

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700469

研究課題名(和文)活動電位と起動電位の動的関係に基づく味物質濃度検出機構

研究課題名(英文) Detecting mechanism of tastant concentrations by a kinetic model for action potentials and generator potentials.

研究代表者

大坪 義孝(Ohtubo, Yoshitaka)

九州工業大学・生命体工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00380725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：味物質受容細胞が発生する電気信号、活動電位は、味情報伝達に重要な役割を担っている。私は、味覚器である味蕾を構成する細胞のタイプによって活動電位の形状が異なること、活動電位の生成に關与する電位依存性電流の性質および遺伝子発現に細胞型依存性があることを明らかにした。各細胞型について、味情報伝達における活動電位の役割について議論する。

研究成果の概要(英文)：Action potentials in taste receptor cells play an important role in taste transmissions to neighboring cells including taste nerve fibers. I show that the shape of action potentials differs among cell types and that taste bud cells express voltage-gated channels and their genes in a cell-type-dependent manner. The discussion is made on the role of these voltage-gated currents in the transmission of taste responses.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：味蕾細胞 活動電位 電位依存性チャネル パッチクランプ法 single cell RT-PCR 免疫染色法

1. 研究開始当初の背景

食べ物に含まれる化学情報は、味質と濃度である。我々が感じる味質は、一般に基本5味と呼ばれ、甘味・塩味・苦味・酸味・旨味の5種類に分類される。これらの味覚を引き起こす物質は、口腔内に多数分布する味蕾で検出される。マウス単一味蕾は、約50の味蕾細胞から成り、味蕾細胞は更に4種類の細胞型(～型)に分類される。近年の研究により、基本5味に対する受容体は、別々の味蕾細胞が発現し、型細胞の一部は塩味、型細胞は甘味・旨味・苦味、型細胞は酸味を受容すると考えられるようになってきた。

一方、味の濃度に関する研究は、味蕾細胞からの出力情報を受け取る味神経からの測定が古くから行われ、味物質濃度の増加は、味神経の発火周波数を増加させることが分かっている。しかし、味蕾細胞レベルでの研究はほとんどない。また、単一味神経は、複数の味蕾細胞の情報を受け取るため、味神経の応答特性から味蕾細胞の電氣的応答を予測するのも単純ではない。私は予備実験で、味蕾細胞は、神経細胞に比べ、活動電位の高周波発火が困難な細胞であることを明らかにした(Ohtubo, 2009)。この結果は、味蕾細胞は、神経細胞とは異なる手法で、化学物質の濃度の違いを生体信号に変換することを示唆する。本研究では、味の濃度変化に対する味蕾細胞の活動電位と起動電位の動的関係に着目し、味蕾細胞における味物質濃度検出機構を明らかにする。

2. 研究の目的

生体電気信号の生成には各種イオンチャンネルが関与している。興奮性細胞と同様に味蕾細胞においても、活動電位を伴う膜電位変化が味情報伝達において重要である。前述したように、味蕾細胞は細胞型によって発現する味物質受容体が異なっている。この味物質受容体発現の違いに加え、味神経への情報伝達方法も細胞型によって異なる。型細胞は電位依存性ヘミチャンネルの開口による傍分泌によって、型細胞は化学シナプスによって味情報を伝達すると考えられている。従って、細胞の電気生理学的特徴や味物質応答特性を細胞型と関連付けて研究することは、味物質濃度検出機構の解明において重要である。本研究では、味蕾細胞の電気生理学的および分子生物学的特徴と細胞型の関係を常に明確にし、以下の点を明らかにする。

(1) 活動電位形成に關与するイオンチャンネルの性質と種類

活動電位は、上昇相(電位依存性Naチャンネルの活性化)と下降相(電位依存性Kチャ

ネル、電位依存性陰イオンチャンネル、ヘミチャンネルなどの活性化)からなる。これらイオンチャンネルの発現量や種類の違いは、活動電位の発火周波数に影響を与える。各味蕾細胞型について、電位依存性Naチャンネルの電気生理学的特徴を明らかにし、薬理的に分類する。下降相についても、電位依存性電流の特徴、薬理的性質を解明する。

(2) 味蕾に発現するイオンチャンネルサブタイプの同定

電位依存性Naチャンネルはサブユニットとサブユニットから成り、9種類のサブユニットと4種類のサブユニットの遺伝子サブタイプが存在する。味蕾細胞特異的に発現するサブタイプの同定を行う。下降相を形成する電位依存性Kチャンネル、電位依存性陰イオンチャンネル、ヘミチャンネルなどの遺伝子は多数存在する。電流特性の薬理学実験から予想されるイオンチャンネルについて同定を試みる。

