

嗅細胞における情報変換機構の研究

Study of olfactory transduction mechanism

代表研究者	電気通信大学電子物性工学科助教授 Assoc. Prof., Dept. Applied Physics & Chemistry, Univ. Electro-Communications Tadashi NAKAMURA	中村 整
協同研究者	電気通信大学電子物性工学科教授 Prof., Dept. Applied Physics & Chemistry, Univ. Electro-Communications Takeshi KAMBARA	神原 武志

In the last several years after Nakamura and Gold (1987) found the cyclic nucleotide-gated ion channel in olfactory receptor cilia, biochemical and/or genetic engineering researches revealed molecular components of the olfactory transduction. Those data appear to have established that cAMP works as the second messenger in the olfactory transduction. However, there are several reports that indicate the other transduction pathway(s) in addition to cAMP pathway. Final goal of our study is to understand the real mechanism(s) of the olfactory transduction by the coupling of electrophysiological experiments and computer simulation analyzation.

In the course of characterization of the cyclic nucleotide-gated channel, 5'-AMP was found to increase the binding affinity between cAMP and the channel protein rather than to inhibit it. This may indicate that numbers of nucleotide could bind to one site of the channel.

We introduced the microscopic image analyzer to measure the intracellular Ca ion in the olfactory cell. We measured both Ca concentration and membrane currents simultaneously when cAMP was introduced into the cell from the patch electrode. The rapid increase of Ca at the olfactory knob near cilia corresponded to the membrane current, which indicate that Ca influxed through the cyclic nucleotide-gated channel in the cilia.

On the other hand, the computer simulation showed that pure lipid bilayer can respond to odorant exhibiting a waveform that resembles the olfactory receptor potential. This may explain the mechanism of artificial odor sensors many of which are currently made of pure lipid bilayer. On this basic result, the model that includes all the transducing components including several types of ion channel is under consideration.

研究目的

動物の嗅覚は空中に微量に分散する化学物質を高感度に検出する神経活動である。社会的には、環境汚染と嗅覚の関係はもとより、ヒトの深層心理に嗅覚が関与することが指摘されるなど、嗅覚への関心はにわかに高まった観がある。実際、空中の化学成分の検出器の開発は盛んであるし、香料を扱う企業は活況を呈しているようである。しかし、肝心のヒトあるいは動物における嗅覚の仕組みは明確にはなっていない。特に嗅覚の「入口」

である嗅覚受容器細胞（嗅細胞）において、化学物質（匂い物質）が受容されてから、最初の神経電氣的反応（受容器電位の発生）にいたる過程は、匂い物質の化学的情報から電子的情報への変換機構であり、たいへんに興味深い。また、このような各神経細胞の挙動が明らかになってこそ、より正確に高次の神経活動を記述できるという側面もある。当研究の目的はこの嗅細胞における、分子レベルの情報変換機構を、主として電気生理学的な手法を用いて解明することである。

近年、動物の各種の感覚受容における情報変換の分子機構の研究は著しく進歩し、特に脊椎動物の視細胞に於ける情報変換はその分子的な主経路が確定され、ロドプシン、トランスデューシン、環状グアニル酸 (cGMP) 作働性イオン・チャンネルなど主な情報変換分子の一次構造も決定された。同様の解析が他の感覚受容においてもなされることが期待されているが、研究代表者は1985年のイスラエルのLancetのグループが、嗅細胞の繊毛(嗅繊毛)に匂い刺激により活性化するアデニル酸シクラーゼを発見したことにヒントを得て、嗅覚のトランスダクションを担うと推定される環状ヌクレオチド作働性イオン・チャンネルが嗅繊毛に存在することを発見し、それが視覚のcGMP 働作イオン・チャンネルと極めてよく似ていることを報告している(Nakamura and Gold, 1987)。幸いなことにこの報告に刺激を受けて嗅覚の情報変換分子の探求が活発になった。まず、アメリカと、ドイツ=イスラエルの二つの研究グループによってこのチャンネルの生化学的、および遺伝子工学的な解析が行われ、二つのイオン・チャンネルは構造的に大変よく似ていることや、嗅細胞のチャンネルの持つ特徴が、遺伝子から再構成されるチャンネルでも発揮されることなど、我々の報告が確認された。さらに、視覚のトランス・デューシンに相当するGTP結合蛋白質については生化学的、遺伝子工学的解析が行われ、また、ロドプシンに相当する匂い物質レセプター蛋白については、ごく最近になって、推定約1万種の匂いを区別できる巨大な遺伝子群として存在することが報告されたばかりである。これらことから、嗅細胞では環状アデニル酸(cAMP)を細胞内情報伝達因子とする情報変換機構が作働しているという、いわゆるcAMP説が多くの支持を得られるようになってきた。しかし、cAMP経路が単一の嗅覚情報変換であると決定されたわけではなく、他の機構を支持する実験結果も少なくはない。したがって、本研究ではこれらの説の評価、あるいは相互関係について検討をし、実際の嗅覚の機構を確定することを最終的な目的の一つとした。

