

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500357

研究課題名（和文）嗅繊毛における生体情報変換機構の研究

研究課題名（英文）Mechanisms of transduction system in the olfactory cilia

研究代表者

倉橋 隆（KURAHASHI TAKASHI）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：90225251

研究成果の概要（和文）：われわれの嗅覚は嗅覚粘膜でスタートし、そこにある嗅覚受容器のナノレベル繊毛で化学—電気情報変換がなされる。本研究プロジェクトでは、新規な嗅覚刺激法や、電気生理学とケージド化合物、UV レーザー光学的手法を組み合わせ、繊毛上の局所刺激に対する応答から、刺激受容の空間分布、マスキングの分子構造特性、に関する研究を行った。繊毛内 Ca に対して実時間制御を行った結果、情報変換過程における繊毛内で応答は空間的に独立であり、cAMP や Ca イオンの拡散が起こりにくいこと、また、嗅覚マスキングは匂い分子が細胞膜に融合してから起こる可能性が高いことなどを提唱した。

研究成果の概要（英文）：Molecular diffusion in solutions is known to occur in the general neurons and cells. However, olfactory receptor cells have cilia, which having a nano-scale structure. In fact, olfactory transduction cascade exists within the cilia locally, it is important to know the spatial distribution and temporal kinetics of the transduction elements (cAMP and Ca²⁺) in the transduction cascade within the cilia in real-time. However, there were technical difficulties using nano-scale cilia. In the previous report, we overcame such technical limitation using patch clamp, nano-scale ROI, and fluorescent imaging (Fluo3 or 4) simultaneously. These results indicated that olfactory response was linear-summation at local in the cilia, which was caused by the existence of the diffusion limitation in the cilia. The olfactory masking showed presumably representing the integration of the substance into the hydrophobic site of the membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理生理学（1104）

キーワード：嗅覚マスキング・LogD・匂い分子・CNG チャネル・光活性化物質

1. 研究開始当初の背景

われわれの嗅覚は嗅覚粘膜でスタートし、そ

こにある嗅覚受容器のナノレベル繊毛で化学—電気情報変換がなされる。嗅覚の特性に

は、a.匂い識別様式、b.信号増幅の分子機能、c.嗅覚順応の分子機構、d、嗅覚マスキングが挙げられるがその分子機構には未知の点が残される。嗅細胞の匂い情報変換は、Gタンパク質、細胞内 cAMP によって仲介され、CNG チャネルの開口によって電気信号発生する。ここを通過して流入する Ca が細胞内側から即座に興奮性の Cl チャネルを開口する。また、Ca イオンは嗅覚順応を制御する (Kurahashi & Menini, 1997 Nature)。このように細胞内では cAMP と Ca イオンが嗅覚の情報変換に密接な役割を演じている。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトでは、細胞培養法、マスキングの分子構造特性、刺激受容の空間分布に関する研究を行うことを目的とした。これを遂行するために新規な嗅覚刺激法や、電気生理学と UV レーザー光学的手法を組み合わせ、従来技術的に困難とされてきたナノレベル器官内での分子挙動計測、分子制御を行う点に新規性をおいた。我々が開発する新システムを用いて、ナノ構造繊毛を観察し、繊毛内部の分子を制御し、分子挙動を実時間レベルモニターして、従来から残されてきた問題を解決し、「香り感覚受容の諸特性」を、物理化学的分子実体と挙動の観点から説明することを本プロジェクトの目的とした。嗅細胞の匂い情報変換は、Gタンパク質、細胞内 cAMP によって仲介され、CNG チャネルの開口によって電気信号発生する。ここを通過して流入する Ca が細胞内側から即座に興奮性の Cl チャネルを開口する。また、Ca イオンは嗅覚順応を制御する (Kurahashi & Menini, 1997 Nature)。このように細胞内では cAMP と Ca イオンが嗅覚の情報変換に密接な役割を演じているが、従来の研究においては、ナノメートル領域の細胞空間が実験調査の進展を阻んでいた。本研究では、細胞内 cAMP 制御、cAMP モニターに加えて、嗅覚マスキングの分子機構が CNG チャネルの閉鎖、その過程の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

初年度の実験では、LSM 統合システムを用いて、パッチクランプ法を適用して電流記録を取りながら、ケージド化合物 (ケージド AMP) を適用した単離嗅細胞線毛に多ポイント微小局所光刺激を行った。ナノスケール構造体であるシリアは光学顕微鏡の分解能 (200 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きたまま可視化することが困難である。更に生きたシリア内での分子ダイナミクスを可視化することは技術的に困難を極める。そのため、NA=1.4 の高 NA 対物レンズを使用し、レーザースポット径を小さくすることを考慮した。使用レ

