

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23570088

研究課題名(和文) イモリ嗅細胞におけるアミノ酸応答のシグナル伝達機構と生息環境による応答の調節

研究課題名(英文) Signal transduction mechanism of amino acid response and the modulation of its responsiveness in newt olfactory receptor neurons.

研究代表者

中谷 敬 (NAKATANI, Kei)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：20125040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：両生類であるイモリの嗅細胞は、揮発性匂い物質のみならずアミノ酸にも応答することが知られている。しかし、アミノ酸応答のシグナル伝達の分子メカニズムについては不明であった。そこで、本研究では、アミノ酸応答のシグナル伝達経路を明らかにする目的で、パッチクランプ法などの電気生理学的方法および免疫組織化学法を用いて解析を行った。その結果、繊毛型嗅細胞は揮発性匂い物質とアミノ酸の両方に応答した。アミノ酸に応答する細胞にシグナル伝達に關与する酵素の賦活剤を投与した実験から、アミノ酸応答にはcAMP経路とIP3経路の両方の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Newt olfactory receptor neurons respond not only to volatile odorants but also amino acids. However, the molecular mechanism of the signal transduction pathway is not known. In this study, we employed electrophysiological techniques including patch clamp recording and immunohistochemical techniques to elucidate the signal transduction mechanism of amino acid response. The ciliary olfactory receptor neurons responded to both volatile odorants and amino acids. We then applied activators of candidate signal transduction machinery. The results suggest that the signal transduction pathway of amino acid response in ciliary ORN includes both cAMP pathway and IP3 pathway.

研究分野：動物生理学

キーワード：嗅細胞 イモリ アミノ酸応答 シグナル伝達 パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に陸生脊椎動物の嗅細胞は繊毛型で、cAMP を介するシグナル伝達経路により、匂い情報を電気的信号に変換することが知られている。陸生脊椎動物が揮発性匂い物質のみを受容するのに対して、両生類であるイモリが揮発性匂い物質のみならずアミノ酸にも応答することを先行研究で明らかにした (Yamada and Nakatani, 2001)。しかし、アミノ酸応答におけるシグナル伝達の分子メカニズムについては不明であった。

(2) 両生類であるイモリは陸上および水中の両方で生活する。イモリ嗅細胞のアミノ酸に対する応答性が、生息環境(陸上および水中)によって変化することを報告した (Inoue and Nakatani, 2010)。

2. 研究の目的

(1) 揮発性匂い物質に対する応答のシグナル伝達経路はよく分かっているため、嗅細胞におけるアミノ酸応答の電気的特性を揮発性匂い物質応答と比較した。さらに、シグナル伝達経路に関わる各種酵素の活性化剤等の薬物を投与してその効果を観察し、シグナル伝達の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

(2) 生息環境によって匂い応答(揮発性匂い物質およびアミノ酸)の応答性が変化する原因は不明である。本研究では、EOG (electro-olfactogram)法を用いて生息環境の違いによる匂い応答性の変化を生理学的に解析するとともに、免疫組織化学法を用いて揮発性匂い応答およびアミノ酸応答に関わる分子の局在を比較し、応答性の変化の原因を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

実験材料には業者から購入したアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) を雌雄の区別なく用いた。飼育は水中と陸上を自由に行き来できるようにした水槽内で室温(22-25℃)にて行った。

(2) EOG 法

動物は低温麻酔を行った後断頭し、外鼻孔から、くさび型に切り込みを入れ嗅上皮が露出した標本を作成した。この標本は虫ピンでチャンパーに固定した。電極にはガラス管を用い、誘導した電気シグナルは差動増幅器 (Warner DP-301) で増幅した後、デジタイザー (Axon, Digidata 1200) でデータを取り込み、解析を行った。

(3) パッチクランプ法

EOG 法と同様の手順で嗅上皮を取り出した後、コラゲナーゼ+2価陽イオンフリー生理的塩類溶液中でインキュベート(35℃・5分間)した。酵素処理後は生理的塩類溶液でリンスし、ピPETTINGによって物理的に嗅細胞を単離した。パッチ電極はプラー (Sutter Instrument, P-97) を用いて作成した。単離嗅細胞から誘導した電気シグナルはパッチクランプ増幅器 (Axon, Axopatch 200B) を用いて増幅した後、デジタイザー (Axon, Digidata 1440A) でデータを取り込み、解析を行った。本研究では、パッチクランプ法のうちホールセルクランプ法を用いた。また、匂い物質等のテスト溶液は、電動マイクロインジェクター(ナリシゲ, IM-31)を2台使い、1種類あるいは2種類のテスト溶液を局所的に投与した。

