1PA081

キメラレセプターを用いたサルモネラ菌化学感覚レセプター
Tcpのリガンド認識に関与する領域の解析

○岩間智徳、山縣修造、+川岸郁朗（岐阜大・農、+名古屋大・生命理学）

金属イオンが様々な生体反応において重要な役割を持つことはよく知られている。サルモネラ菌は、面白いことにクエン酸に誘引応答をした後、金属イオンを加えるとさらに誘引応答を示す。これらの応答には共に細胞膜に存在するレセプター Tcp が関与する。同じタンパク質がどのようにしてクエン酸と金属イオン・クエン酸複合体を別々の誘引物質として識別しているのだろうか。すでに我々は、クエン酸が負電荷を持つことから、Tcp の正電荷を持つアミノ酸残基がクエン酸の特異的認識に関与すると予想し、幾つかの残基を一つずつシステインに置換した（昨年度の年会で報告）。調べた残基の中にはクエン酸認識に関わるものが見出されたが、クエン酸と金属イオン・クエン酸複合体の識別に関わる残基はなかった。したがって、リガンド認識部位を同定するためにはもっと系統的な方法が必要である。そこで、今回は、相同なレセプターとのキメラを作って調べた。手始めに、ペリプラズム側と2つの膜貫通領域はTcp に由来する配列をもち、細胞質側は Tcp と高い相同性のある大腸菌アスパラギン酸レセプター Tar やセリンレセプター Tsr 由来の配列を持つキメラレセプター Tcar-N₁Tcsr-N を作成した。レセプターを欠損した大腸菌株にそれらを発現させると、どちらを持つ菌もクエン酸に対して誘引応答を示したが、アスパラギン酸やセリンに対しては何も応答を示さなかった。また、クエン酸に適応した後に更にマグネシウムを与えると、どちらも誘引応答を示した。すなわち、マグネシウム・クエン酸複合体の認識は細胞質側の配列によらない。しかし、Tcp がマグネシウム・クエン酸複合体を認識しているのではなく、マグネシウムがクエン酸に対する適応を阻害するためと考えても説明はつく。適応はレセプターのメチル化によって起こるので、Tcp のメチル化レベルをウェスタンブロッティングで調べた。その結果、Tcp にクエン酸とマグネシウムを同時に与えた場合の方がクエン酸のみの場合よりもメチル化が進行していた。Tcar-N₁Tcsr-N においても同じような結果が得られた。以上の結果から、Tcp における金属イオン・クエン酸複合体の認識はこのレセプター自体に本来備わっている特性であり、少なくともペリプラズム側や膜貫通領域がそれに関与すると考えられる。現在、さらに範囲を狭めるべく新たなキメラを作成中である。

T. Iwama, S. Yamagata, I. Kawagishi : The ligand specificity of the chimeras between the citrate chemoreceptor and the aspartate or serine chemoreceptor of enteric bacteria.

1PA083

鋤鼻器感覚細胞の尿中フェロモンに対する選択的な応答

○稲村耕平、柏柳誠

（北海道大学大学院薬学研究所）

多くの動物は、嗅覚器で一般的な匂いを受容し、鋤鼻器でフェロモンを受容している。行動学的実験により、哺乳類の尿中にフェロモンが含まれていることが示唆されている。そこで、哺乳動物のフェロモン受容・識別機構を明らかにするために、ラット鋤鼻器感覚上皮のスライスを作成して、細胞レベルにおけるフェロモン受容・識別機構についてパッチクランプ法を用いて検討した。

Wistar 系メスラットの単一鋤鼻器感覚細胞に、Wistar 系オスとメス、Donryu 系オスから採取した3種類の尿を与えたところ、1種類の尿のみに特異的に応答した。このようにラット鋤鼻器感覚細胞が尿に対して高い選択性を示すことは、個々の細胞が異なる受容体を有することを示唆する。嗅細胞の場合は、個々の細胞は多種類の匂い物質に応答することが報告されているので、鋤鼻器感覚細胞は嗅細胞よりもはるかに特異性の高い受容機構が発達していることになる。フェロモンは、生理的機能に直接的に影響を与えるので、その情報は厳密に識別されることが必要であるからと思われる。

尿に対する応答の発生機構を調べるため、ホールセルモードで測定した。負電位に感覚細胞をクランプしておくと、Wistar 系オスの尿投与により内向き電流が引き起こされた。SD 系オスラットおよびオスハムスターの尿でも同様に、内向き電流応答が引き起こされた。Wistar 系オス、SD 系オスラットおよびオスハムスターの尿に対する応答の逆転電位の平均値はそれぞれ -10 mV 前後であった。また、尿に対する応答は、Na⁺/Ca²⁺除去外液中ではほとんど抑制されたが、Cl⁻除去外液中では全く変化がみられなかった。このことから、尿によって引き起こされる電流応答は陽イオン選択的であることが示唆された。

次に、種々の尿に対して応答した感覚細胞の上皮内での分布を調べた。その結果、Wistar 系オス尿に反応した細胞は感覚上皮の上半部に存在し、Donryu 系オスおよび Wistar 系メスの尿に反応した細胞は下半部に存在していた。このような尿に対して応答する細胞の分布パターンは、感覚上皮での G 蛋白質の発現分布と鋤鼻器特異的 G 蛋白質共役型受容体ファミリーの発現パターンと類似していた。これらのことから、感覚細胞は2種類に分類されることおよびフェロモンは G 蛋白質共役型受容体を介して受容される可能性が示唆された。

K. Inamura, M. Kashiwayanagi : Selective responses to urinary pheromones in vomeronasal sensory neurons.

1PA082

レセプターの組み合わせによるニオイ情報のコーディング

Bettina Malnic¹、廣野順三²、○佐藤孝明²、Linda Buck¹

（1 Harvard Medical School、2 電子技術総合研究所大阪ライフエレクトロニクス研究センター）

嗅覚は、数万〜数十万種といわれるニオイを識別することが可能である。ゲツ菌類などでは、ニオイ分子に対するレセプターは、約1000種類存在すると推定されており、個々のレセプターのニオイ応答性が次第に明らかになってきている。我々は、これまで、個々の嗅細胞のニオイ応答性を調べ、マウスの嗅細胞は濃度依存的にニオイ分子の構造を詳細に識別出来ることを明らかにしてきた。そして、今回、ニオイ分子応答特異性を特定した嗅細胞からニオイレセプターの遺伝子を single-cell RT-PCR によって増幅/同定し、ニオイ応答性とレセプターのアミノ酸配列の類似性を比較した。その結果、嗅覚におけるニオイ識別は、ニオイレセプターのユニークな組み合わせに基づいていることを初めてデータで裏付けることが出来た。

ニオイ刺激は、n-脂肪酸アルコール（炭素数：4〜9）、n-脂肪酸（炭素数：4〜9）、n-臭化脂肪酸（炭素数：4〜6、8）、n-脂肪酸ジカルボン酸（炭素数：6〜9）の合計20種の分子をそれぞれ生理食塩水に溶かし、100 nM〜100 μM までの10倍希釈溶液として調整した。これらのニオイ刺激を tissue-printing 法により得られたマウス単離嗅細胞に4秒間投与し、各ニオイ物質に対する濃度と応答の有無を、fura-2を用いた細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇を指標にして調べた。応答が得られた嗅細胞は、個別に採取し、RT-PCRによりニオイレセプターのTM3-TM6あるいはTM6-TM7を増幅し、アミノ酸配列を決定した。この結果、TM3-TM6について19-100%のアミノ酸相同性を示す14個のニオイレセプターが得られた。その内11個は多様性を示しながらも、TM4とTM5の特定位置にアスパラギン酸を持つ共通点を示した。これらのレセプターは、複数のニオイ分子種に反応し、一致するアミノ酸配列が22-50%の場合でも同じニオイ分子種に反応することが出来た。また、個々のニオイ分子種は、複数種のニオイレセプターを活性化出来たが、活性化されるニオイレセプターの組み合わせはオーバーラップを持ちながらニオイ分子種によって異なっていた。これらの結果は、嗅覚におけるニオイ識別が、ニオイレセプターのユニークな組み合わせに基づいていることを示している。

B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, Linda Buck: Combinatorial receptor codes for odors.

1PA084

カメ嗅細胞におけるIP₃とcADP-riboseが引き起こす内向き電流応答

関本浩介、○柏柳誠（北大院薬）

嗅細胞に高濃度のcAMPを投与し、cAMP依存性経路を完全に遮断した条件下でも、匂い応答が発現することから、cAMPに依存しない経路が匂い応答の発現に大きく寄与している(J. Gen. Physiol., 1994)。経路の一つの候補は、IP₃をセカンドメッセンジャーとする経路だが、IP₃を細胞内に投与しても応答の記録に成功しない研究者が多く、懐疑的に考えられている。また、cADP-ribose (cADPR)は、最近、セカンドメッセンジャーとしていくつかの系で働くことが示されている。しかしながら、嗅細胞でcADPRがどのような働きをするかはまったく不明である。

我々は、各研究者間で応答性に差が見られるのは、用いる嗅細胞のプレパレーションの方法が異なるためであると考えた。そこで、嗅細胞の生理活性を損なわないように無酵素下で嗅細胞を遊離した。その結果、カメ嗅細胞から安定したIP₃に対する応答を記録することに成功した。細胞内投与したIP₃は、濃度依存的に内向き電流応答を引き起こした。また、cADPRを投与したところ、細胞内のCa濃度の増加を伴い、濃度依存的な内向き電流が生じた。

K. Sekimoto, M. Kashiwayanagi : Inward currents induced by dialysis of IP₃ and cADPR in turtle olfactory neurons