

脳科学ライフサポート研究センターセミナー

2014.5.30

化学感覚の情報変換 および関連神経機構

先進理工学専攻 中村 整

研究室で取り組み中の課題

- 脊椎動物嗅覚神経の動作機構
- 昆虫味覚神経の動作機構
- 昆虫の食欲調節機構
- その他

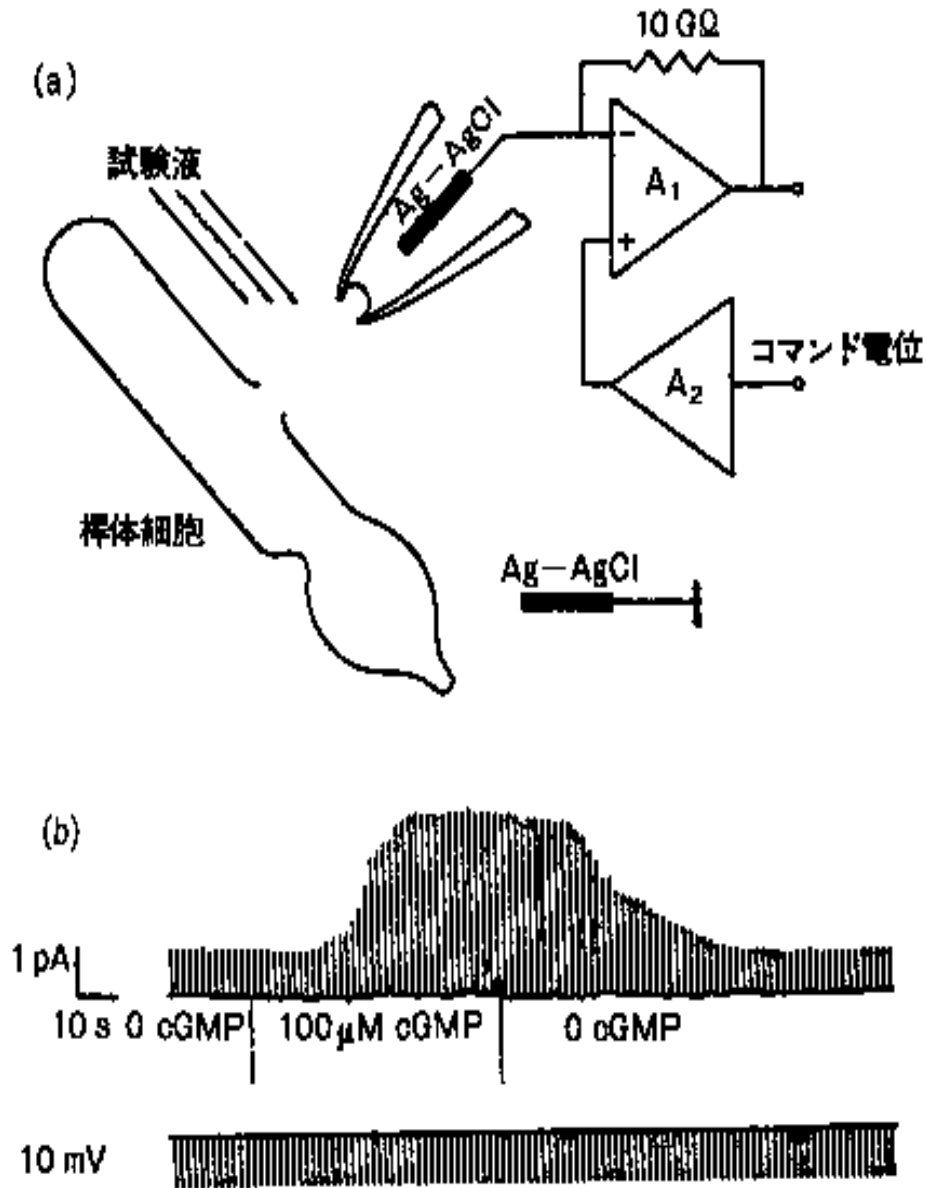
研究室で取り組み中の課題

- 脊椎動物嗅覚神経の動作機構
- 昆虫味覚神経の動作機構
- 昆虫の食欲調節機構
- その他

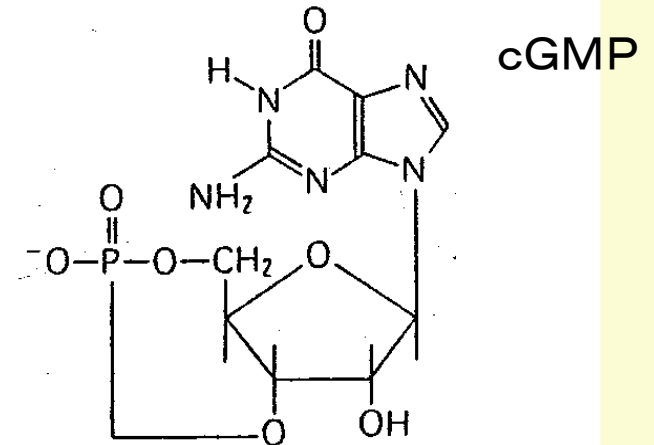
如何にして嗅覚の研究を始めたか？

- 1970年代：視覚に興味。
- 網膜において光で電気興奮が起きるメカニズムは当時の大きな課題（？）
 - ⇒ 視物質の研究室で網膜の電気生理
- いろいろ回り道（企業の研究所で漢方薬の研究など）しているうちに1985年に突如ソ連の研究者によって視細胞の興奮のメカニズムが解明されてしまった。⇒まずこの話から

視細胞 cGMP感受性チャンネルの発見

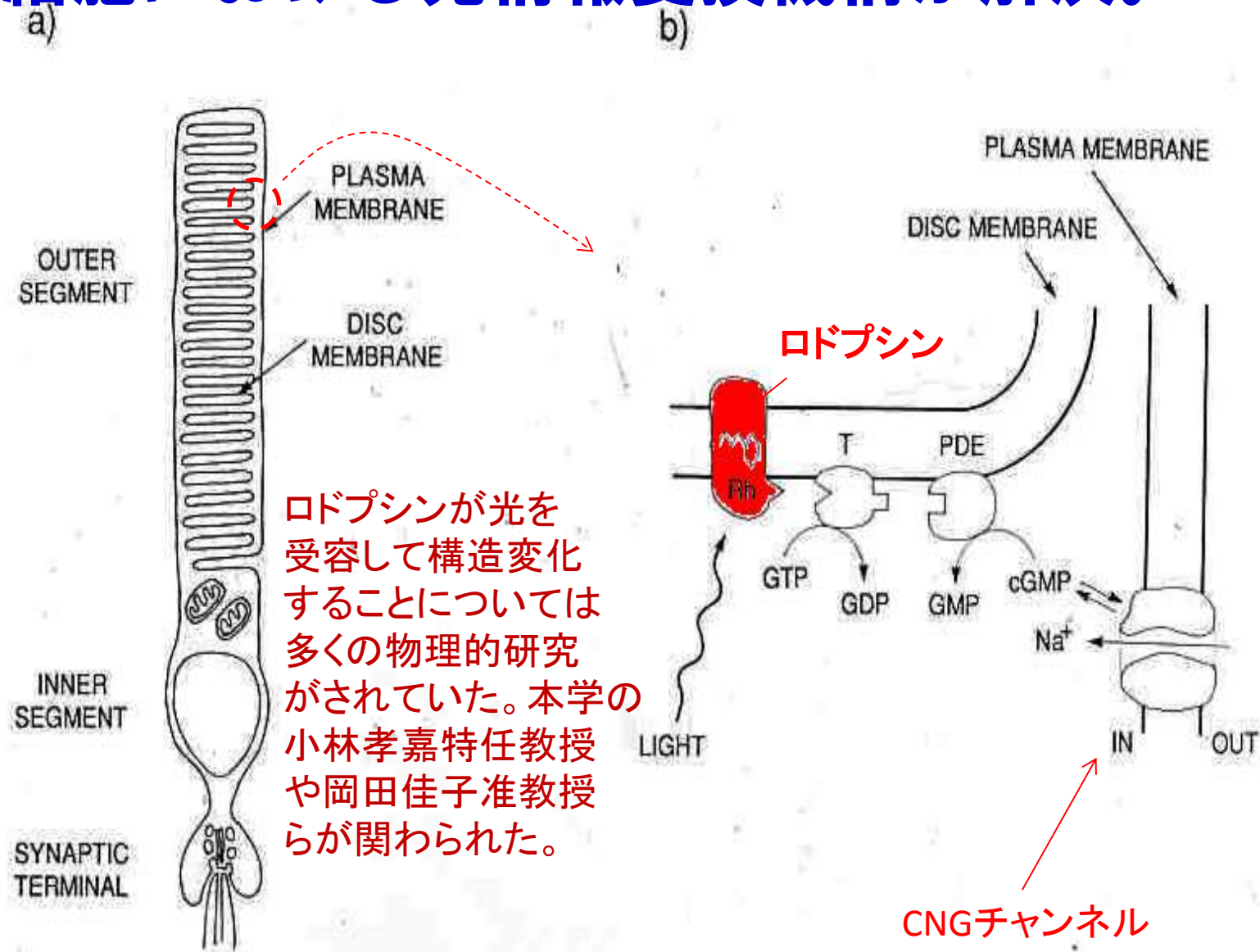


パッチクランプ法でインサイドアウト膜を切り出して、細胞膜の細胞内側にcGMPを与えたとき、膜コンダクタンスが変化することを観察。cGMPにより開閉するイオンチャンネルが存在することを初めて示した。



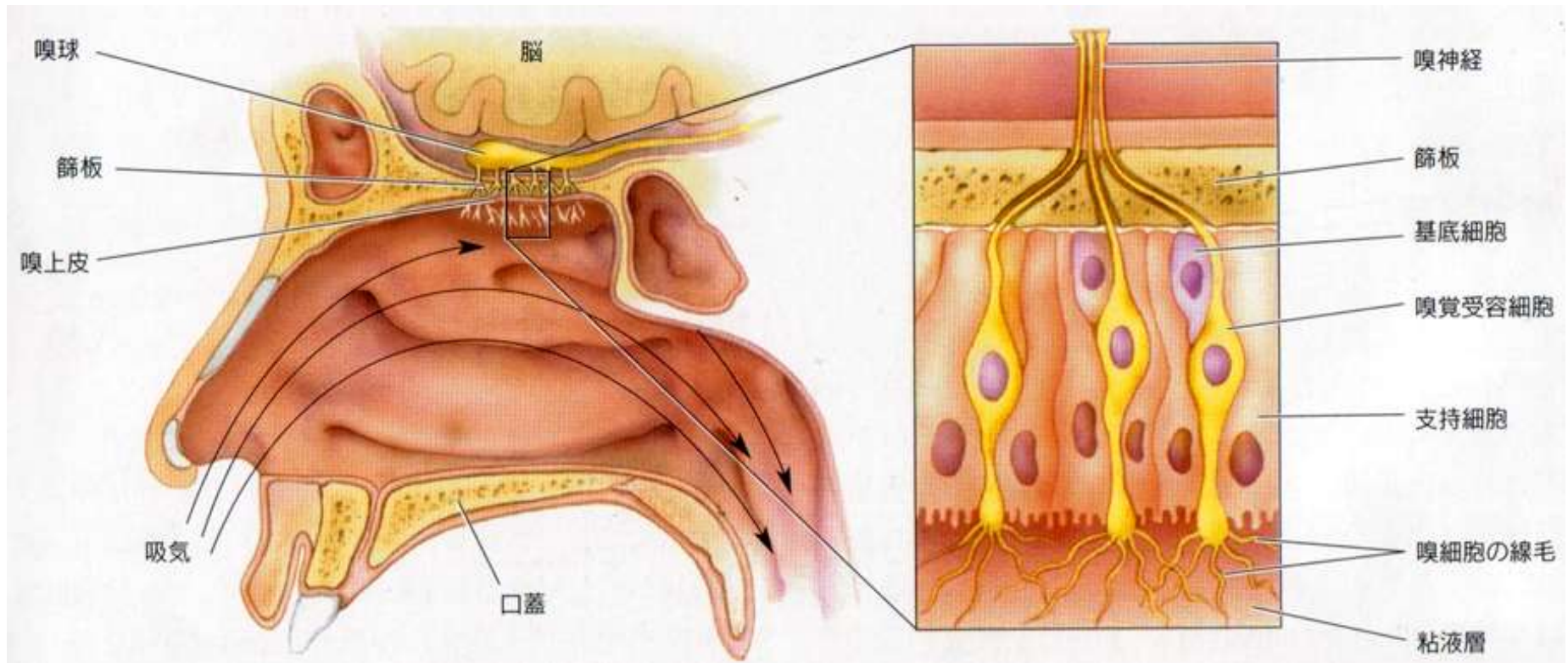
Fesenko et al. 1985

視細胞における光情報変換機構が解決。



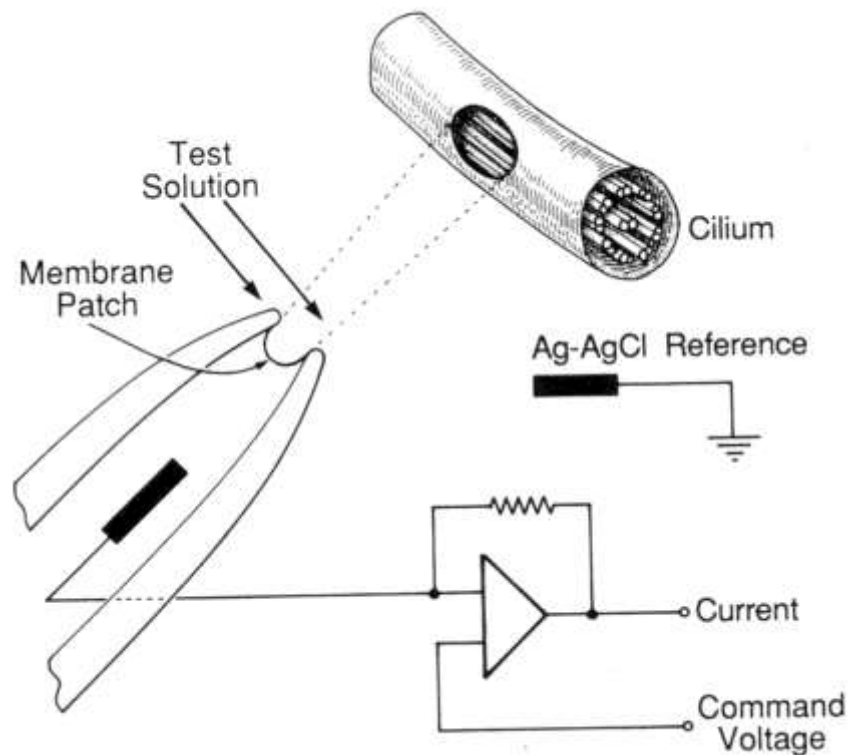
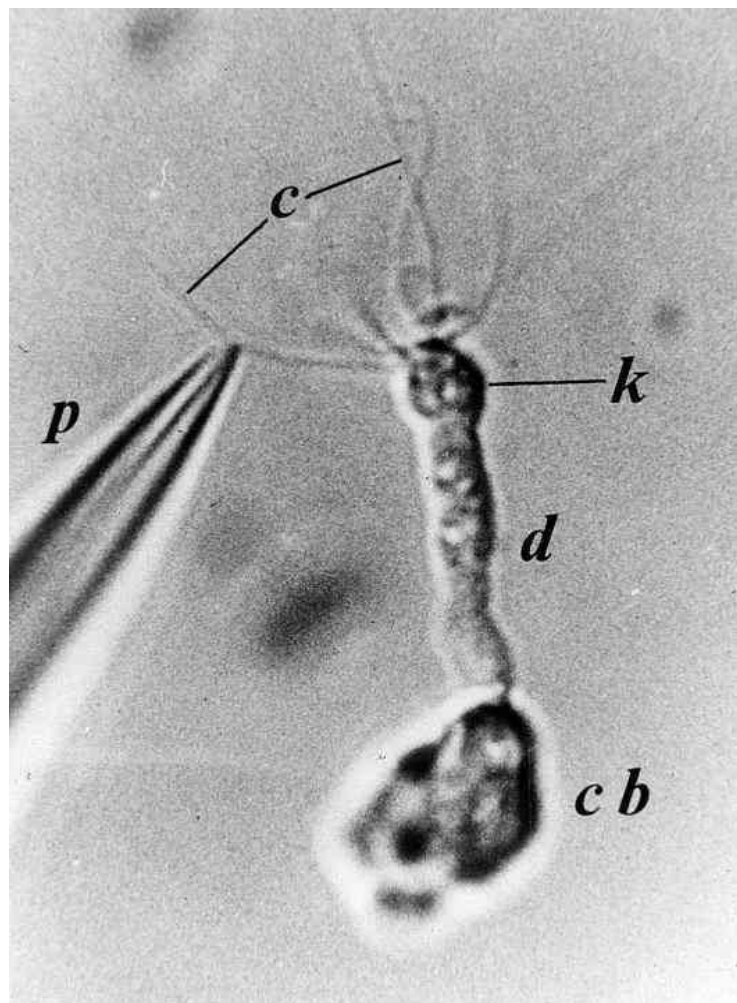
嗅細胞で匂いに反応するGTP依存性のcAMP合成酵素が発見された(1985)

