

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アミノ酸の受容*

杉本 久美子*

(東京医科歯科大学歯学研究科神経機構制御学講座)

Abstract

In order to elucidate the taste receptor mechanism for umami tasting substance, monosodium L-glutamate (MSG) and sweet amino acids, the responses of isolated mouse taste receptor cells were investigated using patch-clamp techniques and optical recordings with voltage-sensitive dyes. The effects of the substances that exert synergism with MSG or D-phenylalanine were also investigated.

In some taste receptor cells isolated from the circumvallate and foliate papillae, persistent inward currents were induced by MSG (40-85mM) at a holding potential of -60 mV. The inward currents were reversed at about +10 mV and accompanied with slight conductance increase by 14% on average, indicating involvement of non-selective cation channels in the induced currents. In other cells, MSG induced outward currents at a holding potential of -80 mV. Optical recording showed that MSG slowly depolarized several cells both in a clump of taste bud cells isolated from circumvallate papilla and in an intact taste bud of fungiform papilla. 5'-GMP and 5'-IMP (1 mM), the enhancer of MSG response, increased the whole-cell K⁺ outward currents. Sweet amino acids, D-phenylalanine (D-Phe, 100 mM) and D-tryptophan (D-Try, 20mM), suppressed the whole-cell outward K⁺ currents as well as single K⁺ channel activities in a cell-attached patch. When 2 mM saccharin, the synergist, was added to D-Phe, the outward K⁺ currents were suppressed more strongly. Optical recordings showed that strong depolarization in some taste bud cells induced by D-Try and D-Phe (20 mM) was eliminated by the addition of K⁺ channel blocker to the bath.

Key words: mouse taste bud cells, patch-clamp recording, voltage-sensitive dye, monosodium L-glutamate, sweet amino acids, synergistic effects.

はじめに

旨味の代表的物質であるグルタミン酸ナトリウム (MSG) の受容機構に関する研究は少なく、ほとんど解明が進んでいない。また、糖類および人工甘味料に関しては、味細胞内セカンドメッセンジャーのサイクリックアデノシン 3', 5'-リン酸 (cAMP)

やイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP 3) の情報変換における重要な役割が明らかにされつつあるが、甘味を呈するアミノ酸についてはあまり調べられていない。そこで、本研究では、味細胞におけるこれらの味刺激の受容と情報変換機構を検索する目的で、パッチクランプ法および非侵襲的膜電位測定法の光学計測を用いて、マウスの単離味蕾細胞においてこ

* 平成8年7月4日受付

Reception of amino acids in the mouse taste bud cells.

**Kumiko Sugimoto: Department of Neurobiology, Graduate School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University. 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113 Japan

これらの味刺激がどのような応答を引き起こすかを検討した。さらに、これらの味刺激と相乗効果を示すことが知られている物質の味細胞への作用をあわせて検討した。

材料と方法

実験には ddY 系の 8~15 週齢の雄マウスを用いた。舌を切り出し、上皮下に 2mg/ml のコラゲナーゼを注入して、約 30 分後に味蕾を含む舌上皮を剥離した。単離味蕾細胞を得るために、有郭乳頭と葉状乳頭を含む単離舌上皮を、さらにコラゲナーゼで 10~15 分間、次いで 2mM EGTA を含む低 Ca^{2+} 液で約 10 分間処理し、最終的にマイクロピペットで吸い上げて機械的に味蕾細胞を分離した。紡錘形で細長い細胞突起をもつ細胞を味細胞と判定し記録を行った。味細胞膜の電流は、パッチクランプ法の whole-cell 記録法と cell-attached 記録法を用いて検討した。膜電位の光学計測には Fuji HR Deltaron 1700 を使用し、1 フレーム当たり 19ms の速度で二次元画像を記録した。膜電位感受性蛍光色素として、RH795 あるいは RH155 を細胞膜に取り込ませ、それぞれ 545nm および 710nm の励起光を照射して細胞が脱分極する際の蛍光増加あるいは吸光変化を検出した。味刺激には、MSG および甘味を呈するアミノ酸の D-フェニルアラニン (D-Phe) と D-トリプトファン (D-Try) を用い、味細胞の先端突起部へパフにより局所的に与えた。MSG については、 Na^+ が高濃度とならないよう細胞外液の NaCl と置換した。味応答の修飾物質として、サッカリンナトリウム (Sac)、5'-グアノシンーリン酸 (GMP)、5'-イノシンーリン酸 (IMP) 等を使用し、細胞外液に添加した。標準細胞外液の組成は、145mM NaCl、4.7mM KCl、3.3mM CaCl_2 、0.1mM MgCl_2 、2mM Hepes、7.8mM Glucose で、電極内液の組成は、125mM K-aspartate、20mM KCl、2.5mM MgCl_2 、0.5mM CaCl_2 、10mM Hepes、2mM EGTA であった。溶液はすべて pH を 7.4 に調整し、 O_2 で飽和させて用いた。

結果

単離した味細胞に存在する電位依存性イオンチャンネルは、テトロドトキシン (TTX) 感受性の Na^+ チャンネルとテトラエチルアンモニウム (TEA) 感受性の遅延整流性 K^+ チャンネルが主体であった。この

