

クロキンバエ味細胞の応答に対する *l-cis*-ジルチアゼムの阻害効果村田 芳博¹・尾崎 まみこ²・中村 整¹(¹ 電通大・量子物質工学、² 京都工繊大・繊維・応用生物)

目 的

クロキンバエ唇弁味覚毛には1本につき4つの味細胞が存在し、それぞれ糖受容、塩受容、水受容および忌避物質受容を担っている。そのうち糖受容細胞の情報変換機構において、我々は、細胞内で産生された一酸化窒素 (NO) が同じ細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能することを主に薬理学的手法を用いた電気生理学実験によって示してきた¹⁾。また同様の方法で、グアニル酸シクラーゼの可溶型 (sGC) が糖受容細胞で機能することを示唆する結果も得て、一昨年の本大会で発表した²⁾。糖受容細胞では、NO とは別に cGMP もセカンドメッセンジャーとして関与することが示唆されている³⁾ ことから、NO で活性化される sGC が cGMP を産生する経路が予想される。本研究では、cGMP の標的と考えられるサイクリックヌクレオチド感受性 (CNG) チャネルの関与を検討するため、そのブロッカーとして知られる *l-cis*-ジルチアゼムが糖受容細胞の応答に及ぼす影響を電気生理学実験により調べた。

方 法

羽化後5～7日のクロキンバエ (*Phormia regina*) の唇弁 LL 型味覚毛に対し、いわゆる「チップレコーディング法⁴⁾」で味細胞の応答を記録した。すなわち、刺激液を詰めたガラス管電極を当て、味細胞が発するインパルスを記録した。前報¹⁾に従って、刺激開始後150～350 ms までのインパルス数 (指標インパルス数) を応答の大きさとした。刺激液には糖刺激として100 mM スクロースと100 mM フルクトース、塩刺激として500 mM NaCl、水刺激として10 mM NaCl を用いた。糖溶液には導通を確保するために10 mM NaCl を加えた。*l-cis*-ジルチアゼムは1、10 および50 μ M の濃度で刺激液に混ぜ、刺激とともに味覚毛先端に作用させた。

結 果

l-cis-ジルチアゼムを含む糖、塩および水の各溶液で単一味覚毛の先端を刺激したときの味細胞の応答変化を調べた。図1は、スクロースおよびフルクトース刺激によって糖受容細胞が発した典型的なインパルス列である。この例では、100 mM スクロースで刺激したときの指標インパルス数は24を示した (図1Aa)。その3分後、50 μ M *l-cis*-ジルチアゼムを含む100 mM スクロースで刺激すると14に減少した (図1Ab)。さらに3分後、再び100 mM スクロースで刺激すると指標インパルス数は最初と同じ24であった (図1Ac)。別の単一味覚毛に対し、スクロースをフルクトースに代えて同様に刺激したところ、50 μ M *l-cis*-ジル

Inhibitory effects of *l-cis*-diltiazem on the responses of the taste cells in the blowfly, *Phormia regina*. Yoshihiro Murata¹, Mamiko Ozaki² and Tadashi Nakamura¹, ¹Dept. Appl. Phys. Chem., Univ. Electro-Commun., Chofu, Tokyo 182-8585, ²Dept. Appl. Biol., Fac. Textile Sci., Kyoto Inst. Tech., Kyoto 606-8585; tad@pc.ucc.ac.jp, Fax +81-424-43-5501

