The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	嗅細胞のニオイ応答性と分子機構の研究
Author(s)	佐藤, 孝明
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3097469
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

嗅細胞のニオイ応答性と分子機構の研究

博士学位論文

1994年２月

佐　藤　孝　明

目　次

概要 …… 1

第Ⅰ章．序論 …… 2

第Ⅱ章．嗅細胞での情報変換機構 …… 5

第Ⅲ章．嗅細胞の細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定法 …… 8
1．$[Ca^{2+}]_i$測定装置 …… 10
2．刺激投与法 …… 10
3．刺激溶液 …… 14
4．嗅細胞の単離法 …… 14
4-1．カエル嗅細胞の酵素処理 …… 16
4-2．イモリ嗅細胞の酵素処理 …… 18
4-3．マウス嗅細胞の酵素処理 …… 18
5．機械的単離処理 …… 19
5-1．Trituration法 …… 19
5-2．Tissue-printing法 …… 21
6．fura-2の細胞内負荷 …… 23
7．$[Ca^{2+}]_i$の算出法 …… 25

第Ⅳ章．ニオイ刺激による電気生理的応答と$[Ca^{2+}]_i$応答 …… 29
1．嗅細胞の蛍光性と静止状態での$[Ca^{2+}]_i$ …… 29
2．ニオイ刺激による嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$上昇 …… 29
3．嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対する考察 …… 33
4．Patch-clamp法による電気生理的応答測定と蛍光法による
$[Ca^{2+}]_i$測定の同時記録の方法 …… 35
5．電気生理的応答と$[Ca^{2+}]_i$上昇の動特性の比較 …… 36
6．電気生理的応答と$[Ca^{2+}]_i$上昇の関係についての考察 …… 36

第Ⅴ章．同一嗅細胞におけるニオイ応答とcAMP誘起応答の比較 39
1．forskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇とニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇の比較 …… 39
2．個々の嗅細胞のニオイ選択性とcAMP誘起応答 …… 42
3．考察 …… 45

第Ⅵ章．ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇の経路と機能 …… 48
1．$[Ca^{2+}]_i$上昇への細胞外からのCa^{2+}流入と細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の寄与 …… 48
2．電位依存性カルシウムチャネルの寄与 …… 50
3．cAMP依存性チャネルの寄与 …… 57
4．細胞外からのCa^{2+}流入と細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の機能に関する考察 …… 57

第Ⅶ章．嗅細胞のニオイ応答性と嗅上皮内での分布の推定 …… 60
1．ニオイ分子の立体化学的構造に対する嗅細胞の特異性 …… 60
2．嗅細胞の立体化学的構造特異性に対する検討 …… 61
3．Tissue-printing法による細胞レベルでの組織内ニオイ応答分布推定の試み …… 64
4．近傍の嗅細胞のニオイ応答の比較 …… 64
5．近傍の嗅細胞のニオイ応答分布に関する考察 …… 66

第Ⅷ章．結論 …… 67

謝辞 …… 70

参考文献 …… 72

概　要

5感（視覚，聴覚，体性感覚，嗅覚，味覚）における受容細胞での刺激種識別のための基本量については，視覚でのRGB三原色，聴覚の周波数，体性感覚の触・圧・温冷，味覚の甘・酸・塩・苦・旨の5原味と，4つの感覚ではほぼ確立された概念がある．一方，嗅覚においては，本研究を開始した1988年頃においても，基本量についての確立した概念がなかった．当時，Amooreにより提唱された7原臭はすでに提唱者自身により否定され，30種以上の原臭の存在の可能性が示唆される一方で，大多数から支持されていた受容蛋白質説とニオイ物質による膜流動性変化により受容器電位が発生するという仮説とが対峙し，ニオイ受容機構は，まだ混沌とした段階にあった．また，嗅覚の高感度性を説明するため，受容細胞での信号増幅機構としてcAMPセカンドメッセンジャーが提唱されていたが，まだ完全には確立されておらず，IP_3／Ca^{2+}系についても興味が持たれていた．本研究は，このような状況を背景に，通産省工技院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生体エレクトロニクス研究室において，嗅覚のニオイ識別能及び高感度性の解明の一環として，個々の細胞の細胞内Ca^{2+}濃度の動態計測によって，受容器レベルでのニオイ識別能とニオイ受容の細胞内分子機構の解明を目指して行なわれたものである．

その結果，ニオイ受容におけるCa^{2+}の複雑な制御機能と嗅細胞の高度なニオイ識別能が示唆された．本論文は，以下の内容で構成されている．第Ⅰ～Ⅲ章で，ニオイ受容機構の概要と細胞内$[Ca^{2+}]_i$濃度の測定方法を紹介する．第Ⅳ章では，ニオイ応答時の細胞内Ca^{2+}濃度上昇について述べ，第Ⅴ章では，細胞レベルでのニオイ選択性とcAMP介在応答との類似性について，第Ⅵ章では，ニオイ誘起細胞内Ca^{2+}濃度上昇への電位依存性Ca^{2+}チャネルとcAMP-gatedチャネルからのCa^{2+}流入と新たに発見されたニオイ誘起細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の寄与及びその機能について述べる．第Ⅶ章では，個々の嗅細胞の高度なニオイ分子の立体化学的構造に対する識別能とニオイ分子構造識別能で分類した嗅細胞サブタイプの嗅上皮上の空間的分布様式について述べ，第Ⅷ章に，結論を個条書きに述べる．

第Ⅰ章．　序　　論

感覚は，環境情報を神経信号に変換し，脳に入力する為のセンサーシステムである．嗅覚系は，多様な化学物質をニオイとして遠隔的／近接的に検出・知覚し，外敵／危険物からの忌避，食物摂取，性行動など生命維持や種の保存に関係が深い感覚である．嗅覚におけるニオイ識別のための神経情報処理も，他の感覚と同様に受容器での刺激の質に依存した信号検出に始まる．この嗅細胞で行なわれるニオイ識別の初期プロセスは，ニオイ分子が検出され受容器電位が発生する化学的→電気的信号変換と，引き続き同じ細胞の神経軸索で行なわれる受容器電位から神経インパルスへのアナログ→デジタル変換（あるいは電圧→周波数変換）の２つのプロセスから構成されている（図１）[1]．このうち前者の受容過程は，神経細胞のポストシナプスでの情報変換の刺激受容性を多様化させたものに類似性を見ることができる．

ニオイ受容における情報変換は，各種の機能分子が嗅細胞内で時間的／空間的にうまく制御されることによって行われていると思われる．嗅細胞のニオイ識別能については，1991年に発見されたニオイ受容蛋白質候補群[2]のニオイ特異性により決まると考えられており，高感度性を説明する信号増幅機構については細胞内の化学的信号増幅系である環状アデノシン一リン酸（cAMP）系[2-12]とイノシトール三リン酸（IP_3）系[3, 13, 14]によるセカンドメッセンジャーの関与及び最近ではCa^{2+}依存性Clチャネルの寄与[15-17]等で説明されている．図１の嗅細胞の断面内には，嗅覚情報変換の分子メカニズムの内cAMP系と細胞内カルシウム制御系について，本論文の内容も含め現在得られている知見に基づいて模式的にまとめたものである．この系における信号増幅はcAMPによるプロセスとCa^{2+}依存性Clチャネルによる電流増幅と２段階で考えられている．ニオイ受容におけるカルシウムの機能については，図１に示された以外にもIP_3系におけるトランスダクション電流のキャリア及びcAMP系とIP_3とのcross-talkへの関与などが報告されており，これらの点に関してはまだ議論が続けられている（第Ⅱ章参照）．

