

Studies on the mechanism of Ca^{2+} signaling in rat and pig olfactory receptor neurons : *Effect of intensity of stimulation and involvement of T-type Ca^{2+} channels*

(ラットおよびブタ嗅神経細胞のカルシウムシグナル伝達機構に関する研究：刺激強度依存症の反応と T 型カルシウムチャネルの関与)

学位論文内容の要旨

- 1) 嗅神経細胞 (ORNs) の線毛／嗅小胞に存在する G タンパク質共役型受容体において物質と反応すると、cAMP 依存性に細胞内カルシウムイオン濃度が一過性に上昇する。第 1 章では、刺激の強さに依存する一過性カルシウム反応の特性について、カルシウム指示薬の Fluo-4 を負荷した単離 ORNs を用いて共焦点顕微蛍光画像解析法で検討した。比較的小さなカルシウム反応は、嗅小胞に局限して起こるのに対して、大きなカルシウム反応は細胞体にもまで伝播した。また、嗅小胞に局限していた反応は、におい物質への暴露時間を延長すると細胞体に伝播するようになった。さらに、におい物質の濃度に依存して、低濃度では嗅小胞に局限していたカルシウム反応が、高濃度になるにつれて細胞体にもまで伝播するようになった。forskolin/IBMX 刺激の場合でも同様の現象が認められた。MDL12330A でアデニレートサイクラーゼを部分的に抑制すると、細胞体まで伝播が認められた反応が嗅小胞に局限する反応に変化した。Nifedipine で L 型カルシウムチャネルを抑制すると、細胞体でのカルシウム反応の振幅は減少したが、嗅小胞での反応は影響されなかった。以上から、嗅小胞に局限したカルシウム反応は弱い刺激の場合に認められ、それは ORNs の反応を全体として抑制するか、あるいは微弱な興奮生反応として自発性ノイズを覆い隠すことに役立っているかもしれない (Gautam et al., Neurosci. Res., 2006, 55: 410-420)。
- 2) これまで、におい物質で惹起される嗅小胞から細胞体へのカルシウム反応の伝播は、L 型カルシウムチャネルによって媒介されていると考えられてきた。第 2 章では、共焦点顕微蛍光画像解析法と免疫染色法によって、L 型に加えて T 型のカルシウムチャネルの存在を同定し、カルシウム反応の伝播への関与を明らかにした。T 型カルシウムチャネルの特異的抑制物質である mibefradil (10-15 μM) と Ni^{2+} (100 μM) は、におい物質あるいは forskolin/IBMX による細胞体および樹状突起におけるカルシウム反応を強く抑制あるいは消失させた。これに対して、嗅小胞におけるカルシウム反応の抑制の程度は、前者の

40-50%であった。30 mM K^+ による反応は mibefradil によって部分的に抑制されたが、この抑制の程度には嗅小胞と細胞体とで差が認められなかった。また、 K^+ 濃度をわずか 2.5 mM 上昇させただけでもカルシウム反応が惹起された。この反応は mibefradil あるいは Ni^{2+} で完全に抑制された。細胞外 Na^+ を NMDG で置換してもカルシウム反応は影響を受けなかった。免疫染色により、T型チャネルのサブユニットである $Ca_v3.1$ 、 $Ca_v3.2$ および $Ca_v3.3$ の存在が細胞体、樹状突起そして嗅小胞で確認された。以上の知見から、ORNs のT型カルシウムチャネルは、カルシウム反応の伝播のみならず電気生理学的反応を修飾し、におい物質に対する感受性を上昇させている可能性が浮かび上がった (Gautam et al., Neuroscience, 2007, 144: 702-713)。

- 3) 第3章では、T型カルシウムチャネルの関与についてブタの新鮮分離 ORNs で検討した。mibefradil (10 μ M) あるいは Ni^{2+} (100 μ M) の存在下では、forskolin/IBMX による細胞体でのカルシウム反応は、比較的強い刺激の場合には強く (>60%) 抑制され、中等度の刺激の場合には完全に消失した。これに対して、嗅小胞での反応はいずれの刺激強度においても部分的に (<60%) 抑制されただけであった。30 mM K^+ による反応もまた細胞体、嗅小胞いずれにおいても部分的に (~60%) 抑制されただけであった。また、ラット ORNs で認められたのと同様、2.5 mM の細胞外 K^+ 濃度上昇によってカルシウム反応が認められ、これは mibefradil あるいは Ni^{2+} で完全に抑制されたが、TTX あるいは NMDG による Na^+ の置換では影響を受けなかった。これらのことは、ブタの ORNs にT型カルシウムチャネルが存在することを示唆し、におい刺激に続くカルシウム反応の嗅小胞から細胞体への伝播に関与していることを推測させる (Gautam et al., Neurosci. Res., 2007, 57: 129-139)。

以上を総合して、においの受容と認識機構について以下の結論を得た。(1) 各々の ORNs は様々な強度(濃度)のにおい物質に対して異なった反応性を示し、におい物質の認識につながる情報の符号化は、高次中枢より前の ORNs レベルで既になされている。(2) ORNs の嗅小胞、樹状突起および細胞体すべての部位に存在するT型カルシウムチャネルを介して流入するカルシウムイオンが、におい物質の情報の処理と感受性の修飾に寄与している。(3) カルシウム反応が嗅小胞に局限する微弱なにおい刺激の際には、カルシウム依存性 K^+ チャネルを活性化して過分極反応を惹起することにより、ORNs での電氣的な自発性ノイズを抑制しているかもしれない。これらの特性は、におい物質を検出して、混在する他のにおい物質からそのにおい物質を差別化して上位中枢で認識するという ORNs の基本的な能力の達成に深く関わっていると思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	葉原芳昭
副査	教授	伊藤茂男
副査	助教授	太田利男
副査	助教授	岩永ひろみ

