

## グルタミン酸味覚受容体の性質

富田祐介 古山 昭 宗形芳英

大須賀謙二 丸井隆之

### Properties of Glutamate Taste Receptors on Fish

Yusuke TOMITA, Akira FURUYAMA, Yoshiei MUNAKATA

Kenji OHSUGA and Takayuki MARUI

Gustatory systems of the carp, *Cyprinus carpio* L., are most sensitive to amino acids, and the threshold for L-Glu-Na (L-MSG) is down to 10 nM being lower than that of neurotransmitter in the brain. In mammals, there are a couple of reports concerning the existence of two receptor types for L-MSG, i.e. metabotropic and ionotropic glutamate receptors (mGluRs and iGluRs). It has been tentatively revealed by us with molecular biological techniques that gustatory receptors on carp haven't iGluRs. Neural taste recordings were attempted in the species by applying several ligands for the GluRs of the brain. The gustatory system of the carp were not responsive to D-Ser but antagonists (NBQX and D-AP V), and didn't show the enhancement of taste responses for L-MSG by Gly.

In conclusion, there might be completely different type of gustatory iGluRs from those in the brain, or there is no iGluR in the taste system.

Key words : glutamate receptors, taste, antagonists, electrophysiology, fish

### 緒 言

グルタミン酸 (L-Glu) は、広く生体内に分布し、細胞のエネルギー代謝、アミノ酸代謝、タンパク質合成などに重要な生理的意義をもっている<sup>1)</sup>。中枢神経においては、L-Gluはアンモニア固定やγ-アミノ酪酸の前駆物質として機能を果たし、脳における記憶や学習に関わる最も主要な興奮性神経伝達物質である。さらに、伝達機能不全を起こす内因性興奮毒として神経細胞死を誘発する<sup>1-4)</sup>ことも知られている。こうした中枢神経系におけるL-Gluの特殊な機能は、Glu受容体

(GluRs, glutamate receptors) を介して出現する。このGluRsには、いくつかのサブタイプが存在し<sup>3,4)</sup>、大きく分けて、1) イオンチャネルと共役している「イオンチャネル型受容体 (iGluRs, ionotropic glutamate receptors)」と、2) Gタンパク質と共役した「代謝型受容体 (mGluRs, metabotropic glutamate receptors)」の2つに分けられる。iGluRsはイオンチャネルを直接開閉して細胞の電位変化により生理機能を発揮するかなり速い情報伝達システムとして、mGluRsは細胞内情報伝達系を介して代謝調節により生理機能を発揮する比較的ゆっくりとした情報伝達制御シ

受付：平成20年9月25日，受理：平成20年10月21日  
奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座  
(指導：丸井隆之教授)

Department of Oral Function and Molecular Biology,  
Ohu University School of Dentistry  
(Director : Prof. Takayuki MARUI)

ステムとして、それぞれの機能を果たしている。iGluRsには、L-Gluの選択的な構造類似物質NMDA (N-methyl-D-aspartate) の親和性に基づいて、NMDAと非NMDA受容体がある (Table 1)。さらにNMDA受容体には、GluサイトとGlyサイトがあり、神経伝達において増強作用などの役割を果たしている<sup>3)</sup>。また非NMDA受容体は、同じくL-Gluの選択的な構造類似物質であるAMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-methylisoxazole-4-propionic acid) 受容体とKA (kainic acid, カイニン酸) 受容体に分類されている<sup>3)</sup> (Table 1)。

