

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26430016

研究課題名(和文) 嗅覚線毛における情報変換チャンネルの修飾機構

研究課題名(英文) Modulation mechanism of transduction channels in the olfactory cilia

研究代表者

倉橋 隆 (KURAHASHI, Takashi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：90225251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚はナノスケールの嗅線毛でスタートする。この過程には、分子の気相/液相分配、ナノスケール構造体としての線毛での分子反応連鎖が関与し、一般的な実験の適用が困難であり、システムを定量的に知るまでに多くの問題点が残されていた。本研究では、従来から用いられたパッチクランプ法、ナノイメージング法、レーザー光などをリファインし、微小空間ケージド化合物解離技術を複合させて使用した。また、さらに、高S/N比特性を持つ低ノイズ電流解析を組み込んだ。その結果、微小な生体組織での分子挙動を実時間レベルでモニターすることを可能とし、嗅覚情報変換チャンネルの修飾機構を解明した。成果は論文化し、学会発表で公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、感覚細胞における情報変換の分子機構を定量的に説明し、生体情報入力に関する分子動態的知見をもたらすことで、今後、ニューロンを含む生体細胞の微細構造部分(各種線毛、細胞小器官、 dendrite や軸索、シナプス、分泌顆粒)での分子機能研究に応用される進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Olfaction starts from the olfactory cilia with nano-scale structure. It is difficult to apply to cell experiment because it involves distribution between air/water phases of molecules and molecular chain reaction within the cilia as nano-scale structure. In addition, many questions remain and we couldn't elucidate that system quantitatively. In this research, we developed new methods and used it for making clear the transduction system within the nano-scale structure cilia. For that, we needed to refine conventional patch clamp technique, nano-imaging technique, laser beams and combined photolysis of caged substances within tiny space. Furthermore, we combined a low noise current analysis of with high S/N ratio into new system. As a result, we could monitor its molecular dynamics in real time in the tiny living tissue and clarified the modification mechanism of olfactory transduction system using channels. We made a paper regarding this result and presented in the conference.

研究分野：電気生理学

キーワード：情報伝達機構 イオンチャンネル ナノスケール 線毛 パッチクランプ法 電流

1. 研究開始当初の背景

ヒトを取り巻く匂い環境は年々変化している。特に、匂い受容や嗅覚知覚・嗅覚疾患と関連する高次脳を対象とした臨床研究や住居や生活空間における環境レベルでの匂いの研究は進められている。嗅覚は五感とは異なり、認識・知覚していない状態でも生体に影響を及ぼすため、臨床的にも、産業的にも、社会から重要視されている。しかし、研究当初から現在に至るまで匂い受容の第一段階である嗅細胞の基礎研究は他と比較するとまた立ち遅れている現状がある。その理由として、匂いを知覚する嗅細胞（嗅覚神経細胞）で情報変換を行っている部分が線毛に局在しているからである。嗅細胞の線毛は直径 100-200nm の微細構造であることから生きたまま取り出して、その特性を調べるのが技術的に困難であった。細胞を取り扱う際、指標としてカルシウムイメージングを用いることもあるが、リアルタイム性・濃度精確性に欠けることを多くの研究者は気づいていない。電気生理学を用いることで、この 2 点はクリアできる。リアルタイムにチャネル活性から定量的な濃度変化も知ることが可能である。本研究では、電気生理学を用い、生きた線毛をターゲットとする実験系を用いることで、世界の多くがまだ気づいていない部分を開拓する。

