

塩味受容機構：カエル舌咽神経の Na および Mg 応答
に対する Ni の増強効果

1997

美藤 純弘

岡山大学歯学部口腔生理学講座

塩味受容機構：カエル舌咽神経の Na および Mg 応答に対する Ni の増強効果

美藤 純弘

岡山大学歯学部口腔生理学講座

緒 言

味刺激は味細胞を脱分極し、シナプスを介して神経線維にインパルスを発生させる。この神経線維のインパルスにより味覚情報は中枢へと伝えられる。しかし、複数の味物質の混合液の味覚は必ずしもそれぞれ単独の味物質による味覚の単純な総和になるわけではない。例えば、グルタミン酸ソーダとイノシン酸ソーダを加えると旨味が数倍も強くなる。このアミノ酸と核酸の相乗効果は、一次ニューロンで観察されるので、主に味物質と味細胞の受容膜の相互作用に起因する(Adachi, 1964; Sato and Akaike, 1965; Adachi *et al.*, 1967; Yamashita *et al.*, 1973; Yoshii *et al.*, 1986)。このように受容膜レベルで、既に生体は味覚情報処理を行っているが、味覚受容の初期過程は必ずしも十分に理解されているとはいえない。

カエル舌咽神経の神経応答は種々の塩の混合により抑制されたり増強されたりするので、受容膜レベルにおける味覚受容の初期過程を知るのに適している。

指導教官：足立明教授（口腔生理学講座）

本論文は、A quantitative study of the enhancing effect of nickel ions on the taste response to sodium ions of single fibers of the frog glossopharyngeal nerve: competitive inhibition by calcium ions of the nickel-enhanced response to sodium ions., Kitada, Y. and Mitoh, Y., *Chem. Senses*, 21 (1996), 65-73. および Enhancing effect of nickel ions on the response to magnesium ions of single fibers of the frog glossopharyngeal nerve: competitive inhibition by calcium ions of the nickel-enhanced response to magnesium ions., Kitada, Y. and Mitoh, Y., *Chem. Senses*, 22 (1997), in press. をまとめたものである。

カエル舌咽神経には純水に応答する神経線維が存在し水線維と呼ばれている (Zottermann, 1949; Kusano and Sato, 1957)。この水線維は CaCl_2 に非常に鋭敏に応答する (Kusano, 1960; Nomura and Sakada, 1965; Junge and Brodwick, 1970; Kitada, 1978)。 CaCl_2 は専ら水線維にのみ興奮作用をおよぼすので CaCl_2 に鋭敏に応答する神経線維は水線維である。この水線維の CaCl_2 に対する閾濃度は 0.01 mM 以下である (Nomura and Sakada, 1965; Kitada, 1978)。また水線維はマグネシウム塩やナトリウム塩にもよく応答する (Kusano, 1960; Nomura and Sakada, 1965; Kitada, 1989, 1991)。しかし、 MgCl_2 と NaCl の閾濃度は比較的高く、閾濃度はそれぞれ 10 mM (Kitada, 1989)、100 mM (Kitada, 1990, 1991) である。

Ca 、 Mg および Na イオンは次のようなことから、それぞれ別々の受容体に作用し、水線維を興奮させることが分かった。まず第一に、舌表面のタンパク分解酵素 (0.05-0.1% pronase E) 処理で、 Ca イオンに対する応答 (Ca 応答) は著しく抑制され、また Mg イオンに対する応答 (Mg 応答) もある程度抑制されるが、 Na イオンに対する応答 (Na 応答) はほとんど抑制されなかった (Kitada, 1984, 1986ab)。このように、3 種の陽イオン応答はタンパク分解酵素処理の影響の受け方が異なっていた。次に、2 種の Cl 塩の混合液の応答の大きさは単独の Cl 塩の応答の大きさの和になることが期待されるが、 CaCl_2 および MgCl_2 の混合液に対する応答の大きさは、それぞれ単独の塩の応答の大きさより小さかった。このことから、 Ca および Mg イオンはそれぞれのイオンをアゴニストとする受容体があり、 Ca 応答は Mg イオンにより、 Mg 応答は Ca イオンによって競合的に抑制されることが、定量的に解析された (Kitada, 1989)。また、このような相互抑制は CaCl_2 および NaCl の混合液に対する応答でも見られ、 Ca イオンをアゴニストとする受容体と Na イオンをアゴニストとする受容体は異なることが推察された (Kitada, 1991)。このようなことから、カエル舌咽神経の水線維には少なくとも 3 種類の特異的な受容体、つまりカルシウム受容体 (X_{Ca})、マグネシウム受容体 (X_{Mg}) およびナトリウム受容体 (X_{Na}) が存在することが提唱された (Kitada, 1990, 1995)。ここで受容体と言う用語はイオン種を区別する膜要素 (cation-discriminative element) あるいは陽イオン応答を引き起こすチャネルの意味で使っている。応答を引き起こすチャネルが存在するかどうかは後で考察する。

Ni 、 Co および Mn イオンなどの遷移金属イオンは興奮性膜に対し多様な作用を引き起こす。例えば、フジツボの巨大筋線維において遷移金属イオンは活動電位に関係する Ca イオンの流入を抑制する (Hagiwara and Takahashi, 1967)。また、ヒキガエルの有随神経線維では、遷移金属イオンは活動電位の持続時間を延長する (Takahashi *et al.*, 1958)。味覚では、マウス鼓索神経において遷移金属イオンは HCl 応答に影響せず NaCl と塩酸キニーネに対する応答を僅かに抑制するがその効果は大きくない (Iwasaki and Sato, 1984)。ところが、遷移金属イオンはカエル舌咽神経の塩応答に対し著しい影響を与える事が分かった。即ち、遷移金属イオンは 5 mM 以下の濃度では水線維に殆どイ

ンパルスを生じさせないが、この濃度で Ca イオン (Kitada, 1994b, c)、Mg イオン (Kashiwagura *et al*, 1978; Kitada, 1994b) および Na イオン (Kashiwagura *et al*, 1978; Herness, 1987, 1991; Kitada, 1994b) に対する神経応答を増強する。しかし、遷移金属イオンは水線維に対してのみ増強効果を生じる (Kitada, 1994d)。これまでに、単一水線維の Ca 応答に対する遷移金属イオンの効果が定量的に調べられ、遷移金属イオンは Ca 応答に対しては増強効果の他に抑制効果も持つことが分かった。このような二重の作用のうち抑制効果は遷移金属イオンが他の陽イオンと同じく X_{Ca} に結合することによる Ca 応答の競合抑制であり、増強効果は遷移金属イオンが X_{Ca} 以外の膜要素を通じて X_{Ca} に二次的に作用することによると解析された (Kitada, 1994c)。しかし、Mg 応答や、Na 応答に対してはまだ定量的な解析はなされていない。3 種陽イオンの受容体がことなることから、遷移金属イオンはそれぞれの陽イオン受容体に対し異なる影響を与えるかもしれない。しかし、いずれの陽イオン応答も増強されることから、増強効果には共通性があるものと思われる。このように、Ca、Mg および Na 受容機構の解明に、遷移金属イオンは一つの道具として役立ちそうである。そこで、本研究ではカエル単一水線維の Na 応答に対する遷移金属イオンの効果 (実験 1) と Mg 応答に対する遷移金属イオンの効果 (実験 2) を定量的に調べた。遷移金属イオンの中で Ni イオンが最も効果が大きい (Kitada, 1994a) ので本実験では Ni イオンを用いた。また、Mg および Na 応答が Ca イオンによって、競合的に抑制されることは前に述べたが、これらの、競合抑制に Ni イオンが影響を与えるかどうか調べた。そして、本実験で得られた結果と、以前得られた Ca 応答に対する遷移金属イオンの効果の結果とを合わせ、陽イオン受容機構を考察する。

材料ならびに方法

実験には体重 200~400g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を用いた。カエルを速やかに断頭し、脳と脊髄をピスで破壊した後、舌を摘出した。摘出舌標本を標本箱に置いた。

記 録

カエル舌咽神経の水線維からのインパルスは吸引電極を用いることにより、逆行性インパルスとして記録される (Taglietti et al., 1969; Kitada, 1978)。吸引電極の先端はポリエチレンチューブでできており内径がほぼ 150~200 ミクロンである。この先端を摘出舌の一個の茸状乳頭の上に置きこの茸状乳頭を吸引電極内に吸い込んだ。吸引電極内部は 100 mM NaCl で満した。吸引電極で逆行性インパルスが記録できる理由を以下に示す (図 1)。一本の神経線維は舌粘膜下で枝分かれし、数個の茸状乳頭を支配し味細胞とシナプスを形成している。味覚刺激が与えられ、味細胞に興奮が起こり神経線維にインパルスが生じると、これらのインパルスは順行性に中枢に向かって伝導する一方、

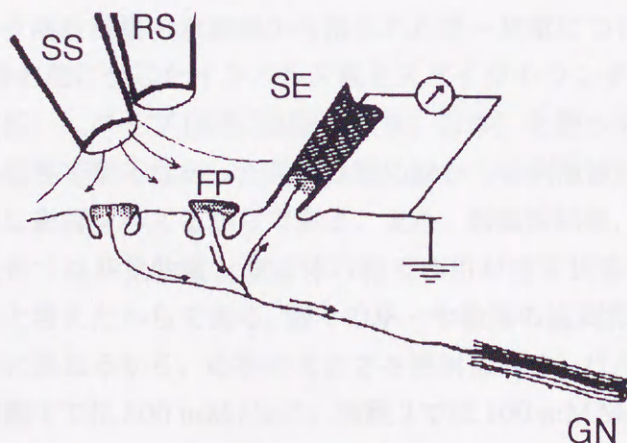


図 1 吸引電極によってカエル舌咽神経から単一の逆行性インパルスを記録する方法を説明したシェーマ。
SS: 刺激溶液。RS: リンス溶液。SE: 吸引電極。
FP: 茸状乳頭。GN: 舌咽神経。詳細は本文参照。

枝分かれした神経線維に沿って逆行性にも伝導する。この逆行性インパルスが吸引電極で記録されるのである。水線維からの逆行性インパルスの振幅は大きく 100~200 マイクロボルトあり、他の化学刺激に応答する神経線維からの逆行性インパルスの振幅の 3~4 倍の大きさもあるので容易に水線維からの応答は他の線維の応答と区別がつく。

一本の神経線維が枝分かれているため、味覚刺激で順行性インパルスと逆行性インパルスが衝突を起こし、味細胞の興奮がそのままインパルス頻度に反映されないことが考えられる。しかし、水神経線維の枝分かれの数は多くの線維で 3~5 と少なく、また

枝分かれの位置はかなり茸状乳頭の近傍にある。ある茸状乳頭を電気刺激してインパルスが発生させ、隣りの茸状乳頭でそのインパルスを記録すると、latency は僅か平均 2.4 ミリ秒であった (Sato, T et. al, 1987)。塩の刺激で引き起こされる水線維のインパルス頻度は 30 秒間の刺激中で通常 100~600 インパルス (3~20 インパルス/秒) であり、衝突により消えてしまうインパルスはそう多くないと考えられる。そこで、吸引電極法によって得られた単一水線維の応答はその神経線維の支配している味細胞全体の興奮をほぼ反映しているものと思われる。

味覚刺激

味覚刺激には蒸留水に溶かした種々濃度の CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaCl および NiCl_2 とこれら塩類の混合液を使用した。刺激液はポリエチレンチューブを通じて吸引電極の近くの舌表面に流速 5~8 ml/min で 30 秒間流した。50 mM NaCl 溶液を舌の洗浄液および順応液として用いた。50 mM NaCl 溶液を流している間は低濃度の電解質溶液によって水応答は抑制されるので神経インパルスは生じない。刺激を与えてから次の刺激まで約 5 分間ありその間、舌を 50 mM NaCl 溶液で順応させた。刺激液および順応液は舌に与えた後、標本箱の底面に設けた排水溝により除去した。刺激液および順応液の温度は室温の 20~25℃ であった。

