

## 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：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700414

研究課題名（和文）ケージド化合物とイメージング法を用いた神経細胞情報伝達分子ダイナミクスの定量解析

研究課題名（英文）Quantitative analysis of molecular dynamics in the transduction cascade using caged compounds and imaging techniques.

研究代表者

竹内 裕子（TAKEUCHI HIROKO）

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：10324823

研究成果の概要（和文）：昨今、QOLの上昇などと相まって嗅覚への社会的関心が高まっている。匂いセンサーである嗅細胞は鼻孔内上部の嗅粘膜内に位置しており、嗅覚受容の初段を担っている。また、匂い分子の持つ化学情報を生体電気信号（活動電位）へと変換する匂い情報変換チャンネル（CNG・Cl(Ca)チャンネル）が嗅線毛のみに高密度に発現していることも既に知られている。この嗅覚情報変換は、高次へ匂い情報を伝達する際に、嗅覚感度を調節する重要なポイントである。本研究では、線毛内での情報伝達因子である cAMP・Ca<sup>2+</sup>に焦点をあて、各分子の実時間挙動を電気生理学的・光学的アプローチを併用して、定量的に解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Olfactory transduction cascade starts from the receptor protein which binds to odorant molecules. After the binding, G-protein and AC are activated continuously. It leads to open the transduction channels (CNG, Cl(Ca)) and generate current responses, after [cAMP]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increased. Spatial and temporal distributions of cytoplasmic elements (cAMP, Ca<sup>2+</sup>) are key factors in the olfactory transduction cascade. We examined that based on the olfactory adaptation and non-linear signal amplification with these techniques. 1) Local laser light stimulation (LMS-ROI). 2) Current responses with caged-cAMP photolysis (patch-clamp) and 3) Ca-imaging(Fluo4) in parallel.

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	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：感覚神経細胞・情報変換・電気生理学・パッチクランプ法・ケージド化合物

### 1. 研究開始当初の背景

感覚神経細胞の入出力特性に関して、定量的に解明されていない点が多いため、高次への信号伝達に対する信号修飾についても未知の部分が多い。特に嗅覚神経細胞（嗅細胞）では、外来からの匂いを生体電気信号へと変換する部分が、嗅細胞線毛のみに高密度に発現しているイオンチャンネル部位であること

は知られているが、その線毛は直径 100nm 程度であることから、生きた嗅覚神経細胞を用いた生理学的な実験は、技術的に困難を極め、国内のみならず、海外においても研究が立ち遅れていた。本研究では、さまざまな技術と電気生理学を組み合わせることで、微細な構造体（線毛）を持つ嗅細胞の信号解析を可能とした。

嗅細胞先端からは直径 100 ナノメートル (nm) の線毛が 10 本程度、外界と接している粘液層に伸びている。情報伝達に必要な蛋白質や酵素が線毛に局限して分布していることから、この線毛こそが嗅覚情報変換の場であることは明らかである。嗅覚情報変換の概要は以下のようなものである。嗅覚は、匂い分子が嗅覚受容体 (R) と結合することから始まる。その後、酵素 (AC: アデニル酸シクラーゼ)・セカンドメッセンジャー (cAMP) がサイクリックヌクレオチド感受性非選択性陽イオン (CNG) チャネルに結合し、陽イオンを流入させることで電流が発生する。更に、流入した  $Ca^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  依存性 Cl (ClCa) チャネルを開口させ、更なる電流増幅を引き起こす (Pace et al., 1985; Sklar et al., 1986)。この電位変化は嗅細胞で活動電位に変換された後、アクソンを通じて脳へと伝達される。これまで、嗅覚情報変換カスケードにはセカンドメッセンジャーとして、cAMP を使用するカスケードと IP3 を使用するカスケードがあると信じられていたが、2003 年竹内 (申請者) らは、電気生理学的手法であるパッチクランプ法を適用し、ケージド化合物による光解離と匂い刺激を組み合わせた実験系により、全ての匂い物質において cAMP がセカンドメッセンジャーとして使用されていることを立証した (Takeuchi et al., 2003; Takeuchi & Kurahashi, 2003)。その結果、20 年来国内外で議論されていた嗅細胞におけるセカンドメッセンジャーと情報変換カスケードに関して終止符が打たれ、cAMP・ $Ca^{2+}$  が重要な役割を担っていることが明らかとなった。嗅覚情報変換カスケードと似た分子カスケードを持つ視細胞では、酵素であるトランスデュシンのレベルで大きな増幅が行われ、応答電流に反映される。しかし、嗅細胞の場合、AC レベルではほとんど増幅がない一方で、チャネルレベルで非線形な信号増幅を引き起こす (ヒル係数 5)。視細胞の場合には 1 光子刺激時に 25 万分子の cGMP が分解されるが、嗅細胞では最大の匂い刺激時でも 2 万分子しか cAMP が生成されない。つまり、cAMP と  $Ca^{2+}$  が働くことで情報変換チャネルが最大限の効率で信号を増幅していることが明らかとなった (Takeuchi & Kurahashi, 2005)。

