

〔原著〕 松本歯学 20: 58~63, 1994

key words: NEM — NQS — 化学修飾 — 水受容器 — カエル

カエル舌水受容器の化学修飾 1. NEM, TNBS および NQS の作用

野村浩道, 浅沼直和

松本歯科大学 口腔生理学教室 (主任 野村浩道 教授)

Chemical Modification of Water Receptor in the Frog 1. Effects of NEM, TNBS and NQS

HIROMICHI NOMURA and NAOKAZU ASANUMA

Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental College

(Chief : Prof. H. Nomura)

Summary

Chemical modification of protein was applied to a frog water receptor to learn whether or not sulfhydryl and amino residues are indispensable to the receptor site of Ca response.

N-ethylmaleimide (NEM), which is known to modify sulfhydryl residues of protein, was shown to inhibit Ca response irreversibly without affecting responses of tactile receptors, indicating that the receptor molecule responsible for Ca response is protein.

Trinitrobenzene sulfonate (TNBS) and β -naphthoquinone-4-sulfonate (NQS), which are known to modify amino residues of protein, did not inhibit Ca response irreversibly, indicating that amino residues are not indispensable to the receptor site of Ca response.

緒 論

カエルは、舌および口蓋粘膜に、通常の淡水に高い感受性を有する味覚受容器(水受容器)を持っており、この受容器の水に対する応答は水応答とよばれている^{2,19,27)}。ところが、この受容器は水だけでなく、さまざまな高張電解質溶液、例えば0.3 M 以上の食塩溶液やチオシアン酸ナトリウム溶液にもよく応答する(以下 Na 応答とよぶ)^{13,19)}。また、応答を抑制する0.1M 食塩溶液中に1 mM

以上のカルシウム塩を加えると応答するようになる(以下 Ca 応答とよぶ)^{13,19)}。Kumai & Nomura¹²⁾は、この水受容器の multiple sensitivity は、水受容器細胞が2種類またはそれ以上の受容部位を有するからであると考えた。すなわち、アルカリ金属とアルカリ土類金属の塩化塩に対する応答に及ぼす pH の影響を調べたところ、前者に対する応答は pH 依存性を示したが、後者に対する応答は大きな pH 依存性を示さなかったからである。

Kitada^{8,9)}は、舌をプロナーゼ E で処理したところ、Na 応答が阻害されない条件下で水応答が阻

害されることを見出し、両応答の受容部位が異なること、また Ca 応答の受容分子が蛋白質であることを示した。われわれも、前報で報告したごとく、水受容器の Ca 応答は、プロナーゼ E、ヒスチナーゼ、キモトリプシンおよびトリプトファナーゼなどによって、Na 応答が抑制されない条件下で不可逆的に抑制されることを見出し、受容分子は蛋白質であると考えている²⁸⁾。

機能性膜蛋白質のアミノ酸残基の同定に化学修飾という方法があり、多くの機能性膜蛋白質、とくにイオンチャネル蛋白質の特性を明らかにする目的で、多くの生理学的研究で用いられている（カエルおよびザリガニ神経線維膜のイオン透過性²⁵⁾；ラット味覚応答¹⁸⁾；ヒト赤血球膜のイオン透過性^{10,11)}；カエル神経線維ランビエ絞輪のイオン透過性⁷⁾；ザリガニ巨大神経線維膜 Na チャネル不活性化過程²⁴⁾；イカ巨大神経線維 Na チャネル不活性化過程膜²¹⁾；イカ巨大神経線維の内膜蛋白質⁶⁾；カエル骨格筋線維膜の電位依存性 K チャネル¹⁴⁾；電気ウナギ Na チャネルの透過性^{3,4)}；脳下垂体前葉細胞 K チャネル不活性化過程¹⁵⁾；ウサギ心室筋線維 Na チャネル⁵⁾）。そこで、本研究では、カエル水受容器の Ca 応答の受容分子が蛋白質であることをさらに確認すると共に、Ca 応答の受容蛋白質の特性を明らかにするため、Ca 応答に及ぼす化学修飾試薬の阻害効果を調べることとした。