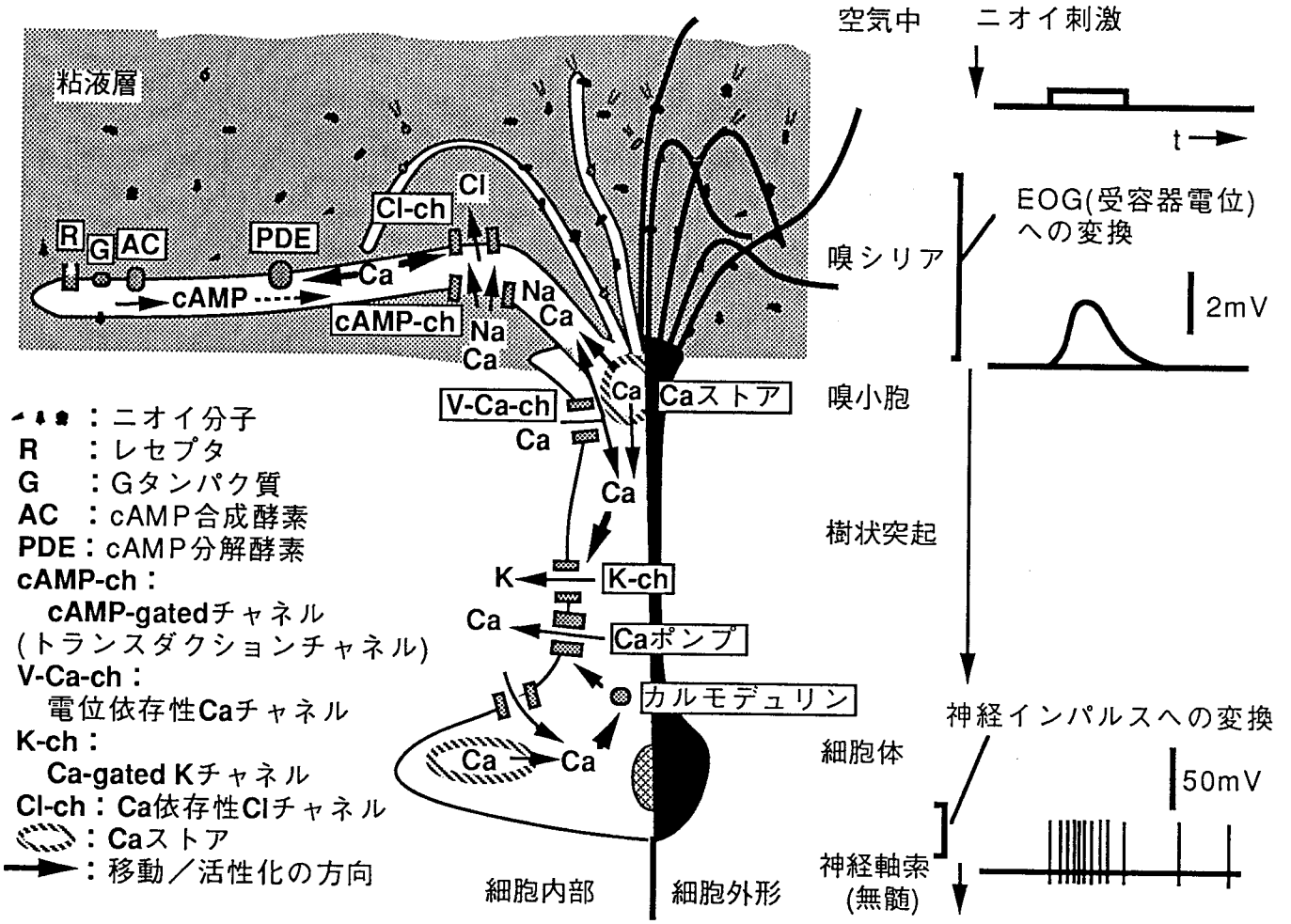


図１　嗅細胞でのニオイ受容の情報変換プロセスと分子機構[1)]

嗅細胞の左半分は断面図として細胞内部の分子メカニズムを模式的に示した．ニオイ刺激により嗅シリアで受容器電位が発生し，細胞体軸索基部で神経インパルスに変換される．

このように，細胞内カルシウムは，嗅細胞のニオイ受容における信号制御系への多様な関与が予想されていたが，ニオイ応答時の細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の動態は明らかにされていなかった．そこで，本研究では，嗅細胞のニオイ応答における$[Ca^{2+}]_i$の動態を明らかにし，$[Ca^{2+}]_i$の動態からニオイ受容の分子機構の解析を試みた．更に，$[Ca^{2+}]_i$上昇を細胞応答の指標として，個々の嗅細胞のニオイ特異性について調べ，その嗅上皮内分布の推定を試みた．まず，第Ⅰ章では，ニオイ受容機構についての概要を紹介し，第Ⅱ章では，嗅細胞の情報変換機構の分子メカニズムについて，第Ⅲ章では，$[Ca^{2+}]_i$の測定原理と嗅細胞における計測方法について述べる．第Ⅳ章では，ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇と電気生理的な応答の動的関係について述べる．第Ⅴ章ではcAMPセカンドメッセンジャー系のニオイ応答への寄与を検討するため，個々の嗅細胞でcAMP系及びIP_3系と言われるニオイ物質に対するニオイ選択性を同定し，それらの嗅細胞がcAMP誘起応答を同時に持つかどうかを調べ，細胞レベルでのニオイ応答とcAMP介在応答との類似性について比較・検討した．第Ⅵ章では，新たに発見されたニオイ誘起細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出とその機能についての推測，ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇への電位依存性Ca^{2+}チャネルとcAMP-gatedチャネルからのCa^{2+}流入の寄与とその機能について述べる．第Ⅶ章では，直鎖炭化水素系のニオイ物質を用い，炭化水素鎖の長さと官能基に対する選択性を調べ，個々の嗅細胞の高度なニオイ識別能が明らかになった結果について述べる．更に，このニオイ特異性で分類した嗅細胞サブタイプの嗅上皮上の空間的分布様式について推定を行なった．第Ⅷ章には，結論を個条書きにまとめた．

第Ⅱ章．嗅細胞での情報変換機構

嗅細胞は，鼻の奥にある嗅粘膜のうち，嗅上皮の中間層に細胞体を持つ双極性の細胞であり，ニオイ受容を機能とする神経細胞である（図１）．細胞体から上皮表面に垂直な軸上の両極から１本ずつ伸びる突起の内，上皮表面側には樹状突起が粘膜表面に突出するまで伸び，反対の極である基底膜側からは，無髄神経軸索が伸びて分岐することなく嗅球まで達し，糸球体で僧帽細胞／房飾細胞とシナプスを形成している．樹状突起の先端は少し膨らんで嗅小胞を形成し，嗅細胞に特異的な嗅シリアが十数本生えている．

嗅細胞が中枢にニオイ情報を伝達するために用いている神経インパルスの発生機構は，神経一般にみられる電位依存性Na^+チャネルと電位依存性K^+チャネルによるものである．従って，嗅細胞における分子機構の特異性は，嗅シリアで行なわれるニオイ分子→受容器電位への変換の分子機構にあると思われる．嗅細胞のニオイ識別能については，1991年に発見されたニオイ受容蛋白質候補群[2)]のニオイ特異性により決まると考えられているが，まだ１例を除いて受容蛋白質のニオイ応答性は知られていない．また，高感度性を説明する信号増幅機構については，細胞内の化学的信号増幅系である環状アデノシン一リン酸（cAMP）系[2-12)]とイノシトール三リン酸（IP_3）系[3, 13, 14)]によるセカンドメッセンジャーの関与及び最近ではCa^{2+}を介した外向きCl電流[15-17)]による信号増幅等で説明されている．これらの分子機構をひとまとめに表したのが，図２の模式図[18)]である．この内，cAMP系の概要について以下に説明する．

