

〔原著〕 松本歯学 19: 152~157, 1993

key words: 蛋白分解酵素 — 受容蛋白 — 味覚 — 水受容器 — カエル

カエル舌水受容器に対するトリプトファナーゼ およびヒスチダーゼの作用

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)

Effects of Tryptophanase and Histidase on Water Receptor in the Frog

HIROMICHI NOMURA and NAOKAZU ASANUMA

Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental College

(Chief: Prof. H. Nomura)

Summary

N-bromosuccinimide, which is known to act on histidine and tryptophan residues of polypeptides and proteins, has been shown to inhibit Ca response specifically without inhibiting Na response in the water receptor of the frog. In order to ascertain the involvement of histidine and tryptophan residues in the receptor site responsible for Ca response, effects of histidase, tryptophanase and α -chymotrypsin on Ca and Na responses were examined. Histidase, tryptophanase and α -chymotrypsin inhibited Ca response without inhibiting Na response, while tyrosinase had no effect on either Ca nor Na response. These results suggest that the receptor site for Ca response involves histidine and/or tryptophan residues.

結 論

カエルは、通常水受容器とよばれている味覚受容器を有している^{4,17,21)}。この味覚受容器の適刺激は、この受容器が純水より水道水によりよく応答することから、池や川の通常の淡水と考えられている¹⁷⁾。また、この味覚受容器を刺激すると、咬筋、下顎下筋および頤下筋に緊張性収縮が生じることから、この味覚受容器はカエルが水中に潜ったとき、鼻孔および口から水が入るのを反射的に防ぐ

働きをする感覚器と考えられている^{15,16)}。

この水受容器は、水以外のさまざまな電解質溶液、例えば高濃度の食塩溶液や塩化カリウム溶液にもよく応答することが知られている^{12,17)}。Kumai & Nomura¹⁰⁾は、この multiple sensitivity に関して、それぞれの水受容器細胞が2つまたはそれ以上の種類の受容部位を有する可能性を示唆した。すなわち、彼らが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、高張食塩溶液に対する応答は pH 依存性を示したが、低張塩化カルシウム溶液に対する応答は顕著な pH 依存性を示さなかつ

た。0.1–1M NaCl に対する応答の大きさは、刺激溶液の pH を 4.5 から 6.5 に上げるにつれて次第に減少して pH 6.5 以上では応答が生じなくなるが、1mM CaCl_2 に対する応答は、pH 4.5 から pH 9.0 まで大きな変化が見られなかったというのである。(以後、前者を Na 応答、後者を Ca 応答と呼ぶ。)

味覚受容のうち、糖やアミノ酸の受容の第一段階は、味細胞受容膜に存在する特殊な受容蛋白と糖やアミノ酸分子との反応であると考えられている。一方、塩、酸および苦味物質の受容については、イオンチャンネルが受容蛋白として働いていることが示唆されている^{5,18,19)}。しかし、受容蛋白の存在を否定する研究もあり¹¹⁾、結論が出るには至っていない。そこで、カエル水受容器においても受容蛋白が存在しているのかどうか問題となる。

Asanuma & Nomura²⁾はこの問題を解決するため、カエル水受容器に対する蛋白分解酵素、リン脂質分解酵素およびノイラミナーゼの作用を調べ、その何れかが阻害作用を示すことを期待して実験を行なったが、不可逆的あるいは 10–20 分程度持続する可逆的抑制が、ほとんどすべての酵素で見られたため結論を得ることが出来なかった。ところが、最近 Kitada^{8,9)}は、プロナーゼ E を用いて同様な実験を行ったところ、Na 応答の阻害なしに、Ca 応答のみが阻害されることを見出した。しかし、プロナーゼ E は、いろいろの酵素の混合であり、非特異的にペプチドのいろいろなアミノ酸残基に作用することが分っているので、哺乳動物で同様な実験を行った Hiji¹⁰⁾は、特異的なアミノ酸残基に作用する蛋白分解酵素だけでは阻害が起らないのではないかとの見解を提出している。ただし、Hiji¹⁰⁾の見解は、多くの蛋白分解酵素の作用を詳細に調べた上での見解ではないので、まだ一般に認められるには至っていない。

