

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08495

研究課題名(和文) 嗅覚神経細胞における感度モジュレーションの分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of sensitivity modulation in ORCs

研究代表者

竹内 裕子 (Takeuchi, Hiroko)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：10324823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚受容の第一段階は、におい分子の持つ化学情報が生体電気信号に変換される過程である。外界から飛来したにおい分子が鼻腔内の嗅覚神経細胞受容体と結合して始まる。その後、CNGやCl(Ca)チャンネルを介して情報変換が起こる。情報変換の場は粘液層内にある線毛であるため、外部刺激による細胞の電気変化を測定することは可能である。しかし線毛は直径100-200nmであり、通常の顕微鏡の解像度以下であることから生きた線毛からの応答を測定することは困難であった。本研究では、技術的困難を克服して電気記録を取得し、チャンネル修飾による嗅覚感度の変化を定量的に解析し、論文・学会発表という形で国内・海外に発信した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、電気生理学的手法を始め複数の手法により以下の知見を得た。嗅細胞の線毛上に発現しているCNGチャンネルが嗅覚マスキングのターゲット。ある種の農薬がTCA同様に極低濃度でチャンネル活性を抑制。初段の分子モジュレーションにより生体レベルで嗅覚感度に影響。嗅覚感度低下がチャンネル抑制に起因。本結果により、嗅覚抑制を引き起こす可能性を示唆し、基礎研究、社会的、産業的、医学的にも重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The first step in sense of smell(olfaction) is the conversion of chemical information from odor molecules into bioelectrical signals. Odorant molecules from the outside begin to bind to olfactory receptor cells(ORCs) in the nasal cavity. Information conversion to bio-electric signals then occurs via CNG and Cl (Ca) channels. It is possible to measure the electrical changes in the ORCs caused by external odorant stimuli because the information is transferred by cilia in the mucus layer. However, it was difficult to measure the response from live cilia because the cilia were 100 -200 nm in diameter and were below the resolution of a conventional microscope.

In this study, we overcame technical difficulties, obtained bio-electrical signals, quantitatively analyzed changes in olfactory sensitivity due to channel modification, and reported the results via original articles, conference presentations and several meetings.

研究分野：電気生理学

キーワード：嗅覚情報変換 CNGチャンネル Cl(Ca)チャンネル 嗅覚マスキング パッチクランプ法 ケージド化合物
電気生理学 嗅線毛

1. 研究開始当初の背景

本課題研究開始当初、嗅覚に関する研究分野では、ヒトを用いた心理学的アプローチである官能検査や、細胞を用いても培養細胞上に様々な受容体タンパク質を発現させて匂い物質をかけて Ca イメージングで応答のあるなしを測定する定性的な研究や、動物から取り出した嗅細胞の線毛などの微細構造を切片で観察する研究が主流であり、生きた嗅細胞をそのまま取り扱い、更に線毛上のイオンチャネル活性で起こる電気記録をリアルタイムで測定し、定量的に解析する研究を行っている研究者は国内ではほとんどいない状態であった。世界に視野を広げても、欧米(アメリカ・ドイツ・イタリア・チリ)で数研究室が進めている状態であった。その原因として、線毛の直径が 100-200nm であり常に動いているため、通常の光学顕微鏡ではその姿さえ捉えることができないことから、生体試料としての取り扱いが難しく、市販の装置を使用するだけでは限界があったからである。更に、生体見るだけでも困難である上に、電気生理学的なアプローチを加えるに至っては、実験・研究ノウハウを持たない研究者には至難の業であろう。そして、この研究状況は本課題が終了する 2020 年にも至っても世界的、日本的にも何ら変わっていない。

