

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650170

研究課題名(和文) 嗅覚における新規な油センシングの分子機構

研究課題名(英文) A novel molecular mechanism underlying the sense of oily odorants by olfaction

研究代表者

坪井 昭夫 (TSUBOI, Akio)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20163868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：動物が油を感じるメカニズムに関しては、味覚の油センサーの報告はあるものの、嗅覚による油の受容の研究はこれ迄全く行われていない。申請者は、自然界で動物が効率的に油を摂取するためには、嗅覚を用いた油の匂いの感知が必要であると推測した。本研究では、不飽和長鎖脂肪酸に反応する嗅細胞とセンサー分子に着目し、嗅覚における新規な油センシングの分子機構の解明を目指した。マウスの行動実験から、Caイメージングによる嗅細胞の匂い反応の解析までを行い、油や不飽和長鎖脂肪酸の種類による嗅覚反応の相違を明らかにし、申請者が見出した油センサー細胞で特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索し、油の匂いセンサーの機能を解析した。

研究成果の概要(英文)：About mechanisms that animals feel oil, there are some reports for oil sensors in gustation; however, the perception of oil by olfaction remains to be uncovered. It is possible that the perception of the oily smell by olfaction is necessary so that animals consume oil effectively in the natural world.

In this study, we focused on olfactory sensory neurons (OSNs) and sensor molecules that respond to unsaturated long-chain fatty acids to elucidate a novel molecular mechanism of oil sensing by olfaction. Notably, we not only analyzed mice by behavior experiments, but also examined responses to oily odorants in OSNs by the calcium imaging to clarify the difference in responsiveness to odorants among several kinds of oils and unsaturated long-chain fatty acids. In addition, we searched for the genes expressing specifically in the oil sensor OSNs, which we have recently found, to clarify the function of oil sensors by ectopic expression of candidate molecules in OSNs with the lentivirus.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：嗅覚系 油センシング 匂いセンサー カルシウムイメージング 不飽和長鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

過剰なカロリー摂取に伴う肥満は、生活習慣病の原因として大きな社会問題の1つである。従って、油を感知するメカニズムの研究は、油への嗜好性を抑え、その摂取量を調節する方法を開発する上でも極めて重要である。味覚による油のセンシングに関しては、最近、舌の味細胞で、3種類の油センサーが同定された (J. Clin. invest. 115, 3177, 2005; J. Neurosci. 30, 8376, 2010)。しかしながら、サラダ油や菜種油などの油の匂いを、嗅覚により感じる仕組みは、全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、不飽和長鎖脂肪酸に反応する嗅細胞とセンサー分子に着目し、嗅覚における新規な油センシングの分子機構の解明を目指す。具体的には、マウスの行動実験から、カルシウムイメージングによる嗅細胞の匂い反応の解析までを行い、油や不飽和長鎖脂肪酸の種類による嗅覚反応の相違を明らかにする。また、申請者が見出した油センサー細胞で特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索し、得られた候補分子に関しては、レンチウイルスによる嗅細胞での遺伝子発現系を用いて、油センサー分子に関しては、ノックアウトマウスを用いて、油の匂いセンサーの機能を明らかにする。

嗅覚の油センサーに関しては、国内外を問わず全く研究されていないのが現状である。本研究の特色は、申請者が最近見出した不飽和長鎖脂肪酸に反応する嗅細胞とセンサー分子に着目して、油の感知機構を明らかにしようという点である。油の匂いを感知する仕組みが分かれば、味覚と統合されることによる、種を超えた油の嗜好性のメカニズムに迫ることができるかと期待される。

3. 研究の方法

油への嗜好性を生み出す「油の匂いを感知する仕組み」を明らかにするために、(1) 油の匂いに対する応答性の解析と(2) 油の匂いセンサーの機能解析を行った。まず、油やその構成要素である脂肪酸やグリセロールに対する嗜好性や識別能の有無を、行動実験を用いてマウスの個体レベルで解析した。また、嗅球の神経回路レベルでの活性化部位の解析と、カルシウムイメージングによる嗅細胞レベルでの匂い反応の解析を行い、嗅覚による油への反応性を検討した。さらに、申請者が見出した新規の油センサー候補分子の

機能を明らかにするため、油センサー細胞で特異的に発現する関連遺伝子を、RNA シークエンシング (RNA-Seq) 法を用いて、現在、探索している。得られた油センサー候補分子に関しては、今後、レンチウイルスを用いた嗅細胞での *in vivo* 遺伝子発現系を用いて機能解析を行う予定である。

4. 研究成果

(1) 油の匂いに対する応答性の解析

動物が油を感じるメカニズムに関しては、味覚の油センサーの報告はあるものの、嗅覚による油の受容の研究はこれまで全く行われていなかった。その1つの原因として、従来の行動実験の問題点が挙げられる。匂いの嗜好性を判定する従来のテストでは、濾紙に匂いをしみ込ませてマウスに提示し、その反応を見る方法が一般的であった。しかしながら、従来の方法では、マウスが濾紙の油を舐めてしまうため、油による誘引作用は味覚のみによるものと推定され、油の匂いセンサーの存在は無視されてきた。