⇒ 嗅細胞は視細胞に似ている可能性？



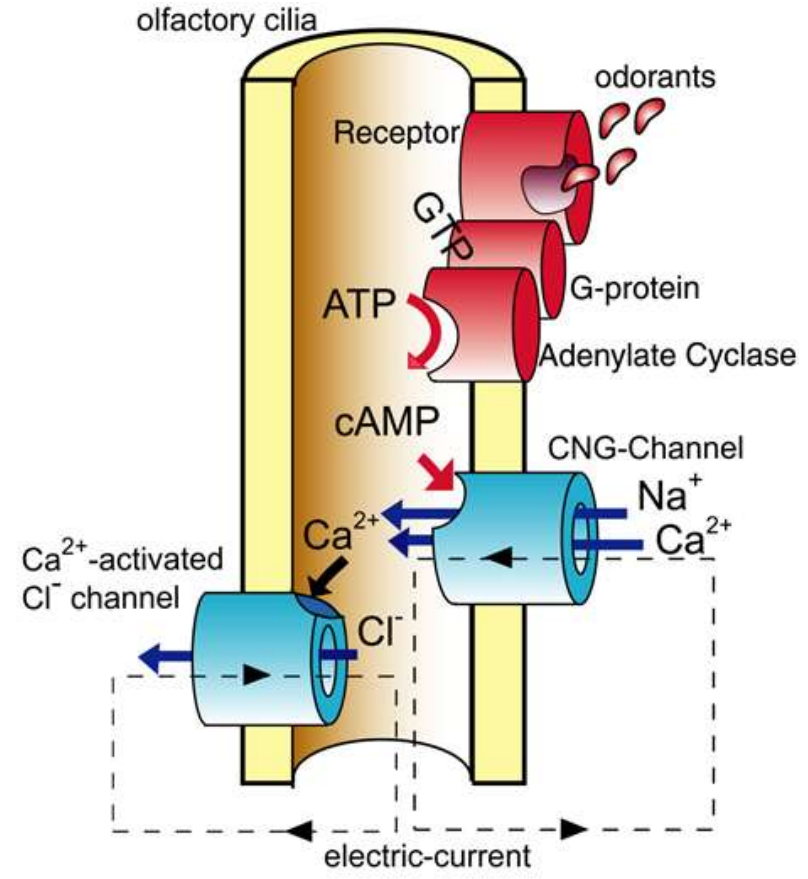
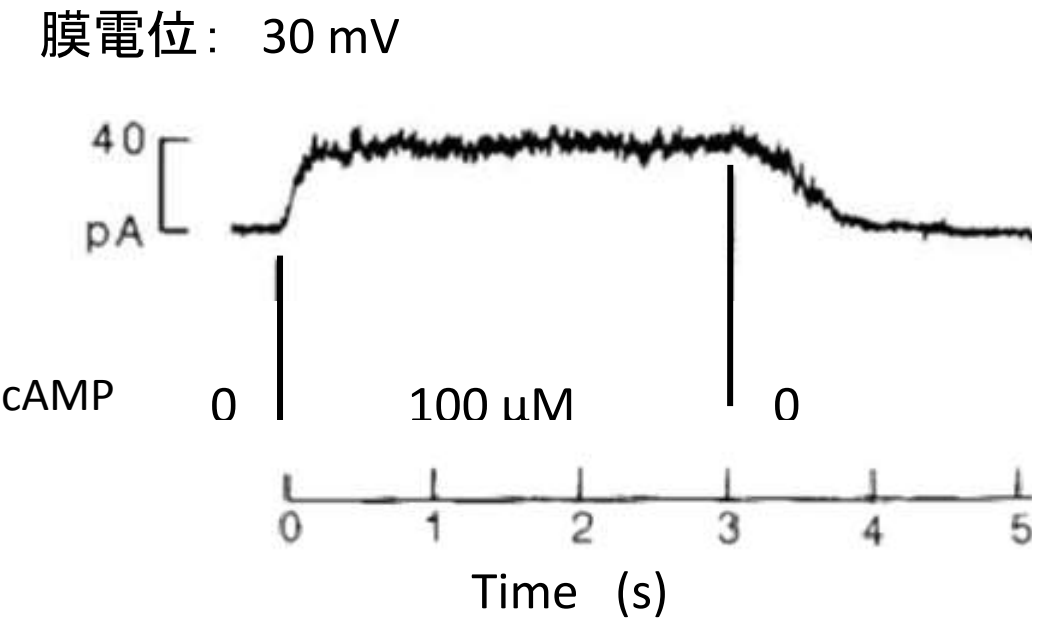
パッチクランプ法を練習中だった。

⇒ 嗅繊毛に適用



Nakamura and Gold, 1987

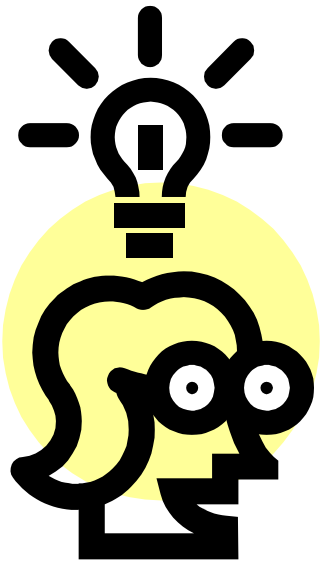
嗅繊毛にcAMP感受性チャンネルを発見 ⇒ 嗅覚情報変換機構の解決



この機構は現在、ほぼ確立。ただし、順応や体調で嗅覚が変化したりするなどの機構は未解明な点も。それらに関わる嗅細胞特異な遺伝子発現がないか検討中。

嗅覚受容体（OR）発見のきっかけを与える結果に・・・

- 嗅細胞のcAMP合成酵素はGTP依存性（1985）
- cAMPが細胞内情報伝達因子だった（1987）
⇒ 嗅覚受容体は視物質の仲間

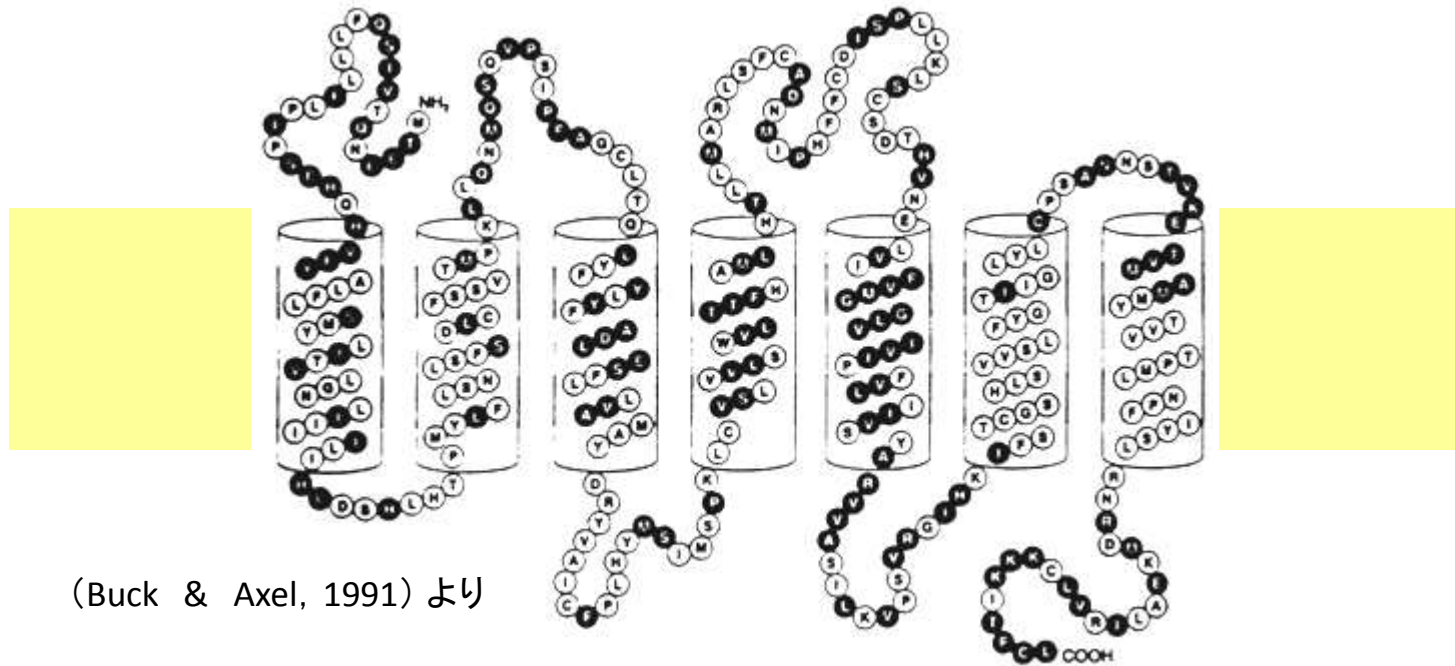


Buck & Axel (1991)

