

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500350
 研究課題名（和文）嗅覚刺激と感覚繊毛内分子カスケードの連携
 研究課題名（英文）Correlation between olfactory stimulation and transduction cascade within the sensory cilia

研究代表者

倉橋 隆（KURAHASHI TAKASHI）
 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
 研究者番号：90225251

研究成果の概要（和文）：

嗅覚はナノスケールの感覚神経（嗅繊毛）でスタートする。嗅覚情報伝達カスケードにおいて、Ca イオンの役割は信号非線形増幅（Cl(Ca)チャネル開口）、信号制御（adaptation）に代表されるように多様かつ重要である。本プロジェクトは、嗅覚システムの分子挙動を実時間でモニターすることによって、従来から残されてきた問題を解決し「香り感覚受容」という生理学的システムを空気中の匂い分子の到達過程から嗅繊毛内で構成される分子の実体と挙動の観点から説明した。

研究成果の概要（英文）：

Olfaction starts at the olfactory sensory cilia which have nano-scale structure. In the olfactory transduction cascade, it is an important because Ca can cause olfactory adaptation and non-linear signal amplification. In this project, we solve the problem that had been left conventionally by monitoring the molecular dynamics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学 生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：Ca、cAMP、嗅覚、ケージド化合物、繊毛

1. 研究開始当初の背景

嗅覚はナノスケールの嗅繊毛（直径 100nm、長さ数 10 ミクロン）でスタートする。空中に浮遊する匂い物質は、分子量 300-500 の炭素化合物と定義されている。このような匂い物質が揮発性を伴い、鼻腔内に到達する。

その後、嗅粘液層に溶け込み、嗅神経細胞のシリア、と呼ばれる繊毛にヒットする。この繊毛上には匂い分子受容蛋白質が発現しており、匂い分子が結合することで、分子情報伝達カスケードが ON となる。匂いの識別はすべて、この受容蛋白質が行っている。その

後の情報変換は、受容蛋白、嗅覚特異性 G 蛋白質、アデニル酸シクラーゼ、と引き続き、更には、細胞内で発生した cAMP が CNG チャネルと結合することで、電流発生が認められる。この電流発生により、細胞外から流入した Ca イオンによって Ca 依存性 Cl チャネルが連続的に開口することで、匂い分子の持つ化学情報が電気信号へと変換される。情報変換の過程は、匂いが粘液中に溶け込む際の分子の気相/液相分配、繊毛での分子連鎖が関与し、定性的には理解されている。しかし繊毛は微細構造ゆえにシステムを定量的に知ることは実験的に困難とされ多くの問題が残されている。本研究では、この繊毛内で起こる情報変換を定量的に解明することを目的とする。嗅覚の特性には、a. 匂い識別 (匂いの種別と細胞応答性/受容蛋白質との相互関係) b. 信号増幅 (いかに匂いの情報を細胞情報へ結びつけるか) c. 嗅覚順応、d. 嗅覚マスキングなどが挙げられる。これら機能解析のために実時間による繊毛内分子ダイナミクスを実測する。

2. 研究の目的

嗅覚情報伝達カスケードにおいて、Ca イオンの役割は信号非線形増幅 (Cl (Ca)チャネル開口)、信号制御 (adaptation) に代表されるように多様かつ重要である。本プロジェクトは、嗅覚システムの分子挙動を実時間でモニターすることによって、従来から残されてきた問題を解決し「香り感覚受容」という生理学的システムを空気中の匂い分子の到達過程から嗅繊毛内で構成される分子の実体と挙動の観点から説明することが最終目的である。

