

Expression of Kainate Glutamate Receptors in Type II Cells in Taste Buds of Rats.

Sang-Bok Lee¹, Cil-Han Lee¹, Young-Kyung Cho^{1,2}, Ki-Myung Chung^{1,2}, and Kyung-Nyun Kim^{1,2}

¹Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Kangnung National University.

²Research Institute for Oral Science, Kangnung National University.

(Received May 27, 2008 ; Revised June 27, 2008 ; Accepted July 14, 2008)

Glutamate-induced cobalt uptake reveals non-NMDA glutamate receptors (GluRs) in rat taste bud cells. Previous studies suggest that glutamate-induced cobalt uptake in taste cells occurs mainly via kainate type GluRs. Cobalt-stained cells were immunoreactive against GluR6 and KA1 subunits of GluRs. However, the functions of those type of receptors are not known yet. It is important question which types of taste cells are cobalt-stained when stimulated by glutamate and whether they express these kinds of GluRs. Circumvallate and foliate papilla of Sprague-Dawley rats (45-60 days old) were used. A cobalt-staining technique combined with immunohistochemistry against specific markers for taste bud cell types, such as blood group H antigen (BGH), α -gustducin (Gus), or neural cell adhesion molecule (NCAM) was employed. We also performed double labeling of GluR6 or KA1 subunits of GluR with each specific marker for taste bud cell types. Lots of cobalt-stained taste bud cells expressed Gus-like immunoreactivity, and subsets of the cobalt stained cells appeared NCAM- or BGH-like immunoreactivity. Stimulation with 1 mM glutamate significantly increased the number of cobalt-stained cells in Gus-like immunoreactive cells, but not in NCAM- or BGH-like immunoreactive cells. In the double labeling experiments, GluR6 and KA1 subunits of GluRs were mainly expressed with Gus. These results suggest that kainate glutamate receptors preferentially expressed in type II taste bud cells in rat.

Key words: taste bud, kainate, cobalt staining, immunohistochemistry

서 론

미각은 영양물질의 탐지뿐만 아니라 독성 음식물의 섭취를 예방하는데 관여하는 생존에 필수적인 특수감각이다(김 등, 2005). 미각은 주로 구강에 위치하는 특수한 구조인 맛봉오리의 이차감각세포에 의하여 전환되어 중추로 전달된다(김 등, 2005).

맛봉오리는 미각 감수 세포와 지지세포 등 다양한 기능을 수행하는 여러 종류의 세포로 구성되어 있는데, 맛봉오리 세포들 간의 상호 관계는 맛을 인지하는데 매우 중요하다(Roper, 1992; 2006). 쥐의 맛봉오리 세포에서 glutamate (Caicedo 등, 2000; Kim 등, 2001), serotonin (Herness 등, 1997; Huang 등, 2005), norepinephrine (Herness 등, 2002), ATP (Finger 등, 2005) 등 다양한 신경 전달 물질이 존재하고 기능을 발휘하고 있는 것이 알려져 있다.

맛봉오리는 주로 혀에 분포하고 있으며, 적은 수가 입천장 후방이나 식도 상부에 존재한다. 흰쥐에서는 혀의 앞부분에 버섯유두(fungiform papilla), 뒷부분 중앙의 성곽유두(circumvallate papilla) 및 뒤쪽 가장자리에 위치한 잎새유두(foliate papilla)에 존재한다(김 등, 2005; Fig. 1A).

맛봉오리 세포는 종에 따라 차이가 있기는 하지만 100여개의 세포로 구성되며 다음의 4 종류의 세포로 구성되어 있다(Fig. 1B). 방추형의 세포는 형태적으로 세 종류로 구분되며(Farbman, 1965), 지지세포인 type I 세포, 미각 감수 세포로 추정되는 type II 세포 및 구심신경으로 신호를 내보내는 type III 세포로 생각된다(Farbman,

*Corresponding author: Kyung-Nyun Kim, Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Kangnung National University, 123 Chibyun-dong, Kangnung, Kangwon-do, 210-702, KOREA. Tel.: +82-33-640-2450; Fax.: +82-33-642-6410; E-mail: knkim@kangnung.ac.kr

