

ヒト水棲型嗅覚受容体の機能解析と新たな水溶性匂い分子の探索

廣 田 順 二

東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター 准教授

緒 言

嗅覚は、外部環境中の匂い情報を感知・識別し、動物の生命維持のために必要な行動を誘導する重要な感覚である。ヒトやマウスの嗅覚神経系は、嗅覚受容体 (odorant receptor: OR) によって数十万もの匂い分子を識別している。近年アロマセラピーに代表される“香りの効果”など、嗅覚を介した生体への作用に関心が高まりつつある。

匂い分子感知の鍵となる OR は、動物の進化の過程において、水棲から陸棲への生活環境の変化に伴って分子進化を遂げ、また社会の複雑さに対応するためにその遺伝子数を増加させてきた。その結果、OR 遺伝子はゲノム上最大の遺伝子ファミリーを形成し、その総数はヒトにおいて約 400 個 (全遺伝子の約 2%)、マウスにおいては約 1300 個 (全遺伝子の約 5%) に及ぶ¹⁾。OR 遺伝子は、系統発生的に大きく 2 つのクラス (Class I と Class II OR) に分類される^{2, 3)}。Class I OR は、系統発生的により古く魚類由来の OR に類似しており、水溶性の匂い分子を感知すると考えられている。一方、Class I から進化したと考えられる Class II OR は、陸棲動物特異的な遺伝子であり、揮発性の匂い分子を感知すると考えられている。従来、水棲型 OR は魚類 OR に類似していることから、進化の名残と考えられてきた。しかし最近のゲノム解析の進展によって、魚類からヒトに至るほぼすべての脊椎動物に存在することが明らかとなり、何らかの重要な生理的機能をもつのではないかと考えられるようになってきている。これまで OR 遺伝子の機能と遺伝子発現の分子機構についての研究をおこなってきた。揮発性匂い分子を受容する OR について、機能的な遺伝子発現に必須な領域と構造を明らかにし、さらに必須転写因子を同定した^{4, 5)}。一方、OR 遺伝子ファミリーのうち、水溶性の匂い分子を受容するサブファミリー遺伝子発現制御領域の解析をおこない、揮発性匂い分子の受容体とは異なる遺伝子発現制御機構を有することを明らかにしてきた⁶⁾。本研究課題では、水棲型 OR

の生理機能を明らかにすることを目的として、新たな水溶性匂い分子の探索を行った。

方 法

本研究課題の最終的な目的はヒト水棲型 OR の生理機能を明らかにし、新たな水溶性匂い分子を同定することである。しなしながら水溶性匂い分子の有無をふくめ、水棲型 OR の機能は未知であることから、まずマウス水棲型 OR を対象とした研究を行うこととし、その結果をもとにヒトへと発展させることとした。水溶性匂い分子の探索には、哺乳動物唯一の水棲環境である羊水に着目し、以下のつ 2 の実験を行った。

実験 1

羊水中になんらかの行動を誘導する水溶性匂い分子が存在するかどうかを明らかにするために、行動解析実験をおこなった (図 1)。C57 BL/6 マウスを 1 個体ずつクリーンケージで 2 日間飼育し、ケージの匂いに馴れさせた。羊水サンプル 20 μ l をろ紙小片 (約 1cm \times 2cm) にしみこませ、ピンセットを用いてケージ内中央に静置し、約 10 分間マウスの行動をビデオカメラで撮影・観察し、行動を解析した。対照実験としてイオン交換水を用いた実験を行った。C57BL/6 マウスは、3 週齢 (未成熟) もしくは 6 週齢 (成熟) の雌と雄マウスで、いずれも交尾経験のない個体を用いた。