データ解析は単一水線維から得られた単一放電についてのみ行った。刺激開始後、5~30 秒の間に生じたインパルス数をスパイクカウンター (ダイヤ メディカル システム (株) タイプ DSE 325P、東京、日本) を使って数えた。刺激開始後、最初の 5 秒間の応答を数えなかった理由は順応液から味刺激液に切り換える時、流速が変化し味覚応答に影響を与えるからである。また、刺激開始後、5~30 秒の間に生じた持続性応答の大きさは味覚物質と受容体の相互作用が定常状態にある時の味細胞の興奮を表していると考えたからである。個々の単一水線維の塩刺激に対する応答の大きさは単一水線維毎に異なるから、応答の大きさを絶対値 (インパルス頻度) で表すよりある基準溶液 (実験 1 では 500 mM NaCl 、実験 2 では 100 mM MgCl_2) の応答に対する相対値で表すことにした。水線維の応答は刺激の回数が増す毎に減少する傾向にあることから、基準液の刺激は試験刺激の前後の二回行い、二つの基準液の応答の大きさの平均値を基準液の応答の大きさとし、試験刺激液の応答の大きさの相対値を求めた。

理 論

味覚受容の最初の段階は味物質とそれを受容する受容体との結合である。そこで、本研究では次のような最も単純な仮定を置いた。ある味物質 S が味細胞受容膜上に存在する S の受容体 (X_s) と結合するとし、形成された SX_s 複合体が味細胞を興奮させシナプスを介して味神経線維にインパルスを発生させると仮定する。また、他の味物質 I は IX_s 複合体を形成して X_s の結合に対し S と競合すると仮定する。そこで、次のような式を書くことができる。



質量作用の法則が成り立つとすると、

$$\frac{[S][X_s]}{[SX_s]} = K_s \quad \dots (3)$$

$$\frac{[I][X_s]}{[IX_s]} = K_{s-I} \quad \dots (4)$$

ここで、 K_s は SX_s の解離恒数、 K_{s-I} は IX_s の解離恒数である。もし応答 (R) が $[SX_s]$ に比例すると考えると、

$$R = k[SX_s] \quad \dots (5)$$

そして、

$$R_{\max-S} = k[X_{s-\text{total}}] \quad \dots (6)$$

ここで $R_{\max-S}$ 、 k および $[X_{s-\text{total}}]$ はそれぞれ最大応答値、定数および S の受容体の全濃度である。味刺激がアゴニストの S だけの時、

$$[X_{s-\text{total}}] = [X_s] + [SX_s] \quad \dots (7)$$

となる。そこで、(3)、(5)、(6) および (7) の式より、 R の逆数の次式が得られる。

$$\frac{1}{R} = \frac{K_s}{R_{\max-S}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{R_{\max-S}} \quad \dots (8)$$

もし、SとIの混合液で刺激すると、

$$[X_{S-\text{total}}] = [X_s] + [SX_s] + [IX_s] \quad \dots (9)$$

となり、(3)、(4)、(5)、(6) および (9) の式より、Rの逆数の次式が得られる。

$$\frac{1}{R} = \frac{K_s}{R_{\max-S}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{S-I}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{R_{\max-S}} \quad \dots (10)$$

(8)および(10)の式は酵素反応の速度論式でよく知られている Lineweaver-Burk の式と同様な式である。

味覚刺激での神経応答が最も単純な上記の仮定を満足するならば、Sの濃度の逆数(横軸)と応答の大きさの逆数(縦軸)プロット(両逆数プロット)で、Iの濃度が定まれば K_s 、 $R_{\max-S}$ および K_{S-I} は定数であるから、実験値は直線となる。そして直線の勾配はIの濃度が高くなると大きくなるはずである。また、それらの直線は縦軸の一点に交わり、その交点は $1/R_{\max-S}$ であるから、 $R_{\max-S}$ の値を求めることができる。もし、Iが存在する時見掛けの解離恒数を K_a とすれば、

$$\begin{aligned} K_a &= K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_{S-I}} \right) \\ &= K_s + \frac{K_s}{K_{S-I}} \cdot [I] \quad \dots (11) \end{aligned}$$

となり、さらに両逆数プロットでの勾配の大きさを S_s とすれば (10) 式より、

$$S_s = K_a / R_{\max-S} \quad \dots (12)$$

S_s の値は測定により、 $R_{\max-S}$ は上記のように求めることができるのでそれぞれのIの濃度における K_a の値が(12)式より計算できる。Iが0の時の K_a の値は K_s である。また

(10) および (11) 式より両逆数プロットの直線が横軸と交わる点は $-1/K_a$ を示すのでここからも K_a の値を求めることができる。式(11)は K_a とIの濃度プロットで直線の勾配の大きさは K_s/K_{S-I} になることを示しており、この勾配の大きさの測定値と K_s の値が分かれば K_{S-I} の値は求まる。

本実験ではインパルス頻度を応答の大きさの指標としたので、実験値の解析に閾値現象を考慮する必要がある。濃度—応答曲線において Ariëns *et al.* (1960) は閾下の大きさを考慮した解析を行った。ここで、閾下の応答の大きさを r とすると、いわゆる真の応答の大きさはこれまで用いてきた神経応答の相対応答値の R に r を加えた ($R + r$) の値となる。そこで、そのような閾値現象を考慮すると、式 (10) は

$$\frac{1}{R + r} = \frac{K_s}{R_{\max-S}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{S-I}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{R_{\max-S}} \quad \dots (13)$$

となる。

刺激液の中に遷移金属イオンなど応答の大きさに影響を与える物質が含まれ、その物質が二次的に受容体に働き、リガンド—受容体の複合体の解離恒数や応答の大きさを変える場合、最大応答値および解離恒数に * 印をつけると次式が得られる。

$$\frac{1}{R + r} = \frac{K_s^*}{R_{\max-S}^*} \left(1 + \frac{[I]}{K_{S-I}^*} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{R_{\max-S}^*} \quad \dots (13)'$$

実験 1 Ni イオンによる Na 応答の増強効果：増強された Na 応答に対する Ca イオンの競合抑制

実験 1—刺激

NaCl 応答に対する NiCl_2 の効果を調べるために蒸留水に溶かした単独の塩および幾つかの塩の混合液を用いた。用いた刺激液は 10-500 mM NaCl、1-2 mM CaCl_2 、1 mM NiCl_2 、1 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 、20-500 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 、5-500 mM NaCl + 0.5-1 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 であった。これらの刺激溶液の塩濃度を決めた理由は次の通りである。(a) NaCl の 閾濃度はおよそ 80-100 mM である (Kitada, 1991)。

(b) Ni イオン非存在下において、Na 応答は 0.2-5 mM CaCl_2 を加えることによって抑制される (Kitada, 1991)。(c) NiCl_2 は 5 mM 以下では神経応答はほとんどなく、各々の陽イオン応答に対して NiCl_2 の増強効果は 1 mM で飽和する (Kashiwayanagi *et al.*, 1978; Kitada, 1994b)。実験 1 では基準溶液に 500 mM NaCl 単独液を用いた。刺激溶液の応答の大きさは基準溶液に対する応答の大きさの相対値として表された。

実験 1—結果

Ni イオンは Na 受容体の Na イオンに対する親和性を増加する

NaCl 単独の溶液の閾濃度は約 80 - 100 mM である (Kitada, 1991)。10 mM NaCl を順応液として用いた場合、NaCl の閾濃度は変わらなかったため、NaCl の閾濃度が高いのは順応液の NaCl 濃度 (50 mM) が比較的に高いためではない。NaCl の高い閾濃度とは対照的に、 CaCl_2 は 0.01 mM 以下の濃度で応答し、 CaCl_2 の最大応答値は 1 mM で得られる (Kitada, 1978)。図 2 には 1 mM CaCl_2 、1 mM NiCl_2 、50 mM NaCl、50 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 の刺激によって生じた単一神経線維からのインパルスを示している。1 mM CaCl_2 は大きな応答を発生させるが 1 mM NiCl_2 には殆ど応答が現れなかった。

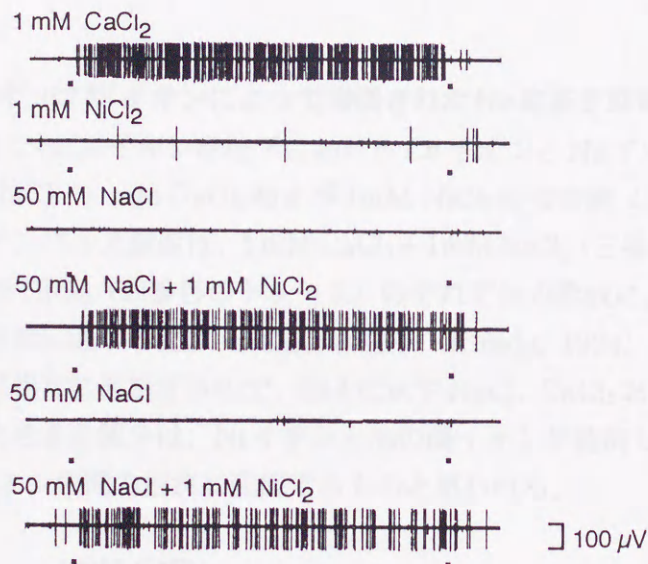


図 2 1 mM CaCl_2 、1 mM NiCl_2 、50 mM NaCl、50 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 、50 mM NaCl および 50 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 に対する単一神経線維の応答例。それぞれの応答例の下に 2 つの■印は、刺激をした 30 秒間を示している。応答例の配置は上から順に刺激をした順番を示している。

リンス溶液として用いた 50 mM NaCl 溶液には応答は見られないが、50 mM NaCl に 1 mM NiCl_2 を加えた混合液では大きな応答が現れた。このような Na 応答に対する NiCl_2 の増強効果は可逆的であった。

図 3 には 1 mM NiCl_2 存在下または非存在下の NaCl の用量—応答 (C-R) 曲線を示している。神経応答 (R) は 500 mM NaCl 単独液の応答の大きさの相対値である。1 mM NiCl_2 が加わることによって NaCl の閾濃度は 20 mM まで減少した。1 mM NiCl_2 存在下の NaCl の C-R 曲線の勾配は 1 mM NiCl_2 非存在下のものより急峻であり、1 mM NiCl_2 は 500 mM NaCl 応答の大きさを約 6 倍まで増加した。

図 3 の結果は NiCl_2 によつての X_{Na} の Na イオンに対する親和性は増加すること、また同じ NaCl の濃度において Na 応答は著しく増加することを示している。

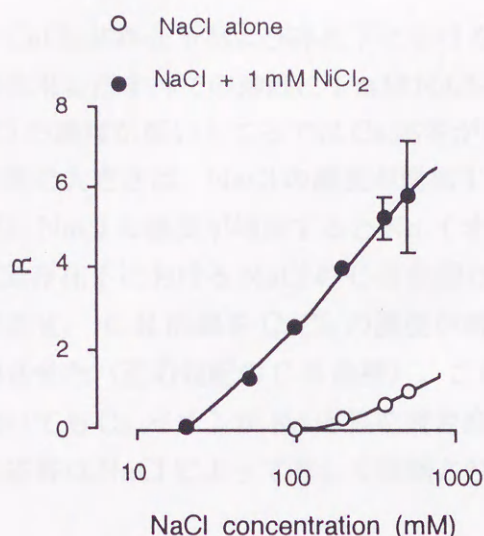


図3 1 mM NiCl_2 非存在下あるいは存在下における NaCl の用量一応答曲線。縦軸に応答の大きさの相対値を、横軸に NaCl の対数濃度を示している。応答の大きさは 500 mM NaCl 単独 (基準液) の神経応答の大きさを 1 とした相対値で示している。それぞれの点とバーは平均値 $\pm$ 標準誤差を表している。n=3~5。

Ca イオンは Ni イオンによって増強された Na 応答を抑制する

図4には Ni イオン存在下における Ca イオンと Na イオンの相互抑制の例を示す。100 mM NaCl、1 mM CaCl_2 および 1 mM NiCl_2 の混合液 (五番目のトレース) によって生じるインパルス頻度は、1 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 (三番目のトレース)、100 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 (四番目のトレース) のそれぞれの溶液によって生じるインパルス頻度よりも非常に低かった。 NiCl_2 非存在下 (Kitada, 1991) において、Ca イオンと Na イオンは相互に拮抗するので、図4に示す NaCl、 CaCl_2 および NiCl_2 の混合液に対する応答の大きさの減少は、Ni イオンと他の陽イオンが拮抗したためではなく、Ca イオンと Na イオンの間の拮抗に起因するものと思われる。