(4) 免疫組織化学法

動物を4%パラホルムアルデヒド液で還流固定し、5時間浸漬固定した。その後、0.5 M の EDTA で脱灰処理を施し、20%スクロースで置換後凍結包埋し、組織切片を作成した。本研究では、免疫組織化学の実験に抗 G_α および G_β 抗体を用いて染色を行った。

4. 研究成果

(1) 繊毛型嗅細胞の匂い応答

パッチクランプ法(whole-cell clamp)を用いて単離嗅細胞から膜電流を記録した。匂い物質投与を行う前に、細胞が正常に機能していることを確認するために、電位固定法によりイオン電流を測定した。その結果、一過性の内向き電流とそれに続く持続性の外向き電

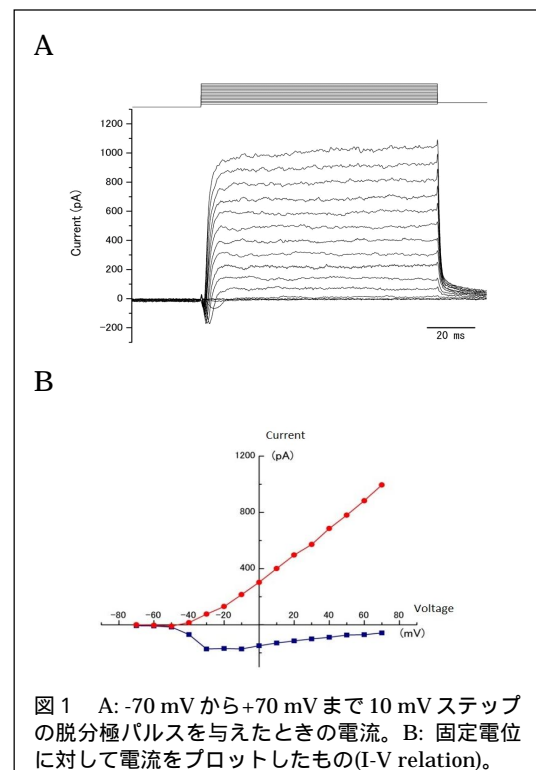


図1 A: -70 mV から+70 mV まで 10 mV ステップの脱分極パルスを与えたときの電流。B: 固定電位に対して電流をプロットしたものの(I-V relation)。

流が観察された(図1)。

本研究で行ったすべての実験は、図1のような電位依存性電流を確認できた細胞、すなわち正常に機能している細胞でのみ行った。

繊毛型嗅細胞に揮発性匂い物質またはアミノ酸刺激を行ったところ、応答した細胞ではいずれも内向き電流が観察された。応答した細胞の割合は、揮発性匂い物質刺激では41細胞中15細胞(36.6%)、アミノ酸刺激では98細胞中28細胞(21.4%)であった。この結果から、繊毛型嗅細胞は揮発性匂い物質およびアミノ酸の両方に応答することが明らかになった。

揮発性匂い物質およびアミノ酸応答のシグナル伝達経路を解明するため、アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン、およびフォスホリパーゼCの活性化剤である *m*-3M3FBS を投与してその効果を調べた。揮発性匂い物質に反応した細胞にフォルスコリンを投与するとすべての細胞(7/7個)で内向き電流が観察された(図2)。このこと

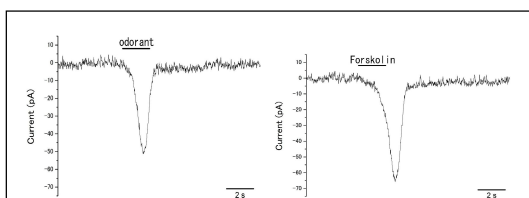


図2 揮発性匂い物質応答細胞のフォルスコリンに投与に対する効果。フォルスコリン投与により内向き電流が観察された。

から、揮発性匂い物質に反応する細胞はcAMPを2次メッセンジャーとするシグナル伝達経路をもつことが明らかになった。これは従来の知見と一致する。アミノ酸に反応した細胞にフォルスコリンを投与すると5個中4個の細胞で内向き電流が観察された。また、アミノ酸に反応した細胞に *m*-3M3FBS を投与すると、10個中6個の細胞で内向き電流が観察された(図3)。これらの結果から、アミノ酸に反応する細胞のシグナル伝達経路には2種類あり、1つは揮発性匂い物質に反応する細