主に中枢神経系で神経伝達物質として働くこの化学物質L-Gluは、ヒトでは旨味の成分としてよく知られ<sup>1)</sup>、多くの動物において、L-Gluに対して味覚感受性をもつことが判明してきている<sup>5-10)</sup>。しかしながらL-Gluにたいする味覚受容体については、脳のシナプスの受容体のように研究が進んでおらず、味細胞に存在するGluRsが中枢神経系に存在する受容体と類似したものか、あるいは全く別の種の受容体であるのか不明である。これまでの研究では、iGluRとmGluRともに味覚受容体として存在するという報告がある<sup>11)</sup>一方で、mGluRしか存在しないという報告もあり<sup>12,13)</sup>、どのような性質をもつGluRsが関与しているのか未だはっきりとはしていない。そこで本研究では、アミノ酸に対する味覚感受性が極めて高い魚類の中で、L-MSG (monosodium L-glutamate) に対して比較的感受性が高いことと、他のアミノ酸とは受容サイトが独立しているということが報告されているコイ<sup>14-16)</sup>を実験材料として、GluRsのうちで、iGluRsの特異的なアゴニストとアンタゴニスト<sup>2)</sup>を味刺激としてそれらに対する味覚神経応答を解析することによって、グルタミン酸味覚受容体が脳型のiGluRsと相同のものであるかどうかを検討し、その性質を明らかにすることを試みた。

## 材料と方法

### (1) 実験材料

実験動物としてコイ (*Cyprinus carpio*, L.) は、購入後2週間以上実験室で飼育 (水温22.0±1.0°C) し、1日に1~2回飼料を与え、環境に

十分適応した体重50~120gの26尾の成魚 (体長18.0±1.3cm, n=26) を電気生理学実験に供した。実験に際しては、コイはMS-222 (Ethyl 3-aminobenzoate methansulfonate, Sigma grade) を溶解した水 (1:8,000希釈) に浸して麻酔後、プラスチックコンテナに固定し、常時口から鰓へ水道水を灌流して実験中の動物の生存をはかった。また体表が乾燥しないようにキムワイプで覆い、鰓からの灌流水により体表面を湿らせるようにした。

味応答の記録は、丸井ら<sup>14)</sup>の方法と同様に行った。すなわち双眼実体顕微鏡下で眼球を摘出し、眼窩底を走行する三叉-顔面複合神経を露出し、神経を引っ張ることのないように注意深く周囲結合組織より剥離して中枢端を切断し、同神経の上顎枝または下顎枝の全神経枝束、あるいは分離した細神経線維束として記録神経とした。神経の分離には、電極プラー (成茂器械, PB-7) で引いたガラス微小管を使用した。分離した神経束は銀-塩化銀単極電極に乗せ、乾燥を防ぐためにミネラルオイルで眼窩を覆い味応答を記録した。実験中、コイは筋弛緩剤のGallamine triethiodide (0.3  $\mu$ g/g体重, 帝国化学産業) を適宜筋注して不動化をはかった。

### (2) 電気生理学実験

神経応答は高感度前置増幅器 (AVB-11A, 日本光電) を介してメモリオシロスコープ (VC-11, 日本光電) で観察し、適宜必要なデータはデジタル信号としてPowerLab/8s (AD Instrument Pty Ltd.) を介してコンピュータに記録し、後日の処理に備えた。データはoff-lineで積分応答としてChart 5ソフトウェア (AD Instrument Pty Ltd.) で解析した。味応答解析の指標として、積分応答の基線からピークまでの高さを計測し、1 mMのL-アラニンに対する応答値を1として換算した相対的応答値を用いた。

味受容野には、22°Cの人工池水 (APW, artificial pond water; 0.3 NaCl, 0.02 KCl, 0.2CaCl<sub>2</sub>, and 0.1 NaHCO<sub>3</sub> in mM, pH 7.0) が先細のガラス管から常時8 ml/minの流速で味受容野に流れるよう調節しておき、その途中にある刺激ポートから22°Cの0.5mlの味溶液を電磁バルブ (Dura Clean

Table 1 Specific ligands for iGluRs in the brain, which were used in this experiment.

Abbreviations : D-APV, D-2-amino-5-phosphonovaleric acid ; NMDA, N-methyl-D-Aspartate ; AMPA, DL- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-methylisoxazole-4-propionic acid ; KA, Kainate ; NBQX, 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide.

