

特集：刺激受容における相互作用の発現機構のメカニズム

味覚の相乗効果発現機序に関する研究：
味細胞内Ca²⁺イオン濃度の変化を指標として*

福田 敦夫・西野 仁雄**

(名古屋市立大学医学部第二生理)

Abstract

It is well known that taste stimuli by amino acids and nucleosides can cause synergistic effects. It is also known that saccharin could cause augmentation of D-phenylalanine response. However, the mechanisms of these synergistic effects are unknown yet. To elucidate the underlying mechanism, we have assessed intracellular Ca²⁺ dynamics during combined taste stimuli by monosodium glutamate (MSG) and guanosine-5'-monophosphate (GMP) or inosine-5'-monophosphate (IMP) as well as by saccharin (Sac) and D-phenylalanine (D-Phe). Fura-PE3 were loaded in taste cells and temporal changes in [Ca²⁺]_i were assessed. Taste cells that responded to MSG by an increase in [Ca²⁺]_i also responded to IMP or GMP. Some of these cells exhibited synergistic [Ca²⁺]_i increases in responses to MSG+GMP/IMP. These [Ca²⁺]_i transients persisted under removal of extracellular Ca²⁺, indicating that synergistic effect could be mediated by signal transduction systems coupled to Ca²⁺ released from intracellular stores. In addition, saccharin caused augmentation of D-phenylalanine-induced [Ca²⁺]_i increases, that was compatible with those previously suggested electrophysiologically.

Key Words : taste cell, umami, sweet, synergism, intracellular Ca

緒言

うま味アミノ酸とヌクレオシドの混合刺激^{1),2),3)} 或いは、サッカリン (Sac) による甘味アミノ酸応答の増強^{4),5)} 等のうま味や甘味物質による味覚の相乗効果が発現することが官能テスト¹⁾ や電気生理学的^{2),3),4),5)} に確認されている。しかし、その機序については未だ明らかになっていない。

これらの機序を解明するためには、パッチクランプ法や細胞内イオンの光学的計測法などの up to date な方法を用いて詳細な生理学的情報を得る必

要がある。そこで我々は、まずこれらの方法の適用が可能な味細胞の急性単離標本の作成法の確立を試みた。

味覚応答には種々のセカンドメッセンジャーが関与していることが知られているが⁶⁾、味覚の相乗効果発現に関しては細胞内情報伝達系がどのように関与しているかについては明らかになっていない。そこで、相乗効果発現に関して、細胞内情報伝達において重要な働きのある細胞内 Ca イオン濃度の変化についてまず知る事が必要である。

そこで今回我々は、急性単離味細胞標本を用いて、

*平成8年6月2日受付

Intracellular Ca²⁺ dynamics during synergistic taste stimuli on acutely isolated taste cells.

**Atsuo Fukuda and Hitoo Nishino: Department of Physiology, Nagoya City University Medical School, Nagoya 467 Japan

グルタミン酸ナトリウム (MSG)、5'-グアニル酸 (GMP)、5'-イノシン酸 (IMP)、及びそれらの混合液で刺激した際の味細胞応答や、サッカリン投与後の D-フェニルアラニン (D-Phe) 応答における細胞内 Ca イオン濃度の変化について解析し、その意義を考察した。

材料と方法

うま味の相乗効果を示すことが知られている C57BL/KsJ マウス (6-16 週齢) を実験に用いた。

味蕾をピンセットにて機械的に単離した後、エラストラーゼ (1 mg/ml) の Ca-free PBS 溶液 (2 mM EDTA, 10 mM グルコース加) による酵素処理を 30°C で 30 分間行った。パスツールピペットによる trituration を行い、味細胞および上皮細胞を急性単離した後、遠心し (1000 回転、10 分)、沈降物に 10% FBS 加 DMEM を加えて酵素反応を停止し、細胞浮遊液とした。

4 mg/ml コンカナバリン A (Sigma, Type IV) をコーティングしたペトリディッシュ上に細胞浮遊液を加えて 95% O₂-5% CO₂ を充満させた密閉容器中で 30 分-1 時間静置し、単離した細胞をディッシュ底面に接着させた。

遊離 Ca の蛍光指示薬である fura-2 のアナログで fura-2 より漏出が少ないとされる fura-PE3 のアセトキシルメチルエステル (Texas Fluorescence Laboratories) を 5 μM でリンガー液に溶解し、この溶液中で単離細胞を 30 分間室温でインキュベートし fura-PE3 を味細胞内に負荷した。75 W Xe ランプ光源を用い、波長 340 nm および 380 nm で励起された蛍光 (500 nm) を SIT カメラで測光し、デジタル画像として取得してその蛍光強度比をコンピュータにて計算することにより細胞内 Ca イオン濃度の変化を経時的にモニターした (Argus 50、浜松ホトニクス)。

