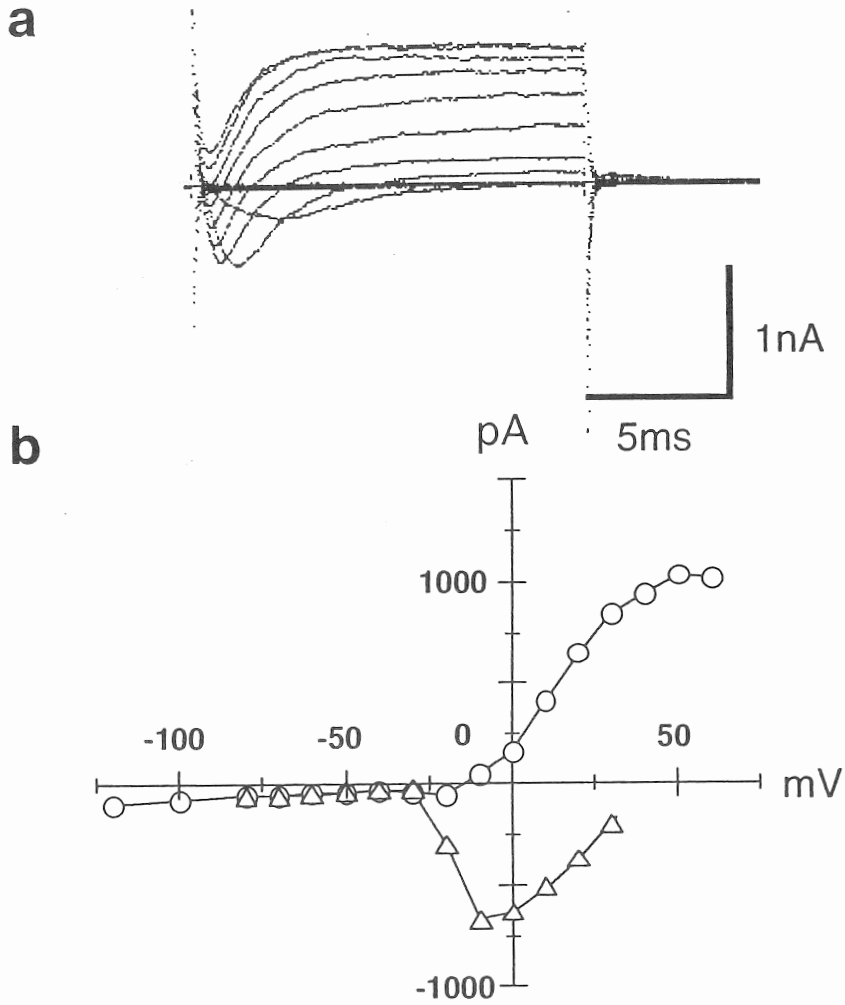


図3 1型味蕾細胞の電位固定電流(a)と電流-電圧曲線(b)

a ; -120 mVから+60 mVまで10 mVステップの脱分極パルスに対する電位固定電流、保持電位 ; -50 mV. 一過性内向き電流と飽和する外向き電流が発生している。
 b ; 一過性内向き電流のピーク値 (△) と飽和する外向き電流の定常値 (○) の電流-電圧曲線