蛋白質はいくつかの種類の遊離アミノ酸残基を有しており、化学修飾試薬もそれぞれのアミノ酸残基に対応して選ばれている。しかし、ある特定のアミノ酸残基のみに特異的に作用する化学修飾試薬は少なく、通常いくつかの種類のアミノ酸残基をかなり非特異的に修飾する場合が多い。また、生理学的な温和な条件、すなわち室温ないし体温程度の温度、中性附近の pH および細胞内外液程度のイオン強度とイオン組成といった条件下で作用する化学修飾試薬は少なく、アミノ酸残基の種類を特定することは容易ではない。今回は先ず、もっとも使用しやすい SH 基の修飾試薬である N-エチルmaleimide (NEM) およびアミノ基の化学修飾試薬である 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) と β -ナフトキノン-4-スルホン酸 (NQS) の作用を調べることにした。

材料と方法

実験に使用した動物は、ニホンアカガエル (*Rana japonica*) とトノサマガエル (*Rana nigromaculata*) である。実験方法は前報²⁸⁾と同様で、1—2 mm の神経を付けて単一の茸状乳頭を摘出し、2枚のガラス板のうち細長いガラス板に茸状乳頭を載せ、ここに刺激溶液を流し、神経をもう1枚のガラス板に橋渡しして air gap 法によって求心性インパルスを導出した。この実験方法は、極めて少量の溶液で実験出来るため、高価な試薬を使用する研究には甚だ適している。

求心性インパルスは、高入力抵抗増幅器を介して陰極線オシロスコープに導き、磁気テープに記録した。Ca 応答を発現させる味刺激溶液には、5 mM CaCl_2 を 0.1 M NaCl に加えた溶液を使用し、Na 応答を発現させる味刺激溶液には、0.5 M NaCl または 0.3 M NaSCN を使用した。これら味刺激溶液およびリンガー液は、先端 150—200 μm のガラス管を注射針に取り付けた 2 ml 注射筒から流した。刺激と刺激の間隔は 3 分間とし、その間はリンガー溶液で順応した。

化学修飾試薬は半井化学薬品 KK より購入した特級試薬である。いずれも味刺激溶液に加えて使用した。これら試薬を味刺激溶液に加えたとき、 β -ナフトキノン-4-スルホン酸 (NQS) は 20

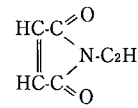
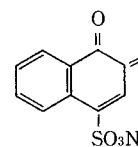
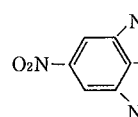
NEM	N-Ethylmaleimide 
NQS	β -Naphthoquinone-4-sulfonic acid 
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid 