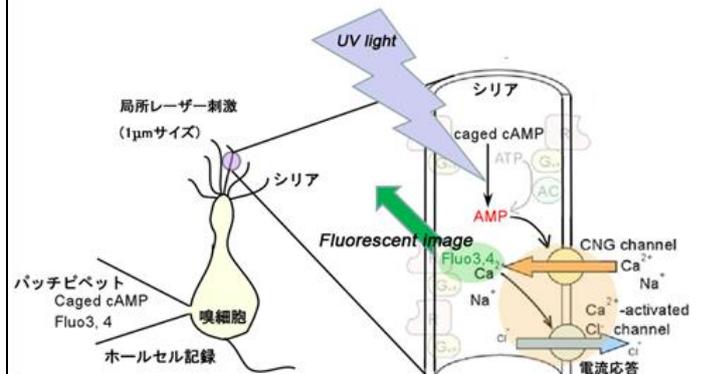
## 2. 研究の目的

嗅覚情報変換は、高次へ匂い情報を伝達する際に、嗅覚感度を調節する重要なポイントになる。嗅覚感度修飾メカニズム解明は嗅覚疾患の原因解明や様々な匂い環境下における嗅覚受容の制御・改善につながる重要な課題である。本研究では、情報変換の場である線毛に焦点をあて、線毛内での情報伝達因子である cAMP・ $Ca^{2+}$  の実時間挙動を電気生理

学的・光学的アプローチを同時併用して定量的な解析を行い、線毛における情報変換機構の実時間挙動解明を目的とした。これは、線毛内の物質移動に関する知見を得ることと同義である。線毛内の分子移動に関しては、可視化データと電気生理学データとのマッチングを得ることが技術的に難しい。そこで本研究では随時システムに改良を加え、嗅線毛内でのリアルタイムな物質移動追跡を電気生理学的に解析することを目的とした。

## 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

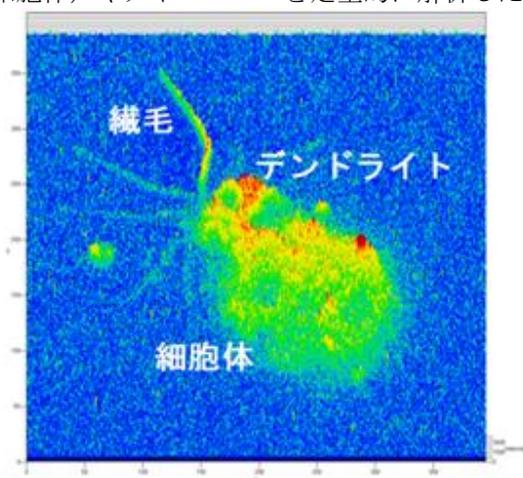


であるシリアは光学顕微鏡の分解能 (200 nm) よりも小さな直径 (100 nm) を持つため、通常の顕微鏡では生きたまま可視化することが困難である。更に生きたシリア内での分子ダイナミクスを可視化することは技術的に困難を極める。そのため、NA=1.4 の高 NA 対物レンズを使用し、レーザースポット径を小さくすることを考慮した。使用レーザーは目的に応じて異なる波長を用いた。ケージド解離には 351・364 nm、刺激タイミング検知にはフォトダイオードの最適感度波長である 488nm を用いる。LSM-ROI (Laser Scanning Confocal Microscope-Region of Interest) システムを用いて、シリア上に ROI を用いて 1  $\mu$ m 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 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  $\mu$ m 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<sup>2+</sup>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