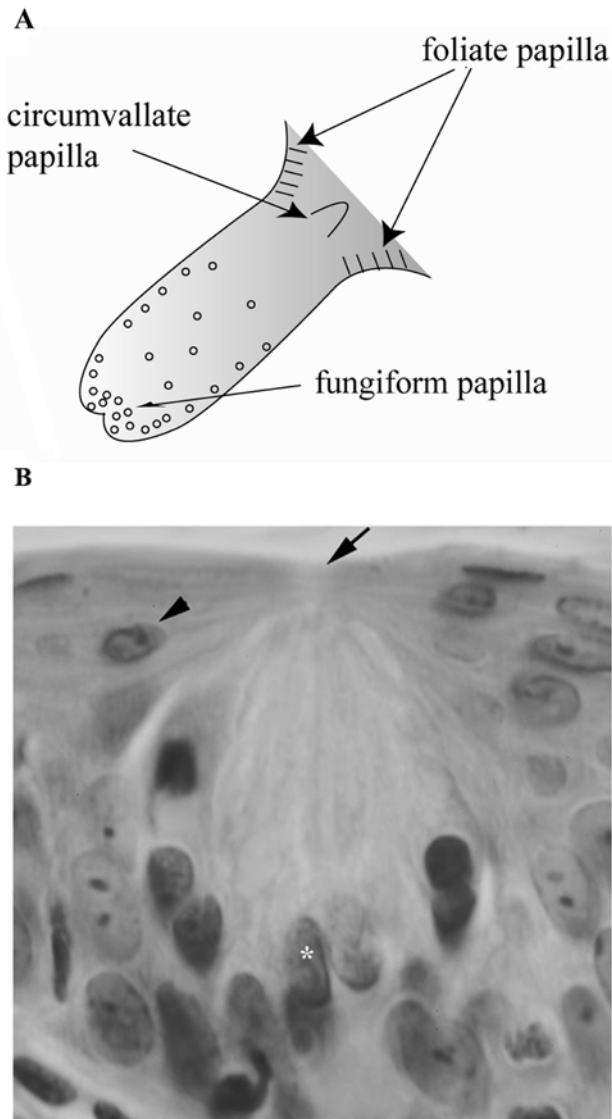


Fig. 1. Schematic diagram showing distribution of tongue papilla including taste buds (A) and representative light micrograph showing a taste bud in foliate papilla of rat (B). Non sensory epithelial keratocytes (arrowhead) and cells in taste bud(*) were easily differentiated by their shape. Subsets of cells in taste bud open their apical end to oral cavity through taste pore (arrow).

1965; Pumplin 등, 1997; DeFazio 등, 2006). 다른 한 종류는 맛봉오리의 기저부에서 발견되는 입방형의 세포로서 기저세포로 불리며, 다른 맛봉오리 세포의 전구세포로 생각된다(Pumplin 등, 1997). Type II 세포는 미각의 신호전환과 관련된 $G\alpha$ -gustducin, phospholipase C β 2 (PLC β 2), 및 몇 종류의 미각 감수기 단백질을 발현하며 (DeFazio 등, 2006), Type III 세포는 신경세포나 화학 시냅스와 관련된 단백질인 neural cell adhesion molecule (NCAM)과 SNAP 25(synaptosomal associated protein of 25kD)를 발현하는 것으로 알려져 있어(Yang 등, 2000; DeFazio 등, 2006), 미각 신호를 미각 신경으로 전달해

주는 출력세포의 기능을 수행한다고 추정하고 있다(DeFazio 등, 2006).

Glutamate는 신경계에서 가장 널리 분포하고 있는 신경 전달 물질로, 작용하는 수용기는 metabotropic receptor (mGluR)와 ionotropic receptor (iGluR)로 크게 나뉘어진다. iGluR은 수용기의 구성단백질의 종류와 기질 특성에 따라 N-methyl-D-aspartate (NMDA) type, α -amino-3-hydroxy-isoxazole-propionic acid (AMPA) type와 kainate type로 구분한다. AMPA GluR은 GluR1-GluR4 네 종류의 구성단백질이, 그리고 kainate GluR은 GluR5-GluR7, KA1,KA2의 다섯 개의 구성단위가 한 종류로만 구성되어 있거나 또는 다른 종류와 함께 모여 이루어진다(Dingledine 등, 2000).

중추신경계에서 AMPA와 kainate 수용기의 역할은 서로 차이가 있어, AMPA 수용기는 빠른 흥분성 시냅스를 전달하며(Song 등, 2002), 뇌의 일부에선 시냅스의 크기를 조절한다(Passafaro 등, 2003). Kainate 수용기에 의하여 발생한 excitatory postsynaptic currents (EPSCs)의 지속시간은 AMPA 수용기에 의하여 발생한 것에 비해 길다(Lerma, 2003). Kainate 수용기에 의해서 조절되는 작고 느린 EPSC는 시간적으로 오래 흥분성 입력을 받아들일 수 있으므로 정보의 통합에 중요한 역할을 수행할 수 있을 것으로 생각된다(Lerma, 2003). 더욱이, AMPA와 kainate 수용기의 통로가 여닫히는 기전에도 차이가 있어, 외부의 이온이 kainate GluR에 의하여 유발되는 EPSC의 크기와 속도를 조절할 수 있다(Bowie, 2002).

