

## 学位論文題名

## Odor discrimination and signal transduction mechanisms in olfactory and vomeronasal systems

(主嗅覚系および副嗅覚系におけるにおい識別および情報変換機構)

## 学位論文内容の要旨

## 【はじめに】

脊椎動物の多くは、においを感知する器官として嗅覚器(主嗅覚系)と鋤鼻器(副嗅覚系)を有し、外界に存在する化学物質を感知し識別している。嗅覚器は多種多様のにおい物質を識別していると言われているが、どの程度まで識別しているかに関しては詳しく調べられていない。本研究の第1章では、嗅覚受容膜がもつにおい識別機構を解明する目的で、カメ嗅覚器を用いて各種光学異性体間でのにおいの強さおよび質に差があるかどうかを調べた。

近年、においの受容体およびトランスダクションに関する研究が急速に進展し、嗅覚受容には様々な経路が存在することが明らかになってきた。1つの経路は、におい分子は特異的な受容体に結合しG-蛋白質を介してcAMPまたはIP<sub>3</sub>を増加させ、受容器電位を発生させるものである。しかしながら、三叉神経や神経芽細胞腫のような非嗅覚系の細胞も各種のにおいに応答することから、受容体を介さずににおい応答が発現する経路も考えられている。この機構の中には、におい分子が直接G-蛋白質を活性化する経路の存在も示唆されている。

においの受容体やG-蛋白質は、受容膜中の脂質に囲まれている。またにおい分子は一般に疎水性であり、脂質層と直接相互作用することが考えられる。におい応答が上記いずれの経路で発現するとしても、におい受容には脂質層が重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究の第2章では、におい受容における脂質の役割を明らかにするため、カメ嗅上皮をさまざまな脂質で処理し、各種におい物質に対する応答特異性変化を調べた。

においを感知するもう一つの器官である鋤鼻器は、両生類以上の多くの動物にみられる。その生理的な役割については、主として行動科学的な研究から、フェロモン様物質などの受容に関与し、動物の行動に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかしながら、鋤鼻器が刺激物質を受容する機構については不明な点が多い。本研究の第3章では、嗅覚器において存在が認められているセカンドメッセンジャー経路が、鋤鼻器感覚細胞にも存在するかどうかを調べた。

## 【実験方法】

実験動物にはクサガメを用いた。嗅覚器応答および鋤鼻器応答は、嗅球(あるいは副嗅球)を露出させて銀電極を接着し、におい刺激により生じる誘起脳波を積分して記録した。単一鋤鼻器感覚細胞の応答：厚さ120 μmの鋤鼻器上皮切片を作成し、その切断面上に存在する鋤鼻器感覚細胞の応答を、パッチクランプ法を用いて細胞体から記録した。

## 【結果および考察】

1. 光学異性体間のにおい強度および質の差。光学異性体間のにおいの強さの差に関しては、これまでに多くの報告がなされているが、これらの報告はヒトの官能試験の結果に基づいたものであり、あいまいな点が多い。本研究結果から、調べた6対のにおいすべてにおいて、においの応答強度および閾値濃度は、*d*-体と*l*-体で差が無いことが明らかとなった。においの質の差異については、定量的な交差順応法を改良し、においの質の差異を定量的に評価することにより調べた。本実験の

結果、カメ嗅覚器は光学異性体のおい質を識別していることが示唆された。ただし、識別の程度は、carvoneのように明確に識別されるものから、limoneneのようにあまり識別されないものまでさまざまであった。

**2. カメ嗅上皮の脂質処理によるおい応答特異性変化。** 嗅受容膜における脂質の役割を明らかにするため、phosphatidyl serine (PS) のリンガー液サスペンションをカメ嗅上皮に与え、嗅覚器の各種におい物質に対する応答特異性がどのように変化するかを *in vivo* の系で調べた。PS処理により、*n*-valeric acidのような脂肪酸に対する応答は、いずれの場合も4~5倍に増大した。その他のおいに対する応答は、PS処理により顕著な変化は見られなかった。PSと同様の実験を他のリン脂質についても行ったところ、cardiolipin処理、phosphatidic acid処理いずれの場合も、処理前後でおい応答の顕著な増大はみられなかった。このように、処理に用いる脂質の種類により、異なった種類のおい応答が変化することがわかった。以上の結果は、嗅覚受容機構において、受容蛋白質だけでなく嗅受容膜中の脂質が重要な役割を果たしていることを示唆した。

### 3. 鋤鼻器感覚細胞における情報変換機構

**3-1. 鋤鼻器感覚細胞の一般的な電気的特性。** まずカメ鋤鼻器感覚細胞の電気生理学的特性を調べた。カメ鋤鼻器感覚細胞の静止電位は、約-48 mVだった。数 pA の電流注入で活動電位を発生することから、カメ鋤鼻器感覚細胞は電気刺激に対し、鋭敏に応答することがわかった。

