

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間： 2006 ~ 2008
 課題番号： 18700382
 研究課題名 (和文) ケージド化合物を用いた神経細胞情報伝達システムのリアルタイム定量解析
 研究課題名 (英文) Quantitative analysis of transduction cascade with caged-compounds in the cell.
 研究代表者 竹内 裕子
 (TAKEUCHI HIROKO)
 大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
 研究者番号：10324823

研究成果の概要：

嗅細胞シリア上に発現している情報変換チャネルの局在を更に詳細に調査した結果、シリア上に発現している情報変換チャネル (CNG チャネル・Cl (Ca チャネル)) が一様に分布していることを明らかにし、局所的な UV 刺激により、ケージド Ca を誘起させたことによる、Cl (Ca) チャネルの分布を明らかにした。本結果は学会・論文で発表を行った。学会発表は、2006 年度：国際学会 2 件、国内学会 1 件、2007 年度：国際学会 2 件、国内学会 1 件、2008 年度：国際学会 3 件、国内学会 2 件を行った。論文は全て査読つき雑誌に受理され、2006 年 The Journal of General Physiology (Chen et al.,) 2008 年 The Neuroscience (Takeuchi H & Kurahashi T)、アロマリサーチ (Sugahara et al.,) に掲載された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	300,000	3,800,000

研究分野：神経・筋

科研費の分科・細目：神経・筋生理

キーワード：神経科学・シグナル伝達・感覚生理学・生体分子・生理活性

1. 研究開始当初の背景

ヒトが感じることの出来る匂いは地球上に約40万種類あることが知られている。その多様な匂いは各々分子量約300-400程度の炭素化合物からなる匂い分子によって構成され、その匂い分子は嗅細胞の繊毛 (シリア) に存在するレセプタ蛋白と結合することで嗅覚情報変換が開始される。40万種類もある匂い物質を感知する嗅覚メカニズムの多様性の仕組みを遺伝子学的に解明した

研究は2004年度のノーベル医学・生理学賞の受賞対象となった (Buck & Axel)。匂い情報変換の場となるシリア上には遺伝子によりコードされた1種類のレセプタ蛋白が発現し、ヒトは350種類のバリエーションのレセプタ蛋白を発現するため、匂い物質とレセプタ蛋白は多対多の応答様式を持つことが明らかとなった。しかし、レセプタ蛋白だけでは匂いを感じることはできない。つまり、匂い分子の持つ化学情報を電気信

号へと変換することができない。本研究ではレセプタ以降のシグナル情報伝達カスケードの分子ダイナミクスを定量的に解析することを目的とする。匂い物質とレセプタ蛋白質が結合した後、活性化したレセプタ蛋白質により、嗅覚特異性G蛋白質 (G_{olf}) α サブユニットが飛び出し、 α サブユニットは膜上にランダムに配置しているアデニール酸シクラーゼ (AC) と結合し、活性化させる。その結果、細胞内のATPがcAMPに加水分解され、嗅細胞シリア内のcAMP濃度が上昇する。このcAMPは嗅細胞トランスダクションカスケードにおけるセカンドメッセンジャーである。4分子のcAMPは1個のサイクリックヌクレオチド感受性チャンネル (CNGチャンネル) を開口させるため、急激な細胞内cAMP濃度上昇によって、瞬時に多数のCNGチャンネルが開口する。細胞外から陽イオン (Na^+ ・ Ca^{2+}) が流入し、流入した Ca^{2+} により、Ca依存性Clチャンネルが開口し、 Cl^- が流出することにより、高協同性を示す大きな電流増幅が発生する。その結果、匂いの化学信号が物理信号である活動電位へと変換され、高次中枢である脳へと伝達していく。これまで嗅覚情報伝達カスケードを構成する各因子に関して、生化学的なアプローチや分子遺伝学的アプローチにより、多くの定性的な知見が得られたが、現段階においては、生理学的手法を用いた嗅覚受容メカニズム各因子の定量的な解明が期待されている。そこで本研究では、レセプタ蛋白質が匂い分子と結合してから後、匂い物質の持つ化学情報を脳へと伝える電気信号へと変換する働きを担う嗅細胞情報伝達システムに着目し、細胞内メッセンジャー物質の細胞内での効果を知るための手法の一つであるケージド光乖離システムを導入した。過去の研究では一連のシステムを構築する因子の定性的な研究は存在しているが、各因子をリアルタイムに記録し、定量的に解析した電気生理学的研究は数少ないという状況であった。

