

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24年6月11日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500351

研究課題名（和文） 水系の鼻を利用した微絨毛嗅細胞の機能研究

 研究課題名（英文） Study of microvillus olfactory receptor cells
with the nose for the aqueous habitat

研究代表者

恒成 隆（TSUNENARI TAKASHI）

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30286439

研究成果の概要（和文）：

本研究では微絨毛嗅細胞の機能を明らかにすることを目的として、水棲動物鼻腔内の嗅上皮における線毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞の応答を計測・解析した。本研究を通じて、嗅上皮スライス標本からのホールセルパッチクランプ記録系およびリンガー液中に浸した状態での嗅電図記録系を確立し、それぞれの記録系で嗅細胞の応答を解析した。嗅電図記録では線毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞の応答特性の差が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this project, the function of microvillus olfactory receptor cells was studied on the olfactory epithelium in the nasal cavity of aquatic animals where both of microvillus olfactory cells and ciliated olfactory receptor cells exist together. The whole-cell recording system was developed for the olfactory epithelium of these animals. In addition, the electroolfactogram recording system was developed for the olfactory epithelium submerged in Ringer solution. The electroolfactogram from bullfrogs and goldfish revealed the difference in the dependence of the extracellular Na ion on the recovery phase of the olfactory response in these animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：感覚、嗅覚、微絨毛、情報変換

1. 研究開始当初の背景

多くの陸生脊椎動物は、経鼻の化学感覚を2系統もつ。このうち、主嗅覚器が揮発性の嗅物質を感知するのに対して、鋤鼻器は不揮

発分子やフェロモン類の受容に重要とされている。それぞれには形態が異なる嗅細胞が分布する。主嗅覚器には、細胞先端部に線毛をもつ線毛嗅細胞があり、その線毛で嗅物質を受容すると電氣的に興奮する。鋤鼻器には

細胞先端部に微絨毛をもつ微絨毛嗅細胞が分布し、その微絨毛部で化学物質を感知する。

これらの互いに細胞先端部の構造が異なる嗅細胞では、化学刺激から電気的興奮への情報変換機構も異なるとされている。線毛嗅細胞では、嗅刺激時に嗅受容体、Gタンパク質、アデニル酸シクラーゼの活性化で生成されたcAMPが陽イオンチャネルを開き、NaイオンとCaイオンを流入させて興奮性電流を生じる。流入したCaイオンはCaイオン依存性Clイオンチャネルを開き、Clイオンの流出が応答電流をさらに増幅する。

一方、微絨毛嗅細胞では受容体、Gタンパク質、ホスホリパーゼCの活性化によりチャネルが開き、細胞が脱分極すると仮定されてきた。しかし、線毛嗅細胞の機構がかなり解明されてきたのに対して、微絨毛型では不明な点が多い。特にチャネルを開く二次伝達物質や、細胞の応答には線毛嗅細胞と比べてどのような差異があるかには不明点が多い。

水生脊椎動物において外界の水環境に接する嗅上皮では、線毛、微絨毛嗅細胞の両方が同じ嗅上皮に混在しているものがある。例えば硬骨魚では同じ嗅上皮に両型の嗅細胞が分布する。また、成体のツメガエルでは、主鼻腔（気系用）と鋤鼻器にはそれぞれ線毛嗅細胞、微絨毛嗅細胞が分かれて分布するが、鼻腔中憩室にある水系用の嗅上皮には、両嗅細胞が混在している。このような硬骨魚やツメガエルの水系用の嗅細胞では線毛型、微絨毛型の両方がアミノ酸や核酸類などに広く応答することが知られており、嗅刺激やその応答の観察が効率良く行える利点がある。

2. 研究の目的

本研究では微絨毛嗅細胞の機能特性を調べることを目的とした。脊椎動物の嗅細胞には、嗅物質を受容する部分の形態が互いに異なる、線毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞がある。このうち、線毛嗅細胞については近年飛躍的に解明が進んだ一方で、異なる化学受容機構を持つとされる微絨毛嗅細胞では、実際の嗅応答の様態・メカニズムについて以前不明な点が多い。本研究では、水棲動物がもつ水系の鼻を利用して、同じ嗅上皮において線毛嗅細胞と微絨毛嗅細胞の応答を比較することで微絨毛嗅細胞の機能を調べた。

