

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592155

研究課題名（和文） 味細胞分化・再生メカニズムの解明

研究課題名（英文） The mechanisms of differentiation and regeneration of taste cells in the frog taste disc

研究代表者

深見 秀之 (FUKAMI HIDEYUKI)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：30382625

研究成果の概要：

カエル味覚器である茸状乳頭は切り取って除去した後、再生してくる。本研究の目的は再生過程にあるカエル味覚器内細胞の電気生理学的特性を細胞タイプ別に調べ、成熟味細胞と比較することで、味細胞の分化・再生機構を明らかにすることである。まず、成熟味細胞の基礎的データを得るために、味細胞タイプ別に味覚受容機構を調べた。成熟味細胞では Ib 型および II 型細胞が苦味を受容する細胞であり、III 型細胞が塩味を受容する細胞であることを明らかにした。摘出後 1 ヶ月経過し再生してきた味覚器は苦味や塩味を受容することを明らかにした。摘出後 1 ヶ月で苦味および塩味を受容する細胞タイプに分化していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生理学、味細胞、味覚器、再生、分化、味覚受容、細胞タイプ、膜電流、細胞内カルシウム

1. 研究開始当初の背景

味蕾を構成する細胞は電顕像によってタイプ I、II、III および基底細胞に分類される。それぞれの細胞タイプで味覚受容における役割が異なると考えられているが未だ不明な点が多い。味細胞は基底細胞からそれぞ

れの細胞タイプに分化していくと考えられている。しかし、細胞タイプごとの細胞系譜は明らかになっていない。細胞の分化段階に応じて電位依存性イオンチャネルの発現は調節されている。これまで、味細胞の発生・再生過程で細胞の電位依存性電流の性質が

変化することが報告されてきた。しかし、この再生過程における電位依存性電流の変化を細胞タイプとの関係についてはあまり考慮されてこなかった。これまで味蕾の再生研究は主に組織学的手法で行われてきた。しかし、味細胞は興奮性細胞であり、味細胞の分化機構を探る上で再生過程における電気生理学的特性や味覚受容機構の変化を明らかにしていく必要が有る。

2. 研究の目的

味蕾は味細胞を含む数種類の細胞タイプから成る。味蕾の再生過程においてそれぞれの細胞タイプの分化メカニズムについては不明な点が多い。興奮性細胞はその細胞分化過程で電位依存性イオンチャネルの発現が調節されている。そのため細胞の分化段階に応じて膜電流の構成が変化していく。本研究で我々は興奮性細胞である味細胞からパッチクランプ記録を行い、膜電流を記録する。パッチ電極に封入した蛍光色素で味細胞タイプを形態学的に同定し、味細胞タイプごとの再生過程における膜電流の変化を明らかにする。

味細胞タイプごとに受容する味物質が異なると考えられているが、それぞれの味細胞タイプとその受容機構の関係は不明な点が多い。そこで、成熟味細胞タイプ別に味覚受容機構を調べ明らかにする。この味覚受容機能が再生過程のどの段階で回復するかを明らかにする。

3. 研究の方法

体重 200-400g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) をウレタン (3g/kg) で麻酔後、舌を摘出した。ホールセルパッチクランプ法やカルシウムイメージング法をスライス標本の細胞に適用した。

(1) スライス標本とカルシウムイメージング法

1 個の味覚器を摘出し、鋭利なメスで半切しスライス標本を作製した。

パッチ電極法により味覚器内細胞の膜電流を測定した。また、カルシウムイメージング法による味細胞内 Ca^{2+} の動態を調べた。 Ca^{2+} 感受性色素 (Calcium Green-1 dextran, potassium salt, 3000 MW (CaGD)) をパッチ電極内に充填し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000BX61WI-TS、オリンパス) を用いて、味細胞内 Ca^{2+} の動態を観察した。CaGD の励起はアルゴンレーザー (励起波長 488 nm) を用いた。記録細胞を標識することで細胞タイプを同定した。