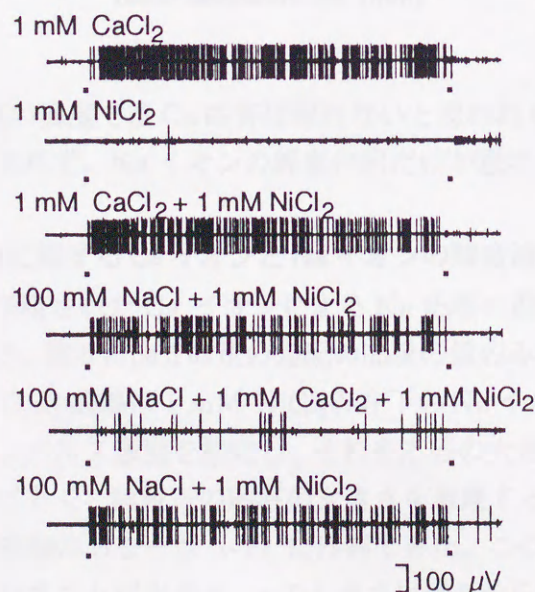


図4 1 mM CaCl_2 、1 mM NiCl_2 、1 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 、100 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 、100 mM NaCl + 1 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 および 100 mM NaCl + 1 mM NiCl_2 に対する単一水線維の応答例。それぞれの応答例の下2つの■印は、刺激をした30秒間を示している。応答例の配置は上から順に刺激をした順番を示している。

図5にはCaCl₂非存在下および存在下におけるNaClのC-R曲線を示している。以後の実験では使用したすべての溶液に1 mM NiCl₂が加えてある。0.5 - 1 mM CaCl₂存在下ではNaClの濃度が低いところではCa応答が現れている。しかし、Caイオンによって生じた応答の大きさは、NaClの濃度が増加するに従って減少した（負の勾配のC-R曲線）。更にNaClの濃度が増加するとNaイオンによる応答が現れてくる。図5で示す様にCaCl₂存在下におけるNaClのC-R曲線はV字型であった。CaCl₂はNaClの閾濃度を上昇させ、C-R曲線をCaCl₂の濃度が増すにつれ、右方向に段階的にそして平行して移動させた（正の勾配のC-R曲線）。このようなCaイオンの作用はNiイオン存在下においてもCaイオンがNa応答を競合抑制することを思わせる。Caイオンによって生じた応答はNaClによって著しく抑制されたので（V字型曲線の最小値を見よ）、

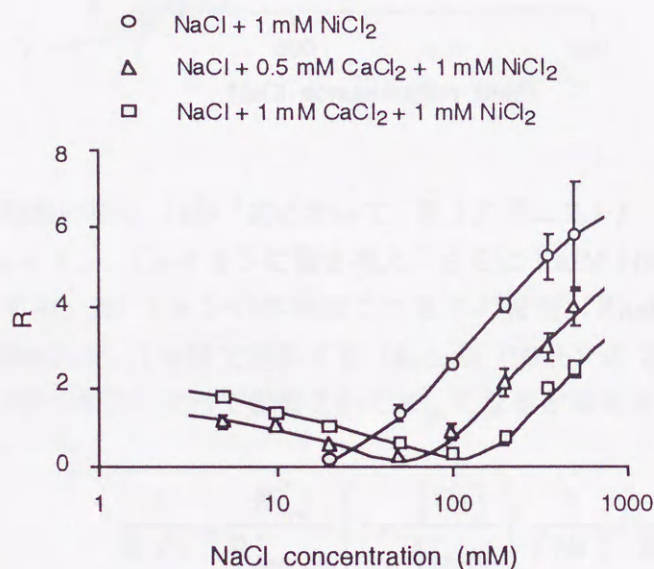


図5 1 mM NiCl₂存在下における種々濃度のCaCl₂存在下のNaClの用量-応答曲線。縦軸に応答の大きさの相対値(R)を、横軸にNaClの対数濃度を示している。応答の大きさは500 mM NaCl単独（基準液）の神経応答の大きさを1とした相対値で示している。それぞれの点とバーは平均値±標準誤差を表している。n=3~5。

NaClの高い濃度ではCa応答は現れないと思われる。従って、正の勾配の曲線にはCa応答は含まれず、Naイオンの興奮作用だけが現れているものと思われる。

Na受容体に対するCaイオンとNaイオンの競合拮抗

図5で示唆されたCaイオンによるNa応答の抑制が競合抑制によるのかどうか、解析を試みた。図6に図5の正の勾配の曲線の値のみを一次用量目盛りで再プロットした。これらのC-R曲線は1 mM NiCl₂存在下のNaイオンの興奮効果を現している。本実験ではインパルス頻度を測定し、それを応答の大きさの指標にしているので、理論の項で記述のごとく、閾値下の応答の大きさを考慮する必要がある。図6に示した様に曲線は目測で縦軸のある一点（-r）に外挿できた。このrの値は閾値における神経応答の大きさとみなすことが出来る。rの大きさは図6から読み取って0.4であった。

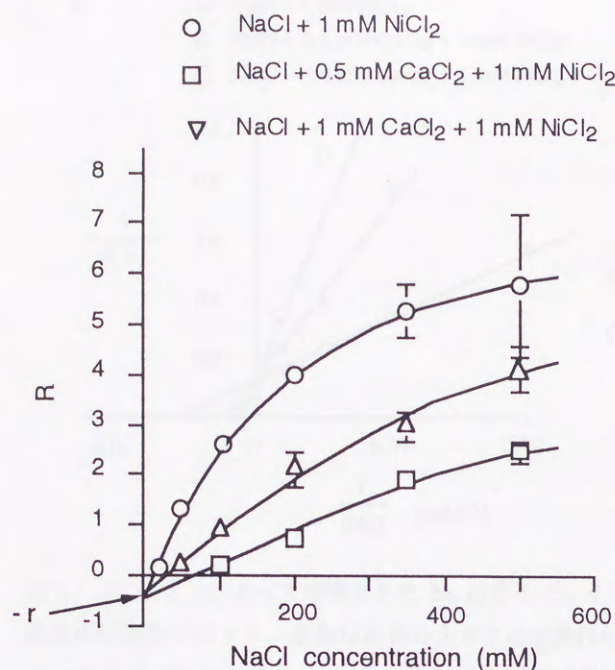


図6 Ni イオンによって増強されたNa応答に対するCaイオンの効果。図4のNaClの正の傾斜の曲線のデータのみ一次容量目盛りで再プロットした。それぞれの点とバーは平均値±標準誤差を表している。n=3~5。それぞれの曲線を目測で外挿すると縦軸の一点に収束する。それぞれの曲線は縦軸に共通の切片(-r)を持つことが分かる。rの値はこの図から読みとると0.4であった。詳細は本文参照。

理論の項の(13)'式において、S(アゴニスト)、I(アンタゴニスト)をそれぞれNaイオン、Caイオンに置き換え、さらに1 mM NiCl₂がX_{Na}に二次的に影響を与えるとする。Niイオンの作用はこれまでの報告(Kashiwayanagi *et al.*, 1978; Kitada, 1994b)で、1 mMで飽和する(Kitada, 1994b)ので、1 mM NiCl₂存在下で全てのX_{Na}はNiイオンによって影響されてX_{Na}^{*}になると考えると、次式が得られる。

$$\frac{1}{R+r} = \frac{K_{Na}^*}{R_{\max-Na}^*} \left(1 + \frac{[Ca]}{K_{Na-Ca}^*} \right) \cdot \frac{1}{[Na]} + \frac{1}{R_{\max-Na}^*} \quad \dots (14)$$

ここでK_{Na}^{*}、K_{Na-Ca}^{*}およびR_{max-Na}^{*}は1 mM NiCl₂存在下におけるそれぞれNaX_{Na}^{*}複合体の解離恒数、CaX_{Na}^{*}複合体の解離恒数およびNa応答の最大応答値を表している。

Caイオン存在下のNaX_{Na}^{*}複合体の見かけの解離恒数をK_{a-Na}^{*}とすると、理論の項の(11)式より次式が得られる。

$$K_{a-Na}^* = K_{Na}^* + K_{Na}^*[Ca]/K_{Na-Ca}^* \quad \dots (15)$$

そこで、神経応答の相対値に図6のC-R曲線において得られた閾値下(r)の応答の大きさ0.4を加え、(R+0.4)の逆数を縦軸に、NaCl濃度の逆数を横軸に再プロットした(図7A)。図7Aに示しているように3本の直線が得られ、式(14)から期待されたように3本の直線は縦軸の一点で交わった。そこで、CaイオンはNiイオンによって増

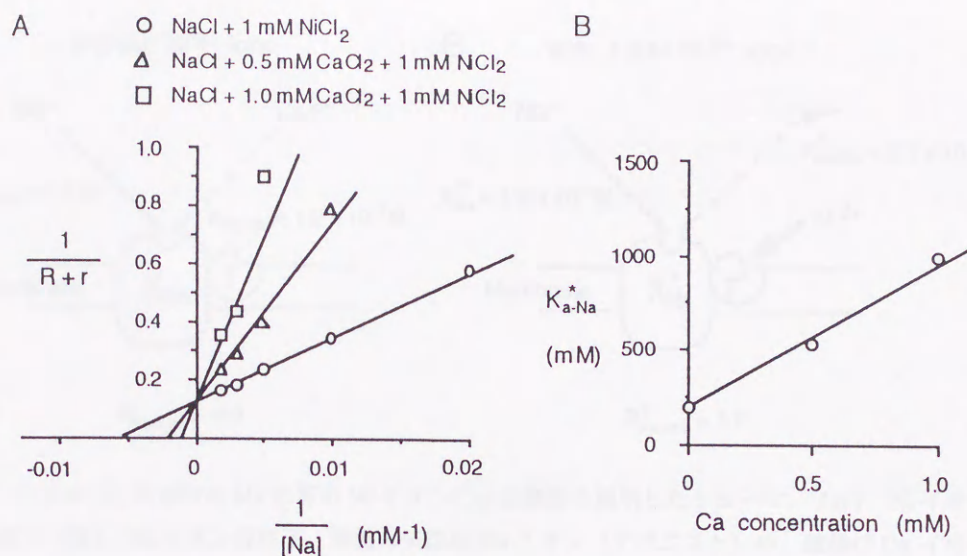


図7 Ni イオンによって増強された Na 応答の Ca イオンによる競合抑制。(A) 図6 で示した結果の両逆数プロット。縦軸は応答の大きさの逆数 $1/(R+r)$ を、横軸は Na イオンの濃度の逆数 (mM⁻¹) を示している。 $r=0.4$ 。(B) 見かけの解離定数 K_{a-Na}^* と Ca イオン濃度の関係を示した。 K_{a-Na}^* の値は A の直線の横軸の切片の大きさから算出した。

強された Na 応答を競合的に抑制するというモデルと図 7A の結果は一致する。 $R_{\max-Na}^*$ の値は図 7A の縦軸の切片の大きさから計算して 7.7 であった。 K_{a-Na}^* の値は 0, 0.5 あるいは 1 mM の Ca イオンが存在する時それぞれ 1.9×10^{-4} M, 5.3×10^{-4} M と 1.0 M であった。図 7B から分かるように、 K_{a-Na}^* と Ca 濃度との関係は直線であった。図 7B の直線の勾配から K_{Na}^*/K_{Na-Ca}^* の値が得られる (式 15)。更に上記のように Ca 濃度が 0 の時の K_{a-Na}^* は K_{Na}^* であるから、計算された K_{Na-Ca}^* の値は 2.3×10^{-4} M であった。

実験 1—考察

遷移金属イオンは Ca 応答、Mg 応答および Na 応答に影響を与える。実験 1 では Na 応答に対する NiCl₂ の影響を調べた。1 mM NiCl₂ は可逆的に Na に対する Na 受容体の親和性を高め、また Na イオンに対する最大応答値を増強させた。さらに、実験値は Ca イオンが Ni イオンによって増強された Na 応答を競合的に抑制するという仮定を満足することが分かった。このことは Ni イオンは Na 受容体に直接作用するのではなく Ni イオンと結合する膜要素を通じて Na 受容体に影響を与えることを意味する。図 8 にそのモデルを示す。即ち、Ni イオンが Ni イオンと結合する膜要素 (T) に結合して T にコンフォメーション変化を起こして T* に変え、今度は NiT* が X_{Na} にコンフォメーション