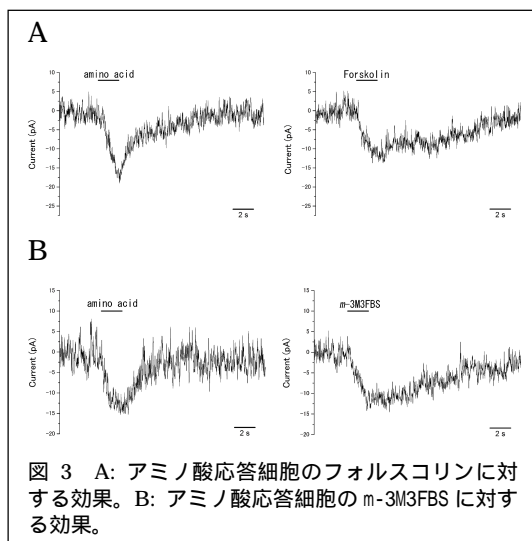


図3 A: アミノ酸応答細胞のフォルスコリンに対する効果。B: アミノ酸応答細胞の *m*-3M3FBS に対する効果。

胞と同じくcAMPを2次メッセンジャーとするシグナル伝達経路、もう1つはIP₃を2次メッセンジャーとするシグナル伝達経路であることが示唆された。

同一の細胞に揮発性匂い物質とアミノ酸の両方を投与する実験を行った。まだ1例にすぎないが、1つの細胞で揮発性匂い物質とアミノ酸の両方に対する応答が観察された。これは今後の研究において検証する。

本研究では、ホールセルを形成した細胞のうち274個の細胞で正常な電位依存性電流を観察した。表1は、記録した全細胞で各テスト溶液に応答した割合をまとめたものである。

表1 投与物質ごとの応答数と応答率

投与物質	応答数/全細胞数(応答率)
揮発性匂い物質混合溶液	15/41 (36.6%)
アミノ酸混合溶液	21/98 (21.4%)
フォルスコリン (500 μM)	25/51 (49.0%)
フォルスコリン (50 μM)	1/38 (2.6%)
<i>m</i> -3M3FBS (500 μM)	9/46 (19.6%)

(2) 生息環境による応答性の変化

EOG法を用いて嗅上皮から揮発性匂い物質およびアミノ酸に対する応答を比較した。水中で飼育したイモリを陸に移し、一定時間経過後にEOG応答を記録した。その結果、時間依存的にアミノ酸応答の大きさが増大した。この結果は専攻研究と一致する。

この原因を調べるために、免疫組織化学法による実験を試みた。アミノ酸受容体が全く不明であるため、受容体の抗体の代わりにG_{oif}およびG_oの抗体を用いて水中飼育および陸上飼育の動物でそれらの発現を比較した。その結果、生息環境によってこれらのGタンパク質の発現に大きな差はなかった。その原因として、アミノ酸応答のシグナル伝達経路はcAMP経路およびIP₃経路の両方があること、G_oが関与しないことなどが考えられる。

<引用文献>

Yamada, H. and K. Nakatani (2001) Adenylate Cyclase Mediates Olfactory Transduction of Amino Acid Responses in the Newt. *Zool. Sci.* 18: 159-164

Inoue, R. and K. Nakatani (2010) Changes in the Olfactory Response to Amino Acids in Japanese Newts After Transfer from an Aquatic to a Terrestrial Habitat. *Zool. Sci.* 27: 369-373

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 7 件)

1) Tabuchi, M, Dong L, Inoue S, Namiki S, Sakurai T, Nakatani K, Kanzaki R. (2015) Two types of local interneurons are distinguished by morphology, intrinsic membrane properties, and functional connectivity in the moth antennal lobe. *J Neurophysiol.* 114(5):3002-3013 (査読有)

2) Hamada, S. M. Tabuchi, T. Toyota, T. Sakurai, T. Hosoi, T. Nomoto, K. Nakatani, M. Fujinami and R. Kanzaki (2014) Giant vesicles functionally expressing membrane receptors for an insect pheromone. *Chem. Commun.*, 2014, 50, 2958–2961 (査読有)