嗅覚受容の第 1 段階である嗅細胞は鼻腔上部の嗅上皮内に位置する。外界に存在する匂い物質は、まず嗅上皮上の嗅粘液層に溶け込み、次に嗅細胞線毛上に発現している嗅覚受容体タンパク質と結合する。この結合は多対多であるため、1 種類の匂い物質でも複数の受容体とルーズに結合することが知られている。しかし、嗅覚受容の多様性は受容体タンパク質(R)のみであり、その後の情報変換カスケードはいかなる匂いでも共通している (Takeuchi et al., 2003)(上図)。線毛内でのカスケードは以下のようなものである。匂い分子が嗅覚受容体と結合し、G タンパク質(Golf)、アデニル酸シクラーゼ(AC)が順に活性化し、セカンドメッセンジャーである cAMP がサイクリックヌクレオチド感受性非選択性陽イオンチャネル(CNG チャネル)に結合し、開口すると、細胞外から陽イオンが流入することで電流が発生する。更に流入した Ca^{2+} により、 Ca^{2+} 感受性 Cl-チャネルが開き、CNG・Cl(Ca)チャネルが連続的に働くことで、非線形増幅を引き起こし(ヒル係数 5)、エネルギー効率のよい信号増幅機構を実現している (Takeuchi & Kurahashi, 2005)。また、これらのチャネルは線毛上に高密度で一様に発現している (Takeuchi & Kurahashi, 2008)。チャネル開口に伴う電位変化は活動電位の発生に変換され、軸索を通じて脳へと伝達して「匂い」として知覚される。嗅細胞におけるセカンドメッセンジャー(cAMP)は、線毛内のケージド化合物の光解離で生成し、CNG チャネルを直接開口させる (Takeuchi & Kurahashi, 2002)。「匂い」受容はこれまで、嗅細胞で起こる興奮性のシグナルに起因すると考えられてきたが「匂い物質自身が匂い応答を抑える」現象が既に嗅細胞のイオンチャネルレベルで起こっていることが明らかとなり (Chen et al., 2006)、細胞による応答電流抑制データがヒトでの嗅覚マスキング測定結果と高い相関を示した($R=0.8$)(Takeuchi et al., 2009)。特に、ワインの風味減少(コルクテイント)を引き起こす物質である 2,4,6-トリクロロアニソール(TCA)は極低濃度(aM レベル)でチャネルを抑制したことが示された(Takeuchi et al., 2013)。このように、嗅覚受容に関して、嗅細胞レベルでの興奮と抑制による信号の総和である、という概念は出来上がりつつあるが、チャネル抑制に関するメカニズムはまだ解明されていない。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本課題における研究目的は明白である。感覚神経細胞は、外来の刺激を生体信号へと変換し、高次(脳)に伝達する。匂いを知覚する嗅覚神経細胞(嗅細胞)では、線毛と呼ばれる直径 100 nm の微細構造体で情報変換が行われている。嗅覚受容の第 1 段階である嗅細胞での匂い情報変換は嗅覚感度を調節する重要なポイントであり、その調節メカニズム解明は、嗅覚疾患の原因解明や様々な匂い環境下における嗅覚受容の制御・改善に繋がる重要な課題である。現在は医療分野・産業界のみならず、国内外の多分野で「匂い受容・修飾メカニズム」が注目されている。これまでは嗅細胞の興奮こそが匂い受容であると信じられていたが、近年、嗅覚受容に抑制の概念があることが示されたものの、情報変換の場である線毛がナノスケール構造体であるため、詳細が不明である。

そこで、本研究では、嗅覚情報変換チャネルの実時間挙動の定量解析から「嗅覚感度モジュレーションの分子メカニズム解明」を目的として、生体嗅線毛をターゲットとした電気生理学的・光学的実験技術の同時併用可能なシステム開発とパッチクランプ法による電流記録・解析および光学測定により、これまで不可能であった線毛上の情報変換チャネルのダイナミクス解析から、最終的にヒトが「匂い」を感じる実感覚が、匂い物質による嗅細胞の興奮と抑制で引き起こされる分子メカニズムを解明することを目的とした。

具体的な目的は以下のように設定した。

1) 「匂いを感じる時」の嗅線毛内の分子ダイナミクス解析

「匂いを感じる」ためには、匂い分子の持つ化学的な情報は、嗅細胞線毛に局在して高密度に発現している CNG チャネルと Cl(Ca)チャネルの連続的な開口により電気信号へと変換される。セカンドメッセンジャーである cAMP・ Ca^{2+} の挙動をリアルタイムで自由に制御する実験系を用いて、直径 100nm の線毛内の分子動向を明らかにする。その際、線毛の微細構造に由来する実験技術的な困難を克服するために以下の技術を組み合わせたシステムを構築する。1) 微細構

造体の可視化, 2) 線毛へのケージド化合物導入と光解離による電流発生システム, 3) チャネル電流測定のためのパッチクランプシステム, 4) 単離細胞への匂い物質投与システム。これらを作製し、同時併用することで「生きた嗅細胞線毛内での分子の実時間挙動」を定量的に調べる。

