

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19355

研究課題名（和文）嗅覚系における匂いの混合物のコーディングロジック

研究課題名（英文）Odor mixture coding in the olfactory system

研究代表者

今井 猛（Imai, Takeshi）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70509851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：最近の我々のin vivoイメージング実験によって、嗅神経細胞はしばしば抑制性応答、拮抗作用、相乗効果など、複雑な匂い応答を示すことが明らかになってきている。本研究においては、匂い分子と嗅覚受容体の相互作用をin vivoとin vitroで詳しく解析し、匂い分子による抑制性応答や、混合させたときの様々な非線形効果について、受容体レベルで解析した。その結果、相乗効果が正のアロステリック制御によって生じること、アロステリックサイトにおけるリガンド結合にも受容体ごとの多様性が存在することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来から、嗅覚受容体による匂い識別について、「組み合わせコード」が提唱されていたが、これは単一の匂い物質がどのように嗅覚受容体によって認識されるのかを記述したものであった。本研究では、匂いの混合物のコーディング機構を研究し、匂い分子と受容体の組み合わせコードがオルソステリックサイトとアロステリックサイトの両方で存在すること、両者の組み合わせによって匂いの混合物のコーディングが決まることを明らかにした。この成果は、1000種類の嗅覚受容体による匂い識別の理論を確立するものならず、香料や消臭剤を新たに開発する上で重要な視点になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our recent in vivo imaging experiments have revealed that olfactory neurons often exhibit complex odor responses, including inhibitory responses, antagonism, and synergistic effects. In this study, we analyzed the interactions between odor molecules and olfactory receptors in vivo and in vitro in detail and investigated the We analyzed various nonlinear effects of the mixture of odor molecules at the receptor level. As a result, it was found that synergistic effects are caused by positive allosteric regulation and that there is receptor-specific diversity in ligand binding at allosteric sites.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅覚受容体 アロステリック制御

1. 研究開始当初の背景

これまで、匂い分子は嗅神経細胞を「活性化」し、その組み合わせコードで認識されるとされてきた。また、匂いの混合物は、その線形和として表現されるとされてきた。しかしながら、我々が独自に確立した嗅神経細胞細胞体の *in vivo* カルシウムイメージングの結果、嗅神経細胞はしばしば抑制性応答を示すこと、匂いの混合物はしばしば非線形的な増強（相乗効果）・抑制効果（拮抗抑制）を示すことが明らかになってきた（Inagaki et al., *Cell Rep*, 2020）。こうしたことから、従来の考え方は再考を要する状況となっている。匂い分子はまず OR によって検出されることから、嗅覚知覚に関する様々な問題の理解において最も基本的な重要性を有している。

2. 研究の目的

哺乳類の嗅覚系において、多様な匂い分子は、約 1000 種類存在する嗅覚受容体（OR）の組み合わせによって識別される。従来、匂い分子はこれらの嗅覚受容体の「活性化パターン」によって認識されると考えられてきた。しかしながら、こうした研究は、単一の匂い分子を動物に嗅がせる実験によって確立された考え方である。一方、自然界の匂いは単一の匂い分子からなっていることはきわめてまれであり、多くは複数の匂い分子が複雑に混ざり合ったものであるが、そうした匂いの混合物がどのように認識されるのかは十分に調べられていない。我々らの最近の *in vivo* イメージングの研究から、嗅神経細胞は匂い分子に反応して活性化するだけでなく、しばしば抑制性応答を示すことが判明した（Inagaki et al., *Cell Rep*, 2020）。更に、複数の匂い分子の混合物を嗅がせると、しばしば互いの匂い分子反応を抑制し合ったり（拮抗抑制）、強め合ったりする（相乗効果）ことが明らかになった。従来、匂いの混合物はその線形和として認識されるものと考えられてきた。しかしながら、我々のデータによれば、末梢レベルにおける匂い反応はそんなに単純ではなく、匂い認識の基本的なロジックを根本から再考する必要が生じている（Inagaki et al., *Cell Rep*, 2020）。本研究においては、匂い分子と OR の相互作用を *in vitro* と *in vivo* の両方で詳しく解析し、匂い分子による抑制性反応や、混合させたときの様々な非線形効果について、そのロジックを解明することをめざした。これによって、1000 種類の OR に基づく匂い情報（特に匂いの混合物）のコーディング理論を再構築することが期待される。

