

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460288

研究課題名(和文) ケージド化合物を用いた神経細胞情報伝達因子の実時間細胞内分子ダイナミクス機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of real-time molecular dynamics of second messengers using caged compounds

研究代表者

竹内 裕子 (HIROKO, TAKEUCHI)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：10324823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚は嗅線毛から始まる。線毛には2種類の情報変換チャネル(CNG・Cl(Ca)チャネル)が発現し、匂い物質の化学情報を生体信号へと変換する。チャネルが連続的に活性化して電流増幅が起こり、最終的には活動電位が脳へと情報を伝達する。線毛内での細胞内因子の時空間分布は応答電流の発生に重要な意味を持つが、線毛の直径が100nmと微細であるため、生理学的研究は遅れていた。本研究では3つの技術(1. LSM-ROIによる局所刺激, 2. ケージド化合物の線毛内光乖離, 3. パッチクランプ法)を同時併用し、克服した。その結果、線毛内の分子動向の実時間解析のみならず、匂い物質自体によるチャネル抑制効果を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Sense of olfaction starts at the olfactory cilia of the olfactory receptor cells. Two types of olfactory transduction channels express on the cilia with high density, named CNG and Cl(Ca) channels. These channels cause current responses, which leads to the signals transmission to the brain. Spatial and temporal distributions of cytoplasmic elements (cAMP, Ca²⁺) are key factors in this cascade. However, structure of cilia are extremely tiny (100nm). This is the one of the reason for delaying electrophysiological study of the olfactory receptor cell. Furthermore, we combined three techniques into one set up to examine the excitatory and inhibitory of transduction channels and dynamics of second messengers in single cilium. Three techniques are here. 1) LMS-ROI. 2) Caged substances and photolysis, 3) Patch-clamp recording in parallel. Therefore, we observed the channel inhibition by certain odorants and molecular kinetics in the cilium in the real time using the patch clamp recording.

研究分野：生理学、電気生理学、神経科学

キーワード：パッチクランプ法 嗅細胞 線毛 ケージド化合物 細胞内因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始時における嗅覚研究は心理学的アプローチ、分子生物学的アプローチが主であり、その対象も嗅覚認知に関わる脳が多く行われていた。嗅覚受容の第一段階である嗅覚細胞でのにおい物質受容とその後の情報変換に関する分子機構に関する研究はいまだ未知の事項が多かった。その原因として、嗅覚をつかさどる末梢神経細胞の嗅細胞で嗅覚受容体を発現しているのが線毛のみだからである。この線毛は直径 100nm 程度であり、可視光線の波長よりも短いことから、可視化することすら困難であった。

(2) 同時に、生きた線毛を持つ嗅細胞からの電気記録を記録することが非常に難しく、電気生理分野の研究者ですら実験試料として嗅細胞を取り扱うことが困難であった。

(3) そこで、電気生理学研究のバックグラウンドを持つ申請者がナノスケール構造体である嗅細胞線毛をターゲットとして生きた状態での各種刺激時における電気記録を取得し、嗅覚情報変換カスケードに関する分子機構解明および応答の興奮や抑制を目的とする研究を開始した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では「ケージド化合物を用いた神経細胞情報伝達因子の実時間細胞内分子ダイナミクス機構解明」を定量的に明らかにすることが目的である。

線毛上に発現している情報変換チャンネル (Cyclic nucleotide-gated channel, Calcium-activated chloride channel) をターゲットとし、活性を測定する。

実際に、におい物質が存在するときの線毛内での分子動向をリアルタイムで測定する。

情報変換チャンネルの活性化に伴う、応答電流の発生から、線毛内での分子ダイナミクスを推定する。

(2) 上記より得られた結果から、最終的には末梢神経細胞の1つである嗅細胞での情報変換機構を定量的に解明し、神経細胞の興奮および抑制とその機序を明らかにする。

(3) におい物質刺激時、光刺激時におけるイオンチャンネルの興奮と抑制の機構と線毛内のセカンドメッセンジャー分子の実時間動向を明らかにし、嗅細胞における分子ダイナミクス機構を総合的に解明する。

3. 研究の方法

(1) パッチクランプ法：単離した嗅細胞にパッチクランプ法を適用し、イオンチャンネルの活性をリアルタイムで測定する。

(2) ケージド化合物：ケージド cAMP・ケージド Ca をそれぞれ用いることで、Cyclic nucleotide-gated channel,

Calcium-activated chloride channel の両チャンネルを UV 光により開口させることで、定量的な刺激を与えることが可能となり、cAMP により開口する CNG チャンネル、Ca²⁺

により開口する Cl(Ca)チャンネルの定量的な解析が可能となる。

(3) 微細構造の可視化：パッチクランプ法を適用する前に線毛の有無を確認する必要があるため、高倍率のレーザー顕微鏡にて形態を確認した。線毛の直径が 100nm であることから通常の光学顕微鏡では観察が困難を極める。そのため、顕微鏡下でパッチクランプ法を行うために蛍光物質 (ルシファーイエロー) を用いて可視化を行う。

(4) サブミクロン範囲での局所刺激：LSM を用いて、高い倍率 (x100)・高い NA (1.45) を持つレーザーコンフォーカル顕微鏡 (LSM510, Zeiss) を用いて、線毛の可視化を行う。

(5) 全て生きた嗅細胞からの電流記録を取得するため、上記 (1) ~ (4) の技術を 1 つのセットアップに組み込み、各技術を同時併用して実験を行う。その後、得られたデータを解析する。必要であれば、シミュレーションも導入し、検証を行う。

