

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791355
 研究課題名（和文）味細胞の活動電位依存性ATP放出：超微量リアルタイム測定法の開発
 研究課題名（英文）Action potential-dependent ATP release from taste receptor cells: development of real-time micro determination for neurotransmitter release at single cell level
 研究代表者
 村田 芳博（MURATA YOSHIHIRO）
 高知大学・教育研究部医療学系・助教
 研究者番号：40377031

研究成果の概要（和文）：

味細胞の一部（II型細胞）は、味刺激に応答するにも関わらず求心性神経とのシナプス形成因子が欠落している。本研究ではII型細胞の神経伝達物質（ATP）放出能と味細胞が発する活動電位の機能を調べた。その結果、II型細胞は発火頻度の増大に応じてATPを放出し、活動電位の阻害で抑制され、ヘミチャネルの阻害で消失した。II型細胞の活動電位は、ヘミチャネルを介したATP放出を増幅する働きがあることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Subsets of taste bud cells generate action potentials in response to sapid stimuli. Type II taste cells have many taste transduction molecules but lack well elaborated synapses, which leads to the question in the functional significance of action potentials in these cells. We examined the dependence of adenosine triphosphate (ATP) transmitter release from taste cells upon action potentials. To identify Type II taste cells we used mice expressing a green fluorescence protein (GFP) transgene from the gustducin promoter. Action potentials were recorded by an electrode basolaterally attached to a single GFP-positive taste cell. ATP release was monitored from gustducin-expressing taste cells by collecting the electrode solution immediately after tastant-stimulated action potentials and using a luciferase assay to quantify ATP. Stimulation of gustducin-expressing taste cells with a sweet, bitter, or umami compound on the apical membrane increased ATP levels in the electrode solution; the amount of ATP depended on the firing rate. Increased spontaneous firing rates also induced ATP release from gustducin-expressing taste cells. ATP release from gustducin-expressing taste cells was depressed by tetrodotoxin and inhibited below the detection limit by carbenoxolone. Our data support the hypothesis that action potentials in Type II taste cells enhance ATP release through hemichannels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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： 味細胞、活動電位、シナプス、神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

味覚はヒトの食行動を左右する重要な口腔内感覚であり、その入力センサーとして機能するのが味細胞である。味細胞で得られた情報は、化学シナプスを介して味神経に伝達される。形態学的にI型、II型、III型細胞および基底細胞の4つに分類される味細胞のうち、シナプス小胞を持つのはIII型細胞である (e. g. Yang et al 2000)。しかし、甘味、うま味および苦味受容体 (T1r, T2r) を発現しているのは、シナプス前細胞の特徴を持たないII型細胞であることが判明した。(例 DeFazio et al 2006)。すなわち、受容体を発現する味細胞 (II型) は、旧来のシナプスでない、何らかのメカニズムで神経へ味情報を伝達することと思われるが、そのメカニズムはどのようなものなのか、研究当初、味覚研究が抱える最大の謎となっていた。

味細胞・味神経間の神経伝達物質の新たな候補として、研究当初、ATPが注目されていた。その最大の理由は、味神経のATP受容体・P2X₂/P2X₃の遺伝子のダブルノックアウトマウスが味に対して全く応答しないことが判明したことによる (Finger et al 2005)。また、さらに、単離味細胞にATPバイオセンサーを近づけた研究でII型細胞はヘミチャネルを介してATPを放出する可能性が示され (Romanov et al 2007、Huang et al 2007)、シナプス小胞を必要としないATP放出メカニズムが浮かび上がってきた。しかし、味細胞のATP放出が自然条件下での味刺激に応じて生じうるか、さらに何を直接のトリガーとしてどのようなメカニズムで作動するかは全く不明であった。

前段の報告で興味深いのは、味細胞は、活動電位様のパルス波を与えられただけでATPを放出することである (Romanov et al 2007)。味細胞の活動電位は約20年前に両生類味細胞で記録されたのが始まりで、哺乳類の味細胞でも様々な味刺激により活動電位が発生する。活動電位を発生する味細胞の応答はほぼそのまま味神経に伝達されていることから (Yoshida et al 2006)、味細胞の活動電位発現が味細胞・味神経間の情報伝達に極めて重要だと考えられる。すなわち、シナプス小胞を必要としないATP放出メカニズムを解明する鍵は、活動電位を発生する味細胞にあると考えられたのである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、味細胞に備わっている新規活動電位に依存した新規の神経伝達物質放出機構を解明することにある。本研究ではATPに焦点を当て、まず活動電位を発生する味細胞 (II型細胞およびIII型細胞) がATPを放出するのかを味応答特性ごとに検証する。味刺激に応じてATPが放出される味細胞について、神経伝達物質放出における活動電位の機能を明らかにするために、ATP放出が活動電位の発火頻度に依存して生じるかどうかを検証し、ATP放出に関わる因子を明らかにする。上記の目的を達成するために、当研究室で確立した活動電位記録システムをもとに、単一味細胞の応答を測定しながら、放出される超微量のATPをリアルタイム測定する新たなシステムを開発することを目指した。