일련의 연구로 맛봉오리 세포에서 kainate GluR이 발현하며, 기능을 발휘하고 있는 것이 잘 알려져 있지만(Caicedo 등, 2000; Kim 등, 2001; Chung 등, 2005), 그 역할은 확인되지 않고 있다. 맛봉오리의 kainate GluR이 어떤 종류의 맛봉오리 세포에서 발현하는지 확인하는 것은 그 역할을 밝히는데 매우 중요한 단서를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 코발트 염색(Pruss 등, 1991; Kim 등, 2001)과 면역조직화학 분석을 이용하여 맛봉오리 세포 종류에 따른 kainate GluR의 분포를 확인하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

모든 실험 과정은 국립 강릉대학교 치과대학 실험동물 위원회의 승인을 얻었으며, 위원회의 감독을 받으며 수행되었다.

맛봉오리 세포의 kainate GluR의 발현이 성숙되는 생후 45-60일 사이의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley, Semtaco, 대한민국)를 사용하였으며(Kim 등, 2001), 여성호르몬에 따른 변화를 최소화하기 위하여 수컷만을 사용하였다.

코발트 염색

이미 발표된 Caicedo 등(2000) 및 Kim 등(2001)의 논문을 참고로 하여 코발트 염색을 시행하였다. 이산화탄소를 이용하여 희생시킨 후 혀를 재빨리 제거하여 차게 식혀 산소로 포화시킨 저 나트륨, 고 자당의 Tyrode 배양용액(57.5 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 12 mM glucose, 139 mM sucrose, pH 7.4, 305 mOsm)에 저장하였다. 주변 근육을 절제하고 일새유두가 포함되게 혀를 잘라내고 tissue chopper (Stoelting, 미국)에 준비한 후, 일새유두를 포함하는 두께 500 µm의 박편을 고랑에 수직되게 잘라내서 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 각각의 쥐에서 2개 이상의 조직 박편을 얻어 실험에 사용하였다.

박편을 산소로 포화시킨 Tyrode 배양용액으로 2회 세척하고 코발트의 uptake를 유발하기 위해 5 mM의 CoCl₂에 1 mM의 glutamate 또는 다른 약물이 첨가된 배양용액에서 5분간 실온에서 자극하였다. 약물자극 후 남아있는 Co²⁺를 제거하기 위해 2 mM의 EDTA를 함유한 완충용액으로 5분간 씻어내고, 1.2% (NH₄)₂S를 함유한 배양용액으로 5분간 처리하여 침전을 시켰다. 박편은 다시 씻어내고 4°C의 4% paraformaldehyde (PFA) 용액(in 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 고정시켰다. 20% sucrose 용액(in 0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4)로 동결방지 시키고 동결절편기(Jung Frigocut 2800N, Leica, 독일)로 20 µm 두께의 조직 표본을 제작하였다. IntenSEM kit (Amersham, 미국)로 은 입자를 침착시킨 후 조직 표본을 gelatin 도포 slide glass에 얹어 methylene blue로 대조 염색한 뒤, 투명화 하여, coverglass로 덮어 봉입하여 광학현미경(E-600, Nikon, 일본)으로 관찰하였다.

면역조직화학적 실험

면역 조직화학적 실험에 사용한 1차 항체와 2차 항체 및 사용 희석 비율은 Table 1에 정리하여 나타내었다.

흰쥐를 일정 기간 사육한 후 체중 kg 당 1.5 g의 urethane을 복강내 주사하여 전신 마취 시킨 뒤 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.4; PBS)을 심장으로 관류 세척하고 PBS에 용해시킨 4% PFA로 심장관류 고정하였다. 일새유두를 포함하는 조직 표본을 절제한 후 같은 고정액에서 두 시간 동안 후고정하였다. 20% sucrose 용액으로 동결손상을 방지한 뒤 위에 기술한 순서와 같은 방법으로 20 µm으로 조직표본을 제작하였다. 조직표본을 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS (PBST)에 1% bovine serum albumin, 10% normal donkey serum (Santa Cruz, 미국)을 포함한 전배양 용액으로 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 각각의 맛봉오리 세포 타입의 특이 항원으로서 Blood group H antigen (BGH, Type I), α-gustducin(Type II), 및 NCAM (Type III)을 이용하였

다. 또한 이미 맛봉오리 세포에서 그 면역조직화학적 양성 반응이 잘 알려져 있는(Chung 등, 2005) GluR6와 KA1에 대한 면역조직화학적 실험을 함께 수행하였다. 조직 절편들을 전배양 용액에서 subunit에 대한 일차 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양한 후, PBST로 5분 씩 3회 세척하여 비특이성 면역 반응을 차단하였다. 세포타입 특이 항원(BGH, α-gustducin, NCAM)의 2차 항체와 GluR subunit (GluR 또는 KA1)의 2차 항체 형광 발색을 FITC 또는 rhodamine으로 다르게 하였다. 1% normal donkey serum이 포함된 PBST 용액에 희석하여 상온에서 한 시간 반응하였다. 반응 후 PBST로 5분씩 3회 세척하고 물기를 제거한 후, 형광 전용 봉입액(Vectashield, Vector, 미국)으로 처리하여 형광 현미경(E-600, Nikon, 일본)으로 관찰하였다. 형광 2차 항체 염색 과정은 암실에서 수행하였다.