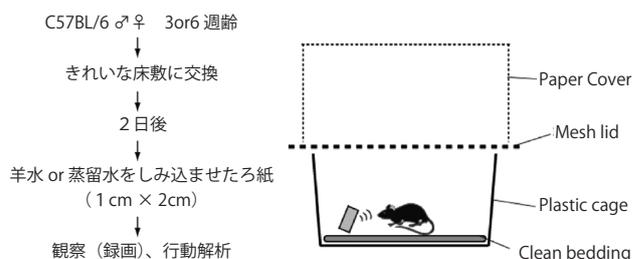


図 1 マウス行動実験の概略図

マウス行動実験には、交尾経験のないマウス (雌雄、3 週齢 もしくは 6 週齢) を用いた。

実験 2

羊水中に含まれる水溶性匂い分子に対する嗅神経細胞応答を調べるために、神経活動マーカーである c-Fos を特異的に認識する抗体を用いて免疫組織化学を行った。実験には C57BL/6 マウスの性成熟前後のオスとメスをを用いた。マウスはあらかじめ麻酔下で右側鼻腔を外科的に閉塞し、匂い分子に暴露しないネガティブコントロールとした。実験は以下の手順に従って行った。1 個体ずつクリーンケージで 2 日間飼育し、ケージの匂いに馴れさせた後、羊水サンプル 20 μ l をしみこませたる紙小片をピンセットを用いてケージ内中央に静置した。c-fos の発現ピークである 90 分後に麻酔下で 4% PFA/PBS により灌流固定した。嗅球と大脳を摘出した後に 4% PFA/PBS で 1 時間後固定し、15%スクロース /PBS で約 3 時間、30%スクロース /PBS で約 20 時間置換した。OCT コンパウンド (Sakura Finetechnical) 中に包埋、凍結した後に、クライトスタットを用いて 30 μ m の冠状凍結切片を作製した。免疫組織化学は ABC 法によって行い、以下の試薬を用いた。ブロッキング試薬: Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories、1 次抗体: Anti-c-Fos (Ab-5)(4-17) Rabbit IgG (Calbiochem)、検出試薬: VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories)。

表 1 羊水刺激によって誘導されるマウスの行動 *

性別・週齢	誘導される行動 (ろ紙に対する行動)
♀ 6 週齢	すぐに接近し匂いを嗅ぐ 抱える 齧る 巣に持ち帰る
♀ 3 週齢	匂いを嗅ぐ もしくは無反応 特に行動を示さない
♂ 6 週齢	すぐに接近し匂いを嗅ぐが、顔を背ける
♂ 3 週齢	匂いを嗅ぐ もしくは無反応 特に行動を示さない

* 対照実験として同一個体に水をしみ込ませたる紙を提示し、比較した。

0.05% DAB/0.01% H2O2 を用いて発色させ、Entellan により封入し、観察した。

結 果

実験 1

羊水提示に対する行動実験の結果、マウスは性差、成熟度によって異なる行動を示した(表 1)。成熟メスでは、匂い提示直後からろ紙片に近づき、積極的に抱えて匂いを嗅ぐ、ろ紙を齧るなどの行動を示し、またろ紙を巣へ持ち帰る等の母性行動様の行動を示した。一方、成熟オスでは、ろ紙片に近づくものの、すぐに顔を背け、離れる等の嫌悪行動が見られた。また未成熟のオス、メスでは、ろ紙片の匂いを嗅ぐ行動は見られるが特徴的な行動は認められなかった。

以上の結果から、羊水中にはなんらかの匂い分子が存在し、さらに成熟メスと成熟オスに特徴的な行動を誘導する匂い分子が含まれることが示唆された。

実験 2

嗅神経細胞は匂い分子を受容するとその情報を投射先である主嗅球の特定の糸球体に伝達する。そこで匂い刺激に応答した神経活動を c-Fos を指標にして、免疫組織化学的に検出した。解析の結果、羊水刺激によって成熟メスでは主嗅球の背側領域・内側領域・外側領域の特定の位置で、c-Fos 陽性の糸球体が存在することが確認された(図 2)。成熟オス・未成熟メス・未成熟オスの c-Fos 陽性細胞数は、成熟メスに比して少ないことがわかった。水棲型嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の軸索の投射先は主嗅球背側領域に分布することが知られている。これらの領域で c-Fos 陽性細胞の一部が認められることから、水棲型 OR の一部が羊水刺激に応答してい