2. 研究の目的

そこで、嗅覚情報伝達に関わる細胞内因子の定量的解析を詳細に検討し、嗅細胞を光で制御するという新しい方法を用いることで、生体内で起こる化学反応や物理応答の即時応答性を解明することを目的として本研究を立ち上げた。シリア内での濃度変化や分子ダイナミクス、シリア間での応答特性をリアルタイムに解析することを初期目標とした。今回の一連のプロジェクトにつ

いて特筆すべきは、直径 $0.2\mu m$ という非常に微細な構造を持つシリア内での分子レベルの経時的動向を解明するため、ケージド化合物を嗅細胞シリアに導入し、UV光を用いて、微小空間内で細胞内情報伝達因子 (cAMP・Ca) 濃度を自由にコントロールできるシステムを用いることで、これまで不可能であった物質の濃度制御が可能となる点である。

3. 研究の方法

本研究では、モデル細胞として嗅覚神経細胞を用いた。細胞にはあらかじめ、蛍光物質と共にケージド化合物を導入させておき、ホールセルパッチクランプ法を適用すると同時に、蛍光物質による形態確認とシリアにおいてナノスケールの範囲でUV照射を行うことで、局所的な部位のケージド物質の解離に伴い、チャンネルの開口へと引き続き、最終的には電流発生・実時間記録・解析を行う実験が可能であった。使用した本システムは、レーザーコンフォーカル顕微鏡とパッチクランプ装置を組み合わせ、生体内で起こる化学反応や物理応答の即時応答性を見ることができるといった大きなメリットがあった。更に、細胞内物質を光で制御する手法を取ったため、物理量での刺激が可能となり、従来使用されてきた化学物質による刺激よりもより定量的な解析が可能となった。

4. 研究成果

本研究において、嗅覚神経細胞における新規知見を発表した。

1) ケージド cAMP を導入した嗅覚細胞のナノスケール構造を持つシリアに対して、サブマイクロンレベルのローカル光刺激を行い、嗅覚情報伝達に関与する CNG チャンネル・Cl (Ca) チャンネルのローカライゼーションを明らかにした。これまでは、情報伝達チャンネルはシリアの根元に多く局在しているという報告があり、電気生理学的な特性としても、これらのチャンネルの発現部位は明らかになっていなかった。これはシリアがナノスケールであり、しかも生体の電気生理学的挙動を記録するのに、実験技術的な問題多く存在したからである。そこで、本研究では、ナノシリアを可視化するためには、コンフォーカルマイクロスコープ・LSMシステム、蛍光物質であるルシファー・イエローを用いた。ケージド化合物解離により発生した cAMP による CNG 開口に引き続く、応答電流はパッチクランプ法ボルテージクランプモードで記録した。その結果、嗅シリア上には全ての部位において、CNGチャンネルが発現

していることを明らかにすることができた。

2) これまで、化学物質により嗅細胞が応答することは多くの報告があったが、化学物質により、その匂い応答が抑制されることに関しては、多くの知見を持たなかった。本研究では、匂い物質による嗅覚マスキングの分子メカニズムを明らかにした。その結果、匂いによる嗅覚マスキングはCNGチャンネルをターゲットに行われ、情報チャンネルであるC1 (Ca) チャンネルにはほとんど影響がないことも明らかとなった。

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)

査読つき国際雑誌

① Takeuchi H and Kurahashi T. (2008) Distribution, amplification, and summation of cyclic nucleotide sensitivities within single olfactory sensory cilia. *Journal of Neuroscience*: 28, 766-775.

査読つき国内雑誌

② 菅原亜弓・吉田真理子・竹内裕子 嗅細胞イオンチャンネルの定量解析 ノイズ解析の効率を図るプログラム開発 (MS-Windows application executing the non-stationary noise analysis of whole-cell transient current) *Aroma Research* Vol9, No3, 233-240. (2008).