**3-2. 細胞内投与したcAMPに対する鋤鼻器感覚細胞の応答。** 次にcAMP経路が存在するかを調べるため、cAMPをバッチ電極より細胞に注入し応答を測定した。鋤鼻器感覚細胞にcAMPを注入すると、注入したcAMPの濃度の増加に伴って大きな内向き電流が生じた。cAMPにより生じる内向き電流のcAMPに対する感受性は、他のグループにより報告されているイモリ嗅細胞と同程度であった。したがって、カメ鋤鼻器感覚細胞はcAMPに対し、イモリ嗅細胞と同様な感受性を示すことが明らかとなった。電流が生じる前と生じている間の電流-電圧曲線の交点から求めたcAMPに対する応答の逆転電位は $-14.8 \pm 2.6$  mV ( $n=12$ )であった。

**3-3. 細胞内投与したcGMPに対する鋤鼻器感覚細胞の応答。** 嗅線毛に存在するサイクリックヌクレオチド依存性陽イオンチャネルは、cAMPとともにcGMPに対しても応答する性質を有している。そこで、先ほどのcAMPと同様の実験をcGMPについても行った。1 mM cGMPを細胞内に注入することにより、内向き電流が生じた( $227.1 \pm 61.4$  pA;  $n=10$ )。cAMPの場合と同様にして求めたcGMPに対する応答の逆転電位は、 $-11.5 \pm 8.7$  mV ( $n=6$ )であった。この値は、cAMPに対する応答の値とほぼ同じであることから、cAMPやcGMPが感覚細胞膜に存在する同種のイオンチャネルを直接活性化することにより、内向き電流が生じたことを示唆した。

**3-4. 細胞内投与したIP<sub>3</sub>に対する応答。** cAMPと同様の実験をIP<sub>3</sub>についても行ったところ、0.1 mM IP<sub>3</sub>の細胞内注入でも内向き電流が生じた。0.1 mM IP<sub>3</sub>の細胞内注入により生じた内向き電流の大きさは、約88 pAであった。IP<sub>3</sub>の注入により生じる応答は、IP<sub>3</sub>-チャネルのプロッカーであるruthenium redにより、ほとんど抑制された。このことはIP<sub>3</sub>が感覚細胞膜に存在するイオンチャネルを活性化することにより、内向き電流が生じたことを示唆した。また、IP<sub>3</sub>に対する応答の逆転電位は、 $-32.3 \pm 1.5$  mV ( $n=6$ )と算出された。この値は、先ほどのcAMPの細胞内注入により生じる応答の逆転電位よりもいく分過分極側となっている。したがって、鋤鼻器感覚細胞に存在するIP<sub>3</sub>依存性イオンチャネルはcAMPの場合に比べ、よりK<sup>+</sup>イオン選択性を有すると考えられる。

**3-5. cAMP経路は一般的なおいの応答発現に寄与するか。** 以上のように、鋤鼻器感覚細胞においてもcAMP経路が存在することが示唆された。一方、カメ鋤鼻器は一般的なおい物質にも、嗅覚器と同様に応答することが知られている。鋤鼻器感覚細胞に存在するcAMP経路が、一般のおいに対する応答にどの程度関与しているのかを副嗅球からの誘起脳波を測定することにより調べた。鋤鼻器上皮にforskolinを高濃度で与え、cAMP経路を介した応答を一度生じさせると、cAMP経路に強い脱感作が引き起こされる。このような条件下でcitralvaを与えると、おい応答が生じた。この結果は、鋤鼻器のcAMP経路はcitralvaのような一般的なおいの応答の発現にはあまり寄与していないことを示唆した。

最近、鋤鼻器上皮にも嗅覚受容体ファミリーが発現していることや、鋤鼻器感覚細胞をミミズから分泌されたフェロモン蛋白で刺激するとcAMPやIP<sub>3</sub>のレベルが変化することが報告されている。

本研究で見いだされたcAMPやIP<sub>3</sub>に依存的に内向き電流を生じる経路は、鋤鼻器がフェロモンのような特殊なおいを受容する際の応答発現に寄与しているものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 栗原 堅三  
副査 教授 加茂 直樹  
副査 助教授 三宅 教尚  
副査 講師 宮内 正二

## 学位論文題名

### Odor discrimination and signal transduction mechanisms in olfactory and vomeronasal systems

(主嗅覚系および副嗅覚系におけるにおい識別および情報変換機構)

脊椎動物の多くは、においを感知する器官として嗅覚器(主嗅覚系)と鋤鼻器(副嗅覚系)を有し、外界に存在する化学物質を感知し識別している。申請者は長年にわたり脊椎動物における嗅覚情報変換機構の研究を行ってきたが、今回主嗅覚系および副嗅覚系におけるにおい識別および情報変換機構に関する以下の研究成果がまとまったので、学位論文を提出した。

