小特集 バイオ表面をみる

生体膜表面における化学識別

ー化学受容膜を例としてー

柏 柳 誠*, 栗 原 堅 三*

Odor-Discrimination in Biomembrane

Makoto KASHIWAYANAGI* and Kenzo KURIHARA*

Key Words : Odor Discrimination, Alternative Transduction Pathway, Non-receptor Mechanism, Olfaction

嗅覚系は、多種多様な刺激物質を幅広い濃度範囲で受容し識別する能力を有している。このような多様なにおいの識別は、受容タンパク質のみならず膜脂質が関与している可能性がある。

1. はじめに

揮発する性質を有するほとんどすべての化学物質は、酸素や窒素などのごく一部の物質を除いてにおい物質として嗅覚系で検知される。嗅覚器におけるにおいの質の違いを識別する能力は大変優れており、分子構造の差はもとより、動物によっては立体異性体をも正確に識別する。におい情報は、鼻腔内を被っている嗅上皮表面に存在する嗅細胞の一部で、受容膜より構成される嗅繊毛と嗅小胞により受容される。受容膜表面で受容されたにおい情報は、受容器電位と呼ばれる電気信号に変換され、さらに神経インパルスに変換されて嗅球を経由して高次中枢の領域に伝えられる。本小論では、中枢における識別に不可欠な末梢の受容部位における識別について述べる。まず、嗅上皮表面におけるにおい識別を考察する上で重要な意味をもつ嗅細胞内における情報伝達機構を紹介する。次に嗅細胞受容膜におけるにおい識別の分子機構を、受容体タンパク質と新しい概念の受容サイトの視点から考察する。

2. 嗅細胞内情報伝達機構

ー化学情報の電気的情報への変換ー

2. 1 セカンドメッセンジャー依存性経路

1972年、栗原と小山は嗅上皮に非常に高いアデニル酸シクラーゼ活性が存在することを見だし、嗅覚受容におけるcAMPの関与の可能性をはじめて指摘した¹⁾。その後、Lancetのグループは、カエルの嗅繊毛標品を用いて、におい物質がこの酵素の活性をGTP依存的に上昇させることを報告した²⁾。また、中村とGoldは、cAMPにより開くチャンネルが嗅繊毛に存在することを見だし³⁾。一方、強いにおいを有するにも関わらず嗅細胞のcAMP濃度を全く増加させないにおい物質も測定した中に4割近く存在することが知られていた。Breerのグループは、これらのにおい物質は、嗅繊毛内のIP₃濃度を増加させると報告した⁴⁾。その後、IP₃によって活性化されるチャンネルが嗅細胞の細胞膜で見つけられ⁵⁾、次のような機構が提唱された。におい物質が受容タンパク質に結合すると、GTP結合タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼ(cAMP合成酵素)あるいはホスホリパーゼ(IP₃合成酵素)が活性化する。その結果、嗅繊毛内のcAMPあるいはIP₃濃度が

* 北海道大学 薬学部 (〒060 北海道札幌市北区北12条西6丁目)
Fac. of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido Univ. (Kita-ku N 12 W 6, Sapporo-shi, Hokkaido 060)

嗅覚細胞内情報伝達経路

図1 嗅覚系における複数の細胞内情報伝達経路

A : cAMP依存性経路 B : IP_3 依存性経路

C : Ca依存性経路 D : 新しい経路

上昇し、嗅繊毛に存在するcAMP依存性もしくは IP_3 依存性陽イオンチャネルが活性化され、受容器電位が発生する(図1)。

また、Breerらの実験では、cAMP濃度を増加させるものは IP_3 濃度を全く変化させなかった。このことから、におい物質の中にはcAMP濃度を増加させるグループと IP_3 濃度を増加させるグループが存在することが示された。ただし、ヒトの官能テストで同じ花香と分類されるゲラニオールとリリアルがそれぞれcAMPと IP_3 を上昇させるなど、においの識別の観点からはこれらのセカンドメッセンジャーによる2つのグループ分けは重要な意味を持たない。

2.2 セカンドメッセンジャー非依存性経路

実際の嗅覚応答を注意深く検討してみると、以上に述べた2つのセカンドメッセンジャーを介する経路だけでは説明できない現象が数多く見られる。例えば、嗅繊毛内におけるcAMPや IP_3 濃度の増大は200ms以内で終了してしまうが、実際のにおい応答は数秒以上続く。われわれは、*in vivo*においてセカンドメッセンジャーを介する経路がどのような役割を果たしているのかを調べた⁶⁾。嗅細胞にフォルスコリンという薬物を与え続けると、嗅細胞内のcAMP経路が脱感作のために一時的に全く働かない状態が作り出される。

