

〔原著〕 松本歯学 18 : 132~137, 1992

key words : キナクリン — カルシウム — 水受容器 — 拮抗抑制 — カエル

## カエル水受容器におけるカルシウムとキナクリンの拮抗

野村浩道

松本歯科大学 口腔生理学教室 (主任 野村浩道 教授)

### Competition between Calcium and Quinacrine in Frog Water Receptor

HIROMICHI NOMURA

*Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental College*  
(Chief : Prof. H. Nomura)

#### Summary

Quinacrine has been shown to inhibit reversibly Ca response of the frog (Nomura, 1975). In order to reveal whether the mechanism of the inhibition by quinacrine is a competition between calcium ions and quinacrine to receptor sites, Ca responses to various calcium concentrations with or without 10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M quinacrine-HCl were examined using single fungiform papilla preparations dissected from the frog tongue. Response—concentration curve shifted to the right when quinacrine was added to the solutions. This indicates that quinacrine inhibits the Ca response by competing with calcium ions to receptor sites.

#### 結 言

カエル舌および口蓋には、通常の淡水に顕著に応答する水受容器とよばれる味覚受容器がある<sup>3,10,20</sup>。Nomura & Sakada<sup>20</sup>は、0.1 M 食塩溶液のみでは水受容器は興奮しないが、そこに 1 mM 以上の塩化カルシウムを加えると水受容器に顕著な応答が起ることおよび 0.3 M 以上の食塩溶液単独でもでも応答が起ることを見出した。前者は Ca 応答、後者は Na 応答とよばれている<sup>18</sup>。

味覚の受容機序としては、現在つぎの 3 つの説が提唱されている。第 1 の説は、味細胞受容膜を

構成する磷脂質または糖質の陰性基が作る表面電荷に対するイオンの吸着によって味細胞先端膜 (apical taste cell membrane) の界面電位が変化すると味細胞が興奮するという説である<sup>11,14</sup>。この場合、イオンは単に吸着して味細胞先端膜の界面電位を変えるだけで、味細胞内には入らない。第 2 の説は、味物質またはイオンの吸着によって受容蛋白分子が立体構造変化を起こすことによって味細胞が興奮するという説である。この場合、受容蛋白分子はイオンチャンネルでも膜酵素でもよいが、味刺激のイオンは charge carrier のイオンとは直接関係がない<sup>7</sup>。哺乳動物における甘味受容機序はこのしくみによると考えられて

る<sup>13,14)</sup>。第3の説は、イオンがイオンチャンネルを通過して味細胞内に流入することによって味細胞が興奮がするという説である。哺乳動物における塩応答の受容機序はこのしくみによると考えられている<sup>4)</sup>。

カエル味覚受容器のCa応答およびNa応答の受容機序については、上記の3つの仮説すべてが提出されている。栗原ら<sup>6,13,23)</sup>は、Ca応答およびNa応答が共に第1の機序で発現すると考えている。Nomura & Ishizaki<sup>18)</sup>は、Na応答については言及していないが、Ca応答は第2の機序によると考えている。また、佐藤ら<sup>16,21)</sup>は、Ca応答およびNa応答が共に第3の機序によると考えている。

Okada et al.<sup>21)</sup>は、カエル味細胞の静止電位の発現機序を調べたところ、味細胞の静止電位は、味細胞の先端膜 (apical membrane) と側底膜 (basolateral membrane) のNaイオン拡散電位とKイオン拡散電位の和であることを見出した。つまり、味細胞膜はイオンを透過するというのである。また、Kitada<sup>8,9)</sup>は、3価のLaイオンがカエル味覚受容器に対して強い抑制効果をもつことを見出し、第1の機序によれば3価のLaイオンは2価のCaイオンより強い刺激効果を有するはずであるので、この実験結果は第1のしくみの可能性を否定すると述べている。