細胞内 Ca^{2+} の上昇が膜電流変化に関与しているかを調べるために 2.5 mM 2,6-dimethyl-4-nitropyridine (DMNP)-EDTA と 0.75 mM $CaCl_2$ (caged Ca^{2+}) を電極内液に

封入しパッチクランプ記録を行った。405 nm レーザーで caged Ca^{2+} の uncaging を行い、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、膜電流を記録した。

(2) 味覚器内細胞の先端受容膜近辺への味覚刺激

味覚刺激液を充填したパイペットからスライス標本における先端受容膜近辺にピコスプリッター (General Valve Corporation) を通じて 5-10 秒間圧をかけ味覚刺激液を噴出 (パフ) させて味覚刺激を行った。

(3) 再生してきた味覚器からの味覚神経応答記録

味覚器摘出後一ヶ月経過したカエルを用いた。再生してきた味覚器から吸引電極を用いて味刺激を行った時の逆行性神経インパルスを記録した。

(4) 再生してきた味覚器スライス標本からのパッチクランプ記録

味覚器摘出後一ヶ月経過したカエルを用いた。1 個の味覚器を摘出し、鋭利なメスで半切しスライス標本を作製した。パッチ電極法により味覚器内細胞の膜電流を測定した。パッチ電極内に Alexa Fluor 488 hydrazide を充填し、記録細胞を標識することで細胞タイプを同定した。

4. 研究成果

(1) 成熟味細胞の味覚受容機構

カエル舌の味覚器は舌咽神経線維によって支配されている。カエル舌咽神経線維には水や低濃度の Ca^{2+} によく応答する水線維と苦味物質のキニーネによく応答する Q-線維が存在する。水線維は持続的刺激に対し持続性応答を示し、Q-線維は刺激が持続しても一過性の応答しか出現しない相動性応答を示す。水線維はキニーネ刺激には応答せず、Q-線維は Ca^{2+} に応答しない。これらの性質の違いからこの 2 種類の神経線維は異なる味覚受容細胞を支配することが考えられる。そこで、キニーネ味覚刺激あるいは Ca^{2+} 味覚刺激ほどのタイプの細胞によって受容されるか調べた。また、水線維は Na^+ にも応答する。この水線維の Na^+ 応答は刺激液に加えた低濃度の $NiCl_2$ によって増強される。そこで、2 mM の $NiCl_2$ を含む NaCl 溶液を刺激液に用いて Na^+ 味覚刺激ほどのタイプの細胞によって受容されるか調べた。

① 苦味刺激

10 mM 塩酸キニーネ (Q-HCl) パフ刺激をスライス標本の口腔サイドに面した細胞の先端受容膜近辺に 5 秒間与えた。図 1 に示すように Q-HCl 刺激は Ib 型細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流の増加をもたらした。Q-HCl 刺激で Ib 型細胞の 11 個の内、8 個で細胞内 Ca^{2+} 濃度

および内向き電流が増加した。II型細胞ではQ-HCl刺激で11個の内、2個の細胞で細胞内Ca²⁺濃度の増加が見られた。図2に示すようにQ-HCl刺激はII型細胞において細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流の増加をもたらした。II型細胞では外液をCa²⁺ freeにしても、Q-HCl刺激による細胞内Ca²⁺濃度の増加が観察された。このことは細胞内Ca²⁺濃度の増加は細胞外からではなく、細胞内のCa²⁺ストアからもたらされたことを示す。しかし、III型細胞ではQ-HCl刺激による細胞内Ca²⁺濃度と内向き電流の変化は見られなかった (n=8)。

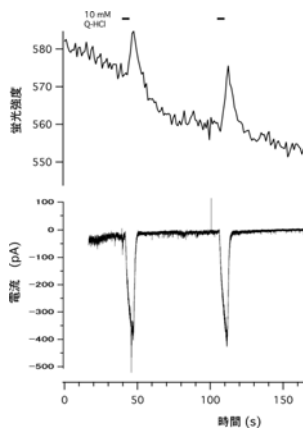


図1 Q-HCl刺激によりIb型細胞におこった細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流。細胞は-80 mVに電圧固定している。

