1C1030

等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた大腸菌走化性受容体 Tar とリガンドの相互作用の測定

○角井 碧、宮内 正二、奈良 敏文、加茂 直樹（北大院・薬・生物物理）

Tar は大腸菌やサルモネラ菌に存在する走化性受容体で、主なりガンドとして L-アスパラギン酸が知られている。この親和性の度合いを測定するためにこれまでは主に間接的な方法が用いられてきた。今回、これを直接的な方法で測定することを試みた。物質の相互作用を測定する実験系として等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) がある。ITC では、サンプルセル内で物質が相互作用する際に熱が発生し、対照セルとの間に温度差が生じる。その差に基づいて熱補償を行なう。この熱補償が熱量変化に相当し、相互作用による熱量変化を直接測定できる。この熱量変化を解析することにより解離定数 Kd やエンタルピー変化 ΔH などの熱力学パラメーターをもとめることができる。

Tar の大量発現株から Kaback 法によって膜ペシクルを作成し、ITC を用いて Tar とアスパラギン酸との相互作用の測定を行なった。その結果、L-アスパラギン酸では Kd が約 $2 \mu\text{M}$ 、 ΔH が約 -9kcal/mol となった。D-アスパラギン酸を用いて同様の測定を行なうと Kd は約 $50 \mu\text{M}$ となり、これらの解離定数は間接的方法で得られた値と一致した。これにより ITC は受容体とリガンドの相互作用の測定に有用であることが示された。アスパラギン酸の結合に関与する残基である Thr154 を変異させた T154C 変異体では wild-type と比較して結合が数十倍程度弱くなることがわかった。また、現在、Tar とアスパラギン酸以外のアミノ酸相互作用についても測定を行っており、それについても議論したい。

議論していただいた名大院・理・川岸郁朗先生に感謝します。

M.Sumii,S.Miyauchi,T.Nara,N.Kamo : The binding constant of *Escherichia coli* Aspartate Receptor measured by Isothermal Titration Calorimetry

1C1100

マウス単一味蕾における味細胞応答の記録

○吉田 竜介^{1,4}、石塚 智²、Bernd Lindemann³、二ノ宮 裕三^{1,4} (¹ 九大院 歯 口腔機能、² 九工大院 生命体工学、³ サールランド大 生理、⁴ 生研機構)

味細胞は口腔内の味物質を受容し、電気的信号に変換する。生理的条件下では、口腔内に与えられた味物質は味細胞の受容膜を刺激し、basolateral 側に影響を与えることは稀である。しかし、味細胞応答を記録するために味蕾を単離した場合、basolateral 側に影響を及ぼさないよう味刺激を与えることは難しい。そこで我々はこれまでの報告を参考にし、摘出した単一味蕾を用い、味細胞の受容膜にのみ味刺激を与え、味細胞応答を記録するより簡便な実験系を考案した。この系では、舌上皮組織を含む単一味蕾を酵素処理後に摘出し、舌上皮の味孔周辺を直径約 $40 \mu\text{m}$ の味刺激用ピペットで吸引保持した。味刺激用ピペット内部は蒸留水または味溶液により常に灌流した。味細胞の basolateral 側は $95\%\text{O}_2$ 、 $5\%\text{CO}_2$ で飽和させた Tyrode 溶液で常に灌流し、場合によっては薬剤添加や溶液変更を行った。このようなセッティングにより味刺激は味細胞の受容膜には当たるが、細胞外溶液と混ざり合わず、basolateral 側に影響を及ぼさない。味細胞応答は basolateral 側よりルーズパッチ法にて記録した。この結果、多くの味細胞は自発的な action current を生じさせた。その内の一部の味細胞では、サッカリンや D-phe 等の甘味物質で刺激した場合 action current 頻度が増加したが他の味質の刺激には応答しなかった。また別の細胞では、酸味刺激に対する action current 頻度の減少、酸味溶液から蒸留水に切り替えたときに生じるオフ応答を示した。自発または味刺激により生じる action current は basolateral 側に $1 \mu\text{M}$ の TTX を加えることで消失したことから、action current 発生には電位依存性 Na^+ チャンネルが関与すると考えられる。

R.Yoshida, S.Ishizuka, B.Lindemann, Y.Ninomiya : Recordings of responses from taste cells elicited by taste stimuli to the single taste bud of mice.