前研究²³⁾において、ヒスチジンおよびトリプトファン残基を化学修飾する N–ブロモサクシンイミドが、Na 応答の阻害なしに Ca 応答のみを阻害することが見出されている。そこで、ヒスチジンおよびトリプトファン残基に作用するヒスチダーゼ、トリプトファナーゼおよびキモトリプシンと、比較のためチロシナーゼの阻害効果を調べることとした。これら蛋白分解酵素のうち、ヒスチダー

ゼはとくに特異性が高いと言われており、カエル水受容器には受容蛋白があって、その活性中心がイミダゾル基であることが証明できるかも知れないと考えたからである。

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*) である。実験方法は前報^{10,14)}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、3 枚のガラス板のうち細長い中央の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 air gap 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、必要に応じて再生して写真に撮影した。

味刺激溶液には、5 mM CaCl_2 を 0.1M NaCl に加えた溶液、0.5M NaCl 溶液および 0.3M Na SCN 溶液を使用した。前者はカエル水受容器の Ca 応答の刺激溶液、後の 2 者は Na 応答の刺激溶液として用いた。刺激と刺激の間はリンガー溶液で順応した。

本研究で使用した蛋白分解酵素は、トリプトファナーゼ (EC 4.1.99.1)、ヒスチダーゼ (EC 4.3.1.3)、チロシナーゼ (1.14.18.1)、プロナーゼ E および α -キモトリプシン (3.4.21.1) で、すべてシグマ化学社から購入したものである。これら酵素はリンガー溶液に溶解し、トリプトファナーゼは 5%、ヒスチダーゼ、チロシナーゼおよびプロナーゼ E は 0.5%、 α -キモトリプシンは 2% 溶液として使用した。

結 果

1. プロナーゼ E

0.5% プロナーゼ E を加えた Ca 溶液をを単一茸状乳頭標本に与えると、4 例中 2 例で、Na 応答の抑制なしで Ca 応答の抑制がみられた。残りの 2 例では両応答共抑制された。

図 1 に、プロナーゼ E の代表例を示す。まず、Ca 応答を発現させる刺激溶液 (5 mM CaCl_2 を 0.1M NaCl に加えた溶液、以後 Ca 溶液とよぶ) 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)。0.5% プロナーゼ E を加えた Ca 溶液を与えると、プロナーゼ E 自体にはと

くに刺激作用も抑制作用もないようにみえる(図1-2)が、3分間ほどそのままにしておくと、Ca 応答はほとんど発現しなくなる(図1-3および5)。(僅かに発現している発火が、プロナーゼEが十分作用していなかったためか、あるいは自発活動によるものかは不明である。)0.5M NaCl 溶液に対する応答はあまり顕著でないが、0.3M NaSCN 溶液に対しては顕著な応答が発現している(図1-4, 6)。

2. トリプトファナーゼ

5%トリプトファナーゼを加えたCa 溶液を与えると、8例中3例で、Na 応答の抑制なしでCa

応答の抑制がみられた。残りの5例中3例では、両応答共抑制され、2例では両応答共抑制されなかった。

図2に、Na 応答の抑制なしでCa 応答の抑制がみられたトリプトファナーゼの代表例を示す。プロナーゼ-E溶液の場合と異なり、数発のインパルスが最初に出現した後、発火は完全に起らなくなっている(図2-2)。(約1秒後に出現している小さなインパルス状のものはアーチファクトである。)3分間ほどそのままにしておくと、Ca 応答はまったく発現しなくなる(図2-3)。しかし、0.5M NaCl 溶液に対する応答は顕著に発現して