Kitada<sup>8,9)</sup>の研究では、LaイオンがNaイオンと同じようにCaイオンと競合するかどうかは調べられていない。Laイオンは、水酸化化合物を生じて溶液のpHを下げ、Naイオン存在下で顕著なNa応答を発現する作用がある<sup>19)</sup>ので、多価陽イオンの抑制効果を調べるにはあまり適当な多価陽イオンといえない。

キナクリンは低濃度 (0.5 mM 以下) でCa応答を抑制することが見出されている<sup>17)</sup>が、そのアクリジン環と側鎖に2つのアミノ基を有し、pKはそれぞれ10.3と7.7であるので、弱酸性溶液中では2価の陽イオンとなる<sup>15)</sup>。そこで、カエル水受容器では、キナクリンがCaイオンと競合してCa応答を抑制する多価陽イオンとして働くのではないかと考え、その点を調べることにした。

#### 材料と方法

実験に使用した材料は、トノサマガエル (*Rana*

*nigromaculata*) の舌から、1-2 mm の神経を付けて摘出した単一茸状乳頭 (単一茸状乳頭標本) である。実験方法は、3枚のガラス板の中央の細長いガラス板に茸状乳頭を載せ、神経をもう1枚のガラス板に橋渡しし、いわゆるエアギャップ法によって求心性インパルスを導出した。求心性インパルスは、高入力インピーダンス増幅器 (MEZ 7101, 日本光電工業) および主増幅器 (AVH 10, 日本光電工業) で増幅したのち、陰極線オシロスコープ (VC-10, 日本光電工業) で観察し、データレコーダー (R351F, TEAC) に保存し、必要に応じ連続撮影装置 (5R41, 三栄測器) を用いオシログラフ用紙に記録した。

基準刺激溶液には5 mM  $\text{CaCl}_2$  を0.1 M NaClに加えた溶液、順応溶液にはリンガー液を用いた。キナクリン溶液は、1~100 mM  $\text{CaCl}_2$  を0.1 M NaClに加えた刺激溶液に10  $\mu\text{M}$  あるいは100  $\mu\text{M}$  塩酸キナクリン (半井化学) を加えて作った。リンガー液ならびに刺激溶液は、先端150~200  $\mu\text{m}$  のガラス管を注射針に取り付けた2 ml ツベルクリン用注射筒から流した。刺激間隔は3分間とし、刺激と刺激の間はリンガー液で順応した。

キナクリン溶液は、塩酸キナクリンを刺激溶液に溶解して作ったが、pHの調整は行わなかった。pHを中性にすると、溶液の色が黄色から褐色に変化し、キナクリンが2価から1価に変化するように思われたからである。なお、塩酸キナクリンを加えることによって刺激溶液は酸性 (pH4.5~5.0) になったが、このpHでは応答が大きくなることはあっても抑制されることはない<sup>12)</sup>。

濃度=応答曲線は、基準刺激溶液に対する応答 (インパルスが発生し始めてから7.5秒間のインパルス数) を1とし、1~100 mM  $\text{CaCl}_2$  を0.1 M NaClに加えた刺激溶液に対する応答と基準刺激溶液に対する応答の強さの比から求めた。

実験は、室温 (24~27°C) で行った。

#### 結 果

基準刺激溶液 (5 mM  $\text{CaCl}_2$  を0.1 M NaClに加えた溶液) を単一茸状乳頭標本に与えると持続性の応答 (Ca応答) が発現する (図1の1, 6および12段目)。キナクリンがCaイオンと競合してカエル水受容器のCa応答を抑制しているかどうか