ーザーは目的に応じて異なる波長を用いた。ケージド解離には 351・364 nm、刺激タイミング検知にはフォトダイオードの最適感度波長である 488nm を用いる。LSM-ROI (Laser Scanning Confocal Microscope-Region of Interest) システムを用いて、シリア上に ROI を用いて 1 μm もしくはそれ以下の任意の微小区画を選択し、その範囲内のみレーザー光を照射することで、局所的にケージド化合物を解離させることが可能である (Takeuchi & Kurahashi, 2008)。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 $\text{Cl}_{(\text{Ca})}$ チャネルが順に開口して更なる電流増幅が引き起こされる。局所レーザー刺激部位や大きさは任意に選択できるため、1 μm 以下のナノスケールでの刺激も可能となる。この局所レーザー刺激に対する応答電流を記録し、電気生理学的特性を解析した。また、レーザー顕微鏡による線毛の可視化に関しては、次に、蛍光インジケータについて、細胞内 Ca^{2+} 感受性インジケータとして、当時は Fluo3 が他細胞でも広く使用されていたが、本研究での対象は直径 100 nm 線毛であることから、可視化の際には、蛍光効率・強度の高い試薬を選択するため、効果の高い試薬を模索し、Fluo4 や Fluo8 等の最高効率の試薬を使用した。可視化とともに、パッチクランプ法を適用し、電流記録を行った。

4. 研究成果

本研究プロジェクトでは、細胞培養法、マスキングの分子構造特性、刺激受容の空間分布に関する研究を行った。新規嗅覚刺激法として電気生理学と UV レーザー光学的手法を組み合わせることで、従来技術的に困難とされてきたナノレベル器官内での分子挙動計測を可能とし、特に分子制御を行う点に新規性・重要性を考慮して開発した。新システムでは、ナノ構造繊毛を観察し、繊毛内部の分子を制御し、分子挙動を実時間レベルモニターして、従来から残されてきた問題を解決し「香り感覚受容の諸特性」を、物理化学的分子実体と挙動の観点から説明した。嗅細胞の匂い情報変換は、セカンドメッセンジャーである cAMP や Ca^{2+} によって仲介され、CNG チャネル、Cl チャネルの連続的な開口で電気信号発生する。しかし同時に、CNG チャネルを流入した Ca^{2+} が CNG チャネル自身にフィードバックをかけることで嗅覚順応起こる (Kurahashi & Menini, 1997 Nature)。このように細胞内では cAMP と Ca イオンが嗅覚の情報変換に密接な役割を演じているが、従来の研究においては、ナノメートル領域の細胞空間が実験調査の進展を阻んでいた。本研究では、細胞内因子制御技術及び因子のリアルタイム可視化、嗅覚マスキング

の分子機構が CNG チャネルの閉鎖であること、その過程の分子メカニズムを世界に先駆けて発表した。また、絨毛内 Ca^{2+} に対して実時間制御を行った結果、情報変換過程における絨毛内で応答は空間的に独立であり、少なくとも 2 マイクロメートル以上の距離間では cAMP や Ca イオンの拡散が起らないこと、これは、細胞内 Ca バッファーに依存すること、また、嗅覚マスキングは匂い分子が細胞膜に融合してから起こる可能性が高いことなどを提唱し、国内外の学会で発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Kishino Y, Kato H, Kurahashi T, Takeuchi H. Chemical structures of odorants that suppress ion channels in the olfactory receptor cell. *J Physiol Sci*. 査読有 61 巻(2012) 231-245 DOI: 10.1007/s12576-011-0142-2
- ② Tamari K, Takeuchi H, Kobayashi M, Kurahashi T, Yamamoto T. Suppression and recovery of voltage-gated currents after cocaine treatments of olfactory receptor cells. *Auris Nasus Larynx*. 査読有 40 巻 (2012) DOI:10.1016/j.anl.2011.11.002
- ③ 竹内裕子・倉橋隆. 嗅覚の細胞分子生物学. におい香り環境学会誌. 査読無 41 巻(2010) 82-91.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 竹内裕子 加藤寛之 倉橋隆 2,4,6-Trichloroanisole is a potent blocker of olfactory signal transduction. 第 90 回 日本生理学会 2013 年 03 月 27 日~2013 年 03 月 29 日東京タワーホール船堀
- ② 倉橋隆. 生体ナノチューブ嗅覚絨毛における分子挙動と産業とのかかわり. 第 5 回 香りに関する産学フォーラム (招待講演) 2012 年 11 月 09 日. 東京大学本郷キャンパス.
- ③ 竹内裕子 加藤寛之 倉橋隆 コルク汚染は 2,4,6-Trichloroanisole による嗅細胞 CNG チャネル抑制である. 第 104 回 近畿生理談話会 2012 年 10 月 01 日~2012 年 10 月 01 日. 大阪医科大学
- ④ 竹内裕子 倉橋隆. 単一嗅絨毛内細胞内因子の拡散制限. 日本動物学会 第 83 回大会. 2012 年 09 月 13 日~2012 年 09 月 15 日. 大阪大学 豊中キャンパス
- ⑤ 竹内裕子・倉橋隆 単一嗅細胞における

