

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 5 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700341

研究課題名（和文） マウス嗅覚系における CO₂ センサー細胞の発達と機能の分子機構研究課題名（英文） Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system

研究代表者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20390685

研究成果の概要（和文）：マウスは嗅覚により大気中のCO₂濃度の微妙な変化を感知して、忌避的に行動することが知られている。これまでに嗅上皮に存在するCO₂センサー細胞の実体として、炭酸脱水酵素をセンサーとして持つ嗅細胞サブタイプの存在が報告されていた。私達の研究により、マウス嗅上皮にはさらに複数種類の、新規 CO₂応答細胞が存在することが明らかとなった。マウスはこれらの細胞を組み合わせるにより、CO₂濃度やその原因となる周囲の状況を判断していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mice can detect CO₂ at concentrations around the average atmospheric level by olfaction. Previous study reported that there is a unique subset of olfactory sensory neurons (OSNs), which act as a sensor for CO₂ in the mouse olfactory epithelium (OE). In this study, we found that at least two novel subsets of OSNs respond to CO₂. These results suggest that mice sense CO₂ with some subsets of OSNs in the OE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：嗅細胞

1. 研究開始当初の背景

本研究は、マウス嗅覚によるCO₂感知メカニズムの解明を目的として行った。

自然界では多くの生物がCO₂の感知を行っており、外界のCO₂濃度の変化が生物の行動

に影響を与えることが知られている。昆虫の世界では、CO₂がメス蚊に対して誘因物質として作用する一方、ショウジョウバエには忌避物質として働く (*Nature* 431, 854, 2004; *Nature* 445 86, 2007)。また、爬虫類や両生類

の一部も、嗅覚にCO₂感知機構を持つことが知られる。さらに最近、哺乳類でも、マウスが嗅覚により大気中のCO₂を感知し、忌避行動をとることが明らかとなった (*Science* 317, 953, 2007)。行動実験では、大気中のCO₂濃度 (0.038%) をわずかに上回る 0.066%以上のCO₂をマウスが識別することが報告されている (*Science* 317, 953, 2007)。

マウス嗅覚におけるCO₂センサー細胞の実体として、炭酸脱水酵素Car2をCO₂センサーとして発現する嗅細胞サブタイプ (以下、Car2細胞と呼称) が、これまでに同定されている。通常の嗅細胞が、嗅覚受容体をセンサーとして匂い物質の識別を行うのに対して、Car2細胞では細胞質に存在する酵素であるCar2がセンサーとして働き、CO₂から重炭酸イオンの生成反応を触媒する (図1)。重炭酸イオンにより、Car2細胞特異的に発現するグアニル酸シクラーゼGC-Dが活性化され、さらに下流のシグナル経路を介して、Car2細胞の細胞応答が引き起こされる。

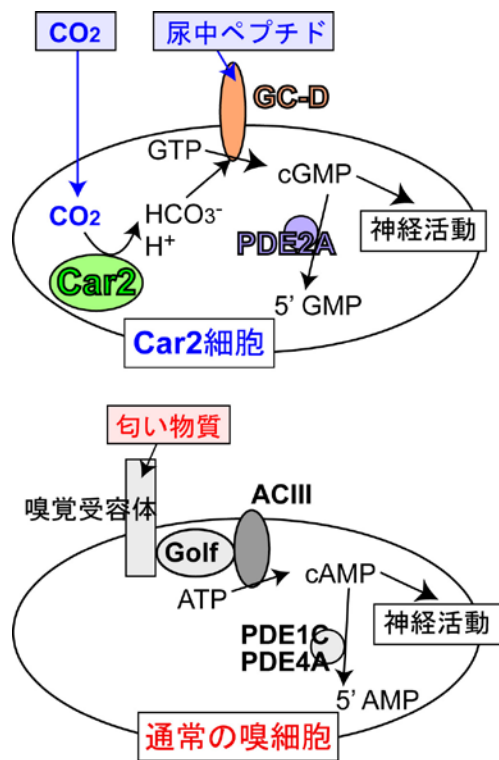


図1 Car2細胞と通常の嗅細胞のシグナルカスケード

(上) Car2細胞では炭酸脱水酵素Car2がセンサーとして働き、Car2細胞特異的に発現するグアニル酸シクラーゼGC-Dを活性化して、神経活動が引き起こされる。興味深いことに、GC-D自身は尿中のペプチドに対するセンサーとしても働くことが報告されている。(下)通常の嗅細胞では、嗅覚受容体がセンサーとして、匂い物質の感知が行われる。