ニオイ受容蛋白質は，嗅シリアに局在すると考えられており[19)]，その候補群[2, 14, 20)]が報告されている．まず，ニオイ分子は，吸気と共に嗅粘膜に吹き付けられ，嗅上皮表面を覆う嗅粘液に溶け込む．嗅粘液中のニオイ分子は，嗅シリアに局在するニオイ受容蛋白質に特異的結合を行ない，この蛋白質を活性化する．活性化されたニオイ受容蛋白質は，嗅覚特異的GTP結合蛋白質を活性化し，これによりアデニル酸シクラーゼが活性化される．活性化されたアデニル酸シクラーゼは，cAMPを産生し，嗅シリア内のcAMP濃度は急激に

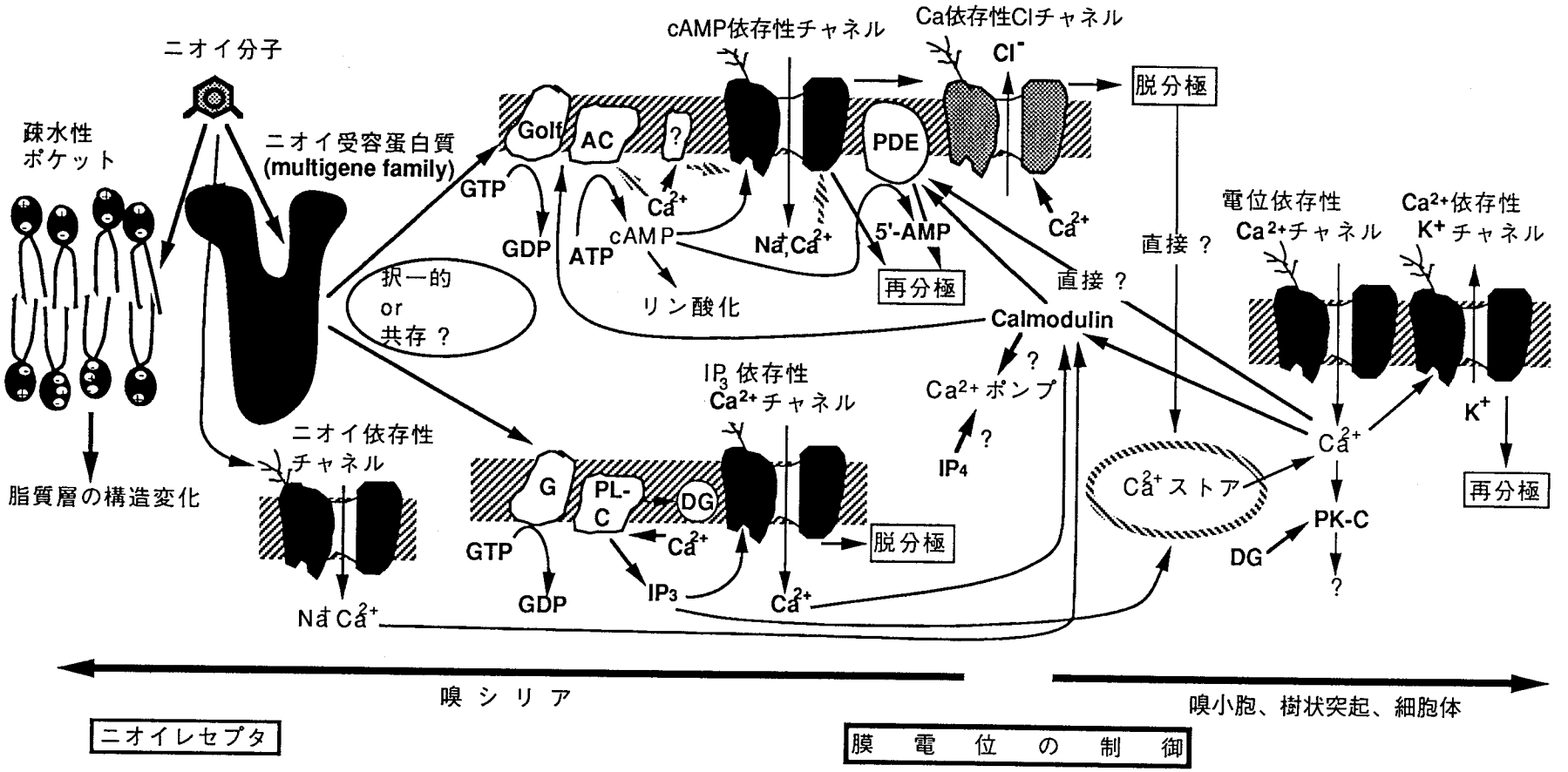


図２　ニオイ受容の分子機構において提唱されている４つの経路[18)]

G_{olf}:嗅覚特異GTP結合蛋白質，G:GTP結合蛋白質，AC:アデニル酸シクラーゼ，PDE:フォスフォジエステラーゼ，PL-C:フォスフォリパーゼC，DG:ジアシルグリセロール，PK-C:プロテインキナーゼC，→:活性促進，斜線太矢印:抑制作用，？：不明.

上昇する[3-5]．cAMPは，嗅シリア膜に高濃度に存在する[6] cAMP依存性非選択的カチオンチャネル（cAMP-CH）を開かせ，主にNa^+によって運ばれる内向き電流を発生させる[6-9]．この電流とニオイ誘起電流のイオン選択性[10]の類似性から，ニオイ応答時に受容器電位を発生させていると考えられている[6-10]．また，cAMP -CHから流入したCa^{2+}によって[21-23]，Ca^{2+}依存性Clチャネルが活性化され，外向きのCl電流が発生する[15-17]．この電流も受容器電位に大きな寄与をしていると考えられている[16, 17]．従って，現在のところ，ニオイ受容の高感度性は，受容器ではcAMP-セカンドメッセンジャーによる信号増幅とCa^{2+}を介したCl^-チャネルによる信号増幅系によって説明することができる．受容器電位発生機構としては，cAMPセカンドメッセンジャー系[1-12]以外にイノシトール三リン酸（IP_3）セカンドメッセンジャー系[3, 13, 14]あるいは，ニオイ分子の結合により直接開くトランスダクションチャネル[24]，脂質二重層のコンフォメーション変化による表面電位変化，Ca^{2+}依存性のcAMP系とIP_3とのcross-talk[25]などのメカニズムが考えられている．

脱分極性の受容器電位から静止電位への回復には，Ca^{2+}が大きな寄与をしていると考えられている．まず，細胞内に流入したCa^{2+}はcAMP感受性の調整[26]などによりcAMP-CHを閉じさせることで，トランスダクション電流を抑制する[7-9, 21]．また，視細胞と類似のCa^{2+}依存性[27]を有するホスホジエステラーゼの活性化によるcAMPの分解→細胞内cAMP濃度の低下→cAMP-CHの閉塞のプロセスもトランスダクション電流を抑制する．高濃度の細胞内Ca^{2+}によるアデニル酸シクラーゼの抑制[28]も応答からの回復を促進する．また，電位依存性Ca^{2+}チャネルから流入[22, 29-31]したCa^{2+}は，Ca^{2+}依存性K^+チャネルを活性化し膜電位を過分極方向に移動させ，静止状態への回復を促進する．ニオイ応答時，細胞内で増大したCa^{2+}は，Ca^{2+}ポンプなどによって細胞外に汲み出されるので，細胞内Ca^{2+}濃度はニオイ応答時に一過性の上昇をすることが予想される．このように，Ca^{2+}は受容器電位の増幅，応答からの回復の促進など，ニオイ受容の情報変換において重要な制御因子として機能しており，信号制御系の解明にはその動態の計測が不可欠であると思われる．