図2 新しい経路を介したにおい応答

A : Citralva (cAMP依存性におい物質) に対するカメ嗅覚器の応答

B : フォルスコリン順応時のCitralvaに対する応答

C : フォルスコリン順応時に各種におい物質で引き起こされた新しい経路を介した応答。横軸は、正常リンガー液順応時の各種におい物質に対する応答を1とした。

このような条件下でカメの嗅細胞をcAMP依存性におい物質で刺激したところ、大きなおい応答が測定された(図2)。各種におい物質に対する応答へのcAMP非依存性経路の関与を調べてみると、少なくとも50から80%はこの経路によりにおい応答が引き起こされていることが示された。また、 IP_3 依存性チャンネルの阻害剤であるルテニウムレッドを作用させても、cAMP非依存性におい応答は抑制されなかった。以上の結果は、先に述べたセカンドメッセンジャーを介する経路とは無関係の新しい経路が、*in vivo*におけるにおい応答の発現に大きく寄与していることを示している。現在のところ、どのような機構で電位変化が生ずるのかは明らかではないが、一つの可能性としてにおい物質が受容サイトに吸着すると界面の荷電密度が変化して、界面電位変化が生ずることが考えられる。また、このような情報伝達経路が重要であることから、以下に述べるようににおいの識別を考慮する上で、古典的な受容体タンパク質だけではなく、新しい形においの受容サイトを考える必要があることが示唆された。

3. におい物質に対するリセプター

嗅受容膜におけるにおい識別機構を考える上で、におい物質に対するリセプターを特定してその性質を解明することが重要である。におい物質のリ

セプターの1つとしては、特定のおい物質が結合する受容体タンパク質が考えられる。そのため、におい物質に対する受容体タンパク質を単離・同定しようとする試みは古くからなされてきたが、受容体精製に必要な嗅覚組織を大量に得ることは困難であることから大きな進歩は見られなかった。例えば、Fesenkoらはショウノウ香を有するカンファーに対する受容体タンパク質を単離したと報告した⁷⁾が、その受容体タンパク質が他のどのようなにおい物質に対して結合する性質があるか、再構成した場合に受容器電位の発生やセカンドメッセンジャーの産生などの嗅覚受容体としての機能を再現できるかなどについては確かめられていない。一方、最近の分子生物学的手法の発展は、以下に述べるような受容体タンパク質の検索の新しいアプローチを可能にした。

3. 1 GTP結合タンパク質共役型受容体

先に述べたように、におい受容の1つの経路として、GTP結合タンパク質を介するcAMPあるいは IP_3 依存性経路が考えられている。そこで、この経路におけるにおい物質受容体は、いわゆるGTP結合タンパク質共役型受容体と推定された。これまで、多くの系で同定されてきた受容体タンパク質は、7回膜貫通構造を有しており、その膜貫通部分には高いアミノ酸残基保存性がみられる。

1991年BuckとAxelは、上記の受容体タンパク質でみられたアミノ酸残基保存性の高い部分に

図3 嗅組織からクローニングされた7回膜貫通型受容タンパク質 (Buck & Axel, 1991)

対応する縮重プライマーを合成し、PCR法を用いてラット嗅上皮からGTP結合タンパク質と共役するタンパク質を多数クローニングした⁸⁾ (図3)。リガンドの(におい物質?)認識・結合に関与すると考えられる4および5番目の膜貫通部分は多様性を有しており、これらのタンパク質は最低200~300種類が存在すると推定した。彼らは、このようにGTP結合タンパク質共役型タンパク質が多数存在すること、およびこれらの遺伝子が嗅覚器に特異的に発現していることから、におい物質に対する受容体タンパク質をコードするのではないかと推測した。1993年、Ramingらは同様にクローニングしたラット嗅覚受容体を昆虫の細胞に発現させ、そのうちの1つの受容体クローンがにおい物質に応答しIP₃を産生させることを報告した⁹⁾。