つまり、Car2細胞は嗅細胞のサブタイプでありながら、通常の嗅細胞とは全く異なるセンサーとシグナル経路を持つことにより、CO₂の感知という極めてユニークな働きをしていることが分かる。

また最近の研究により、Car2細胞は、CO₂のみならず、尿やマウスの呼気に含まれるCS₂など、仲間に由来する匂い物質に応答を示し、食物選択に関する情報伝達 (socially transmitted food preference: STFP) に関わることが、Mungerらにより報告されている (*Curr. Biol.* 20: 1438, 2010)。

しかしながら、Car2細胞が忌避行動とSTFPという全く異なる2つの行動を制御しているのか？あるいは、マウスの嗅覚にさらなるCO₂センサー細胞が存在するのか？という点はこれまで明らかとなっていなかった。そこで私達は、マウス嗅覚によるCO₂感知機構の全体像を明らかとするため、嗅上皮における未知のCO₂センサー細胞の存在を明らかとする研究を行った。

2. 研究の目的

私達は最近、従来知られているCar2細胞以外にも、新規なCO₂への応答性を示す細胞が、マウス嗅上皮に存在することを見出した。そこで本研究は、マウス嗅覚によるCO₂センシング機構の全体像を明らかとするため、新規CO₂センサー細胞に着目し、その性質を明らかとする解析を行った。

3. 研究の方法

マウスの嗅上皮から嗅細胞を単離し、Ca²⁺イメージングにより、CO₂への応答性について検討した。CO₂への応答が見られた細胞に関して、CO₂以外の匂い物質への反応性や、発現する分子について解析を行い、Car2細胞の性質と比較検討した。

4. 研究成果

私達は、嗅上皮から嗅細胞を単離してCa²⁺イメージングによる解析を行った結果、既知のCO₂センサー細胞であるCar2細胞とは異なる反応性を示す新規のCO₂応答細胞を見出した (図2A)。Car2細胞は、CO₂以外にも、尿中のペプチドやCS₂など、仲間のマウスに由来する複数のリガンドに反応することが知られている。私達が見出した新規のCO₂応答細胞は、CO₂への応答は示すものの、尿やCS₂へは全く反応を示さなかった。また、嗅細胞のマーカー遺伝子であるOMPは発現しているが、Car2は発現しておらず、Car2細胞とは異なるセンサー機構を持ち、異なる反応性を示す新規のCO₂応答細胞であることが明らかとなった (図2B)。

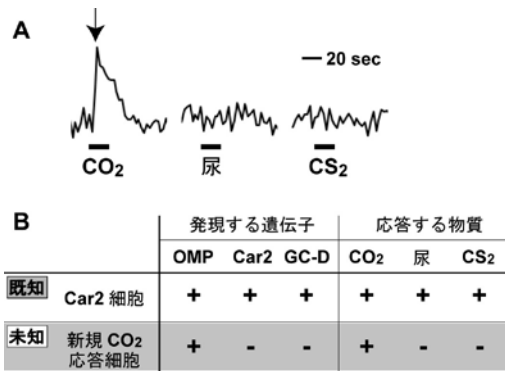


図2 新規の CO₂ 応答細胞の匂い応答
(A) Ca²⁺ イメージングによる匂い応答の解析
CO₂ に反応するが、尿や CS₂ には反応しない
嗅細胞の反応例
(B) Car2 細胞と新規 CO₂ 応答細胞の比較

そこで次に新規 CO₂ 応答細胞が、CO₂ 自身に反応しているのか？それとも、CO₂ に伴う酸性の pH に反応しているのか？という点について解析を行った。CO₂ の溶液は酸性の pH を示す。CO₂ へ応答を示した Car2 陰性の嗅細胞を、pH のみを酸性に調整した溶液で刺激して、その反応性を検討した。結果、CO₂ への応答が見られた嗅細胞は、CO₂ に直接反応する細胞 (CO₂ センサー細胞) と、CO₂ に伴う酸性 pH に反応する細胞 (pH センサー細胞) の 2 つのタイプに分けられることが明らかとなった (図 3)。両者は、嗅上皮にはほぼ同程度の割合 (前者 4.7%、後 6.4%) で存在した。