③ Chen TY, Takeuchi H and Kurahashi T. (2006). Odorant inhibition of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel with a native molecular assembly. *J Gen Physiol*. 128(3):365-71.

[学会発表] (計 15 件)

① 竹内裕子・引地聰・倉橋隆 ナノバイオマスキングの分子メカニズム解明. JASTS (The Japanese Association for the Study of Taste and Smell (Annual meeting)). 富山・2008/9/17-20. 招待シンポジウム発表

② 倉橋隆・竹内裕子・石田浩彦・引地聰 嗅覚マスキングに関わる嗅細胞トランスダクションチャンネル抑制機構. JASTS (Annual meeting) 富山・2008/9/17-20.

③ 竹内裕子・倉橋隆 嗅細胞における信号増幅を司るC1(Ca)チャンネルの特性 JASTS (Annual meeting) 富山・2008/9/17-20.

④ Takeuchi, H & Kurahashi, T. Spatial Distribution of the Signal Transduction System in the Single Olfactory Cilia. *Physiological Society of Japan* (Invitation symposium, Annual meeting) 大阪・2008/9/13.

⑤ Takeuchi, H & Kurahashi, T. Visualization, manipulation, recording of nanotube olfactory cilia. ECR0 (Congress of European Chemoreception Research Organization) スロベニア (ポルトロズ)・2008/9/3-7.

⑥ Kurahashi, T., Takeuchi, H., Ishida, H & Hikichi, S. CNG block may reduce the olfactory sensitivity. ECR0. スロベニア (ポルトロズ)・2008/9/3-7.

⑦ Kurahashi, T., Takeuchi, H., Ishida, H & Hikichi, S Mechanism of Olfactory Masking ISOT (International Symposium on Olfaction and Taste)・米国 (サンフランシスコ)・2008/7/21-26.

⑧ Takeuchi, H. & Kurahashi, T. Visualization, manipulation and recording of nanotube olfactory cilia. ISOT・米国 (サンフランシスコ)・2008/7/21-26.

⑨ Takeuchi, H. & Kurahashi, T. Photolysis of Caged Calcium in the Olfactory Sensory Cilia. *Physiological Society of Japan* (Annual meeting) 東京・2008/3/25-27.

⑩ Sugahara, A., Oi, H., Kurahashi, T & Takeuchi, H. MS-Windows application executing the non-stationary noise analysis of whole-cell transient current. *Physiological Society of Japan* (Annual meeting) 東京・2008/3/25-27.

⑪ Takeuchi, H. & Kurahashi, T. Spatial Distribution of Transduction System with Nano-scale Resolution in Living Olfactory Cilia. AchemS (Association for Chemoreception Sciences) (Annual meeting) 米国 (サラソタ)・2007/4/25-29.

⑫ Takeuchi, H. & Kurahashi, T. Sub-micron UV-laser regulation of cytoplasmic factor in living sensory cilia. *Physiological Society of Japan* (Annual meeting) 大阪・2007/3/20-23.

⑬ Takeuchi, H & Kurahashi, T. Real-time dynamics of molecular elements within the nano-scale olfactory sensory cilia. *International Symposium of Olfaction and Taste.* (Invitation symposium) 2006/7/11-13.

⑭ 竹内裕子・倉橋隆 嗅細胞シリアにおける信号増幅機構・日本生理学会・前橋・2006/3/28-30.

⑮ Takeuchi H & Kurahashi T. MECHANISM OF SIGNAL AMPLIFICATION IN THE NEWT OLFACTORY SENSORY CILIA. AChemS・米国 (サラソタ)・2006/4/26-30

[図書] (計 2 件)

① Editoted by Allan Basbaum etal (H Takeuchi , T Kurahashi) The Senses: A Comprehensive Reference, Six-Volume Set, 1-6 (Volume 4: Olfaction & Taste 4. 28 :Signal Transduction in the Olfactory Receptor Cell). Elsevier. 2009.

② 竹内裕子 「第4章第2項：嗅細胞のイオンチャネル特性」匂いと香りの科学 朝倉書店 p87-93. (2007).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 裕子 (TAKEUCHI HIROKO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：10324823

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：