第Ⅲ章.　嗅細胞の細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定法

嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$は，Ca^{2+}濃度感受性の蛍光色素fura-2[32]を用いることにより測定することができる．fura-2の510 nmでの蛍光強度は，Ca^{2+}濃度の上昇に対し340 nm励起時（F_{340}）に増大し，380 nm励起時（F_{380}）に減少する特性を持つため，蛍光強度の逆方向の変化により信号がアーティファクトかどうかクロスチェックしながら$[Ca^{2+}]_i$を測ることが可能である（図３）．また，２つの励起波長での蛍光強度の比：$R_{340/380}=F_{340}/F_{380}$を用いれば，$10^{-8}$M～$10^{-6}$Mの$[Ca^{2+}]_i$の定量が可能となる．本稿で示す$[Ca^{2+}]_i$の値は，励起波長を変えて２度測定して求めた$R_{340/380}$の値を，蛋白質を含まない標準$Ca^{2+}$溶液での測定によって作成した校正曲線に当てはめて求めた．また，$[Ca^{2+}]_i$値の計算には，各応答において２励起波長の交互測定を行なう必要があるが，時間分解能が１.５秒であり$[Ca^{2+}]_i$変化の立ち上がり速度や遅延時間など重要なパラメータの測定が不可能になる．この為，嗅細胞でのニオイ応答時の蛍光強度変化の再現性が比較的良好であったことも考慮し，時間分解能を重視し1/3秒の時間分解能が得られる１波長励起で測定を行なった．$[Ca^{2+}]_i$値は，同じ刺激に対して励起波長を変えて２度測定を行ない，ratio法で計算した．また，紫外線照射の影響を最小限にする為にも，同じ刺激に対する複数回測定は最低限にする必要があった．この為，各細胞に対してratio法に用いた蛍光強度と得られた$[Ca^{2+}]_i$値の関係を用いて，１励起波長測定データから便宜的に，$[Ca^{2+}]_i$値の計算を行なった．この詳細については，７節に後述する．

嗅細胞の２種類の情報変換機能（図１）は，細い樹状突起で隔てられた異なる機能分子を持つ部位で行なわれているので，それぞれの分子メカニズムの解析には細胞部位毎の変化を比較できれば都合がよい．顕微蛍光画像による$[Ca^{2+}]_i$測定は，それぞれの情報変換が行なわれる部位あるいはそれに近い部位の変化が同時測定できる為，上記目的に適している．また，複数の嗅細胞の応答を同時に計測できるという利点も併せ持っている．測定では，周辺細胞などに起因する背景光を除去し測定のS/N比を上げる為に[33]，嗅細胞は単離して用いた．

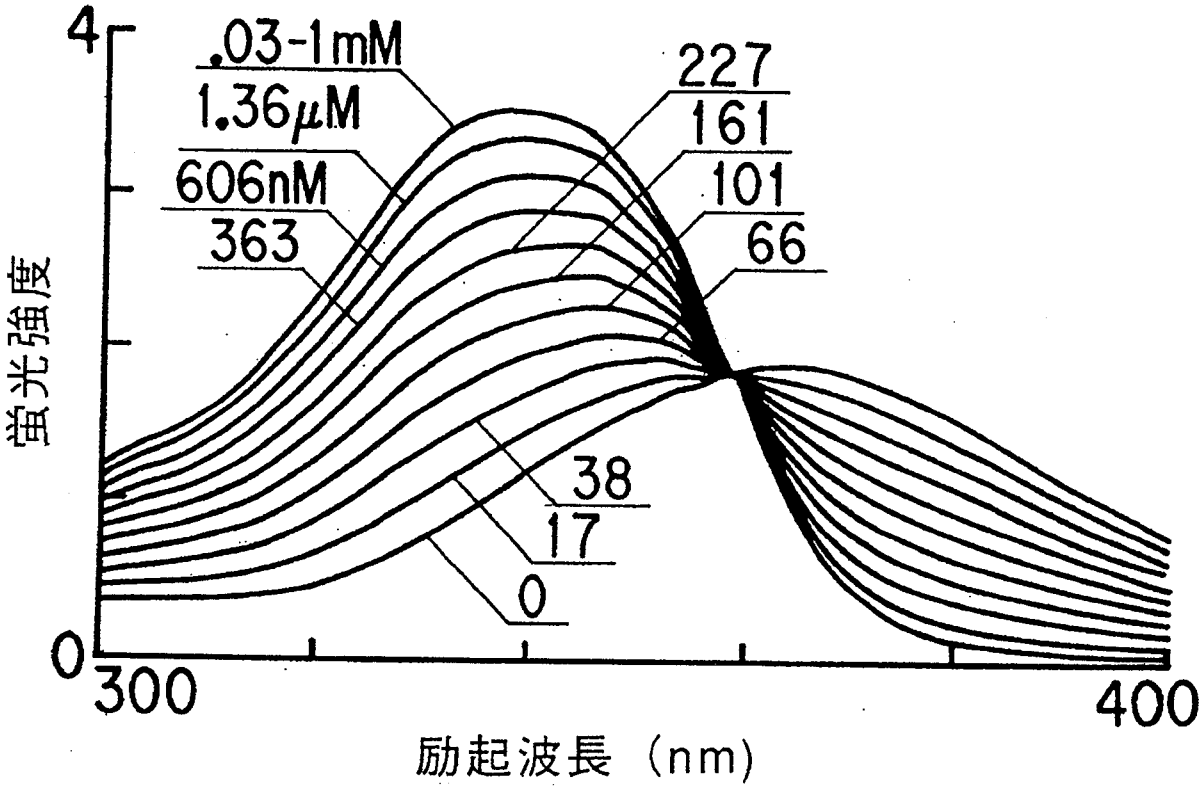


図３　fura-2の励起スペクトルのCa^{2+}濃度依存性[32)]

グラフ中の数字はCa^{2+}濃度（M：モル／*l*）を示す．蛍光の波長は510 nm.

1．　$[Ca^{2+}]_i$測定装置

図４に，$[Ca^{2+}]_i$測定系を示す[34]．このシステムは，倒立型落射蛍光顕微鏡（ニコン製，TMD-EFQ）とリアルタイム画像計測装置（浜松ホトニスク製，ARGUS-100）を母体とする汎用の顕微蛍光画像測定で，励起光（浜松ホトニスク製，150W キセノンランプ，安定電源；三啓製，ランプハウス）と蛍光の分離は干渉フィルタとダイクロイックミラーによって行った．励起光の波長を切り替えるため，干渉フィルタは電動回転ディスク（ニコン製，電動フィルタ切換装置）に取付け使用した．また，励起波長を変えたときに生じる蛍光強度変化を小さくするため，NDフィルタ（ニコン製）により励起光強度を調整した．視野内を均一に励起光で照明し，蛍光画像を40倍の蛍光用対物レンズ（ニコン製，CF fluor）で拡大し，SITカメラ（浜松ホトニクス製，C2400-08）で検出した．蛍光強度の測定は，７ケ所で行ない，それぞれ５×５画素（細胞上で2.0×2.4 μm）のウインドウ内の画素の出力値を８ビデオフレームに渡って加算し，1/3秒間隔で記録した．実験は，室温25℃の暗室において薄暗い赤色照明下で行なった．