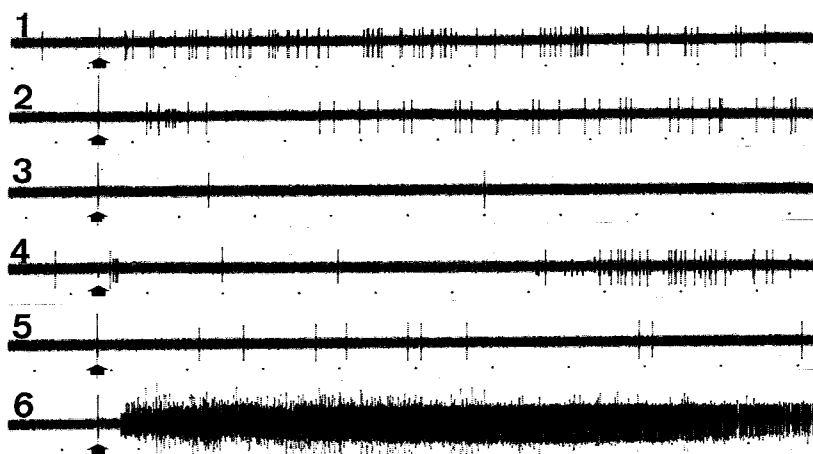


図1：カエル水受容器のCa 応答に及ぼすプロナーゼEの抑制作用：記録は、同一の単一茸状乳頭標本から導出した求心性神経インパルスを示す。1, 3, 5はCa 溶液, 4は0.5M 食塩溶液, 6は0.3M NaSCN 溶液, 2は、0.5%プロナーゼEを加えたCa 溶液による応答を示す。上向きの矢印は溶液を掛けた時点を示す。

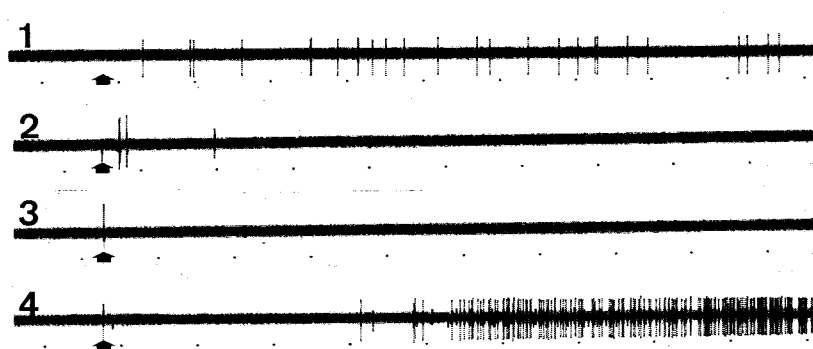


図2：カエル水受容器のCa 応答に及ぼすトリプトファナーゼの抑制作用：1, 3は、Ca 溶液, 4は0.5M 食塩溶液, 2は、5%トリプトファナーゼを加えたCa 溶液による応答を示す。

いる(図2-4)。(刺激時に発現している発火は、インパルスの形が水受容器からのものと異なるので、機械的受容器の興奮によるものと思われる。)

3. α -キモトリプシン

2% α -キモトリプシンを加えたCa溶液を与えると、7例中3例で、Na応答の抑制なしでCa応答の抑制がみられた。残りの4例中1例では、両応答共抑制され、3例では両応答共抑制されなかった。

図3に、Na応答の抑制なしでCa応答の抑制がみられた α -キモトリプシンの代表例を示す。2%キモトリプシンを加えたCa溶液を与えると、プロナーゼ-Eやトリプトファナーゼの場合と異なり、即効性があるらしく、発火は最初から起らない(図3-2)。しかし、0.3M NaSCN溶液に対する応答は顕著に発現している(図3

-4)。この例では、再度Ca溶液に対する応答を調べているが、応答は発現していない(図3-5)。

4. ヒスタダーゼ

0.5%ヒスタダーゼを加えたCa溶液を与えると、2例中2例で、Na応答の抑制なしでCa応答の抑制がみられた。

図4に、ヒスタダーゼの代表例を示す。0.5%ヒスタダーゼを加えたCa溶液を与えると、プロナーゼ-Eの場合とよく似て、発火は完全には消失しない(図4-2および3)。しかし、0.5M NaCl溶液に対する応答は顕著に発現している(図4-4)。

5. チロシナーゼ

0.5%チロシナーゼを加えたCa溶液では、2例中2例共Ca応答は消失しなかった。

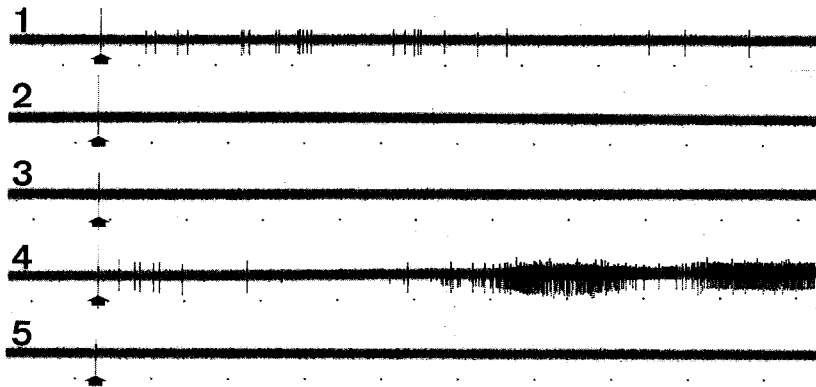


図3：カエル水受容器のCa応答に及ぼすキモトリプシンの抑制作用：1，3，5はCa溶液，4は0.3M NaSCN溶液，2は、2%キモトリプシンを加えたCa溶液による応答を示す。