協同研究者は、コンピュータを用いシミュレーション実験によって、感覚受容から中枢神経での情報処理にいたるプロセスの解明に取り組んできたが、特に嗅覚や味覚のシステムは視覚等と比べ、より原始的で単純な系に思われるのに、不明なことも多く、よい研究対象と考えてきた。嗅細胞や味細胞の受容器電位もその一連の研究対象の一つであり、その発生機構のモデルを検討し、真の情報変換機構を同定することを一つの目的とした。

研究経過

研究代表者は、近年国外より帰国し、現在の電気通信大学に赴任し独立の研究室を与えられた。しかし当大学では生物を研究対象として専門に扱うことはほとんどされておらず、物理の研究棟の中にまず研究室そのものを整備することから始めた。生物材料の飼育設備から始まる生物研究用の施設は現在でも不十分であるが、とりあえず中心的な計測システムであるパッチ・クランプ法の機器類を整備した。本格的な研究はまだやっと始まったばかりという感がある。

顕微鏡下で、単離した脊椎動物の嗅細胞に対しパッチクランプ法を行い、パッチ電極の先端にその嗅繊毛の形質膜の切り出し膜パッチを得、還流液を介して試すべき物質を与えて、膜コンダクタンスの変化を観察することにより、その物質とチャンネルの相互作用を検討した。パッチ・アンプの出力はPCMデータ・プロセッサとビデオ・デッキの組合せによるデータ・レコーダーに記録するか、または直接AD/DA変換器を介してデータ記録・解析用のコンピュータにつなげた。

さらに、嗅細胞のチャンネルの開閉に伴うイオンの挙動などを画像として記録するため蛍光顕微鏡にテレビ・カメラなどを付加した顕微画像解析装置を導入した。現在多くの関心を集めている嗅細胞内のCa濃度はこの装置を用い、蛍光色素Fura 2を取り込ませた嗅細胞について測定することができると考えられたので、匂い刺激をした時の嗅細胞内のCa変化を観察できるかどうかの検討からスタートした。次にパッチ電極を組合せて、同時測定を行えるように改良した。電極は嗅

細胞の細胞体部分に適用し、電極径内のパッチ膜を破ってホール・セル状態にし、細胞全体に流れる電流の測定をした。現在、パッチ電極から注入した cAMP による細胞内 Ca と電流の変化について解析を進めている。

協同研究者のグループでは、以前より化学感受容器の化学刺激による膜電位変化の機構のシミュレーションを行ってきた。一般に神経の電位変化の、最近のシミュレーションによる研究においてはイオン・チャンネルの寄与のみが研究されているが、化学感受容器においては他の主要構成要素である脂質二重膜の寄与が重要とする説も有力であった。そこで、初めに脂質二重膜の化学刺激への応答特性を検討し、次にイオン・チャンネルと脂質二重膜の両方を考慮したモデルを検討する予定をたてた。さらに受容器細胞の活動電位を始めとする神経系の非線形の電位変化を扱う研究をスタートさせた。溶液を脂質膜で二つの相に区切った系において、両液相のイオン濃度を調節すると膜電位が自励発振することが実験的に示されているので、初めに一つのアプローチ方法としてこの現象をシミュレートし、非線形現象を取り扱う方法の修得をめざした。

研究成果

代表研究者の実験的研究においては、研究室の開設に当たっての機器の整備という面ではどうか当初の目標にいたり、目標を越える Ca 測定の実験も開始させることができた。しかし研究そのものはようやく糸口をつかんだばかりである。

実験的な成果は実験方法によって次のように 2 方向に分けられる。

第 1 は、嗅繊毛の環状ヌクレオチド作働性イオン・チャンネルの性質についてである。化学物質による阻害等を観察するという方法で、cAMP がチャンネルにどのような様式で結合するのか検討を試みた。5' AMP は cAMP の結合を阻害するのではないかと予想されたが、実際には高濃度の 5' AMP は cAMP のチャンネルに対する親和性をむしろ増加させる様に観察された。これは、すでに報告した様にチャンネルの cAMP 結合部位が複数個あり、一部に 5' AMP が結合してアロステ

リックに cAMP への親和性を増大させるのではないかと考えられた。

第 2 は、細胞内 Ca 濃度の測定を行った実験である。他の報告にあるように、匂い刺激で細胞内 Ca が増加することは実際に確かめた。そこで cAMP のパッチ電極を通しての細胞内注入による電流の誘発と Ca 流入の同時測定を行った。cAMP の注入による電流の誘発はいくつかの報告があり、嗅繊毛の環状ヌクレオチド作働性チャンネルが開いて Na イオンが流入するとされてきた。今回その電流には Ca イオンが含まれていることが示されたわけである。したがって匂い刺激によって増加する嗅細胞内の Ca は、やはり cAMP の経路の一部として起きている可能性が高い。

一方、協同研究者のシミュレーション実験では、蛋白を含まない脂質二重膜に匂い物質が吸着し、脂質分子の極性基が持つ電気双極子の向きが変わるという現象で匂い応答電位が再現できることが示された。化学物質の人工センサーは多くが脂質膜を基につくられているが、その開発にとってはここで得られた知見はたいへん有用と考えられる。しかし実際の嗅細胞においては研究代表者が証明したように受容膜には多くのイオン・チャンネルが存在しており、これを考慮したモデルは今後の問題として残された。

また脂質二重膜の自励発振、イオン透過率の低いゲル状態と高い液晶状態の間の周期的相転移として記述できることが示された。実際の発振現象を研究するのに参照すべきよいモデルが得られたことになる。

今後の課題と発展

研究代表者にとっては、本研究助成の期間は実験設備の立ち上げに当たり、本格的な実験はようやく始まったばかりである。何よりも上記の研究成果はこれから細部を検討しなくてはならない。

環状ヌクレオチド作働性イオン・チャンネルの諸性質はさらに詳しい研究が望まれる。5' AMP ばかりではなく他の物質がチャンネルと相互作用をするかどうか順次調べて、cAMP の結合部位に関する知見を増加させる予定である。その際構造

の良く似た視細胞の cGMP 作働性チャンネルの知見と比較すればチャンネルの部分構造と機能の関連について議論ができると考えられる。

一方 Ca の流入と膜電流の同時測定は、嗅細胞の情報変換を、より総合的に研究することを可能にした。特に現在興味深く思われるのは魚類の嗅覚器では IP3 がセカンド・メッセンジャーとして働き、Ca チャンネルを開孔するという報告である。これが魚類のみに限られたことかどうかはたいへん興味深い。現在のシステムを用いて両性類と魚類双方の嗅細胞に IP3 を注入して応答を研究すれば、その解答が得られるのではないかと考えられる。ただし、技術的には、色素の希釈による、見かけの Ca 変化の補正方法を確立しなくてはならないし、その他の解決すべき問題点は多い。また匂い刺激そのものに対する応答を cAMP の注入実験と比較しなければならない。そのため現在この実験システム上に匂い刺激装置を製作中で、近い将来にこの実験も行えるようになる予定である。

一方、協同研究者は上にも述べたように、物理学的センスにおいては現実を良くシミュレートするモデルをつくることができたが、研究代表者らの発見によるイオン・チャンネルを含めたモデル作りはこれからの課題となった。将来的には受容器細胞の関連する要素をすべて盛り込んだモデルをつくるのが考えられる。化学感覚の認識には高次の情報処理が伴い、そのためには受容器の活動電位の発火の様式が重要である。今後はそのような情報処理機構についても多くの精力を注ぎたいと考えている。

発表論文

- 中村 整: 環状ヌクレオチドの部分構造と、嗅毛チャンネルに対する作用の関連について。第 24 回味と匂いのシンポジウム論文集, pp. 159~162 (1990).
- Ogita, Y., Nakamura, T., Higuchi, S., Mori, T. and Shimo-Oku, M.: Histochemical studies of mitochondrial activities of cultured corneal endothelial cells of cat during wound-healing. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **34**, 200~215 (1990).
- Gold, G. H. Nakamura, T., and Lowe, G.: Studies on the mechanism of olfactory transduction in ver-

tebrates, *Neurosci. Res. Suppl.* **12**, S127~S134 (1990).