2) 「匂い分子による細胞抑制の発生メカニズム」解明

これまで、匂い受容における抑制は高次機能で行われていると考えられていた。匂い物質が嗅細胞を興奮させることだけではなく、抑制させることが嗅覚受容の新しい概念として近年報告された(Takeuchi et al., 2009, 2013)。しかし、その分子メカニズムは不明である。信号抑制は大きく分けて2種類が存在すると考えられる。1つは、匂い刺激により、CNGチャネルを通して流入したCa²⁺がCa-CAM複合体を形成し、CNGチャネルを直接ブロックすることで、嗅覚順応が引き起こされる(Kurahashi & Menini, 1997)、細胞内での信号抑制。もう1つは、匂い物質自体がCNGチャネルを通る電流を細胞外からブロックすることで、嗅覚マスキングと呼ばれる(Takeuchi et al., 2009)、細胞外からの抑制である。これらより、細胞内外から応答電流が抑制されるメカニズムが存在し、「匂い情報」は嗅覚受容の第1段階である嗅細胞で、興奮と抑制の両パラメータにより信号の出力が決定される。そこで、パッチクランプ法でチャネル電流をモニタしながら、チャネル活性の興奮と抑制を制御する分子機構を明らかにする。

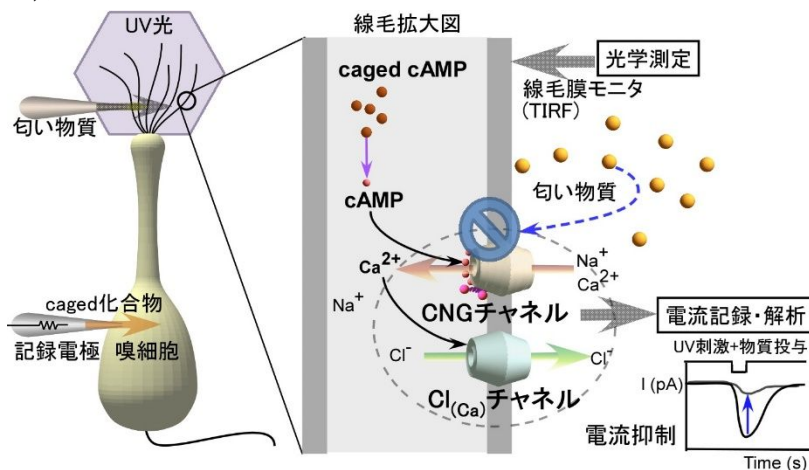
3) 「極低濃度で作用する抑制物質の探索と抑制の分子メカニズム」解明

TCAのEC₅₀は1 μMであり(Takeuchi et al., 2013)、抑制効果は強力である。TCAの前駆体であるTCPや自然界に存在する抑制物質であるゲラニオールは1,000倍、CNGチャネルブロッカーのL-cis diltiazemの100倍低濃度で作用するが、未発見の物質も存在すると思われる。また、TCAは高いLogD値を持ち(3.87)、TCAの類似構造を持つ化学物質のLogD値と電流抑制率との間には強い正の相関(R=0.89)が見られるため、TCAによる抑制・回復の時間経過から推測すると、線毛膜に作用し、間接的にチャネルの構造変化から抑制が生じる可能性が高い。そこで、膜脂質やチャネルの組成を制御し、濃度・時間依存的な応答抑制解析から、分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

電気生理(パッチクランプ法)を中心とした実験セットに、ケージド光解離システム、微細構造体である線毛の可視化システム(LSM・TIRF)、匂い物質投与システムを加えたセットアップを作製し、記録を取得・解析した。

システム構築として、LSMにパッチクランプデータ取得装置を組み込み、線毛の可視化と電流記録を同時適用できる装置を作製した。その際、LSMでは線毛の一部のみ(1 μm以下)に局所的に刺激を行うことが可能なシステムを構築し、キャリブレーションを測定・解析した後細胞実験を行った。微小区画の応答電流取得および同時に形態画像も取得可能にした。これらにより、線毛の可視化、チャネル活性の同時測定を可能とした。