2．　刺激投与法

ニオイ刺激は，表１に示すニオイ物質をリンゲル液に溶かし，チュービングポンプ（Pharmacia LKB製，Microperpex）を用いて細胞外液（容量：50 μl）を灌流（25 μl／sec）することによって細胞に与えた．測定チャンバーは，図５に示すバイオニックチャンバー（Bionique LABORATORIES社製，CD-100）に細胞外液容量調整用のアダプタを付加したものを用いた．チャンバーは，底面のカバーグラス（マツナミ製，No.0，400×400m/m）をシリコンゴム製のOリングを介して中央に円形の開口を持つテフロン板と真鍮フランジにより挟み込みネジによって固定する構造のものである．この開口部にすっぽりとはまるように作成した擂り鉢状のテフロン製アダプタは，測定面上部をカバーグラスで覆い灌流中の水深変化による背景光強度の変動がないように工夫し，細胞外液が灌流流量のほぼ２倍

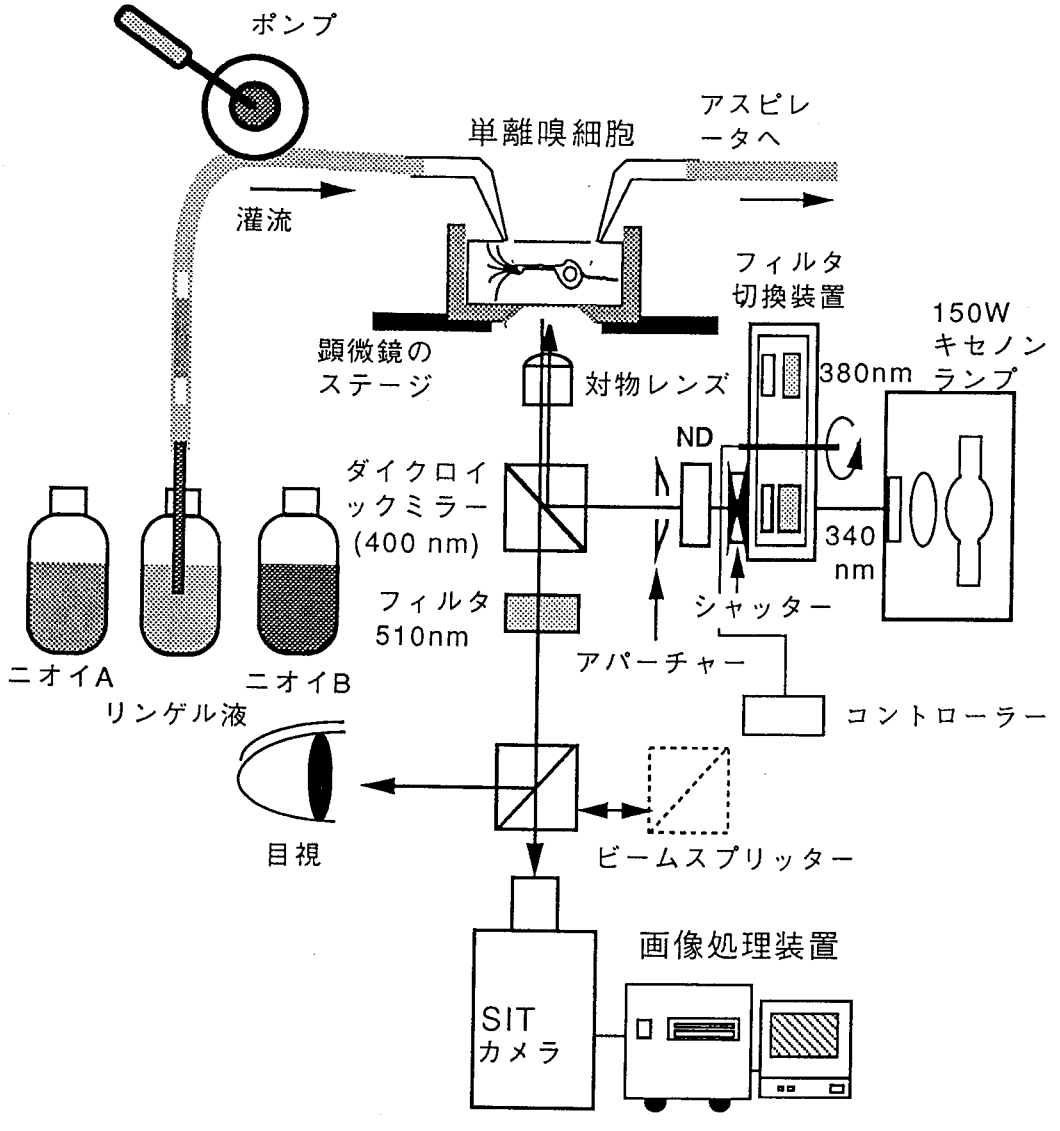


図４　嗅細胞内カルシウム濃度の測定システム[34)]

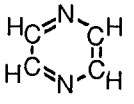
ニオイ物質名		構造	分子量	ニオイの種類
Citralva (Geranyl nitril)	CT	$(CH_3)_2C{=}CHCH_2CH_2C(CH_3){=}CHCN$	149.24	柑橘臭
Isoamyl acetate	AM	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2COOCH_3$	130.18	バナナ臭
Pyrazine	PY		80.09	ピーマン臭
脂肪酸				
Propionic acid (プロピオン酸)	c3	CH_3CH_2COOH	74.08	刺激性の悪臭
Butyric acid (酪酸)	c4	$CH_3CH\ CH_2COOH$	88.11	不快な酸敗臭
Valeric acid (吉草酸)	c5	$CH_3CH_2CH_2CH_2COOH$	102.13	不快臭、腐食性
Caproic acid (ヘキサン酸)	c6	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	116.16	やぎに似た不快臭
Enanthic acid (ヘプタン酸)	c7	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	130.19	不愉快な悪臭(獣脂)
Caprylic acid (オクタン酸)	c8	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	144.21	僅かに不快な悪臭
Pelargonic acid (ペラルゴン酸)	c9	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$	158.24	特徴的で強い刺激性 (人工産物)
直鎖脂肪族アルコール				
1-propanol	a3	$CH_3CH_2CH_2OH$	60.10	フーゼル油中の芳香
1-butanol	a4	$CH_3CH_2CH_2CH_2OH$	74.12	
1-pentanol	a5	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2OH$	88.15	フーゼル油様臭
1-hexanol	a6	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$	102.18	
1-heptanol	a7	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$	116.20	
1-octanol	a8	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$	130.23	
1-nonyl alcohol	a9	$CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$	144.26	芳香(人工レモン油)