匂い受容の初段は嗅上皮内に位置する嗅細胞と匂い物質が接触することで始まる。匂いを感じる受容機構を備えている嗅細胞線毛を実験モデルとして用いて、匂い受容システムと生体情報変換過程における分子機構を解明することを目的とした。嗅細胞線毛には匂い物質と結合する嗅覚受容体タンパク質が発現しており、外界から飛来した匂い物質（主に揮発性炭素化合物）とコンタクトすることで、一連の反応が開始する。更に、この線毛には情報変換チャネル（サイクリックヌクレオチド感受性陽イオンチャネル、カルシウム感受性クロライドチャネル）が他の箇所と比較しても高密度に発現している。これにより、嗅細胞の中でも、線毛で局所的に化学-電気信号変換が高効率で行われることが知られている。しかし、情報伝達の間である線毛がナノスケール構造体としての線毛での分子反応連鎖が関与し、一般的な実験の適用が困難であり、多くの問題点が残されていた。その中でも、嗅覚の特性と関連して残される問題点には、a. 匂い識別様式（細胞間の匂い受容の違い：匂いの種別と細胞応答性/受容蛋白質との相互関係） b. 信号増幅の分子機能（いかに匂いの情報を細胞情報へ結びつけるか） c. 嗅覚順応の分子機構、d. 匂いマスキングなどが挙げられた。そこで、上記の問題点を解明するため、線毛をターゲットとして電気生理学的アプローチを用いて、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本課題に関連する研究のメインターゲットテーマとして上記記載の b 信号増幅の分子機構および d 匂いマスキングがあげられる。前者は線毛がナノスケールの構造体であることから実験的な困難が多く、生きた試料を用いたリアルタイム解析が難しかった。そこで、複数の技術を同時に適用し、メカニズムを構成する因子ダイナミクスの定量的な解析を目指した。また、後者は嗅覚マスキングとも呼ばれる現象で、古代から人類が悪臭をなくすために経験則的に利用してきた知見でもあった。しかし、各種様々な化学物質により、情報変換チャネルが抑制されることから、嗅覚マスキングは飲食品における風味低下とも密接がかかわりを持つことが示された (Takeuchi et al., 2013)。本研究では、チャネル阻害をもたらす分子を自然界に存在する天然化合物、人工化合物など広い範囲で探索し、試料採取や物質探索後は電気生理学的手法であるパッチクランプ法を用いて、チャネル抑制を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

手法には、パッチクランプ法、ナノイメージング法、レーザー光による微小空間ケージド化合物解離などの技術を複合させ、同時利用した。さらには、低ノイズ電流解析を組み込んで、使用した。線毛内の物質操作に関してはケージド化合物の UV 光解離を利用した。刺激にはレーザースポットを利用して、ナノスケールの線毛内で局所的に cAMP や Ca イオンのジャンプを起こし、その際の応答を電氣的に記録することで定量的な解析を可能とした。レンズで絞るレーザー光スポット径の大きさは、ブルーレイ記録技術でも知られるように、波長が短いほど、直径が小さくなり、ナノメートル領域の局所スポットを作り出すことができる。本研究では、ブルーレイに利用される波長よりもさらに短波長（UV 領域）を利用し、さらに開口数の高い油浸光学系を用いた。線毛内のサブミクロン領域での物質ジャンプを生じさせ、同時に光学測定によって物質の拡散状況を観察した。この仮説を、膜電位固定法下のチャネル電流記録と同時に、光学的に線毛内分子を直接可視化することで検証した。すでに本研究室では、局所 UV 照射のための ROI 機能を備えた共焦点顕微鏡とパッチクランプの統合システムは稼働状況にある。Ca イオンに関しては Ca 感受性の色素をホールセルパッチ電極から直接線毛内へ流し込む。cAMP に関しては cAMP 感受性蛋白質の線毛での発現と cAMP 濃

度測定を行った。

実際には、有尾両生類であるイモリから嗅粘膜を取り出し、酵素処理・物理処理を行って、単離嗅細胞を取得する。有尾両生類を用いた理由として、全ての細胞サイズが哺乳類よりも1.5倍程度大きいためである。パッチクランプ法を適用するにあたり、電極がアクセスする対象面積が大きければ大きいほど成功確率が上昇するためである。嗅覚受容における情報伝達カスケードや発現しているイオンチャネルに関して、哺乳類との差異がないと考えられているため、かつ、本実験ではケージド化合物を使用し、情報伝達カスケードの上流部分をスキップするので手法的な問題はない。