最近、MargalitとLancetは定量的なPCR法を用いて、胎児および新生児ラットにおける受容体タンパク質とセカンドメッセンジャー経路に関与する様々なタンパク質をコードする遺伝子の発現を調べた¹⁰⁾。出産4日前の胎児はにおい物質に対して応答する能力を持っているが、この時期の胎児の嗅細胞には、受容体タンパク質やcAMP依存性チャンネルをコードする遺伝子は未発現であった。すなわち、発生初期の嗅覚器は受容体タンパク質を持たないにも関わらず、においに対する応答性を有している。この結果は、後に述べる受容体タンパク質を介さないにおい受容の存在を示唆する。また、ラット胎児初期の個々の嗅細胞は、ほとんどのにおい物質に応答するが、出産直前にその応答するにおいの種類が減少する。この時期に、先の仮想的受容タンパク質をコードする遺伝子が発現する。この結果は、においの識別にこのタンパク質が関与している可能性を示唆している。

また、マウスの嗅上皮上における受容体ファミリーの発現様式が*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて調べられている。嗅細胞の存在する嗅上皮におけるこれらの遺伝子は2-3の発現ゾーンに分かれるものの、その中ではランダムに発現しており、今のところにおいの識別とこれらのゾーンに分かれた発現の関連は不明である。

最近、嗅細胞に特異的に発現すると報告されて

いた上記の受容体遺伝子ファミリーが、嗅覚系以外にも発現していることが報告された。阿部ら¹¹⁾や松岡ら¹²⁾は、それぞれラットやウシの舌上皮や腎臓などに受容体のメンバーが発現していることを報告した。また、Parmentierらは、同様のファミリーがヒトの精子に発現していることを見いだした¹³⁾。このように上記の受容体が嗅覚器とは全く無関係の組織に発現していることから、当初AxelとBuckが考えた嗅細胞における特異的な発現という仮定は崩れてしまった。しかしながら、におい受容とはまるで無関係な味細胞が各種におい物質を受容し嗅覚系と同様に識別すること¹⁴⁾や、腎上皮細胞や色素細胞がにおい物質によりcAMPの増大がみられることなども報告されており、これらの細胞がGTP結合タンパク質と共役しているタンパク質を介してにおい物質を受容している可能性は完全には否定できない。

3. 2 膜脂質のにおい受容における役割

以上のように嗅覚受容体ファミリーの存在が明らかになったが、現在のところその機能に関してはRamingらがクローニングしたうちのただ1つの遺伝子がIP₃産生に関与していることが知られているだけである(前述)。しかも、この受容体は、においの質(刺激臭、腐敗臭、花香など)およびにおい分子の構造(アルデヒド、アミン、有機酸など)が全く異なる一連のにおい物質に対して応答する非常に幅広い応答スペクトラムを示す。しかしながら、一説では、嗅細胞が最初に入力している嗅球の細胞のにおい応答スペクトラムは非常に狭いことも指摘されており¹⁵⁾、仮想的な嗅覚受容体タンパク質だけで本当ににおいの識別が可能であるかについてはやや疑問が持たれる。

一方、受容膜を形成する脂質がにおいの識別に重要な役割を演じている可能性が考えられる。谷口らは、カメ嗅受容膜にリン脂質の1種であるフォスファチジルセリン(PS)を添加すると、腐敗臭を有するイソバレリン酸などの有機酸系のおい物質に対する応答感度が特異的に50倍ほど高くなるが、花香を有するアミルアセテートやハッカ香を有するメントールなどに対する応答は変化しないことを見いだした。また、花田らは、カメ嗅上皮の温度を上昇させると、常温ではよく識別

図4 リポソームにおけるにおい応答

A : リポソームの模式図

B : PS含有リポソームのアミルアセテートに対する応答

カメおよびカエルの嗅覚器よりも感度よくにおい物質に応答する。

C : 脂質組成の異なるリポソームのにおい応答特異性

D : 受容体タンパク質を介さないにおい受容サイト

されるにおい物質が識別できなくなることを見いだした¹⁶⁾。例えば、常温では *trans*-3-ヘキセノールと *cis*-3-ヘキセノール、あるいは *d*-カルボンと *l*-カルボンはよく識別されるが、40℃では両者は識別されなくなった。さらに、カメ嗅上皮から遊離した細胞標品やカメ嗅上皮から抽出した脂質を用いて作製した膜の流動性を蛍光色素を用いて測定したところ、温度上昇によるにおいの識別能の低下と膜の流動性の増加には高い相関が見られた。これらの結果は、嗅受容膜を構成する膜脂質自身あるいは膜脂質で取り囲まれている受容体タンパク質の存在状態が、においの識別に重要な役割を果たしていることを示唆している。