3) Namiki, S., H. Norimoto, C. Kobayashi, K. Nakatani, N. Matsuki and Y. Ikegaya (2013) Layer III neurons control synchronized waves in the immature cerebral cortex. *J. Neurosci.* 33(3): 987–1001 (査読有)

4) Tabuchi, M., S. Inoue, R. Kanzaki, and K. Nakatani (2012) Whole-cell recording from Kenyon cells in silkmoths. *Neurosci. Lett.* 528 (2012) 61– 66 (査読有)

5) Niikura, R. and K. Nakatani (2012) Retrograde labeling and fine structure of olfactory receptor neurons in cat sharks. *Zool. Sci.*, 29(8):477-480 (査読有)

6) Masutomi, K., C. Chen, K. Nakatani and Y. Koutalos (2012) All-Trans retinal mediates light-induced oxidation in single living rod photoreceptors. *Photochem. Photobiol.*, 2012, 88: 1356–1361 (査読有)

7) Seko, Y., N. Azuma, M. Kaneda, K. Nakatani, Y. Miyagawa, Y. Noshiro, R. Kurokawa, H. Okano, and A. Umezawa (2012) Derivation of human differential photoreceptor-like cells from the iris by defined combinations of CRX , RX and NEUROD. *PLoS ONE* 7 (4) e35611 (査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

阿部希美、中谷敬 (2016) アカハライモリ幼生・成体における G olf の発現 (日本動物学会関東支部大会, 神奈川大学横浜キャンパス, 神奈川県, 横浜市)

阿部希美、中谷敬 (2016) アカハライモリ幼生・成体の嗅上皮における G olf の発現

(日本生理学会大会, 札幌コンベンションセンター, 北海道, 札幌市)

櫻井啓輔, 大西暁士, 今井啓雄, 千坂修, 山下高廣, 中谷敬, 七田芳則 (2013) ニワトリ緑色感受性錐体視物質を桿体視細胞に発現させたノックインマウスの単一視細胞応答 (日本動物学会大会, 岡山大学津島キャンパス, 岡山県, 岡山市)

Inoue, S., M. Tabuchi, K. Nakatani, R. Kanzaki (2013) Intrinsic electrophysiological property of Kenyon cells in Silkmoths. (Association for Chemoreception Sciences Annual Meeting, Huntington Beach, アメリカ合衆国)

田淵理史, 井上重毅, 神崎亮平, 中谷敬 (2012) ホールセルパッチクランプ法によるカイコガ脳高次中枢キノコ体ニューロンの解析 (日本動物学会大会, 大阪大学豊中キャンパス, 大阪府, 大阪市)

濱田聡志, 田淵理史, 豊田太郎, 櫻井健志, 神崎亮平, 中谷敬, 野本知理, 藤浪眞紀 (2012) 昆虫フェロモン受容体を担持したジャイアントベシクルのフェロモン刺激応答 (日本化学会年会, 慶応義塾大学日吉キャンパス, 神奈川県, 横浜市)

Tabuchi1, M., L. Dong, S. Namiki, T. Sakurai, K. Nakatani, R. Kanzaki (2011) Two distinct types of local interneurons exhibit different synaptic connectivity in the silkmoth antennal lobe. (ESITO meeting, St. Petersburg, ロシア)

島口真菜, 越谷真理子, 中谷敬 (2011) マウス味細胞の細胞間コミュニケーションの解析 (日本動物学会大会, 大雪クリスタルホール他, 北海道, 旭川市)

田淵理史, 櫻井健志, 光野秀文, 並木重宏, 峯岸 諒, ハウプト周一, 塩月孝博, 内野恵朗, 瀬筒秀樹, 田村俊樹, 中谷敬, 神崎亮平 (2011) 光遺伝学的手法によるカイコガ触角葉出力神経の時間加重特性の解析 (日本神経科学学会大会, パシフィコ横浜, 神奈川県, 横浜市)

〔図書〕(計 1 件) 分担執筆

1) Kanzaki, R., K. Nakatani, T. Sakurai, N. Misawa and H. Mitsuno (2016) Physiology of chemical sense and its biosensor application. *In* T. Nakamoto (ed) *Essentials of machine olfaction and taste*, Wiley, pp 3-48

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 敬 (NAKATANI, Kei)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：20125040

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：