図 1 : NEM, NQS および TNBS の化学構造

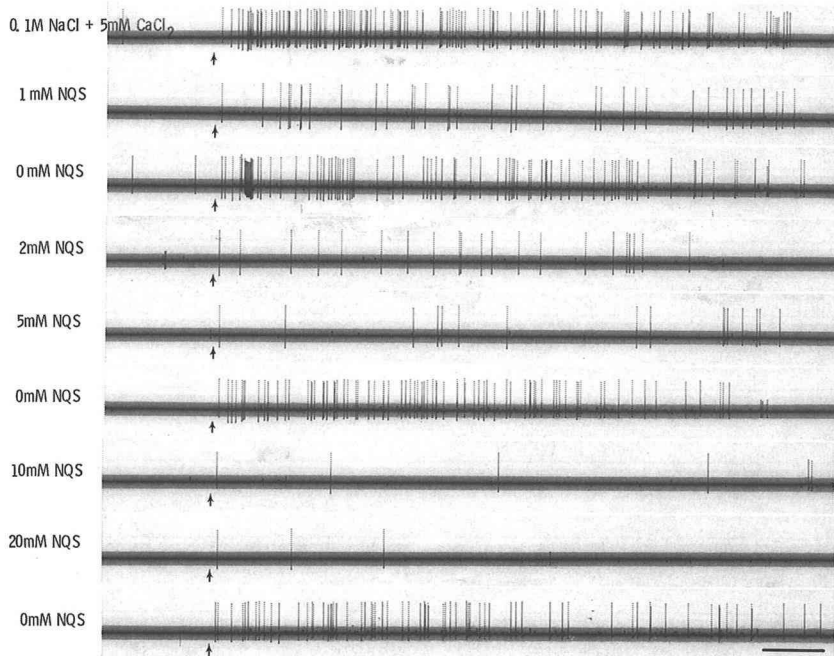


図2：Ca 応答に対する NQS の作用：

上向きの矢印は刺激時点，右下の横棒は1秒間を示す。

mM で pH3.7, 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) は20 mM で pH5.5, NEM は20 mM で pH4.2になったので，実験前に NaOH を加えて中性にしてから使用した。使用した化学修飾試薬の構造式を図1に示す。

実験温度は室温 (25~27℃) とした。

結 果

1. アミノ基の化学修飾

化学修飾試薬は，目的のアミノ酸残基とは通常共有結合するため，化学修飾が行われた場合不可逆的な変性起る筈であるが， β -ナフトキノソン-4-スルホン酸 (NQS) および 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) は，20 mM まで調べたが，顕著な不可逆的な変性は生じなかった。

図2は，単一茸状乳頭標本における水受容器の Ca 応答に及ぼす NQS の抑制効果を示す。味刺激溶液 (5 mM CaCl_2 を 0.1 M NaCl に加えた溶液) に 1~20 mM NQS を加えると応答は抑制され小さくなる。しかし，この抑制は NQS を洗い去ると直ちに消失し，応答は回復する。従って，NQS や