蛋白の研究をせず、
発現遺伝子の研究をした。

検出された匂い物質受容体 (OR) の遺伝子

●は変異の多いアミノ酸



(Buck & Axel, 1991) より

1. 1000種 (ヒトでは350種) の受容体スーパーファミリー
2. 膜貫通部分に変異が多い: 疎水性匂い物質受容部位
3. 視物質と同じような型

嗅覚神経系の謎

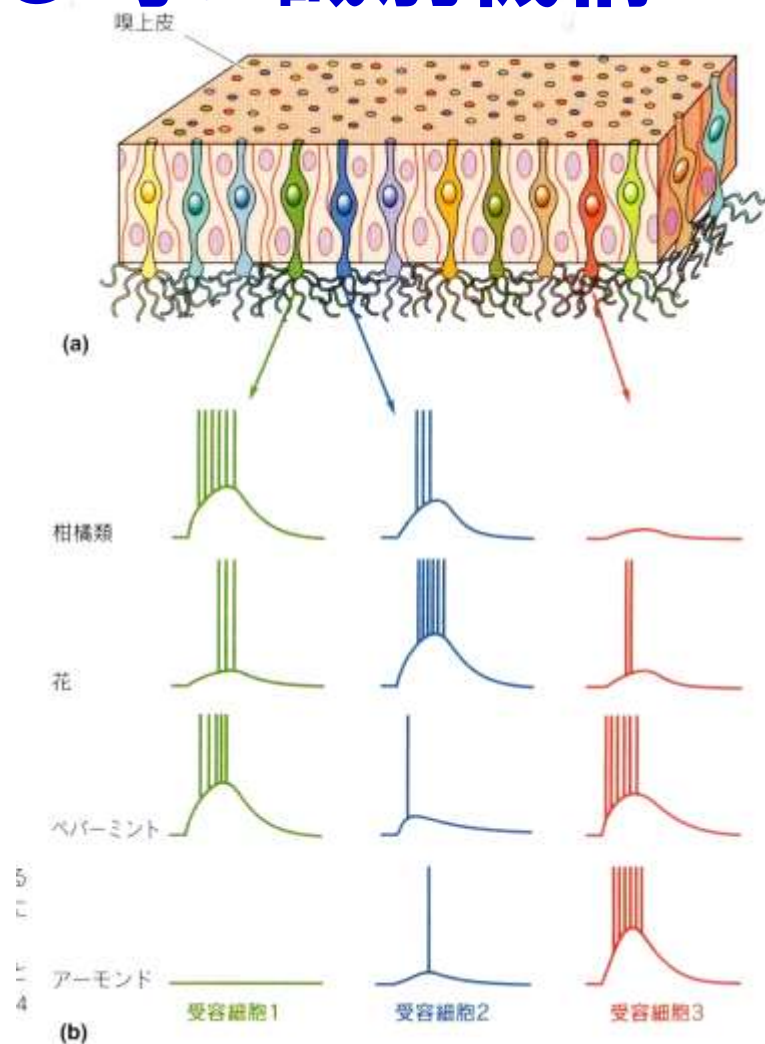
多数の嗅細胞による匂い識別機構

個々の嗅細胞は様々な匂い物質に反応

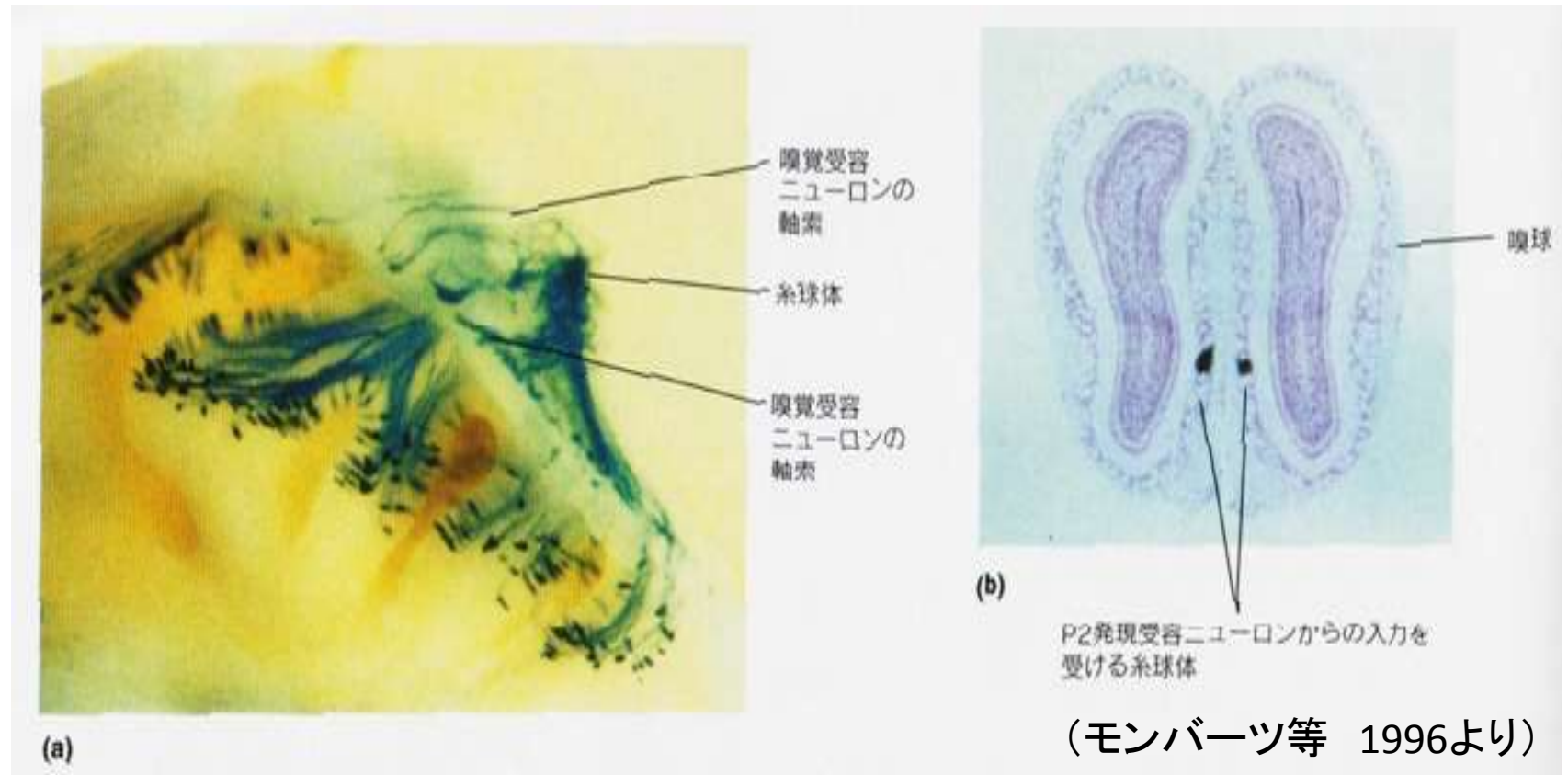
鍵と鍵穴のような狭さは無く、幅広い応答特性。



匂いの識別はどうやって？



嗅細胞の軸索の配線様式の分子生物学的解析

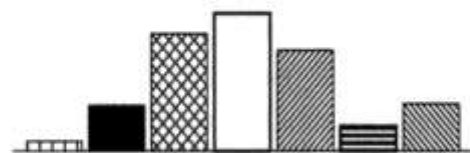


1つのOR遺伝子の下流に可視化のための遺伝子を置くと、そのORを持つ嗅細胞だけを見ることが可能。同じORを持つ嗅細胞は“嗅球”の左右1対の糸球体に投射。

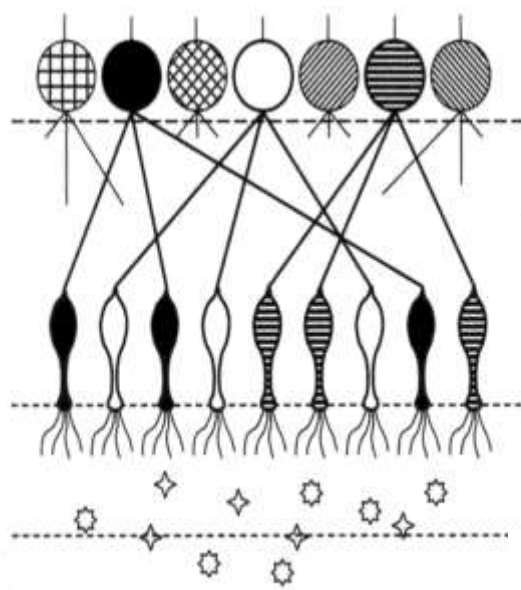
匂い識別機構（嗅球での第一段階）



匂い物質A



匂い物質B



嗅球
系球体

嗅上皮

嗅細胞

粘液

鼻腔

1. 1000種の受容体
2. 匂い物質に対し低い選択性
3. 複数の受容体の組み合わせ＝各匂い物質のパターン→**系球体マトリックスの興奮パターン**

匂いもパターン認識！

分子生物学：神経研究で力

イモリの嗅上皮, 遺伝子解析

- イモリの単離嗅細胞: パッチクランプの好材料。遺伝子情報を扱いたい(電通大・中村 研)
- 嗅覚の分子生物学を始めたいが, 匂い応答の測定が必要(室蘭工大・岩佐研)



イモリ嗅上皮の試料を室蘭工大に送り, 岩佐研でcDNA作製




リポカリン2種(匂い物質結合蛋白質)の大量発現を見出す。 CpLip-1, CpLip-2と命名。

Cp-Lip1, Cp-Lip2のアミノ酸のアライメント

Cp-Lip1 1:MSAMWISLGLLFSGLLQLOAMEIPVMSNFDPOKILGKWYAVAVASNCPEFVQMKSVMKMPITIFSVLDDG 70
 Cp-Lip2 1:MFVLWVSLGLALTSLLOVEAMDVPVVKDFETDKFLGRWYSVVVASNCTQFMKMSMLKMPVNVITAHENG 70
 * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *

* 同一性
 ▪ 類似性



Q83 ChainA 1: MTVP-----DRSEIAGKWYVVALASNTEFFLREKDKMKMAMARISFLGED 45


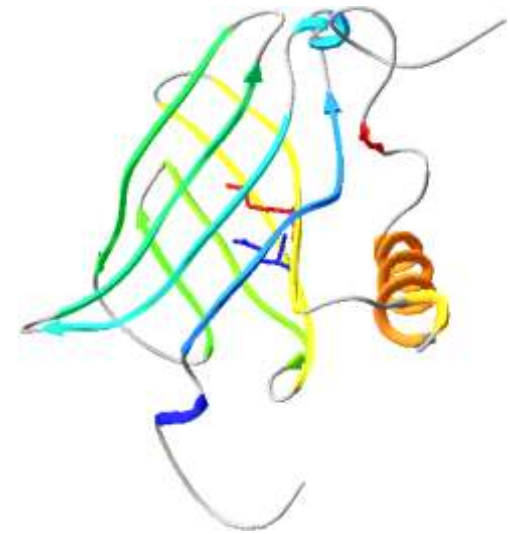
Cp-Lip1 71:DLYAATGVAGPSGCMTMDMY- HTAKHGQYTQSVDNSDIRFVDGDFDHSVLEYTQNVSESGDACKMVKL 139
 Cp-Lip2 71:DL DVRMGFPGKDGCMKKDMYY-QMISPGRYTQSTATQTEVRI VETDYKHTAIEYSRKVSELEVVSVMVKL 139
 ** . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *

Q83 ChainA 46:ELKVSYAVPKPNGCRKWETTFKKTSDDGEEVYVYSEEAKKKVEVLDTDYKSYAVIYATRVKD-GRTLHMMRL 114


Cp-Lip1 140:LARQPEVAEIPALAIIEHFKMLIPVVGLSMEDVTHLPRDIDCVPGEF 185
 Cp-Lip2 140:YAREADV--HPGV-FTLFKMLMEGLGLTEENMVVLPHDVECVPGETF 182
 ** . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *

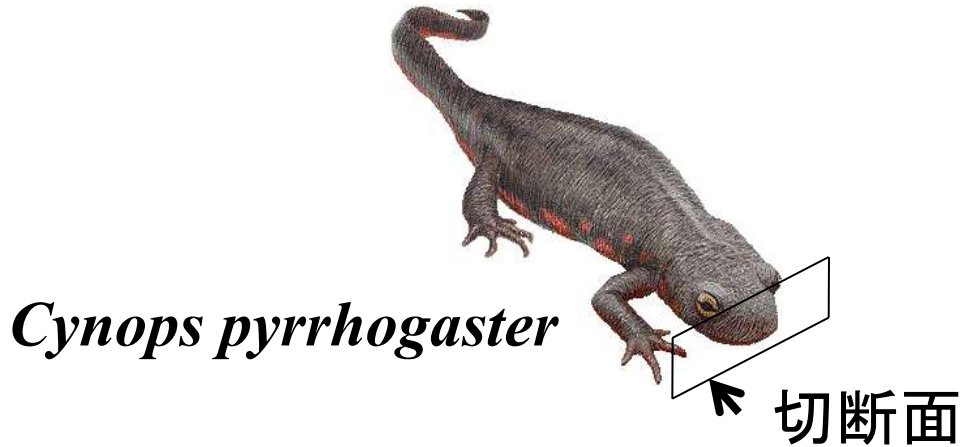
Q83 ChainA 115:YSRSPEV--SPAA-TAIFRKLAGERNYTDEMVA MLPRQEECTVDEV 157


 α helix
 β sheet



(Sawada et al. 2013)