絨毛内細胞内因子のリアルタイム拡散制限. 膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析研究会. 2012 年 09 月 06 日~2012 年 09 月 07 日. 生理学研究所.

- ⑥ 倉橋隆. 嗅覚の分子機構. The 1st International Congress of Aromatherapy (招待講演) 2012 年 8 月 31 日-9 月 2 日. 国立京都国際会館.
- ⑦ 倉橋隆. 嗅覚初期過程の分子機構. 第 25 回におい・かおり環境学会(招待講演) 立命館大学 びわこ・くさつキャンパス 2012 年 08 月 23 日~2012 年 08 月 24 日
- ⑧ Hiroko Takeuchi, Hiroyuki Kato, Takashi Kurahashi. Off-Flavors in Foods and Beverages Cause a Potent Blockage of the Olfactory Signal Transduction. The Association for Chemoreception Sciences (AChemS). 2012 年 04 月 25 日~2012 年 04 月 28 日 Huntington Beach, California, USA.
- ⑨ Takeuchi, H, Kurahashi, T. 単一嗅絨毛内セカンドメッセンジャー因子の拡散制限. 第 89 回 日本生理学会大会 2012.3.30. 長野県松本市 松本市立体育館.
- ⑩ Kurahashi, T においを感じる仕組み. におい研究交流会. 2012.3.15. 愛知県名古屋市大同大学
- ⑪ Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. Effect of cytoplasmic calcium buffer on the lateral spread of the olfactory transduction signals in the olfactory cilium. 7th FAOPS. 2011.9.
- ⑫ Takeuchi, H, Kurahashi, T. Effect of cytoplasmic Ca buffer on the lateral spread of olfactory information in the olfactory cilium. The Association for Chemoreception Sciences (AChemS) 33rd Annual Meeting. 2011.4.16. St. Pete Beach. FL. USA.
- ⑬ 倉橋隆. 香り感覚の最先端科学: 嗅覚の特性を説明する分子機構. アロマセラピー学会 特別講演 (招待講演). 2010 年 10 月 10 日. 大阪国際会議場
- ⑭ 倉橋隆. 化学感覚(味覚・嗅覚)の分子生物学. 日本心理学会 シンポジウム (招待講演). 2010 年 9 月 22 日. 大阪大学(豊中キャンパス)
- ⑮ 倉橋隆. 島津製作所 イブニングフォーラム (招待講演) 2010 年 9 月 2 日. 幕張メッセ.
- ⑯ 竹内裕子・倉橋隆. 嗅細胞シリアにおける匂い物質による情報伝達チャネルの修飾. 第 87 回 日本生理学会. 2010 年 5 月 19 日. いわて県民情報交流センター
- ⑰ 岸野佑圭子・竹内裕子・倉橋隆. 嗅細胞

シリアの蛍光物質による可視化. 第87回
日本生理学会. 2010年5月19日. 盛岡市
市民文化ホール

- ⑱ 吉田太一・竹内裕子・倉橋隆. 嗅細胞の
電位依存性 K チャンネルにおける匂い物質
による抑制. 第 87 回 日本生理学会.
2010 年 5 月 21 日. 盛岡市民文化ホール
- ⑲ 玉利健悟・竹内裕子・小林正佳・倉橋隆・
山本哲朗. 嗅細胞の膜電流に対する塩酸
コカインの影響. 第87回 日本生理学会.
2010 年 5 月 21 日. 盛岡市民文化ホール
- ⑳ Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi.
Diffusion limitation of cytoplasmic
elements within the olfactory cilium.
AChemS 32nd Annual Meeting. 2010, 4,
22. St. Pete Beach (FL, USA)

〔図書〕(計 1 件)

- ① 倉橋隆 福井寛 光田恵. トコトンや
さしい においとかおりの本. 日刊工
業新聞社. 2012 年 160 ページ.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: カチオンチャンネル阻害剤及びこれを含
有する嗅覚感度低下剤組成物

発明者: 倉橋隆・竹内裕子・加藤寛之

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類:

番号: O 1 1 J 4 0 6 9

出願年月日: 2012.1.23

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋隆 (KURAHASHI TAKASHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号: 90225251