코발트 염색과 면역조직화학적 염색 이중 표지

일부 조직 절편에서는 코발트 염색과 맛봉오리 세포종류에 따른 표지 항원(BGH, α-gustducin, NCAM)에 대한 면역 조직 화학 반응을 동시에 수행하였다. 코발트 염색을 수행한 20 µm의 두께의 조직 표본을 1% bovine serum albumin, 10% normal rabbit serum (Santa Cruz, 미국)을 포함한 PBST 용액으로 상온에서 1시간 처리한 다음 2% normal goat serum을 포함한 PBST에 맛봉오리 세포 종류에 따른 특이 표지 항체를 Table 1에 나타낸 바와 같이 희석하여 사용하였다. 이후 4°C에서 밤새 배양하고, PBST 용액으로 5분씩 3회 세척하였다. 이차 항체는 biotinylated goat anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG (Vector, 미국)를 1% normal goat serum이 포함된 PBST 용액에 희석하여 상온에서 한 시간 동안 반응하였다. PBST 용액으로 세척 후, ABC kit (Vector, 미국)로 45분간 반응시켰다. 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma, 미국; AEC)을 dimethyl sulfoxide에 녹여 pH 5.0의 acetate 완충용액에 0.4 µg/ml로 희석하여 여과하여 준비한 용액에 절편들을 넣고, 사용 직전에 30% H₂O₂ 0.1 µl/ml 를 첨가하여 2분 동안 발색반응을 하였다. 대조실험으로는 일차 항체를 첨가하지 않고 같은 방법으로 실험을 시행하였다. 증류수로 세척하여 발색을 멈추고 물기를 제거한 다음 수용성 봉입액(Aqueous Mount, Scy Tek, 미국)로 처리하고 광학현미경(E-600, Nikon, 일본)으로 관찰하였다.

조직표본의 관찰 및 자료 분석

조직표본은 Nikon E-600 광학현미경(일본)으로 관찰하고 Digital 사진기(S2Pro, Fujifilm, 일본)로 촬영하였다. 코발트 염색 또는 면역조직화학적 반응 양성세포를 확인하기 위하여 박편 당 두 섹션에서 맛봉오리 마다 표지된 세포의 수와 맛봉오리의 수를 세었다. 각각의 박편에서

맛봉오리 당 염색된 세포의 수의 평균을 구하여 실험군 사이의 표지된 세포의 수를 비교하였다. 두 명의 연구원이 독립적으로 계수하여 비교하였지만 연구원간의 편차는 없었다. 모든 결과는 mean ± S.E.M.으로 표시하였으며, 각 실험군은 최소한 4마리를 시행하였다. 각 실험군 사이의 통계적 유의성은 코발트 염색 결과는 Mann-Whitney U-test를 면역조직화학적 실험 결과는 ANOVA를 사용하여 검증하였다.

시약

이 연구에서 사용한 시약은 특별히 명시한 경우를 제외하고 Sigma사(미국)의 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

실험 결과

코발트 염색과 맛봉오리 세포 특이 항원의 이중 표지
 과거의 연구 결과와 같이(Caicedo 등, 2000; Kim 등, 2001; Chung 등, 2005), glutamate 자극으로 코발트 염색이 된 맛봉오리 세포의 수는 맛봉오리 당 1.67 ± 0.16 개(n = 18; Fig. 2A1, 2, 3)에서 3.30 ± 0.3개(n = 18; Fig. 2A 4, 5, 6)로 유의하게 증가하였다(p < 0.05). 맛봉오리 세포에 대한 특이 항원에 대한 면역조직화학적 양성반응인 세포의 수는 BGH 양성인 세포가 8.22 ± 0.86개(n = 6; Fig. 2 A1, 4), α-gustducin 양성인 세포가 6.20 ± 0.37 개(n = 8; Fig. 2A2, 5), NCAM이 양성인 세포의 수가 5.74 ± 0.67개 이었다(n = 4; Fig. 2A3, 6). Glutamate 자극 없이 코발트 염색을 시행한 경우에는 BGH 면역 양성인 세포에서 0.11 ± 0.08(n = 6), α-gustducin 양성인 세포에서 0.96 ± 0.16(n = 8) 및 NCAM 양성인 세포에서 0.39 ± 0.10(n = 4)으로 세 가지 종류의 세포 모두에서 비슷한 비율로 코발트 염색이 관찰되었지만, 1 mM glutamate로 자극한 경우에는 각각 0.23 ± 0.10개(n = 6), 2.32 ± 0.29개(n = 8) 및 0.53 ± 0.16개(n = 4)로 α-gustducin 면역 양성인 세포에서만 코발트 염색된 세포가 증가하였다(p < 0.05, Fig. 2B).