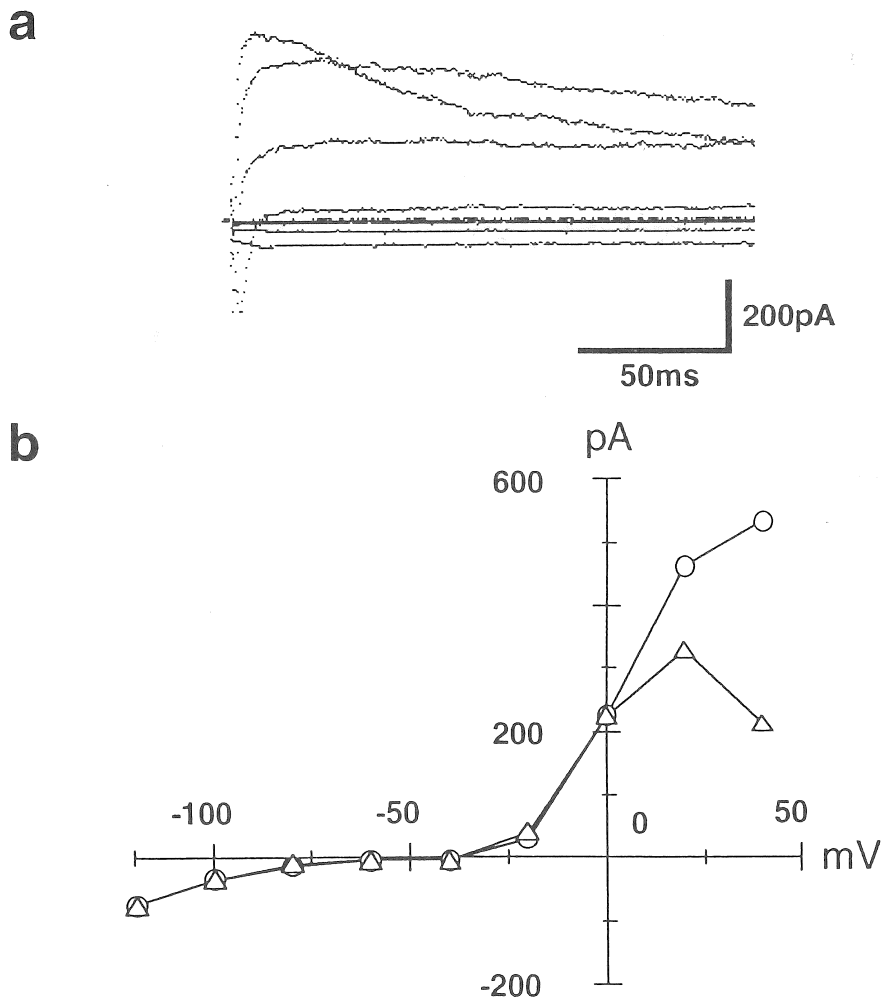


図4 2型味蕾細胞の電位固定電流(a)と電流-電圧曲線(b)

a ; -120 mVから+40 mVまで20 mVステップの脱分極パルスに対する電位固定電流、保持電位 ; -50 mV. 一過性内向き電流、持続性内向き電流、不活性化を持つ外向き電流が発生している。

