

博士(薬学) 庄司 隆行

学位論文題名

Receptor Functions and Transduction Mechanisms
in Olfactory Systems

(嗅覚器の各種刺激物質に対する応答機能と情報変換機構)

学位論文内容の要旨

現在までに得られている知見から、それぞれcAMP、IP₃が関与するふたつの経路のニオイ受容メカニズムが提唱されている。cAMP経路では、ニオイ分子が嗅線毛膜上のレセプタータンパクに結合するとG-タンパクを介してアデニレートシクラーゼが活性化され、cAMP濃度の上昇にともない嗅線毛膜上に高密度に存在するcAMP依存性カチオンチャネルが活性化され、受容器電位が発生する。一方IP₃依存性経路では、ニオイ分子が嗅線毛膜上のレセプタータンパク質に結合するとGTP結合タンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化され、産生されたIP₃により嗅線毛膜上のIP₃依存性カチオンチャネルが活性化され、受容器電位が発生する。また、これらのカチオンチャネルから流入したCa²⁺によるCa²⁺依存性Cl⁻チャネルの活性化も、受容器電位の発生に寄与しているという報告もある。以上の機構に共通のことは、外界と接している嗅線毛膜のイオン透過性が変化することがニオイ応答発現の要因であるという点である。そこで、本研究では、ニオイ刺激によって活性化されるcAMP依存性およびIP₃依存性カチオンチャネル、Ca²⁺依存性Cl⁻チャネルが、実際にニオイ応答発現に寄与しているかどうかを調べた。また、嗅細胞が本来持っているニオイ物質以外の刺激に対する応答性を調べる目的で、種々の味物質に対するクサガメ嗅覚器の応答についての実験を行い、他の動物の味覚器で得られている味応答の性質と比較した。

(1) クサガメ嗅受容膜におけるイオン透過性変化はニオイ応答発現に寄与するか
ニオイ応答が、嗅線毛上のcAMP依存性カチオンチャネルやIP₃依存性カチオンチャネルの活性化によって発現するならば、受容膜上に存在する塩を完全に除いた場合、ニオイ応答は消失するはずである。したがって、嗅受容膜上の塩環境を変化させたときのニオイ応答に与える影響を調べれば、これらのカチオンチャネルが関与しているかどうかを知ることができる。本実験では、嗅上皮を種々の塩濃度の溶液で灌流したときのニオイ応答を測定し、嗅受容膜におけるカチオンチャネルの活性化がニオイ応答発現に寄与するかを調べた。ニオイ物質を100 mM NaCl溶液に溶かした場合とsalt free 溶液に溶かした場合の濃度-応答曲線を比較したところ、両者はほぼ同じ曲線であることがわかった。このことは、Naイオンが存在しなくともいずれのニオイ物質濃度でもニオイ応答が発現することを示している。また、応答の大きさは、Naイオンの濃度変化によりほとんど影響

を受けなかった。さらに、13種のニオイ物質に対する応答のNaCl依存性を調べた。その結果、刺激溶液に塩が含まれない場合の応答の大きさと100 mM NaClが含まれる場合の応答の大きさの比は0.83から1.26の間の値であり、刺激液中か

ら塩を除いてもニオイ応答の大きさはほとんど影響を受けないことが明らかになった。また、刺激液中に含まれるCaCl₂濃度を、0から10 mMまで変化させた場合でも、ニオイ応答の大きさはほとんど変化しなかった。以上の結果は、嗅受容膜表面から塩を除いた状態でも、通常と同じ大きさのニオイ応答が発現することを示している。このことは、嗅線毛膜上のcAMP依存性カチオンチャネルやIP₃依存性カチオンチャネルがニオイ応答の発現には寄与していないことを示している。また、ニオイ応答の大きさが、刺激液中に含まれるCaCl₂濃度の変化にほとんど影響を受けないことから、Ca²⁺依存性Cl⁻チャネルの活性化もまたニオイ応答の発現には寄与しないと考えられる。したがって、ニオイ応答の発現には、嗅線毛を含む嗅受容膜におけるイオン透過性変化は寄与していないことが示唆された。