申請者は、自然界で動物が効率的に油を摂取するためには、嗅覚を用いた油の匂いの感知が必要であると推測した。そこで、申請者は、小さな穴をあけたチューブに油を入れてマウスに提示するという、味覚の影響を排除した新たな匂いの嗜好性実験法を確立した (図1 A 写真)。その結果、嗅覚においても油センサーが存在し、油の匂いに対してマウスが誘引行動を示すことが判明した (図1 B)。即ち、植物油に含まれる不飽和長鎖脂肪酸、それ自体の匂いによって、マウスは誘引作用を示すと考えられる。

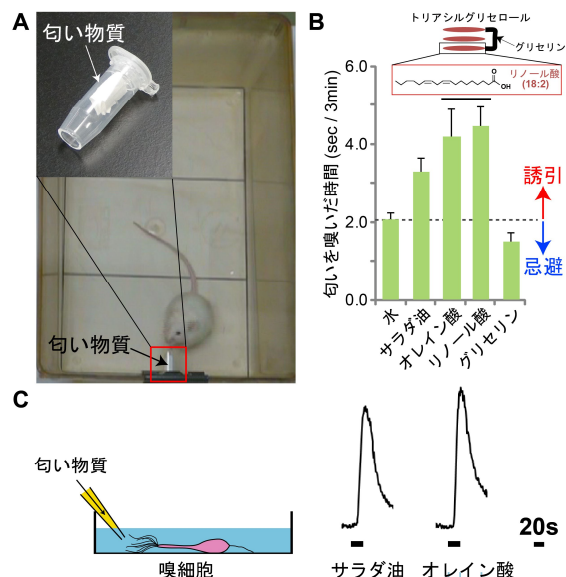


図1 マウスは不飽和脂肪酸の匂いに対して誘引行動を示す。
 (A) 匂いの嗜好性実験: マウスが直接触れられないようにエッペンチューブを通して匂い物質を提示し、それを嗅いだ時間を測定した。
 (B) 植物油に対する匂いの嗜好性実験: 油やその成分の不飽和長鎖脂肪酸の匂いに対して、マウスは誘引された。
 (C) 嗅細胞の Ca^{2+} イメージング: 嗅細胞の一部は、サラダ油やオレイン酸に反応を示した。

また、申請者の確立した匂いの嗜好性実験法が、味覚を排除した嗅覚によるものを見ているのか？を知るために、嗅覚喪失マウスを用いて検討した。まず、鼻孔内に ZnSO₄ を注入することにより、嗅細胞が著しく消失していることを、OMP (olfactory marker protein: 嗅細胞マーカー) に対する抗体染色を用いて確認した(図 2 A 写真)。そして、通常マウスと嗅覚喪失マウスを用いて、絶飲絶食条件下において匂いの嗜好性実験を行い、両者の行動を比較した。その結果、サラダ油に対する探索時間が、ZnSO₄ 処理群では非処理群に比べて有意に短くなった(図 2 B)。一方、コントロールの水に対する探索時間は、通常マウスと嗅覚喪失マウスとの間で有意な差が見られなかった。以上の結果から、本実験系における油による誘引作用が、嗅覚に依存するものであることが明らかとなった。

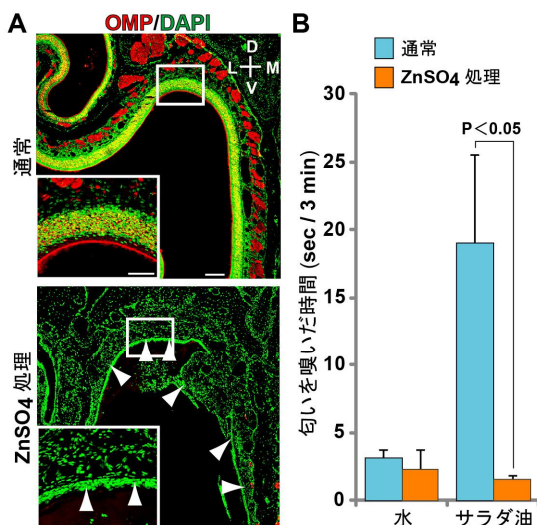


図 2 嗅覚脱失マウスを用いた匂いの嗜好性実験
(A) 嗅覚脱失マウスの嗅上皮に対する OMP 抗体染色: DAPI による核染色を緑で示す。スケールバー = 100 μm (50 μm; 拡大図)。D, dorsal; V, ventral; M, medial; L, lateral。
(B) 嗅覚脱失マウスにおける絶飲絶食条件下での匂いの嗜好性実験: エラーバーは標準誤差を表す。