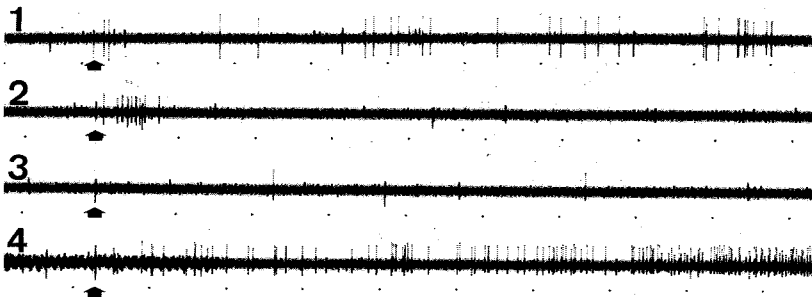


図4：カエル水受容器のCa応答に及ぼすヒスタダーゼの抑制作用：1，3はCa溶液，4は0.5M 食塩溶液，2は、0.5%ヒスタダーゼを加えたCa溶液による応答を示す。

考 察

Armstrong et al.¹⁾は、イカ巨大神経線維の内部をプロナーゼEで灌流すると、カリウムチャンネルおよび電位依存性ナトリウムチャンネルには影響なしに、ナトリウムチャンネルの不活性化過程のみを選択的に阻害することを見出した。Hiji⁶⁾は、ラットの舌表面にトリプシンやパペインを1時間以上与えても四基本味に対する応答に変化が見られなかったが、プロナーゼEを20分間与えると、塩味、酸味および苦味応答の変化なしに、甘味応答が消失することを見出している。また、Yoshii et al.²⁰⁾は、アフリカツメガエルの味覚受容器のアミノ酸に対する応答のうち、緊張性応答がプロナーゼE処理で選択的に阻害されることを示している。さらに、Kitada^{8,9)}は、0.05—0.1%プロナーゼをウシガエル舌表面に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 (pH 4.5) に対する応答が阻害されないことを見出している。以上の知見は、プロナーゼEが膜結合蛋白であるイオンチャンネルや味覚受容蛋白の一部を特異的に分解する能力があることを示す。しかし、プロナーゼEは *Streptomyces griseus* から得られるいくつかの蛋白分解酵素の混合物であり、どのアミノ酸残基を特異的に加水分解するかはよく分っていないし、また、一部の研究者は、ナトリウムチャンネルの不活性化過程を阻害する成分はプロナーゼEに含まれる不純物であって、蛋白分解酵素そのものではないとさえ考えている¹³⁾ので、プロナーゼEによる阻害の有無は、確かにイオンチャンネルや味覚受容部位に種類があることは示すものの、それ以上のことは教えてくれない。

本研究の結果は、チロシナーゼを除く、プロナーゼE、 α -キモトリプシン、ヒスチナーゼ、トリプトファナーゼのすべてが、Na 応答を阻害することなしにCa 応答を消失させることを示した。 α -キモトリプシンは、蛋白質またはペプチド中の芳香族側鎖をもつアミノ酸残基(トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン)の α -カルボキシル基側ペプチド結合を加水分解するが、ヒスチジン、ロイシンおよびメチオニンなどの大きな疎水基側鎖をもつものにも作用する²²⁾ので、 α -キモトリプシン、ヒスチナーゼおよびトリプトファ

ナーゼが加水分解する共通のアミノ酸残基としては、トリプトファンとヒスチジンが挙げられる。しかし、プロナーゼEを含め、これら蛋白分解酵素によるCa 応答の失活はあまり特異的とは言えず、Ca 応答とNa 応答の両者が共に失活した例およびCa 応答もNa 応答も共に失活しなかった例も少なからず見られた。今後は、化学修飾試薬を用いることによって活性中心のアミノ酸残基を特定したり、さらには、糖鎖酵素によって活性中心の糖鎖を同定したい。