맛봉오리 세포의 면역조직화학적 실험

흰쥐의 맛봉오리 세포에서는 이미 알려진 바와 같이

(Chung 등, 2005) GluR6와 KA1의 면역양성 반응이 관찰되었으며 그 수는 맛봉오리 당 각각 4.23 ± 0.21개(n = 16)와 5.99 ± 0.66개(n = 20)로 이전의 연구결과(Chung 등, 2005)와 비슷하였다. 맛봉오리 세포 종류에 따른 표지항원에 대한 이중면역조직화학적 실험결과 GluR6와 KA1을 발현하는 세포 중 각각 1.94 ± 0.52개(n = 6) 및 2.34 ± 0.50개(n = 7)가 α-gustducin과 동시에 발현하는 양상을

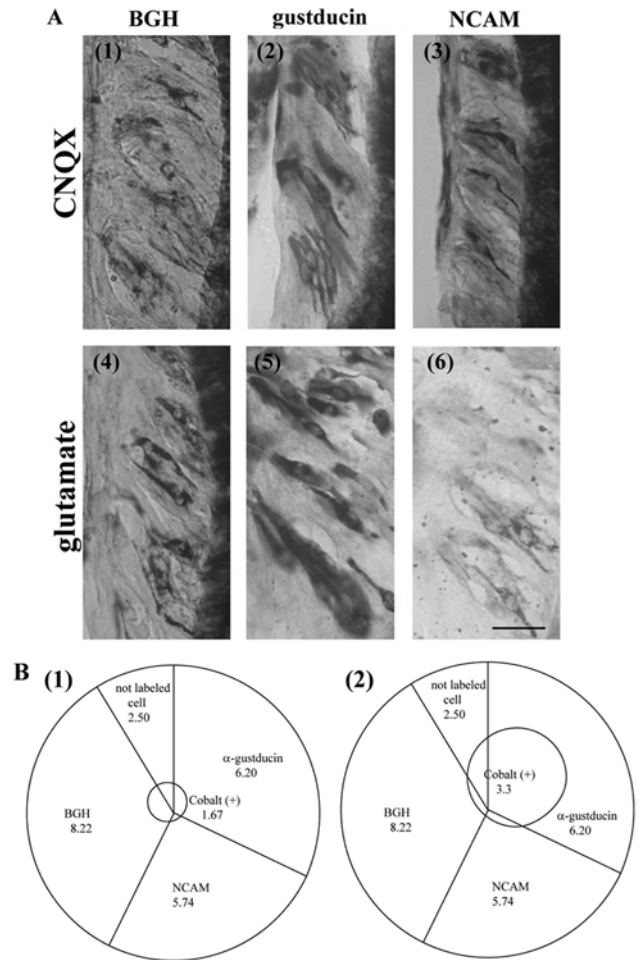


Fig. 2. Light microphotography showing double labeling with immunohistochemistry against taste cell type marker and cobalt staining (A), and venn diagram showing number of labeled cells per taste bud (B). Inner small circle indicated double labelling of cobalt staining and taste cell type specific immunohistochemistry. Scale bar in (A) represents 25 μm.

Table 2. The taste bud cells of double immunohistochemical staining against GluR6 or KA1 and BGH, α-gustducin, or NCAM.

	BGH	α-gustducin	NCAM	total
GluR6	0.03 ± 0.05 (4)	1.94 ± 0.52 (6)*	0.06 ± 0.08 (6)	4.23 ± 0.21 (16)
KA1	0.00 ± 0.00 (6)	2.34 ± 0.50 (7)*	0.11 ± 0.12 (7)	5.99 ± 0.66 (20)
total	7.77 ± 1.41 (10)	6.22 ± 0.83 (13)	4.64 ± 0.83 (13)	

*: GluR6 and KA1 preferentially expressed in gustducin immunoreactive taste bud cells (p < 0.05). The numbers in parenthesis means the number of animals used in this experiment.