イモリ嗅上皮の2種のリポカリン（岩佐ら、2008）



背側
└─┬─
└─┬─▶ 体側

in situ hybridization



Cp-Lip1

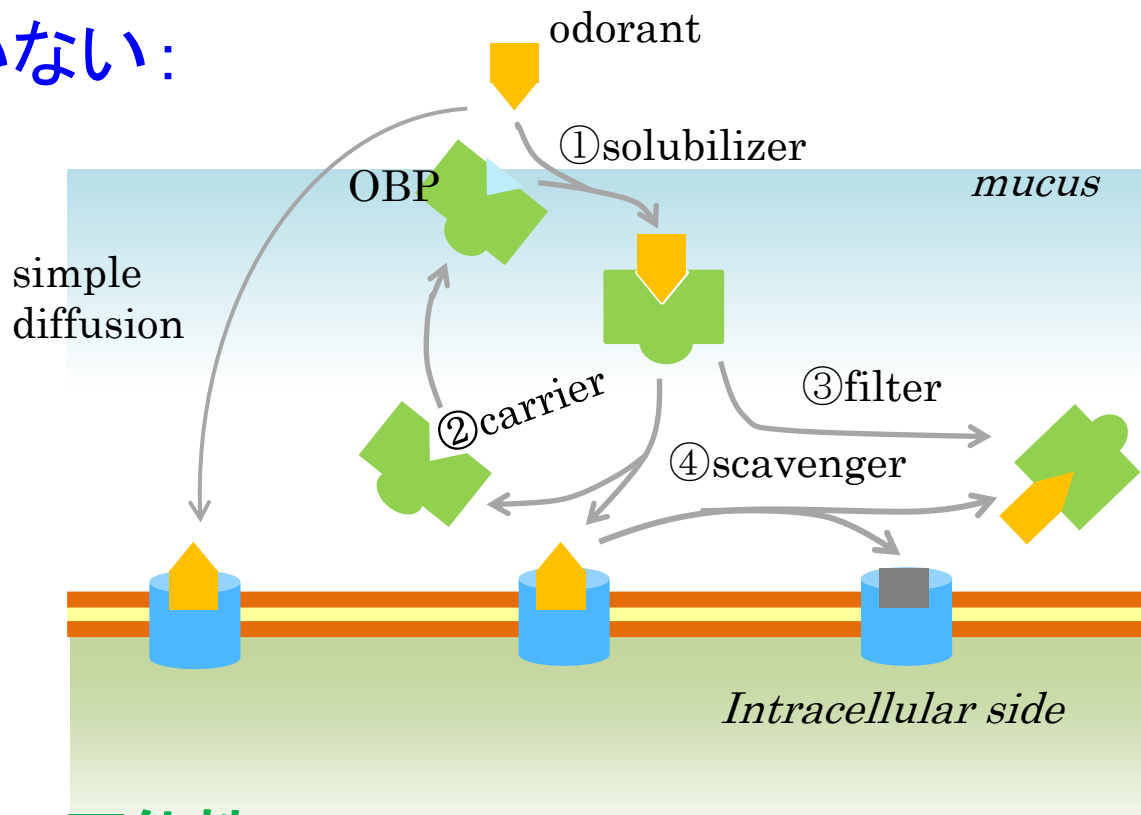


Cp-Lip2

Cp-Lip1とCp-Lip2の発現場所は大まかに背側、腹側で扱える⁷。

• OBPの生理的役割の解明：

OBPの生理的役割については諸説があり、確定していない：



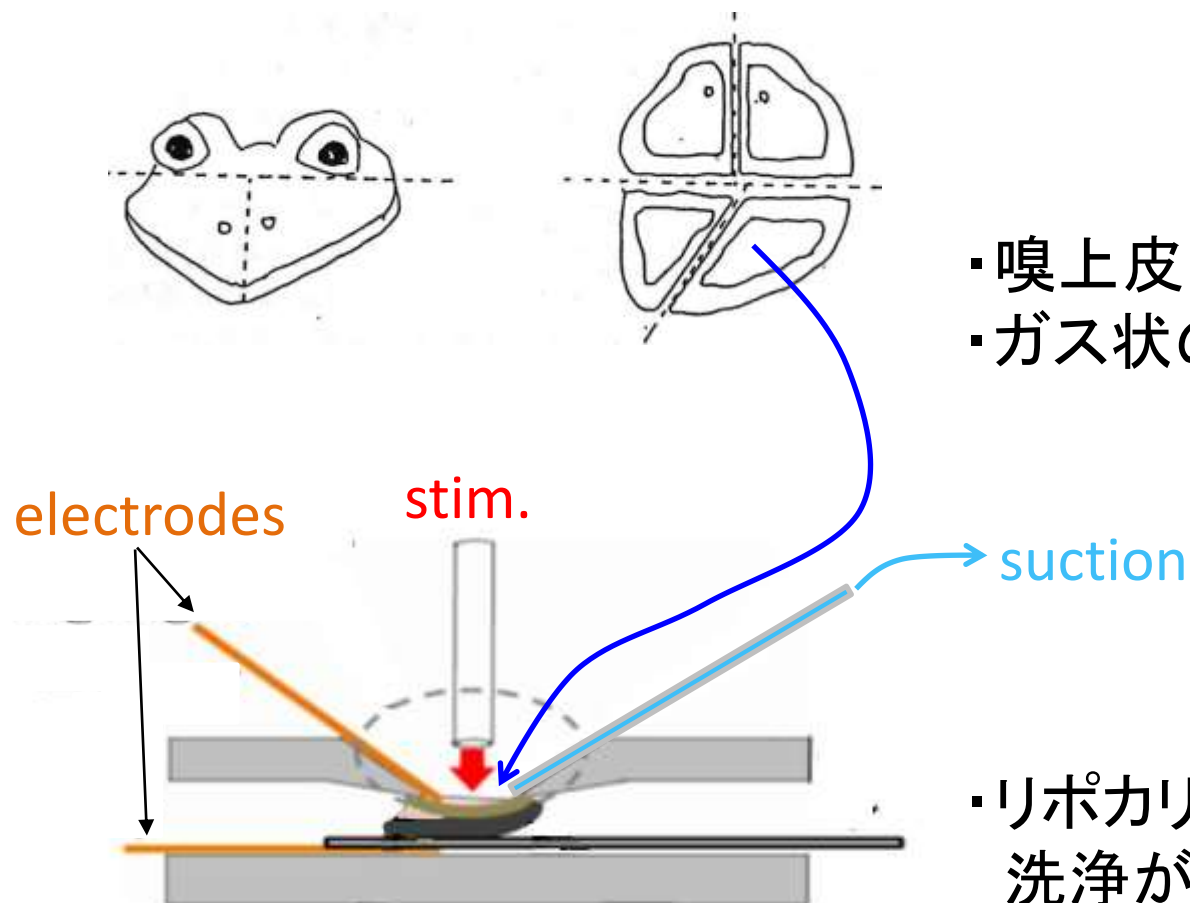
応答増強の可能性：

- ① 可溶化促進
- ② 粘膜中の運搬

応答抑制の可能性：

- ③ フィルター効果
- ④ 刺激後の速やかな除去

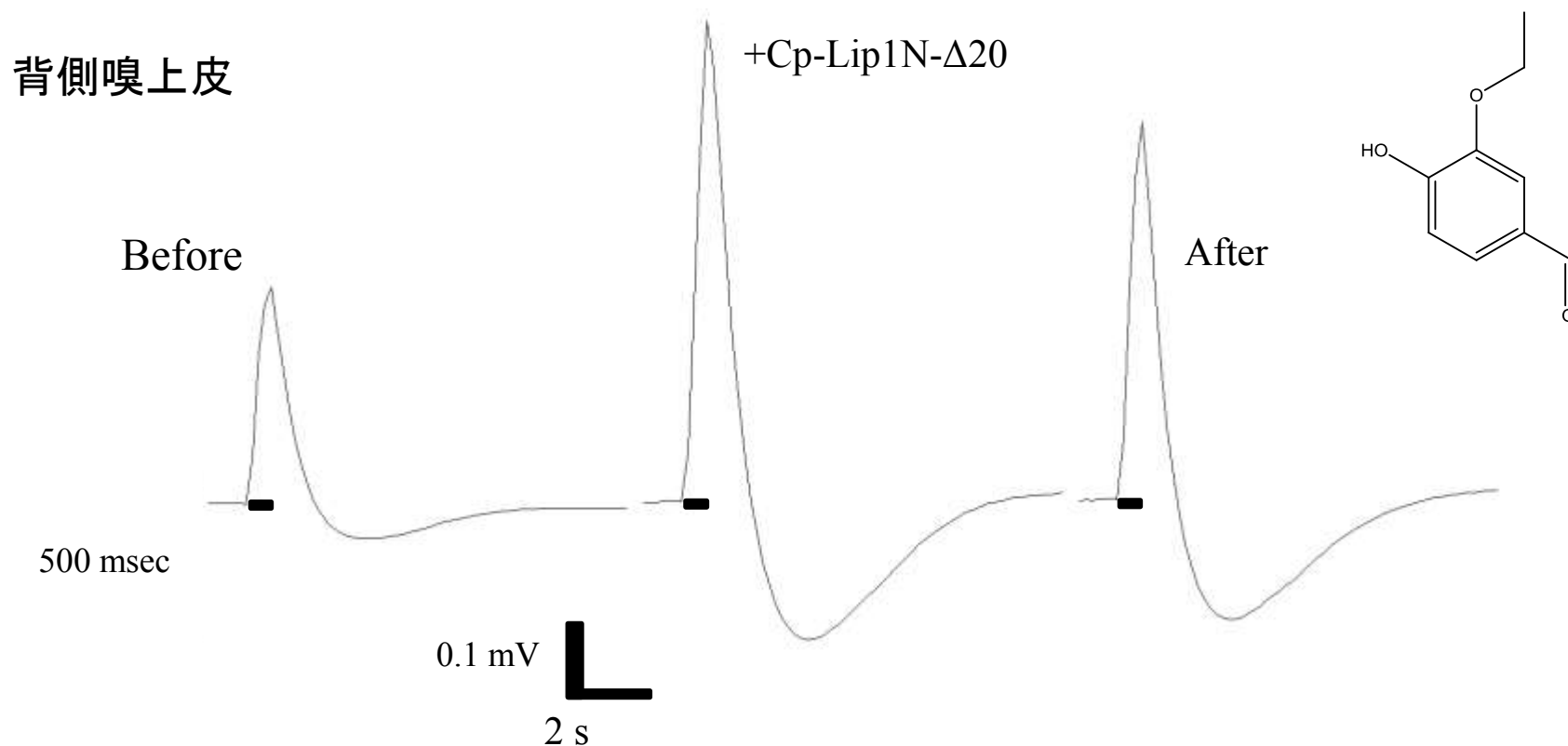
方法：リポカリンの嗅電図 (EOG) に対する影響を検討



- ・嗅上皮のセッティングが容易。
- ・ガス状の匂い刺激を使用。

- ・リポカリン溶液等の散布や洗淨が容易。
その前後でEOGを測定

Ethylvanillin誘発EOGに対するリポカリン散布効果



Cp-Lip1散布により **Ethylvanillin** (高親和性) の応答が**増強**。
しかし、洗浄によって、元の振幅に戻らない。
リンゲル溶液に触れると活性上昇の可能性？

➡ 現在なお検討中

研究室で取り組み中の課題

- 脊椎動物嗅覚神経の動作機構
- **昆虫味覚神経の動作機構**
- 昆虫の食欲調節機構
- その他

昆虫味細胞 (味覚毛) の味応答機構



ふ節 (肢先)

唇弁 (口器)

孔 →

機械受容細胞

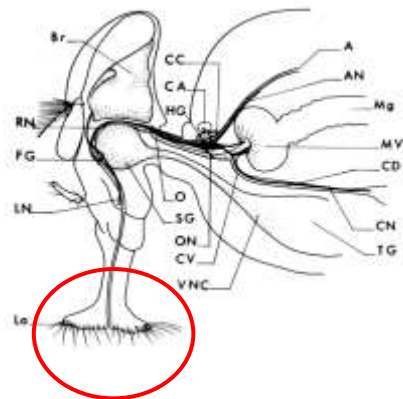
糖細胞
塩細胞
水細胞
苦味細胞

各味覚毛の内部には4種の味細胞の樹状突起 (受容部) が収まっている。

単離味細胞における味応答機構

- パッチクランプ法？
- 味受容部の構造が繊毛なみの細さ
- クチクラ(外骨格)に囲まれた味細胞

- 昆虫を実験材料とする利点
 - 材料としての容易さ(?) \longleftrightarrow 自分で殖やす
 - 簡単な脳構築 \longleftrightarrow 小さくて実験しづらい
 - ほとんど反射のみで行動が成立
 - \longleftrightarrow 結果はヒトなどに応用可能か？



+papain/chitinase 140 μ l

(エッペンドルフチューブ内)

↓ ソニケーション(48kHz, 40W, 1~2sec)
インキュベート(29°C, 40min)

↓ 培養液10 μ l 中にて洗浄(スライドガラス上)

↓ 培養液190 μ l (エッペンドルフチューブ内)

↓ Vortex処理(1,400回/min)

· pupa; 【10sec(+) \rightarrow 10sec(-)】 \times 3~5sets

· adult; 【10sec(+) \rightarrow 10sec(-)】 \times 5~10sets

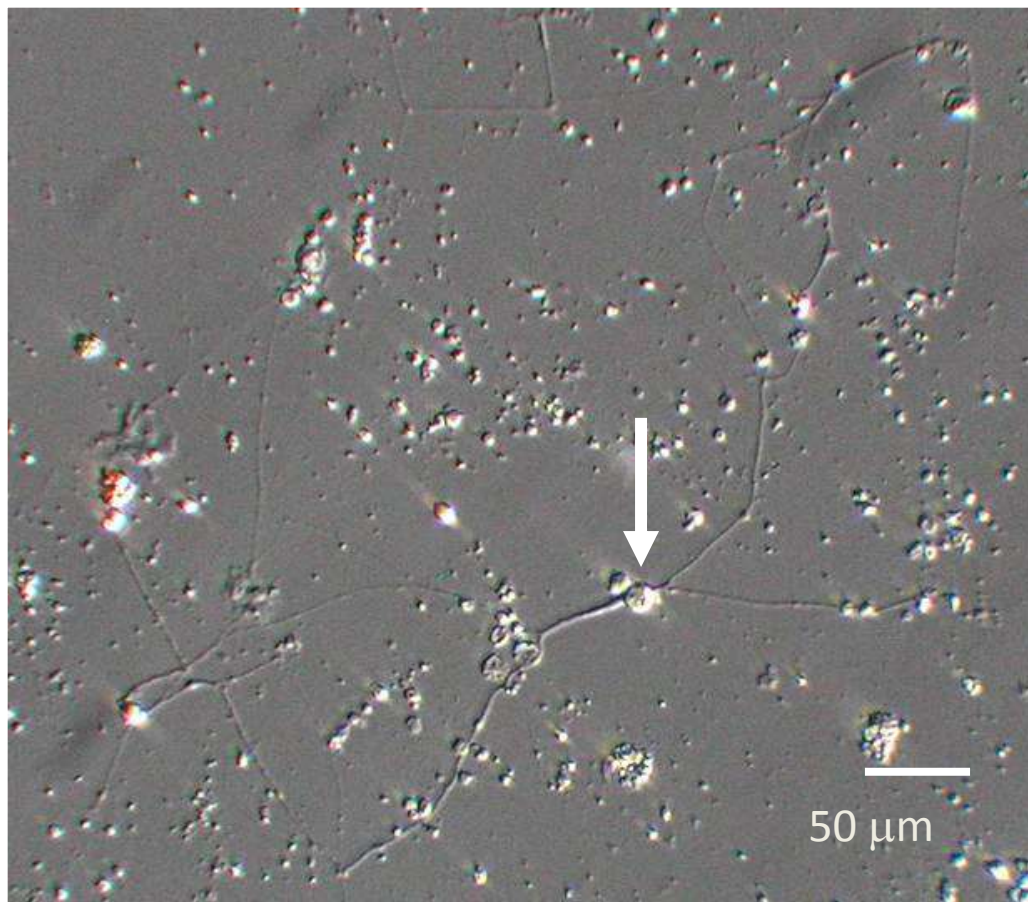
↓ 培養(29°C)