3. 研究の方法

GFPマウス茸状乳頭由来のII型細胞またはIII型細胞から、共焦点レーザー顕微鏡下でルーズパッチ記録法により活動電位を記録した。味孔に限局して与えられた味刺激に対して活動電位の発火頻度が上昇したら、記録後速やかに電極内液を回収してルシフェラーゼアッセイに供し、超微量のATPをリアルタイム測定する方法を開発した。本研究ではII型細胞とIII型細胞の活動電位発生の有無と味応答特性を解析しながら、ATP放出能を調べ、ATP放出が活動電位の発火頻度に依存するかを明らかにし、どのような因子が関与するかを薬理的に解析した。

4. 研究成果

(1) II型細胞のATP放出能とその発火頻度依存性

甘味刺激で誘発される活動電位の頻度が上昇すると、記録電極内液に検出されたATP濃度は増大する傾向を示した。苦味刺激でも同様の結果が得られた。うま味刺激に反応したII型細胞からもATPが検出された。さらに自発発火頻度とATP検出量との間にも正の相関がみられた。

(2) II型細胞のATP放出におけるヘミチャネルの機能

II型細胞からのATP放出は、ヘミチャネルブロッカーのカルベノキソロンを投与することで検出限界以下となった。その濃度は5 μMと低濃度であり、パネ

キシニン1の特性に一致した。コネキシンのブロッカーであるGAP26とGAP27の混合液を投与してもATP放出は抑制されなかったことから、II型細胞からのATP放出はパネキシニン1を含むヘミチャネルを介して生じるものと考えられる。

(3) II型細胞のATP放出における活動電位の機能的役割

電位依存性Naチャネルのブロッカーであるテトロドトキシンを投与したところ、II型細胞からのATP放出は抑制されたが、検出限界以上の値を示した。このことから、II型細胞の細胞内情報伝達機能の活性化に伴うヘミチャネルの開口によって生じるATP放出を、活動電位は増強する働きがあるものと考えられる。

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10件)

- ① Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y, Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels, *Journal of Neurophysiology*, 査読有, 印刷中
- ② Yoshida R, Miyauchi A, Yasuo T, Jyotaki M, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y, Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells, *The Journal of Physiology*, 査読有, Vol. 587, 2009, 4425-4439
- ③ Yasumatsu K, Horio N, Murata Y, Shirosaki S, Ohkuri T, Yoshida R, Ninomiya Y, Multiple receptors underlie glutamate taste responses in mice, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 査読有, Vol. 90, 2009, 747-752
- ④ Sanematsu K, Horio N, Murata Y, Yoshida R, Ohkuri T, Shigemura N, Ninomiya Y, Modulation and transmission of sweet taste information for energy homeostasis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 査読有, Vol. 1170, 2009, 102-106
- ⑤ Yoshida R, Yasumatsu K, Shirosaki S, Jyotaki M, Horio N, Murata Y, Shigemura N, Ninomiya Y, Multiple receptor systems for umami taste in mice, *Annals of the New York Academy*

of Sciences, 査読有, Vol. 1170, 2009, 51-54

- ⑥ Ouyang Q, Sato H, Murata Y, Nakamura A, Ozaki M, Nakamura T, Contribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate transduction cascade to the detection of "bitter" compounds in blowflies, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 査読有, Vol. 153, 2009, 309-316
- ⑦ Yoshida R, Horio N, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Ninomiya Y, NaCl responsive taste cells in the mouse fungiform taste buds, *Neuroscience*, 査読有, Vol. 159, 2009, 795-803
- ⑧ 吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、味細胞の細胞型と応答特性、*日本味と匂学会誌*、査読有、15巻、2008、285-288
- ⑨ 村田芳博、吉田竜介、安尾敏明、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、マウスII型味細胞の発火頻度依存性ATP放出、*日本味と匂学会誌*、査読有、15巻、2008、381-384
- ⑩ 村田芳博、二ノ宮裕三、味覚研究は生活習慣病対策のヒントを見つけ出せるか、*G. I. Research*、査読無、16巻、2008、388-395

[学会発表] (計20件)

- ① 村田芳博、味細胞の神経伝達物質ATP放出における活動電位の機能的役割、第1回味覚健康科学シンポジウム、2010年3月13日、なないろの風(大分県由布市)
- ② 村田芳博、安尾敏明、吉田竜介、小幡邦彦、柳川右千夫、Margolskee RF、二ノ宮裕三、味細胞が神経伝達物質ATPを放出するメカニズム—味細胞が発する活動電位の機能的役割—、2010年2月4日、第9回KMS Research Meeting、高知大学医学部(高知県南国市)
- ③ Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y, Action potential-dependent ATP release from Type II taste cells through hemichannels in mice, *Beijing International Meeting on Research in Taste and Smell*, Nov. 16, 2009, Marriot City Wall Hotel, Beijing, China
- ④ Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y, Functional role of action potentials for ATP transmitter