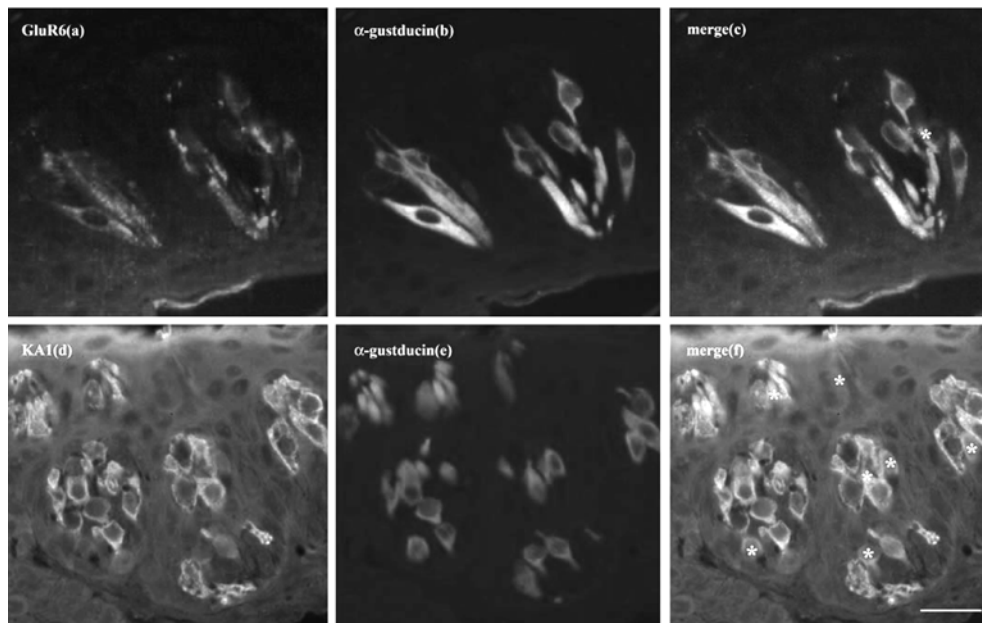


Fig. 3. Fluorescence microphotograph showing double immunohistochemical staining against GluR6(a) or KA1 (d) and α -gustducin(b, e). Most GluR6 or KA1 immunoreactive cells showed α -gustducin-like immunoreactivity. However, subsets of GluR6 or KA1 immunoreactive cells did not show α -gustducin like immunoreactivity (c, f*). Scale bar represents 25 μ m.

보였지만($p < 0.05$, Table 2, Fig 3) 일부 세포는 동시에 발현되지 않았다(Fig. 3*). 특히 GluR 구성 단백질이 α -gustducin과 이중 표지 되는 경향은 KA1의 경우 더욱 뚜렷하였다(Table 2).

고 찰

본 연구에서 non-NMDA GluRs의 subunit에 대해 코발트 염색법과 면역조직화학적 실험을 이용하여 맛봉오리 세포 종류에 따른 kainate 수용기 발현 양상을 확인하여 보았다. 면역조직화학적 실험과 코발트 염색의 이중 표지 실험을 통하여 glutamate에 의하여 코발트 염색이 유발되는 세포는 주로 α -gustducin을 발현하고 있다는 것이 확인되었으며, 형광 이중면역조직화학적 실험 결과도 GluR6와 KA1 구성 단백질이 주로 α -gustducin과 함께 발현됨으로써 서로 일치하는 결과를 보여주었다.

맛봉오리의 kainate GluR

Glutamate는 신경계에서 가장 널리 발견되는 신경전달물질로 그 작용하는 수용기의 종류에 따라 mGluR과 iGluR로 대별되며, iGluR은 그 기질 특이성에 따라 NMDA GluR, AMPA GluR 및 kainate GluR로 구분되고, AMPA와 kainate GluR은 전통적으로 non-NMDA GluR로 부르고 있다.

맛봉오리 세포에서의 non-NMDA GluR은 Caicedo 등(2000)에 의하여 처음으로 보고되었으며, 그 후 Kim 등

(2001)과 Chung 등(2004)의 연구로 시냅스 수용기인 것이 확인되었고, 맛봉오리 세포의 non-NMDA GluR은 kainate GluR인 것을 Chung 등(2005)이 보고하였다.

중추신경계의 non-NMDA GluR의 기능은 종류에 따라 차이가 있어 AMPA GluR은 주로 빠른 시냅스 전달이나 시냅스의 가소성에 관여하지만 kainate GluR은 느린 활동전류로 정보의 통합이나 시냅스 활성의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Lerma, 2003; Mayer, 2005). 또한 kainate GluR의 구성 단위에 따른 기능차이가 보고되어 GluR6는 시냅스 전 신경전달물질의 유리를 조절하는 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Chittajallu 등, 1996). 그러므로 본 연구에서 확인된 GluR6는 맛봉오리 세포들 사이 또는 맛봉오리 세포와 미각 구심신경 사이의 시냅스에서 신경전달물질의 유리를 조절할 가능성을 시사하고 있다.

맛봉오리 세포에 따른 kainate GluR의 발현

전통적으로 포유류 맛봉오리에는 형태학적으로 구분할 때 4가지 종류의 세포가 있는 것이 알려져 있으며(Murray, 1974), 각각의 세포가 서로 다른 기능을 하고 있는 것으로 생각된다. 최근까지도 맛봉오리 세포의 종류와 기능 사이에는 많은 논란이 있어왔지만 최근 이들의 역할에 대해서는 많은 보고가 발표되고 있다. Type I 세포는 전통적으로 지지세포의 기능을 수행하는 것으로 생각되어지며, 최근 신경계의 교세포와 같은 기능을 수행하는 것이 알려졌다(Bigiani, 2001). Type II 세포는 단맛과 쓴맛의 감수기와 미각 신호 전환과 관련된 신호 전달 관련