培養液:L-15, w/trehalose, hydroxyecdysone, FBS



10 μm

単離直後



50 μm

17日培養

$[Ca^{2+}]_i$ -increase induced by 100 mM sucrose

Ca²⁺-Probe: fluo-3

λ_{ex} : 488 nm

λ_{rec} : >500 nm

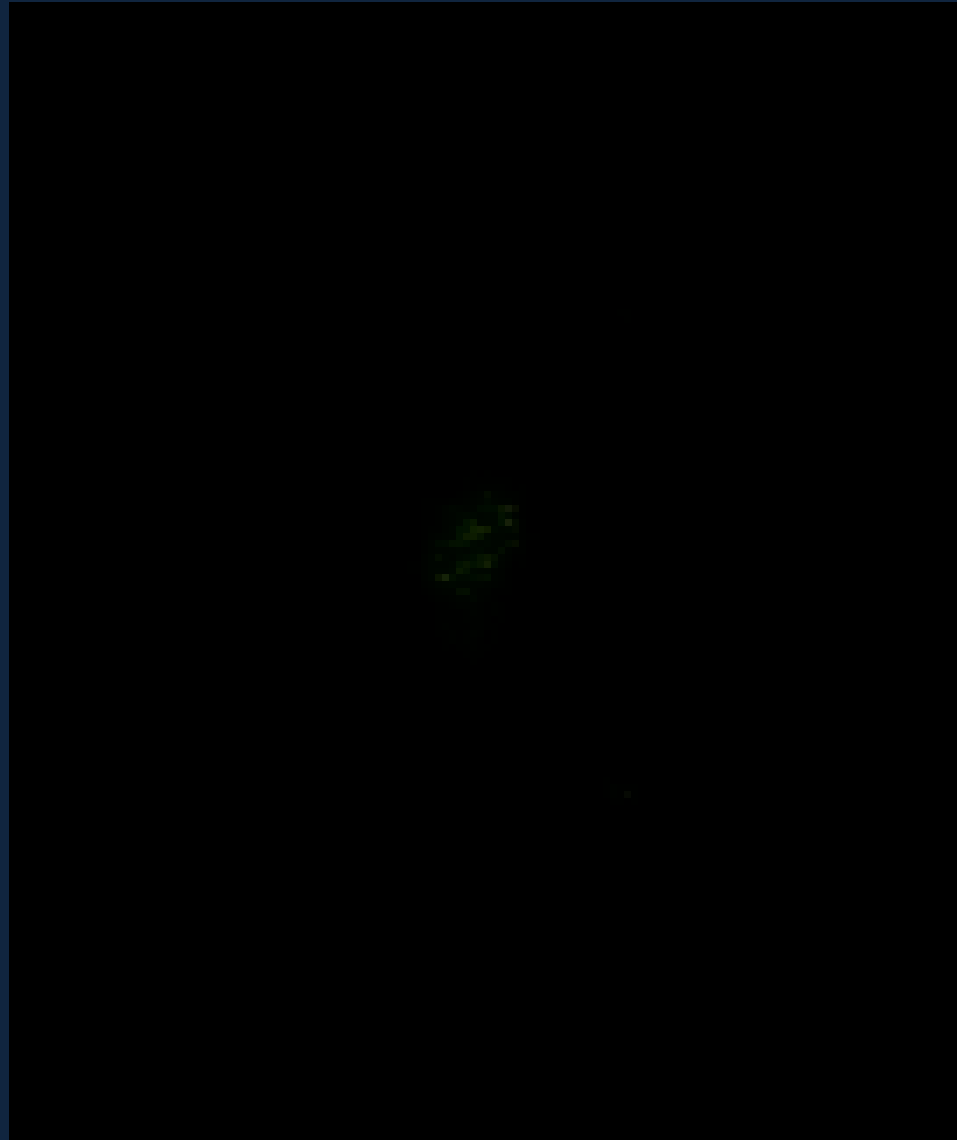
100 mM sucrose



2 sec

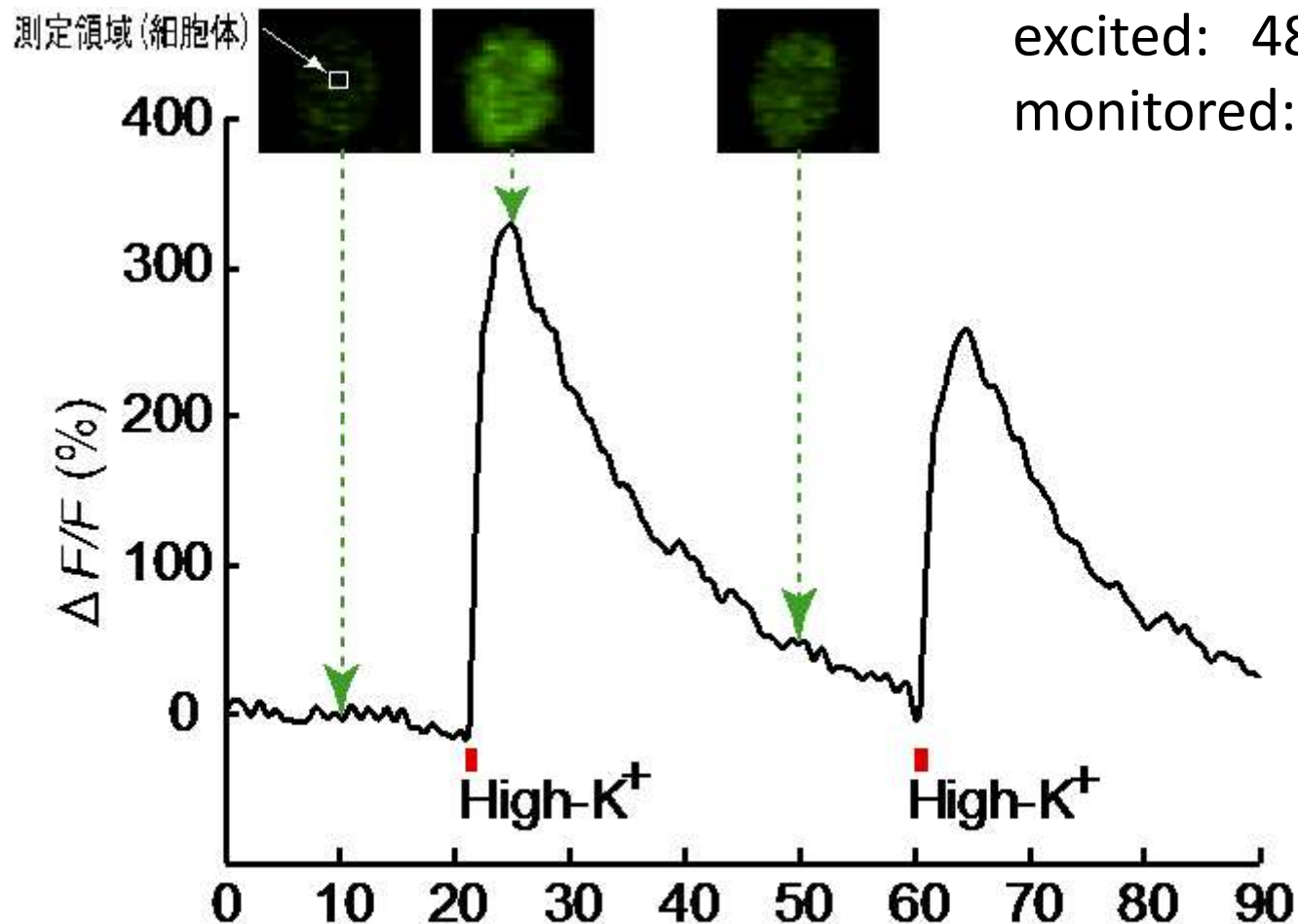


100 mM mannitol



細胞興奮に伴う $[Ca^{++}]_i$ 増加

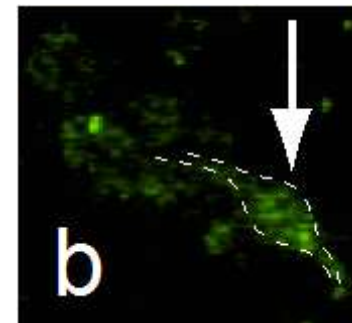
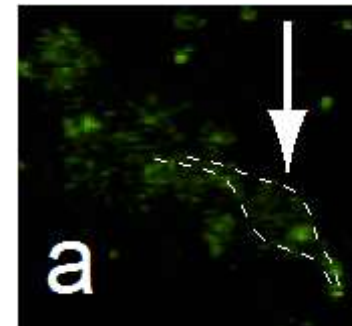
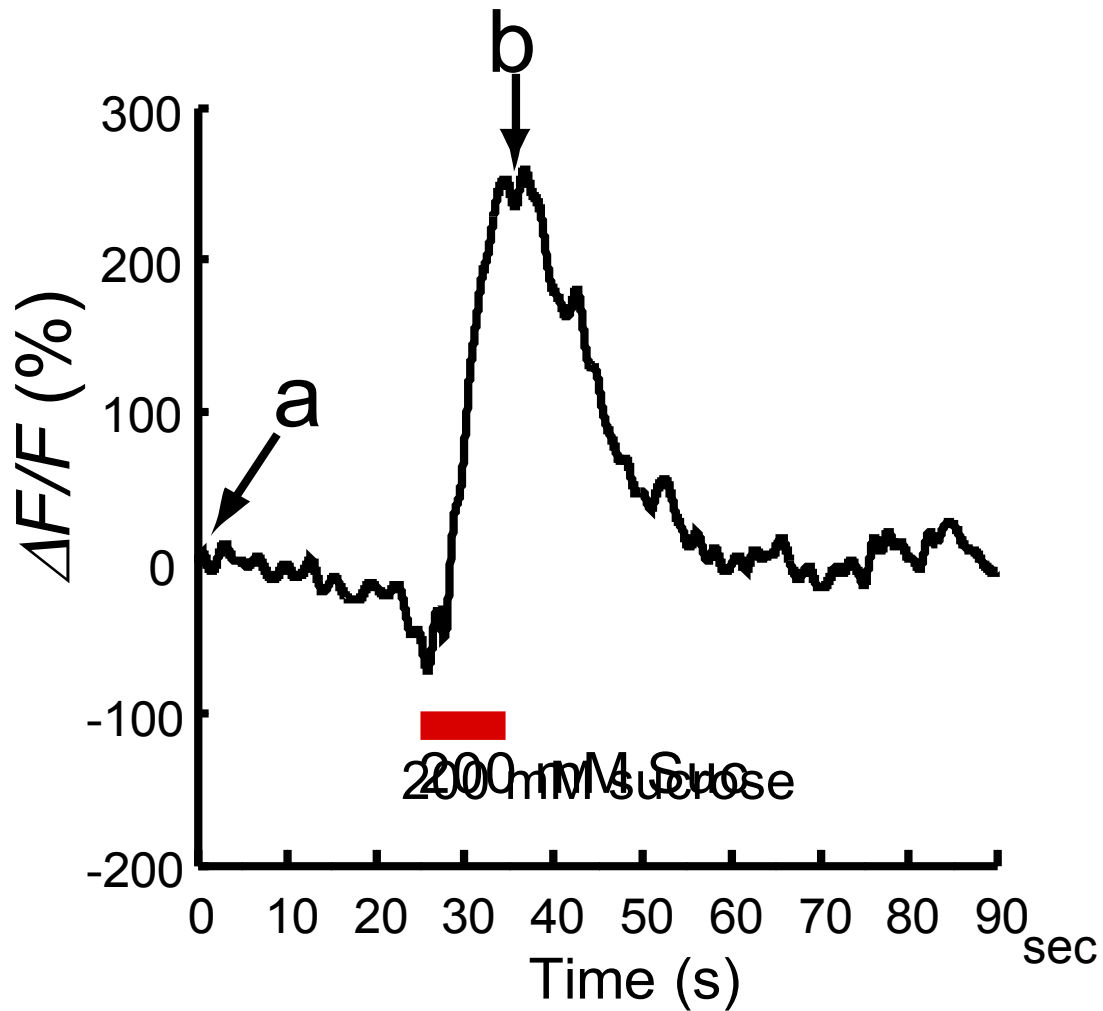
Ca⁺⁺ dye: fluo-3
excited: 488 nm
monitored: >500 nm



高カリウム液で刺激したときの蛍光強度変化例

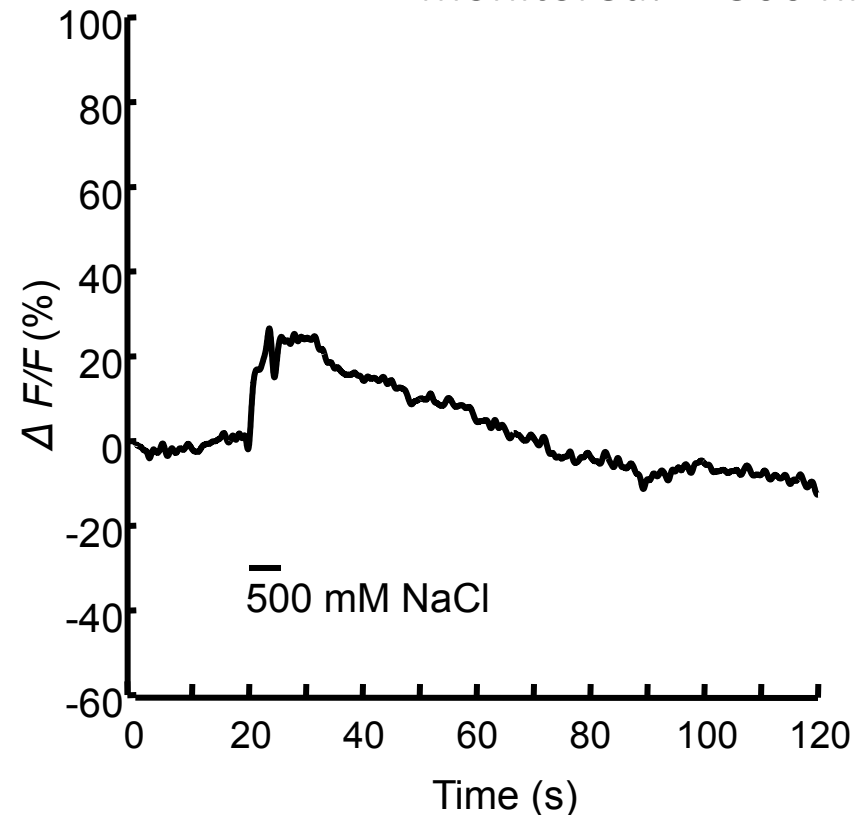
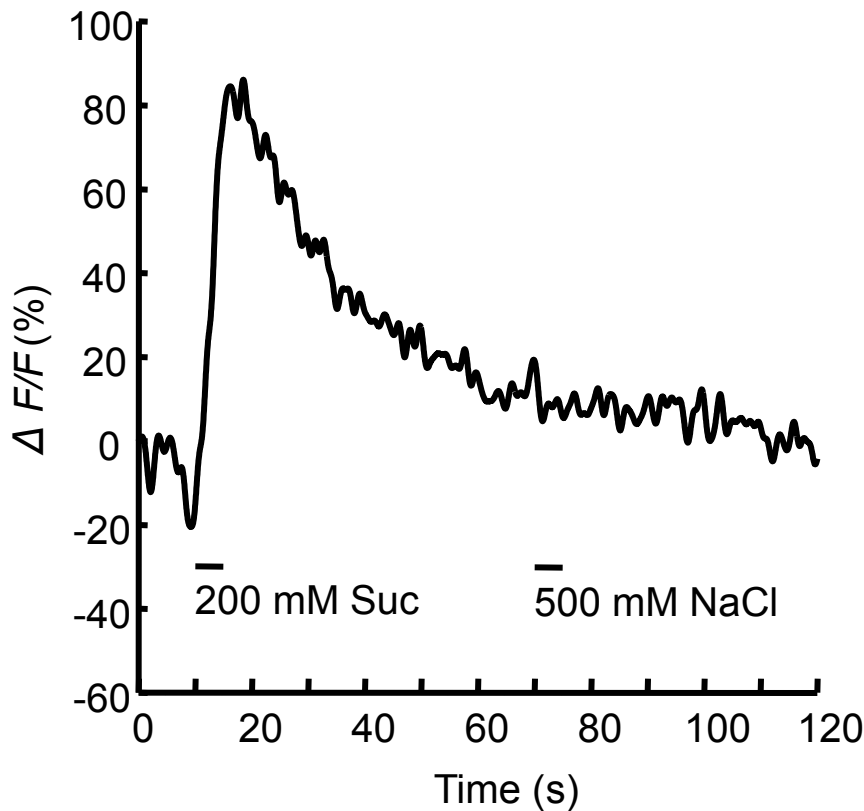
糖刺激に対する $[Ca^{++}]_i$ 反応

Ca⁺⁺ dye: fluo-3
excited: 488 nm
monitored: >500 nm



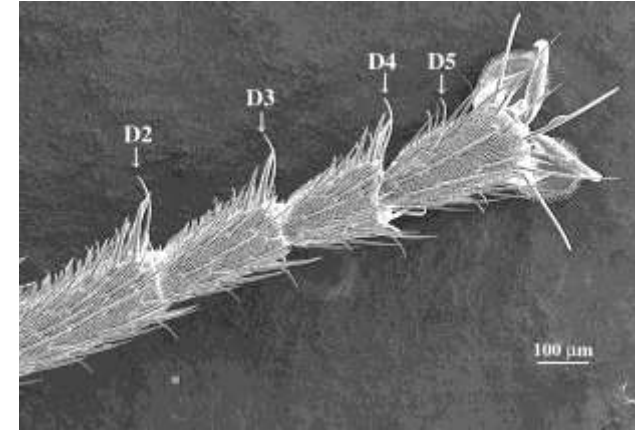
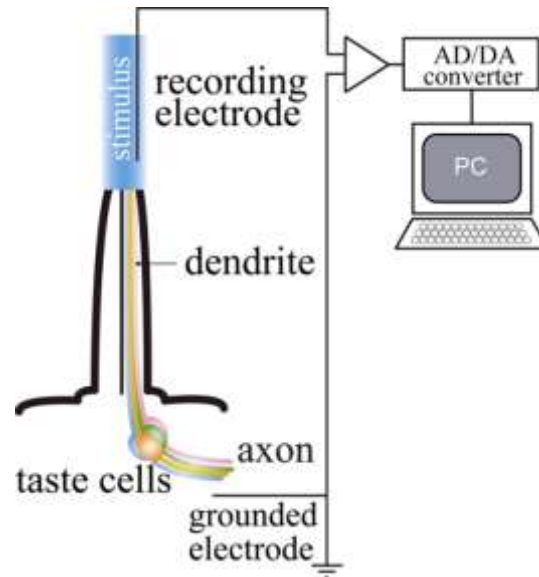
細胞特異的な味応答 (sucrose, NaCl)

Ca⁺⁺ dye: fluo-3
excited: 488 nm
monitored: >500 nm

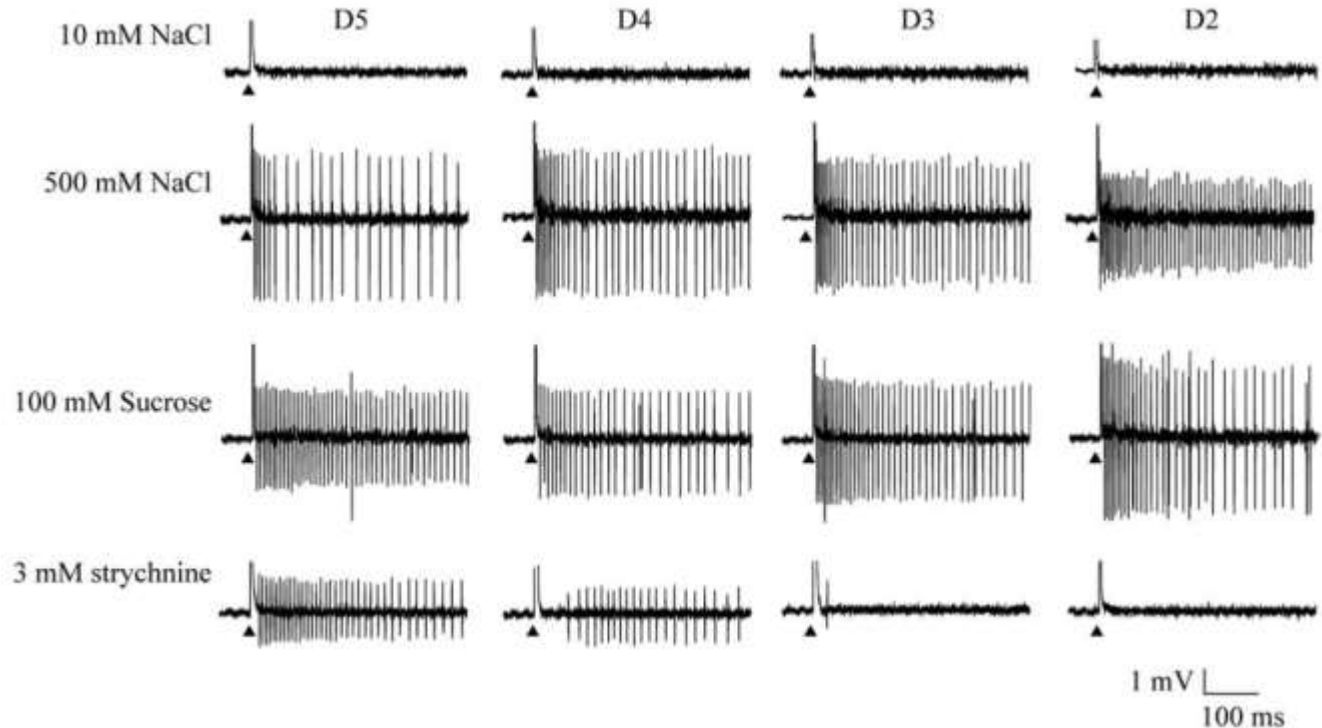


糖応答と塩応答をそれぞれ示す単独の細胞が得られた。
ただし、パッチクランプ法を適用するには、壊れやす過ぎた。

ふ節（肢）の味覚毛の応答インパルスの記録



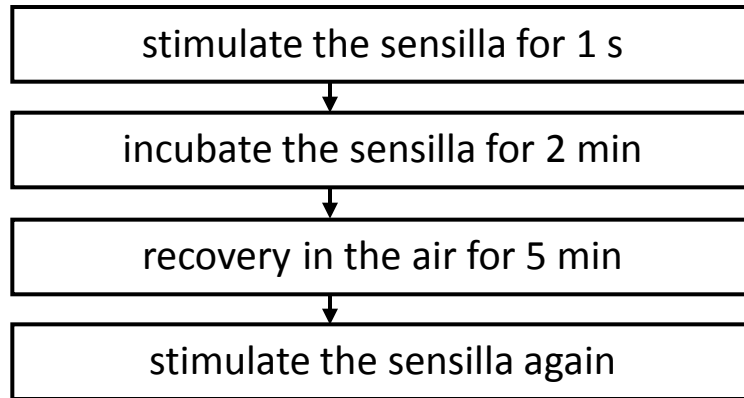
味物質+10 mM NaCl
溶液を詰めた
ガラス管電極を味覚
毛先端にかぶせると、
味物質に応じたインパルス列が
記録される。(振幅が異なる4種の
反応: 4個の味細胞)