b ; 不活性化を持つ外向き電流のピーク値 (○) と150 msec後の電流値の (△) の電流-電圧曲線

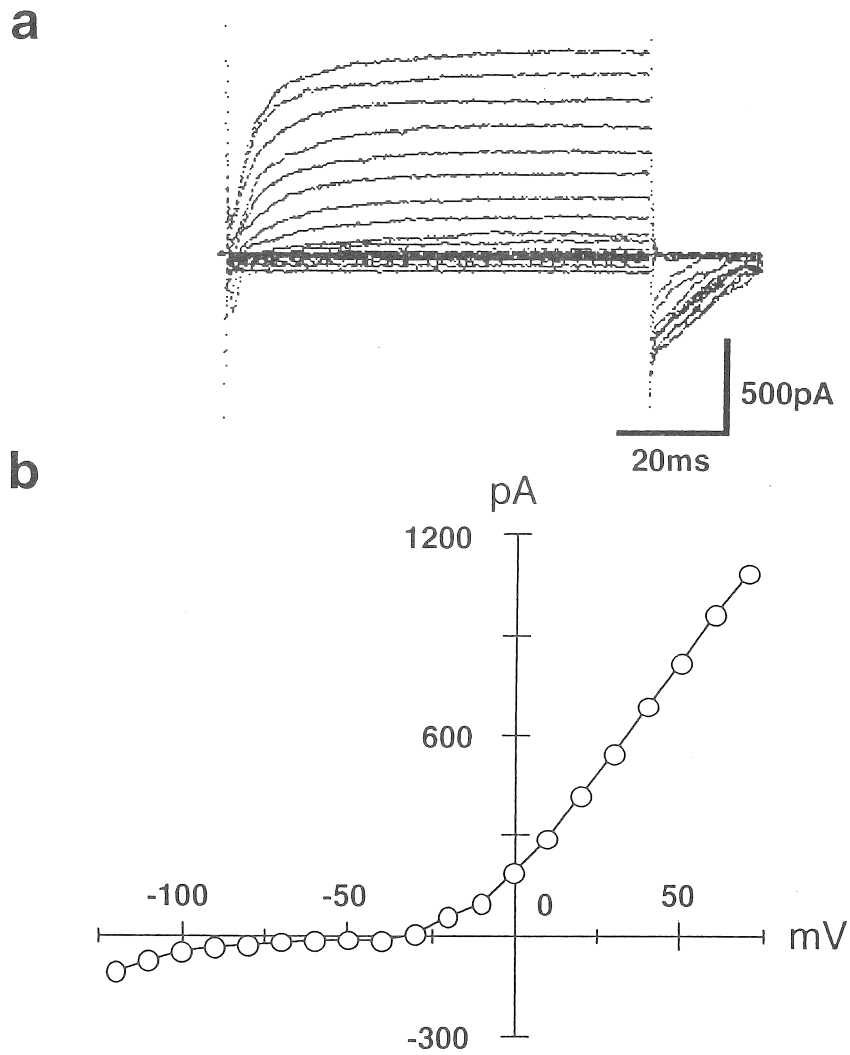


図5 3型味蕾細胞の電位固定電流(a)と電流-電圧曲線(b)

a ; -120 mVから+70 mVまで10 mVステップの脱分極パルスに対する電位固定電流、保持電位 ; -50 mV. 一過性内向き電流、持続性内向き電流、持続性外向き電流が発生している。

b ; 持続性外向き電流の50 msec後の電流値の電流-電圧曲線

た。脱分極によって味蕾細胞は、図6に示すように活動電位を継続的に発射した。活動電位のオーバーシュートは $\sim 30\text{mV}$ 、アンダーシュートは $\sim -60\text{mV}$ 、継続的発射の持続時間は、 $\sim 200\text{msec}$ であった。活動電位の発生数は、 $-50\text{mV} \sim -25\text{mV}$ の膜電位範囲で線形に増加した。

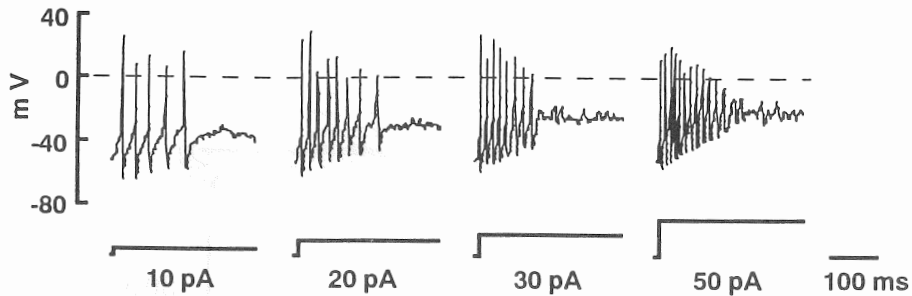


図6 脱分極による味蕾細胞活動電位の反復発射
各トレースの下のパターンと数字は、脱分極のための電流の大きさを示している。

考察

通常のホールセルクランプ法では、電極内にATPおよびGTPを加えても、NaCl応答を記録することができなかった。細胞内環境保護により有効であるアンフォテリシンBを利用したperforated patch法を用いると、数例NaCl応答が記録できた。これらの記録は、電極からのアンフォテリシンB漏れによる膜抵抗減少のため解析には不適當であったが、NaCl応答に細胞内メッセンジャーシステムが関与していることを示唆している。

味蕾中央部の味蕾細胞は、外向き電流を基準に3種に分類できた。味蕾細胞は、成熟に伴い味蕾周辺から中央部へ移動する(5)。本結果は、成熟の進んだ味蕾細胞に多様性のあることを示している。

測定したすべての味蕾細胞は、活動電位を継続的に発射した。受容膜あるいは受容膜近傍のアピカルポーションで発生した受容器電位は、電気緊張的に基底膜シナプス部へ伝搬され则认为られている。しかし、長いアピカルポーション上を効率よく味覚情報を伝えるためには、活動電位の発生が有効である。味細胞は、受容器電位を起動電位として活動電位を発生し細胞体で再びアナログ的電位に変換して味細胞-味神経シナプスから神経伝達物質を放出するのかもしれない。