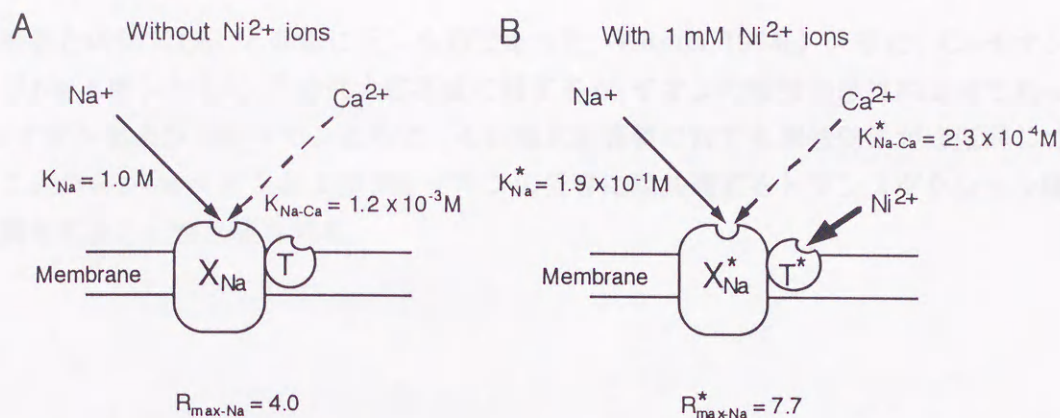


図8 カエル GL における Na 応答の Ni イオンによる調節を説明したシエーマ。(A) Ni イオン非存在下 (B) Ni イオン存在下。実線の矢印は Na イオン (アゴニスト) の、破線は Ca イオン (競合的アンタゴニスト) の作用を示している。Na と Ca イオンはナトリウム受容体あるいはチャネル (X_{Na}) に対して競合する。T は Ni 結合要素を示している。Ni イオン (太い実線の矢印) は Ni 結合要素 (T^*) に結合して複合体を形成する事によって X_{Na} に作用して X_{Na}^* にコンフォメーション変化させる。A において K_{Na} 、 K_{Na-Ca} および R_{max-Na} はそれぞれ NaX_{Na} 、 CaX_{Na} の解離定数および Ni イオン非存在下における Na イオンの最大応答を示している。図中の数値は以前報告した数値である (Kitada, 1991)。B において K_{Na}^* 、 K_{Na-Ca}^* および R_{max-Na}^* はそれぞれ NaX_{Na}^* 、 CaX_{Na}^* の解離定数および Ni イオン存在下の Na イオンの最大応答を示している。図中の数値は本実験で求めた数値である。Ni イオンは Na 味覚変換の効率と Na イオンおよび Ca イオンに対するナトリウム受容体の親和性を調節する。詳細は本文参照。

ン変化を起こして X_{Na}^* に変える。今回、1 mM $NiCl_2$ 存在下における NaX_{Na}^* 複合体の解離定数と CaX_{Na}^* 複合体の解離定数を算出した。そして以前報告した 1 mM $NiCl_2$ 非存在下の解離定数と今回得たそれぞれの値を比較した (Kitada, 1991; 図 8A を見よ)。 K_{Na}^*/K_{Na} と K_{Na-Ca}^*/K_{Na-Ca} の値はそれぞれ 0.2 と 0.21 であった。その結果、1 mM $NiCl_2$ 存在下における Na イオン (アゴニスト) および Ca イオン (アンタゴニスト) に対する Na 受容体の親和性は Ni イオン非存在下における値よりもそれぞれ 5 倍高くなっていることがわかる。

以前報告した 1 mM $NiCl_2$ による Na 応答の最大応答値の増強効果は、Ca 応答および Na 応答ともにほぼ同じであった。NaCl 刺激の場合、1 mM $NiCl_2$ 非存在下の Na イオンに対する最大応答値は 4.0 であり (Kitada, 1991)、今回の結果から $NiCl_2$ 非存在下のそれは 7.7 であった。これらの値は同じ基準液 (500 mM NaCl 単独) の応答の大きさに対する相対値として表している。1 mM $NiCl_2$ 存在下における Na イオンに対する最大応答の相対値 (7.7) と $NiCl_2$ 非存在下における Na イオンに対する最大応答の相対値 (4.0) の比の値は 1.9 であった。この値は 1 mM $NiCl_2$ 存在下における Ca イオンに対する最大応答の相対値と $NiCl_2$ 非存在下における Ca イオンに対する最大応答の

相対値との比 (1.8) と非常に近いものであった (Kitada, 1994c)。故に、Ca イオンおよび Na イオンともに、その最大応答値に対する Ni イオンの増強効果は約 2 倍であった。Ca イオンおよび Na イオンともに、その最大応答値に対する増強効果がほぼ同じであることから、Ca イオンおよび Na イオンの受容には共通するトランスダクション機構が関与することが示唆される。

実験 2 Ni イオンによる Mg 応答の増強効果：増強された Mg 応答に対する Ca イオンの競合抑制

実験 2-刺激

Mg 応答に対する NiCl_2 の効果を調べるために蒸留水に溶かした単独の塩および幾つかの塩の混合液を用いた。用いた刺激液は 5-200 mM MgCl_2 、1-2 mM CaCl_2 、1-5 mM NiCl_2 、2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 、5-100 mM MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 、100 mM MgCl_2 + 5 mM NiCl_2 、2-200 mM MgCl_2 + 0.5-2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 および 5-200 mM MgCl_2 + 0.5-2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 + 50-100 mM NaCl であった。これらの刺激溶液の塩濃度を決めた理由は実験 1 で述べた以外に次のことが上げられる。(a) MgCl_2 の閾濃度は約 10 mM であった (Kitada, 1989)。(b) Ni イオン非存在下において、Mg 応答は 0.2-5 mM CaCl_2 を加えることによって抑制された (Kitada, 1989)。(c) Ni イオン存在下において 0.2-1 mM CaCl_2 に対する応答は 50-100 mM NaCl で抑制される (図 5) ので、50-100 mM NaCl を Ca 応答を選択的に抑制するのに使った。

実験 2 では基準溶液に 100 mM MgCl_2 単独液を用いた。刺激溶液の応答の大きさは基準溶液に対する応答の大きさの相対値として表された。

実験 2-結果

Mg 応答に対する Ni イオンの効果

図 9 は Ni イオンによる Mg 応答の増強効果を示す。図 9A には 1 mM CaCl_2 、1 mM NiCl_2 、100 mM MgCl_2 、100 mM MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 刺激に対する各々の応答例を示す。 CaCl_2 は 1 mM で大きな応答を生じるが NiCl_2 は 1 mM でほとんど水線維からの応答は現れなかった。 MgCl_2 は 100 mM でかなりの応答を引き起こし、1 mM NiCl_2 が存在すると Mg 応答は増強された。図 9B に 1 mM NiCl_2 の非存在下および存在下での MgCl_2 の C-R 曲線を示す。神経応答 (R) は 100 mM MgCl_2 に対する相対応答値として表さ

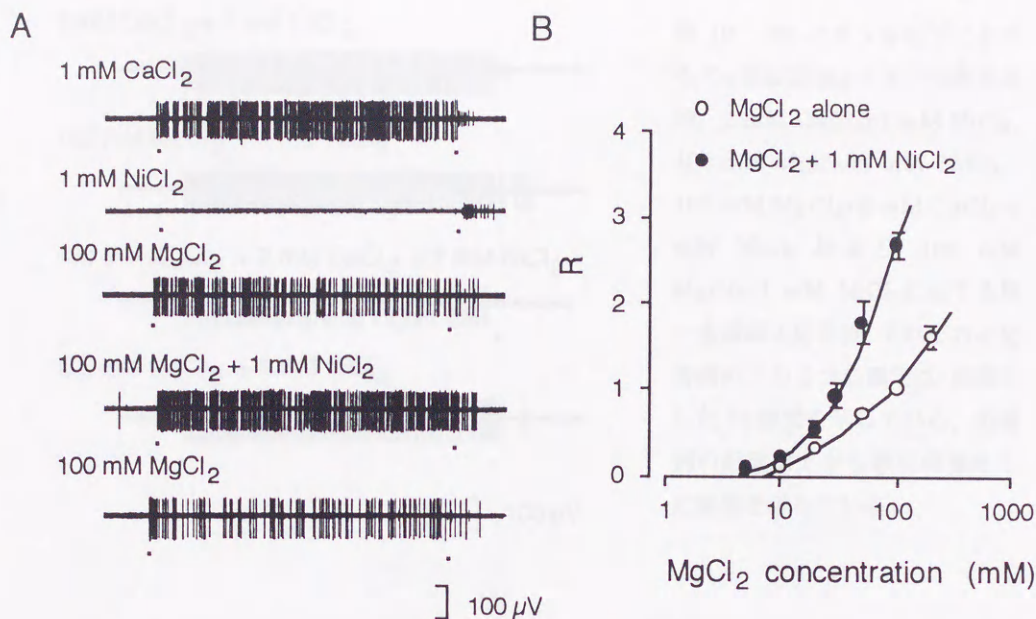


図9 Mg 応答における Ni イオンの増強効果。(A) 1 mM CaCl_2 、1 mM NiCl_2 、100 mM MgCl_2 、100 mM MgCl_2 +1 mM NiCl_2 および 100 mM MgCl_2 に対する単一水線維の応答例。それぞれの応答例の下への2つの■印は、刺激をした30秒間を示している。応答例の配置は上から順に刺激をした順番を示している。(B) Ni イオン非存在下あるいはNi イオン存在下における MgCl_2 の用量-応答曲線。縦軸に応答の大きさの相対値 (R) を、横軸に MgCl_2 の対数濃度を示している。応答の大きさの相対値は 100 mM MgCl_2 単独 (基準液) の神経応答の大きさを1として示している。それぞれの点とバーは平均値±標準誤差を表している。n=3~5。

れた。明らかに Ni イオンは Mg 応答を増強させた。しかし、Na 応答 (実験1) とは異なり Ni イオンは Mg イオンの閾値は変えなかった。Ni イオンは Ca 応答に対し増強と抑制の二重の効果がある (Kitada, 1994c) ので、Ni イオンが Mg 応答を抑制するかどうか調べた。100 mM MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 刺激と 100 mM MgCl_2 + 5 mM NiCl_2 刺激に対する応答値はそれぞれ 2.69 ± 0.15 (平均 ± 標準誤差, n=5) そして 2.62 ± 0.21 (平均 ± 標準誤差, n=5) であり、Ni イオンは Mg 応答を抑制しないことが分かった (Student's t-test, $P > 0.05$)。

Ca イオンは Ni イオンによって増強された Mg 応答を抑制する

Ni イオン存在下での Ca イオンと Mg イオンの相互抑制の例を図 10 に示す。この図で見られるように 100 mM MgCl_2 + 2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 刺激の応答 (三番目のトレース) は 2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 刺激の応答 (一番目のトレース) あるいは 100 mM MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 刺激の応答 (二番目のトレース) より小さかった。Ca イオンと Mg イオンの相互抑制は Ni イオン非存在下でも起こるので、Ni イオン、Ca イオンと Mg イオンの混合刺激液での応答の減少は Ni イオンと他のイオンの間の拮抗作用に

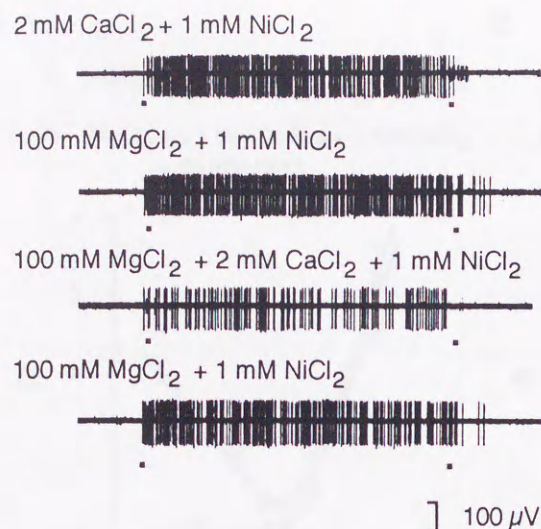


図 10 Ni イオン存在下における Ca および Mg イオンの相互拮抗。2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 、100 mM MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 、100 mM MgCl_2 + 2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 および 100 mM MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 に対する単一水線維の応答例。それぞれの応答例の下の方の2つの■印は、刺激をした30秒間を示している。応答例の配置は上から順に刺激をした順番を示している。