(2) クサガメ鋤鼻器におけるニオイ応答感度と情報変換機構

鋤鼻器は多くのほ乳類や虫類、両生類などにみられる化学受容器であり、性行動や索餌行動に重要な役割を果たしていると考えられている。鋤鼻器受容細胞には嗅細胞のような線毛はみられず、受容膜は微絨毛構造を形成している。リンガー液に種々のニオイ物質を溶かして刺激液としたときの、鋤鼻器および主嗅覚器のニオイ応答の濃度-応答曲線を比較したところ、鋤鼻器は、主嗅覚器とほぼ同じ閾値濃度から応答を発現することがわかった。嗅覚器のニオイ受容においては、線毛構造の役割の重要性が強調されているが、線毛を持たない鋤鼻器受容細胞が嗅細胞と同等の感度を有することから、線毛構造の有無は、少なくとも応答感度には影響しないものと推測される。また、鋤鼻器のニオイ応答も、主嗅覚器の場合と同様にNaClの有無にかかわらず、応答の大きさはほぼ一定であった。さらに、刺激液中のCaCl₂濃度を0から10 mMまで変化させても、ニオイ応答の大きさはほとんど変化しなかった。このことは、Caイオンも、Naイオンと同様にニオイ応答発現に必須ではないことを示している。以上の結果から、鋤鼻器におけるニオイ応答発現には、受容膜表面のイオン透過性変化は寄与しないことが示唆された。

(3) 各種味物質に対するクサガメ嗅覚器の応答

クサガメ嗅覚器は、5基本味のうち塩味、酸味、苦味に対して味覚器と同等の応答性を示した。塩応答においては、味覚器とほぼ同じく、より高い感度で応答し、多価陽イオンの塩は、一価陽イオンの塩よりも大きな応答を発現した。また、味覚器で報告されている陰イオン効果も観察された。チャネルを通過しにくいと考えられる有機陽イオンも、大きな応答を引き起こした。さらに、amilorideによる抑制効果を種々の塩応答について調べたところ、amilorideはNa応答だけでなく他の塩応答も非特異的に抑制することがわかった。この結果は、イヌ味覚器の実験結果と一致する。種々の苦味物質に対して、クサガメ嗅覚器は敏感に応答した。中性で正電荷をもつキニーネ、ストリキニーネ、パパベリンに対する応答は、100 mM NaClの存在により完全に抑制された。一方、電荷を持たないカフェインなどに対する応答は全く影響を受けなかった。この結果は、ウシガエル味覚器での実験結果と一致する。種々の酸に対する応答の大きさを、pHに対してプロットしたところ、ヒト味覚器、ラット味覚器と同様に陰イオンの種類によって応答の大きさが変化することがわかった。また、応答は味覚器よりもより高いpHから発現した。したがって、嗅細胞は味細胞よりも酸に対する感度が高いことが明らかになった。塩、酸、苦味物質に対する応答の温度依存性を調べたところ、20~30°Cにピークをもつ曲線を描いた。この結果は、ラット味覚器、イヌ味覚器の実験結果と一致する。

以上の結果から、クサガメ嗅覚器の味物質（塩、酸、苦味物質）に対する応答の感度は一般に味覚器よりも鋭敏であり、その性質は味覚器で報告されている味応答の性質ときわめて類似していることがわかった。このことは、嗅細胞

がニオイ物質以外の種々の刺激に対しても応答する機能を有しており、塩、酸、苦味物質の受容には、味細胞と嗅細胞に共通の構造が関与している可能性を示している。

学位論文審査の要旨

主査 教授 栗原堅三

副査 教授 野村靖幸

副査 教授 加茂直樹

副査 助教授 三宅教尚

学位論文題名

Receptor Functions and Transduction Mechanisms in Olfactory Systems

(嗅覚器の各種刺激物質に対する応答機能と情報変換機構)

申請者は、長年嗅覚受容機構に関する研究を行ってきた。現在までに得られている知見から、cAMP、およびIP₃がセカンドメッセンジャーとして関与するふたつの経路のニオイ受容メカニズムが提唱されている。これらの機構では、最終的にセカンドメッセンジャーに依存したカチオンチャネルの開口によって受容器電位が発生する。また、これらのカチオンチャネルから流入したCa²⁺によってCl⁻チャネルが活性化されるとの説も提唱されている。つまり、これらに共通しているのは、外界と接している嗅線毛膜のイオン透過性が変化することがニオイ応答発現の要因であるという点である。そこで、本研究では、cAMP依存性およびIP₃依存性カチオンチャネル、Ca²⁺依存性Cl⁻チャネルが、実際にニオイ応答発現に寄与しているかどうかを調べた。また、嗅細胞が本来持っているニオイ物質以外の刺激に対する応答性を調べる目的で、種々の味物質に対するクサガメ嗅覚器の応答についての実験を行い、他の動物の味覚器で得られている味応答の性質と比較した。