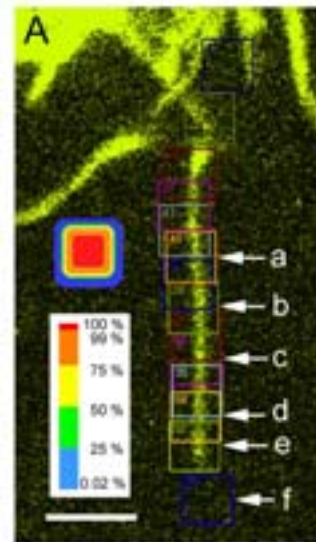
3. 研究の方法

本研究では、電気生理学と光学的手法を組み合わせ、従来技術的に困難であった微小構造体内での分子挙動の実時間での制御・可視化、分子移動のシミュレーション検証に新規性において、実験を計画・遂行した。実験対象である嗅繊毛直径は 100 nm という限られた微小空間であるため、内在している分子の挙動を実時間で測定するために、パッチクランプ法による電流測定と蛍光インジケータ (Fluo4) による可視化を使用した。

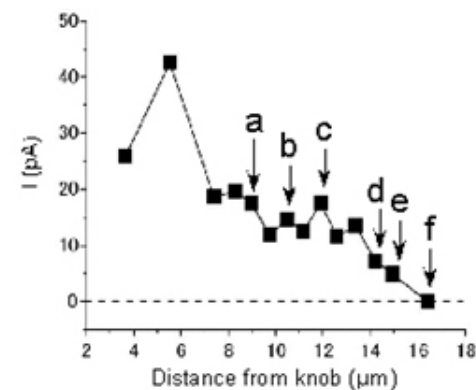
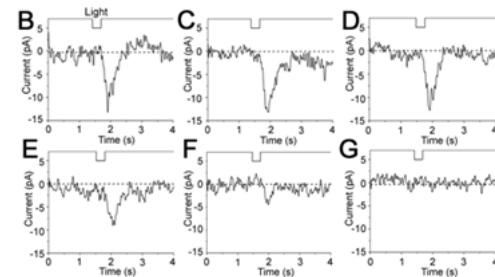
4. 研究成果

LSM 統合システムを用いて、ケージド化合物 (ケージド AMP) を適用した単離嗅細胞シリア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という点と、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たため、高 NA 対物レンズを使用して、レーザースポット径を小さくして刺激をおこなっ

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、その範囲内だけに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となった (Takeuchi & Kurahashi, 2008)。



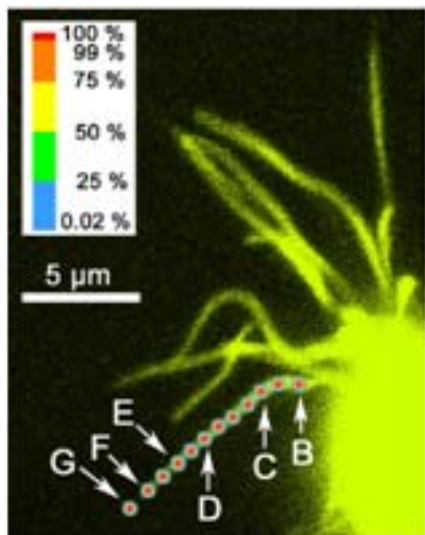
ケージド cAMP 解離後は生成した cAMP により CNG チャネルが開口し、流入した Ca²⁺ が Cl (Ca)チャネルが順に開口して更なる電流増幅が引き起こされる。局所レーザー刺激部位や大きさは任意に選択できるため、1 μm 以下のナノスケー



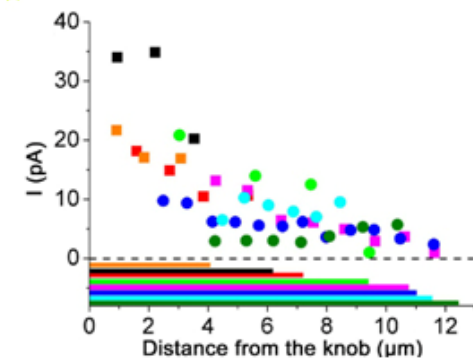
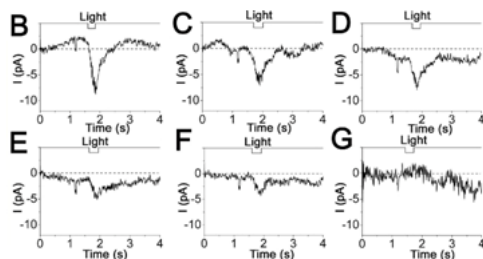
ルでの刺激も可能である。この局所レーザー刺激に対する応答電流を記録し、電気生理学的特性を解析した。また、レーザー顕微鏡によるシリアの可視化に関しては、次に、蛍光