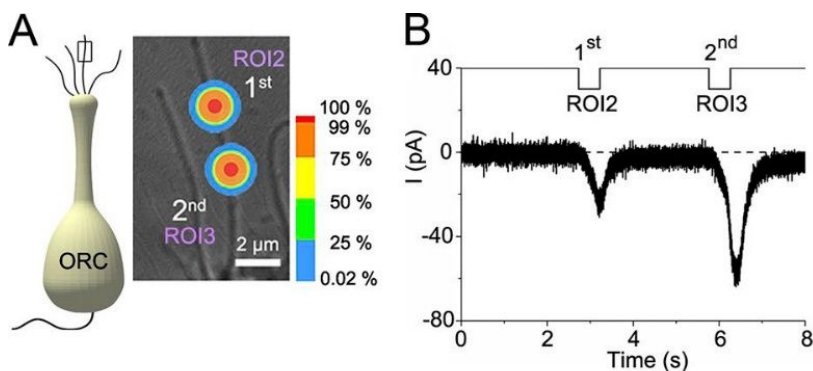


4. 研究成果

1) 単離嗅細胞線毛の分子ダイナミクス解析

LSM (Laser Scanning Confocal Microscope) および、TIRF(全反射照明蛍光顕微鏡)にそれぞれパッチクランプシステムを組み込み、システムを構築する。LSM セットアップでは、ケージド化合物(caged cAMP)を適用した単離嗅細胞線毛に微小局所光刺激を行い、電流記録を取得する。ナノスケール構造体である線毛は光学顕微鏡の分解能(200 nm)よりも、可視光線の波長(360-830 nm)よりも小さな直径(100 nm)を持つため、通常の顕微鏡では生理機能を維持したままの線毛の形態を可視化することが困難なためである。そこで、本研究では線毛内の一部分でのチャネル活性を電流値として測定するため、

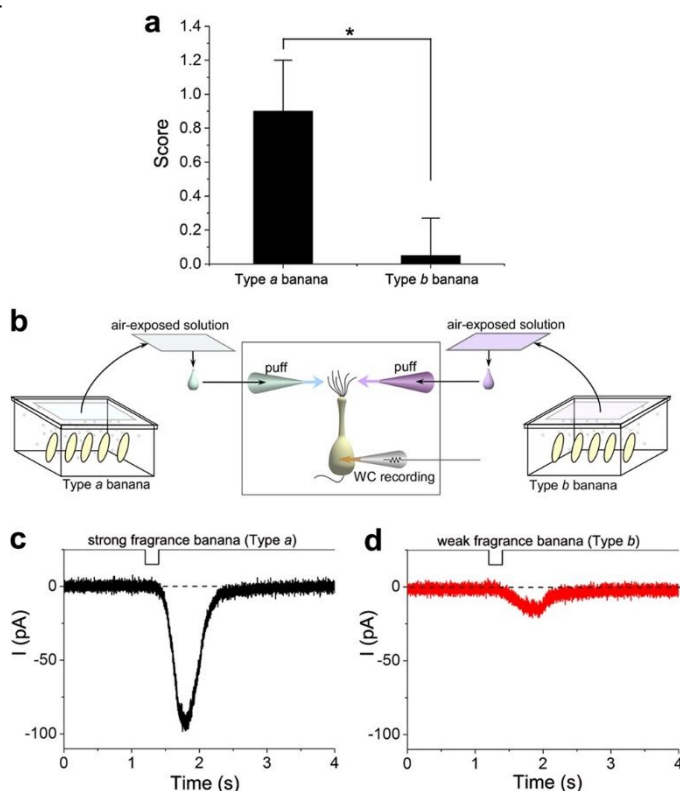
LSM-Region of Interest で、線毛上に1 μm²以下の任意の微小区画を選択し、その範囲のみにレーザー光を照射して、線毛内に導入したケージドcAMPを光解離する(右図)。光解離反応を局所的に引き起こすため、レーザービームのスポット径をサブマイクロレベルまで小さくすることの可能な、高NA=1.45、高倍率(x100)の対物レンズを使用する。使用レーザー波長は目的に応じて変え、ケージド解離に



