

## ウシガエル味細胞の電気的特性の解析

酒井 祐貴子 (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取り入れている。その一つ的手段に摂食行動が挙げられる。摂食行動の際に、食物に含まれている化学物質が受容器によって感知され、生じる感覚が味覚である。味覚は生命活動に有用な化学物質を積極的に摂取し、有害な物質を回避するのに必要な感覚である。甘味・塩味・旨味・苦味・酸味の5種類の基本味に分けられ、一般的に甘味・塩味・旨味に対しては誘引的な行動を、苦味・酸味は回避的な行動を引き起こすと考えられている。

両生類であるウシガエル (*Rana catesbeiana*) の味覚は苦味と酸味に対して特化した性質があることが示唆されている。本研究では、生物の生息環境と味覚の特性の関係を明らかにすることを目的として、ホールセルパッチクランプ法の習得と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 300g から 600g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を雌雄の区別なく用いた。はさみを用いて脊椎を切断し、切断面から針を差し込み頭側と体側の神経を破壊した。さらに口を開いて舌下神経と舌下筋を切除して下あごから舌を単離し、Ca<sup>2+</sup> free ringer で洗浄した。単離した舌は Ca<sup>2+</sup> free ringer 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リガードコーティングをしておき、複数の虫ピンで舌を引き伸ばすように固定した。刃の反ったはさみを用いて、実体顕微鏡下で舌表面に散在する円盤状の味覚器を切り取った。約 80 個の味覚器を集め、2% Collagenase を含む二価イオン free 溶液で置換し、10 分間保温した (36°C)。その後、二価イオン free 溶液で 2 回リンスし、10 mM L-cystein、10 U/mL Papain を含む二価イオン free 溶液を置換して 6.5 分保温した (36°C)。その後、Ringer 溶液で 2 回リンスし、パストゥールピペットを用いて、ピペッティングを 20 回程度行い、物理的刺激を与えて味細胞を単離した。Concanavalin A でプレコーティングしたチャンバーディッシュに単離した味細胞を敷き、10 分静置して細胞をディッシュの底に沈ませた。

パッチクランプ法の一つであるホールセルパッチクランプ法を用いて味細胞を流れる電流を記録した。マイクロピペット・プレー (Sutter instrument, P-57) を用いて作成したパッチ用ガラス電極の中に K<sup>+</sup> pipette 溶液を充鎮した。パッチ電極が bath solution に浸かった時の抵抗値は 6~9 MΩ だった。顕微鏡下でマニピュレーター (MX-1, Narishige) を用いて電極を操作し、電極先端を単離味細胞に近づけ、陰圧を与えて細胞膜と電極を密着させた状態 (ギガ・シール) を作った。このときの抵抗値は 1~5 GΩ であった。次いでさらに強い陰圧やパルスを与えることで細胞膜に穴をあけ、ホールセルを形成した。

味細胞内の電位を -80 mV に固定し、-80 mV から +60 mV まで 10 mV ごとのステップ電位を与え、味細胞における電位依存性チャン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したところ、細胞体からデンドライトを伸ばす味細胞が観察された。これらの細胞は形態的特徴から Type Ib、Type II、Type III の 3 種類に分類することができた。ホールセルを形成した味細胞に -80 mV から +60 mV まで 10 mV ずつのステップ電位を与えたところ、Type Ib、II、III に共通して一過性の内向き電流と、それに次ぐ持続性の外向き電流が観察された。次にこの結果から、それぞれの固定電位に対する内向き電流と外向き電流の大きさをプロットし (data not shown)、電流と電圧の関係 (I-V relation) を解析した。内向き電流は 20 mV 付近から見られ始め、+20 mV 付近でピークを迎えたあと、電位の増加に伴って減少した。外向き電流は電位の増加にしたがって増加した。この結果から、一過性の内向き電流成分は電位依存性 Na<sup>+</sup>電流であり、持続性の外向き電流成分は電位依存性 K<sup>+</sup>電流であると推察される。すなわち、単離ウシガエル味細胞に電位依存性 Na<sup>+</sup>チャンネルと電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネルが存在し、味物質を受容した時に受容器電位を発生させるに足る機能を持つと考えられる。

## 今後の展望

今後は、ホールセル法の技術をさらに向上させ、ホールセルを維持したままデンドライトに局所的に味物質を与える。刺激に対する電氣的応答を観察し、各細胞タイプの電気的特性を解析することが目標である。また、味細胞における細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、各種阻害剤を作用させた時の変化や、電流成分の分析を行う予定である。

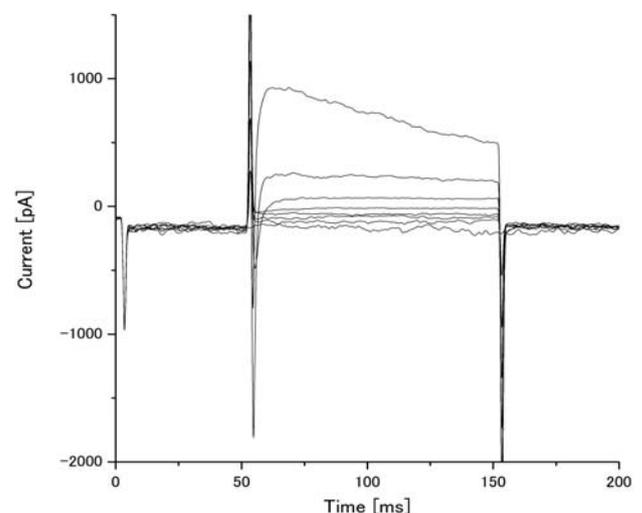


図 1. ウシガエル Type Ib 味細胞における電位依存性電流