3. 研究の方法

OR のアロステリック制御の解析

本研究では、まず、マウス嗅上皮の *in vivo* カルシウムイメージングにより、嗅神経細胞（OSN）細胞体の匂い反応を計測し、アゴニストに対するにおい反応をノンアゴニストがどのように修飾するのかを詳しく解析した。特に、相乗効果のメカニズムに対して更なる示唆を得るため、ノンアゴニストがアゴニストの反応曲線をどのように変化させるのか、詳しく解析した。

酢酸アミルに反応し（酢酸アミル = アゴニスト）、pent アナールに反応しない（バレラルデヒド = ノンアゴニスト）OSN に着目し、酢酸アミルの濃度反応曲線をバレラルデヒドがどのように変化させるのか、*in vivo* カルシウムイメージングにより検討した。

アロステリックリガンドの特異性の解析

次に、ノンアゴニストがアゴニスト活性を正に制御する場合、どのようなリガンド特異性があるのかを解析した。具体的には、酢酸アミルに反応し（酢酸アミル = アゴニスト）、ブタナール、ペントナール、ヘキサナールのいずれにも反応しない（C4-6 のアルデヒド = ノンアゴニスト）OSN に着目し、酢酸アミルの濃度反応曲線を C4-6 アルデヒドがどのように変化させるのか、*in vivo* カルシウムイメージングにより検討した。

4. 研究成果

OR のアロステリック制御の解析

ノンアゴニストはしばしばアゴニストの濃度反応曲線を左方シフトないし上方シフトさせることが判明した。左方ないし上方シフトは、ノンアゴニストの用量依存的に大きくなった。この結果は、ノンアゴニストがアロステリックエンハンサーとして作用していることを強く示唆している。同様の実験は別の複数の匂い分子セットにおいても確認された。

アロステリックリガンドの特異性の解析

同じ濃度のブタナール、ペントナール、ヘキサナールが、酢酸アミルに対してどのように濃度反応曲線を変化させるか解析したところ、その程度がアルデヒドの種類および OSN によって異なっていることが判明した。ある OSN においては、3 種類のアルデヒド全てによって正のアロステリック効果が観察されたが、別の OSN においては、1 ないし 2 種類のアルデヒドによってのみ正のアロステリック効果が観察された。この結果は、アゴニストの結合サイト（オルソステリックサイト）と同様、アロステリックサイトにも、OR 毎に異なるリガンド特異性が存在することを強く示唆している。

以上の結果から、OR にはオルソステリックサイトとアロステリックサイトの両方の結合部位が存在し、それぞれ OR ごとに異なる結合特異性を有していることが強く示唆される。従来、多様な匂い分子を受容する仕組みとして、オルソステリックサイトのみを考慮した「組み合わせコード」が提案されていたが、我々の結果は、アロステリックサイトにも「組み合わせ」的な結合があることを示唆している。従って、匂いの混合物の受容は、オルソステリックサイトとアロステリックサイトの両方の組み合わせによって決まると考えるべきである（図1）。