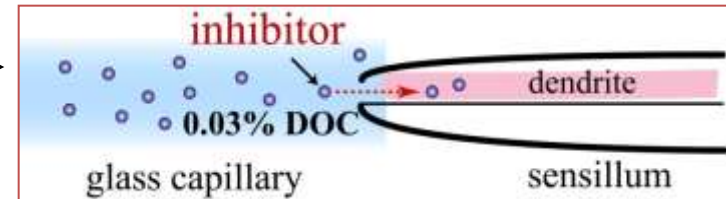
”D4”味覚毛から記録される苦味応答を研究対象に。

Methods

Protocols

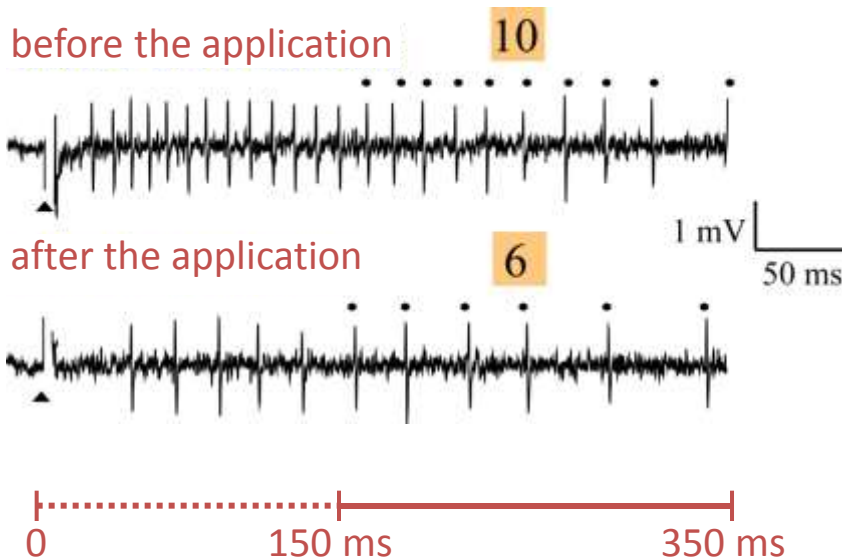


● recording the response (before)



● recording the response (after)

Analysis

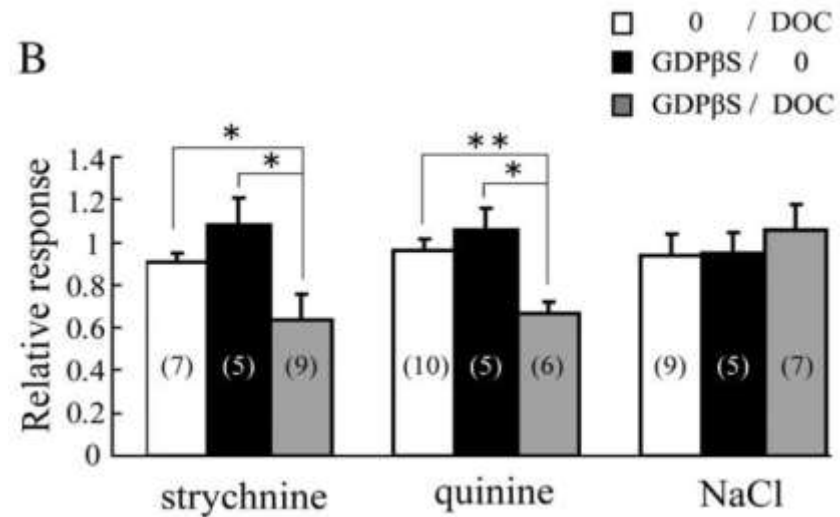
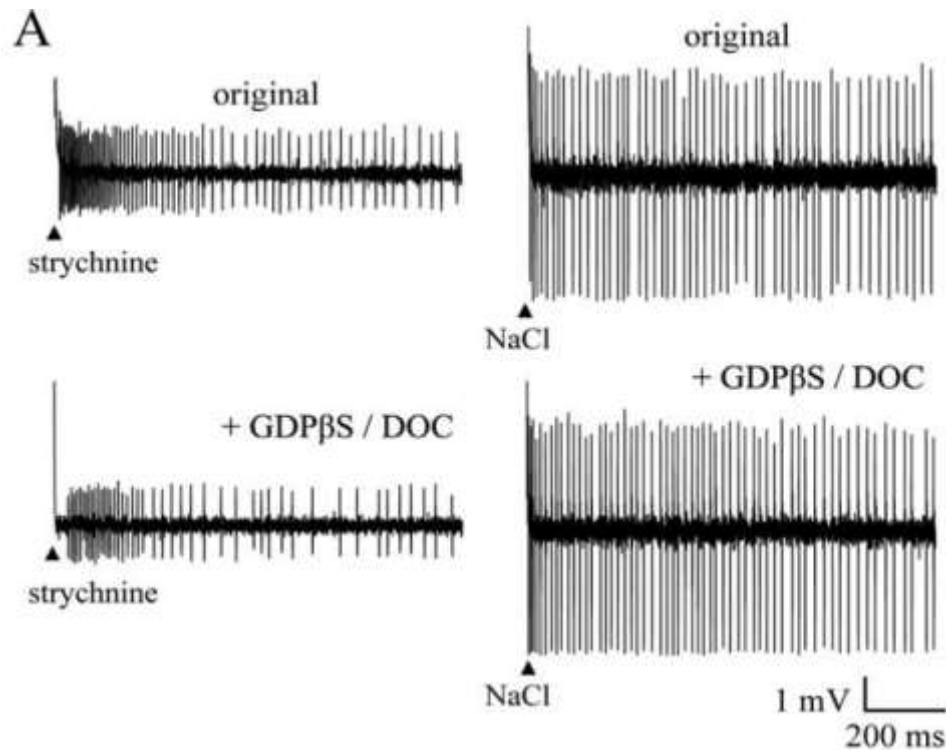


see the effects of reagents

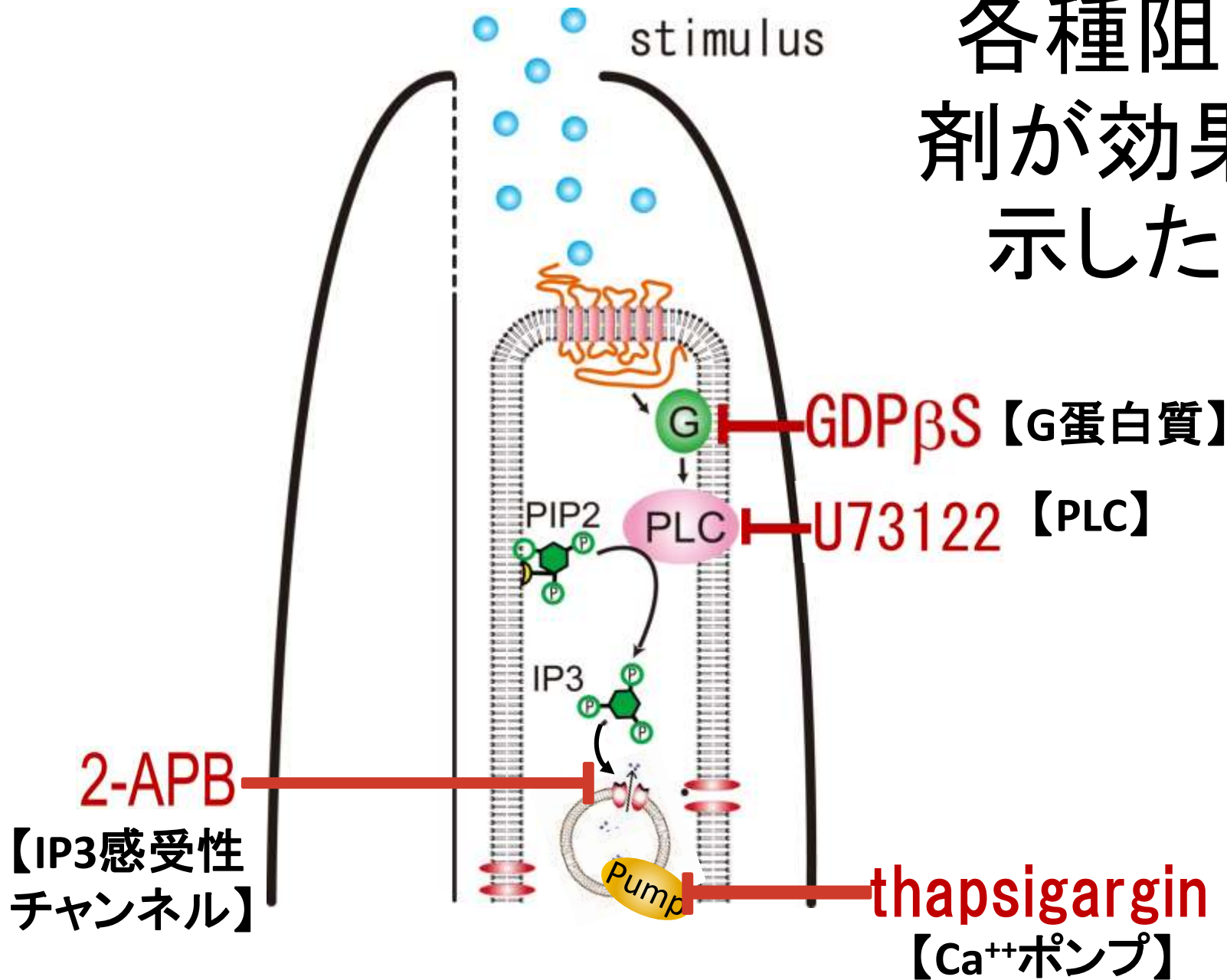
relative response

$$= \frac{\text{impulse frequency after}}{\text{impulse frequency before}}$$

阻害剤の効果を見た実験の例

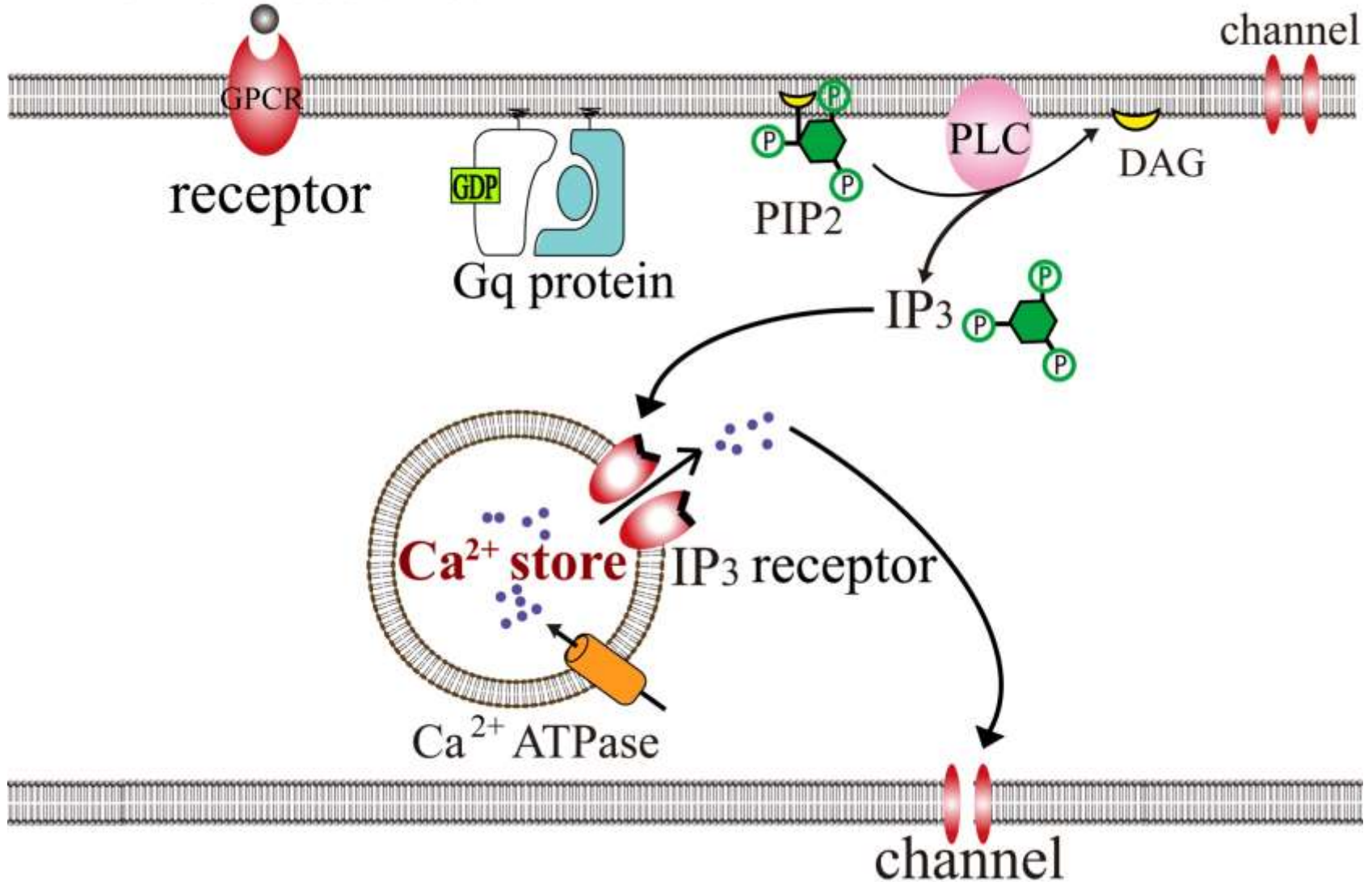


各種阻害
剤が効果を
示した。



A possible bitter taste signal transduction

bitter substance



研究室で取り組み中の課題

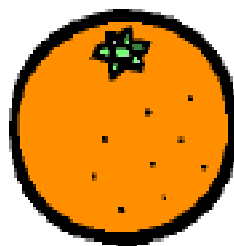
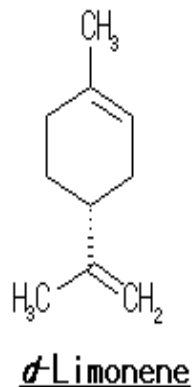
- 脊椎動物嗅覚神経の動作機構
- 昆虫味覚神経の動作機構
- **昆虫の食欲調節機構**
- その他

昆虫の食欲調節機構

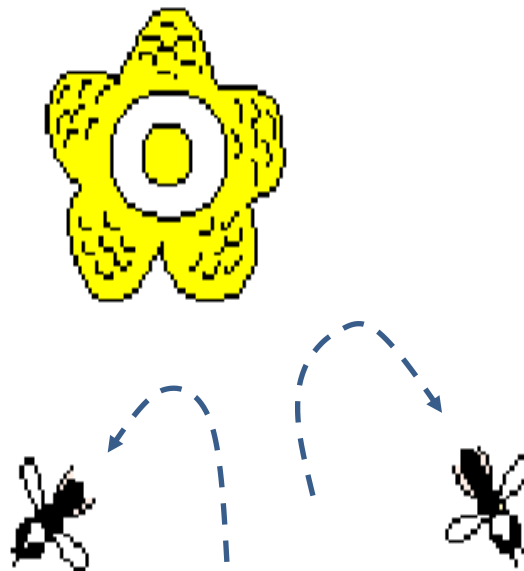
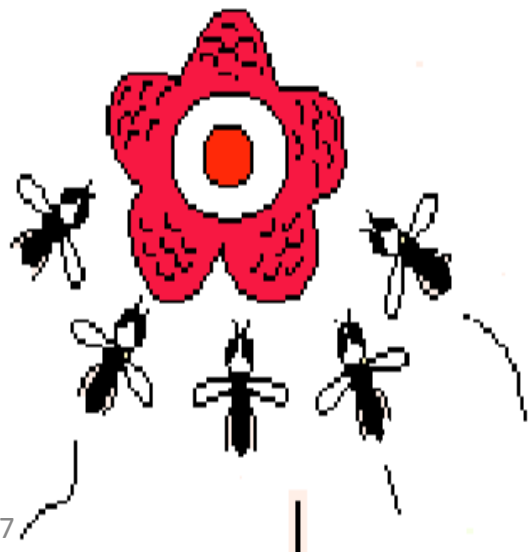
- 嗅覚味覚連合学習のモデル系確立
- 長期記憶に関わる遺伝子の探索
- AMPKの脳内機能(食欲調節)の研究