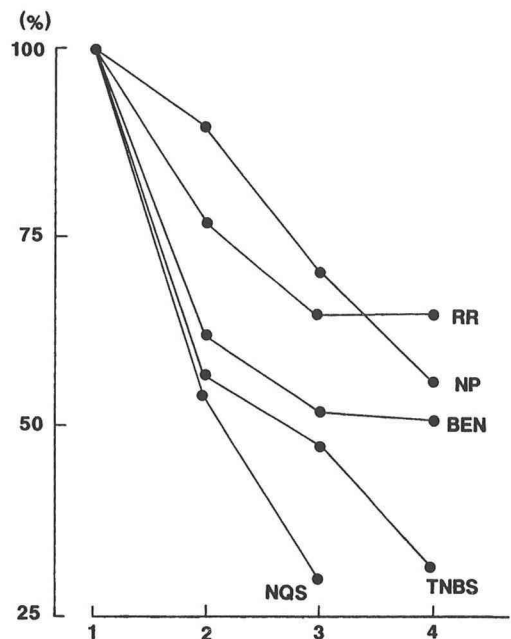


図3：反復刺激による感受性の低下：

RR：ルテニウムレッド，NP：ニトロフェノール，
BEZ：安息香酸，TNBS：2, 4, 6-トリ
ニトロベンゼンスルホン酸，

NQS： β -ナフトキノソン-4-スルホン酸

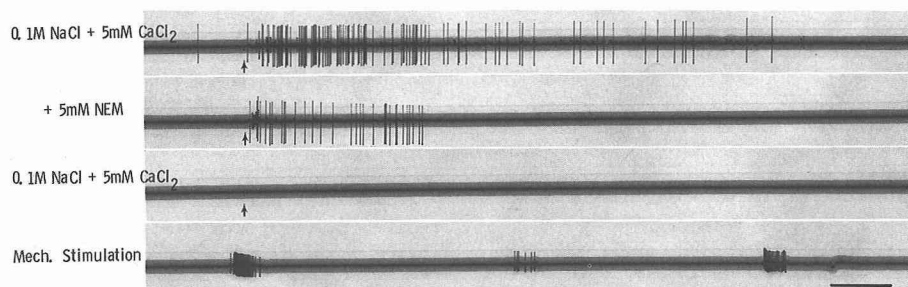


図4：Ca 応答に対する NEM の作用：

上向きの矢印は刺激時点，右下に横棒は1秒間を示す。

TNBS は化学修飾試薬としては作用しないようにみえる。

ところが、NQS や TNBS が入らない味刺激溶液に対する応答も、味刺激を繰り返して与えると徐々に減衰していくが、NQS や TNBS が入っていると、応答の減少速度が NQS や TNBS が入らないときよりも大きいようにみえた。そこで、阻害効果が少ないルテニウムレッド、ニトロフェノール、安息香酸の場合と比べたところ、NQS や TNBS が入っていると、応答の減少速度はかなり大きいことが分った。図3は、そのことを示すグラフである。ルテニウムレッド ($n=3$)、ニトロフェノール ($n=10$) および安息香酸 ($n=7$) では4回目でも50%以上の応答が出現しているが、TNBS ($n=6$) では30%以下、NQS ($n=6$) では3回目ですでに30%以下になっている。以上の結果は、カエル水受容器の受容分子にはアミノ基が活性中心には存在しないか、主要な官能基ではないけれども、アミノ基が化学修飾されると僅かではあるが感受性が落ちることを示す。

2. SH 基の化学修飾

SH 基の化学修飾試薬としては、N-エチルマレイミド (NEM) を使用した。

図4は、NEM の典型的な実験結果を示す。まず、味刺激溶液を単一茸状乳頭標本に与えると、持続性の応答が発現する(図1, 1段目)。味刺激溶液に5 mM NEM を加えた溶液を与えると、2～3秒間味刺激溶液に対する応答が現れるが、やがて応答が止まる(図1, 2段目)。通常、化学修飾試薬を含む溶液は15秒間流したが、NEM の抑制は不可逆的であり、その後再び味刺激溶液を与えても応答は発現しなかった(図1, 3段目)。一方、針の先端で茸状乳頭の頂を圧迫したときの機

械的受容器の応答はまったく阻害されなかった(図1, 4段目)。以上の結果は、カエル舌水受容器のCa イオン受容部位にSH 基が不可欠であることを示す。

同様な実験結果は、他の4例の標本で得られた。

考 察

Kitada^{8,9)}は、0.05—0.1%プロナーゼEをカエル舌表面に15—20分与えたとき、1%CaCl₂溶液に対する応答が阻害されたが、0.5M NaCl (pH4.5) に対する応答が阻害されなかったことから、少なくとも前者の応答に関与する受容部位 (Ca site) は蛋白分子である結論した。本研究において NEM がプロナーゼEと同様な阻害効果を示したことは、Kitada の結論を支持する。

機能膜蛋白に対してSH 基の化学修飾を行った例としては、カエルおよびザリガニ神経線維膜イオン透過性^{7,25)}、筋小胞体Ca-ATPアーゼ²⁶⁾、ヒト赤血球膜イオン透過性^{10,11,22)}、ラット味覚応答¹⁸⁾、カエル骨格筋線維膜電位依存性Kチャンネル¹⁴⁾などが知られており、アミノ基の化学修飾を行った例としては、ヒト赤血球膜イオン透過性^{10,22)}が知られている。これらの例ではいずれも化学修飾試薬としての効果があったと報告されているが、本研究ではSH 基の化学修飾のみで、アミノ基の化学修飾試薬のNQS や TNBS に化学修飾試薬としての効果ははっきりとは認められなかった。このことは、カエル水受容器の受容膜蛋白の活性中心、すなわち受容部位にはNQS や TNBS で阻害される官能基は存在しないか、存在してもあまり重要でないことを示す。なお、TNBS や NQS の可逆的抑制は、化学修飾によるものでなく、安息香酸イオンの場合と同じく、有機陰イオンとして