(2) 油の匂いセンサーの機能解析

申請者は、匂いセンサーである嗅細胞を単離し、カルシウムイメージングにより応答性を検討したところ、一部の嗅細胞がサラダ油やオレイン酸に顕著に反応することが分かった(前頁 図 1 C)。また、油に対する反応性のある嗅細胞で発現する遺伝子を解析したところ、新規の油センサー候補分子が見出された。

現在、新規の油センサー細胞で特異的に発現する遺伝子を、さらに網羅的に探索しているので、得られた候補分子に関しては、レンチウイルスを用いた過剰発現やノックダウンにより、機能解析を行う予定である。

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 4 件)

Yoshihara S, Takahashi H, Naritsuka H, Nishimura N, Shirao T, Torashima 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 interneuron in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 32: 2217-2226 (2012). 査読有

高橋弘雄、坪井昭夫. 嗅覚系における CO₂ センシングの分子機構. *化学と生物*, 第 51 巻, pp.437-439 (2013). 査読有

吉原誠一、坪井昭夫. 嗅球における感覚入力依存的な神経回路再編の分子機構. *AROMA RESEARCH*, 第 13 巻, 第 3 号, pp.235-239 (2012). 査読有

高橋弘雄、坪井昭夫. 嗅覚系における神経回路形成と CO₂ センシングの分子機構. *日本応用酵素協会誌*, 第 46 巻, pp.23-30 (2012).

[学会発表](計 10 件)

(国際学会・シンポジウム)

Tsuboi A, Yoshihara S, Tamada Y and Takahashi H.: Time-lapse imaging of neuronal migration in the mouse olfactory bulb. *In: iCheMS Symposia: The 14th International Membrane Research Forum*, Kyoto Univ., Kyoto, March 15-17 (2013).

Tsuboi A, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Mori K, Stern PL and Yoshihara S.: Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. *In: The 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)*, Stockholm, Sweden, June 23-27 (2012).

(国際学会・一般講演)

Tsuboi A, Takahashi H, Asahina R, Kinoshita M, Nishimura N and Yoshihara S. 5T4 and Npas4 regulate the sensory experience-dependent development of dendrites in newborn olfactory bulb interneurons. *Keystone Symposia: Adult Neurogenesis*, Stockholm, Sweden, May 12-17 (2014).

Yoshihara S, Takahashi H, Nishimura N, Kinoshita M, Asahina R, Furukawa-Hibi Y, Nagai T, Yamada K and Tsuboi A: Npas4 regulates the sensory experience-dependent development of dendritic spines in newborn olfactory bulb interneuron. **Cold Spring Harbor Meeting: Neuronal Circuits**, Cold Spring Harbor, USA, April 2-5 (2014).

Yoshihara S, Takahashi H, Kinoshita M, Nishimura N Nagai T, Yamada K and Tsuboi A: Npas4 regulates sensory experience-dependent development of dendritic spines in olfactory bulb granule cells. **Neurogenesis 2013 in Matsushima**, Miyagi, Japan, October 16-18 (2013).

Tsuboi A, Takahashi H, Kinoshita M, Nishimura N and Yoshihara S: Npas4 transcription factor regulates the sensory experience-dependent dendritic spine development of newborn interneurons in the mouse olfactory bulb. **Cell Symposia: Genes, Circuits & Behaviour**, Toronto, Canada, June 2-5 (2013).

Tsuboi A, Takahashi H, Kinoshita M, Nishimura N and Yoshihara S: Sensory experience regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. **Keystone Symposia: Neurogenesis**, Santa Fe, USA, February 3-7 (2013).

Yoshihara S, Takahashi H, Kinoshita M, Nishimura N and Tsuboi A: Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. **Cold Spring Harbor Meeting: Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration**, Cold Spring Harbor, USA, September 18-22 (2012).

Takahashi H, Yoshihara S, Miyazaki N, Nanaura H, Hirono J, Sato T and Tsuboi A. Molecular basis of CO2 sensing in the mouse olfactory system. **The 16th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT)**, Stockholm, Sweden, June 23-27 (2012).

(国内シンポジウム・招待講演)

Tsuboi A, Takahashi H, Yamada K, Mori K, Stern PL and Yoshihara S: Sensory input regulates the dendritic development of specific neuronal subtypes in the mouse olfactory bulb. **In: Symposium**

“**Molecular basis of odor processing in the brain**”, **Neuroscience 2012**, Nagoya Congress Center, September 18-21 (2012).

〔図書〕(計 2 件)

Tsuboi A and Sakano H.: Odorant receptor gene regulation. **Handbook of Olfaction & Gustation (3rd edition): Modern Perspectives** (editor, Doty, R.L.) **Wiley-Blackwell Publishing**, in press (2014). 査読有

坪井昭夫. 嗅覚系における匂い地図の形成機構. **嗅覚と匂い・香りの産業利用最前線**, NTS 出版, pp. 69-79 (2013).

〔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

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坪井 昭夫 (TSUBOI, Akio)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20163868

(2)研究分担者

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

研究分担者

吉原 誠一 (YOSHIHARA, Sei-ichi)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 90360669