表1　実験に用いたニオイ物質

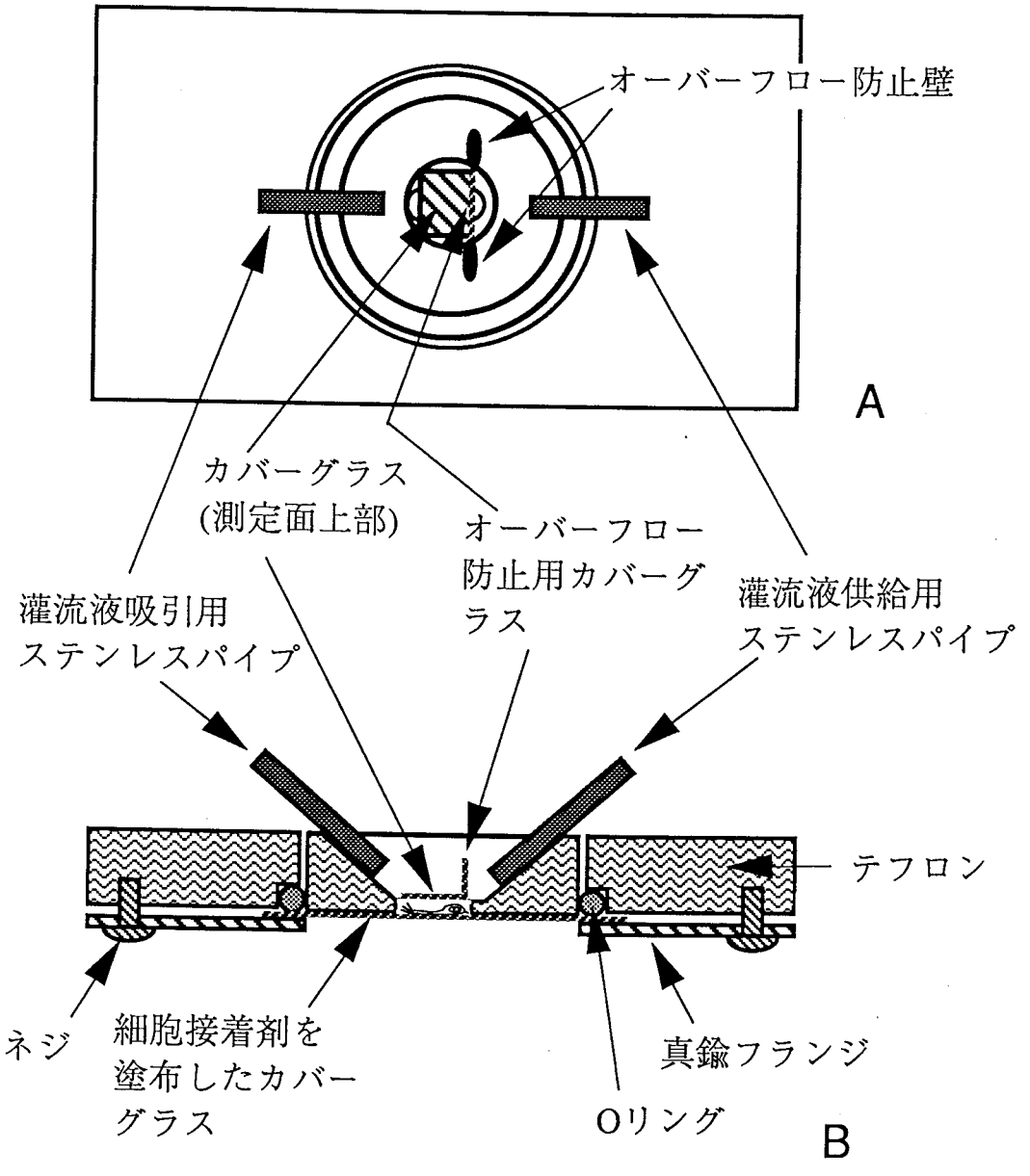


図5　$[Ca^{2+}]_i$測定用チャンバー

Aは上から見た図．Bは測定領域を断面図で示したもの．

となる約50 μlの容積を持つように水深を調整した．灌流液がアダプタの測定室内に容易に導入されるように，灌流液の供給口から測定室の入り口までと測定室の出口から灌流液の排出口まではレンズペーパーを挿入し，溶液のガイドとした．刺激溶液を灌流するときは，１秒程度の長さの泡をはさみ，チューブ内で異種の溶液が混合するのを防いだ．刺激濃度変化は，後述の方法で調整したEGTA-Ca^{2+}緩衝液のうち，fura-2の蛍光がほぼ飽和する１mM Ca^{2+}濃度のfura-2溶液を灌流した時の蛍光強度変化を測定し（図６），同じ長さの刺激期間の蛍光強度変化から推定した．８秒間fura-2を灌流した場合，蛍光強度の増大がfura-2投与後６秒経過後からほぼ飽和を示した．図６の各トレースは，３回の測定の平均値を８秒間fura-2投与時の最大蛍光強度を基準にして規格化したものである．結果は，この刺激投与法では１秒の刺激投与も２秒の刺激投与も半値幅では刺激期間の長さは同程度であり，強度だけが異なることを示している．この原因は，灌流流量をチャンバー容量の溶液交換に２秒間かかる流量に設定してあることに起因していると考えられる．投与した刺激濃度変化は，各時刻の相対的強度比を刺激濃度にかけ推定値として求めた．

３．　刺激溶液

刺激として，ニオイ物質以外に，嗅細胞のcAMP系の活性を確認する為，cAMP合成酵素の活性化剤であるフォルスコリン(FK，２μM，Sigma製，F-6886）を用い，細胞の生存を確認するためにNaClをKClで置換した高K^+刺激(K^+濃度：145.6 mM)を用い脱分極による$[Ca^{2+}]_i$上昇を調べた．細胞外液にCa^{2+}が無い条件で，ニオイ応答を測定する場合のCa^{2+}フリーリンゲル液は，正常リンゲル液から$CaCl_2$を除去し２mMのEGTA（Sigma製，E-4378）を加えたものを用いた．正常リンゲル液の組成については，細胞単離の項で説明する．