#### ●嗅覚器におけるにおい識別および情報変換機構

1. **光学異性体間のおい強度および質の差**。嗅受容膜がもつにおい識別機構を解明する目的で、カメ嗅覚器を用いて各種光学異性体間でのにおいの強さおよび質に差があるかどうかを調べた。この結果、調べた6対のおいすべてにおいて、においの応答強度および閾値濃度は、*d*-体と*l*-体で差が無いことが明らかとなった。においの質の差異については、交差順応法を改良し、においの質の差異を定量的に評価することにより調べた。本実験の結果、カメ嗅覚器は光学異性体のおいの質を識別していることが示唆された。ただし、識別の程度は各光学異性体間でさまざまであった。

2. **カメ嗅上皮の脂質処理によるにおい応答特異性変化**。現在のところ、嗅覚受容には様々な経路が存在することが明らかになってきた。このなかには、におい分子が直接G-蛋白質を活性化する経路の存在も含まれている。においの受容体やG-蛋白質は、受容膜中の脂質に囲まれていること、またにおい分子は一般に疎水性であり脂質層と直接相互作用する可能性のあることから、におい受容には脂質層が重要な役割を果たしていることが考えられる。そこで、におい受容における脂質の役割を明らかにするため、カメ嗅上皮をさまざまな脂質で処理し、各種におい物質に対する応答特異性変化を調べた。この結果、カメ嗅覚器のおいに対する応答特異性は嗅上皮の脂質処理により大きく影響を受けること、その程度は処理に用いる脂質の種類により異なることがわかった。以上の結果は、嗅覚受容機構において、受容蛋白質だけではなく嗅受容膜中の脂質が重要な役割を果たして

いることを示唆した。

### ●鋤鼻器感覚細胞における情報交換機構

においを感知するもう一つの器官である鋤鼻器は、両生類以上の多くの動物にみられる。しかしながら、鋤鼻器の電気化学的性質やにおいの受容機構については不明な点が多い。本研究では、このことについて電気生理学的手法を用いて調べた。

**3. 鋤鼻器感覚細胞の一般的な電気的特性.** カメ鋤鼻器感覚細胞の静止電位は、約-48 mVであった。数 pAの電流注入で活動電位を発生することから、カメ鋤鼻器感覚細胞は電気刺激に対し、鋭敏に応答することがわかった。

**4-1. 細胞内投与したcAMPに対する鋤鼻器感覚細胞の応答.** 次に、鋤鼻器感覚細胞にもcAMP経路が存在するかを調べるため、cAMPをパッチ電極より細胞に注入し応答を測定した。鋤鼻器感覚細胞にcAMPを注入すると、注入したcAMPの濃度の増加に伴って大きな内向き電流が生じた。cAMPに対する応答の逆転電位は約-14.8 mVであった。

**細胞内投与したcGMPに対する鋤鼻器感覚細胞の応答.** 嗅線毛に存在するサイクリックヌクレオチド依存性陽イオンチャネルは、cGMPに対しても応答する性質を有している。そこで、先ほどのcAMPと同様の実験をcGMPについても行った。cGMPを細胞内に注入することにより、大きな内向き電流が生じた。cAMPの場合と同様にして求めたcGMPに対する応答の逆転電位は、約-12 mVであった。この値はcAMPの場合とほぼ同じであることから、cAMPとcGMPが感覚細胞膜に存在する同種のイオンチャネルを直接活性化することにより、内向き電流が生じることが示唆された。

**4-2. 細胞内投与したIP<sub>3</sub>に対する応答.** cAMPと同様の実験をIP<sub>3</sub>についても行ったところ、IP<sub>3</sub>の細胞内注入でも内向き電流が生じた。この応答は、IP<sub>3</sub>-チャネルのプロッカーであるruthenium redによりほとんど抑制された。このことはIP<sub>3</sub>が感覚細胞膜に存在するイオンチャネルを活性化することにより、内向き電流が生じたことを示唆した。IP<sub>3</sub>に対する応答の逆転電位は、約-32.3 mVと算出された。

**5. cAMP経路の生理的役割.** カメ鋤鼻器は一般的なにおい物質にも、嗅覚器と同様に応答することが知られている。鋤鼻器感覚細胞に存在するcAMP経路が、一般のにおいに対する応答にどの程度関与しているのかを*in vivo*の系で調べた。鋤鼻器にforskolinを高濃度で与えることによりcAMP経路を完全に脱感作させた条件下でも、鋤鼻器のにおい応答は生じた。この結果は、cAMP経路が鋤鼻器の一般的なにおいに対する応答の発現にはあまり寄与していないことを示唆した。

最近、鋤鼻器感覚細胞をミミズから分泌されたフェロモン蛋白で刺激するとcAMPやIP<sub>3</sub>のレベルが変化することが報告されている。本研究で見いだされたcAMPやIP<sub>3</sub>に依存的に内向き電流を生じる経路は、鋤鼻器がフェロモンのような特殊なにおいを受容する際の応答発現に寄与しているものと考えられる。

以上のように、申請者は主嗅覚系および副嗅覚系におけるにおい識別および情報交換機構に関し数多くの新しい知見を得ており、本論文は博士の学位を与えるにふさわしいものと判定した。