電流刺激によって生じた活動電位の継続的発射は、 $\sim 200\text{msec}$ 程度しか持続しなかった。これは、味神経の活動電位持続時間に比べはるかに短い。味物質は、細胞内メッセンジャーを生産し、これが電位依存性イオンチャンネルをモデュレートすることで活動電位継続的発射の持続時間を延長するのかもしれない。

活動電位の刺激強度依存的継続発火は、ほ乳類単離味蕾細胞では報告されていない。本実験結果は、剥離舌上皮標本の味蕾細胞がintactであることを示している。

今後の課題

本実験で予備的に行ったperforated patch法は、有効であると考えられる。この方法を改良し、NaCl応答を記録できるよう努力する。

外向き電流に基づいて、味蕾中央部の味蕾細胞を3種に分類した。この分類と味覚応答特性の関係を調べる。また、この分類と形態学的な明細胞、暗細胞、中間型細胞の分類の対応関係を調べる。

活動電位が味覚情報を受容膜から基底膜シナプス部へ運ぶ可能性を調べる。細胞内メッセンジャーの候補物質を味蕾細胞内に導入し、活動電位発射の継続時間が延長できるかどうか調べる。また、ホワイトノイズ解析法を用い、アピカルポーションのケーブル特性を調べる。

単一培養マウス海馬神経細胞からのcDNAが作成できること、またこのcDNAがPCRで増幅できることを確認している。この方法を単一味蕾細胞に応用し、differential display法にり味蕾細胞に特有のcDNAを検出する。

文献等

- 1) Heck GL, Mierson S and DeSimone JA : Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223, 403-5 (1984)
- 2) K. Yoshii, Y. Kiyomoto and K. Kurihara : Taste receptor mechanism of salts in frog and rat. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85A, 501-507 (1986)
- 3) Tonosaki K and Funakoshi M : Cyclic nucleotides may mediate taste transduction. *Nature* 331, 354-6 (1988)
- 4) Etoh M, Furue H and Yoshii K : Electrical Responses of Taste Cells in Peeled Epithelium of Mouse Tongue. *Olfaction and taste XI* (Kurihara K, Suzuki N and Ogawa H), Springer-Verlag, Tokyo, pp. 113 (1993)
- 5) Beidler LM and Smallman RL : Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol* 27, 263-272 (1965)

Generation mechanisms of mouse taste cell responses to salts

K. Yoshii and J. Nikawa

Dept. of Biochemical Engineering and Science,
Kyushu Institute of Technology, Iizuka, Fukuoka 820, Japan

We investigated the ionic mechanisms of mouse taste bud cells to understand the receptor mechanisms for salts under voltage or current clamp conditions using peeled mouse tongue epithelia. The epithelium was set on a recording chamber where receptor membranes and basolateral membranes of the mouse taste cells were perfused with deionized water and a saline solutions, respectively.

The mean and standard deviations of the resting potentials of the taste bud cells were -51.3 ± 14.7 mV, $n = 13$). The recorded taste bud cells elicited TTX-sensitive transient inward currents and various outward currents on depolarization. The taste bud cells were roughly classified into 3 groups based on the properties of the outward currents; type 1 cells (22%), saturating outward currents; type 2 cells (17 %) inactivating outward currents; and type 3 cells (61 %) no-saturating/no-inactivating outward currents. The type 2 and 3 cells elicited slow inward currents on hyperpolarization.

The taste bud cells investigated under current clamp conditions elicited a train of action potentials lasting for ~ 200 msec on depolarization. The spike frequencies were linearly increased on depolarization in the range between -50 mV and -25 mV.

Each taste bud cell in the peeled epithelia had long apical portion (2×30 μm). The taste receptor potentials generated at the receptor membranes or the apical portions close to the receptor membranes may elicit the action potentials that can release neurotransmitters from the taste cells. Although further experiments are needed, taste cells may use the action potentials as well as olfactory receptors or invertebrate photoreceptors.