4. 研究成果

(1) 単離嗅細胞における電流測定のために、セットアップを新しく構築する必要があった。更に、実験の目的に際して、市販の装置では遂行できないため、実験目的に応じた、実験装置を開発した。特に、ケージド化合物の光乖離システム (UV 刺激装置) とにおい刺激システム (圧力刺激装置) と電流記録 (パッチクランプ装置) との連動、におい刺激システムと光刺激が独立して行える点、匂い-UV 光、UV 光-匂い、など交差刺激を行いながら電流を計測することが可能となる点など、市販の装置では行えない点を強化した。作製した使用して、データを取得した。

(2) 嗅細胞において、チャンネル興奮時に流れる応答電流はにおい物質自体の存在で抑制されることが明らかとなった。

(3) 2,4,6-trichloroanisole (TCA) がワインを始めとする多岐にわたる各種飲食品に含まれており、嗅細胞の応答活性を抑制する物質であることを発見し、機能を精査した。その結果、嗅細胞に発現している情報変換チャンネルのうち、CNG チャンネルのみを抑制していることが明らかとなった。

(4) 単離嗅細胞を用いて電流応答を調査したところ、極低濃度で効果を示すことを発見し、各種の風味の劣化した飲食品に 2,4,6-TCA が含まれていることも示唆した。その結果が PNAS に掲載されたことで、世界中の各種メディアが取り上げた (BBC, Times, 日経新聞, 読売新聞, 朝日新聞等)。

(5) 応答時における線毛内でのセカンドメッセンジャー (cAMP および Ca イオン) のダイナミクスを電流値より推定した結果とシミュレーションでの結果が一致し、その結果、線毛内での実時間における分子移動の可能性が低いことが示唆された。

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 1 件)

Takeuchi H. Kurahashi T.
2,4,6-Trichloroanisole is a potent suppressor of olfactory signal transduction. PNAS. 査読あり,110, 2013, 16235-16240. DOI:10.1073/pnas.1300764110

[学会発表](計 15 件)

竹内裕子、倉橋隆. 嗅覚情報変換チャンネルを修飾する物質探索、生理学研究所研究会、2016.9.8-9. 国立生理学研究所(愛知県)

竹内裕子、嗅覚情報変換における CNG チャンネル・Cl (Ca) チャンネル活性と修飾、第 1 回イオンチャンネル研究会、2016.7.7-8. 福岡大学病院(福岡県)

竹内裕子、倉橋隆. Modulation of CNG channel activity in olfactory cilia. 日本生理学会、2016.3.22-25. 札幌コンベンションセンター(北海道)

竹内裕子、倉橋隆. Modulation by off-flavor of CNG channels in olfactory cilia. Biophysical Society (アメリカ生物物理学会). 2016.2.27-3.2. ロサンゼルス(アメリカ)

竹内裕子、倉橋隆. 嗅覚情報変換チャンネル抑制を引き起こす TCA 以外の物質の可能性、第 108 回近畿生理学談話会、2015.10.24. 近畿大学(大阪府)

竹内裕子、倉橋隆. Modulation of CNG channels activity in the olfactory cilium. Physiological Society (英国生理学会). 2015.7.6-8. カーディフ(イギリス)

竹内裕子、Limited spread of second messenger molecules in the olfactory cilium. 大阪大学国際シンポジウム、2015.3.20. 大阪大学(大阪府)

竹内裕子、倉橋隆. High efficiency suppression of olfactory CNG channels may explain the olfactory masking and degradation of foods and beverages. 生理研国際シンポジウム、2014.11.25-28. 国立生理学研究所(愛知県)【招待講演】加藤寛之、竹内裕子、倉橋隆. 風味阻害と嗅覚情報変換チャンネル抑制との関係. 第 107 回近畿生理学談話会、2014.10.24. 兵庫県立医科大学(兵庫県)

竹内裕子、倉橋隆. Effect of 2,4,6-trichloroanisole; mechanism and diversity. Association for Chemoreception Science Annual Meeting. 2013.4.17-20. フロリダ(アメリカ)

Takeuchi H. Kurahashi T. TCA suppresses the olfactory transduction channel. 日本生理学会、2014.3.16-18. 鹿児島大学(鹿児島県)【招待講演】

加藤寛之、竹内裕子、倉橋隆. 2,4,6-TCA によるブショネの生体機構解明. ASEV 日本ブドウ・ワイン学会、2013.11.8. 山梨大学(山梨県)

加藤寛之、竹内裕子、倉橋隆. 2,4,6-Trichloroanisole による嗅覚情報変換チャンネル抑制と風味阻害. 第 106 回近畿生理学談話会、2013.11.2. 奈良県立大学(奈良県)

竹内裕子、倉橋隆. TCA による嗅細胞情報変換チャンネル抑制と風味阻害機構の検証. 生理研研究会「膜機能分子の機能・構造ゆらぎの時空間スペクトル解析」生理学研究所、2013.9.5-6. 国立生理学研究所(愛知県)

竹内裕子、倉橋隆. Off-flavor substances existing in a wide variety of foods and beverages cause a potent suppressor of the olfactory signal transduction currents. Association for Chemoreception Science Annual Meeting. 2013.4.17-20. フロリダ(アメリカ)

[図書](計 2 件)

倉橋隆、竹内裕子、日刊工業新聞社、おもしろサイエンス神経細胞の科学、2013、154 ページ.

倉橋隆、竹内裕子、中外医学社、Clinical Neuroscience、Vol.34.12 月号、2016、120 ページ.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 裕子 (Takeuchi Hiroko)

大阪大学大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：10324823

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()