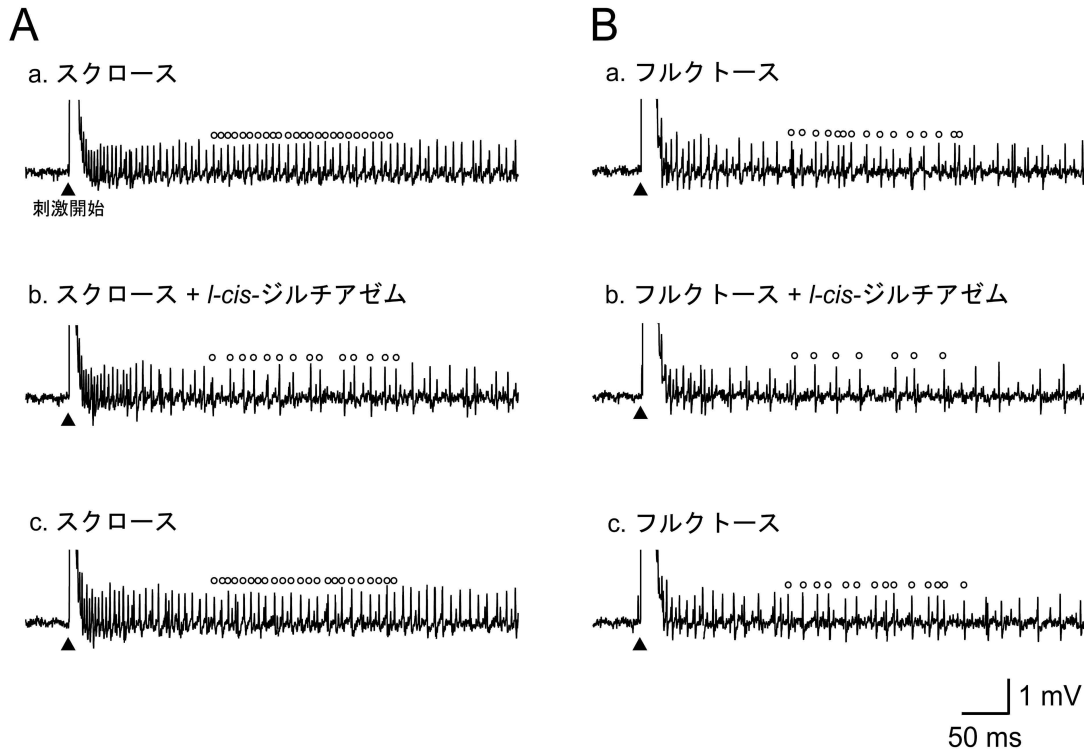


図1 100 mM スクロース (A) および 100 mM フルクトース (B) に対する典型的なインパルス列。単一味覚毛 A と B の先端をそれぞれ a、b、c の順に 3 min 間隔で刺激した。▲ は刺激開始点。刺激開始後 150 ~ 350 ms 間に糖受容細胞が誘発したインパルスを○で示した。ジルチアゼムの濃度は 50 μ M。

チアゼムを刺激液に混ぜることで指標インパルス数は 15 から 7 へと減少し (図 1Ba、b)、減少した指標インパルス数は 14 まで回復した (図 1Bc)。すなわち、*l-cis*-ジルチアゼムは可逆的に糖応答を阻害する傾向を示した。複数回の実験を行った結果をまとめて、表 1 に示した。スクロース刺激での指標インパルス数は、ジルチアゼム (-) で 22.0 ± 0.5 、ジルチアゼム (+) で 15.4 ± 0.7 であった ($n = 11$)。また、フルクトース刺激ではそれぞれ 15.3 ± 1.2 、 7.3 ± 1.1 となった ($n = 8$)。ジルチアゼムの有無によって指標インパルス数に差があるかを符号付き順位和検定により調べた結果、スクロース刺激では 1% 水準で ($P = 0.004$)、フルクトース刺激では 5% 水準で ($P = 0.014$) それぞれ有意差が検出された。すなわち、*l-cis*-ジルチアゼムは、スクロースおよびフルクトースによって誘発される糖応答をともに有意に阻害した。さらに、この糖応答阻害のジルチアゼム濃度に対する依存性を調べたところ、ジルチアゼム濃度 (1 ~ 50 μ M) が上昇するにしたがって糖受容細胞の応答残存率は減少した (表 2)。一方、塩応答および水応答においては、*l-cis*-ジルチアゼム (50 μ M) による阻害効果は見られなかった (表 1)。すなわち、500 mM NaCl に対する指標インパルス数は、ジルチアゼム (-) で 27.3 ± 1.7 に対して、ジルチアゼム (+) で 26.8 ± 1.3 ($n = 4$) であった。また、10 mM NaCl ではそれぞれ 12.0 ± 1.4 と 12.8 ± 1.6 であった ($n = 5$)。

表1 *l-cis*-ジルチアゼムによる指標インパルス数の変化 (平均値 ± SEM)。

味細胞の種類	刺激液	糖受容細胞		塩受容細胞	水受容細胞
		100 mM スクロース (n = 11)	100 mM フルクトース (n = 8)	500 mM NaCl (n = 4)	10 mM NaCl (n = 5)
50 μM <i>l-cis</i> -ジルチアゼム	-	22.0 ± 0.5	15.3 ± 1.2	27.3 ± 1.7	12.0 ± 1.4
	+	15.4 ± 0.7	7.3 ± 1.1	26.8 ± 1.3	12.8 ± 1.6

