

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15018

研究課題名(和文)Olfactory Marker Proteinを発現する視床下部神経の運命追跡

研究課題名(英文)Investigating the roles of Olfactory Marker Protein

研究代表者

中島 則行(Nakashima, Noriyuki)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：80625468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：嗅細胞は、種々の匂いに応答するために数百種もの匂い受容体を利用している。一方で、すべての嗅細胞は、Olfactory Marker Protein(OMP)というタンパク質を発現している。OMPは嗅細胞の内部に広く存在しているが、その生理的機能は謎だった。匂い刺激を与えると、嗅細胞の中では一般に「サイクリックAMP(cAMP)」というシグナル分子が増加する。OMP分子の表面に新たに見つかった「くぼみ」構造が、まるでスポンジのように速やかにcAMPを吸着することで、cAMPが供給過剰になることを防ぐことが分かった。この機構により嗅神経は、匂いの刺激に応答し続けることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主に嗅細胞マーカーとしてのみ頻用されてきたOMPの生理学的な機能として、細胞に普遍的に存在するcAMPを吸着もしくは放出することが明らかとなった。細胞内シグナルのcAMPは、膜電位の調節や遺伝子発現の制御など、精密に細胞内濃度が制御されていると考えられる。これまで、cAMPの産生および分解は、酵素によるメカニズムが知られていたが、本研究で発見したcAMP緩衝メカニズムは、空間的なcAMP濃度を素早く制御するうえで基礎的な機構と考えられる。OMPは、腸管や嗅覚以外の感覚器などでも発見されており、さまざまな細胞においてcAMP濃度の精密な制御を必要とする生理学プロセスでの役割が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Olfactory receptor neurons encode the environmental odors by combinatorial activities of hundreds of odorant receptors. Meanwhile, all the olfactory neurons express a unique protein named Olfactory Marker Protein (OMP). The biophysical action of OMP has been unclear. We discovered that OMP possesses pockets to bind to cAMP, an intracellular signaling molecule. With this binding property, OMP can acutely eliminate the surplus free cAMP from the cytosol during the continual odor sensing and also maintain the basal cAMP pool.

研究分野：Cell signaling

キーワード：cAMP Signal buffering PKA Neural resilience

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嗅覚神経細胞(嗅細胞)は、生涯にわたり新生を繰り返しながらも正確な軸索投射を再現することから、匂い応答だけでなく神経再生および神経ネットワーク形成の研究にも用いられている。嗅細胞研究において、成熟嗅細胞のマーカーとされてきた **Olfactory Marker Protein (OMP)**は、匂い受容や新生嗅細胞の軸索投射に影響が出ることが知られていた。しかし、45年にわたり生物物理特性と生理学的機能が不明であった(文献1)。

2. 研究の目的

OMPは、生体内でも嗅覚系に限らず広く発現することが知られていることから、何らかの普遍的な作動メカニズムがあると考えた。匂い受容や新生嗅細胞の軸索投射に、普遍的なセカンドメッセンジャーである **cAMP** が関与することに着目し、**OMP は cAMP と相互作用をするのではないかと仮説**をたてた。分子生物学から行動学およびゲノム解析に至る横断的戦略により **OMP** の普遍的な物性および生理学的役割の解明に挑んだ。

3. 研究の方法

(1) **OMP** と **cAMP** の物理的な結合を明らかにするために、生物発光共鳴エネルギー転移(**BRET**)を用いた。**OMP** とルシフェラーゼを融合したタンパク質に蛍光ラベルした **cAMP** を加えることで、量子エネルギーの転移効率を導き、その結果から **OMP** と **cAMP** の結合エネルギーの決定を行った。同様に **BRET** を用いて、その他のアデノシンヌクレオチドアナログとの結合能を明らかにした。

(2) 分子系統解析によって、**OMP** の遺伝子における分子特性を担う部位を特定し、**cAMP** との結合性を **in silico** シミュレーションを行った。さらに、変異型 **OMP** を用いて、**BRET** 実験を行い、**OMP** の表面で **cAMP** と相互作用をする部位を特定した。