4. 研究成果

本研究課題において、信号増幅の分子機構については、情報伝達に関わる因子が線毛内での実時間あたりのダイナミクスを調査した。電気生理学の実験では、線毛内ではcAMP、Caイオンともにバッファによる拡散制限があり、これが情報増幅や細胞機能のコンパートメント化に関与するというデータを取得した。更にシミュレーションにてパラメータを換えて計算をしたところ、細胞膜に細胞内物質と結合するサイトがあるものとならないもので分子拡散制限が大きく異なった。細胞から取得したデータとシミュレーション結果と合わせて解析したところ、線毛内ではcAMP、Caイオンともにバッファによる拡散制限があることが判明し、2018年12月に生理学分野の専門誌であるThe Journal of General Physiologyに掲載された(Takeuchi & Kurahashi (2018). Second messenger molecules have a limited spread in olfactory cilia. J Gen Physiol. 150: 1647-1659)。

後者の嗅覚マスキングに関しては、情報変換チャネル阻害をもたらす分子を自然界に存在する天然化合物、人工化合物など広い範囲で探索し、試料採取や物質探索後は電気生理学的手法であるパッチクランプ法を用いて、チャネル抑制を検証することを目的とし探索・実験を行った。その結果、新規抑制物質が嗅線毛に発現しているイオンチャネルを抑制することを示し、匂い受容における生体電気信号構築には抑制のパラメータも含まれていることを一連の実験・研究によって明らかにした。また、各種物質の中でも、数分子で多数のチャネルを同時に阻害するほどの高阻害性を持つ分子が存在することを明らかにした後も、抑制機構解明や新規物質設計も並行で進めている。これら結果は、基礎科学分野のみならず、産業界や応用科学分野においても基盤となる知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Tamari K, Takeuchi H, Kobayashi M, Takeuchi K, Kurahashi T, Yamamoto T. (2019). Electrical properties of cells from human olfactory epithelium. *Auris Nasus Larynx*. 30697-30697. 査読有.
2. Takeuchi H & Kurahashi T (2018). Second messenger molecules have a limited spread in olfactory cilia. *J Gen Physiol*. 150: 1647-1659. 査読有.
3. 倉橋隆 (2014) 風味抑制因子 日本食品工学会誌 15 巻 203-205. 査読無.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 倉橋隆、竹内裕子 (2018) 視細胞ターミナルや嗅線毛に存在する Ca²⁺感受性 Cl⁻チャネルの記録 第111回近畿生理学談話会 2018年11月17日(和歌山医科大学・和歌山)
2. 竹内裕子、倉橋隆 (2018) 食品の臭い消しに関して嗅細胞レベルでの検討 第111回近畿生理学談話会 2018年11月17日(和歌山医科大学・和歌山)
3. Takashi Kurahashi. (2017) Limited Spread of Second Messenger Molecules in the Olfactory Cilium. *Osama International Symposium : From Ion Channel to Brain*. 2017年8月3日(大阪大学・大阪) <国際シンポジウム主催>
4. Takashi Kurahashi, Hiroko Takeuchi (2017) Ion channels mediating sense of smell. *Seminar of Neurobiology of Ion Channels Department of Neurosciences, University of Groningen*. 2017年6月23日(University of Groningen, The