の作用によるものと思われる。

イカの巨大神経線維で、電位依存性 Na イオンチャンネルは外部から与えた蛋白分解酵素によって阻害されないが、内部から与えた蛋白分解酵素によって阻害されることが知られている^{1,17)}。Narahashi (1974)¹⁷⁾は、電位依存性 Na イオンチャンネルが外部から与えた蛋白分解酵素で阻害されないのは、大型の分子である蛋白分解酵素が、神経軸索の周りにあるシュワン細胞によって拡散が障害され、神経軸索に近づけないためではないかと考えている。もしこの考えが正しいとすると、カエル水受容器の受容部位は露出しているため、プロナーゼ E や NEM の作用を受けやすいと考えられる。しかし、イカの巨大神経線維の電位依存性 Na イオンチャンネルは、内部から与えた N-ブロモサクシンイミド (NBS) などの化学修飾試薬によって蛋白分解酵素の場合と同様に阻害されるが、外部から与えると阻害されないことが知られている²¹⁾。N-ブロモサクシンイミド (NBS) などの化学修飾試薬は分子は大して大きくないので、NBS は神経軸索の周りにあるシュワン細胞の拡散障害によって、外液からでは作用しないという説明は、テトロドトキシン (TTX) が外液から作用する事実からみて、説得力がないように思える。電位依存性 Na イオンチャンネルの活性化過程と不活性化過程とは、異なる性質の活性中心を有し、前者には NBS やプロナーゼ E で失活する官能基は無く、一方、後者は NBS やプロナーゼ E で失活する官能基を持つと考えべきである。従って、カエル水受容器に対する NEM の作用も、カエル水受容器の受容部位に NEM などで特異的に化学修飾される官能基が有ると考えるべきである。

Na 応答は、受容細胞膜の非選択性陽イオンチャンネルを介する Na イオンの流入によって¹⁶⁾、水応答は Cl イオンの流出によって説明されている²⁰⁾。しかし、Ca 応答は、100 mM NaCl 中で、Na イオンの流入も Cl イオンの流出も生じない条件下で起る応答なので、これら 2 つの説では Ca 応答の発現機序は説明出来ない。そこで、われわれは、Ca 応答は以下の機序で発現するのではないかと考えている。

イオンチャンネルの不活性化は電位依存性 K イオンチャンネルにも存在する¹⁵⁾ので、カエル水受容細

胞における Ca 応答に対するプロナーゼ E や NEM の作用機序は、K イオンチャンネル不活性化過程の阻害によるとして説明出来るように思える。すなわち、Ca 応答は、Roper (1989)²³⁾一派がサンショウウオの酸および苦味受容機序について提唱しているように、細胞内セカンドメッセンジャー（あるいは非選択性陽イオンチャンネルを通して流入した Ca イオン）による K イオンチャンネルの不活性化によって起ると考えるのである。この考えに従うと、NEM やプロナーゼ E の不可逆的抑制は、K イオンチャンネルの不活性化過程を不可逆的に阻害することによって脱分極を起こらないようにすることになる。

われわれは、上述の Na 応答が非選択性陽イオンチャンネルを介する Na イオンの流入によって発現するとの説には同意出来る。しかし、水応答が Cl イオンの流出によって発現するとの説については、カエル水受容細胞に Cl イオンを蓄える機能を持つことが証明されておらない現時点では同意出来ない。われわれは、水応答の発現機序も Ca 応答の発現機序と同様、K チャンネルの不活性化によるのではないかと考えている。この問題の解決は、今後の研究に待ちたい。

文 献

- 1) Armstrong, C. M., Bezenilla, F. and Rojas, E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axon perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* **62**: 375-391.
- 2) Casella, C. and Rapuzzi, G. (1957) Azione dell'acqua, del CaCl_2 e del NaCl sui ricettori linguiali nella Rana. *Arch. Sci. Biol.* **41**: 191-203.
- 3) Cooper, E. C., Tomiko, S. A. and Agnew, W. S. (1987) Reconstituted voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus*: Chemical modifications that alter regulation of ion permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 6282-6286.
- 4) Cooper, E. C. and Agnew, W. (1989) Reconstituted voltage-sensitive sodium channels from eel electroplax: Activation of permeability by quaternary liocaine, N-bromoacetamide, and N-bromosuccinimide. *J. Membrane Biol.* **111**: 253-264.
- 5) Dudley, S. C. and Baumgarten, C. M. (1993) Modification of cardiac sodium channels by carboxyl reagents. *J. Gen. Physiol.* **101**: 651