多くの動物の酸応答および塩応答の受容部位が、それぞれKイオンチャンネルおよびアミロライド感受性Naイオンチャンネルではないかと考えられている²⁴⁾。カエルについても、アミロライドがNa 応答を抑制することが見いだされている²⁰⁾ので、カエル味細胞のNa 応答の受容部位もアミロライド感受性Naイオンチャンネルである可能性が高い。一方、Ca 応答の方は、環状AMPによって閉鎖する電位非依存性Kイオンチャンネルが関与すると言われており³⁾、受容部位はイオンチャンネルではなく、アデニル酸シクラーゼを賦活する受容蛋白にCaイオンが結合することによって水受容細胞の興奮が起ると考えられる。従って、Ca 応答とNa 応答の蛋白分解酵素に対する感受性の差異は、イオンチャンネルと受容蛋白の違いによるものかも知れない。

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) Asanuma, N. and Nomura, H. (1986) Effects of protease, phospholipase and neuraminase on the Ca²⁺-receptor of the frog tongue. *Chemical Senses*, **5**: 81—91.
- 3) Avenet, P., Hoffmann, F. and Lindemann, B. (1988) Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature*, **331**: 351—354.
- 4) Casella, C. and Rapuzzi, G. (1957) Azione dell'acqua, del CaCl₂ e del NaCl sui ricettori linguiali nella Rana. *Arch. Sci. Biol.* **41**: 191—203.
- 5) Heck, G. L., Mierson, S. and DeSimone, J. A. (1984) Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*. **223**: 403—405.

- 6) Hiji, Y. (1975) Selective elimination of taste responses to sugars by proteolytic enzymes. *Nature*, **256**: 427—429.
- 7) Kinnamon, J. C., Sherman, T. A. and Roper, S. D. (1988) Ultrastructure of mouse vallate taste buds: III. Patterns of synaptic connectivity. *J. Comp. Neurol.* **270**: 1—10.
- 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) 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.
- 11) Kurihara, K., Yoshii, K. and Kashiwayanagi, M. (1986) Transduction mechanism in chemoreception. *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**: 1—22.
- 12) Kusano, K. and Sato, M. (1957) Properties of fungiform papillae in frog's tongue. *Jpn. J. Physiol.* **7**: 324—338.
- 13) Narahashi, T. (1970) Pronase. *Methods Enzymol.* **5**: 19—43.
- 14) 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.
- 15) Nomura, H. and Kumai, T. (1981) Reflex discharge evoked by water stimulation on the frog tongue. *Brain Res.* **221**: 198—201.
- 16) Nomura, H. and Kumai, T. (1984) Jaw-closing reflex elicited by water stimulation of oral mucosa in the frog. *Jpn. J. Oral. Biol.* **26**: 259—261.
- 17) Nomura, H. and Sakada, S. (1965) On the "Water response" of frog's tongue. *Jpn. J. Physiol.* **15**: 433—443.
- 18) Schiffman, S. S., Lockhead, E. and Maes, F. W. (1983) Amiloride reduces the taste intensity of Na^{+} and Li^{+} salts and sweeteners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 6136—6140.
- 19) Simon, S. A., Labarca, P. and Robb, R. (1989) Activation by saccharides of a cation-selective pathway on canine lingual epithelium. *Am. J. Physiol.* **256**: R394—402.
- 20) Yoshii, K., Kiyomoto, Y. and Kurihara, K. (1986) Taste receptor mechanism of salts in frog and rat. *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**: 501—505.
- 21) Zotterman, Y. (1949) The response of the frog's taste fibers to the application of pure water. *Acta. Physiol. Scand.* **18**: 181—189.
- 22) 飛田 亨, 安藤鋭郎 (1973) キモトリブシンの構造と機能, 蛋白分解酵素と生体制御 (村地 孝, 浅田敏雄, 藤井節郎編) 205—235. 東京大学出版会, 東京.
- 23) 野村浩道 (1971) カエル水受容器に対する化学修飾剤の作用. *歯基礎誌*, **13**: 57.
- 24) 野村浩道 (1992) 味蕾における情報交換機序. *松本歯学*, **18**: 237—243.