４．　嗅細胞の単離法

嗅細胞はtight-junctionによって周辺の支持細胞と強く結合しているため，無処理では収

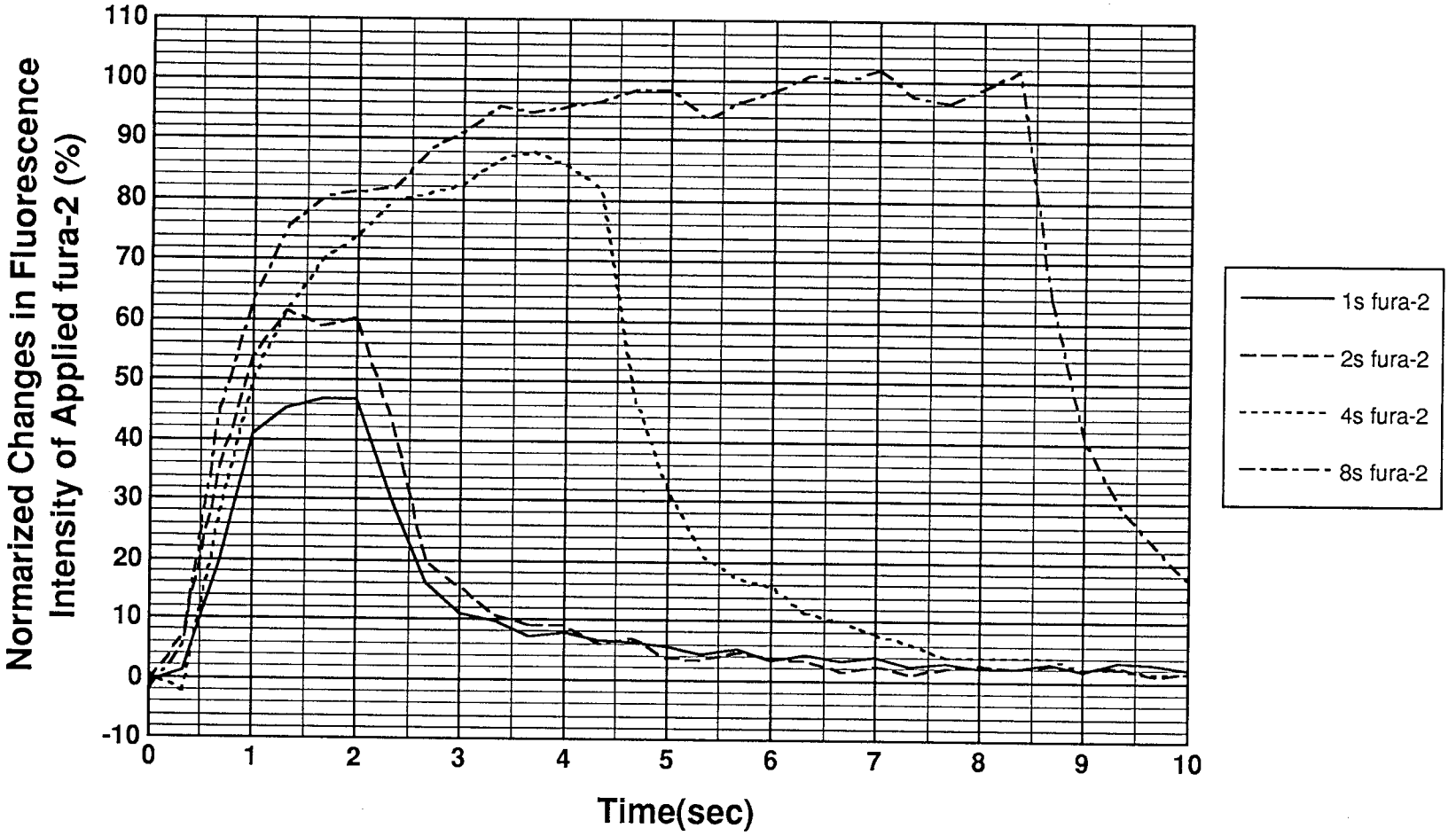


図 6　fura-2灌流における蛍光強度変化

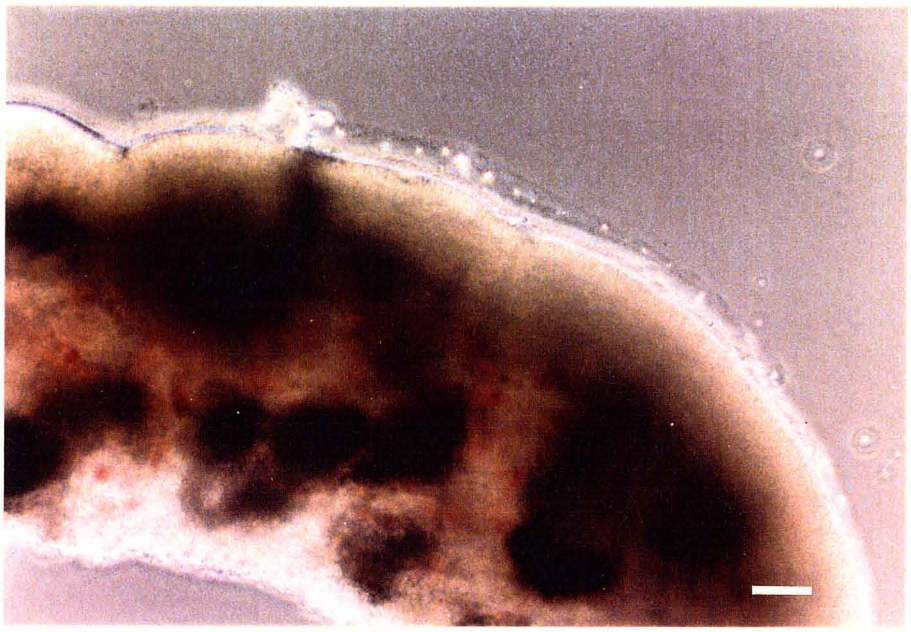
fura-2の蛍光強度比測定用に調整した 5 μMのfura-2を含む 1 mM Ca^{2+}標準溶液を一定時間灌流し，340 nm励起時の蛍光強度変化を測定した．データは，3 回測定の平均値であり，8 秒間fura-2溶液を流したときの飽和蛍光強度で規格化した．刺激濃度変化の推定のための校正データとして本データを用いた．

率良く細胞を単離することが困難である．この為，酵素処理によりtight-junctionを切断し，機械的処理によって嗅細胞の単離を行なった．実験動物は，当初，受容器電位に関するデータの蓄積がある食用カエルを用いて行なった．食用カエルの嗅シリアは運動性があり，嗅細胞の単離後にも細胞の生存を嗅シリアの運動によって確認できる為，単離条件を最適化する為に好都合であった．しかしながら，食用カエルの嗅粘液は粘性が高く，単離後も嗅細胞表面に付着しているのか，パッチクランプ法で高絶縁性を得るのは困難であった．この為，パッチクランプ実験用の動物としては，嗅細胞が大きく嗅粘液の粘性が比較的低い点でパッチクランプ実験に適するといわれ，データがすでに報告されていたイモリを用いた．また，食用カエルのCa^{2+}の経路を哺乳類で確かめ，両生類と哺乳類のニオイ選択性を比較する為に，嗅覚中枢細胞の脂肪酸系刺激に対する応答が報告されていたウサギと同じ齧歯類であるマウスを用いて実験を行なった．ニオイ応答性単離条件は，用いた動物種に合わせて調整した．酵素を溶かすために用いたCa^{2+}フリーリンゲル液は，正常リンゲル液から$CaCl_2$だけを除去して用いた．具体的な酵素処理手順を動物種ごとに以下に記す．

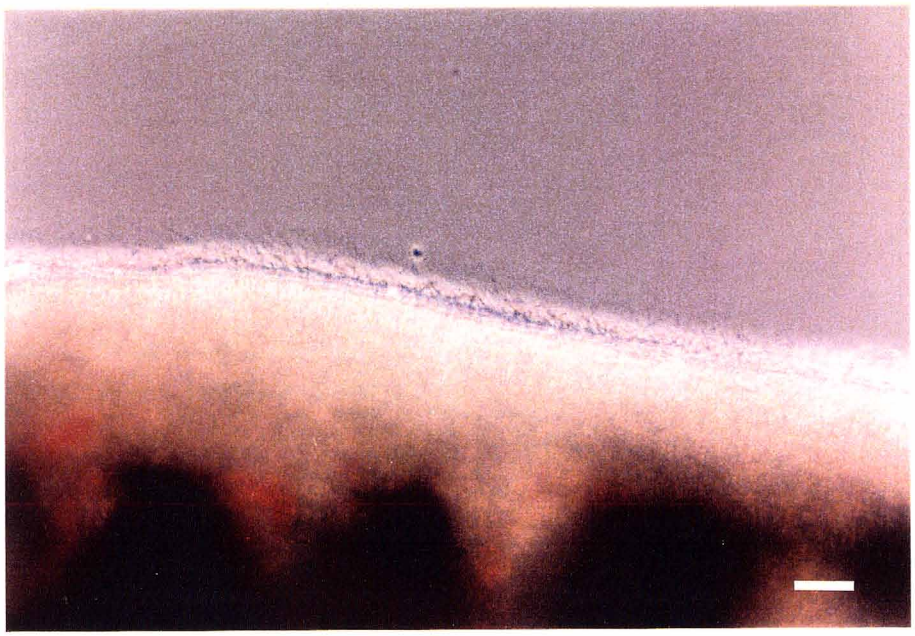
4-1．　カエル嗅細胞の酵素処理[11)]

食用カエル（Rana catesbeiana）は，MS-222の腹腔内投与（0.2mg/g）によって麻酔後，脊髄と脳の２重破壊によって安楽死させた．嗅上皮は，軟骨ごと切り出した後，メスを用いて嗅粘膜として剥離した．剥離嗅粘膜は，替え刃用ステンレス製剃刀（シック製，１枚重ね）を２枚合わせ，注意深く嗅上皮表面に垂直に押し当てて切り，厚み300 μm程度にスライス化した（図７-(a)）．これらの嗅粘膜スライスは，細胞増殖促進因子を含む汎用培地GIT（日本製薬製）に５％の牛胎児血清（Gibco製，200-6140）を加えた培地中に５℃で保存した．嗅シリアは，保存後４週間以上経過したスライスでも特徴的な運動性が観察され，嗅上皮の保存状態が良好なことが示唆された．細胞単離に用いたスライスは，保存後10日以内のものとした．嗅粘膜は，背側と腹側の両者を特に区別せずに用いた．

