

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

マウス味蕾細胞における味刺激応答の画像記録*

林 由佳子*

(京都大学食糧科学研究所)

はじめに

味蕾細胞の味受容機構について電気生理学的や生化学的手法を用いた論文が数多くある中、いずれも細胞に何らかの機械的ダメージを与えるため実際の応答を見逃している可能性がある。画像解析法は、非侵襲的な（蛍光試薬を細胞に取り込ませるので厳密には非侵襲とはいえないが）方法であることはもとより、味蕾細胞というごく小さな細胞でも細胞内のイオン分布や細胞間相互作用がわかること、装置の性能アップ（長時間解像化・高空間解像化・高ダイナミックレンジ化）ならびに目的にそった蛍光試薬の作成が急速に進んでいることなどから、これからの味覚研究において活躍すると考えられる。

本研究では味蕾細胞の味受容機構の解明を目的として画像解析法の味覚分野への応用を試みた。使用した装置の特徴としては、①4波長励起が行えるので2種類の蛍光試薬のモニタリングができる。②deblurプログラムにより味蕾などの厚いサンプルに対しても一般の蛍光顕微鏡で個々の味蕾細胞が観察できる、ことが挙げられる。膜電位と細胞内カルシウム濃度の同時計測は以前に報告例のないことであったので、まずリポソームを用いて2種の蛍光試薬の条件検討を行った後、味蕾細胞のグルタミン酸受容解析に応用した。

材料と方法

実験材料は大豆の全リン脂質（45%ホスファチジ

ルコリン、20%ホスファチジルエタノールアミン、20%ホスファチジルセリン、10%ホスファチジルイノシトールおよび5%ステロール類と糖タンパク質）にコレステロールを加えて（25：1）調製したりポソームおよび生体材料としてうま味感受性のあるC3H/HeJマウス（7-11週齢、メス）の舌から調製した味蕾を用いた。味蕾は舌にコラゲナーゼ（2.5 mg/ml）・エラスターゼ（2.0 mg/ml）・アミロライド（10 μ M）・DNase（15 U/ml）を含むリンガー液を皮下注射することによって剝離した舌上皮上の有郭乳頭と葉状乳頭からキャピラリーガラスを用いて単離し、ConA被膜したカバーガラスに接着させた。

光学画像解析装置

蛍光顕微鏡（Nikon Diaphot 300 microscope）・40倍対物レンズ（Nikon fluor 油浸、n. a. =1.4）・キセノン光源（モノクロメーター、T. I. L. L. Photonics GmbH）・cooled CCDカメラSC-90（Theta System Elektronik GmbH）・パーソナルコンピュータ（IBM compatible）によって構成され、画像は12 bitの解像度でデジタル化した。画像解析は Bernd Lindemann 博士よりいただいた Img8 プログラム（C言語で組まれている）を改良して使用した。

蛍光試薬の導入

蛍光物質¹⁾は膜電位感受性色素の di-8-ANEPPS (excitation max. 498 nm, extinction coefficient 35,

* 平成8年6月29日受付

Optical imaging analysis of taste response in mouse taste buds.

**Yukako Hayashi: Research Institute for Food Science, Kyoto University,

Uji, Kyoto 611 Japan

000 $M^{-1}cm^{-1}$, emission max. 713 nm) (75 μM —リポソーム、5-20 μM —味蓄)と遊離カルシウム指示薬の fura-2 (膜透過性 AM 体) (2 μM) を pluronic F127 (20-80 μM) 共存下室温で 30 分から 1 時間導入した。di-8-ANEPPS は“fast”電位感受性 styryl 色素に分類される。味細胞には fura-2 を Di-8-ANEPPS より 30 分長く染色した。リポソームと味細胞はベースラインの安定化のため、測定する前に 10-15 分間リンガー液でリンスした。

味刺激はグルタミン酸、ionotropic グルタミン酸受容体のアゴニストである N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)、metabotropic グルタミン酸受容体のアゴニストである L-2-amino-4-phosphonobutyric acid (L-AP4) を各々 1 mM の濃度でリンガー液に溶解し、外液置換で行った。5'-グアニル酸は 0.1 mM で添加した。解析時、味蓄内の細胞は deblur プログラムによって視覚化し、解析範囲 (個々の細胞) を選んだ。画像は蛍光強度に依存して 100-2000 msec で積算し 12 bit のダイナミックレンジでデジタル化した。