(3) **OMP** 遺伝子と脱感作しない **cAMP** 感受性(**CNG**)チャンネル遺伝子をクローニングし、**HEK239T** 細胞に共発現させた。**OMP** 存在下におけるケージド **cAMP** に対する **CNG** チャンネル電流のキネティクスを膜電位固定法で定量化した。

(4) **cAMP** 感受性試験(ルシフェラーゼレポーターアッセイ)を用いて、定常状態での **cAMP** プールと **OMP** の関係を明らかにした。

(5) **OMP** ノックアウトマウスから得た嗅上皮のスライス標本を用いて、嗅細胞の電気生理学記録を実施し、**OMP** が感覚刺激応答における役割を明らかにした。

(6) **OMP** ノックアウトマウスを用いて、嗅覚を用いた持続探索行動を調べた。円形のアリーナの床に4つの穴があり、その中の1か所にエサを隠した。嗅覚による探索(スニフイング)によって、エサを見つけるまでの時間や成功率を調べた。

4. 研究成果

(1) 生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) により、OMP は高い cAMP 親和性を持つことが明らかとなった (約 - 37kJ/mol : 文献 2)。

(2) 分子結合シミュレーションにより OMP には、よく知られた cAMP 結合モチーフと、未報告のモチーフからなる 2 つのポケット構造があることを発見した。アミノ酸変異導入実験によって、そのうち 1 つのポケットは高い cAMP 結合能を示した。残るポケットは、高濃度での cAMP 存在下に結合することが分かり、アロステリックな効果を与えることが示唆された (文献 2、3 ; 次頁図 a)。

(3) HEK293T 細胞に発現した CNG チャネルは、UV フラッシュで活性化するケージド cAMP を用いて定常電流を生じた。一方で、OMP 存在下では CNG 電流は、cAMP による活性化を受けた後、速やかに減衰することが分かった。すなわち、細胞内に多く存在する OMP は全体としてスポンジのように機能し、匂い刺激ごとに遊離した cAMP を吸着して速やかに取り除く、すなわち「緩衝 (バッファー)」することで、CNG チャネルの応答時間を精密に制御していることが分かった (文献 2、4 ; 次頁図 b)。

(4) OMP が存在することで、外部からの刺激によることなく cAMP/PKA 依存性のルシフェラーゼによる発光シグナルが増加した。すなわち、cAMP の定常プールサイズが大きくなることが分かった。さらに、外部からの持続的な cAMP 負荷刺激を与えた。OMP 存在下では、低濃度 cAMP 刺激に対して発光シグナルがほとんど変化しなかったが、中程度より強い cAMP 刺激に対しては一定かつ十分な発光シグナルがみられた。つまり、弱い cAMP の変動に対しては変化を最小限にするという緩衝能力を示すことが分かった。これらの結果より、OMP は、急増する cAMP に対しては抑制的に働き、定常状態では結合した cAMP を持続的に遊離して PKA の基底活性を維持することで、OMP が cAMP バッファ蛋白として機能することが分かった (文献 5)。

(5) OMP 遺伝子が存在しないマウス (OMP ノックアウトマウス) から得たスライス嗅上皮に対して、電気生理学記録を実施し、嗅細胞の感覚刺激応答を調べた。単回の感覚刺激に対して野生型マウスの嗅細胞は速やかなバースト発火を示す一方、OMP 欠損嗅細胞は緩やかに発火頻度が増加し、そのまま長引く応答を示した。次に、連続刺激を与えたところ、野生型マウスの嗅細胞は持続的に高頻度の神経活動を示したが、OMP 欠損嗅細胞は最初に活動電位が急増した後に、自発活動レベル以下に抑制される「サイレント状態」が観察された。このサイレント状態は cAMP 負荷によって再現され、その状態で細胞外からのフィールド電場刺激により膜を過分極させると自発発火が回復した。そのため、サイレント状態は、持続的な膜の脱分極によって引き起こされた電位依存性 Na⁺チャネルの不活性化によるものと考えられた。これらの知見から、OMP は CNG チャネルの活性化持続時間を短くすることで、膜の持続脱分極を回避していることが分かった (文献 2 ; 次頁図 c)。