は 351・364 nm を使用する。ケージド cAMP 解離後は生成した cAMP により CNG チャネルが開口し、流入した Ca^{2+} が Cl(Ca)チャネルが順に開口して電流増幅が引き起こされる。これは匂い分子が受容されて引き起こされる電流と同じ機構であることから、匂い刺激なしで、定量的な光刺激を加えて、チャネル活性を引き起こすことが可能とある (Takeuchi & Kurahashi, 2002, 2005, 2008)。TIRF セットアップでは、数百 nm 範囲での線毛の局所的な分子挙動を可視化するため、観察には 488 nm レーザーを用い、NA=1.7、高倍率(x100)の対物レンズを使用した。微小局所刺激によるチャネル応答電流解析：LSM セットアップを用いてケージド化合物を導入した単離嗅細胞の 1 本の線毛上の微小局所を選択し、レーザー光照射により、ケージド化合物を線毛内で解離させる。レーザー光量に伴い、生成した cAMP 濃度依存性に情報変換チャネル電流は増加するが、セカンドメッセンジャーである cAMP や Ca^{2+} が線毛内を拡散する場合、刺激を与えていない遠方の線毛上に発現しているチャネルも活性化する可能性がある。つまり、セカンドメッセンジャー分子の拡散を調べることで、チャネル活性の修飾範囲を検証することが可能となる。そこで、細胞内情報伝達因子(cAMP・ Ca^{2+})の線毛内挙動(拡散)とその効果を検証した。

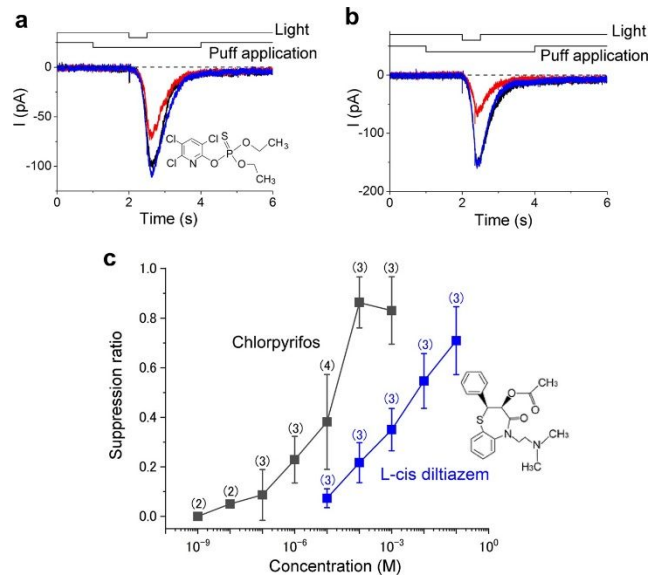
2) 匂い分子による細胞抑制の発生メカニズムの検証
匂い物質による細胞の興奮と抑制の発生メカニズムを検証した。

ヒトの嗅覚が抑制される現象(嗅覚マスキング)は CNG チャネル抑制が初段での分子メカニズムである。一般市場で流通している飲食品にもヒトの嗅覚を抑制させる物質が混入している過去の報告 (Takeuchi et al., 2013) を元に市販のパナナを用い、パナナから揮発する分子によるチャネル抑制を検証した。匂い物質はそれ自体が単体の化学物質であるが、飲食品に含まれる匂い物質は数十~数百の複数にわたる。各々の物質の化学的特性は大きく異なっていることから、どの成分が嗅覚マスキングに作用するかを、嗅細胞を用いて電気生理的に定量的に検証した。揮発させた匂い物質はパッチクランプ法ボルテージクランプモード($V_h = -50mV$)下の単離嗅細胞に適用し、電流値を指標として、チャネル活性抑制を測定した。予め、投与する匂い物質に対して、嗅細胞が応答しないことを確認した後、細胞内に導入しておいたケージド cAMP により、匂い刺激なく情報変換チャネルを活性化させて電流発生を引き起こす。その後、抑制物質候補の物質を投与し、応答電流の抑制を定量的に解析した。市販パナナにおける結果では、ヒトでのアンケート調査結果と細胞データとに矛盾は見られなかった。この結果から一般市場で流通しているパナナを含む飲食品には嗅覚感度を低下させる物質が含まれていることがあり、その場合、嗅覚受容の初段である嗅細胞のレベルで既に抑制が起こっていることが明らかとなった。その主な理由は嗅細胞線毛上に発現している情報変換チャネルのうち CNG チャネルの活性抑制であった。