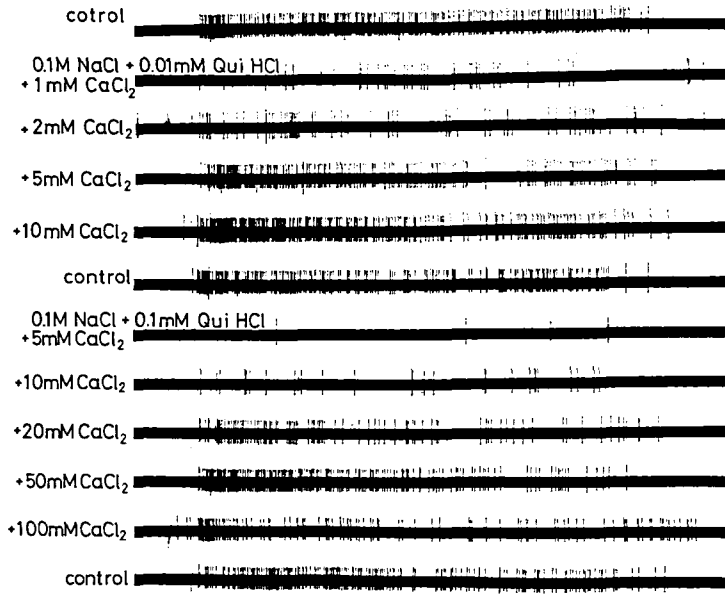


図1：カエル水受容器のCa応答に及ぼすキナクリンの抑制作用：記録は、同一の単一茸状乳頭標本から導出した求心性神経インパルスを示す。図の左側の+1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、+2 mM  $\text{CaCl}_2$ 、………は、10  $\mu\text{M}$  あるいは100  $\mu\text{M}$  塩酸キナクリンを含む0.1 M NaCl 溶液に加えた  $\text{CaCl}_2$  濃度を示す。

かは、対数濃度＝応答曲線がキナクリンによって右方移動するかどうかを調べれば分る<sup>25)</sup>ので、10  $\mu\text{M}$  あるいは100  $\mu\text{M}$  塩酸キナクリンを含む0.1 M NaCl 溶液に1～100 mM  $\text{CaCl}_2$ を加えた溶液を刺激溶液として単一茸状乳頭に与えて応答を調べた。

同一のCa濃度におけるCa応答は、キナクリン濃度を加えると小さくなり、また、濃度を高くするほどその効果は大きかった。たとえば、100  $\mu\text{M}$  塩酸キナクリンを含む0.1 M NaCl 溶液に5 mM  $\text{CaCl}_2$ を加えた溶液に対する応答(図1の7段目)は、自発活動程度で2～3発しかインパルスが出ていないが、10  $\mu\text{M}$  塩酸キナクリンを含む0.1 M NaCl 溶液に5 mM  $\text{CaCl}_2$ を加えた溶液に対する応答(図1の4段目)は、基準刺激溶液に対する応答に近い顕著な応答が出ている。なお、このキナクリンの抑制効果は、この程度の濃度では可逆的であり、かつ抑制は瞬時に起こるので、キナクリンは味細胞内に入ることではなく、味細胞先端膜表層で作用すると考えられる。

図2は、塩酸キナクリンが入らないときと、10  $\mu\text{M}$  あるいは100  $\mu\text{M}$  塩酸キナクリンを加えたとき

きの対数濃度＝応答曲線を示す。前者は7標本、後2者はそれぞれ4標本の結果をグラフにしたものである。塩酸キナクリンを加えることによって、対数濃度＝応答曲線が右方へ平行移動している。このことは、カエル水受容細胞先端膜のCaイオ

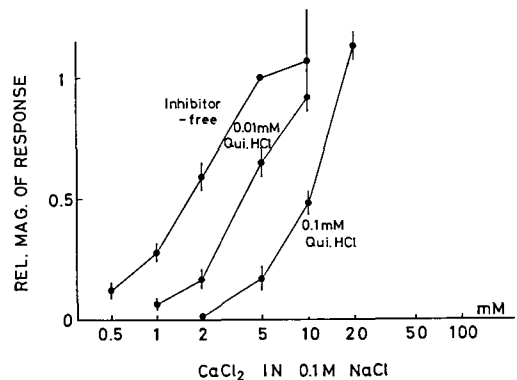


図2：Ca 応答の対数濃度＝応答曲線：黒丸および縦の線は、対照 (inhibitor-free) 7 標本およびキナクリン溶液 (Qui-HCl) 4 標本の平均値と標準誤差を示す。縦軸は、標準刺激溶液 (0.1 M NaCl + 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) の応答を 1 とした。