(6) さらに、野生型マウスと OMP ノックアウトマウスを用いて匂いを手がかりとした行動実験を実施した。匂いだけを手がかりにして穴の中に隠されたエサを探し当てる「匂い探索実験」を考案した。空腹状態の野生型マウスとヘテロノックアウトマウスは、匂いを手がかりに探索を開始後すぐにエサの場所を探り当てることができた。OMP ノックアウト

トマウスは、最初はエサの匂いに気づき探索を始めるが、匂いの元がどこにあるか正確には見つけられなかった。さらに **cAMP** 分解酵素の阻害薬(**PDEi**)を点鼻して **cAMP** の持続負荷状態を再現したところ、ヘテロノックアウトマウスは、目の前に置いたエサを「物体」として認識して近づき、何度か嗅ぐ行動をするが実際に食べようとはしなかった(下図 d)。代わりに、事前に訓練された穴の中にあるエサを探し続けた。このことから、匂いを手がかりとして「エサ」を認識できなかったと考えられる。これらの一連の実験結果より、**OMP** がない嗅細胞では、匂いの感覚刺激が続いたときに細胞の中で **cAMP** があふれ、匂いに対して応答しすぎの状態に陥り、途中で電気活動そのものを止めてしまう「サイレント状態」となり、マウスは匂いを感じにくくなると考えられた(文献 2)。結論として、**OMP** による **cAMP** の吸着作用は、変化し続ける感覚刺激に対して、嗅細胞が安定した匂い応答を続けるための新しい細胞内メカニズムと言える。

(7) ゲノム解析を行ったところ、**OMP** 遺伝子は、**Calpain5** 遺伝子のイントロンに埋め込まれた **Nested gene** であり、**OMP** と **Calpain5** は、排他的に発現することを見出した(文献 6)。**Calpain5** は核に発現することが知られ、遺伝子発現制御に関わると示唆される。今後、さらに新生細胞における **OMP** の発現制御機構の解明に挑む。



図. **OMP** の物性解明： **cAMP** 緩衝作用により嗅覚の感受性を維持する

a: コンピュータシミュレーションにより **OMP** に **cAMP** 結合部位が想定された。**b:** **OMP** 存在下に **CNG** 電流は、活性化した直後に速やかに減衰した。**c:** **OMP** 存在下では、持続的な **cAMP** 負荷時に嗅細胞の神経活動が維持された。**d:** **OMP** ヘテロノックアウト (+/-)マウスに、4つの穴のいずれかにエサが隠されていることを学習させた。**cAMP** 分解酵素阻害薬 (**PDEi**) 投与前は穴の中のエサを探し当てることができた。一方で **PDEi** 投与後は、目の前にエサが置かれても食べようとはせず、穴の中のエサを探し続けた(写真)。