3) 「極低濃度で作用する抑制物質の探索と抑制の分子メカニズム」検証

極低濃度で作用する TCA (TriChloroAnisole) だけではないと幾つかのパイロット実験から示唆を得たことで、未発見の抑制物質の探索と、その分子メカニズムの調査を行った。その結果、ある種の農薬にも TCA と同等の嗅覚抑制物質が含まれていることが明らかとなった。農薬の中でもクロルピリフォス (Chlorpyrifos) は低濃度で CNG チャンネル抑制を引き起こした。CNG チャンネルや Ca チャンネルの特異的プロッターとしても使用されている L-cis diltiazem の抑制効果 (dose-suppression relation) よりも嗅細胞レベルでは 1,000 倍程度強いことが示された。クロルピリフォスは農薬・シロアリ駆除などに用いられるコリンエステラーゼ阻害作用を持つ有機リン系殺虫剤の 1 つであり、食品衛生法における基準値以下の濃度で CNG チャンネル抑制を引き起こすことが明らかとなった。この結果により、ヒトが感じるおいしさの減少つまり風味抑制に嗅細胞線毛上のチャンネルが大きく関与していることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeuchi H, Kurahashi T	4. 巻 3
2. 論文標題 Suppression of olfactory signal transduction by insecticides.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NPJ Sci Food.	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41538-019-0042-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamari K, Takeuchi H, Kobayashi M, Takeuchi K, Kurahashi T, Yamamoto T.	4. 巻 S0385-8146
2. 論文標題 Electrical properties of cells from human olfactory epithelium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 30697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2019.01.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi H, Kurahashi T.	4. 巻 150
2. 論文標題 Second messenger molecules have a limited spread in olfactory cilia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gen Physiol.	6. 最初と最後の頁 1647-1659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.201812126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 8件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 竹内裕子
2. 発表標題 線毛内情報伝達分子の実時間可視化
3. 学会等名 2019年度 生理研研究会大阪「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム：構造生物学の先にあるもの」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉橋隆、竹内裕子
2. 発表標題 嗅細胞での内向き単一チャネルの検討
3. 学会等名 日本生理学会 第112回近畿生理学談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内裕子、倉橋隆
2. 発表標題 イモリ嗅細胞のベーサル活動に関する検討
3. 学会等名 日本生理学会 第112回近畿生理学談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Tamari, Hiroko Takeuchi, Masayoshi Kobayashi, Kazuhiko Takeuchi, Takashi Kurahashi, Tetsuro Yamamoto.
2. 発表標題 Electrical properties of cells from human olfactory epithelium.
3. 学会等名 95rd Annual meeting of the Physiological Society of Japan.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内裕子.
2. 発表標題 ワインのブシヨネの生体機能解明.
3. 学会等名 洋酒技術研究会.(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内裕子、倉橋隆
2. 発表標題 食品の臭み消しに関して嗅細胞レベルでの検討
3. 学会等名 日本生理学会 第111回近畿生理学談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉橋隆、竹内裕子
2. 発表標題 視細胞ターミナルや嗅線毛に存在するCa ²⁺ 感受性Clチャンネルの記録
3. 学会等名 日本生理学会 第111回近畿生理学談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内裕子
2. 発表標題 嗅覚マスキングとイオンチャンネルの抑制
3. 学会等名 日本動物細胞工学会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kengo Tamari, Hiroko Takeuchi, Masayoshi Kobayashi, Kazuhiko Takeuchi, Takashi Kurahashi, Tetsuro Yamamoto.
2. 発表標題 Electrical properties of cells from human olfactory epithelium.
3. 学会等名 95rd Annual meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内裕子
2. 発表標題 ワインのブシヨネの生体機能解明
3. 学会等名 洋酒技術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi
2. 発表標題 Ion channels mediating sense of smell
3. 学会等名 Seminar of Neurobiology of Ion Channels Department of Neurosciences, University of Groningen, The Netherlands (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroko Takeuchi
2. 発表標題 Olfactory Masking: Suppression of the Cyclic Nucleotide Channel on the Cilia
3. 学会等名 Osaka International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi.
2. 発表標題 Mechanisms of flavor loss in foods and beverages
3. 学会等名 Association for Chemoreception Sciences (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 竹内裕子
2. 発表標題 Molecular mechanism of the olfactory masking
3. 学会等名 日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroko Takeuchi
2. 発表標題 Haloanisoles suppress activation of the cyclic nucleotide-gated channel in the olfactory cilia
3. 学会等名 The Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroko Takeuchi
2. 発表標題 Modulation of CNG channel activity in olfactory cilia
3. 学会等名 International Conference of Physiological Science (ICPS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 竹内裕子、倉橋隆
2. 発表標題 Modulation of the olfactory transduction channel by small molecules
3. 学会等名 日本生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroko Takeuchi, Takshi Kurahahsi, Dietmar Krautwurst (Ed)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 199
3. 書名 Topics in Medical Chemistry, Taste and Smell	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----