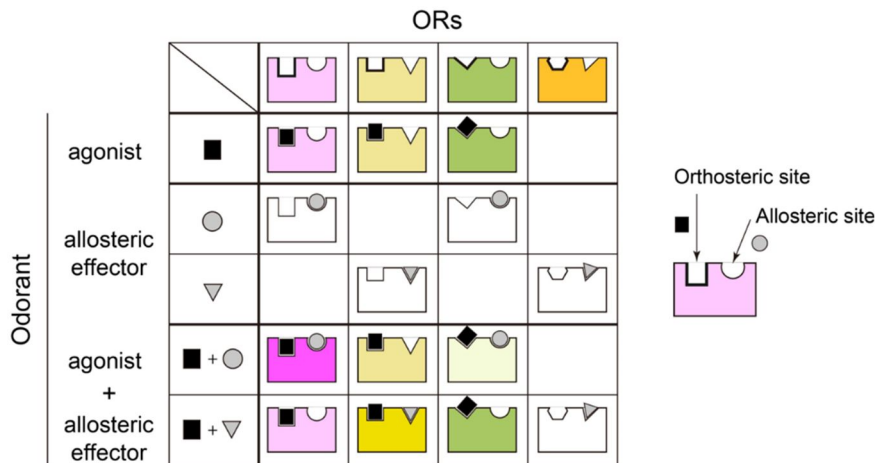


図1 オルソステリックサイトとアロステリックサイトの両方を考慮した匂い検出の組み合わせコード

この説をより直接的に受容体レベルで証明するため、現在、複数の嗅覚受容体の *in vitro* アッセイを進めている。具体的には、培養細胞を使った *in vitro* アッセイと *in silico* のドッキングシミュレーションを併用し、嗅覚受容体に結合する匂い分子を網羅的にスクリーニングしている。特に、既に CryoEM によって活性化型の構造が報告されている hOR51E2 を中心に解析を進めている。これらを使ってアゴニスト応答をノンアゴニストがどのように修飾するのか示すとともに、変異体解析を行い、物理的にアロステリックサイトがオルソステリックサイトとは離れた位置にあることを証明する。

以上の成果は、匂いの混合物を受容するためのメカニズムを明らかにし、嗅覚系におけるアロステリック制御の重要性を示すとともに、アロステリーに着目した香料開発のための基盤を提供するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aihara Shuhei, Fujimoto Satoshi, Sakaguchi Richi, Imai Takeshi	4. 巻 35
2. 論文標題 BMPR-2 gates activity-dependent stabilization of primary dendrites during mitral cell remodeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109276 ~ 109276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109276	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 Inagaki Shigenori, Iwata Ryo, Imai Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo Optical Access to Olfactory Sensory Neurons in the Mouse Olfactory Epithelium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e4055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4055	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 Leiwe Marcus N., Fujimoto Satoshi, Imai Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Post hoc Correction of Chromatic Aberrations in Large-Scale Volumetric Images in Confocal Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 760063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2021.760063	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 Fritsch Bernd, Elliott Karen L.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of the olfactory system: from sensory neurons to cortical projections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Evolution of Neurosensory Cells and Systems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1201/9781003092810	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 該当する

1. 著者名 Leiwe Marcus N., Fujimoto Satoshi, Baba Toshikazu, Moriyasu Daichi, Saha Biswanath, Sakaguchi Richi, Inagaki Shigenori, Imai Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Automated neuronal reconstruction with super-multicolour fluorescence imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.10.20.512984	査読の有無 無
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 Fujimoto S, Leiwe MN, Aihara S, Sakaguchi R, Muroyama Y, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Saito T, Imai T	4. 巻 -
2. 論文標題 Activity-dependent local protection and lateral inhibition mediate synaptic competition in developing mitral cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 -
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 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5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 今井 猛
2. 発表標題 末梢嗅覚系における匂い情報コーディングのin vivo計測
3. 学会等名 第5回感覚フロンティア研究シンポジウム (2021年大阪大学タンパク研セミナー) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井 猛
2. 発表標題 嗅覚系における匂いの混合物の検出機構
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Fukata, Shigenori Inagaki, and Takeshi Imai
2. 発表標題 Allosteric modulations in odor mixture responses
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Imai
2. 発表標題 Visualization of flavor perception
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Imai
2. 発表標題 In vivo imaging of odor coding in the peripheral olfactory system
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

疾患情報研究分野 (生理学教室) | 今井研究室
<https://www.lab.med.kyushu-u.ac.jp/dn/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------