Nakamura, T.: Modification by 5'-AMP of cAMP binding to cyclic nucleotide gated ion channel in olfactory receptor cilia, *Chemical Senses*, **16**, 195 (1991).

中村 整: 嗅覚情報変換における cAMP の役割の研究, 平成 2 年度科研費(総合研究 A・木島班) 研究成果報告書“化学受容におけるトランスダクションの分子機構” pp. 99~102 (1991).

Nakamura, T. and Hirota, S.: Ca influx induced by intracellular cAMP in the newt olfactory receptor cell. Abstract of 2nd Japan-USSR Cooperative Symposium on Receptors: Structure and Function, p. 16 (1991).

Nakamura, T.: Study of cAMP and Ca²⁺ in the olfactory transduction, Abstract of 24th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. S-18-17 (invited) (1991).

神原武志: 応用数学入門, オーム社 (1990).

神原武志, 佐々木直幸, 内藤正美, 淵上信子: コンピュータ物理の世界, 講談社 (1990).

Naito, M., Kambara, T., Sasaki, N., and Fuchikami, N.: Mechanism of Dynamic Responses of Membrane Potential to Chemical Stimuli, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **13**, s-107 (1990).

Yagisawa, K., Kambara, T., Gondaira, K., Natio, M., Fuchikami, N. and Sasaki, N.: A Model for self-sustained potential oscillations of lipid bilayer membranes due to gel-liquid crystal phase transitions, *J. Pharmacobio-Dyn.* **13**, s-108 (1990).

Fuchikami, N., Sasaki, N., Kambara, T., Yagisawa, K., Naito, M. and Sasaki, N.: Self-sustained oscillations and chaos in a model membrane system. Abstracts of 10th Int. Biophysics Congress, p. 63 (1990, 7).

Naoti, M., Kambara, T., Sasaki, N. and Fuchikami, N.: Dynamics of membrane potential changes of lipid bilayer in chemoreception. Abstracts of 10th Int. Biophysics Congress, p. 223 (1990).

神原武志: 混合原子価錯体における協同的電子移動, 日本化学会第 59 春年会, 特別講演予稿集, p. 123 (1990).

八木沢亨一, 神原武志, 権平健一郎, 内藤正美, 淵上信子, 佐々木直幸: 生体膜系における自励発振の相転移モデル, 第 1 回自律分散システムシンポジウム資料集, pp. 81~86 (1990).

淵上信子, 沢島信介, 神原武志, 八木沢亨一, 内藤正美, 佐々木直幸: カオス的自励発振をする生体モデル膜のシミュレーション, 第 1 回自律分散システム資料集, pp. 87~92 (1990).

佐々木直幸, 神原武志, 内藤正美: 味受容細胞における脱分極伝播のモデル, 第 1 回自律分散システムシンポジウム資料集, pp. 93~96, (1990).

- 淵上信子, 沢島信介, 内藤正美, 佐々木直幸, 神原武志: 生体モデル膜のカオスの自励発振, 日本膜学会, 第12年会講演要旨集, p. 51, (1990).
- 八木沢亨一, 神原武志, 権平健一郎, 内藤正美, 淵上信子, 佐々木直幸: 自励発振パターンの膜間相互作用の効果, 日本膜学会第12年会講演要旨集, p. 53 (1990).
- 佐々木直幸, 神原武志, 内藤正美, 淵上信子: 味受容細胞のモデル, 日本膜学会, 第12年会講演要旨集, p. 53 (1990).
- 八木沢亨一, 神原武志, 権平健一郎, 内藤正美, 佐々木直幸: 生体膜によるグルコース/Na 能動輸送系のシミュレーション, 第9回シミュレーション・テクノロジー・コンファレンス発表論文集, pp. 123 ~126 (1990).
- 佐々木直幸, 神原武志, 内藤正美, 淵上信子: 化学受容の細胞モデルによるシミュレーション, 第9回シミュレーション・テクノロジー・コンファレンス発表論文集, pp. 127~130 (1990).
- 八木沢亨一, 神原武志, 権平健一郎, 内藤正美: 膜電位自励発振の相転移モデル 3. 日本生物物理学会誌, 30 (Suppl.), s150 (1990).
- Naito, M., Fuchikami, N., Sasaki, N., Kambara, T.: Model for the dynamic responses of taste receptor cells to salty stimuli, 1. Function of lipid bilayer membranes, *Biophys. J.* 59, 1218~1234 (1991).