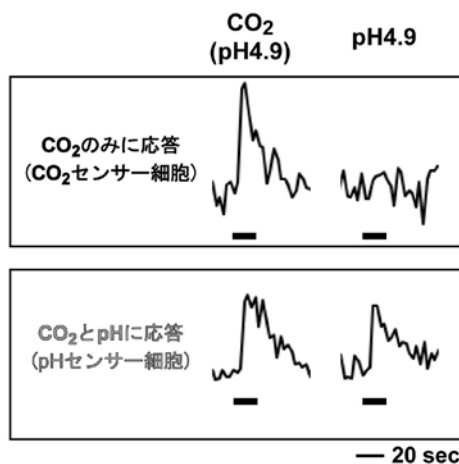


図3 新規の CO₂ 応答細胞の酸性 pH への応答
(上段) CO₂ に反応するが、酸性 pH には反応しない Car2 陰性の嗅細胞。(下段) CO₂ と酸性 pH に共に反応する Car2 陰性の嗅細胞。酸性 pH に応答していると考えられる。

そこでさらに、CO₂ のみに応答する CO₂ センサー細胞に着目し、Car2 以外の炭酸脱水酵素が CO₂ センサーとして働く可能性を検討した。炭酸脱水酵素の阻害剤である Acetazolamide で処理すると、Car2 陰性で CO₂ のみに反応を示す細胞の多くは、CO₂ への応答性が顕著に阻害された。Acetazolamide 処理による阻害効果は、約 60% の新規 CO₂ センサー細胞で見られており、少なくともこれらの細胞では、Car2 以外の炭酸脱水酵素が CO₂ の感知に関わっていることが明らかとなった。

本研究により、マウスの嗅上皮には、複数種類の CO₂ 応答細胞が存在することが明らかとなった。マウスを取り巻く自然環境には、捕食者、仲間、巣穴の換気の悪化、などの様々な CO₂ の発生源が存在する。以上の結果から、マウスは、応答性の異なる複数種類の細胞を組み合わせることにより、CO₂ の発生源となる周囲の状況を識別しているものと予想される。例えば、CO₂ が仲間のマウスに由来する場合、尿や CS₂ といった仲間の匂いにも応答を示す Car2 細胞は、他の CO₂ 応答細胞よりも強く活性化されると考えられる。

興味深いことに、私達は最近、炭酸脱水酵素 Car7 が OMP 陽性の一部の嗅細胞で発現することを見出している。この Car7 発現細胞こそが、新規 CO₂ センサー細胞の有力な候補であると考え、今後、嗅覚受容体の発現も含めてセンサーシステムの詳細を検討して行きたい。

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 4 件)

- ① Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Naritsuka H, Shirao T, Hirai H, Yoshihara Y, Mori K, Stern P.L. and Tsuboi A: 5T4 Glycoprotein regulates the sensory input-dependent development of a specific subtype of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience*, 査読有、Vol.32, pp.2217-2226, 2012. doi:10.1523/JNEUROSCI.5907-11.2012
- ② 高橋弘雄, 坪井昭夫: 脳における匂い感覚地図の形成メカニズム *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 和文総説、Vol.216, pp.100-106, 2011.

- ③ Takahashi H, Yoshihara S, Nishizumi H, and Tsuboi A: Neuropilin-2 is required for the proper targeting of ventral glomeruli in the mouse olfactory bulb. ***Molecular and Cellular Neuroscience***, 査読有、Vol.44, pp.233-245, 2010.
doi:10.1016/j.mcn.2010.03.010,
- ④ 高橋弘雄、吉原誠一、坪井昭夫: 脳における匂い感覚地図の形成メカニズ ***Aroma Research***, 和文総説、Vol.11, pp.224-229, 2010

[学会発表] (計2件)

- ① 高橋弘雄 他、Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system、The International Symposium on Olfaction and Taste、2012年6月24日、スウェーデン Stockholm Waterfront
- ② 高橋弘雄 他、Molecular basis of CO₂ sensing in the mouse olfactory system、第33回日本神経科学学会大会、2010年9月3日、神戸国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~amrc-lab1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 弘雄 (TAKAHASHI HIROO)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20390685

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし