嗅細胞の環状ヌクレオチド感受性イオンチャンネル

モネル化学感覚センター 中 村 整

Using ultramicro patch electrodes, we have shown that olfactory receptor cilia contain a cyclic nucleotide-gated ion channel which has low selectivity between monovalent cations and high sensitivity to divalent cations. Biochemical evidence of an odorant-activated adenylate cyclase supports the idea that this channel mediates olfactory transduction.

olfactory receptor / transduction / ultra micro patch electrode / cAMP cascade / cyclic nucleotide gated ion channel / ion permeability

最初に感覚細胞の第2メッセンジャーが環状ヌクレオチド(cN)ではないかと考えたのは視覚の研究者 W. H. Miller であった。彼はホルモン受容の仕事をしていた Bitsensky と共に、感覚刺激はホルモンの様に作用するという仮定で数種の感覚細胞の刺激によるアデニル酸シクラーゼ(Aシクラーゼ)の活性変化を検討した。その結果脊椎動物の視細胞では光によりcAMP(cA:実はcGMP < cG > であった。)が減少することを見出した¹⁾が、嗅細胞の結果は否定的であった(Miller 私信)。その後約15年を経てcGが視細胞の第2メッセンジャーであることが確認されたが^{2),3),4),5),8)}、時期を合わせた様に嗅細胞のcAが再び注目されるようになった^{6),7),8),9)}。その中で我々は嗅細胞の繊毛にcN感受性イオンチャンネルを見出した^{10),11)}。以下にこのチャンネルと、その嗅覚情報変換における役割について述べてみたい。

1. 嗅覚情報変換機構に対する様々な説

脊椎動物の嗅細胞(図1)はその繊毛において分子が接触すると脱分極性の細胞電位の変化を起こす。続いて細胞の一部である嗅神経で電位感受性チャンネルにより活動電位のパルスが発生する^{7),8),9),12),13)}。本稿では以下、最初の電位変化のみを受容器電位として記述する。受容器電位は、異なった説もあるが¹⁴⁾、膜コンダクタンス増大によることが一般に認められるようになった^{15),16),17),30)}。

この膜コンダクタンスの調節についてはいくつかの機構が考えられている。まずにおい分子の結合により

図1. 嗅上皮の模式図。嗅細胞(R)は支持細胞(S)に囲まれ、その繊毛(C)は粘液(M)中にあり、嗅神経(N)も嗅細胞の一部が延びたものである。

直接開くチャンネルを示唆する報告がある^{18),19)}。これはニコチン性アセチルコリン受容器等に例があり信号増幅はしないが伝達速度で有利と考えられる。一方におい受容とコンダクタンス変化の間に第2メッセンジャーを置く説がある。その候補であるcA⁶⁾⁻¹¹⁾や、イノシトール代謝回転²⁰⁾などは広く神経細胞などの機能調節に作用していることが知られている。

嗅細胞がAシクラーゼに富むことは最初の視細胞の報告と前後して報告されている²¹⁾。嗅上皮(図1)をはさんで測られるEOG(嗅電図:多数の嗅細胞受容器電位の細胞外記録に相当する)がcAやその誘導体を嗅上皮に与えた時に変化することが報告された^{22),23)}。したがってcAが受容器電位の発生に何らかの関与をしていることは予想できた。最近 Pace ら²⁴⁾は分離した嗅繊毛を用い、においによるAシクラーゼの活性化を見出し、信号伝達酵素群に普遍的なGTP結合蛋白がその反応に組込まれていることを示

A Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channel in Olfactory Receptor Cell

Tadashi NAKAMURA

Monell Chemical Senses Center

した。他のグループからも同様の結果が報告されたが^{25), 26)}, Sklar ら²⁵⁾はAシクラーゼの活性化能の大変低いにおい物質のあることを見出した。これはcAが第2メッセンジャーでないことを示しているかと思われた⁷⁾。しかし同一の、多数のにおい物質によるEOGとAシクラーゼ活性化との間には大変良い相関がある²⁷⁾。この現象は、少数の細胞があるにおい物質に強く反応しても、生化学的測定やEOGには弱い反応としてしかあらわれないためではないかと考えられる。すなわちSklarらの結果はcA説に対する反証とはならない。

cAが第2メッセンジャーとすれば、膜コンダクタンスを制御する機構は、視細胞のようにcN感受性のチャンネルによるのか、 β -アドレナリンレセプターのように蛋白質リン酸化酵素の活性化=チャンネルのリン酸化によるのかが問題であった^{6), 7), 9), 11)}。

2. cN感受性チャンネル

我々¹⁰⁾は開口部が従来の1/10以下の超微小パッチ電極を用いて嗅繊毛にギガシールを得ることができた。これをinside-outの切出し膜パッチとし膜コンダクタンスをI-V(電流-電圧)カーブにより観察しながらcAを膜の細胞質側に与えると、図2Aのように可逆的な膜コンダクタンス増大が記録された。このcAの作用はATPを必要とせず、cAは膜蛋白に直接結合してチャンネル孔を開くことが示唆された。cAの $K_{1/2}$ 値は約3 μ Mであった。さらにcAだけでなくcGやcC(cyclic Cytidine Monophosphate)にも反応した。cCは $K_{1/2}$ 値が高く生体内で作用している可能性は低いが、cGは $K_{1/2}$ 値がcAよりやや低く、cGのにおいによる変化が見出されていない²⁶⁾。現在、その機能は謎である。鈴木²⁸⁾やTrotierら²⁹⁾は嗅細胞にホールセルパッチクランプ法を用い、cNを細胞内に与え同様の膜コンダクタンスの増大を観察している。従ってこのコンダクタンスは無傷の細胞にも存在する。ただし2', 3'-cNや5'-NMPは作用を示さずこのコンダクタンスは3', 5'-cNに特異的ということが出来る^{10), 28)}。

またこのコンダクタンスはイオンに対し独特な挙動を示した。まず切出し膜パッチを生体内に似たイオン環境に置いたとき反転電位は0 mVに近く、Na/Kの選択性が低いことが示された¹⁰⁾。これはにおい応答の反転電位のデータ^{15), 16), 30)}と同様である。さらに切出し膜パッチで得られた、他のアルカリ金属一価イオンの透過性のNaに対する比は0.8~1.2で低い選択性を示し³¹⁾、におい応答で得られた結果³²⁾と類似していた。

図2. A, 生理的塩類溶液中で切出し膜パッチに1 nMcAを与える前(1), 与えた時(2), 洗い流した時(3)のI-V曲線¹⁰⁾. B, 2価イオンOの溶液中で200nMcAにより誘導された単一チャンネルの開閉の記録。保持電位は60mV。

これらの結果はこのコンダクタンスが受容器電位を担っていることを強く指示している。また溶液中の2価イオンはこのコンダクタンスを著しく低下させている^{10), 31)}。そこで2価イオンを0とし100nM程度のcAを与えると単一チャンネルの開閉の様子が記録できた³¹⁾(図2B)。予備的な集計ではチャンネルの開口時間は一つの指数関数分布(時定数約24msec)を示し、平均単位コンダクタンスは約30psであった。同じ程度のチャンネル開閉頻度が50nMcGや5 μ McCで観察され、I-Vの関係の観察で得た $K_{1/2}$ 値の関係と適合した。したがって先に述べたマクロなコンダクタンス変化はこのチャンネルに由来することが確かである。

以上のように嗅覚のチャンネルはcNにより直接開かれ、その一価イオン、二価イオンに対する挙動や単位コンダクタンスの値などは視覚のチャンネルによく似ている^{11), 33)}。特にイオンに対する挙動は多くのCaチャンネルで観察される特色で³⁷⁾、2つのcN感受性チャンネルとCaチャンネルの関係を暗示している。しかし視覚のチャンネルはcGに特異的なのに対し、嗅覚のチャンネルはcAだけでなく他の3', 5'-cNに反応する。またcAに対する親和性は非常に高く、そのことと関連があると思われるチャンネルの開口時間