そもそも脂質のみより作製した小胞（リポソーム）においても、嗅覚系でみられる応答と非常に類似した応答が観察される。野村と栗原は、リポソームに種々のにおい物質を与えたところ嗅覚細胞でみられるものと同様な膜電位変化を測定し

た¹⁷⁾。また、嗅覚器は非常に鋭敏であることがその特徴の一つであるが、フスファチジルコリン (PC) に PS を 10 から 20% 添加すると 100 pM のにおい物質で膜電位変化が生ずるほど感度の高いにおい応答が測定された¹⁸⁾ (図4)。この場合、1つのリポソームに数個のにおい分子が吸着すると電位変化が引き起こされることになる。

それでは、受容体タンパク質が存在しなくともにおいの識別が可能であろうか。嗅細胞とは全く無関係な培養神経細胞は、嗅細胞と同様に各種におい物質に応答する。この神経細胞にステアリン酸やコレステロールを添加するとにおいに対する応答特異性が大きく変化した。同様の結果がリポソームでも観察された¹⁸⁾。われわれは、PSを様々な割合で加えたリポソームの各種におい物質に対する応答を測定したところ、10%PSを含有するリポソームは、アミルアセテートによく応答し、20%PS含有リポソームはシトラールによく応答

することを見いだした。これらの結果は、仮に嗅細胞受容膜の脂質組成が異なるとすると、特異的な受容体タンパク質が存在しなくとも個々の嗅細胞のにおい応答特異性が異なり、においの識別が可能になることを示唆している。

タンパク質は、脂質と並んで生体膜の重要な構成要素である。そこで、われわれは、膜タンパク質のにおい応答への効果を調べるためにコンカナバリンA (ConA) を添加したリポソームを作製して、各種におい物質に対する応答を測定したところ、におい応答特異性が大きく変化することを見いだした。ConAは嗅細胞受容膜に特異的に存在しておい物質と結合するタンパク質ではなく、他の細胞に普遍的に存在する。この結果は、受容膜の脂質組成とともに、タンパク質の組成が異なるとにおい応答特異性が更に多様になることが示唆される。

におい物質が受容されるサイトはどのような性質をもっているかを調べるために、膜の様々な領域あるいは様々な深さの膜構造の変化（流動性変化）を検知する様々な蛍光色素を用いて、各種におい物質が引き起こす培養神経細胞の膜構造の変化を測定した。その結果、例えば、麝香を有するムスコとオキサリドは同じような膜流動性変化を引き起こした¹⁹⁾。この結果は、同じ種類のおい物質を有するにおい物質は膜に同様の構造変化を引き起こし、唆する。

また、PCのみで構成されるリポソーム、脂質の複合物である大豆から抽出したアゾレクチンから作製したリポソームおよびアゾレクチンにイヌ赤血球細胞膜から抽出した膜タンパク質を添加したリポソーム（プロテオリポソーム）を作製し、各種におい物質が引き起こす膜流動性変化を測定した²⁰⁾。PCリポソームにおける膜構造変化は、各種におい物質であまり変わらなかったが、アゾレクチンリポソームでは、においの種類が異なると異なるパターンの構造変化が見られるようになった。さらにプロテオリポソームでは、におい物質が引き起こす膜構造変化のパターンがさらに複雑になった。この結果は、膜の構成要素が多様であると、多様なにおい受容サイトが、脂質と膜タンパク質によりつくられることを示唆している。

実際の嗅細胞受容膜も複数の脂質と膜タンパク質から形成されているために、受容膜には様々なにおい物質に対する受容サイトが存在していると思われる。

4. おわりに

冒頭で述べたように、嗅覚系は多種類のにおい物質の質の違いを識別し、しかも広い濃度範囲にわたってにおいを検知する機能を有する。現在注目されている仮想的なおい物質受容体タンパク質と、われわれが見いだした脂質やタンパク質により構成される受容サイトを組み合わせることにより、このような機能多様な発現が可能になるものと思われる。

(1993-10-1 受理)

