

嗅覚受容ラボ

(Olfactory Receptor Lab.)

研究項目：嗅覚受容におけるニオイ分子識別機構の研究

研究期間：平成10年度～14年度

1. 当該研究の背景

「私達は、多様なニオイをどのようにして識別しているのでしょうか？」視覚では、呈示色は受容器でRGBに対応する3種の受容細胞により3成分に分解されて検出され¹⁾、一方、工学的産物であるカラービデオカメラなども3色分解方式が用いられているものが多い。これは、生物の優れた機能の原理をうまく模倣することで、同等かそれ以上の性能を持つ機器を実現できる可能性があることを示す良い例である。嗅覚でも、動物の鼻に匹敵するような汎用で優れたニオイ識別能を有すニオイセンサーを実現する為には、そのセンサー部に嗅覚受容神経細胞(嗅細胞)と同等のニオイ分子識別能を持たせることが必要になると考えられる。また、中枢でのニオイ識別機構を解明する為にも、受容細胞でニオイ情報がどのような成分情報に分解されて検出されているのかを明らかにすることが、複雑な神経ネットワークによって行われる情報処理機構の解析に指針を与え、議論を単純化することに繋がると期待される。このような観点から、当ラボでは、嗅細胞あるいはニオイ受容タンパク質(ニオイレセプタ)のニオイ分子識別機構の研究を行っている。また、研究開始の経緯として、脳波を用いた色覚・嗅覚の研究が以前より大阪LERCで行われており、その中で本研究の前段階としての嗅覚情報変換機構の研究が始められた。その研究において、嗅細胞を高密度に単離調整するtissue-printing法²⁾を独自に開発し、逸早く細胞内カルシウム濃度の光学計測法と組み合わせることにより、複数の嗅細胞のニオイ応答を個別に計測する手法を確立した。この技術が、現在の研究を推進する上で、一つのアドバンテージを与えるものとなっている。

2. これまでの研究経過と現状

2.1 嗅細胞のトランスデューサー機能

最初に、神経細胞である嗅細胞の担う機能について

概説する。嗅覚系の神経システムは、他の感覚系と同様に、異なる刺激成分信号を検出する複数種の受容細胞群で構成される受容器と、受容器で発生した信号を入力として受け、必要な情報を生成する為の神経情報処理を行う中枢とを組み合わせた構成になっている。中枢の基本構成要素である多様な神経細胞は、一般的に、信号入力端での神経伝達物質など化学物質から電気信号である膜電位への信号変換を行うトランスデューサー機能と信号出力端までの神経興奮伝播、及び信号出力端での膜電位から神経伝達物質放出のための信号変換機能を基本として、機能していると考えられる。神経細胞の一種である嗅細胞のニオイ分子検出機構も、信号入力端での神経伝達物質をニオイ分子に置き換えてみると、中枢神経細胞のトランスデューサー機能と同様であるとみなすことが出来る。

嗅細胞でニオイ分子と直接相互作用する分子は、7回膜貫通型のニオイレセプタであり、鼻の奥に密集する嗅細胞が嗅粘膜表面に突出させているドアのノブ状の突起から伸びて組織表面を覆う繊毛(直径:0.2 μ m、長さ:数十~200 μ m)の細胞膜に局在している。ニオイレセプタは、ゲッ歯類では、約千種類の異なるタイプがあると推定されており³⁾、マウスでは各嗅細胞には1種類のニオイレセプタのみが存在することが示されている⁴⁾。すなわち、嗅細胞は、ニオイ刺激を約千種類の成分情報に分解して検出し、それらの信号を情報毎に分離して中枢に入力する機能を担っているといえる。従って、ゲッ歯類のニオイレセプタでの刺激種の分類は、色覚のRGBの3種類に比べ、100倍以上に細分されていることになる。嗅細胞の情報変換における信号増幅などの分子機構については、ここでは触れないので他の総説⁵⁻⁷⁾を参照頂きたい。

2.2 ニオイレセプタのニオイ分子特異性とアミノ酸配列の類似性

これまでカエルやマウスの嗅細胞を単離し、細胞毎に信号増幅機構や細胞内カルシウム濃度上昇の経路

を調べ⁸⁾、また、類似のニオイ応答性を持つ嗅細胞の分布様式^{9,10)}や一連の分子構造を持つニオイ分子シリーズを用いて個々の嗅細胞のニオイ分子応答特異性¹⁰⁾を明らかにしてきた。その結果、個々の嗅細胞/ニオイレセプタのニオイ分子応答特異性は多様で、各々の嗅細胞に応答を起させるためには適当なニオイ分子サイズとニオイ分子内の適当な位置に、イオン結合、水素結合、疎水結合など適当な分子間相互作用部位が存在していることが必要であると推測することが出来た¹⁰⁾。これらの知見は、「化学/物理量の識別方法及び装置」(特許第2647798号、米国特許 5541851)及び「疑似ニオイ発生方法およびその装置並びに疑似ニオイ発生媒体」(特許第2741749号)として知的所有権化されている。しかしながら、この段階では、個々の嗅細胞が示す類似のニオイ分子応答特異性が、同じ種のニオイレセプタを持っているが何らかの要因で嗅細胞としての応答性に変動幅が生じているのか、ニオイレセプタ種自体が異なることに起因しているのかについて、完全な検証は出来なかった。