よるのではなく Ca イオンと Mg イオンの間に起こる拮抗作用である。

図 11 は 0.5 mM CaCl_2 存在下 (図 11A) および 2 mM CaCl_2 存在下 (図 11B) での MgCl_2 の C-R 曲線である。ここでは、全ての溶液に 1 mM NiCl_2 が加えられている。これらの図で見られるように、 CaCl_2 存在下では MgCl_2 の濃度が高くなるに連れ応答の大きさは減少し、さらに MgCl_2 の濃度が高くなると応答は増加した。即ち、 MgCl_2 の C-R 曲線は V 型の C-R 曲線であった。このことは負の勾配の曲線は Ca 応答が Mg イオンによって抑制されることにより、正の勾配の曲線は Mg イオンの興奮効果によることを示している。そこで Mg イオンの興奮効果に対する Ca イオンの抑制を調べるのに Ca イオンの興奮効果だけ消すことはできないか考えた。幸い Ni イオン存在下でも、Ca イオンと Na イオンの間には相互拮抗作用がある。1 mM NiCl_2 存在下で 0.5-1 mM CaCl_2 の応答は 50-100 mM NaCl で強く抑制され、1 mM NiCl_2 で増強された 50-100 mM NaCl 応答は 0.5-1 mM CaCl_2 で抑制される (図 5)。更に Mg 応答に対して NaCl は影響しないことが分かっている。故に、50-100 mM NaCl を 2-200 mM MgCl_2 + 0.5-2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 溶液の中へ加えた。図 11 で見られるように明らかに Ca イオンによって生じた応答は NaCl を加えることによって消失したり著しく抑制されることが分かる。NaCl によって Ca 応答が消失した残りの C-R 曲線は NaCl 非存在下の C-R 曲線と MgCl_2 の高い濃度でほぼ一致した。このことは Ca 応答が消失しても Mg イオンの興奮効果は影響を受けないこと、即ち、Mg イオンの興奮効果は Ca イオンの興奮効果とは独立であることを示している。図 11 における結果は 50-100 mM NaCl 存在下での正の勾配の曲線は Mg イオンの興奮効果からもたらされていること、および Ca イオンの興奮効果は 50-100 mM NaCl が存在するとき Mg イオンの高い濃度の領域には及ばないことを示している。

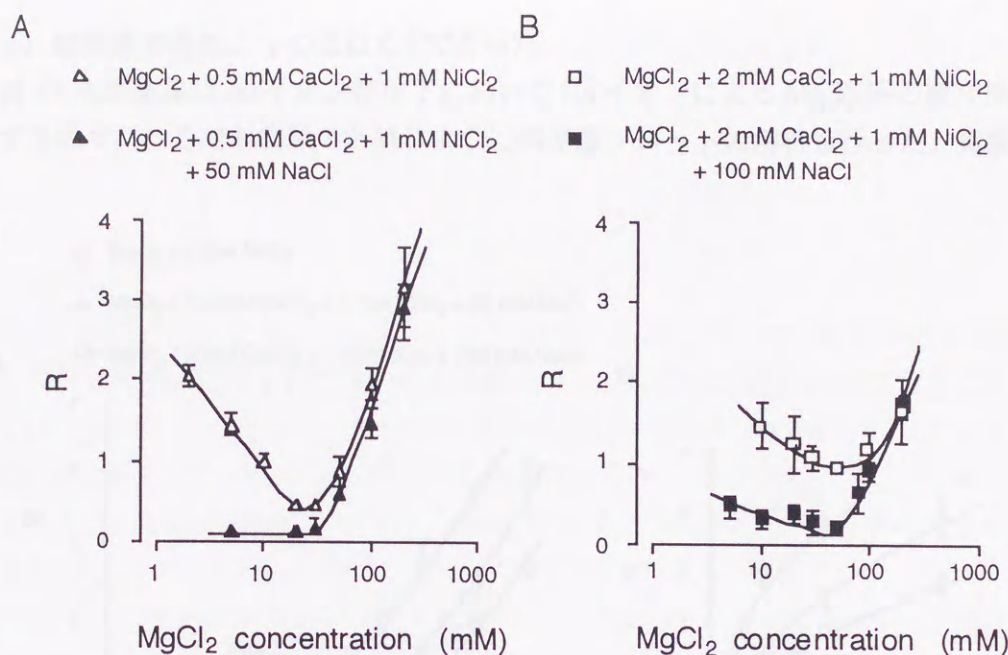


図 11 1 mM NiCl_2 存在下における MgCl_2 の用量一応答曲線。(A) 縦軸に応答の大きさの相対値 (R) を、横軸 MgCl_2 にの対数濃度を示している。それぞれの曲線は 0.5 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 (Δ) および 0.5 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 + 50 mM NaCl ($\blacktriangle$) 存在下の MgCl_2 の応答曲線を示している。(B) それぞれの曲線は 2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 ($\square$) および 0.5 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 + 50 mM NaCl ($\blacksquare$) 存在下の MgCl_2 の応答曲線を示している。A および B において応答の大きさの相対値は 100 mM MgCl_2 単独 (基準液) の神経応答の大きさを 1 として示している。それぞれの点とバーは平均値 $\pm$ 標準誤差を表している。 $n=3\sim 5$ 。

Mg 受容体に対する Ca イオンと Mg イオンの競合拮抗

実験 2 の目的は Mg 応答に対する Ni イオンの効果の特徴を調べることである。そこで 1 mM NiCl_2 存在下で、Mg イオンの興奮効果からもたらされる Mg イオンの C-R 曲線のみが解析された。実験 2 において得られた Mg イオンの C-R 曲線の中、 MgCl_2 + 1 mM NiCl_2 の C-R 曲線 (図 9B の $\bullet$) および MgCl_2 + 0.5-2 mM CaCl_2 + 1 mM NiCl_2 + 50-100 mM NaCl の C-R 曲線 (図 11A の $\blacktriangle$ および図 11B の $\blacksquare$) を図 12A に再プロットした。図 12A に見られるように Ca イオンが存在し、その濃度が高くなると MgCl_2 の C-R 曲線は右にほぼ平行に移動する (Mg の対数濃度に関し正の勾配の曲線を見よ)。これは Ni イオン非存在下でも観察されたように Ca イオンが競合的に Mg 応答を抑制することを示唆する。図 12A で示される正の勾配の曲線のみが Mg イオンの興奮効果からもたらされる曲線として図 12B に再び一次用量目盛りでプロットされた。この実験 2 でも実験 1 と同じくインパルス頻度を応答の大きさの指標にしているので MgCl_2 の閾値濃度が存在する筈である。実験 1 の図 6 から閾値下の応答の大きさ (r) を求めたようにここでも図 12B から Mg 応答における r を求めた。図 12B で曲線は目測で縦軸の一点

(-r) に外挿できた。r の値は 0.3 であった。

図 12 A の結果は Ni イオン存在下において Ca イオンによる Mg 応答の競合抑制を示唆するので、ここでも実験 1 と同じように両逆数プロットの解析を行った。実験 2 では

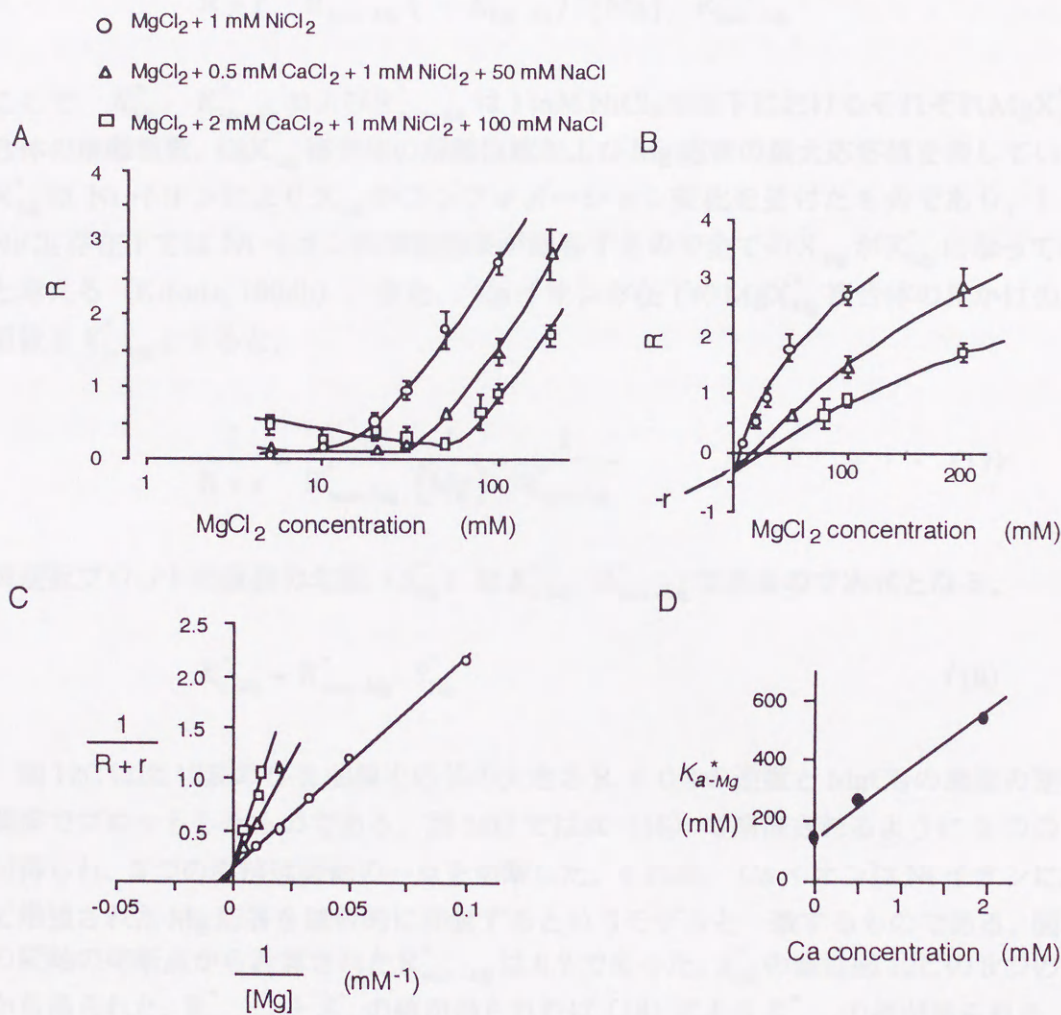


図 12 Ni イオンによって増強された Mg 応答に対する Ca イオンの効果。(A) 1 mM NiCl_2 (図 1B の●)、0.5 mM $\text{CaCl}_2 + 1 \text{ mM NiCl}_2 + 50 \text{ mM NaCl}$ (図 3A の▲) および 2 mM $\text{CaCl}_2 + 1 \text{ mM NiCl}_2 + 50 \text{ mM NaCl}$ 存在下 (図 3B の■) における MgCl_2 の用量-応答曲線を再表示した。(B) A で示した 3 本の曲線において、Mg イオンの興奮作用によって生じたと思われる正の傾斜の曲線のデータだけを取り出して一次用量目盛りで再プロットした。それぞれの曲線を目測で外挿すると縦軸の一点に収束する。シンボルは A と同じである。それぞれの曲線は縦軸に共通の切片 (-r) を持つことが分かる。r の値はこの図から読みとると 0.3 であった (詳細は本文参照)。(C) B で示した結果を両逆数プロットした。縦軸は応答の大きさの逆数 $[1/(R+r)]$ を、横軸は Mg^{2+} イオンの濃度の逆数 (mM^{-1}) を示している。r=0.3。シンボルは A と同じである。(D) 見かけの解離定数 $K_{a-\text{Mg}}$ と Mg^{2+} イオン濃度の関係を示した。 $K_{a-\text{Mg}}$ の値は式 (18) から算出した。