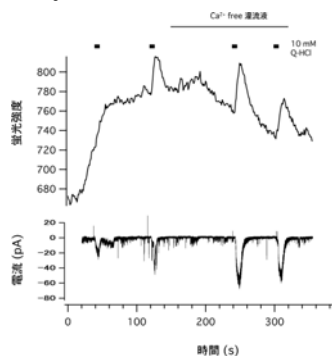


図2 Q-HCl刺激によりII型細胞におこった細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流。細胞は-80 mVに電圧固定している。

②Ca²⁺味覚刺激

40 mM CaCl₂刺激液で5秒間のパフ刺激を細胞の先端受容膜近辺に与えた。図3に示すように細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流の増加がIII型細胞で見られた。CaCl₂刺激でIII型細胞の4個の内、2個で細胞内Ca²⁺濃度および内向き電流が増加した。また、Ib型細胞 (n=4) およびII型細胞 (n=3) ではCaCl₂刺激で応答はみられなかった。

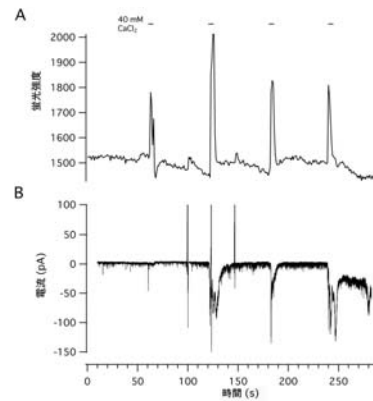


図3 CaCl₂刺激によりIII型細胞におこった細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流。細胞は-80 mVに電圧固定している

③Na⁺味覚刺激

110 mM NaCl + 2 mM NiCl₂刺激液で5秒間のパフ刺激を細胞の先端受容膜近辺に与えた。図4に示すように細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流の増加がIII型細胞で見られた。NaCl刺激でIII型細胞の10個の内、7個で細胞内Ca²⁺濃度および内向き電流が増加した。Ca²⁺ free Ringer液還流下で、110 mM NaCl + 2 mM NiCl₂刺激による細胞内Ca²⁺濃度の増加が観察された。このことは細胞内Ca²⁺濃度の増加は細胞外からではなく、細胞内のCa²⁺ストアからもたらされたことを示す。また、Ib型細胞 (n=3) およびII型細胞 (n=13) ではNaCl刺激で応答はみられなかった。次に、内向き電流の成分をcaged Ca²⁺を用いて調べた。caged Ca²⁺を充填したパッチ電極内液を用いてタイプIII細胞からパッチクランプ記録を行った。405 nmレーザーでuncagingを行い、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させた。細胞内Ca²⁺濃度の上昇に伴って内向き電流が観察された。NaCl受容機構には細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出と細胞内Ca²⁺濃度の上昇に伴う非選択的陽イオンチャネルの開口が関与していることが示唆された。

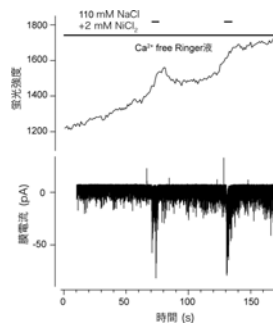


図4 NaCl+NiCl₂刺激によりIII型細胞におこった細胞内Ca²⁺濃度の上昇による蛍光強度の増大と内向き電流。外液をCa²⁺ freeにし

ても、刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が観察された。細胞は -80 mV に電圧固定している。

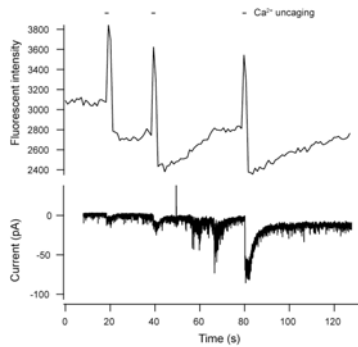


図4 caged Ca^{2+} の uncaging による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と内向き電流。細胞は -80 mV に電圧固定している。