はより長い。これらのことから2つのチャンネル蛋白はチャンネル孔部分が似ており、cN受容部分は多少異っていると考えられる。分子構造が解明されれば興味深い結果が得られそうである。

3. 情報変換機構の解明を目指して

以上のcN感受性チャンネルとcA酵素カスケードとを合わせると、情報変換機構のモデルを仮定できる(図3)。このモデルが承認されるには、さらにcAとにおい刺激を用いた電気生理学的研究が要求されるだろう。しかし問題は嗅纖毛上にあるとされるにおい

図3. 嗅覚情報変換の模式図。受容分子(R)ににおい分子(O)が接するとGTP結合蛋白(G)を介してAシクラーゼ(AC)が活性化され、増加したcAはチャンネル蛋白(ch)に結合してチャンネルが開き、イオンが流入して脱分極が起きる。

受容素子が同定されていないことである。におい分子との結合能を指標とする試みが行われてきたが、あるいは受容素子は蛋白ではなく脂質膜ではないかとも言われた^{8),14)}。培養色素細胞がにおいによりcAを産生するが³⁵⁾、この場合受容蛋白を持つのか、受容蛋白がなくともcAカスケードが活性化されるのか興味深い。また水溶性のにおい物質結合蛋白が同定された³⁶⁾が受容素子との関わりが注目される。cA説が正しいとすればGTP結合蛋白の活性化能や、ロドプシン等の他の受容蛋白との分子構造の比較などが受容蛋白を探す道具になるかもしれない。一方、原嗅^{7),8),9),12)}というものが受容素子の段階でどういう状態なのか、非常に多数の異なる受容蛋白があって、もしかすると抗体の多様性をうみだす遺伝子発現の仕組みが作動しているのだろうか⁷⁾。情報変換の機構も異なったものが平行して作動することにより、多様性を拡大しているかもしれない。

現在、嗅覚の分子レベルの研究は急速に進み出したところだと言ってよいだろう。この数年間でさらにどう進展するか期待したい。

文 献

- 1) Bitensky, M. W., Gorman, R. E., Miller, W. H. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68**, 561-562.
- 2) 特集視覚初期過程の分子機構(1987) 生体の科学, **38**, 252-304.
- 3) 前田章夫(1986) 視覚, 化学同人, 京都.
- 4) Pugh E. N. Jr., Cobbs, W. H. (1986) *Vision Res.*, **26**, 1613-1643.
- 5) Stryer, L. (1986) *Ann. Rev. Neurosci.*, **9**, 87-119.
- 6) Anholt, R. R. H. (1987) *Tren. Biol. Sci.*, **12**, 58-62.
- 7) Lancet, D., Pace, U. (1987) *Tren. Biol. Sci.*, **12**, 63-66.
- 8) 栗原堅三(1986) 化学増刊, **110**, 217-228.
- 9) Lancet, D. (1986) *Ann. Rev. Neurosci.*, **9**, 329-355.
- 10) Nakamura, T., Gold, G. H. (1987) *Nature*, **325**, 442-444.
- 11) Gold, G. H., Nakamura, T. (1987) *Tren. Pharmacol. Sci.*, **8**, 312-316.
- 12) 高木真敬(1976) 化学総説, **14**, 47-82.
- 13) Getchell T. V. (1986) *Physiol. Rev.*, **66**, 772-818.
- 14) Kashiwayanagi, M., Kurihara, K. (1984) *Brain Res.*, **293**, 251-258.
- 15) Suzuki, N. (1977) *Food intake and Chemical Senses* (Katsuki, Y., Sato, M., Takagai, S. F., Oomura, Y. eds.) 13-22, Tokyo Univ. Press, Tokyo.
- 16) Trotier, D., MacLeod, P. (1983) *Brain Res.*, **268**, 225-237.
- 17) Kurahashi, T., Shibuya, T. (1986) *Proc. 20th Jpn. Symp. Taste Smell.*, 33-55.
- 18) Vodyanoy, V., Murphy, R. B. (1983) *Science*, **220**, 717-719.
- 19) Fesenko, E. E., Novoselov, V. I., Pervukin, G. Y., Fesenko, N. K. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **466**, 347-356.
- 20) Huque, T., Bruch, R. C. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 36-34.
- 21) Kurihara, K., Koyama, N. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 30-34.
- 22) Minor, A. V., Sakina, N. L. (1973) *Neurophysiologia*, **5**, 415-422.
- 23) Menerse, A., Dodd, G., Poynder, T. M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 671-677.
- 24) Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., Lancet, D. (1985) *Nature*, **316**, 255-258.
- 25) Sklar, P. B., Anholt, R. R. H., Snyder, S. H. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 15538-15543.
- 26) Shirley, S. G., Robinson, C. J., Dickinson, K., Aujla, R., Dodd, G. H. (1986) *Biochem. J.*, **240**, 605-607.
- 27) Lowe, G., Nakamura, T., Gold, G. H. (1988) *Abstract Book of Achems* **X**, 192.
- 28) Suzuki, N.: *Beidler Symposium on Taste and Smell* (Florida, 1987, April).