Table 1

<i>iGluRs</i>	<i>Non-NMDA receptors</i>		<i>NMDA receptors</i>	
	<i>AMPA</i>	<i>KA</i>	<i>Glu site</i>	<i>Gly site</i>
Selective agonists	/		NMDA	Glycine D-Ser
Non-selective agonists	Glutamate AMPA Kainate		Glutamate	/
Selective antagonists	NBQX (1 $\mu$ M)		D-APV	/

Valve, MCT-3T, 高砂電気) で切り変えて混入することにより、味神経に誘起されるインパルス活動を記録した。この方法では、刺激液の濃度は、受容野に至る際に殆ど変わらないことが判明している<sup>14)</sup>。先に流した味溶液の影響が次の刺激に対する応答に出ないように、すべて2~5分間以上の間隔を空けて刺激を与えた。味応答の記録にあたっては、ヒゲや口唇に先の細いブラシカガラス棒で触刺激を与え誘発される神経インパルスによる電位変化をサウンドモニター (SRS-58, SONY) で聴きながら記録神経が支配している受容野の確認を行い、味覚の受容野は、先細のブラシまたはガラス棒で触応答を示す領域と一致するので、その部位に味刺激を与えて味神経応答を記録した。実験精度と効率を上げるため、電磁バルブ操作はコンピュータ制御によるリモート・コントロールにより行った。

### (3) 味刺激溶液

味覚神経応答を解析するのに、味刺激として、1 mMのL-Alaに対する応答をコントロールとし、中枢神経系のGluRsに対して特異的なアゴニストとアンタゴニストを使用した (Table 1)。味刺激溶液は、ミリポア水で10 mMの濃度にしたものをストック溶液とし、実験には毎日APWで希釈し22°Cに調製して使用した。なお、味刺激のストック溶液は化学変化を避けるため冷蔵庫 (4°C) で保存し、1週間毎に作りかえた。味溶液が酸性ま

たはアルカリ性を呈する場合には0.1 NのNaOHまたはHCl溶液で中和し、pH6.8~7.2に調製して使用した。

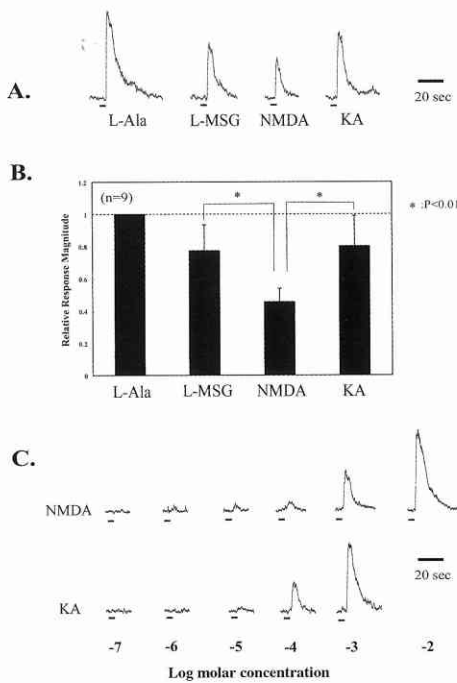
## 結 果

### (1) iGluRsのリガンドに対する味神経応答

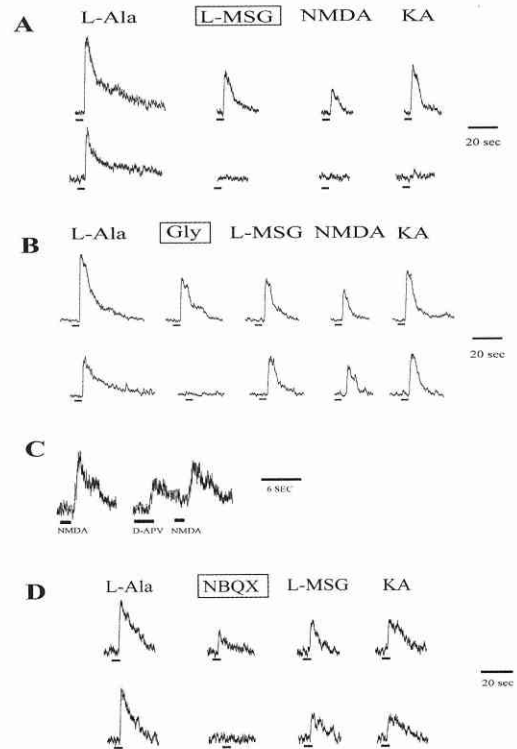
顔面神経下顎枝は、主に下口唇と2本のヒゲに分布する味蕾を支配している。本実験では、L-MSGや神経伝達物質としてのグルタミン酸受容体にあるiGluRsのアゴニストである化合物 (Table 1) に対する味応答は、神経束活動の総和を積分応答として記録した (Fig. 1A)。コイの味覚器はNMDA (iGluRsの選択的アゴニスト) やKA (iGluRsの非選択的アゴニスト) にも比較的大きな味応答性を呈し、1 mMのNMDAとKA、およびL-MSGの平均応答値の大きさは、L-Ala > KA  $\geq$  L-MSG > NMDAであった (Fig. 1 A, B)。これらの化学物質の濃度-神経応答関係は、Fig. 1Cに示すようにNMDAでは閾値が $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$  mol/l、KAでは $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  mol/lであり哺乳類の閾値よりは低い値であった。L-AlaとL-Gluに対する閾値は、丸井ら<sup>14)</sup> によれば各 $10^{-9}$ ~ $10^{-8}$  mmol/lと $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$  mol/lである。