ような単離味細胞に 40~85mM の MSG 刺激を加えると、一部の味細胞は、-60mV の保持電位において約 14% のコンダクタンス上昇を伴う緩徐な内向き whole-cell 電流を発生し、この電流は +10mV 付近で反転した。また、他の味細胞では -40mV 付近で反転する抵抗増大を伴う外向き whole-cell 電流を発生するものがあつた。このことは、一部の味細胞では、MSG が受容体に結合すると選択性の低い陽イオンチャンネルが活性化され、陽イオンが流入して細胞の脱分極が生ずる可能性を示唆する。これに一致して、膜電位変化の光学計測では、単離味蕾細胞ならびに単離上皮中の茸状乳頭試料において、一部の味蕾細胞で 40mM MSG 刺激に対し緩徐な脱分極応答が観察された。この脱分極応答は K^+ チャンネルブロッカーの 10mM TEA が外液中に存在すると減少し、TEA の作用で MSG 刺激前に味細胞が脱分極したためと推測された。MSG との相乗効果を示すことが知られている¹⁾ GMP あるいは IMP を細胞外液に 1mM 添加すると、外向き K^+ 電流が著明に増大した (図-1)。

一方、100mM D-Phe は、Whole-cell の外向き K^+ 電流を約 15% 減少させ、相乗効果を持つことが知ら

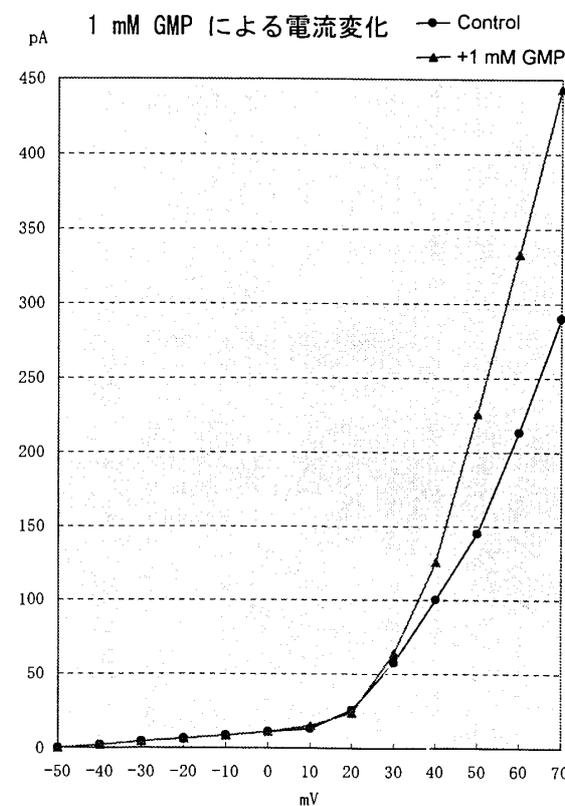


図 1 単離味細胞の外向き K^+ に電流に対する 1mM GMP の作用

マウス味蕾細胞におけるアミノ酸の受容

れる2mM Sac を添加すると一層 K⁺ 電流が抑えられた。また、cell-attached 記録では D-Phe によってパッチ内のチャネル活動が抑えられた。このチャネルの電流は、電極電位が+40mV 付近で反転し、静止膜電位を-60mV と推定すると細胞内が-100mV 付近で反転したこととなる。この反転電位は K⁺ の平衡電位に近いので、D-Phe により抑制されたチャネルは K⁺ チャネルと推測された。光学測定の結果、20 mM D-Phe 刺激によって一部の味蕾細胞に脱分極が発生し、この応答は10mM TEA の存在下では消失することが観察された。20mM D-Try も、D-Phe と同様に whole-cell の外向き K⁺ 電流を抑制するとともに、cell-attached 記録では K⁺ チャネルの活動を抑制する結果が得られ、さらに画像解析では一部の味蕾細胞に強い脱分極を生じることが観察された。

考 察

パッチクランプ法による解析および膜電位感受性蛍光色素を用いた画像解析から、代表的旨味成分である MSG は一部の味細胞で選択性の低い陽イオンチャネルを活性化し、陽イオンの流入によって味細胞に脱分極を発生させることが示唆された。林らが MSG 刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を報告している²⁾ ので、流入する陽イオンに Ca²⁺ 成分が含まれる可能性がある。また、MSG の応答を増強することで知られる GMP や IMP は味細胞の外向き K⁺ 電流を増強したが、これが細胞内 Ca²⁺ により活性化される成分であるかどうか興味深い点である。今後この点を検討することにより、相乗作用に細胞内 Ca²⁺ 濃度のコントロール機構が関与する可能性を明らかにできると考える。ごく最近ラット味細胞に4型の代謝型グルタミン酸受容体が存在することが示され、MSG 刺激の受容体候補と指摘されてい

る³⁾。このタイプの受容体は中枢神経系で細胞内 cAMP を減少させることが知られているので、一群の味細胞で見られた外向き電流の発生はこの受容体と関与する可能性も考えられる。

一方、甘味を呈するアミノ酸の D-Phe および D-Try は、いずれも味細胞の外向き K⁺ チャネルを抑制する作用を示すとともに、脱分極を誘起することが見出された。糖などの甘味刺激は受容体にカップルした G 蛋白質の活性化を介してアデニレートシクラーゼを活性化し、cAMP の産生を促して最終的に K⁺ チャネルを不活性化することにより味細胞を脱分極させることが明らかにされている。今回検討した甘味を呈するアミノ酸についても、cAMP の増産を介する K⁺ チャネルの不活性化という機構と矛盾しない結果が得られており、相乗効果を持つ Sac とともに味細胞の K⁺ チャネルを抑制して脱分極を生じる可能性があると考えられる。これらの相乗効果の機構については今後詳細な検討を加える予定である。

参考文献

- 1) Yoshii K, Yokouchi C and Kurihara K: Synergistic effects of 5'-nucleotide on rat taste responses to various amino acids. *Brain Res.* 367, 45-51 (1986)
- 2) 林由佳子, Zviman MM, Restrepo D and Teeter JH: マウスのグルタミン酸刺激に対する電氣的応答と細胞内 Ca²⁺ 変化. *味と匂誌* 2, 343-345 (1995)
- 3) Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T and Roper S: The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J. Neurosci.* 16, 3817-3826 (1996)