インジケータについて、細胞内 Ca²⁺感受性インジケータとして、Fluo3・4・5 が他細胞でも広く使用されており、本研究においても、広く検討を行った。

また、得られた単一シリアでの電気生理学的特性を踏まえ、単一シリア上でナノスケールの区画を任意に選択し、シリアに沿って刺激を行ったところ、どのシリアにおいても応答電流の発生を確認することができた。このことより、シリアにはケージド cAMP で開口するチャンネル (CNG チャンネル) が一様に存在していることが明らかとなった (図 1 参照)。更に、ケージド Ca を用いた同実験を行った結果、同様にシリア全体で局所的な応答電流を確認することができたため、Cl (Ca) チャンネルもシリア全体に広く一様に分布していることが明らかとなった (図 2 参照)。



更に任意の部位を 2 箇所選択して、刺激位置とし、1 本のシリア上の 2 ポイントの刺激位置は時間差を置いて、順番にレーザ



ー光によるダブルパルス刺激を行うことで、

刺激した部位のみで cAMP が生成し、局所的な電流発生が起こった。刺激光強度・時間・位置のパラメータを多様に変化させて、ダブルパルス刺激を行い、得られた応答電流を記録し、定量的に解析した。その結果、繊毛内では 2μm 以上の距離を Ca イオン拡散が起こらないことが明らかとなったため、その内容を報告した。しかし、狭小空間内の分子移動をシミュレートした結果、空間を構成する膜上に Ca イオンが結合することで空間内拡散に制限がかかること可能性が示唆され、更に Cl (Ca) チャンネルが繊毛上に広く発現している点 (Takeuchi & Kurahashi, 2008) とあわせると、繊毛内コンパートメントとして情報変換を行い、繊毛全体がその機能を有していることが示唆された。

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 1 件)

Takeuchi H, Ishida H, Hikichi S, Kurahashi T. (2009). Mechanism of olfactory masking in the sensory cilia. *Journal of General Physiology*. Vol 133, 583-601pp.

[学会発表](計 8 件)

竹内裕子、倉橋隆. 嗅繊毛内におけるセカンドメッセンジャーの拡散制限: 電流解析と可視化. 近畿生理学談話会. 2009. 12. 13. 大阪大学

玉利健悟、竹内裕子、小林正佳、倉橋隆、山本哲朗. 塩酸コカインによる嗅細胞 Na⁺ 電流の抑制作用と安全性検討. 近畿生理学談話会. 2009. 12. 13. 大阪大学

吉田太一、竹内裕子、倉橋隆. 嗅覚マスキングと匂い物質による電位依存性 K⁺ チャンネルの抑制. 近畿生理学談話会. 2009. 12. 13. 大阪大学.

Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi, Hirohiko Ishida, Satoshi Hikichi. Nano-Manipulation of Olfactory Sensation. IUPS(国際生理科学連合)大会. 2009. 8. 1. 京都国際会議場

Yukako Kishino, Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. Visualization and quantitative analysis of the nano-scale olfactory sensory cilia. IUPS(国際生理科学連合)大会. 2009. 8. 1. 京都国際会議場

Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. Mechanism of olfactory masking in the sensory cilia. IUPS(国際生理科学連合)大会. 2009. 7. 30. 京都国際会議場

Taichi Yoshida, Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. Suppression by odorants of

voltage-gated ion channels of newt olfactory receptor cells. IUPS(国際生理科学連合)大会.2009. 7. 30.京都国際会議場

Ryo Sakane, Takashi Kurahashi. Single K channels in the newt olfactory receptor neuron. IUPS(国際生理科学連合)大会 2009. 7. 29. 京都国際会議場

6 . 研究組織

(1)研究代表者

倉橋 隆 (KURAHASHI TAKASHI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授

研究者番号：90225251

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：