Mg イオンの興奮効果であるので (14) 式の Na の代わりに Mg を (14) 式に入れば次式が得られる。

$$\frac{1}{R + r} = \frac{K_{Mg}^*}{R_{\max-Mg}^*} \left(1 + \frac{[Ca]}{K_{Mg-Ca}^*} \right) \cdot \frac{1}{[Mg]} + \frac{1}{R_{\max-Mg}^*} \quad \dots (16)$$

ここで、 K_{Mg}^* 、 K_{Mg-Ca}^* および $R_{\max-Mg}^*$ は 1 mM NiCl₂ 存在下におけるそれぞれ MgX_{Mg}^* 複合体の解離恒数、 CaX_{Mg}^* 複合体の解離恒数および Mg 応答の最大応答値を表している。 X_{Mg}^* は Ni イオンにより X_{Mg} がコンフォメーション変化を受けたものであり、1 mM NiCl₂ 存在下では Ni イオンの増強効果が飽和するので全ての X_{Mg} が X_{Mg}^* になっていると考える (Kitada, 1994b)。また、Ca イオン存在下の MgX_{Mg}^* 複合体の見かけの解離恒数を K_{a-Mg}^* とすると、

$$\frac{1}{R + r} = \frac{K_{a-Mg}^*}{R_{\max-Mg}^*} \cdot \frac{1}{[Mg]} + \frac{1}{R_{\max-Mg}^*} \quad \dots (17)$$

両逆数プロットの直線の勾配 (S_{Mg}^*) は $K_{a-Mg}^* / R_{\max-Mg}^*$ であるので次式となる。

$$K_{a-Mg}^* = R_{\max-Mg}^* \cdot S_{Mg}^* \quad (18)$$

図 12C は図 12B の C-R 曲線を応答の大きさ $R + 0.3$ の逆数と $MgCl_2$ の濃度の逆数の関係でプロットしたものである。図 12C では式 (16) で期待されるように 3 つの直線が得られ、3 つの直線は縦軸の一点を切断した。それ故、Ca イオンは Ni イオンによって増強された Mg 応答を競合的に抑制するというモデルと一致するものである。図 12C の縦軸の切断点から計算された $R_{\max-Mg}^*$ は 6.7 であった。 S_{Mg}^* の値は図 12C の 3 つの直線から得られた。 $R_{\max-Mg}^*$ と S_{Mg}^* の値が得られれば (18) 式より K_{a-Mg}^* の値が得られる。Ca イオンの濃度が 0、0.5 そして 2 mM の時 K_{a-Mg}^* の値はそれぞれ 1.4×10^{-1} M、 2.7×10^{-1} M および 5.5×10^{-1} M であった。(16) 式と (17) 式から K_{a-Mg}^* は $K_{Mg}^* + K_{Mg}^*[Ca]/K_{Mg-Ca}^*$ である。そこで、 K_{a-Mg}^* の値と Ca イオンの濃度の関係をとると図 12D のように直線になった。図 12D の直線の傾斜は K_{Mg}^* / K_{Mg-Ca}^* であり、 K_{Mg}^* の値は先程求められたので K_{Mg-Ca}^* の値は 6.5×10^{-4} M と計算できた。

実験 2—考察

実験 2 においては Mg 応答に対する NiCl_2 の影響を調べた。1 mM NiCl_2 は Na 応答と同じく Mg の最大応答値を増強させたが、Na 応答と違って Mg イオンの閾値を変えなかった。また、Ca イオンによる Mg 応答の抑制は Ca イオンが Mg イオンと競合して X_{Mg}^* に結合することで説明できた。Ni イオンが存在しなくても Ca イオンによる Mg 応答の競合抑制はおこるので Ni イオンは二次的に Mg 応答に影響を与え、Mg 応答を増強すると考える。図 13 にこれらの陽イオンと Mg 受容体の関係を示す。Na 応答の場合と同じく、Ni イオンは Ni イオンと結合した膜要素 (T) の NiT^* 複合体を通じて X_{Mg} を X_{Mg}^* に変える。Ni イオン非存在下の MgX_{Mg} 複合体および CaX_{Mg} 複合体の解離恒数はそれぞれ K_{Mg} および $K_{\text{Mg-Ca}}$ であり、以前求めた (Kitada, 1989)。今回、Ni イオン存在下で MgX_{Mg}^* 複合体および CaX_{Mg}^* 複合体の解離恒数が得られたので、Ni イオン非存在下の解離恒数と比べ、Ni イオンの存在で解離恒数がどのように変わったか計算した (図 12)。 $K_{\text{Mg}}^*/K_{\text{Mg}}$ と $K_{\text{Mg-Ca}}^*/K_{\text{Mg-Ca}}$ の値はそれぞれ 1.7 と 0.9 であった。それ故、Ni

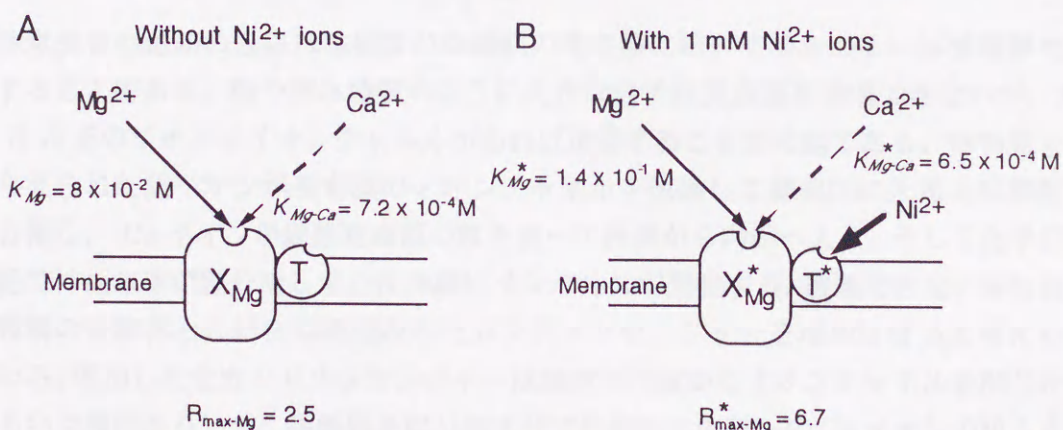


図 13 カエル GL における Mg 応答の Ni イオンによる調節を説明したシエーマ。(A) Ni イオン非存在下 (B) Ni イオン存在下。実線の矢印は Mg イオン (アゴニスト) の、破線は Ca イオン (競合的アンタゴニスト) の作用を示している。Mg と Ca イオンはマグネシウム受容体あるいはチャネル (X_{Mg}) に対して競合する。T は Ni 結合要素を示している。Ni イオン (太い実線の矢印) は Ni 結合要素 (T^*) に結合して複合体を形成することによって X_{Mg} 作用して X_{Mg}^* にコンフォメーション変化させる。A において K_{Mg} 、 $K_{\text{Mg-Ca}}$ および $R_{\text{max-Mg}}$ はそれぞれ MgX_{Mg} 、 CaX_{Mg} の解離恒数および Ni イオン非存在下における Mg イオンの最大応答を示している。図中の数値は以前報告した数値である (Kitada, 1989)。B において K_{Mg}^* 、 $K_{\text{Mg-Ca}}^*$ および $R_{\text{max-Mg}}^*$ はそれぞれ MgX_{Mg}^* 、 CaX_{Mg}^* の解離恒数および Ni イオン存在下の Mg イオンの最大応答を示している。図中の数値は本実験で求めた数値である。Ni イオンは Mg イオンおよび Ca イオンに対するマグネシウム受容体の親和性には影響を与えずに Mg 味覚変換の効率を調節する。詳細は本文参照。

イオンは陽イオンの Mg 受容体の親和性をあまり変えないと言える。

今回得た 1 mM Ni イオンによる Mg 応答の最大応答値 ($R_{\max-Mg}^*$) は 6.7 であり、Ni イオンの存在しない時の最大応答値 ($R_{\max-Mg}$) は 2.5 であった (Kitada, 1989)。これらの値は同じ基準溶液 (100 mM MgCl₂) に対する相対応答値であるので比較することができる。 $R_{\max-Mg}^*/R_{\max-Mg}$ は 2.7 であった。実験 1 で記載のように 1 mM Ni イオンが存在したことにより、Ca 応答および Na 応答の最大応答値はどちらも約 2 倍増強した。そこで、Ni イオンは Ca 応答、Mg 応答および Na 応答の最大応答値を 2–3 倍増強させると結論できる。Ca イオン、Mg イオンおよび Na イオンはそれぞれ異なる受容体に作用するが、Ni イオンはほぼ同じ増強効果を持つのでこれらの陽イオンの受容過程には共通な機構が存在すると思われる。

考察—全般

味覚受容の最初の過程は味物質が味細胞の受容膜に結合するかあるいは受容膜を透過することである。糖や苦み物質のように大きな分子は受容膜を透過できないが、Na や H などのイオンはイオンチャネルがあれば透過することが可能である。味物質として与えられた陽イオンが受容膜のイオンチャネルを透過して細胞内に入ると味細胞は脱分極し、Ca イオンが細胞基底部の膜を通して外側から内側へ入る。そして化学伝達を経て神経末端が脱分極し求心性神経にインパルスが発生する。透過できない味物質と受容膜の受容体との結合は細胞内のセカンドメッセンジャーを増加させると考えられている。増加したセカンドメッセンジャーは細胞の内側からイオンチャネルを閉じたりあるいは開けたりして、味細胞を脱分極させて外部から内部への Ca イオンの流入を高めるか、あるいは脱分極がなくても直接細胞内の Ca ストアから Ca イオンを放出させて化学伝達を引き起こす。しかし、動物が異なると同じ味物質でも味覚受容機構は異なっており、味覚受容機構は単純ではない (総説: Schiffman, 1990; Kinnamon and Cumming, 1992; Roper, 1992; Sato *et al.*, 1994; Lindemann, 1996)。

一般に味細胞は細長く比較的小さいのでガラス電極の刺入が難しく、また、かなり高濃度の液を味細胞の受容膜に与えねばならないことから細胞内電位の測定が難しく、味覚受容機構の研究は他の感覚の受容機構の研究より後れているといえる。しかし、哺乳動物に比べるとカエルの茸状乳頭は円盤状で柔らかく、ガラス電極を刺入し易いため、これまで味覚受容機構の研究にはしばしば使われてきた。カエルの塩味受容機構を中心にこれまで得られた知見を以下に述べる。カエルの味細胞にガラス電極を刺入して得た細胞内電位の研究 (Akaike *et al.*, 1976) によると、NaCl や KCl は膜抵抗の減少を

伴って脱分極するが CaCl_2 や MgCl_2 は大きな膜抵抗の変化がなく脱分極する。この結果は Na イオンや K イオンは受容膜の陽イオンチャネルを透過して細胞に脱分極を起こし、Ca イオンや Mg イオンは受容膜を透過するのでなく受容膜に結合することが受容機構の初期過程であることを示唆する。従って、一価の陽イオンと二価の陽イオンは別の受容発現機構を有するとするものである。カエル茸状乳頭を papain で処理すると、茸状乳頭内の細胞はバラバラに離れて遊離した単一の味細胞を得ることが出来る。この単一の味細胞を使ったパッチ電極法による研究から、カエル味細胞の受容膜および基底外側膜には非選択的一価陽イオンチャネルが存在することが分かった (Fujiyama *et al.*, 1993)。二価陽イオンである Ca イオンの受容機構について、Ca イオンが受容膜に結合すると受容膜上の K チャネルが塞がれ、味細胞に脱分極を起こすことがサンショウウオの一種 mudpuppy で報告された (Bigiani and Roper, 1991)。もう一つの代表的な二価陽イオンである Mg イオンはカエルの味細胞では Ca イオンの受容機構と同じと考えられている (Akaike *et al.*, 1976)。

上記のように、カエルの味細胞レベルの研究では一価の陽イオンと二価の陽イオンの受容発現機構は異なるとされているが、これまで味細胞として調べられた細胞が果たして味細胞かどうかの問題が残る。なぜならば味刺激が与えられると味蕾内のどんな細胞でも何等かの応答を示すものだからである。また、カエル舌咽神経は、今回、調べた水線維の他に苦味物質のキニーネに感受性のある線維があり、水や Ca イオンはキニーネ感受性線維を興奮させない。従って、少なくとも 2 種類の味細胞が存在しなければならないが、これまでの研究者はそのような区別を行っていない。そこで、味細胞レベルの研究の評価は慎重でなければならない。