結果と考察

まず、fura-2 と di-8-ANNEPS の励起波長特性をリポソームを使って調べた。蛍光試薬は溶媒によって蛍光特性が変わるのでモデルリン脂質二重層膜、リポソームを用いた。その結果、fura-2 と di-8-ANNEPS は蛍光シグナル波長特性については 500 から 600 nm と重なっているにも関わらず、それらの励起波長特性は重なっていないことが明らかになった。その上、これらはトポロジ的にも fura-2 は細胞質に、di-8-ANNEPS は細胞膜にと、細胞での別の部位を染色することから同じ細胞で fura-2 を用いた細胞内カルシウム (340 nm— Ca^{2+} 感受性、360 nm— Ca^{2+} 非感受性励起) と di-8-ANNEPS を用いた膜電位 (440 と 505 nm 励起) は同時に計測可能であると考えられる。測定蛍光波長について検討した結果、測定バンド幅は膜電位測定に使用される >570 nm よりも >525 nm の方が両試薬を用いる蛍光測定に適していた。di-8-ANEPPS は蛍光強度変化が小さいが、上記の条件下リポソームの内外のイオン組成の違いからできた膜電位差をバリノマイシンによって消失させる方法で 51 mV 変化させたとき、蛍光強度は 5.6% 変化し、これから逆算したノイズによる測定誤差は約 5 mV であり使用に耐える

と判断した。蛍光強度比のドリフトは、蛍光色素の共存下でリポソーム調製したときには見られず、リポソーム調整後に蛍光色素で染色したときに見られたことから、色素の蛍光特性の変化ではなく、脂質膜 2 重層内での蛍光色素の再配置によると考えられた。

次にマウスの味蓄を用いて fura-2 と di-8-ANEPPS の 2 重染色と味刺激応答を検討した。味蓄内の細胞は deblur 処理²⁾により個々を判別した。fura-2 は細胞質に局在しており、di-8-ANNEPS は細胞膜に局在していた。味細胞を用いた測定ではわずかな di-8-ANEPPS の fura-2 へのオーバーラップが色素の染まり具合によっては強く効いてくることがあるため 360 nm と 440 nm で励起したときの蛍光強度の比 (F 360/F 440) が 10 以上である場合のみ (実験値 10-70) 細胞内カルシウム濃度解析を行った。24 個の細胞の解析を行った結果、L-AP4 によって細胞内カルシウムが減少し (n=11)、NMDA によって増加した (n=5)。グルタミン酸は増加 (n=11) と減少 (n=4) の両方の作用を示した。細胞内カルシウムの増加は膜の脱分極の後に追隨して起きており、膜電位感受性カルシウムチャンネルが開いたことによる細胞内カルシウムの上昇と考えられる。細胞内カルシウムの減少においては測定できるような膜の電位変化はなく異なる系が働いていると考えられる。5'-グアニル酸によるグルタミン酸応答の相乗効果は細胞内カルシウムの上昇を引き起こした。このときの細胞内カルシウム変化は小さくまた膜の電位変化はノイズレベルであったので脱分極にもなっていたのかは不明である。

この様に味質であるグルタミン酸に対して細胞が異なる応答を示すことは少なくとも 2 種のグルタミン酸応答機構が一個の細胞に共存していることを示しており、5'-グアニル酸による相乗効果は片方の系に働いていると考えられる。この 2 種のグルタミン酸受容の細胞での機能についてはこれからの課題である。

以上のように膜感受性色素と遊離カルシウム感受性色素を用いて味細胞の味応答を記録した。2 種以上の蛍光色素を使用した測定では試薬の蛍光特性¹⁾が実験を左右する。つまりお互いに干渉し合っているデータそのものが意味を失ってしまう。しかし用いる実験材料によって検討しなければならない①蛍光試薬の選択、②最適な励起波長、③測定する波

マウス味蕾細胞における味刺激応答の画像記録

長の選択によってそれを克服したときは、蛍光試薬がただ2種になったことで得られたデータが何倍にも意味を持つようになる。

今回は細胞内カルシウム濃度変化と膜電位変化を10秒間隔で記録した。モノクロメーターは20 Hzで波長を替えることができる光源である。また di-8-ANEPPS は活動電位を測定できるぐらいすばやい膜電位応答が可能であるし、fura-2 もミリ秒の応答をするので、膜電位やイオン濃度のすばやい変化を追跡することができる実験系である。さらに deblur プログラムをフルに活用して味蕾内の味応答細胞の分布も調べることができる。今後はこのポテンシャルの高さを利用して研究を発展させていく予定である。

本研究は、米国 Monell Chemical Senses Center において、M. Muz Zwiman 博士、John Teeter 博

士、Joseph G. Brand 博士、Diego Restrepo 博士とともに行われたものである。

謝 辞

Img8 プログラムを快く提供して下さった Bernd Lindemann 博士に感謝します。

参考文献

- 1) Slavik J: Fluorescent probes in cellular and molecular biology (Slavik J. eds.). CRC Press, Boca Raton) (1993)
- 2) Monck JR, Oberhauser AF, Keating TJ and Fernandes JM: Thin-Section ratiometric Ca^{2+} images obtained by optical sectioning of fura-2 loaded mast cells. *J. Cell Biol.* 116, 745-759 (1992)