3. 研究の方法

(1) 水棲動物嗅上皮スライス標本の作成

アフリカツメガエル鼻腔中憩室の嗅上皮またはキンギョ嗅上皮を剥離し、ニトロセルロース膜上にシアノアクリレート接着剤で固定後、上皮に対して垂直に、カミソリ刃を

備えたチョッパー式スライサーで150~200 μm の厚さに薄切することにより嗅上皮スライス標本を得た。

(2) 嗅上皮スライスからの嗅細胞ホールセル記録

得られた嗅上皮スライス切片は、切断面上にして記録チャンバーのスライドガラス面上に載せ、ナイロン線を張った白金線で押さえてリンガー液中で保定した。この嗅上皮スライス切断面の表面に位置する嗅細胞に対して水浸対物レンズ付き正立微分干渉顕微鏡で観察下、ホールセルパッチクランプ法を適用した。ホールセル記録中には、匂い物質または薬理学的試薬で嗅細胞を刺激することにより、得られた応答電流を解析した。記録後にはパッチピペットから細胞内へと導入された蛍光色素ルシファーイエローにより染色された嗅細胞体およびデンドライトの形状を落射蛍光観察法により記録した。

(3) 水棲動物嗅上皮からの嗅電図記録系の構築

嗅電図記録は、嗅細胞集団の興奮応答を嗅上皮表面の負電位変化として記録する細胞外誘導法である。多数の嗅細胞応答の総和を記録できることが特徴であり、嗅電図記録の結果を単一嗅細胞からのホールセル記録の結果と対応させることができれば効率的に研究を進めることが可能になると考えられる。

魚類の嗅電図はこれまで、淡水や海水といった環境水中で、麻酔された魚体で測定されることが多かったが、このイオン環境は、リンガー液中でのホールセル記録の条件とは大きく異なるため、記録結果の相互比較には困難があると考えられる。そこで本研究では、キンギョ頭部から剖出した嗅覚組織をリンガー液中に保持した状態での嗅電図記録系を新たに構築した。

今回の嗅電図記録系では、溶液刺激系としてコンピュータ制御された6連の電磁弁に接続したマニフォールドを用いることにより、10 ms以下の刺激時間制御精度を実現できた。同様の記録法を、アフリカツメガエル嗅上皮、ウシガエル嗅上皮、イモリ嗅上皮に適用することが可能となった。

(4) 水棲動物嗅上皮の嗅電図記録

本研究での嗅電図記録では、リンガー液中に嗅上皮を浸した状態で記録をおこない、嗅上皮表面の溶液のイオン組成を変化させた条件や、薬理学的試薬を投与した状態での嗅電図応答の解析を行った。上述のように6連

の電磁弁に接続したマニフォールドを用いることで、最大6種類の溶液をあらかじめ設定した時間制御で嗅上皮上に投与したときの嗅電図応答を解析できることにより、特にキンギョ嗅上皮とウシガエル嗅上皮の嗅電図の回復過程において細胞外 Na イオン濃度の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 水棲動物嗅上皮スライス標本の作成

本研究では、アフリカツメガエル鼻腔中憩室嗅上皮、アカハライモリ嗅上皮、キンギョ嗅上皮から、それぞれパッチクランプに適用可能なスライス標本の作成方法が確立できた。このうちキンギョ嗅上皮スライス標本からのパッチクランプ記録系はこれまでに報告されていない。キンギョ嗅上皮には微絨毛嗅細胞と線毛嗅細胞が混在していることは既に知られており、同じ標本で微絨毛嗅細胞と線毛嗅細胞の機能を相互に比較できる記録系として有用であると考えられる。微絨毛嗅細胞と線毛嗅細胞では細胞の形態や、嗅上皮内での細胞体の位置（深さ）が異なるので、スライス標本中で細胞の判別と応答の記録が行える。

(2) 嗅上皮スライスからの嗅細胞ホールセル記録

嗅上皮スライス標本からのホールセル記録では、アフリカツメガエル鼻腔中憩室嗅上皮とキンギョ嗅上皮において、嗅細胞からの匂い刺激応答と3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) に対する嗅細胞の応答などを記録することができた。ホールセル記録後には、パッチピペットから導入された蛍光色素により嗅細胞の形態を観察し、写真等で記録することも可能となった。これまでの嗅上皮スライス標本からの嗅細胞ホールセル記録では、刺激持続時間や、刺激濃度の変化に対して異なる応答の仕方を示す嗅細胞が観察されてきており、今後のさらなる解析により、それぞれの嗅細胞の詳細な応答特性や応答メカニズムの解明が期待できる。