神経線維からの応答はその神経線維が支配する多数の味細胞の興奮が反映したものであり、受容膜レベルの現象を直接的に観察したものではない。しかし、味受容の過程で受容膜で起こったことは最終的に神経線維の応答となって現れる。緒言の項で記述したように、カエルの水線維は Ca、Mg および Na イオンによって興奮し、これらのイオンはそれぞれ異なる受容体（あるいはイオンチャネル）に作用する。本研究ではこれらの陽イオン応答を Ni、Co および Mn イオンの遷移金属イオンが増強させるので遷移金属イオンを Ca、Mg および Na イオンの受容機構を解明する道具として使った。そして本研究では 3 種の陽イオン応答の増強に遷移金属イオンの中で一番効果の強い Ni イオンを選び、Ni イオンによる増強効果を定量的に解析した。図 14 は Ca 応答 (Kitada, 1994c) と、Mg 応答および Na 応答に対する Ni イオンによる増強効果のメカニズムのモデルである。Ni イオンは遷移金属イオンと結合する膜要素 (T) と結合し NiT^* 複合体となり、 NiT^* はアゴニスト受容体の複合体に影響を及ぼすと考えられる。本論文では Ca、Mg および Na イオンのそれぞれの受容体を X_{Ca} 、 X_{Mg} および X_{Na} と表し、これらの受容体が NiT^* により影響を受けた受容体をそれぞれ X_{Ca}^* 、 X_{Mg}^* および X_{Na}^* で表した。Ni イオンは他の陽イオン (Mg や Na イオン) と同じく X_{Ca}^* に対して Ca イオンと

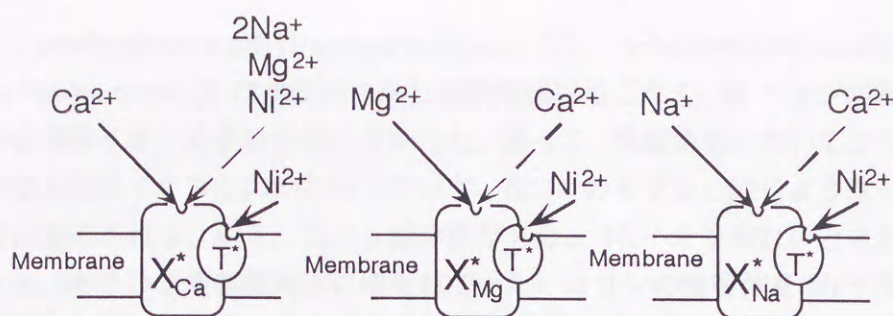


図 14 カエル GL の塩味受容における陽イオン応答の Ni イオンによる調節を説明したシェーマ。カルシウム受容体、マグネシウム受容体およびナトリウム受容体を示している。Ni イオン（太い実線の矢印）は Ni 結合要素（ T^* ）に結合して複合体を形成することによって X_{Ca} 作用して X_{Ca}^* に、 X_M に作用して X_{Mg}^* に、 X_{Na} に作用して X_{Na}^* にそれぞれコンフォメーション変化させる。実線の矢印はアゴニストの、破線は Ca イオン競合的アンタゴニストの作用を示している。 X_{Ca}^* および X_{Mg}^* それぞれに対して陽イオンの相互作用がある。 X_{Na}^* に対して Mg イオンと Ni イオンは相互作用せず、また、 X_{Mg}^* に対して Na イオンと Ni イオンは相互作用しない（図に示していない、Kitada, 1989, 1990）。しかし、Ni イオンは Ca 応答を増強するだけでなく競合抑制もする（Kitada, 1984）。詳細は本文参照。

競合し Ca 応答を抑制する。 X_{Ca} と X_{Ca}^* の親和性は荷電に特異的（charge-specific）であり、陽イオンであればどんなイオンとも結合できるからである（Kitada, 1978; Kitada and Shimada, 1980）。しかし、 X_{Mg} や X_{Mg}^* に Na イオンは作用せず、また X_{Na} や X_{Na}^* に Mg イオンは作用しない。また、本実験で示されたように X_{Mg} や X_{Mg}^* および X_{Na} や X_{Na}^* に Ca イオンはアンタゴニストとして結合できるが Ni イオンは直接これらの受容体に結合できない。従って、Ca 受容体と違って Mg 受容体および Na 受容体は陽イオンに対して化学特異的（chemically specific）である（Kitada, 1990）。本実験では Ni イオンの存在で受容体の陽イオンに対する親和性が変わるかどうか調べた。 X_{Ca} および X_{Mg} がそれぞれ X_{Ca}^* （Kitada, 1994c）および X_{Mg}^* （実験 2）になっても陽イオンに対し親和性は変わらないが、 X_{Na} が X_{Na}^* になると約 5 倍（実験 1）も増加した。このように各々の受容体は陽イオンとの相互作用においてそれぞれの特徴を有する。しかし、最大応答値は Ni イオン存在下で 3 種の陽イオン応答とも Ni イオンの存在しないときに比べると、同じ程度に 2～3 倍増強した。以上の結果はそれぞれの陽イオンの受容体は異なっている、3 種の陽イオン応答の発現機構は共通していることを思わせる。

カエル水線維において大きな有機分子の興奮効果が調べられた。多くの水線維は高濃度（500 mM）の塩化コリン（choline Cl）で興奮しないが、僅かの Ni イオン（1 mM で最大効果）が存在すると大きなコリン応答を生じた（Kitada, 1994a）。この Ni イオンによって増強したコリン応答は Ca イオンによって競合的に抑制された（Kitada, 1994d）。tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl、triethanolamine-HCl および

1994d)。tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl、triethanolamine-HCl および tetraethylammonium Cl は水線維に対し刺激効果は殆どなく、Ni イオンが存在してもこれらの有機陽イオン応答は出現しなかった。従って、興奮効果においてコリンがどうして特別な有機陽イオンなのかわからないが、図 14 のモデルと同じようなモデルがコリン応答に適用される。即ち、コリン受容体があり、Ni イオンがないとき活性化していなかった（あるいは受容膜内部に埋もれていた）コリンの受容体を Ni イオンが存在すると NiT^+ を介して活性化する（あるいは受容膜内部にあった受容体が表面に現れる）と解析された。即ち、コリンの受容機構は Ni イオンが二次的に作用する点で他の Ca、Mg および Na イオンの受容機構と共通している。コリンは大きい分子なので簡単に受容膜のイオンチャネルを透過できない。そこで水線維の陽イオン受容機構に共通性のあることを考えるとコリンと同じく Ca、Mg および Na イオンにも特異的なイオンチャネルが存在するとは思えない。

一価の陽イオンの受容機構に関し、利尿剤のアミロライド (amiloride) がラット鼓索神経の Na 応答を 50% 程抑制することが見出された（総説：Schffmann, 1990）。カエルの舌咽神経においてもアミロライドが Na 応答をある程度抑制することが報告された（Yoshii *et al.*, 1986; Herness, 1987）。アミロライドはカエルの遊離味細胞の Na イオンチャネルを塞ぐことが分かり、Na 受容に Na イオンチャネル が関与することが示唆された（Avenet and Lindemann, 1988）。

しかし、Kitada and Mitoh（1997）はカエル舌咽神経の塩応答に対するアミロライドの効果を詳しく調べ、これまで報告されたアミロライドによるカエル舌咽神経の塩応答抑制は受容器の疲労によることを明らかにした。従って、少なくともアミロライド感受性 Na イオンチャネルは受容膜上にはないと推察された。従って、カエルの遊離味細胞で見られたアミロライド感受性 Na イオンチャネルは味細胞の先端受容膜ではなく、基底外側膜にある可能性がある。

本研究で示してきたようにカエル舌咽神経の塩応答の大きさは他の陽イオンの存在で大きく変わった。カエル舌咽神経の Ca 応答は Co イオンによって抑制され（Kitada, 1978）、Na 応答が Co イオンによって増強される（Kashiwayanagi *et al.*, 1978; Kitada, 1994b）。Co イオンは遷移金属イオンでありその作用は Ni イオンと同じである。Herness（1987, 1991）は Ca 応答および Na 応答に対する Co イオンの作用を味細胞の細胞内電位変化から調べた。舌咽神経の Ca 応答が Co イオンによって抑制され神経応答が小さくなっても味細胞では大きな脱分極が現れた。これは味細胞で起こる脱分極が必ずしも神経応答の大きさと平行しないことを意味する。

以上のようにカエル舌咽神経の塩応答では受容膜上の陽イオンチャネルは考え難い。おそらくアゴニストの陽イオンとその受容体との複合体が形成されると細胞内のセカンドメッセンジャーが増加するのであろう。もし、Herness（1991）が報告したように脱分極そのものは神経応答と平行しないとすると、細胞内の Ca ストアーから Ca イ

オンが放出されて化学伝達が起こり求心性線維にインパルスを生じさせる可能性がある。Niイオンはアゴニストとその受容体の複合体に二次的に作用し細胞内のセカンドメッセンジャー生成を増幅するものと思われる。これらは今後明らかにしなければならない課題である。

結 論

カエル舌咽神経の単一神経線維のNa応答およびMg応答に対するNiの増強効果および、Niによって増強されたNaおよびMg応答に対するCaの抑制効果を定量的に調べた。Niは二次的に受容体に作用しNa応答およびMg応答を増強すること、またCaはNiで増強されたNa応答とMg応答を競合的に抑制することが分かった。NiはNa受容体の陽イオン親和性を5倍高めるが、Mg受容体の陽イオン親和性を変えなかった。また、NiはNa応答とMg応答の最大応答値を2~3倍大きくした。このようにNa応答とMg応答の増強効果はほぼ同じであるから、たとえ、受容体が異なっても両イオンの受容機構には共通の味覚受容変換機構が存在するものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました岡山大学歯学部口腔生理学講座 足立明教授ならびに岩手医科大学歯学部口腔生理学講座 北田泰之教授に深く感謝致します。