(1)クサガメ嗅受容膜におけるイオン透過性変化はニオイ応答発現に寄与するか

ニオイ応答が、嗅線毛上のcAMP依存性カチオンチャネルやIP₃依存性カチオンチャネルの活性化によって発現するならば、受容膜上に存在する塩を完全に除いた場合、ニオイ応答は消失するはずである。したがって、嗅受容膜上の塩環境を変化させたときのニオイ応答に与える影響を調べれば、これらのカチオンチャネルが関与しているかどうかを知ることができる。

本実験では、嗅上皮を種々の塩濃度の溶液で灌流したときのニオイ応答を測定し、嗅受容膜におけるカチオンチャネルの活性化がニオイ応答発現に寄与するかを調べた。その結果、受容膜上に塩が存在しなくとも通常と同様のニオイ応答が発現し、また、NaイオンおよびCaイオンの濃度を変化させても、ニオイ応答はほとんど変化しないことが明かとなった。このことは、嗅線毛膜上のcAMP依存性カチオンチャネルやIP₃依存性カチオンチャネルがニオイ応答の発現には寄与していないことを示している。また、ニオイ応答の大きさが、Caイオン濃度の変化にはほとんど影響を受けないことから、Ca²⁺依存性Cl⁻チャネルの活性化もまたニオイ応答の発現には寄与しないと考えられる。

(2) クサガメ鋤鼻器におけるニオイ応答感度と情報変換機構

鋤鼻器は多くのほ乳類やは虫類、両生類などにみられる化学受容器であり、性行動や索餌行動に重要な役割を果たしていると考えられている。鋤鼻器受容細胞には嗅細胞のような線毛はみられず、受容膜は微絨毛構造を形成している。リンガー液に種々のニオイ物質を溶かして刺激液としたときの、鋤鼻器および主嗅覚器のニオイ応答の濃度-応答曲線を比較したところ、鋤鼻器は、主嗅覚器とほぼ同じ閾値濃度から応答を発現することがわかった。嗅覚器のニオイ受容においては、線毛構造の役割の重要性が強調されているが、線毛を持たない鋤鼻器受容細胞が嗅細胞と同等の感度を有することから、線毛構造の有無は、少なくとも応答感度には影響しないものと推測される。また、鋤鼻器のニオイ応答も、主嗅覚器の場合と同様にNaイオン、Caイオンの有無にかかわらず、応答の大きさはほぼ一定であった。この結果から、鋤鼻器におけるニオイ応答発現には、受容膜表面のイオン透過性変化は寄与しないことが示唆された。

(3) 各種味物質に対するクサガメ嗅覚器の応答

クサガメ嗅覚器は、5基本味のうち塩味、酸味、苦味に対して、味覚器よりも高感度で応答した。塩応答においては、一価よりも多価イオンの方がより閾値が低く、いわゆる陰イオン効果も観察された。チャネルを通過しにくいと考えられる有機陽イオンも、大きな応答を引き起こした。さらに、amilorideはNa応答だけでなく種々の塩応答も非特異的に抑制した。種々の苦味応答においては、中性で正電荷をもつ物質に対する応答は、NaClにより完全に抑制された。一方、電荷を持たない物質に対する応答は全く影響を受けなかった。種々の酸に対する応答の大きさを、pHに対してプロットしたところ、陰イオンの種類によって応答の大きさが変化することがわかった。塩、酸、苦味物質に対する応答の温度依存性を調べたところ、20～30℃にピークをもつ曲線を描いた。これらの結果は、ほ乳類の味覚器やカエルの味覚器で得られた実験結果とよく一致する。以上の結果から、嗅覚

器の味物質に対する応答感度は一般に味覚器よりも鋭敏であり、その性質は味覚器で報告されている味応答の性質ときわめて類似していることがわかった。このことは、嗅細胞がニオイ物質以外の種々の刺激に対しても応答する機能を有しており、塩、酸、苦味物質の受容には、味細胞と嗅細胞に共通の構造が関与している可能性を示している。

以上、申請者は嗅覚器の各種刺激物質に対する応答機能と情報変換機構に関し多くの新しい知見を得ており、その研究成果は博士（薬学）の学位を与えるにふさわしいと評価した。