단백질들인 α -gustducin (Boughter 등, 1997)과 PLC β 2 (DeFazio 등, 2006)가 발현되는 세포로 미각 물질이 직접 결합하여 신경자극으로 변환하는 과정을 담당하는 세포로 생각된다(Roper, 2006). Type III 세포는 신경세포의 특징을 가장 많이 나타내는 세포로 NCAM이나 SNAP 25같은 시냅스 관련 단백질이 발현되며(Yang 등, 2000; DeFazio, 2006) 미각 구심신경세포와 시냅스를 이루고 있으므로(Murray, 1986), 맛봉오리에서 전환된 신호를 미각신경으로 전달하는 세포로 생각된다.

면역조직화학-코발트 염색 실험 결과 kainate GluR은 Type II와 Type III에서 주로 발현되는 양상을 보였다. 실험에 사용한 표지자들이 모두 미각세포 종류에 따른 특이항원이기는 하지만, 면역조직화학적 실험에 사용된 항체는 polyclonal 항체로 비특이적 반응이 있었을 수 있다. 또한 코발트 염색은 이온을 통과시키는 기능을 발휘하고 있는 상태의 GluR을 감지하는데 반하여 면역조직화학적 실험에서는 구성 단백질의 발현만을 확인 할 수 있는 점이 다소 차이가 있는 결과를 초래하였을 가능성이 있다.

Glutamate는 어디서 분비되는가?

맛봉오리에 분포하는 미각 구심신경은 glutamate에 대한 면역 양성반응을 보이고(Jain 등, 1991), 미각 신경의 일차 구심신경이 시냅스하는 고립로핵(solitary tract nucleus)에서 glutamate를 분비하는 것으로 알려져 있다(Bradley 등, 1996). 비록 아직까지 맛봉오리에 대한 중추신경의 하행성 조절이 보고되어진 바는 없지만, 미각 신경핵 세포에서 glutamate(Bradley 등, 1996), GABA(Kim 등, 2005) 등 다양한 신경전달물질의 역할이 확인되고 있으며, 다른 특수감각기관에서는 원심성 조절이 잘 알려져 있어, 달팽이관에서 신경성 반향회로가 명확한 청각 인식과정에 중요한 역할을 하고 있으므로(Raphael과 Altschuler, 2003), 맛봉오리에서 중추 신경계로부터 지배한 신경에서 분비되는 glutamate를 미각 신호전달의 조절에 관여할 개연성을 배제할 수 없다.

최근 맛봉오리와 구심신경세포 또는 맛봉오리 사이의 주된 신경전달물질로는 ATP (Finger 등, 2005), 또는 serotonin(Huang 등, 2005)이 제시되었으며, 맛봉오리 세포 사이의 정보전달이 미각의 조절에 중요한 역할을 할 가능성이 시사되고 있다(Roper, 2006). 또한 맛봉오리 세포에서의 glutamate의 유리와 세포내 유입이 보고되어 있어(Nagai 등, 1996) 맛봉오리 세포들 간의 미각 조절에 관여할 가능성이 있다.

본 연구에서 확인된 kainate GluR의 구성단위는 GluR6와 KA1으로 생각되며 뚜렷한 세포의 종류에 따른 분포 비율의 차이는 발견되지 않았지만, 코발트 염색 양성인 세포는 주로 type II 세포였다. 실험 결과를 종합해 볼 때 맛봉오리의 kainate GluR은 주로 맛봉오리 세포 사

이의 신호전달과 관련된 신경전달물질의 유리를 조절할 가능성을 시사하고 있다. 그러나 보다 정확한 기능을 확인하기 위해서는 knock-out 동물의 제작을 포함한 광범위한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

맛봉오리 세포에서 kainate GluR가 발현되는 양상은 미각의 전환 기구를 이해하는데 매우 중요하다. 본 연구에서는 맛봉오리 세포에서 발현하는 kainate GluR의 분포를 GluR의 subunit과 미각 세포 종류에 따른 특이 항원에 대한 면역조직화학적 실험 및 코발트 염색법을 이용하여 확인하였다.

코발트 염색과 면역조직화학 실험의 이중 표지실험에서 1 mM glutamate에 의하여 유발되는 코발트 염색은 type II 세포에서 증가하였으며, 면역조직화학적 실험 결과 맛봉오리 세포에서 type II cell의 표지 단백질인 α -gustducin이 kainate GluR의 구성 단백질인 GluR6 또는 KA1 subunit과 함께 발현되는 경향을 보였다.

이상의 실험 결과는 맛봉오리의 kainate GluR이 type II 세포에서 발현되어 신경전달물질의 유리를 조절함으로써 미각의 조절에 관여할 가능성을 시사하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-041-E00368).