また、的確な御助言と御教示を頂きました岡山大学歯学部口腔生理学講座 諸先生方に厚く御礼申し上げます。

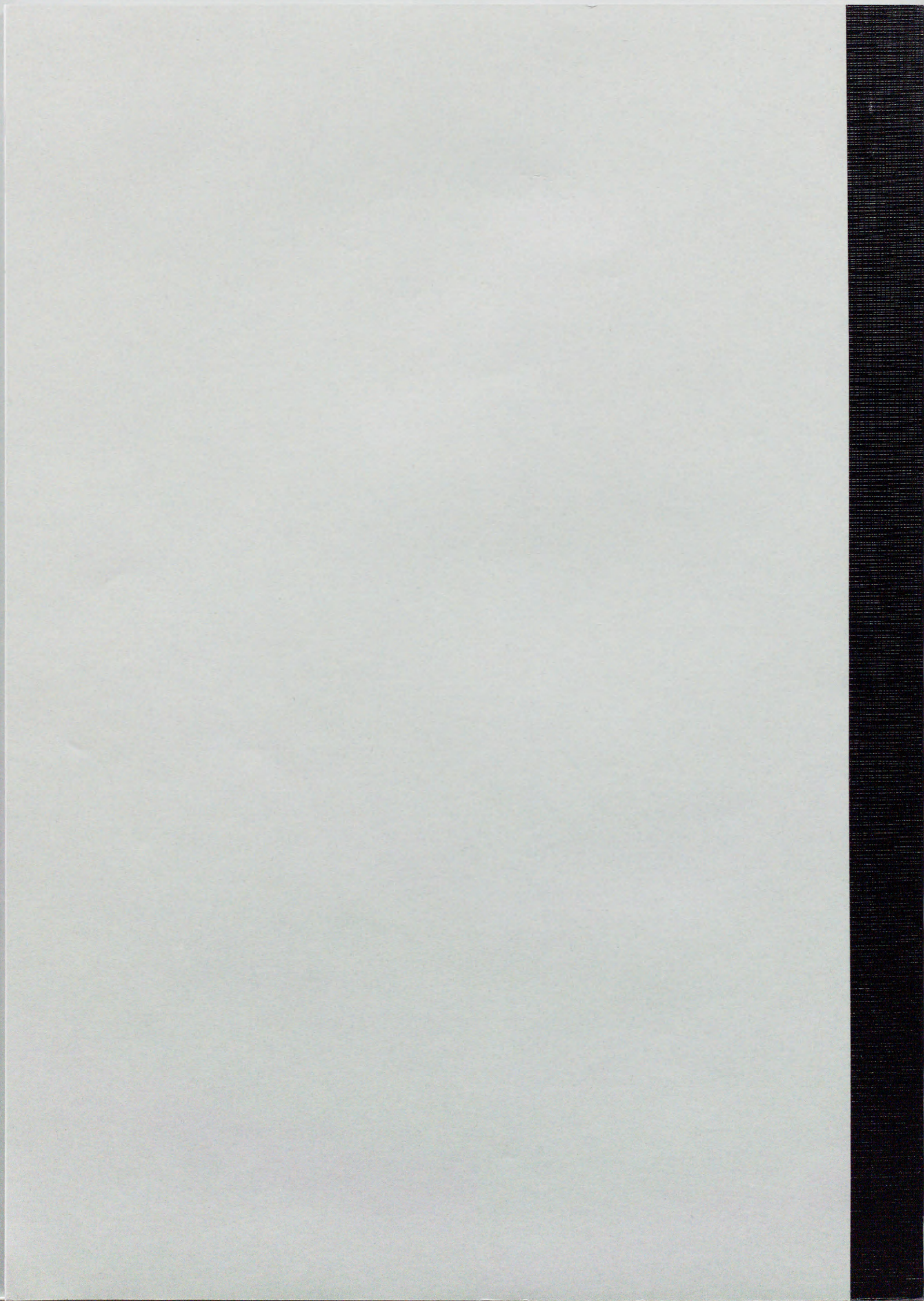
参考論文

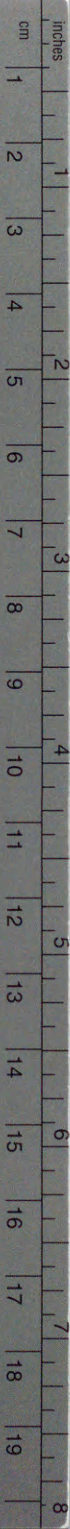
- Adachi, A. (1964) Neurophysiological study on taste effectiveness seasoning. *J. Physiol. Soc. Japan*, **26**, 347-355.
- Adachi, A., Okamoto, J., Hamada, T. and Kawamura, Y. (1967) Taste effectiveness of mixtures of sodium 5'-inosinate and various amino acids. *J. Physiol. Soc. Japan*, **29**, 65-71.
- Akaike, N., Noma, A. and Sato, M. (1976) Electrical responses of frog taste cells to chemical stimuli. *J. Physiol. (London)*, **254**, 87-107.
- Ariëns, E. J., van Rossum, J. M. and Koopman, P. C. (1960) Receptor reserve and threshold phenomena I. Theory and experiments with autonomic drugs tested on isolated organs. *Arch. int. pharmacodyn.*, **CXXVII**, 459-478.
- Avenet, P. and Lindemann, B. (1988) Amiloride-blockable sodium currents in isolated taste receptor cells. *J. Membr. Biol.*, **105**, 245-255.
- Bigiani, A. R. and Roper, S. D. (1991) Mediation of responses to calcium in taste cells by modulation of a potassium conductance. *Science*, **252**, 126-128.
- Casella, C. and Rapuzzi, G. (1957) Azione dell'acqua, del CaCl_2 e del NaCl sui ricettori linguiali nella rana. *Arch. Sci. Biol. (Bologna)*, **41**, 191-203.
- Fujiyama, R., Miyamoto, T. and Sato, T. (1993) Non-selective cation channel in bullfrog taste cell membrane. *NeuroReport*, **5**, 11-13.
- Hagiwara, S. and Takahashi, K. (1967) Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. gen. Physiol.*, **50**, 583-601.
- Herness, M. S. (1987) Are apical ion channels involved in frog taste transduction? Neural and intracellular evidence. In Roper, S. and Atema, J. (eds), *Olfaction and Taste IX*, *Ann. NY Acad. Sci.*, **510**, 362-365.
- Herness, M. S. (1991) Specificity of mono- and divalent salt transduction mechanisms in frog gustation evidenced by cobalt chloride treatment. *J. Neurophysiol.*, **66**, 580-589.
- Iwasaki, K. and Sato, M. (1984) Inhibitory effects of some heavy metal ions on taste nerve responses in mice. *Jap. J. Physiol.*, **34**, 907-918.
- Junge, D. and Brodwick, M. S. (1970) Stimulation of frog gustatory units by calcium. *Comp. Biochem. Physiol.*, **35**, 623-630.
- Kashiwagura, T., Kamo, N., Kurihara, K. and Kobatake, Y. (1978) Enhancement of frog gustatory response by transition metal ions. *Brain Res.*, **142**, 570-575.
- Kinnamon, S. C. and Cummings, T. A. (1992) Chemosensory transduction mechanism in taste. *Annu. Rev. Physiol.*, **54**, 715-731.

- Kitada, Y. (1978) Inhibitory effects of cations on the Ca^{2+} response of water fibers in the frog tongue. *Jap. J. Physiol.*, **28**, 413-422.
- Kitada, Y. (1984) Two different receptor sites for Ca^{2+} and Na^{+} in frog taste responses. *Neurosci. Lett.*, **47**, 63-68.
- Kitada, Y. (1986a) Different receptor sites for Ca^{2+} and Na^{+} in single water fibers of the frog glossopharyngeal nerve. *Brain Res.*, **377**, 211-215.
- Kitada, Y. (1986b) Salt taste responses in the frog glossopharyngeal nerve: different receptor sites for Mg^{2+} and Na^{+} . *Brain Res.*, **380**, 172-175.
- Kitada, Y. (1989) Taste responses to divalent cations in the frog glossopharyngeal nerve: competitive inhibition of the Mg^{2+} response by Ca^{2+} . *Chem. Senses*, **14**, 487-502.
- Kitada, Y. (1990) Taste responses to electrolytes in the frog glossopharyngeal nerve: initial process of taste reception. *Brain Res.*, **535**, 305-312.
- Kitada, Y. (1991) Competitive inhibition of the response to Na^{+} by Ca^{2+} in water fibers of the frog glossopharyngeal nerve. *Chem. Senses*, **16**, 95-104.
- Kitada, Y. (1994a) Competitive inhibition of the nickel-induced response to choline by calcium ions in single water fibers of the frog glossopharyngeal nerve. *Chem. Senses*, **19**, 641-650.
- Kitada, Y. (1994b) Enhancing effects of transition metals on the salt taste responses of single fibers of the frog glossopharyngeal nerve: specificity of and similarities among Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^{+} taste responses. *Chem. Senses*, **19**, 265-277.
- Kitada, Y. (1994c) A quantitative study of dual action of nickel ions on the taste response to calcium ions of single fibers of the frog glossopharyngeal nerve: inhibition and enhancement by nickel ions. *Chem. Senses*, **19**, 401-411.
- Kitada, Y. (1994d) The responses to choline ions induced by transition metal ions in single water fibers of the frog glossopharyngeal nerve. *Chem. Senses*, **19**, 627-640.
- Kitada, Y. (1995) Anions modulate cation-induced responses of single units of the frog glossopharyngeal nerve. *Brain Res.*, **694**, 253-263.
- Kitada, Y. and Mitoh, Y. (1997) Amiloride does not affect the taste responses of the frog glossopharyngeal nerve to NaCl. International Symposium on olfaction and taste XII and AChems XIX, Book of Abstracts, 160.
- Kitada, Y. and Shimada, K. (1980) A quantitative study of the inhibitory effect of Na^{+} and Mg^{2+} on the Ca^{2+} response of water fibers in the frog tongue. *Jap. J. Physiol.*, **30**, 219-230.

- Kohlhardt, M., Bauer, B., Krause, H. and Fleckenstein, A. (1973) Selective inhibition of the transmembrane Ca conductivity of mammalian myocardial fibers by Ni, Co and Mn ions. *Pflügers Arch.*, **338**, 115-123.
- Kusano, K. (1960) Analysis of the single unit activity of gustatory receptors in the frog tongue. *Jap. J. Physiol.*, **10**, 620-633.
- Kusano, K. and Sato, M. (1957) Properties of fungiform papillae in frog's tongue. *Jap. J. Physiol.*, **7**, 324-338.
- Lindemann, B. (1996) Taste reception. *Physiol. Reviews*, **76**, 719-766.
- Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1989) Ionic basis of salt-induced receptor potential in frog taste cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94A**, 591-595.
- Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1993) Cationic and anionic channels of apical receptive membrane in a taste cell contribute to generation of salt-induced receptor potential. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106A**, 489-493.
- Nomura, H. and Sakada, S. (1965) On the "water response" of frog's tongue. *Jap. J. Physiol.*, **15**, 433-443.
- Roper, S. D. (1992) The microphysiology of peripheral taste organs. *J. Neurosci.*, **12**, 1127-1134.
- Sato, M. and Akaike, N. (1965) 5'-ribonucleotides as gustatory stimuli in rats electrophysiological studies. *Jpn. J. Physiol.*, **15**, 53-70.
- Sato, T., Miyamoto, T. and Okada, Y. (1994) Latency of gustatory neural impulses initiated in frog tongue. *Brain Res.*, **424**, 333-342.
- Sato, T., Miyamoto, T. and Okada, Y. (1994) Comparison of gustatory transduction mechanisms in vertebrate taste cells. *Zool. Sci.*, **11**, 767-780.
- Schiffman, S. S. (1990) The role of sodium and potassium transport pathways in transduction: an overview. *Chem. Senses*, **15**, 129-135.
- Taglietti, V., Casella, C. and Ferrari, E. (1969) Interactions between taste receptors in the frog tongue. *Pflügers Arch.*, **312**, 139-148.
- Takahashi, H., Murai, T. and Sasaki, T. (1958) Plateau formation and sulphhydryl groups in the plasma membrane. *Nature (London)*, **182**, 1675-1677.
- Yamashita, S., Ogawa, H. and Sato, M. (1973) The enhancing action of 5'-ribonucleotide on rat gustatory nerve fiber response to monosodium glutamate. *Jpn. J. Physiol.*, **23**, 59-68.
- Yoshii, K., Kiyomoto, Y. and Kurihara, K. (1986) Taste receptor mechanism of salts in frog and rat. *Comp. Biochem. Physiol.*, **85A**, 501-507.
- Yoshii, K., Yokouchi, C. and Kurihara, K. (1986) Synergistic effects of 5'-nucleotides on rat taste responses to various amino acids. *Brain Res.*, **367**, 45-51.

Zotterman, Y. (1949) The response of the frog's fibres to the application of pure water. *Acta Physiol. Scand.*, 18, 181-189.

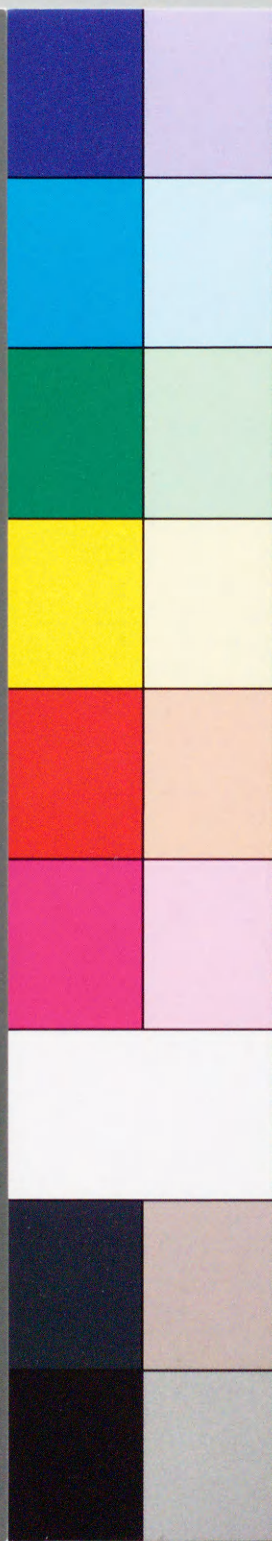




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