(3) イオンチャンネルサブタイプと細胞型の関係

味蕾細胞は細胞型によって味物質受容体や伝達物質の放出方法が異なっている。(2)で同定したイオンチャンネルの遺伝子サブタイプと細胞型の関係を解明する。

3. 研究の方法

1) 活動電位形成に關与するイオンチャンネルの性質と種類

細胞の電気生理学的特性を調べるためにホールセルパッチクランプ法を適用した。細胞型との関連性は、ホールセルパッチクランプ電極内にマーカー物質(バイオサイチン)を導入することで調べた。具体的には、電位依存性電流の測定および薬理学実験終了後、その標本に対し、免疫染色法を適用した。型および型細胞に特異的な抗体と、バイオサイチン-アビジン反応を利用した三重染色法を用い、共焦点レーザー顕微鏡で測定した細胞の細胞型を同定した。各細胞型について、電位依存性電流の大きさや特徴(活性化・不活性化電位など)および薬理的性質を測定、比較した。

(2) 味蕾に発現するイオンチャンネルサブタイプの同定

電位依存性Naチャンネルのサブユニットとサブユニットに特異的なプライマーを設計し、味蕾に発現する遺伝子サブタイプをReverse Transcription (RT)-PCR法で同定した。下降相形成に寄与しているイオンチャンネルについては、薬理学実験の結果から予想さ

れるイオンチャンネルについてサブタイプ同定を行った。

細胞が死んでしまうと mRNA は急速に分解されるため、素早い標本調整が必要となる。また、他組織からの細胞の混入を避ける必要がある。この両方を満たすため、標本調整が短時間 (~10 分) ですむ剥離舌上皮標本に二本のガラス電極を用いて味蕾を採取する方法を用いた。具体的には、先端が細いガラス電極で味蕾を剥離舌上皮標本から切り離し、味蕾を吸い付けた。剥離舌標本から離れた位置に、先端が太い二本目の吸引用ガラス電極を待機させた。一本目の電極に吸い付いている味蕾を二本目の電極開口部まで移動させ、二本目の吸引電極で味蕾を吸い取り、電極内に吸引した味蕾細胞のみを RT-PCR 実験に用いた。

(3) イオンチャンネルサブタイプと細胞型の関係

研究方法 (2) で絞り込んだ各電位依存性チャンネルサブタイプと細胞型との関連は Single Cell RT-PCR 法で解明した。単一細胞からの RNA 抽出は困難なため、イントロンを含むプライマーセットを目的遺伝子に対して 2 セット準備した。まず、1 セット目のプライマーセットを用い RT-PCR を行った。その増幅産物に対して 2 セット目のプライマーセットを用いて PCR を行った。研究方法 (2) の二本のガラス電極を用いた味蕾採取法を単一味蕾細胞に応用することで、他細胞の混入を防ぎ、味蕾細胞型とチャンネルサブタイプとの関係を調べた。

4. 研究成果

(1) 活動電位形成に関与するイオンチャンネルの性質と種類

電位依存性電流およびその薬理的性質を測定した細胞の免疫染色性から、型、型および型と型の免疫染色性を示さない細胞 (Non-IR) の 3 種類に測定した細胞を分類した。分類できた全ての細胞は電位依存性外向き電流 (電位依存性 K チャンネル、電位依存性陰イオンチャンネル、ヘミチャンネル) を機能的に発現していた。電位依存性内向き電流 (電位依存性 Na 電流) を発現していた細胞は、分類できた細胞の 94% であった。外向きおよび内向き電流密度の大きさは、Non-IR 細胞が他の細胞型に比べ有意に小さかった。各細胞型に発現する電位依存性 Na チャンネル電流の大部分は、 $1 \mu\text{M}$ テトロドトキシン (TTX) で抑制され、一部の電流は抑制されなかった。型細胞の外向き電流は K チャンネルブロッカーであるテトラエチルアンモニウム (TEA) で大部分が抑制された。しかし、型細胞の外向き電流は TEA 感受性を持たない電流が主であった。型および型細胞の外向き電流の活性化速度に違いがあった。また、型細胞の活動電位は、型細胞に比べ、 -20mV における活動電位の幅が有意に狭いことが分かった。これらの結果は、細胞型依存的に電位依存性チャンネルを発現していることを示す。

ウム (TEA) で大部分が抑制された。しかし、型細胞の外向き電流は TEA 感受性を持たない電流が主であった。型および型細胞の外向き電流の活性化速度に違いがあった。また、型細胞の活動電位は、型細胞に比べ、 -20mV における活動電位の幅が有意に狭いことが分かった。これらの結果は、細胞型依存的に電位依存性チャンネルを発現していることを示す。