- release from Type II taste cells, The 7th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Nov. 4, 2009, 九州大学馬出キャンパスコラポステーション (福岡県福岡市)
- ⑤ 吉田竜介、村田芳博、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三、味細胞における味覚の受容と情報伝達、第51回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2009年9月9日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市)
- ⑥ Yoshida R, Yasuo T, Murata Y, Jyotaki M, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Damak S, Margolskee RF, Ninomiya Y, Taste responsiveness of Type II and III taste bud cells in mouse fungiform papillae, The XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Jul. 27, 2009, 京都国際会議場 (京都府京都市)
- ⑦ 村田芳博、味細胞の活動電位依存性 ATP 放出、第13回鋤鼻研究会、2009年6月13日、四季の湯温泉・ヘリテージリゾート (埼玉県熊谷市)
- ⑧ 村田芳博、吉田竜介、安尾敏明、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、活動電位を発生する味細胞からの ATP 放出におけるヘミチャネルの関与、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月3日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑨ 吉田竜介、安松啓子、城崎慎也、川東由利子、村田芳博、重村憲徳、中島清人、Margolskee RF、二ノ宮裕三、マウスにおけるうま味の受容・伝達メカニズムの解析、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月3日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- ⑩ 村田芳博、安尾敏明、吉田竜介、二ノ宮裕三、II型味細胞は活動電位の頻度に依存してATPを放出する、第50回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2008年9月25日、TOC有明 (東京都江東区)
- ⑪ 吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三、GFPノックインマウスを用いたII型およびIII型味細胞の応答特製の解析、第50回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2008年9月25日、TOC有明 (東京都江東区)
- ⑫ 村田芳博、吉田竜介、安尾敏明、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、マウスII型味細胞の発火頻度依存性ATP放出、日本味と匂学会第42回大会、2008年9月18~19日、富山市民プラザ (富山県富山市)
- ⑬ 吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、味細胞の細胞型と応答特性、日本味と匂学会第42回大会、2008年9月19日、富山市民プラザ (富山県富山市)
- ⑭ 吉田竜介、村田芳博、安松啓子、重村憲徳、二ノ宮裕三：甘味の受容・伝達・調節機構とATP、生理研研究会『病態と細胞外プリン治療標的としての可能性を探る』、2008年9月5日、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (愛知県岡崎市)
- ⑮ Murata Y, Yoshida R, Yasuo T, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y: Firing rate-dependent ATP release from mouse fungiform taste cells with action potentials, The 15th International Symposium on Olfaction and Taste, Jul. 25, 2008, Hyatt Regency, San Francisco, USA
- ⑯ Ninomiya Y, Yoshida R, Murata Y, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shirotsuki S, Sanematsu K, Yasuo T, Nakamura Y, Shigemura N, Modulation and transmission of sweet taste information for energy homeostasis, The 15th International Symposium on Olfaction and Taste, Jul. 24, 2008, Hyatt Regency, San Francisco, USA
- ⑰ Yoshida R, Murata Y, Yasuo T, Yasumatsu K, Shigemura N, Ninomiya Y, Taste signal transmission from fungiform taste bud cells to chorda tympani nerve fibers in mice, The 15th International Symposium on Olfaction and Taste, Jul. 22, 2008, Hyatt Regency, San Francisco, USA
- ⑱ Ohkuri T, Yasumatsu K, Jyotaki M, Kusahara Y, Yasuo T, Murata Y, Margolskee RF, Ninomiya Y, Temperature- and gurmardin-sensitivity of the chorda tympani nerve responses to sweeteners in the wild-type, T1R3-, Ggust-, TRPM5-KO mice, The 15th International Symposium on Olfaction and Taste, Jul. 25, 2008, Hyatt Regency, San Francisco, USA
- ⑲ 村田芳博、吉田竜介、安尾敏明、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、発火頻度に依存したII型味細胞のATP放出、第31回日本神経科学学会大会、2008年7月10日、東京国際フォーラム (東

- 京都千代田区)
- ⑳ 吉田竜介、村田芳博、安尾敏明、上瀧将史、柳川右千夫、小幡邦彦、植野洋志、Margolskee RF、二ノ宮裕三、味細部尾の細胞型により異なる応答特性、第 31 回日本神経科学学会大会、2008 年 7 月 11 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

[図書] (計 1 件)

- ① 村田芳博、二ノ宮裕三、うま味受容とシグナル伝達、月刊フードケミカル、24 巻、2008、40-44

6. 研究組織

・研究代表者

村田 芳博 (MURATA YOSHIHIRO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40377031