(3) 水棲動物嗅上皮からの嗅電図記録系の構築

本研究で構築された嗅電図記録系では、コンピュータで開閉される電磁弁で制御された刺激液流を、嗅上皮に近接させたマニフォールドから投与することにより、時間的に精密に制御された刺激を再現性高く行なうことが可能となった。これにより嗅電図でも単

一細胞のホールセル記録系に匹敵するほどの溶液投与の自由度が得られたので、マクロ的記録法である嗅電図記録をミクロ的な記録方法である単一細胞の応答記録と比較しながら、効率的に研究を進展させていくことが可能になると考えられる。実際に嗅電図での嗅電図のタイムコースと単一細胞のホールセル記録系での嗅電図時間経過は互いに比較が可能なほどの類似性があった。

(4) 水棲動物嗅上皮の嗅電図記録

本研究で確立できた嗅電図記録系では、時間的に制御された複数の刺激液を自由に投与できるという特徴をもつ。この特性を利用して、リンガー液環境中のキンギョ嗅上皮に対して匂い刺激をおこない、嗅電図応答を解析した。キンギョ嗅上皮はアラニン、胆汁酸（タウロコール酸）の刺激に対して刺激濃度に依存した負電位応答を示した。また、この嗅上皮はフォルスコリンと IBMX の混合液についても応答した。フォルスコリンと IBMX は線毛嗅細胞内の cAMP 濃度を上昇させるので、この応答は線毛嗅細胞の応答と考えられた。フォルスコリン・IBMX 混合液刺激後にアラニン、胆汁酸で刺激した場合には、中程度濃度のアラニン刺激による応答が約 60% となったのに対して、飽和濃度の胆汁酸刺激では 30% 以下へと抑制された。この結果は胆汁酸刺激が線毛嗅細胞で主に受容されるのに対して、アラニン刺激は微絨毛嗅細胞で主に受容される可能性を示すものである。

また、ウシガエル嗅上皮およびキンギョ嗅上皮から嗅電図記録をおこない、嗅電図の回復過程へ嗅上皮表面 Na イオンが与える影響を解析した。ウシガエル嗅上皮では IBMX 応答およびシネオール応答は嗅上皮表面の Na イオンを除くことにより延長した。これはこれまでの報告から Na-Ca 交換体が線毛嗅細胞での応答の回復過程で細胞内 Ca イオンを排出することによってと考えられた。同様の実験をキンギョ嗅上皮で行ったところ、IBMX、セリン、胆汁酸のいずれの刺激による嗅電図も嗅上皮表面 Na イオンの除去によって延長することはなかった。このことからキンギョ嗅上皮では微絨毛嗅細胞と線毛嗅細胞の両方で応答の回復過程が Na-Ca 交換体に依存しないことが考えられた。淡水魚キンギョの嗅上皮表面には Na イオンが少ないと考えられるので、Na-Ca 交換体を利用しない応答機能をもつと考えられる。本研究での嗅電図記録系は嗅電図のイオン依存性の解析などに有効であり、今後、嗅上皮表面の Ca イオン依存性、Cl イオン依存性などを解析していくことで、微絨毛嗅細胞の特性をさらに明らかにすることができることが期待できる。

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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 恒成隆、佐藤藍、リンガー液中のキンギョ嗅上皮からの嗅電図における細胞外Naイオンの影響、第90回日本生理学会大会、2013年3月29日、東京都江戸川区タワーホール船堀
- ② 野尻知宏、武田翔太郎、西塚嵩宏、恒成隆、リンガー液中のキンギョ嗅上皮からの嗅電図記録、第89回日本生理学会大会、2012年3月30日、長野県松本市総合体育館

[その他]

学会発表要旨掲載雑誌

- ① Nojiri, Tomohiro; Takeda, Shotaro; Nishitsuka, Takahiro; Tsunenari, Takashi, Electroolfactogram recordings from the goldfish olfactory epithelium in Ringer solution, *Journal of Physiological Sciences*, 62 (Suppl.1), 2012, S183
- ② Tsunenari, Takashi; Satoh, Ai, The effect of external Na⁺ on the electroolfactogram recorded from the goldfish olfactory epithelium submerged in Ringer solution, *Journal of Physiological Sciences*, 63 (Suppl.1), 2013, S255

6. 研究組織

(1)研究代表者

恒成 隆 (TSUNENARI TAKASHI)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：30286439