1C1045

アセチルコリンによるイモリ嗅細胞の匂い応答の修飾

○大熊 真人、河合 房夫、宮地 栄一（藤田保健衛生大・医・生理学 II）

匂い物質を受容する感覚器官である嗅細胞は鼻腔内の嗅粘膜に存在する。匂い物質は繊毛部分で受容され、発生した活動電位は軸索を介して嗅球へ伝達されるが、この経路とは別に嗅粘膜には遠心性神経突起の存在が報告されている。このことから、嗅細胞の匂い応答は遠心性的に修飾される可能性が考えられる。本研究では、アセチルコリン受容体のアゴニストであるカルバコールを用い、単離イモリ嗅細胞細胞体に存在する膜電位依存性イオン電流へのアセチルコリンの影響をホールセルパッチクランプ法により検討した。まず、嗅細胞を電流固定し、電流注入により発生する活動電位を測定した。 $100 \mu\text{M}$ カルバコールを灌流投与した結果、閾値が減少し 4pA の電流注入で発生していた活動電位が 2pA から発生するようになった。また、活動電位の発生頻度も上昇した。次に、膜電位固定下でカルバコールを投与すると、脱分極刺激により生じた一過性内向き電流が増加した。各電流を分離して測定した結果、カルバコールにより電位依存性ナトリウム電流の振幅が約 15% （コマンド電位 $= -10\text{mV}$ ）、T 型カルシウム電流の振幅が約 30% （コマンド電位 $= -40\text{mV}$ ）増加したが、L 型カルシウム電流とカリウム電流には変化が見られなかった。また、ムスカリン性アセチルコリン受容体のアンタゴニストであるアトロピン存在下では、カルバコールによるナトリウム電流の増加は消失した。このことから、カルバコールはムスカリン性受容体を介して内向き電流を修飾しているものと考えられる。以上の結果から、嗅細胞の応答は遠心性神経繊維から放出されるアセチルコリンにより直接修飾されることが示唆された。また、T 型カルシウム電流は嗅細胞の閾値を減少させることから、アセチルコリンは嗅細胞の活動電位応答の閾値を低下させることにより匂い感度を増強するものと考えられる。

M. Ohkuma, F. Kawai and E.-I. Miyachi : Acetylcholine modulates odor response in newt olfactory receptor cells.

1C1115

ESR に基づく細胞内レドックスレベル計測。スピン試薬配糖体化の吸収・代謝に及ぼす影響

○福井 孝一¹、内田 英伸¹、原 慶明²、佐藤 慎吾³、小野寺 準一³、青山 正明⁴、大矢 博昭⁴ (¹ 山形地域結集、² 山形大・理、³ 山形大・工、⁴ 生物ラジカル研)

近年、生体のストレス応答に際して、細胞内レドックスレベルの変化が重要な働きをしていることが明らかになってきている [1]。我々の研究所では、これまで実験動物や植物について、ニトロキシル系ラジカルをプローブとし、ストレスの影響を調べてきた [2]。その結果、ストレス付加による ESR 信号強度の減衰速度の変化や一度消失した信号の復活が観測され、このようなスピン試薬がストレス評価に有効であることが分かってきた。様々な試薬を調べた結果、現在 Glc-TEMPO (4-glucosyloxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy) に代表される配糖体型ニトロキシルラジカルが最も優れているとの結論を得ている。これは、おそらく配糖体型スピン試薬がより細胞に吸収され易いためと考えられるが詳細は不明である。また、配糖体型ラジカルに限らず細胞に取り込まれたスピン試薬は直ちに還元され、生体がストレスを受けると細胞内レドックスレベルの変化を反映しラジカルへと再酸化されると考えられるが、この機構の詳細も明かでない。これらを明らかにすることは、より高感度に細胞内レドックスレベルをプローブできるスピン試薬の開発に必要である。しかし、これまでのように動物や植物個体を相手にした研究のみではこれらを解明することは難しいと考えられる。そこで、我々は分子生物学的に詳しく調べられてきた大腸菌を対象とした研究を始めることとした。まず配糖体型スピン試薬が実際に大腸菌細胞に取り込まれるかどうかを調べた。Glc-TEMPO や Gal-TEMPO の配糖体型スピン試薬と、TEMPO、hydroxy-TEMPO、oxo-TEMPO、carbamoyl-PROXYL などの非配糖体型スピン試薬とを比較した結果を報告する。 [1] Demple, Nature 279, 1655—1656 (1998). [2] 例えば多田ら、Chem. Lett. 1122—1123 (2001).

K. Fukui, H. Uchida, Y. Hara, S. Sato, J. Onodera, M. Aoyama, H. Ohya : Toward EPR-based Probing of Cellular Redox Status. Effects of Glycosidation on Uptake and Metabolism of Spin Reagents