### (2) iGluRsのリガンド間の交叉順応

脳シナプスにおけるiGluRsの受容メカニズムが、L-MSGのコイの味覚受容メカニズムとどのように異なっているのかを調べ、味受容体として



**Fig. 1** A : Typical integrated taste responses to L-MSG and its agonists with 1mM. L-Ala was shown as a standard response.  
 B : Average response magnitudes of L-MSG, NMDA, KA and L-Ala as a standard.  
 C : Dose-response relations for NMDA and KA.



**Fig. 2** Cross-adaptation experiments among L-MSG and its agonists or antagonists. Framed rectangles of chemicals indicate adapting solutions in each experiment.

のGluRsの特徴を明らかにするために、味覚受容体アゴニストを用いて交差順応実験を行った。すなわち、順応させる味溶液を味覚上皮に常時与えておき、その順応溶液にアゴニストを溶解して応答が見られるかどうかを検討した。その結果がFig. 2のA, B, Dの記録である。L-Alaは、魚類では最も顕著な味応答を示すアミノ酸で、L-Gluとは独立した受容メカニズムをもっている<sup>14, 15)</sup>のでコントロールとした。Fig. 2Aでは、L-MSGに順応させると、NMDAもKAも応答が消失している。すなわち、L-Alaの応答はL-MSG順応の影響を余り受けないが、NMDAとKAは影響を受け、応答性を呈さなかった。すなわち、この結果はこれらの味刺激物質の味受容メカニズムがL-MSGのものと同通している可能性を示唆している。Fig. 2Bは同様にGly溶液に順応させた時の他の刺激溶液の応答の記録である。GlyはL-Alaと受容

サイトを共有しているため<sup>15)</sup>に順応中にL-Alaの応答は減少しているが、L-MSG, NMDA, KAの応答は全く影響を受けておらず、これらの化学物質の受容メカニズムはGlyとは異なっていることを示唆している。Fig. 2Dは、非NMDA型受容体の選択的なアンタゴニストであるNBQXに順応させてもL-MSGやKAは応答性を示す。NBQXは中枢神経系では、応答性を呈さず、L-Gluの応答を抑えるアンタゴニストであるので、この結果は、脳におけるiGluRsの性質とは大きく異なっていることを示している。また中枢神経系におけるiGluRsの内、NMDA型受容体はMg<sup>++</sup>がチャンネルにはまり込んで内向き電流を妨げ膜電位依存性が阻害されるという事実<sup>3)</sup>から、Mg<sup>++</sup>freeの人工淡水を味覚上皮に灌流中にL-MSG, NMDA, KAを投与したが、神経応答に差異は認められず<sup>13)</sup>、Mg<sup>++</sup>がチャンネルにはまり込んで内向き電流を妨

Table 2 Comparison of responsiveness for several ligands to GluRs between taste and neurotransmitter.