文 献

- 1) K. Kurihara, N. Koyama ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 30 (1972)
- 2) U. Pace, E. Hanski, Y. Salomon, D. Lancet ; *Nature*, **316**, 255 (1985)
- 3) T. Nakamura, G. H. Gold ; *Nature*, **325**, 442 (1987)
- 4) I. Boekhoff, E. Tarelius, J. Strotmann, H. Breer ; *EMBO J.*, **9**, 2453 (1990)
- 5) N. Suzuki ; *Olfaction and Taste XI* (Springer-Verlag) 印刷中
- 6) Kashiwayanagi, M. Kawahara, H. Hanada, & T. Kurihara ; *J. Gen. Physiol.*, 印刷中
- 7) E. E. Fesenko, V. I. Novoselov, L. D. Krapivinskaya ; *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 424 (1979)
- 8) L. Buck, R. Axel ; *Cell*, **65**, 175 (1991)
- 9) K. Ramming, J. Krieger, J. Strotmann, I. Boekhoff, S. Kubick, C. Baumstark, H. Breer ; *Nature*, **361**, 353 (1993)
- 10) T. Margalit, D. Lancet ; *Dev. Brain Res.*, **73**, 7 (1993)
- 11) K. Abe, Y. Kusakabe, K. Tanemura, Y. Emori, S. Arai ; *J. Biol. Chem.*, **268**, 12033 (1993)
- 12) I. Matsuoka, T. Mori, J. Aoki, T. Sato, K. Kurihara ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

- 194, 504 (1993)
- 13) M. Parmentier, F. Libert, S. Schurmans, S. Schiffmann, A. Lefort, D. Eggerickx, C. Ledent, C. Mollereau, C. Gerard, J. Perret, A. Grootegoed, G. Vassart, G ; *Nature*, **355**, 453 (1992)
- 14) T. Kashiwagura, N. Kamo, K. Kurihara, Y. Kobatake ; *Comp. Biochem. Physiol.*, **56C**, 105 (1977)
- 15) K. Mori, N. Mataga, K. Imamura ; *J. Neurophysiol.*, **67**, 786 (1992)
- 16) T. Hanada, M. Kashiwayanagi, K. Kurihara ; *Am. J. Physiol.*, 印刷中
- 17) T. Nomura, K. Kurihara ; *Biochemistry*, **26**, 6135 (1987)
- 18) S. Enomoto, M. Kashiwayanagi, K. Kurihara ; *Biochim. Biophys. Acta*, **1062**, 7 (1991)
- 19) M. Kashiwayanagi, K. Kurihara ; *Brain Res.*, **359**, 97 (1985)
- 20) M. Kashiwayanagi, A. Suenaga, K. Kurihara ; *Biophys. J.*, **58**, 887 (1990)

小特集 “ バイオ表面をみる ” によせて

最終的には生命維持につながる生体器官、生体膜、生体分子などの“バイオ表面”，その機能と役割は計り知れないものがあります。構造的には，バイオ表面の素材特性，薄膜の構造，耐久性と再生能，外界からの防御などはどうなっているのでしょうか？バイオ表面においてなされる物質の吸収・排泄，エネルギー変換，情報・刺激の受容と伝達など機能の巧みさには驚異さえ覚えます。

本協会が『金属表面技術協会』から『表面技術協会』に名称が変わって5年，生物や医療などバイオ領域への会員の関心は徐々に高まっておりますが，バイオ表面を対象とする積極的な取り組みと進展はまだこれからと思われまます。また一方では，医用材料の開発あるいは塗装が威力を発揮している海生生物汚損対策などのように，バイオ表面がまさにターゲットといわざるを得ない現状があります。

この小特集は“バイオ表面をみる”と題し，生体あるいは生体機能材料における表面とはどういうものであり，またどのようにその機能を発揮しているか，さらにはどのように表面を探索できるかを，ご紹介いた

だくという主旨で企画いたしました。バイオ表面といってもきわめて多岐にわたっております。受容膜のにおい識別における情報伝達機構のしくみには学ぶことの多さをあらためて認識させられます。バイオ表面そのものの探索は重要不可欠であります，バイオの特殊な環境は計測をも制限してしまいます。タンパク質表面層の動的情報のためのNMR，生育時の植物根表面の電位変化，皮膚表面排泄物質のIR，いずれも計測の妙に興味もたれます。バイオに学び，バイオに倣うだけでなく，医用領域ではバイオの肩代わりも望まれてきました。人工材料設計・開発・機能化の流れは巧みにさえ感じられます。バイオ表面の改質や新たな機能の付与は今後もさらに積極的になろうと期待されます。それぞれの分野の第一人者のかたにご寄稿願いました。ご多忙中にもかかわらず，ご執筆いただいた著者の方々に厚くお礼申し上げます。

これらの解説が読者諸賢の開発・研究のお役に立つことと信じてやみません。

(東京薬科大学 楠 文代)