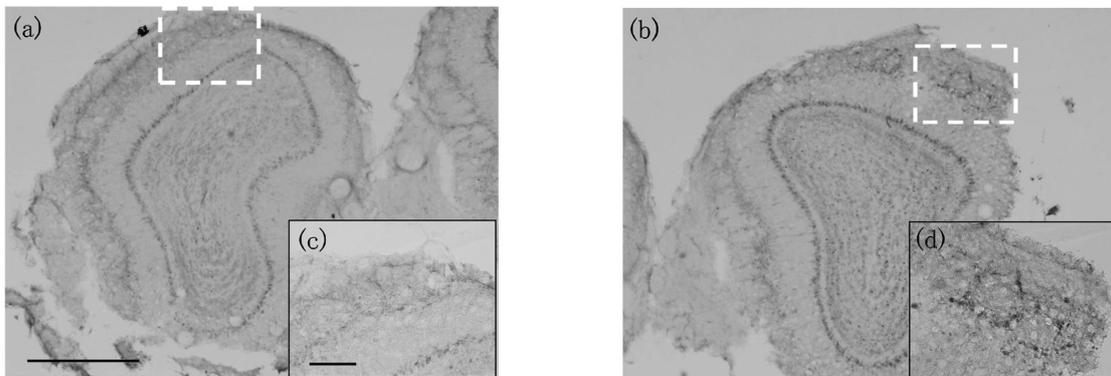


図 2 羊水刺激後の成熟メスマウス主嗅球における抗 c-Fos 抗体陽性細胞

匂い提示 90 分後の主嗅球における抗 c-Fos 抗体による免疫組織化学染色。(a) 対照側の主嗅球の免疫染色像。鼻腔を外科的に閉塞させているため、c-Fos 陽性細胞は検出されない。(b) 主嗅球で匂い刺激に応答して認められる c-Fos 陽性細胞。背側領域の糸球体のまわりに強いシグナルが認められる。(c,d) (a, b) 破線内の拡大像。スケール (a) 500 μ m、(c) 100 μ m。

ることが示唆される。同時にこれ以外の領域でも応答が見られることから、水棲型 OR のみならず、陸棲型 OR も羊水匂い成分に応答することが示唆された。

考 察

水棲型 OR の機能はこれまであまり知られていない。本研究では、哺乳動物唯一の水棲環境である羊水中に着目し、新たな水溶性匂い分子の探索を行った。その結果、成熟雌雄マウスにそれぞれ特徴的な行動を誘導する匂い分子の存在が明らかとなり、その匂い成分の一部の応答に水棲型 OR が関与していることが示唆された。行動実験では、交尾経験のない雌マウスに母性行動様の行動が誘導されたことから、羊水中には個体に先天的な行動を誘導する分子が含まれるものと考えられる。特に性差によって誘導される行動が異なり、羊水匂い成分に応答する神経回路が先天的に異なる可能性が考えられ、匂い応答を示す受容体遺伝子ならびにマウス遺伝学的手法による OR 特異的神経回路の可視化実験が今後の課題となる。

本研究課題では、初代培養嗅神経細胞を用いたカルシウムイメージングによる匂い成分へ応答する嗅神経細胞の単離と OR 遺伝子のクローニングを行っている。OR 遺伝子同定後、培養細胞への OR 遺伝子導入を行い、再構築系を用いた匂い応答の再確認を行う。さらにクロマトグラフィーによる匂い成分の単離と同定とヒト水棲型嗅覚受容体遺伝子の機能解析へと研究を展開する予定である。魚類からヒトに至る長い動物の進化の過程で保存されてきた水棲型 OR は、陸棲型 OR にはない生理的役割を持つものと予想され、そのリガンド探索からはこれまでにない機能を持つ新たな“匂い分子”の同定が期待

される。

要 約

本研究では、水棲型 OR の生理機能の解明と新たな水溶性匂い分子の探索を目的とし、マウス羊水を対象とした匂い応答の検出をおこなった。行動実験から羊水中には特徴的な行動を誘導する匂い匂い分子が含まれ、その影響はメスにおいてとくに強いことが明らかとなった。また交尾経験のない雌マウスに母性行動様の行動が認められることから、先天的な行動を誘導したものと考えられた。さらに、主嗅球における神経活動の検出によって、羊水中には成熟メスの背側領域の糸球体を特異的に活性化する匂い分子が含まれることがわかった。今後、初代培養嗅神経細胞のカルシウムイメージングによって羊水刺激に対して応答のみられた細胞を選択し、single-cell RT PCR による OR の同定と、クロマトグラフィー法によるリガンド分子同定を行う。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり研究助成を賜りました財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Zhang, X. et al.: *Genomics*, **89**, 441-450, 2007.
- 2) Glusman, G. et al.: *Genome Res*, **11**, 685-702, 2001.
- 3) Zhang, X., Firestein, S.: *Nat Neurosci* **5**, 124-133, 2002.
- 4) Hirota, J., Mombaerts, P.: *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 8751-8755, 2004.
- 5) Rothman, A. et al.: *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 535-546, 2005.
- 6) Hirota, J. et al.: *Mol. Cell. Neurosci.*, **34**, 679-688, 2007.