Nether lands) <招待講演>

5. 竹内裕子、倉橋隆 (2017) Modulation of the olfactory transduction channels by small molecules. 第 94 回日本生理学会 2017 年 3 月 28 日 ~ 30 日 (浜松アクロシティ・静岡) <招待講演>
6. Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. (2016) Mechanism of flavor loss in foods and beverages. Association for Chemoreception Science (Hyatt Regency Coconut Point, FL, USA)
7. Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. (2016) Haloanisoles suppress activation of the cyclic nucleotide-gated channel in the olfactory cilia. Physiology 2016, 2016 年 7 月 29 日 ~ 31 日 (Dublin Convention Centre, Dublin, Ireland).
8. Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. (2016) Mechanism of flavor loss in foods and beverages. The Association for Chemoreception Sciences 38th Annual Meeting. 2016 年 4 月 20 日 ~ 23 日 (Bonita Springs, FL, USA).
9. Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. (2016) Modulation by off-flavors of CNG channels in olfactory cilia. Biophysical Society-60th Annual Meeting 2016 年 2 月 28 日 ~ 3 月 2 日 (Los Angeles Convention Center, CA, USA).
10. Grace Jeng, 竹内裕子、倉橋隆、Tsung Yu Chen (2016) Independent activation of the two subunits of the TMEM16 calcium-activated chloride channel. 第 93 回日本生理学会 2016 年 3 月 22 日 ~ 24 日 (札幌コンベンションセンター・北海道).
11. 竹内裕子、倉橋隆 (2015) 嗅覚情報変換チャネル抑制を引き起こす TCA 以外の可能性. 第 108 回 近畿生理学談話会、2015 年 10 月 24 日 (近畿大学医学部・大阪)
12. 竹内裕子、倉橋隆 (2015) Modulation of CNG channels activity in the olfactory cilia. Physiology 2015, 2015 年 7 月 6 日 ~ 8 日 (Motorpoint Arena Cardiff , Cardiff, United Kingdom)
13. Takashi Kurahashi. (2015) Limited Spread of Second Messenger Molecules in the Olfactory Cilium. Osaka International Symposium. 2015 年 3 月 19 日 ~ 21 日 (大阪大学・大阪) <第 92 回日本生理学会大会サテライト国際シンポジウム・主催>
14. 倉橋隆 (2014). Potent inhibition of olfactory transduction channel by natural compounds may degrade the quality of foods and beverages. The 45th NIPS International Symposium. "Cutting-edge approaches towards the functioning mechanisms of membrane proteins". 2014 年 11 月 25 日 (生理学研究所・愛知) <招待講演>
15. 竹内裕子、倉橋隆 (2014) High efficiency suppression of olfactory CNG channels may explain the olfactory masking and degradation of foods and beverages. The 45th NIPS International Symposium. "Cutting-edge approaches towards the functioning mechanisms of membrane proteins" 2014 年 11 月 25 日 ~ 28 日 (生理学研究所・愛知)
16. 竹内裕子、加藤寛之、倉橋隆 (2014) 風味阻害と嗅覚情報変換チャネル抑制との関係. 第 107 回近畿生理学談話会、2014 年 10 月 24 日 (兵庫県立医科大学・兵庫)
17. Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi. (2014) 2,4,6-trichloroanisole suppress the channel activity in the olfactory transduction cascade. The Association for Chemoreception Sciences 36th Annual Meeting. 2014 年 4 月 9 日 ~ 12 日 (Bonita Springs, FL, USA).

[図書] (計 3 件)

1. 倉橋隆 (2015) トコトンやさしい人体のしくみの本 ISBN-10: 4526074098, ISBN-13: 978-4526074097, 日刊工業新聞社 2015年6月出版、総ページ数:159.
2. Richard A. Harvey, Robin R. Prestson, Thad E. Wilson 著 (2014) リッピンコットシリーズ イラストレイテッド生理学 ISBN 9784621088005. 第II編 10. 味覚と嗅覚 日本語訳 丸善書店 2014年12月出版、総ページ数:608.
3. Hiroko Takeuchi, Takashi Kurahashi, Dietmar Krautwurst (Ed) (2014) Taste and Smell. DOI 10.1007/978-3-319-48927-8. Hardcover ISBN 978-3-319-48925-4. Softcover ISBN 978-3-319-84049-9. Series ISSN 1862-2461. eBook ISBN 978-3-319-48927-8. Springer International Publishing 2014年10月出版、総ページ数:199.

〔その他〕

ホームページ等

http://saturn.fbs.osaka-u.ac.jp/18%20labweb/kurahasi_x.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。