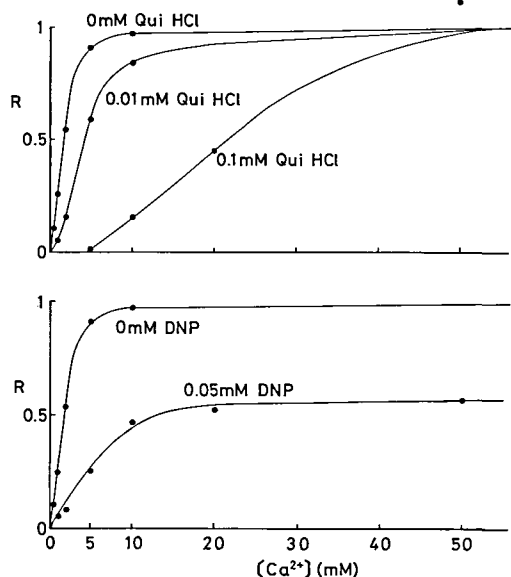


図3：キナクリンおよび2, 4-ジニトロフェノールの比較：キナクリンではCaCl<sub>2</sub>濃度を上げると最大応答が得られるが、2, 4-ジニトロフェノールではCaCl<sub>2</sub>濃度を上げて最大応答は得られない。

ン受容部位において、キナクリンとCaイオンとが競合することを示す。

図3は、キナクリン（上）と2, 4-ジニトロフェノール（下）の濃度＝応答曲線を比較したものである（2, 4-ジニトロフェノールの濃度＝応答曲線も4標本のデータから求めた）。キナクリンの場合、Ca濃度さえ十分に高くすれば最大応答が得られるが、2, 4-ジニトロフェノールの場合、Ca濃度を上げて最大応答が得られない。このことは、2, 4-ジニトロフェノールの抑制が、Caイオンとの競合によるものではないことを示す。なお、2, 4-ジニトロフェノールは解離すると陰イオンとなるので、2, 4-ジニトロフェノールは味細胞先端膜に陰イオンとして吸着して抑制効果を示すと考えられる<sup>17)</sup>。

図4は、図3のグラフを直線にするために書き直したヒル＝プロット（Hill plot）である。グラフを直線にするため、最大応答を基準刺激溶液による応答の125%とした。刺激溶液に食塩が入っていない0.5mM塩化カルシウム溶液または水道水に対する応答の大きさは、基準刺激溶液に対する応

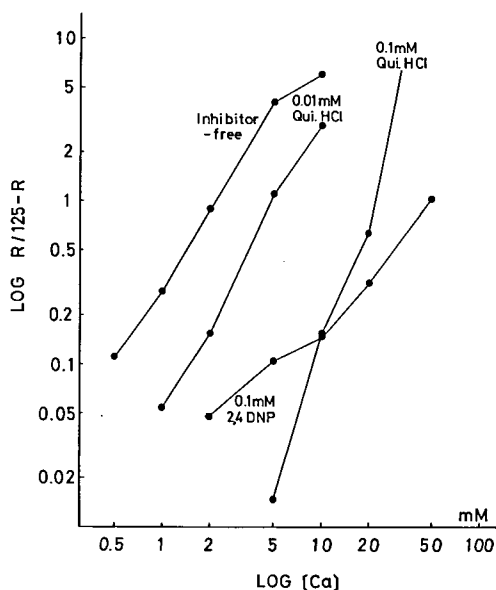


図4：Ca 応答のヒル＝プロット：キナクリンの場合、直線の勾配は2～3であるが、2, 4-ジニトロフェノールの場合、直線の勾配はおおよそ1である。

答より大きいことが分っている<sup>8,18)</sup>ので、この仮定は許容できる範囲のものと考えられる。このグラフにおける直線の勾配はおおよそ2である。このことは、カエル水受容器の受容分子が受容部位を2つもつことを示唆する<sup>22)</sup>。