出発点：野外観察 ハエは訪花昆虫（蜜を好む）

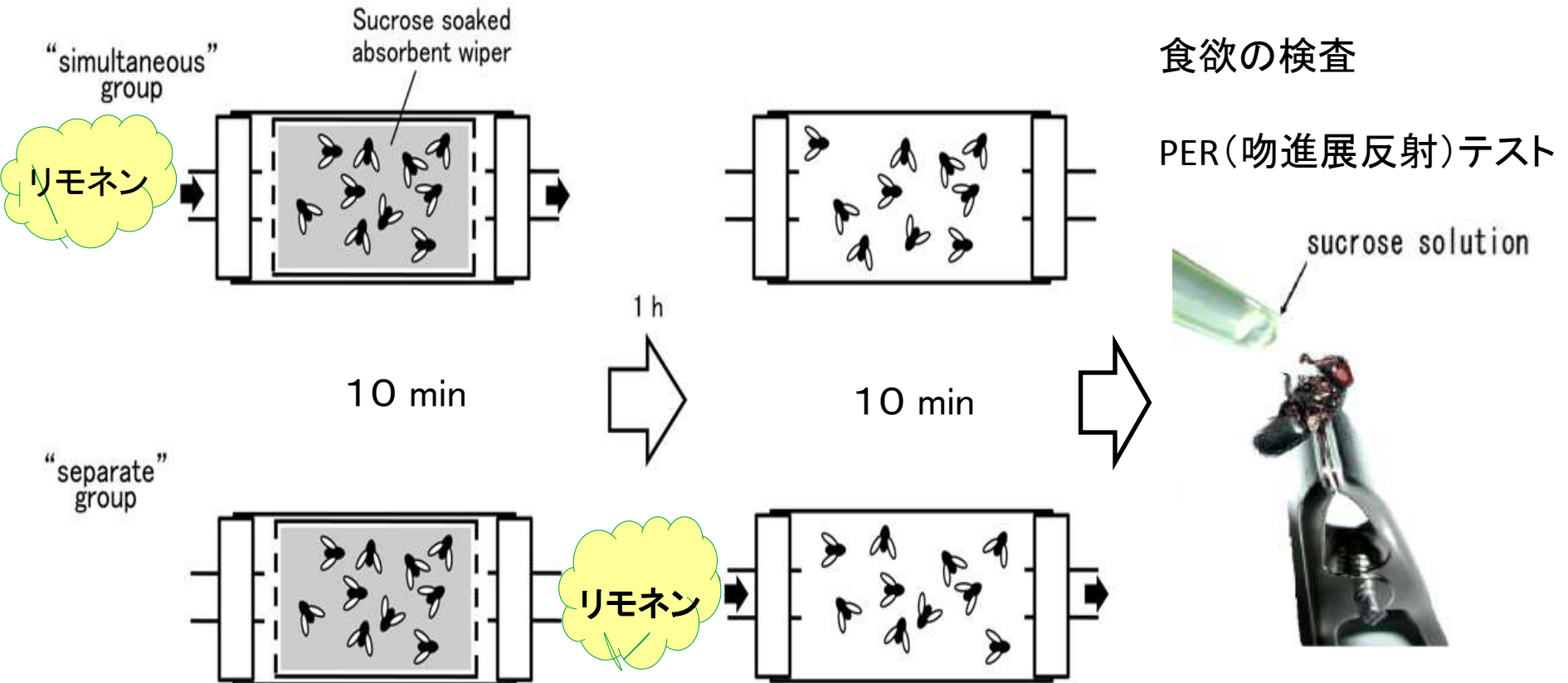
だが柑橘類の花は避ける。



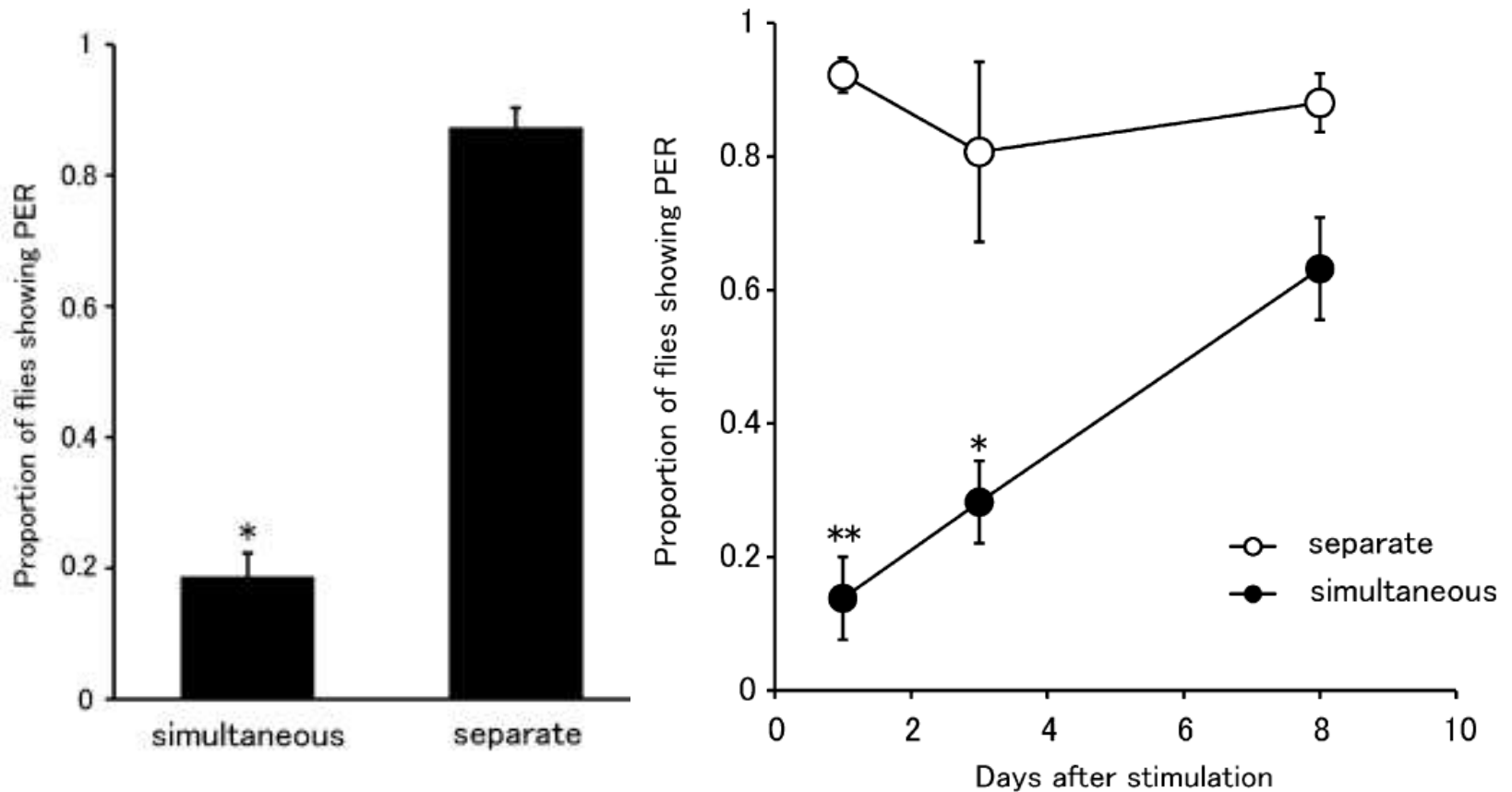
忌避物質
d-リモネン
が理由？



クロキンバエの味覚嗅覚連合学習

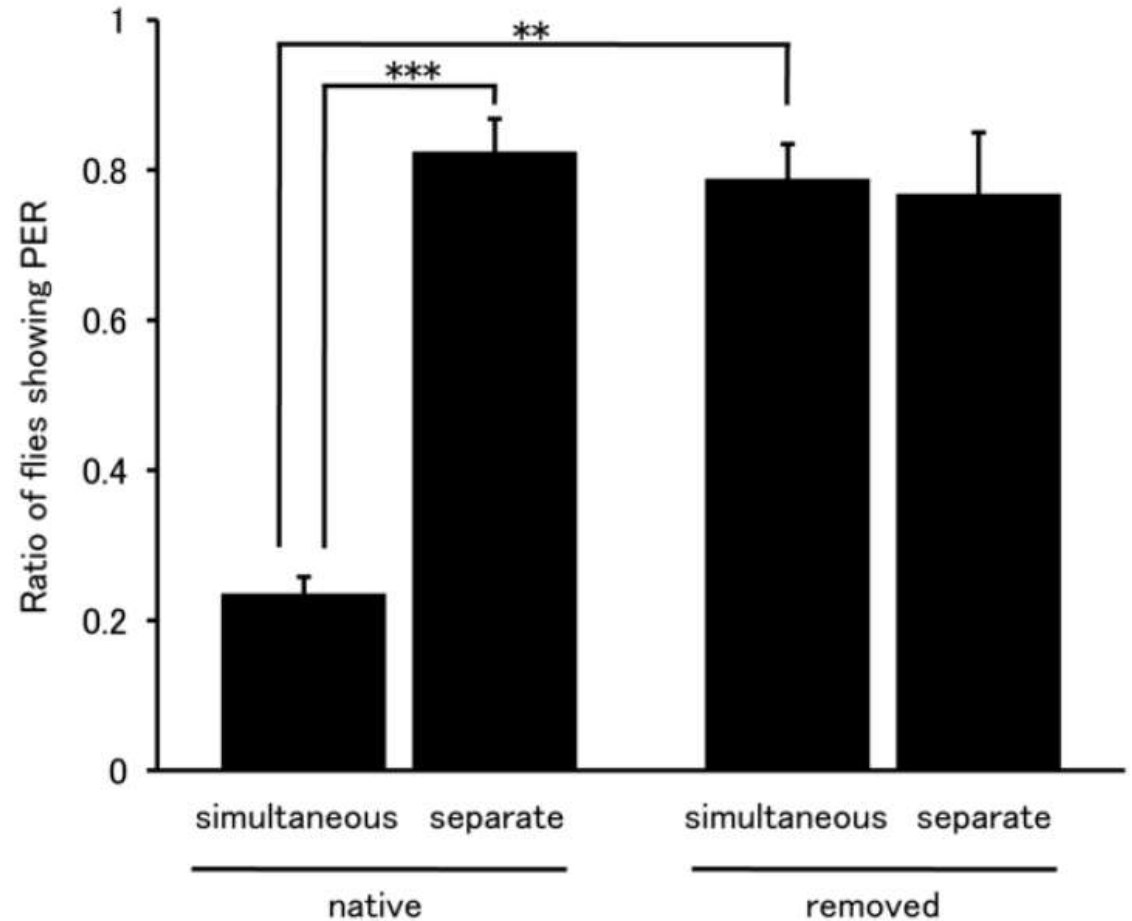


リモネン臭とショ糖味を連合学習すると、ショ糖への食欲が減退し、日が経つにつれ回復した。



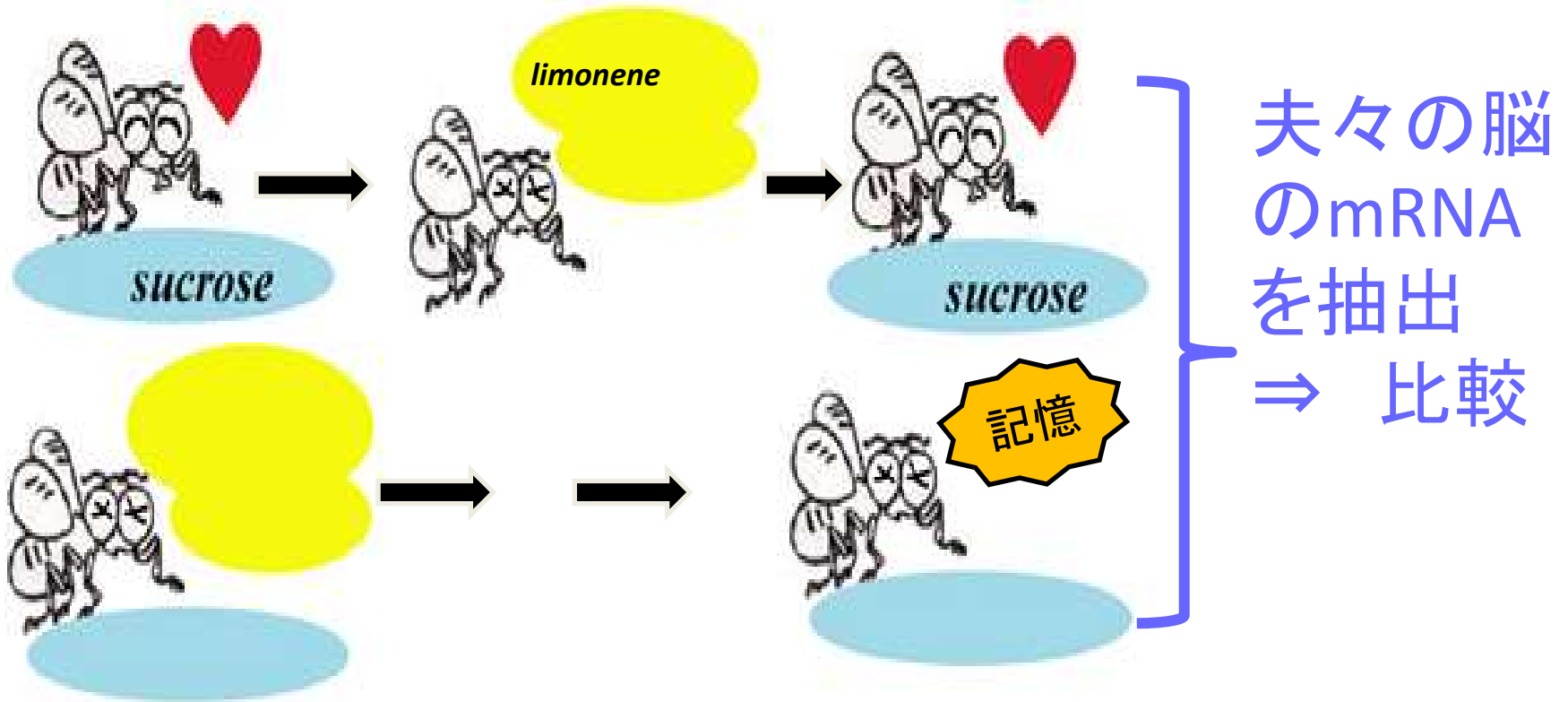
連合学習が起きて、時間とともに忘却される課程を観察できる。

嗅覚器 (maxillary palps) 除去の影響



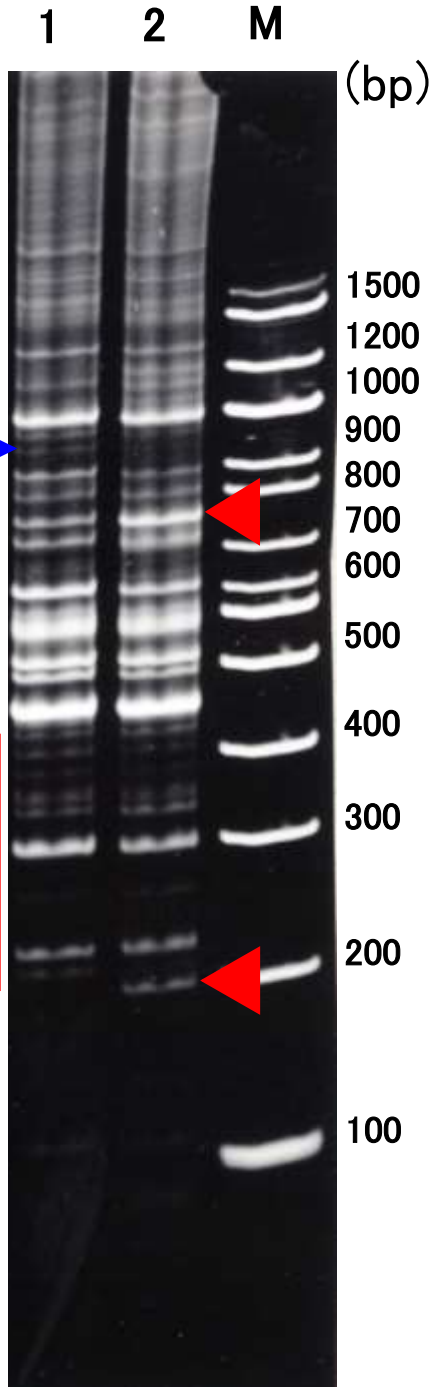
この学習には嗅覚が必須
確かに味覚嗅覚連合学習だった。

「長期記憶成立」に伴い発現する遺伝子の探索



mRNAを調べて
関与蛋白質を調べる：**DNA → mRNA → 蛋白質**

<発現遺伝子の比較>



M: 100 bp DNA Ladder
1: 对照群
2: 条件付け群

◀ : 条件付けで発現
▶ : 条件付けで発現停止

約3000本のバンドを比較



サンプル間でシグナル強度の異なる38本のバンドを検出



27本の塩基配列を決定



データベースとの比較

活性化した遺伝子の一つは、 AMP activated-protein kinase (AMPK)

