

ウシガエル味細胞の電気的特性の解析

伊藤 奈都美 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中谷 敬 (筑波大学 生命環境系)

導入

生物は生命維持のために様々な栄養素を外界から摂取している。摂食行動は外界から栄養とエネルギーを得る方法の一つである。多くの動物は口腔から食物を摂食し、味覚は摂食の可否を判断する感覚の一つである。味覚には甘み、塩味、うま味、酸味、苦味の5つの基本味があり、前三つ(甘み、塩味、うま味)は摂食行動を促進し、後ろ2つ(酸味、苦味)は摂食を忌避する方向に働くと考えられている。

本研究では実験動物としてウシガエル (*Rana catesbeiana*) を用いた。ウシガエルの舌は食物の捕獲に用いられていることから、身体部位としてなんらかの発達がなされていると予想されるためである。ウシガエルを用いた研究では、苦味と酸味に特化していることが示唆されている。しこれらの忌避性の味と接触行動の関係や、それ以外の味覚については不明な点が多い。そこで、動物の摂食行動と味覚の関係を明らかにする目的で、ウシガエル味細胞の電気的特性の解析を行った。

材料と方法

動物業者から購入した 300~600g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を雌雄区別することなく、使用した。はさみを使用してウシガエル頭部に切れ込みを入れ、脊椎を破壊すると、その切れ込みから体側、頭側の神経をピスして反射運動を防いだ。その後口を開けさせ舌のみを切除してくると、Ca²⁺ free solution で満たしたチャンバーに浸した。チャンバーには事前にシルガードコーティングをおこなっておき、ピンによってした表面を張りつめるように固定した。その後、実態顕微鏡下で、はさみを用いて舌表面に散在する味覚器を切り取った。約 300 の味覚器を集めると、2% collagenase をふくむ divalent free solution で置換し、36 度の恒温器内に 10 分間放置した。その後、divalent free solution で2回リンスし 10 mM L-cystein, 10 U/ml papain を含む divalent free solution で置換し、36 度の恒温器内に 6.5 分間放置した。最後に ringer solution で2回リンスし、パストゥールピペットで 15~20 回ほど優しくトリチュレーションし、ディッシュに単離した味細胞を分け入れた。

倒立顕微鏡下で単離した味細胞を発見すると、ホールセルパッチクランプ法の用意をする。ピペット抵抗が 5~15 Ω ほどのパッチ用ガラス電極を、micropipette puller(Sutter instrument、P-57)をもちいて作製し、電極内には K⁺ pipette solution を充填した。倒立顕微鏡をのぞきながら、電極を味細胞膜に接近させると、電極に陰圧を与えることで細胞と膜と電極をシールさせた。

(この状態は膜抵抗値がギガ値になったことで判断する)この状態からさらに陰圧をかけることで膜に穴をあけ、whole cell capacitance と series resistance でゼロ補正することでホールセルを形成した。

ホールセルを形成すると、味細胞内の電位を-80 mV に固定し、-80 mV から+60 mV まで 10 mV ごとの step 電位を与えて味細胞における電位依存性チャネルの存在について調べた。

結果と考察

単離した細胞を顕微鏡下で観察すると、細胞体から電とライトを伸ばす細長い細胞が見られた。これらの細胞はその形態的特徴から、味細胞であると同定できた。これらの細胞にパッチ電極を適用し、ギガシールおよびホールセルを形成することに成功した。電位固定法によって膜電位を変化させると、膜電位に応じて電流が観察された。本実験は現在進行中であり、結果の詳細および考察については卒業研究発表会にて報告する。

今後の展望

今後はホールセル状態の細胞に対し、甘味、塩味、うま味、酸味、苦味に対応する溶液を与えたさいの電気応答を観察し、それぞれの電気的特性を解析することが目標である。これによってウシガエルの味覚の発達が、ウシガエルの取り巻く環境下において有益に働いているのか、もしくは関係しているのか考察する。さらに、各味応答にたいする細胞内シグナル伝達機構についても研究を進める予定である。