Table 2

<i>Stimulus</i>			<i>L-MSG</i>	<i>NMDA</i>	<i>KA</i>	<i>D-Ser</i>	<i>Gly</i>	<i>NBQX</i> or <i>D-APV</i>
<i>Receptor Types</i>								
iGluRs in the Brain	NMDA Receptor	Glu site	+	+	n	n	n	n
		Gly site	n	+	n	+	+*	n
	Non-NMDA Receptor	AMPA R.	+	n	+	n	n	n
		KAR.	+	n	+	n	n	n
Taste GluRs in Fish			+	+	+	n <sup>14)</sup>	+	+

\* , potentiation; +, excitatory response; n, no response.

げ膜電位依存性が阻害するという事は味受容体では無いものと結論される。さらに、Fig. 2CとDは、NMDA型受容体の非選択的アンタゴニストD-APVとNMDAならびにL-Alaと交叉順応した実験の結果である。いずれも順応しないことから、脳型iGluRsのもつ性質とは異なった性質を味受容体が持っていることを示唆している。

以上の電気生理学実験により得られた結果を、脳型iGluRsの性質と比較するとTable 2のようになる。つまり、味覚GluRsは、1) D-Serに反応しないこと、2) 脳シナプスにおけるiGluRsのアンタゴニストNBQXとD-APVに反応すること、3) GlyによってNMDAの反応が増強されないこと、から脳のiGluRsとは異なったものと考えられた。

### 考 察

脊椎動物の中樞神経系にある神経伝達物質L-Gluの受容体は、これまでの研究から) mGluRsとiGluRsに大別され、iGluRsはさらに非NMDA型 (AMPA受容体とKA受容体) とNMDA型 (GluサイトとGlyサイトがある) 受容体に分類され、それぞれにアゴニストとアンタゴニストが判明している<sup>3)</sup> (Table 1)。これらのリガンドを利用して、味覚におけるGluRsの解析を電気生理学的に神経応答を記録したところ、次のように考えられた。本研究で得られたL-MSGなどの化合物に対する電気生理学的な神経応答記録実験結果から、iGluRsのアゴニスト (NMDA, AMPA, KA) に味神経応答が観察され、iGluRsが存在するこ

とが示唆されたが、アンタゴニスト (NBQXとD-APV) を味覚刺激物質とした場合にも興奮性の応答が得られ、脳型のiGluRsとは全く異なる機能を持った受容体であると考えられた。さらに丸井らのこれまでの電気生理学的な神経応答記録実験から、1) NMDA型のiGluRsのアンタゴニストであるD-Serには、コイの味覚受容体は反応しないこと<sup>14)</sup>、2) 味覚上皮の灌流液をMg<sup>++</sup>freeにしても味覚反応性に变化のないこと<sup>2,3)</sup>、3) 中枢神経系におけるNMDA型のiGluRsにはアロステリック部位としてGly-サイトが存在して数μMの濃度のGlyの存在でNMDA電流が増強される<sup>2,3)</sup>が、10 or 100 μMのGlyを共存させてもL-MSGの反応に増強作用が認められなかった、ということが判明している。もしiGluRsと呼べる味受容体がコイの味細胞に存在したとしても、脳の神経伝達物質であるGluの受容体のイオンチャネル型とは大きく異なっている受容体であると結論された。一方で、丸井は分子生物学的手法 (RT-PCR法) によりiGluRsの味覚受容体におけるDNA断片の存在を確認したところ、脳には存在するiGluRsのDNA部分配列が、味覚上皮組織には認められなかったことから、コイの味覚器にはiGluRsが存在しない可能性があることを報告している<sup>12)</sup>。一方、脳型のmGluRsは味覚上皮に存在していることも判明している<sup>12)</sup>。

そもそも味覚は、生存のために必要なエネルギー源 (糖類) を摂取したり、有毒あるいは腐廃物などを忌避するために備わっている。そのためこの化学感覚は、単細胞生物をはじめとして全