蛍光インジケータの特性を踏まえ、嗅細胞に Ca<sup>2+</sup>濃度のインジケータとして生体細胞に用いられている Fluo3 もしくは 4・5 (Minata et al., 1989) を導入し、電圧パルス及び外部刺激により、Ca<sup>2+</sup>依存性チャネルを開口させ、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を 488 nm (励起波長)、526 nm (蛍光波長) を用いて測定し、蛍光変化部位 (シリア・樹状突起・細胞体) やタイムコースを定量的に解析した。



また、本研究で、構築した 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線毛に多ポイント微小局所光刺激を行い、解析した。生きた線毛内での分子ダイナミクスを可視化することが技術的に困難なため、NA= 1.45 の高 NA 対物レンズを使用し、使用レーザーは目的に応じて異なる波長 (ケージド解離には 351・364 nm、Fluo4 の蛍光可視化には最適感度波長である 488nm) を用いて、レーザースポット径を小さくした。その際には LSM-ROI システムを用いて、線毛上に ROI を用いて 1  $\mu$ m もしくはそれ以下の任意の微小区画を選択し、その範囲のみにレーザー光を照射することで、線毛の一部のケージド化合物を局所的に解離させることが可能であり、局所応答電流の確認も行った。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  $\mu$ m 以下のナノスケールでの刺激を行って、嗅細胞の持つ嗅覚特性である adaptation・summation から、線毛におけ

る物質移動を検討した。また、レーザー顕微鏡による線毛の可視化に関しては、細胞内 Ca<sup>2+</sup>感受性インジケータとして、Fluo4 を用いたその結果、微細構造体であるシリア内では、嗅覚情報伝達カスケード内でセカンドメッセンジャーとして働く cAMP 及び Ca イオンが数  $\mu$ m 以上拡散しないことが示唆された。本研究における発見により、ナノスケール構造体内の分子ダイナミクスがリアルタイムで測定・可視化でき、嗅細胞線毛においてはシグナル情報伝達システムの解明に繋が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 4 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 Matsumura K, Matsumoto M, Kurahashi T, Takeuchi H. Recordings from cultured newt olfactory receptor cells. *Zoolog Sci*. 査読有 5 巻 (2012) 340-345.
- ④ 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 17 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 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
- ③ 阪田 尚紀 竹内裕子 Categories of voltage-dependent potassium channels in the newt olfactory receptor cells. 日

- 本味と匂学会 第46回大会. 2012年10月03日～2012年10月05日. 大阪大学吹田キャンパス
- ④ 松村恭平 大和俊作 竹内裕子 Primary culture and recordings from the newt olfactory receptor cells. 日本味と匂学会 第46回大会. 2012年10月03日～2012年10月05日. 大阪大学吹田キャンパス
- ⑤ 青木勝裕 竹内裕子 Analysis of the single potassium channel in the isolated newt olfactory receptor cells. 日本味と匂学会 第46回大会. 2012年10月03日～2012年10月05日. 大阪大学吹田キャンパス
- ⑥ 谷垣 宏美 竹内裕子 Odorant suppression of channel activity in the isolated olfactory cells. 日本味と匂学会 第46回大会. 2012年10月03日～2012年10月05日. 大阪大学吹田キャンパス
- ⑦ 竹内裕子 倉橋隆. 単一嗅繊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
- ⑧ 竹内裕子・倉橋隆 単一嗅細胞における繊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.
- ⑨ 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.
- ⑩ Takeuchi, H., Kurahashi, T. 単一嗅繊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.
- ⑪ Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. Effect of cytoplasmic calcium buffer on the lateral spread of the olfactory transduction signals in the olfactory cilium. 7<sup>th</sup> 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 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
- ⑭ 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. 盛岡市民文化ホール
- ⑮ 吉田太一・竹内裕子・倉橋隆. 嗅細胞の電位依存性Kチャ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
- ⑯ 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
- ⑰ 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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: カチオンチャネル阻害剤及びこれを含む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

竹内裕子 (TAKEUCHI HIROKO)

研究者番号: 10324823