そこで、ハーバード大学との共同研究を行い、これまで行ってきた手法に分子生物学的な手法である単一細胞RT-PCR法を組み合わせることで、個々の嗅細胞のニオイ分子応答特異性とその嗅細胞の持つニオイレセプタのアミノ酸配列の比較を行った。その結果、マウスでは嗅細胞毎に発現しているニオイレセプタは1種類であることを示す成果を得⁴⁾、さらに、嗅覚でのニオイ識別機構がレセプタの組み合わせを基本としていることを、実験事実に基づいて初めて証明することに成功した⁴⁾。Fig.1に、個々のニオイレセプタのニオイ分子応答特異性とニオイレセプタ相互のアミノ酸配列の相同性を表す樹形図を示す。

まず、応答を引き起こすためには、ニオイ分子のサイズが重要である。多くのニオイレセプタにおいて、最も感度が高くなるニオイ分子は同系統の分子構造を持つニオイ分子群の中では、各々1~2種となり、その分子の長さは異なる官能基を持つ分子群に対してもほぼ保存され、そこから分子の長さが長短どちらに変化してもニオイレセプタの感受性が低下する。また、異なる官能基への感度の違いは必要な分子間相互作用の種類/強度の違いを反映していると考えられる。Fig.1の14個のニオイレセプタのアミノ酸配列を比較する⁴⁾と、膜貫通ドメイン(TM)3からTM6まででは、

19~100%のアミノ酸配列同一性となる多様性を示しながら、11個のニオイレセプタでは、共通の電荷を側鎖に持つアミノ酸が膜貫通ドメイン内の同じ位置に保存されていた。この内、カルボキシル基(酸類)と水酸基(アルコール類)両者に応答しカルボキシル基にやや感度が高い傾向を示す5個のニオイレセプタ(S18, S19, S41, S51, S83)は、TM4の特定位置に塩基性側鎖のア르기ニンを持ち、カルボキシル基に相対感度が2桁以上高い2個のニオイレセプタ(S46, S86)は、TM4の同位置により塩基性の弱いリシンを、TM5の同位置に同じくアスパラギン酸を持っていた。一方、水酸基に応答しカルボキシル基には応答しなかった2つのレセプタ(S3, S25)では、その位置にあるアミノ酸は、前者は非極性の側鎖を持つアミノ酸、後者は極性非荷電/非極性のいずれかであった。また、メチル基端の非共有結合の寄与を示唆する結果として、カルボキシル基に反応するニオイレセプタの多くが、カルボキシル基他端のメチル基が臭素の場合でも反応し得るのに対し、両端がカルボキシル基である場合、反応を示さなかった。これらの結果は、ニオイ分子両端の分子間相互作用が重要であることを示唆していると解釈される。

「匂い受容体の機能的発現システムの開発」を依頼している東京大学の研究グループは、Ca-imagingと単一細胞RT-PCR法の組み合わせ、応答性を計測した嗅細胞の持つニオイレセプタの遺伝子配列を同定することに最も早く成功した¹¹⁾。同グループは、さらに、同定したニオイレセプタMOR23の遺伝子を組み込んだアデノウイルスを嗅細胞に感染させ、MOR23を強制発現させた嗅細胞の応答性が、MOR23を本来持っていた嗅細胞のニオイ分子応答特異性と非常によい一致を示すこと、すなわち、Ca-imagingで計測した嗅細胞のニオイ分子応答特異性は単一種のニオイレセプタの応答特異性を反映していること、さらに、MOR23については類似する構造のニオイ分子の中で鈴蘭臭を持つlyralの分子構造に最高感度となり、CHOやOHの分子内配置に感受性が左右される結果を報告している¹¹⁾。