참고문헌

- 김경년, 천상우.: 특수감각, 전국치과대학(원)생리학 교수 협의회 저, 치의학을 위한 생리학, pp403-414, 대한나래 출판사, 서울, 2005.
- Bigiani A.: Mouse taste cells with glialike membrane properties. *J Neurophysiol.* 2001; 85: 1552-1560.
- Boughter Jr JD, Pumplin DW, Yu C, Christy RC, and Smith DV.: Differential expression of alpha-gustducin in taste bud populations of the rat and hamster. *J Neurosci.* 1997; 17: 2852-2858.
- Bowie D.: External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms.: *J Physiol (London).*;2002; 539:725-733.
- Bradley RM, King MS, Wang L, and Shu X.: Neurotransmitter and neuromodulator activity in the gustatory zone of the nucleustractus solitarius. *Chem Sens.* 1996; 21: 377-385.
- Caicedo A, Kim KN, and Roper SD.: Glutamate-induced

- cobalt uptake reveals non-NMDA receptors in rat taste cells. *J Comp Neurol.* 2000; 417: 315-324.
- Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, Barnes JM, Collingridge GL, and Henley JM.: Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature.* 1993; 79: 78-816.
- Chung KM, Chang JH, Park IW, Cho YK, Lee HS, and Kim KN.: Expression of AMPA and kainate receptor subunits in taste cells of rats. *Int J Oral Biol.* 2004; 29: 145-147.
- Chung KM, Lee SB, Heur R, Cho YK, Lee CH, Jung HY, Chung SH, Lee SP, and Kim KN.: Glutamate-induced cobalt uptake elicited by kainate receptors in rat taste bud cells. *Chem Senses.* 2005; 30: 137-143.
- DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, and Chaudhari N.: Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci.* 2006; 26: 3971-3980.
- Dingledine R, and Conn PJ.: Peripheral Glutamate Receptors: molecular biology and role in taste sensation. *J Nutr.* 2000; 130: 1039S-1042S.
- Farbmann AI.: Fine structure of taste bud. *J Ultrastruct Res.* 1965; 12: 328-350.
- Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, and Kinnamon SC.: ATP Signaling Is Crucial for Communication from Taste Buds to Gustatory Nerves. *Science.* 2005; 310: 1495-1499.
- Herness MS, and Chen Y.: Serotonin inhibits calcium-activated K⁺ current in rat taste receptor cells. *NeuroReport.* 1997; 8: 3527-3261.
- Herness MS, Zhao FL, Lu SG, Kaya N, Shen T, and Sun XD.: Adrenergic signaling between rat taste receptor cells. *J Physiol (Lond).* 2002; 543: 601-614.
- Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, and Roper SD.: Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J Neurosci.* 2005; 25: 843-847.
- Jain S, and Roper SD.: Immunocytochemistry of GABA, glutamate, serotonin, and histamine in *Necturus* taste buds. *J Comp Neurol.* 1991; 307: 675-682.
- Kim KN, Caicedo A, and Roper SD.: Glutamate-induced cobalt uptake reveals non-NMDA receptors in developing rat taste buds. *NeuroReport.* 2001; 12: 1715-1718.
- Kim MW, Park HO, Pahng MS, Park SW, Kim SH, Jung JY, Jeong YJ, and Kim WJ.: Effect of GABA on the gustatory nucleus tractus solitarius in rats. *Int J Oral Biol.* 2005; 30: 91-98.
- Lerma J.: Roles, and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4: 481-495.
- Mayer ML.: Crystal structure of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: Molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron.* 2005; 45: 539-552.
- Murray RG.: The ultrastructure of taste buds. in *The ultrastructure of taste organs.* edited by Friedmann I, pp 1-81, North Holland, Amsterdam, 1974.
- Nagai T, Delay RJ, Welton J, and Roper SD.: Uptake and release of neurotransmitter candidates, [3H]serotonin, [3H]glutamate, and [3H]GABA, in taste buds of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. *J Comp Neurol.* 1998; 392: 199-208.
- Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, and Sheng M.: GABAergic neurotransmission in rat taste buds: immunocytochemical study for GABA and GABA transporter subtypes. *Nature.* 2003; 424: 677-681.
- Pruss RM, Akeson RL, Racke MM, and Wilburn JL.: Agonist activated cobalt uptake identifies divalent cation-permeable kainate receptors on neurons and glial cells. *Neuron.* 1991; 7: 509-518.
- Pumplin DW, Yu C, and Smith DV.: Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *J Comp Neurol.* 1997; 378: 380-410.
- Raphael Y, and Altschuler RA.: Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull.* 2003; 60: 397-422.
- Roper SD.: The microphysiology of peripheral taste organs. *J Neurosci.* 1992; 12: 1127-1134.
- Roper SD.: Cell communication in taste buds. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 1494-1500.
- Song I, and Huganir RL.: Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 578-588.
- Yang R, Crowley HH, Rock ME, and Kinnamon JC.: Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 2000; 424: 205-215.