(2) 味覚器再生過程における味覚神経応答

図5に味覚器摘出後30日経過し再生してきた味覚器から記録した味覚神経応答である。 CaCl_2 刺激により水線維から持続的応答が記録された。 QHCl 刺激によりQ線維から一過性の応答が記録された。成熟味細胞では細胞タイプで受容する味物質が異なっている。したがって、味覚器摘出後30日で味細胞は苦味を受容するIb型およびII型細胞と Ca^{2+} を受容するIII型細胞に分化しているものと思われる。

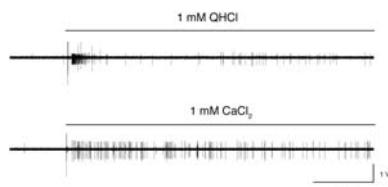


図5 再生味覚器を吸引した吸引電極から記録した QHCl と CaCl_2 刺激による味覚神経の逆行性インパルスの記録。

(3) 再生過程の味細胞からの膜電流記録

摘出後30日経過し再生してきた味覚器のスライス標本から一個のIb型細胞と一個のIII型細胞からパッチクランプ記録ができた。蛍光画像からIb型細胞は羽根状の突起を持ち、III型細胞は細いロッド状の突起を持つことから、細胞の外部形態は摘出後30日以内に成熟味細胞と同様の形に再生してくると思われる。再生Ib型細胞の内向き電流の最大値は -619.02 pA であった。 -80 mV から 60 mV まで脱分極させた時の外向き電流の最大値は 220 pA であった。我々の成熟味細胞でのデータではIb型細胞内向き電流の最大値は平均で $-1666\pm 124\text{ pA}$ で、 -80 mV から 60 mV まで脱分極させた時の外向き電流の最大

値は平均で $1149.3\pm 160.6\text{ pA}$ であった。Ib型細胞において内向き電流、外向き電流ともに30日では成熟味細胞のレベルにまで回復していないものと思われる。再生III型細胞の内向き電流の最大値は -271.7 pA であった。 -80 mV から 60 mV まで脱分極させた時の外向き電流の最大値は 222.2 pA であった。成熟III型細胞内向き電流の最大値は平均で $-680\pm 50\text{ pA}$ で、 -80 mV から 60 mV まで脱分極させた時の外向き電流の最大値は平均で $964\pm 68.7\text{ pA}$ であった。III型細胞において内向き電流、外向き電流ともに30日では成熟味細胞のレベルにまで回復していないものと思われる。今回、II型細胞からは記録が取れなかった。

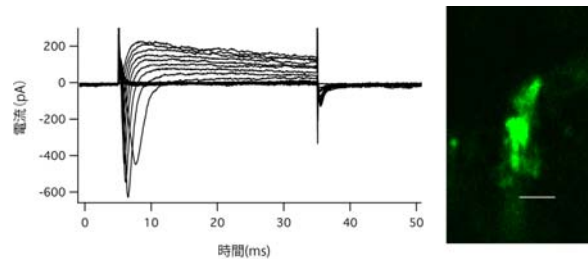


図6 再生Ib型細胞から記録した電位依存性電流と細胞の蛍光画像。蛍光写真のスケールは $10\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

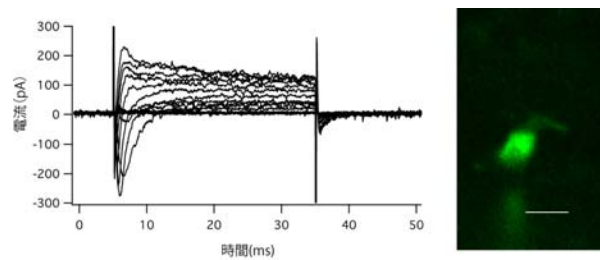


図7 再生III型細胞から記録した電位依存性電流と細胞の蛍光画像。蛍光写真のスケールは $10\text{ }\mu\text{m}$ を示す。

成熟味細胞の味覚受容機構の研究において NaCl 刺激により Ca^{2+} free Ringer液の灌流下でIII型細胞に内向き電流が流れ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見られることを明らかにした。しかし、 Ca^{2+} free Ringer液で灌流していることと細胞を電圧固定していることから、この NaCl 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は電位依存性 Ca^{2+} チャネルを通る Ca^{2+} の細胞外からの流入ではなく細胞内 Ca^{2+} ストアからもたらされたものと思われる。 NaCl 味覚受容メカニズムには味細胞先端受容膜あるいは味細胞基底外側膜にある Na^+ チャネルからの Na^+ の細胞内流入による味細胞の脱分極が引き金となり、電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開き細胞内に Ca^{2+} が流入し神経伝達物質が放出される経路が考えられてきた。しかし、本