2.3 嗅覚でのニオイ識別法

類似する分子構造を持つ一連の直鎖脂肪族系ニオイ分子群に反応するニオイレセプタ14種の同定は、アミノ酸配列の相同性が50%以下でも良く似たニオイ

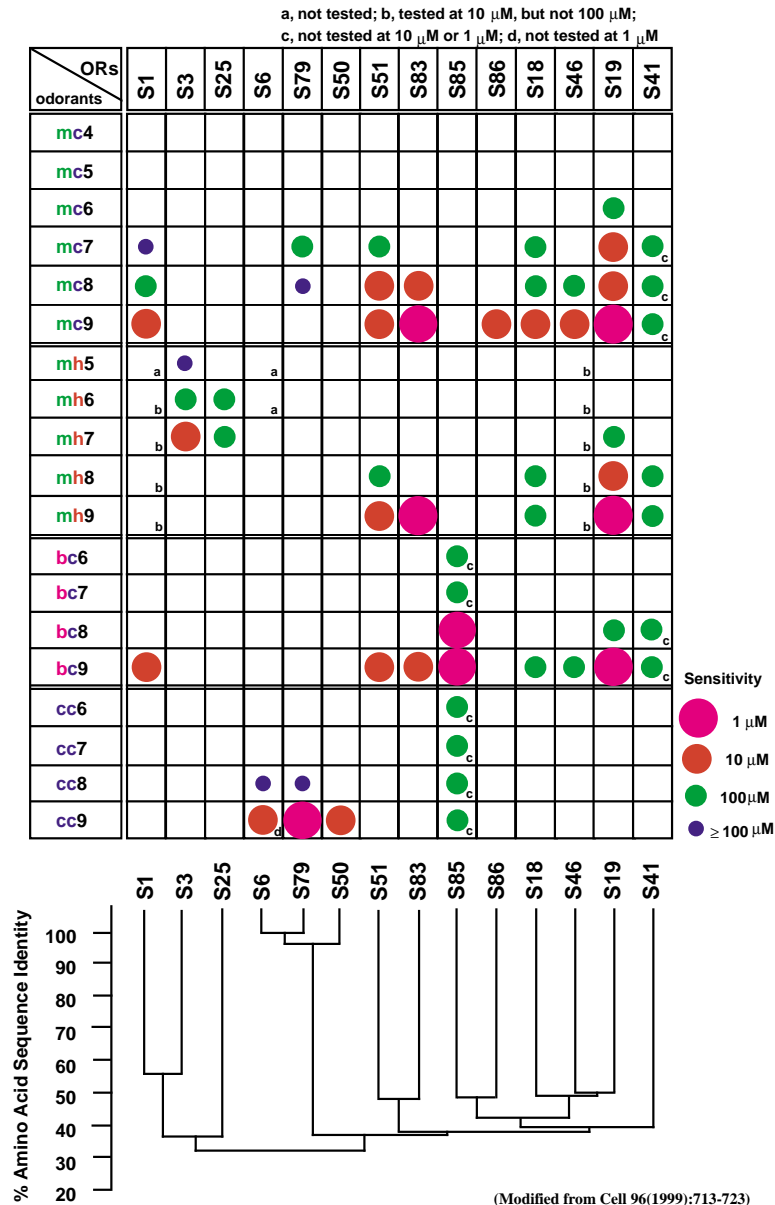


Fig.1 The odorant tuning specificities and amino acid sequence identities of 14 odorant receptors (ORs). In the table, odorant names on the left are abbreviated as three characters, whose first two represent the kinds of two functional groups at the terminals of the odorant molecule and, whose last number represents the number of carbon in the carbon chain of the odorant. In the matrix, each circle indicates the lowest concentration of odorants to which the olfactory receptor neuron with the OR was responsive. Functional groups ; **m** : methyl, **c** : carboxyl, **h** : hydroxyl, **b** : bromo. The dendrogram show the amino acid sequence identities of transmembrane domain (TM)3 - TM6 of ORs. Some are highly related, but as a group they are diverse in sequence (19%-100% identities). The lowest homology (19%) was between S25 and S41. Bars connecting different groups of ORs indicate the maximum percent identity between pairs of ORs from the two groups. (modified from Cell 96(1999):713-723)

分子応答特異性を示し得ることと、それぞれのニオイ分子種に反応するニオイレセプタの組み合わせが、オーバーラップを持ちながらユニークになることを示す初めての実験データとなった(Fig.1)。この結果は、ニオイが構成成分であるニオイ分子群によって決

まることを考えると、嗅覚でのニオイの特定は、少なくともレセプタレベルでは、反応するニオイレセプタの組み合わせパターンを基本にして行われていることを示していると解釈出来る。ニオイ感覚を工学的に再構成する為には、中枢でのニオイ識別機構も明らか

にする必要がある。嗅覚の一次中枢である嗅球の神経細胞のニオイ分子応答特異性¹²⁾は、嗅細胞の応答性と良く似ており、ニオイ分子に対する識別能が高いといわれる高次中枢の応答性に関する知見は十分ではないので、中枢でのニオイ識別機構の解明は今後の研究を待たねばならない。いずれにしても、嗅覚でのニオイ識別は、ニオイレセプタの組み合わせパターンを基本とし、応答強度比プロフィールを利用して行われていると推定できるだろう。