学位論文題名

Studies on the mechanism of Ca^{2+} signaling in rat and pig olfactory receptor neurons : *Effect of intensity of stimulation and involvement of T-type Ca^{2+} channels*

(ラットおよびブタ嗅神経細胞のカルシウムシグナル伝達機構に関する研究：刺激強度依存性の反応と T 型カルシウムチャネルの関与)

博士（獣医学）学位の申請者、シュリー・ハリ・ゴウタム氏の博士論文は3章から構成されている。

第1章は、刺激の強さと細胞内カルシウム反応の特性について単離嗅神経細胞を用いて共焦点蛍光顕微画像解析法で検討したものである。比較的弱いカルシウム反応は、嗅小胞に限局して起こるのに対して、大きなカルシウム反応は細胞体にまで伝播した。また、嗅小胞に限局していた反応は、におい物質への暴露時間が延長されると、細胞体にまで伝播する反応に変化した。さらに、低濃度のにおい物質刺激では嗅小胞に限局していたカルシウム反応が、高濃度になるにつれて細胞体にまで伝播するという濃度依存性の変化を認めた。forskolin/IBMX 刺激でも同様の現象が認められた。アデニレートサイクラーゼ活性を部分的に抑制すると、細胞体にまで伝播していた反応が、嗅小胞に限局する反応に変化した。L型カルシウムチャネルを抑制すると、細胞体でのカルシウム反応の大きさは減少したが、嗅小胞での反応は影響されなかった。以上のことから、におい刺激が弱い場合には、カルシウム反応は嗅小胞に限局し、嗅神経細胞の情報伝達は抑制されているか、あるいはごく弱い興奮性反応を示すと考えられる。これによって、自発性ノイズが覆い隠され、におい物質に対する感受性と識別能が増大しているのではないかと、という新しい仮説を提唱した。

第2章は、共焦点蛍光顕微画像解析法と免疫組織化学法によって、L型に加えてT型のカルシウムチャネルの存在をラットで明らかにし、カルシウム反応の伝播への関与を検討したものである。T型カルシウムチャネルの特異的抑制によって、におい物質あるいは forskolin/IBMX による細胞体および樹状突起におけるカルシウム反応が強く抑制された。これに対して、嗅小胞におけるカルシウム反応の抑制は、前者の 40-50%であった。30 mM K^+ による反応は、T型カルシウムチャネル抑制薬によって部分的に抑制されたが、この抑制は嗅小胞と細胞体とで差がなかった。一

方、7.5 mM K^+ に対する反応は、T型カルシウムチャネル抑制薬で完全に抑制された。免疫組織化学により、T型チャネルのサブタイプである $Ca_v3.1$ 、 $Ca_v3.2$ および $Ca_v3.3$ のサブユニットの存在が、細胞体、樹状突起そして嗅小胞で確認された。以上の知見から、嗅神経細胞に存在するT型カルシウムチャネルは、カルシウム反応の伝播のみならず、電気生理学的反応を修飾すると考えた。

第3章は、T型カルシウムチャネルの関与について、ブタの嗅神経細胞で検討したものである。T型カルシウムチャネル抑制薬は、forskolin/IBMX による細胞体でのカルシウム反応にたいして、比較的強い刺激の場合には部分的に抑制し、中等度の刺激の場合には完全に抑制した。これに対して、嗅小胞での反応は、いずれの刺激強度においても部分的に抑制されただけであった。30 mM K^+ に対する反応も細胞体、嗅小胞いずれにおいても部分的に抑制されただけであった。また、ラット嗅神経細胞同様、7.5 mM K^+ に対してカルシウム反応が認められ、これはT型カルシウムチャネル抑制薬で完全に抑制された。これらのことから、ブタの嗅神経細胞にもT型カルシウムチャネルが存在することが示唆され、におい刺激によるカルシウム反応の嗅小胞から細胞体への伝播に関与していると考えた。

以上の知見を総合して、ゴウタム氏は、においの受容と認識機構について以下の結論を得た。(1) 各々の嗅神経細胞は、様々な強度（濃度）のにおい物質に対して異なった反応性を示し、におい物質の認識につながる情報の符号化は、高次中枢よりも前の、嗅神経細胞レベルで既になされている。(2) 嗅神経細胞の嗅小胞、樹状突起および細胞体すべての部位に存在するT型カルシウムチャネルを介して流入するカルシウムイオンが、におい物質の情報の処理と感受性の修飾に寄与している。(3) 弱いにおい刺激の場合、カルシウム反応は嗅小胞に限局し、カルシウム依存性 K^+ チャネルを活性化して過分極反応を惹起することにより、嗅神経細胞での電気的な自発性ノイズを抑制している可能性が浮かび上がった。本知見は、嗅覚の生理学領域に新しいアイデアを提供するものであり、Neuroscience Research に2報、Neuroscience に1報、公表あるいは印刷中である。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者シュリー・ハリ・ゴウタム氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。