- 29) Trotter, D., MacLeod, P. (1987) *Ann. New York Acad. Sci.*, **510**, 677-679.
- 30) Anderson, P. A. V., Hamilton, K. A. (1987) *Neuroscience*, **21**, 167-173.
- 31) Nakamura, T., Gold, G. H. (1988) *Abstract book of Achems X*, 193.
- 32) Kurahashi, T., Shibuya, T. (1987) *Proc. 21th Jpn. Symp. Taste Smell.*, (in press).
- 33) Gold, G. H., Nakamura, T. (1987) *Discuss. Neurosci.*, **4**, 86-90.
- 34) Chen, Z., Pace, U., Ronen, D., Lancet, D. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 1299-1305.
- 35) Lerner, M. R., Reagan, J., Gyorgyi, T., Roby, A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 261-264.
- 36) Bignetti, E., Cavaggioni, A., Pelosi, P., Pessand, K. C., Sorbi, R., Tirindelli, R. (1985) *Euro. J. Biochem.*, **149**, 227-231.
- 37) Hille, B. (1984) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, p. 226-248, Sinauer Assoc. Sunderland.

なかむら ただし

1980年、京大大学院修了。生物物理学専攻。理博。鐘紡ガン研究院を経て84年渡米。イリノイ大・理、エール大・医と移り88年4月よりモネルに所属 (Dr. G. H. Gold 研究室)。興味の内容は神経活動などの分子機構ですが、思いがけない“遍歴”のおかげで電気生理学以外のこともする何でも屋 (または〇〇貧乏?) になってしまいました。

連絡先: Monell Chemical Senses Center, 3500 Market st. Philadelphia, PA 19104, USA

Hnsaku
尾松さん

Insulin induces activation and translocation of protein kinase FA (a multifunctional protein phosphatase activator) in human platelet. Yang, S. -D., Ho, L. -T. and Fung, T. -J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 61-69 (1988)

protein kinase FA (cAMP-and Ca-independent protein kinase) は ATP, Mg-dependent protein phosphatase だけでなく glycogen synthase, nerve growth factor 受容体蛋白, その他いくつかの蛋白をも基質としている。著者らは FA が cytosol のみではなく plasma membrane にも存在することを見出した。human platelet では全 FA 90% は不活性で plasma membrane に, 10% は活性で cytosol に存在した。platelet を insulin に 1 分間 expose すると cytosol の FA 活性は無処理のものの 3 倍に上昇し, plasma membrane の FA 活性は減少した。今回の研究は insulin の signal として FA を考える上で興味深い。

*Yang et al. (1987) *BBRC* **142**, 38-46

(滋賀医大・尾松万里子)