3. 今後の研究展開の方向

前述のように、ニオイ感覚を表現出来るニオイセンサーを工学的に実現するためには、中枢でのニオイ識別の為に情報処理機能を代替する信号処理系を備えた装置が必要になる。この点に関する知見を得るために、中枢神経系の研究グループとの協力の元に、嗅覚中枢でのニオイ識別のための情報処理機構の解明にも取り組んでおり、今後も継続する予定である。一方、異なるニオイ感覚を引き起こす異なるニオイガスの組成を特定するだけなら、検出対象とするニオイ分子範囲をカバーする為に必要なニオイレセプタ群を代替できるニオイセンサー群を揃えれば可能になると思われる。しかしながら、汎用性のあるニオイセンサー用のセンサー部設計には、さらに別系統のニオイ分子群を担当する多様なニオイレセプタの応答特異性の同定と、ニオイ分子とニオイレセプタの分子間相互作用サイトの解明を推進する必要がある。このために、さらに多様なニオイレセプタの系統分類の為に生理学的/分子生物学的アプローチ、特定のニオイレセプタを機能的に発現させて再現性良く多数のニオイ分子群に対する応答性を評価出来る実験系の開発、ニオイレセプタの精製/構造解析、及び臨床応用も期待されるニオイレセプタの発現制御機構などの基礎的研究課題に取り組み、これらを発展させていきたいと考えている。これらの研究を通じて得られた基礎的知見が利用され、嗅覚機能に匹敵するニオイセンサーの設計・開発が促進されれば、遠隔地で任意のニオイを再生する技術や、マウスでは識別可能な妊娠による体臭変化の同定¹³⁾を可能とする検査技術など新たなニオイの医工学応用にも繋がり、未知の市場の創出も可能になると期待出来るのではないかと考えられる。

謝辞

これまでに、本研究を立ち上げ、推進するに当たり、山根元大阪LERCセンター長、守谷大阪LERCセンター長、所幹部、企画室、国際研究協力推進室、大阪LERC関係各位に、予算獲得や体制構築等で御支援頂き、大変お世話になった。この場を借りて深謝させて頂きたい。

参考文献

- 1) J.Nathans, et al.: "Molecular genetics of inherited variation in human color vision". Science, 232, 203-210 (1986)
- 2) J.Hirono, T.Sato, M.Tonoike and M.Takebayashi: "Simultaneous recordings of $[Ca^{2+}]_i$ isolated olfactory receptor neurons retaining their original spatinal relationship in intact tissue". J. Neurosci. Methods, 42, 185-194(1992)
- 3) L.Buck and L.Axel: "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition". Cell, 65, 175-187(1991)
- 4) B.Malnic, J.Hirono, T.Sato and L.Buck: "Combinatorial receptor codes for odors". Cell, 96, 713-723(1999)
- 5) G.H.Gold: "Controversial issues in vertebrate olfactory transduction". Annu.Rev.Physiol., 61, 857-871(1999)
- 6) 倉橋 隆:「嗅細胞における情報変換とモジュレーション」, 生物物理, 40, 38-43(2000)
- 7) 佐藤孝明:「においレセプタのにおい分子識別能」, 電気学会調査報告, 778, 23-29(2000)
- 8) T.Sato, J.Hirono, M.Tonoike and M.Takebayashi: "Two types of increases in free Ca^{2+} evoked by odor in isolated frog olfactory receptor neurons." Neuroreport, 2, 229-232(1991)
- 9) J.Hirono, T.Sato, M.Tonoike and M.Takebayashi: "Local distribution of odor responsivities of mouse olfactory receptor neurons". Neurosci. Lett., 174, 201-204(1994)
- 10) T.Sato, J.Hirono, M.Tonoike and M.Takebayashi: "Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution". J. Neurophysiol., 72, 2980-2989(1994)
- 11) K.Touhara, et al.: "Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons". Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 96, 4040-4045(1999)
- 12) K.Mori, N.Mtaga and K.Imamura: "Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous

series of fatty acid odor molecules". J. Neurophysiol., 67, 786-789(1992)

- 13) 山崎邦郎：「ヒトのにおい型」,においを操る遺伝子,工業調査会,pp.108-114(1999)

当該研究担当者等

1) ラボ構成員(総数8名)

職員(3名) 佐藤孝明* ,廣野順三(大阪LERC),飯島敏夫
(超分子部)

職員以外(5名) 浜名 洋(科学技術特別研究員),李
守新(STAフェロー),村田潤子(客員研究員,大阪労
災病院),近藤 勝(実習生,大阪大学),片岡泰宏(非
常勤職員)

2) その他の研究協力者

Linda Buck(ハーバード大学),Bettina Malnic(ハー
バード大学),東原和成(東京大学)

*ラボリーダー