- 671.
- 6) Inoue, I., Pant, H. C., Tasaki, I. and Gainer, H. (1976) Release of proteins from the inner surface of squid axon membrane labeled with tritiated N-ethylmaleimide. *J. Gen. Physiol.* **68**: 385—395.
 - 7) Keana, J. F. W. and Stampfli, R. (1974) Effect of several “specific” chemical reagents on the Na^+ , K^+ and leakage currents in voltage-clamped single nodes of Ranvier. *B. B. A.* **373**: 18—33.
 - 8) Kitada, Y. (1984) Two different receptor sites for Ca^{2+} and Na^+ in frog taste responses. *Neurosci. Res.* **47**: 63—68.
 - 9) Kitada, Y. (1986) Different receptor sites for Ca^{2+} and Na^+ in single water fibers of the frog glossopharyngeal nerve. *Brain Res.* **377**: 211—215.
 - 10) Knauf, P. A. and Rothstein, A. (1971a) Chemical modification of membranes. I. Effects of sulfhydryl and amino reactive reagents on anion and cation permeability of the human red blood cell. *J. Gen. Physiol.* **58**: 190—210.
 - 11) Knauf, P. A. and Rothstein, A. (1971b) Chemical modification of membranes. II. Permeation paths for sulfhydryl agents. *J. Gen. Physiol.* **58**: 211—223.
 - 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) Kusano, K. and Sato, M. (1957) Properties of fungiform papillae in frog’s tongue. *Jpn. J. Physiol.* **7**: 324—338.
 - 14) Lynch III, C. (1985) Biochemical separation of delayed rectifier currents in frog short skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **368**: 379—392.
 - 15) Matteson, D. R. and Carmeliet, P. (1988) Modification of K channel inactivation by papain and N-bromoacetamide. *Biophys. J.* **53**: 641—645.
 - 16) 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.
 - 17) Narahashi, T. (1974) Pronase. *Methods Enzymol.* **5**: 19—43.
 - 18) Noma, A. and Hiji, Y. (1970) Depression of sucrose response in the rat Chorda tympani nerve by sulfhydryl reagents. *Kumamoto Med. J.* **23**: 114—116.
 - 19) Nomura, H. and Sakada, S. (1965) On the “water response” of frog’s tongue. *Jpn. J. Physiol.* **15**: 433—443.
 - 20) Okada, Y., Miyamoto, T. and Sato, T. (1993) The ionic basis of the receptor potential of frog taste cells induced by water stimuli. *J. Exp. Biol.* **174**: 1—17.
 - 21) Oxford, G. S., Wu, G. H. and Narahashi, T. (1978) Removal of sodium channel inactivation in squid giant axons by N-bromoacetamide. *J. Gen. Physiol.* **71**: 227—247.
 - 22) Rigard, J. L., Gary-Bobo, C. M. and Taupin, C. (1974) Effect of chemical modifiers of passive permeability on the conformation of spin-labelled erythrocyte membranes. *BBA*, **373**: 211—223.
 - 23) Roper, S. D. (1989) The cell biology of vertebrate taste receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* **12**: 329—353.
 - 24) Shrager, P. (1975) Specific chemical groups involved in the control of ionic conductance in nerve. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **264**: 293—303.
 - 25) Smith, H. M. (1958) Effects of sulfhydryl blockade on axonal function. *J. Comp. Cell Physiol.* **51**: 161—171.
 - 26) Yamamoto, T. and Tonomura, Y. (1976) Chemical modification of the Ca^{2+} dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. II. Use of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonate to show functional movements of the ATPase molecule. *J. Biochem.* **79**: 693—707.
 - 27) Zotterman, Y. (1949) The response of the frog’s taste fibers to the application of pure water. *Acta. Physiol. Scand.* **18**: 181—189.
 - 28) 野村浩道, 浅沼直和 (1993) カエル舌水受容器に対するトリプトファンゼおよびヒスチダーゼの作用, *松本歯学*, **19**: 152—157.