## 考 察

野村ら<sup>19)</sup>は多価無機陽イオンの作用を調べ、4価のトリウム(Th)と錫(Sn)および3価の鉄(Fe)とランタン(La)が、顕著な刺激作用を示すことを見出した。しかし、これら多価陽イオンを含む溶液はかなり酸性になるが、酸性溶液中ではNa応答が亢進することが分っているため、これら刺激効果は低pHの影響によるものと考えられる<sup>12)</sup>。

これら多価陽イオンを含む溶液は、中性にすると水酸化塩となり沈殿を生じてしまうので、多価陽イオンに刺激効果あるいは抑制効果があるかどうかは確かめることが出来なかった。

キナクリンは、アクリジン塩基の一つであり、中性付近では2価の陽イオンとなる<sup>15)</sup>。キナクリ

ンは、シナプトゾーム膜などでCaイオン透過性を抑制することが示されているが、この抑制は競合抑制ではないとされている<sup>2,24)</sup>。しかし、カエル水受容器のCa応答では、対数濃度=応答曲線が右に平行移動しているの、キナクリンはCaイオンと競合して応答を抑制すると結論できる。

ところで、キナクリンの作用部位である、1価有機陽イオンである塩化コリンは食塩と異なり刺激効果がないが、その理由はコリンイオンが大きいため、イオンチャンネルを透過出来ないためと考えられている<sup>5)</sup>。従って、キナクリンもカエル味細胞には入ることなく、先端膜表層で作用すると考えられる。

緒論で述べたごとく、カエル味覚受容器のCa応答およびNa応答の受容機序については3つの説があるが、このうち、第1のCa応答およびNa応答が共に味細胞先端膜の界面電位の変化で発現するという機序は、陽イオンであるキナクリンが抑制作用をもつという本研究の結果から否定される。第1の説に従えば、陽イオンであるキナクリンは抑制作用でなく、反対に刺激作用を示さねばならないからである。そこで、第2のCa応答が受容分子の立体構造変化によるとする説<sup>18)</sup>と、第3のCa応答およびNa応答が共にイオンチャンネルを介するCaイオンおよびNaイオンの流入によるという説<sup>16,21)</sup>が有力なことになる。Avenet & Lindemann<sup>1)</sup>および Miyamoto et al.<sup>16)</sup>によると、カエル単離味細胞では電位依存性Ca電流の存在は認められないといわれている。すなわち、カルシウムイオンチャンネルの存在は今のところ否定的である。しかし、Avenet & Lindemann<sup>1)</sup>は、パッチクランプ法を用いた実験から、Ca応答の機序は細胞内カルシウムイオン濃度が上がると、Ca依存性Kチャンネルが不活性化してカリウム電流が減少して脱分極することであると述べているので、カルシウムイオンチャンネルは存在するが、電流としてはごく弱いため記録出来ないのかも知れない。現在のところ、この2つの説のどちらが正しいかはまだ結論を出すに到っていない。