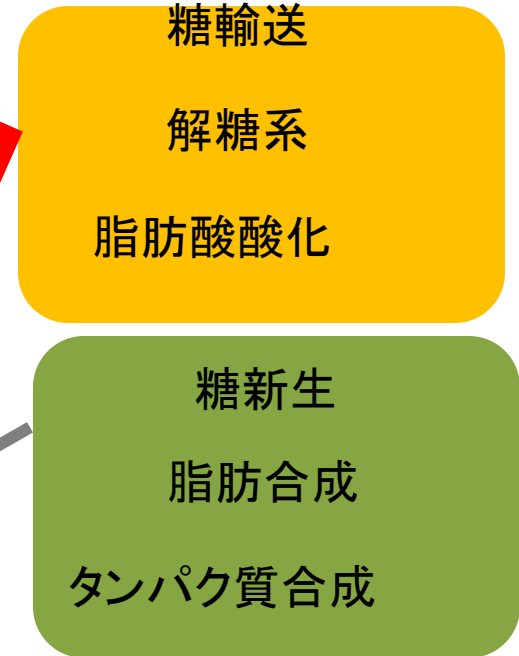
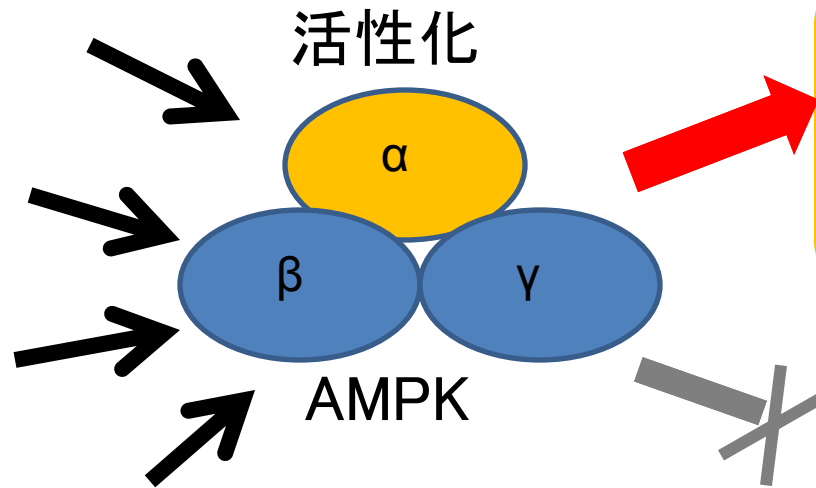
細胞内の栄養状態を反映し、様々な代謝調節を行う蛋白質
リン酸化酵素

虚血・低酸素

筋肉運動

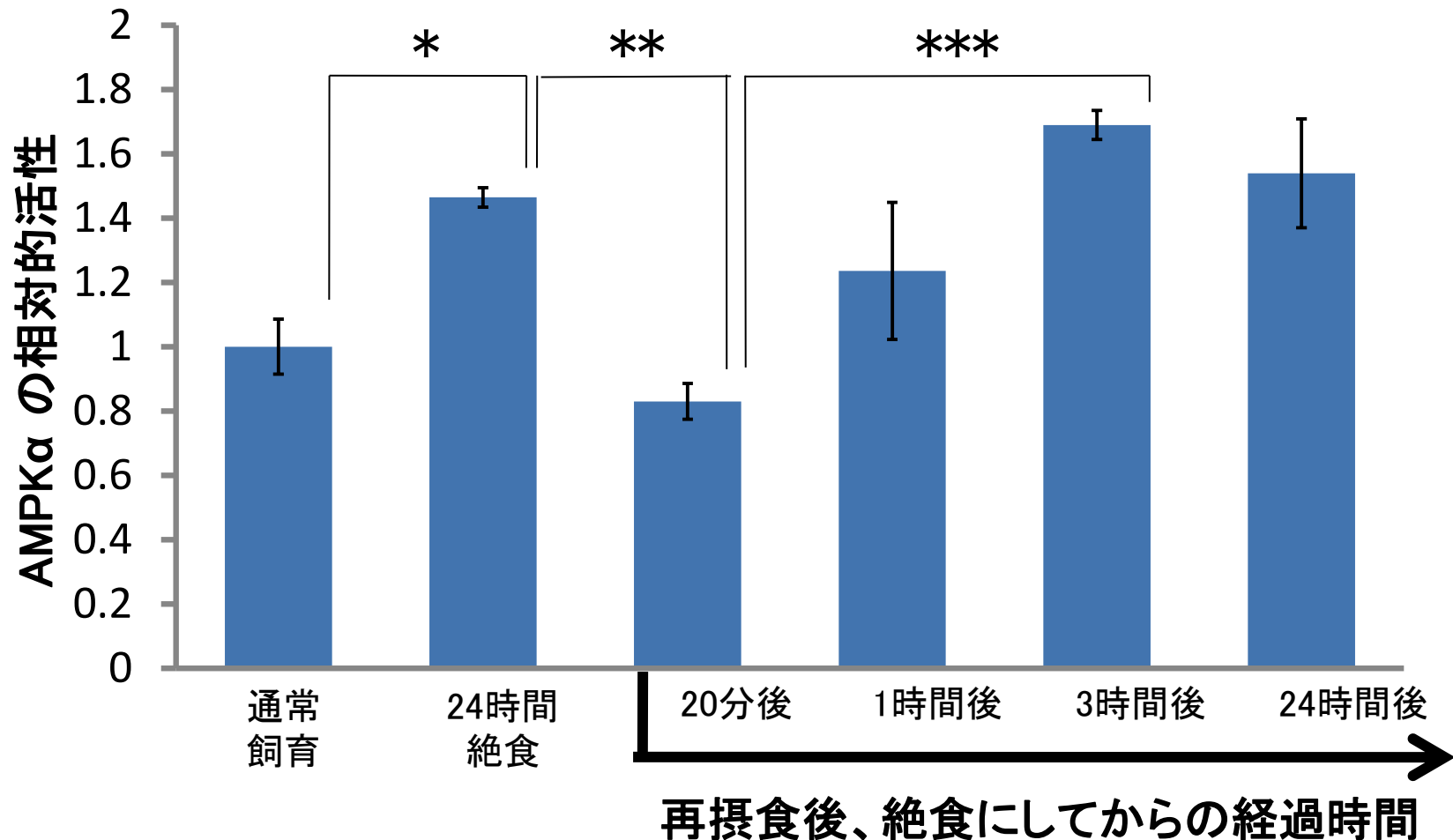
レプチン

アディポネクチン



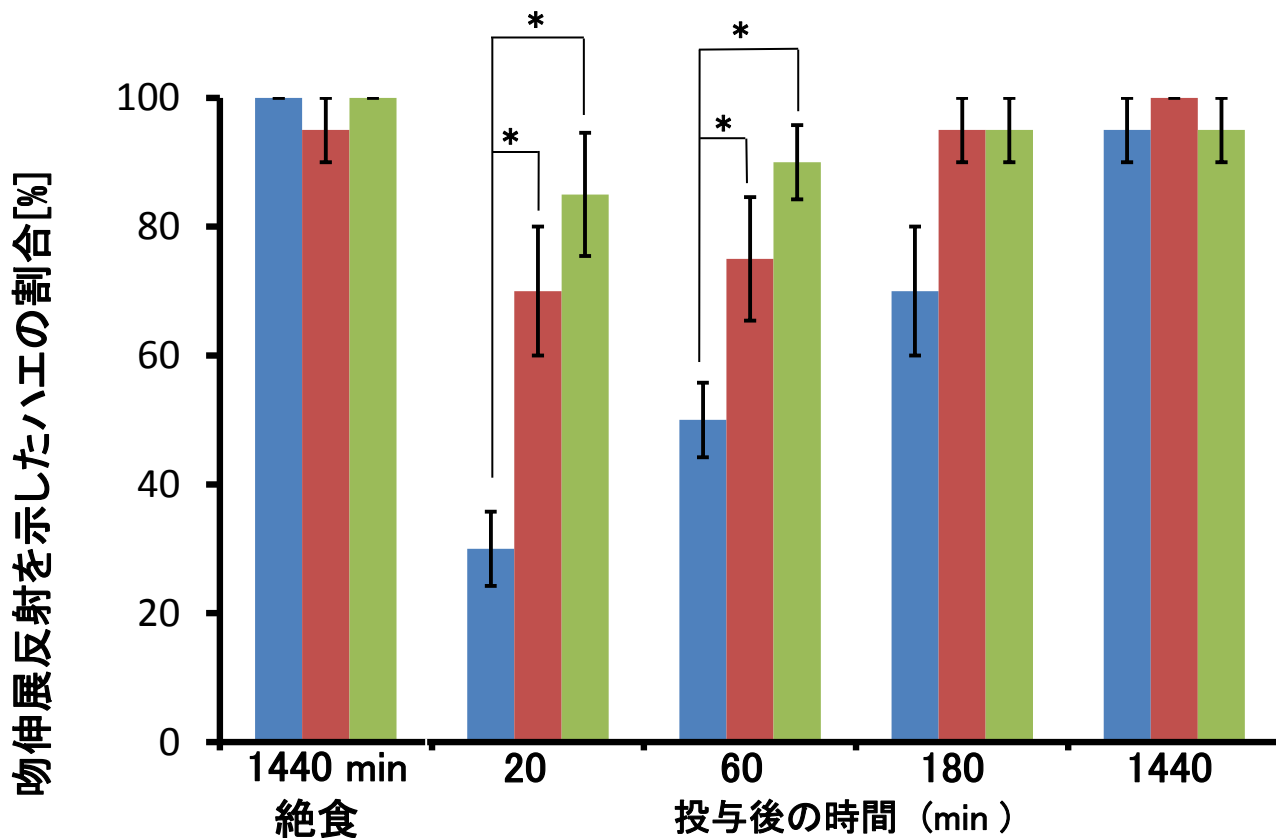
様々な刺激を受けα サブユニットが
リン酸化により活性化

再摂食後活性の変化



AMPK活性は、栄養状態を反映

AMPK活性化剤AICAR投与による食欲変化

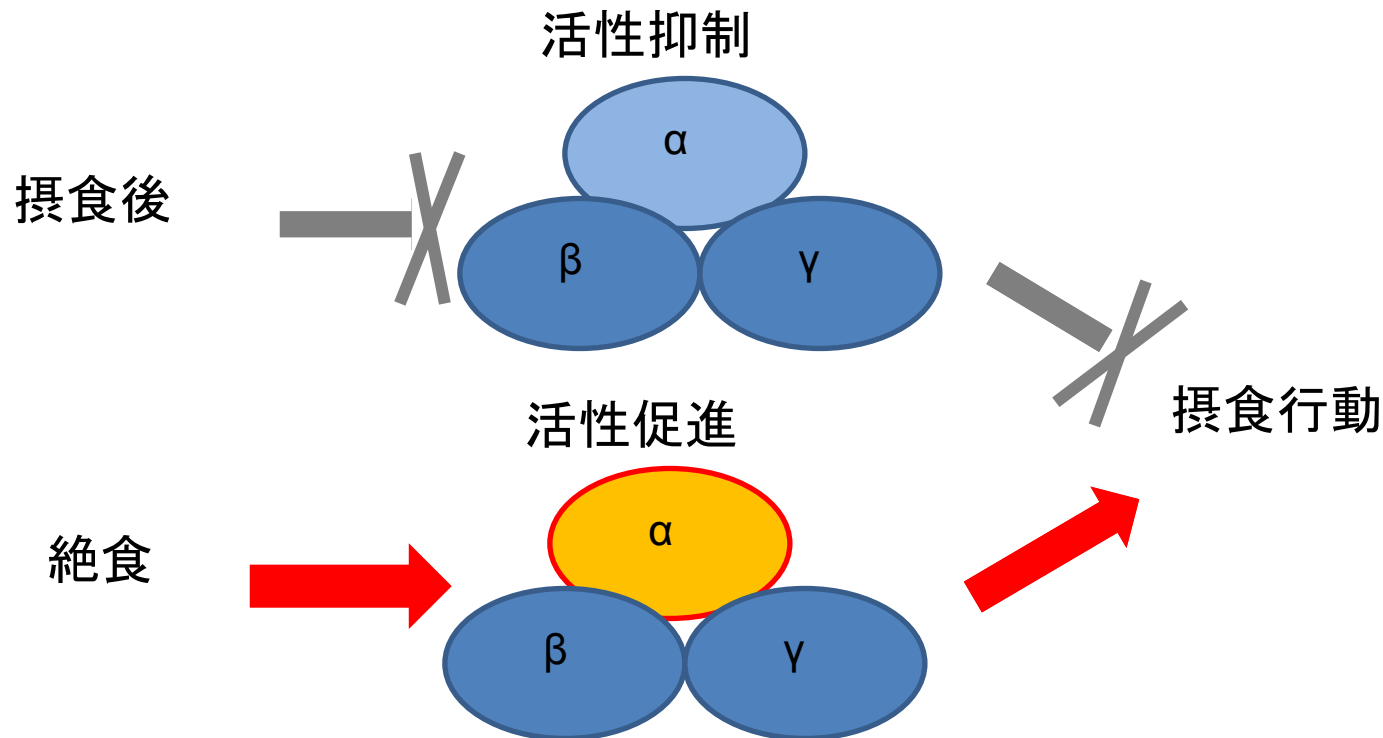


AMPK (AMP activated protein kinase) はATP消費が進むと活性化される進化上よく保存された酵素。脊椎動物では中枢神経で食欲の制御に関与することが報告されていた。同様の機能が昆虫でも機能していることが示唆された。食欲制御に関するモデル生物として昆虫が研究に役立つ可能性が出てきた。

【現状での結論】

この昆虫においても、

- ・栄養状態を反映して脳内のAMPK活性が変化する。
- ・AMPK活性の変化にともない食欲が変化する。



同様の結論がネズミの実験で報告されている (Minokoshi et al. 2004)

遺伝子に関して、今後の展開

- 発現量の変化する(新規)遺伝子が多数存在
⇒ それぞれの機能を明らかに
- 味覚と他の感覚、嗅覚と他の感覚の連合学習
についての解析
- 各蛋白が中枢神経系の回路としてどのように
機能？ (分子と回路との接点・・・)
- 食欲のデータは実験時間帯に左右される(日
周性)。今回検出した遺伝子と体内時計の関
係？

ご清聴ありがとうございました。