実験中、味細胞は 95% O₂-5% CO₂ で飽和したリンガー液 (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM MgSO₄, 2.0 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 5 mM glucose) で室温にて持続灌流した。

結果

急性単離された味細胞および上皮細胞はペトリ

ディッシュ上に良く接着しており、両者はその形状および microvilli の有無により、容易に鑑別する事ができた。さらに、fura-PE3 の細胞内負荷は味細胞のみで認められ、上皮細胞では全く認められなかった。このように、急性単離された味細胞は細胞内 Ca イオン濃度の変化の経時的測定実験に供する事ができた。

うま味アミノ酸のグルタミン酸ナトリウム (MSG) 30 mM の投与に対して細胞内 Ca イオン濃度の上昇を示す味細胞が認められた。これらのうちの多くは、核酸関連物質の 5'-グアニル酸 (GMP) 10 mM あるいは 5'-イノシン酸 (IMP) 1 mM に対しても細胞内 Ca イオン濃度の上昇応答を示した。

一方、MSG に対する応答がみられなかった細胞では、GMP あるいは IMP の投与にたいしても殆ど反応を認めなかった。うま味アミノ酸とヌクレオシドによるうま味の相乗効果に関しては、いくつかの細胞で MSG+GMP あるいは MSG+IMP により細胞内 Ca イオン濃度上昇の程度および持続時間が相乗的に上昇した。

上記の MSG、IMP、GMP の単独投与、或いは MSG+IMP / GMP の混合刺激に対する細胞内 Ca イオン濃度上昇は細胞外 Ca イオン非存在下 (0 mM CaCl₂+0.5 mM EGTA) でも認められたが、その反応パターンは多くの場合 oscillation 様となった。

一方、D-Phe 100 mM の投与によって細胞内 Ca イオン濃度の上昇をおこす甘味応答性味細胞には、Sac 20 mM の前投与によりその反応が増強されるものがあった。

考察

細胞膜貫通型の fura-PE3 のアセトキシルメチルエステルが細胞内エステラーゼにより加水分解されて細胞膜非貫通型の fura-PE3 となり細胞内に留まる事により fura-PE3 が負荷されるわけであるが、今回の結果では fura-PE3 の細胞内負荷は味細胞のみで認められ、上皮細胞では全く認められなかった。このことから、味細胞に分化する前の上皮細胞では細胞内エステラーゼ活性が低い事が示唆される。実際、我々は上皮細胞ではエステラーゼ活性が低いことを免疫組織化学的に証明する事ができた。

MSG+IMP / GMP による細胞内 Ca イオン濃

味覚の相乗効果発現機序に関する研究：味細胞内 Ca イオン濃度の変化を指標として

度の相乗的上昇が細胞外 Ca イオン非存在下でも認められたため、うま味の相乗効果の発現には細胞内貯蔵部位からの Ca イオン放出が関与していることが示唆された。さらに、その反応パターンが oscillation 様であることもこれを支持する。すなわち、うま味の相乗効果の発現に細胞内 Ca が関与した細胞内情報伝達系が関与していることが示唆された。

一方、D-Phe に反応しておこる細胞内 Ca イオン濃度の上昇が、Sac の前投与によって増強されたものがあった。これは Ninomiya ら^{4),5)}が電気生理学的に証明した Sac による D-Phe 甘味応答の増強に相当するものと考えられる。このことから、甘味の増強に関しても細胞内 Ca イオン濃度の上昇がその発現に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、うま味研究会研究助成金による援助により可能となった。また、実験の遂行および本論文の執筆にあたり、朝日大学歯学部口腔生理学教室の二ノ宮裕三先生に多大なご助言を頂いた事を深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Yamaguchi S: Basic properties of umami and effects on humans. *Physiol. Behav.* 49, 833-841 (1991)
- 2) Kumazawa T, Nakamura M and Kurihara K: Canine taste nerve responses to umami substances. *Physiol. Behav.* 49, 875-882 (1991)
- 3) Ninomiya Y, Tanimukai T, Yoshida S and Funakoshi M: Gustatory neural responses in preweanling mice. *Physiol. Behav.* 49, 913-918 (1991)
- 4) Ninomiya Y and Kajiura H: Enhancement of murine gustatory neural responses to D-amino acids by saccharin. *Brain Res.* 626, 287-294 (1993)
- 5) Ninomiya Y and Hellekant G: Enhancing effects of saccharin on gustatory responses to D-phenylalanine in monkey single chorda tympani fibers. *Brain Res.* 635, 335-338 (1994)
- 6) Gilbertson TA: The physiology of vertebrate taste reception. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 532-539 (1993)