(2) 味蕾に発現するイオンチャンネルサブタイプの同定

電位依存性 Na チャンネルの薬理実験から、味蕾細胞には少なくとも 2 種類のタイプが存在する。各サブタイプについて特異的プライマーを作成し、遺伝子サブタイプを同定した。味蕾細胞には数種類のサブユニットが発現し、TTX 感受性タイプと TTX 非感受性タイプの遺伝子を同定できた。この結果は薬理実験と一致した。これらサブタイプの RNA 発現量を定量的に調べ、味蕾細胞の主要な電位依存性 Na チャンネルを同定した。またサブタイプについても遺伝子発現を調べ、少なくとも 1 種類のサブタイプ発現を明らかにした。サブユニットは電位依存性 Na チャンネルの電気生理学的性質を修飾する。味蕾細胞は活動電位の繰り返し発火が困難な性質を持つのは、サブユニットによるチャンネル修飾が予想される。

下降相を形成する外向き電流については、型細胞の主成分である TEA 非感受性電流について調べた。ヘミチャンネルを形成するコネキシンタンパク質について、これまでの研究成果と合わせて、合計 19 種類のマウスコネキシン遺伝子について調べ、数種のサブタイプを同定できた。また、他のヘミチャンネル構成タンパク質であるパネキシンの遺伝子サブタイプ Px1 が発現することも確認した。また、最近の研究で味情報伝達に CALHM1 チャンネルが関与していることが示唆された。この遺伝子もマウス味蕾細胞に発現することを確認した。型細胞の主な外向き電流である TEA 感受性電流については、今後明らかにする予定である。

(3) イオンチャンネルサブタイプと細胞型の関係

電位依存性 Na チャンネル発現の細胞型依存性について single cell RT-PCR 法で調べた。同定できた数種類のサブタイプのうち、細胞型依存性があるものと無いものがあった。

味蕾細胞は受容体発現や情報伝達機構に加え、電気信号形成に必要な電位依存性チャンネルの発現および電気生理学性質も細胞型

依存性があることを示唆した。発現するサブタイプが異なることは、細胞毎に異なる調節機構が存在する可能性がある。今後、チャネル修飾機構などを中心に味情報の生体情報への変換機構を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kimura K, Ohtubo Y, Tateno K, Takeuchi K, Kumazawa T, Yoshii K., Cell-type-dependent action potentials and voltage-gated currents in mouse fungiform taste buds. European Journal of Neuroscience 39(1), 24-34, 2014

[学会発表](計7件)

Tateno K, Ohtubo Y, Kimura K, Takeuchi K, Kumazawa T, Yoshii K., Action potential shapes for a change in TEA-insensitive current ratio in mouse taste bud cell model. FENS Featured Regional Meeting, Final Programme p50, PI-D-105, September 11-14, Prague, Czech Republic, 2013

Takeuchi K, Ohtubo Y, Yoshii K., Aging effects on electrophysiological properties of taste receptor cells in ~20-month-old mice. FENS Featured Regional Meeting, Final Programme p50, PI-D-106, September 11-14, Prague, Czech Republic, 2013

Ohtubo Y, Hashiguchi Y, Yamasaki T, Yoshii K., Postnatal development of taste buds in mouse soft palates. The 47th Annual Meeting of the Japanese Association for the Study of Taste and Smell, Program and Abstracts, p 86, P-011, September 5-7, Sendai, Japan, 2013

Ohtubo Y, Takeuchi K, Yoshii K., Aging of voltage-gated currents in mouse fungiform taste bud cells. The Journal of Physiological Sciences, Proceedings of the 90th Annual Meeting, Volume 63, supplement 1, p S253, 3PK-079, March 27-29, Tokyo, Japan, 2013

Ohtubo Y, Yoshii K., Cell type dependence of voltage-gated sodium channel currents in fungiform taste bud cells. 8th FENS Forum of Neuroscience, Programme p184, July 14-18, Barcelona, Spain, 2012

Yoshii K, Kimura K, Ohtubo Y, Kumazawa T., Action potentials and voltage-gated currents of mouse taste bud cells. 8th FENS Forum of Neuroscience, Programme p184, July 14-18, Barcelona, Spain, 2012

Ohtubo Y, Iwamoto M, Yoshii K., Postnatal development of taste bud cells in mouse fungiform papillae. 8th International Brain Research Organization (IBRO) World congress of neuroscience, Program book p118, C242, July 14-17, Florence, Italy, 2011

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他] ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 大坪 義孝
九州工業大学 生命体工学研究科
(准教授)

研究者番号：00380725

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：