## 文 献

- 1) Avenet, P. and Lindemann, B. (1987) Patch-clamp study of isolated taste receptor cells of the frog. *J. Membrane Biol.* **97**: 223—240.
- 2) Baba, A., Ohta, A. and Iwata, H. (1983) Inhibition by quinacrine of depolarization-induced acetylcholine release and calcium influx in rat brain cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* **40**: 1758—1761.
- 3) Casella, C. and Rapuzzi, G. (1957) Azione dell'acqua, del  $\text{CaCl}_2$  e del  $\text{NaCl}$  sui ricettori linguiali nella Rana. *Arch. Sci. Biol.* **41**: 191—203.
- 4) DeSimone, J. A. and Ferrell, F. (1985) Analysis of amiloride inhibition of chorda tympani taste response of rat to  $\text{NaCl}$ . *Am. J. Physiol.* **249**: R52—R61.
- 5) Hille, B. (1971) The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve. *J. Gen. Physiol.* **58**: 599—619.
- 6) Kashiwayanagi, M., Yoshii, K., Kobatake, Y. and Kurihara, K. (1981) Taste transduction mechanism similar effects of various modifications of gustatory receptors on neural responses to chemical and electrical stimulation in the frog. *J. Gen. Physiol.* **78**: 259—275.
- 7) Katchalsky, A. and Oplatka, A. (1970) Mechano-chemical conversion. In *Handbook of Sensory Physiology*, ed. by Loewenstein, W. R., 1st ed., pp.1—17. Springer-Verlag, Berlin.
- 8) Kitada, Y. (1978) Inhibitory effects of cations on the  $\text{Ca}^{2+}$  response of water fibers in the frog tongue. *Jpn. J. Physiol.* **28**: 413—422.
- 9) Kitada, Y. (1990) Taste responses to electrolytes in the frog glossopharyngeal nerve: initial process of taste reception. *Brain Res.* **535**: 305—312.
- 10) Koketsu, K. and Kimura, K. (1953) Effects of some salt-ions upon chemoreceptors in the mucous membrane of a frog's palate. *Kyushu Memories Med. Scis.* **3**: 233—241.
- 11) Konishi, J. (1966) Fresh-water fish chemoreceptors responsive to dilute solutions of electrolytes. *J. Gen. Physiol.* **49**: 1241—1264.
- 12) Kumai, T. and Nomura, H. (1980) Effects of pH on frog gustatory responses to chloride salts of alkali-metal and alkali-earth-metal. *Jpn. J. Physiol.* **30**: 345—355.
- 13) Kurihara, K. (1990) Molecular mechanisms of reception and transduction in olfaction and taste. *Jpn. J. Physiol.* **40**: 305—324.
- 14) Kurihara, K., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1978) Transduction mechanism in chemoreception. *Advances in Biophysics*, **10**: 27—95.
- 15) Massari, S. (1975) The interaction of Atebrin with phospholipid vesicles. *BBA*, **375**: 22—24.
- 16) Miyamoto, T., Okada, Y. and Sato, T. (1991)

- Voltage-gated membrane current of isolated bullfrog taste cells. *Zoological Science*, 8: 835—845.
- 17) Nomura, H. (1975) Effects of ruthenium red, quinacrine hydrochloride, ethacrynic acid and 2,4-dinitrophenol on the water receptor of the frog tongue. *Jpn. J. Physiol.* 25: 165—173.
  - 18) Nomura, H. and Ishizaki, M. (1972) Stimulation mechanism of water response in the frog: Roles of anions in the activity of a chemoreceptor. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 13: 21—52.
  - 19) 野村浩道, 尾上吉之, 根本卓光 (1968) カエル舌化学的受容器の受容機構 1 陽イオンの作用. *医学と生物学*, 76: 250—255.
  - 20) Nomura, H. and Sakada, S. (1965) On the “water response” of frog’s tongue. *Jpn. J. Physiol.* 15: 433—443.
  - 21) Okada, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. (1986) Contribution of the receptor and basolateral membranes to the resting potential of a frog taste cell. *Jpn. J. Physiol.* 36: 139—150.
  - 22) Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*. 1st ed., pp. 371—373. John Wiley & Sons, New York.
  - 23) Sugawara, M., Kashiwayanagi, M. and Kurihara, K. (1989) Mechanism of the water response in frog gustation: possible significance of surface potential. *Brain Res.* 486: 269—273.
  - 24) Pastuszko, A. and Wilson, D. V. (1985) Kainate-induced uptake of calcium by synaptosomes from rat brain. *FEBS*, 192: 61—65.
  - 25) Rang, H. P. (1971) Drug receptor and their function. *Nature*, 231: 91—96.