<引用文献>

1 Margolis FL. Proc Natl Acad Sci USA. 1972;69(5):1221-1224.

2 Nakashima N. et al. Nature Commun. 2020;11(1):2188.

3 Nakashima N. et al. Biochem Biophys Res Commun. 2021;25:100887.

4 Nakashima N. et al. Biochem Biophys Res Commun. 2020;529(2):341-346.

5 Nakashima N. et al. Biochem Biophys Res Commun. 2020;531(2):203-208.

6 Nakashima N. et al. Mol. Brain. 2019;12(1):54.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Nakashima, Makoto Takano	4. 巻 25
2. 論文標題 Olfactory marker protein interacts with adenosine nucleotide derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100887	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 Akiko Nakashima, Taku Nakagawa, Makoto Takano, Noriyuki Nakashima	4. 巻 739
2. 論文標題 Olfactory marker protein contributes to the evaluation of odour values by olfactory glomerular processing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2020.135445	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 Akiko Nakashima, Mitsue Takeya, Keiji Kuba, Makoto Takano, Noriyuki Nakashima	4. 巻 21
2. 論文標題 Virus database annotations assist in tracing information on patients infected with emerging pathogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Informatics in Medicine Unlocked	6. 最初と最後の頁 100442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imu.2020.100442	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 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Nakashima, Makoto Takano	4. 巻 531
2. 論文標題 Olfactory marker protein elevates basal cAMP concentration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 203-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.087	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 Taku Nakagawa, Toshiharu Yasaka, Noriyuki Nakashima, Mitsue Takeya, Kensuke Oshita, Makoto Tsuda, Ken Yamaura, Makoto Takano	4. 巻 13
2. 論文標題 Expression of the pacemaker channel HCN4 in excitatory interneurons in the dorsal horn of the murine spinal cord	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00666-6	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 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Akiko Takaku-Nakashima, Harunori Ohmori, Makoto Takano	4. 巻 11
2. 論文標題 Olfactory marker protein directly buffers cAMP to avoid depolarization-induced silencing of olfactory receptor neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15917-2	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 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Nakashima, Makoto Takano	4. 巻 529
2. 論文標題 Olfactory marker protein captures cAMP produced via G s-protein-coupled receptor activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 341-346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.017	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 中島則行、中島明子、鷹野誠	4. 巻 21
2. 論文標題 Olfactory Marker ProteinはcAMPをバッファーする	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aroma Research	6. 最初と最後の頁 366-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Takaku-Nakashima, Makoto Takano.	4. 巻 12
2. 論文標題 Olfactory receptor neurons express olfactory marker protein but not calpain 5 from the same genomic locus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-019-0474-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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Noriyuki Nakashima, Akiko Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2. 発表標題 謎を解明: 嗅覚マーカー蛋白は匂い受容神経の応答持続性を制御する
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Akiko Nakashima, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2. 発表標題 Pooling and buffering cAMP assort roles of HCN and CNG channels to ensure stable olfactory navigation
3. 学会等名 NEURO2020 (The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society) CNS-JNS Joint Symposium "Novel mechanisms underlying behavior: From ion channel to neural circuit" (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島則行、中島明子、鷹野誠
2. 発表標題 細胞質 cAMP 緩衝タンパク質による生体膜 cAMP 感受性チャネル活動の時間制御
3. 学会等名 生理学研究所 研究会2020「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」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Nakashima, Akiko Taura, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2 . 発表標題 Olfactory marker protein buffers cAMP by direct binding to avoid depolarization-induced silencing of olfactory receptor neurons
3 . 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Akiko Nakashima, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2 . 発表標題 Olfactory marker protein sharpens cAMP-signal transduction to ensure repetitive olfactory neural responses
3 . 学会等名 The 48th Naito Conference (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Akiko Nakashima, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2 . 発表標題 Cyclic AMP buffering sharpens olfactory signal transduction and ensures repetitive olfactory neural responses
3 . 学会等名 NEURO2019(The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 62nd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Akiko Nakashima, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2 . 発表標題 Olfactory marker protein controls cAMP-throughput capacity via cAMP-gated channels in normosmia
3 . 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS2019) Congress in conjunction with the 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriyuki Nakashima
2. 発表標題 Olfactory marker protein buffers cAMP in olfactory receptor neurons
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP/YRUF/AISCRIB 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島則行
2. 発表標題 嗅覚マーカー蛋白はcAMPを吸着し、嗅覚受容細胞の安定した発火を支える
3. 学会等名 第19回ブレインサイエンス研究会～初心に戻って脳科学を考える～
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島則行、中島輝恵、田浦晶子、中島明子、大森治紀、鷹野誠
2. 発表標題 嗅覚マーカー蛋白はcAMPを吸着する
3. 学会等名 第69回西日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島則行
2. 発表標題 Cyclic AMP buffering reconciles olfactory resilience and adaptation.
3. 学会等名 第20回ブレインサイエンス研究会～ブレインサイエンスを楽しく語る～
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noriyuki Nakashima, Kie Nakashima, Akiko Taura, Akiko Takaku, Harunori Ohmori, Makoto Takano
2. 発表標題 Cyclic AMP buffering proteins support the phasic and tonic functions of olfactory receptor neurons.
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	鷹野 誠 (TAKANO Makoto)		
研究協力者	中島 輝恵 (NAKASHIMA Kie)		
研究協力者	中島 明子 (NAKASHIMA Akiko)		
研究協力者	武谷 三恵 (TAKEYA Mitsue)		
研究協力者	田浦 晶子 (TAURA Akiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	中川 拓 (NAKAGAWA Taku)		
研究協力者	久場 敬司 (KUBA Keiji)		
研究協力者	大森 治紀 (OHMORI Harunori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関