ての動物にそうしたシグナルの検知のために備わったものと考えてよい。その中で、L-Gluはタンパク質の中に最も多く含まれており、タンパク質のシグナルとしてその役割を担っている<sup>5)</sup>。mGluRsはGタンパク質を介して細胞内セカンドメッセンジャーを調節して機能を発揮しているが、中枢神経系ではシナプスの可塑性や神経細胞死に関係している<sup>3,4)</sup>。一方、iGluRsはL-Gluの結合により内蔵する陽イオンチャネルを開口して、主として速い興奮性の情報伝達に中心的な役割を担っている。味覚受容における脳型iGluRsの関与については、本実験の結果から明らかに否定されるが、脳型のiGluRsではなく、これまでに知られていないiGluRsが存在しているか、味覚情報の速い興奮性の伝達は必要ではないために、味の受容サイトに結合可能な化学物質は全て神経応答を引き起こすということなのかもしれない。今後、分子生物学・電気生理学的手法によるさらなる研究によって味覚受容に関わるGluRsの構造やメカニズムが明らかになってゆくものと考えられる。

## 結 論

本研究で得られたL-MSGなどの化合物に対する電気生理学的な神経応答記録実験と、他のこれまでの実験結果から、つぎのように結論された。

もしiGluRsと呼べる味受容体がコイの味細胞に存在したとしても、脳の神経伝達物質であるGluの受容体のイオンチャネル型とは大きく性質を異とした受容体である。もしくはコイの味覚器にはiGluRsが存在しないと考えられた。

## 文 献

- 1) 米田幸雄, 荻田喜代一: グルタミン酸受容体. 「神経伝達物質受容体, 構造と機能」第10章; 123-140 廣川書店 東京:1994.
- 2) Collingridge, G. L. and Lester, R. A. J.: Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Reviews* **41**; 143-210 1989.
- 3) Hammond, C.: *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2nd Edition, Academic Press New

York 2001.

- 4) 小野武年: 脳における神経伝達物質としてのグルタミン酸. 「グルタミン酸の科学」第1章 講談社サイエンティフィック; 93-112 講談社 東京 2000.
- 5) 栗原堅三: 食物の味とうま味の役割. 「グルタミン酸の科学」第4章 講談社サイエンティフィック; 4-26 講談社 東京 2000.
- 6) 栗原堅三: うま味の受容機構. 「グルタミン酸の科学」第2章 講談社サイエンティフィック; 27-48 講談社 東京 2000.
- 7) 赤堀二郎: Amino酸の味と化学構造の関係について *日生化* **14**; 185-192 1939.
- 8) 山口静子: 味覚心理学からみたうま味の性質 *臨床栄養* **66**; 154-160 1984.
- 9) 栗原堅三: うま味の発現機構 *臨床栄養* **66**; 131-136 1984.
- 10) Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. and Adler, E.: Human receptors for sweet and umami taste. *PNAS* **99**; 4692-4696 2002.
- 11) Lin, W. and Kinnamon, S. C.: Physiological evidence for ionotropic and metabotropic glutamate receptors in rat taste cells. *J Neurophysiol* **82**; 2061-2069 1999.
- 12) Marui, T.: Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of expression of glutamate receptors in fish taste tissue. *Dentistry in Japan* **40**; 23-25 2004.
- 13) 丸井隆之, 古山 昭, 大須賀謙二: 魚類MSG味受容体にiGluRは存在するか? *日本味と匂学会誌* **10**; 649-652 2003.
- 14) Marui, T., Harada, S. and Kasahara, Y.: Gustatory specificity for amino acids in the facial taste system of the carp, *Cyprinus carpio* L. *J Comp Physiol A* **153**; 299-308 1983.
- 15) Marui, T., Harada, S. and Kasahara, Y.: Multiplicity of taste receptor mechanisms for amino acids in the carp, *cyprinus carpio* L. In, *Umami: A Basic Taste* (Eds. Kawamura, Y. and Kare, M.R.); 185-199 Marcell Dekker Inc. 1987.
- 16) 隈元伸一: グルタミン酸ナトリウムの味覚応答活性と化学構造の関係 *Jpn J Oral Biol* **30**; 652-663 1988.

著者への連絡先: 富田祐介, (〒963-0202)郡山市柏山町39  
Reprint requests : 39 Kasiwayama-cho, Koriyama, Fukushima, 963-0202, Japan