表2 *l-cis*-ジルチアゼムの濃度と糖受容細胞の応答残存率との関係 (平均値 ± SEM)。

<i>l-cis</i> -ジルチアゼムの濃度 (μM)		1	10	50
刺激液	100 mM スクロース	1.01 ± 0.02 (n = 8)	0.91 ± 0.05 (n = 6)	0.70 ± 0.04 (n = 11)
	100 mM フルクトース	1.06 ± 0.04 (n = 5)	0.86 ± 0.03 (n = 7)	0.47 ± 0.05 (n = 8)

考 察

クロキンバエ糖受容における CNG チャネルの関与を検討するため、CNG チャネルブロッカーとして知られる *l-cis*-ジルチアゼムが味細胞の応答を阻害するかどうかを調べた。その結果、*l-cis*-ジルチアゼムはその濃度に依存して糖受容細胞の応答 (糖応答) を阻害した。その際、*l-cis*-ジルチアゼムは受容膜先端に投与しており、それによって生じた阻害は可逆的であった。このことから、*l-cis*-ジルチアゼムが細胞外から糖受容細胞の受容膜に存在する CNG チャネルに作用した結果、糖応答は抑制されたと考えられる。本研究では糖刺激としてスクロースとフルクトースを用いたが、いずれの刺激に対する糖応答も *l-cis*-ジルチアゼムによって阻害された。スクロースとフルクトースは糖受容細胞膜上においては別個の受容部位に作用することが示唆されている^{5,6)}。今回の結果から、クロキンバエの場合、異なる部位で受容されたスクロースおよびフルクトースの興奮性シグナルは CNG チャネルに収束すると考えられる。

クロキンバエ糖受容機構における CNG チャネルは、cGMP の標的分子である可能性が考えられる。クロキンバエ唇弁では糖刺激に対して cGMP 濃度および cGMP ホスホジエステラーゼ (PDE) 活性が上昇すること⁷⁾や、膜透過性をもつ cGMP のアナログや PDE 阻害剤の細胞外投与によって糖応答が誘発されること³⁾が報告されている。これらのことから、クロキンバエでは cGMP が興奮性のセカンドメッセンジャーとして機能すると考えられている。この考えは、我々が一昨年報告した sGC の阻害剤が糖応答を抑制するという結果²⁾に合致する。これらのことから、糖刺激によって細胞内 cGMP 濃度が上昇した結果、CNG チャネルが活性化されて糖受容細胞が脱分極すると考えられる。

以上、本研究の成果は CNG チャネルが糖受容機構に関与することを示唆するものである。同時に、我々がこれまで主張してきた NO-cGMP 系、すなわち NOS により NO が産生され、その NO が sGC を活性化して cGMP の産生を促すカスケードが糖受容細胞内で機能しているという説を支持するものである。

謝 辞

l-cis-ジルチアゼムは、田辺製薬(株)からご提供いただいた。本研究の一部は、生研センター基礎研究推進事業として行われた。

文 献

- 1) Murata Y, Mashiko M, Ozaki M, Amakawa T and Nakamura T: Intrinsic nitric oxide regulates the taste response of the sugar receptor cell in the blowfly, *Phormia regina*. *Chem. Senses* 29, 75-81 (2004)
- 2) 益子正史, 村田芳博, 尾崎まみこ, 尼川大作, 中村整: クロキンバエ唇弁糖受容味細胞における NO の産生・作用機構. 日本味と匂学会誌 10, 689-692 (2002)
- 3) Amakawa T, Ozaki M and Kawata K: Effects of cyclic GMP on the sugar taste receptor cell of the fly *Phormia regina*. *J. Insect Physiol.* 36, 281-286 (1990)
- 4) Hodgson ES, Lettvin JY and Roeder KD: Physiology of a primary chemoreceptor unit. *Science* 122, 417-418 (1955)
- 5) Shimada I, Shiraishi A, Kijima H and Morita H: Separation of two receptor sites in a single labellar sugar receptor of the flesh-fly by treatment with p-chloromercuribenzoate. *J. Insect Physiol.* 20, 605-621 (1974)
- 6) Ozaki M, Amakawa T, Ozaki K and Tokunaga F: Two types of sugar-binding protein in the labellum of the fly, *J. Gen. Physiol.* 102, 201-216 (1993)
- 7) Wiczorek H and Schweickl H: Concentrations of cyclic nucleotides and phosphodiesterases in an insect chemosensory organ. *Insect Biochem.* 15, 723-728 (1985)