研究の成果はカエルの NaCl 応答には Na⁺チャネルからの Na⁺の流入による脱分極以外の細胞内シグナル伝達経路が関わっている可能性を示すものである。Caged Ca²⁺を用いた実験の結果より III 型細胞には細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出と細胞内 Ca²⁺濃度の上昇に伴う非選択的陽イオンチャネルの開口を引き起こす細胞内シグナル伝達経路が存在することが明らかになった。この研究をさらに進め塩味受容機構を明らかにする必要がある。本研究でカエルにおいては味覚器摘出後 30 日で Ca²⁺と Q-HCl に対する味覚応答が回復していることが分かった。摘出後 30 日で Ib 型細胞と II 型細胞にそして、Ca²⁺を受容する III 型細胞に分化しており、味覚神経線維との連絡が回復していると思われる。Ib 型細胞と III 型細胞では内向き電流、外向き電流がピークのレベルまで回復していないが記録された。したがって膜電流は小さいものの興奮することが可能で受容した味覚情報を伝達できると思われる。

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 2 件)

1) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : カエル味覚器細胞タイプとキニーネ味覚刺激 : 細胞内カルシウム変化と膜電流応答. 日本味と匂学会誌 14 巻 3 号 291-294 平成 19 年 (2007) 査読あり

2) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : NaCl 味覚刺激によるカエル味細胞の細胞内カルシウム濃度変化と膜電流応答. 日本味と匂学会誌 15 巻 3 号 375-376 平成 20 年 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

1) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : カエル味覚器細胞タイプとキニーネ味覚刺激 : 細胞内カルシウム変化と膜電流応答. 第 41 回日本味と匂学会 平成 19 年 (2007) 東京

2) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : キニーネ味覚刺激によるカエル味覚器細胞の細胞内 Ca²⁺濃度変化と膜電流応答. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会 平成 19 年 (2007) 札幌

3) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : キニーネおよびカルシウム味覚刺激に対するカエル味細胞の応答. 第 40 回東北生理談話会 平成 19 年 (2007) 仙台

4) Fukami, H., Okuda-Akabane, K. and Kitada, Y. : Membrane currents and intracellular Ca²⁺ in identified taste cells of the frog induced by quinine and CaCl₂ taste stimuli. 5th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception. 平成 19 年 (2007) Fukuoka

5) Fukami, H., Okuda-Akabane, K. and Kitada, Y. : Intracellular Ca²⁺ and membrane current responses to quinine and CaCl₂ taste stimuli in frog taste cells. 第 85 回日本生理学会大会 平成 20 年 (2008) 東京

6) Fukami, H., Okuda-Akabane, K. and Kitada, Y. : Responses to quinine-HCl and CaCl₂ in morphologically identified frog taste cell. 15th International Symposium on Olfaction and Taste 平成 20 年 (2008) San Francisco

7) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : NaCl 味覚刺激によるカエル味細胞の細胞内カルシウム濃度変化と膜電流応答. 第 42 回日本味と匂学会 平成 20 年 (2008) 富山

8) 深見秀之、奥田・赤羽和久、北田泰之 : カエル味細胞の NaCl 味覚刺激に対する応答 : NiCl₂ の増強効果を利用して. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会 平成 20 年 (2008) 東京

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他] 6. 研究組織

(1) 研究代表者

深見 秀之 (FUKAMI HIDEYUKI)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 30382625

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

赤羽 和久 (AKABANE KAZUHISA)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 70160801

北田 泰之 (KITADA YASUYUKI)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号 : 80018423