単離直前に，嗅粘膜スライスを培地から取り出し，正常リンゲル液中で表面の嗅粘液を



(a)



(b)

図７　カエル嗅粘膜スライスの位相差顕微鏡写真

(a) 嗅粘液のついたカエル嗅粘膜スライス，対物レンズ：10倍，投射レンズ１倍，バーの長さは100 μmを表す．(b) 嗅粘液を除去したカエル嗅粘膜スライス，対物レンズ：20倍，投射レンズ１倍，バーの長さは50 μmを表す．

金属針で機械的に除去した（図７-(b)）．次に，なるべくボーマン氏腺を含まない領域を選び，切断面が嗅細胞の樹状突起に平行になるように幅300～400 μmの小片に切り分け，固有層も基底膜より少し体内側で切断・除去し，嗅上皮小片を得た．複数の嗅上皮小片は，Ca^{2+}フリーリンゲル液に溶かしたパパイン（Calbiochem製，１mg/ml）溶液に34℃で５～10分間インキュベートした．酵素溶液から取り出した嗅上皮小片は，Ca^{2+}フリーリンゲル液で一旦洗浄した後，正常リンゲル液に移した．この酵素処理嗅上皮小片を用い，trituration法あるいはtissue-printing法によって，嗅細胞を単離した．正常リンゲル液の組成は以下の通り．NaCl：110 mM，KCl：３ mM，$CaCl_2$：２ mM，$MgCl_2$：１ mM，Na-pyruvate：３ mM，Glucose：10 mM，HEPES：10 mM，pH：7.2.

４-２．　イモリ嗅細胞の酵素処理

イモリ（Cynops pyrrhogaster）は，MS-222の腹腔内投与（１mg/g）によって麻酔後，断頭によって安楽死させた．嗅上皮は，メスを用いて軟骨から嗅粘膜として剥離し，適当に小片に切り分けた．複数の嗅上皮小片は，Ca^{2+}フリーリンゲル液に溶かした0.1～0.5％コラーゲナーゼ（Sigma製，Type-I，C-0130）溶液に34℃で５分間インキュベートした．酵素溶液から取り出した嗅上皮小片は，Ca^{2+}フリーリンゲル液で一旦洗浄した後，正常リンゲル液に移した．得られた酵素処理嗅上皮小片を用い，tissue-printing法によって嗅細胞を単離した．正常リンゲル液はカエルと同じものを用いた．

４-３．　マウス嗅細胞の酵素処理

マウス（日本SLC製，Balb/c，メス，４週齢以上）は，ケタラール50の腹腔内投与（三共製薬製，５μl/g）によって麻酔後，断頭によって安楽死させた．嗅上皮は，軟骨に付いたまま切り出した後，メスを用いて嗅粘膜として剥離した．剥離嗅粘膜は，ステンレス製替え刃型のメス（シック製）により，リンゲル液中で注意深く嗅上皮表面に垂直に押し当てて切り，厚み300 μm程度にスライス化した．これらの嗅粘膜スライスの表面の嗅粘液は，金属針で機械的に除去した．次に，なるべくボーマン氏腺を含まない領域を選び，切

断面が嗅細胞の樹状突起に平行になるように幅300～400 μmの小片に切り分け，固有層も基底膜より少し体内側で切断・除去し，嗅上皮小片を得た．複数の嗅上皮小片は，Ca^{2+}フリーリンゲル液に0.025％の濃度で溶かしたトリプシン（Sigma製，T2271）溶液に37℃で12分間インキュベートした．処理後，酵素活性を停止させるためCa^{2+}フリーリンゲル液に0.025％の濃度で溶かしたトリプシンインヒビター（Sigma製，T6522）溶液に15分間インキュベートした．この後，嗅上皮小片は，Ca^{2+}フリーリンゲル液で一旦洗浄した後，正常リンゲル液に移した．この酵素処理嗅上皮小片を用い，tissue-printing法により嗅細胞を単離した．正常リンゲル液の組成は以下の通り．NaCl：140 mM，KCl：5.6 mM，$CaCl_2$：2 mM，$MgCl_2$：2 mM，Na-pyruvate：2 mM，Glucose：9.4 mM，HEPES：5 mM，pH：7.4.

5．　機械的単離処理

酵素処理をした嗅上皮小片は，ピペッティングによる水流あるいは単離面への接着力など機械的な力を利用してカバーグラス上に嗅細胞を単離・接着した．カバーグラスは細胞接着剤を塗布し，単離細胞が実験中に灌流などにより流出しないようにした．細胞接着剤としては，5 mg/mlのconcanavalin-A（Sigma製，Type-V，C7275）溶液，あるいはCELL-TAK（Collaborative Research社製，＃40240，1.67 mg/ml）の2～10培希釈溶液でカバーグラスをコーティングして用いた．

5-1．　Trituration法

Trituration法は，パスツールピペットの先端を軽くバーナーであぶりエッジを丸めたもので，酵素処理した嗅上皮小片を1～2 mlのリンゲル液で10回前後注意深く出し入れすることによって行なった．得られた細胞懸濁液は，concanavalin-Aをコートしたカバーグラスを底面に持つチャンバーに注ぎ，10分以上静置し接着の安定化を図った．図8に，イモリを用いてプラスチック培養皿上（ファルコン製，プライマリア）に得た単離嗅細胞の例を示す．これは，予備実験として行なって得られたものであるが，視野内には単離嗅細胞

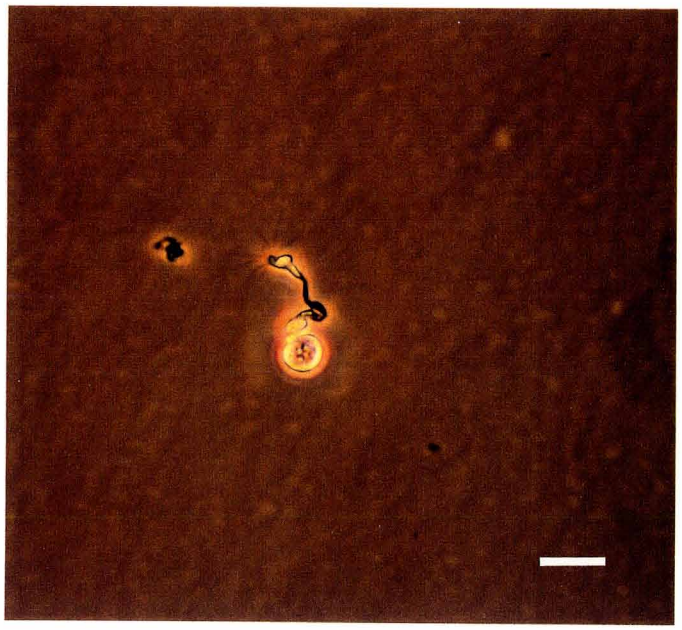


図８　trituration法によって得たイモリ単離嗅細胞

嗅シリア，嗅小胞，樹状突起，細胞体がはっきりと確認できる．バーの長さは20 μm.

が1つしか存在せず，trituration による単離嗅細胞の調整密度が低いことをよく示している．

5-2．　Tissue-printing法

嗅細胞は，長い樹状突起を持っているため，ピペッティング時に損傷を受けやすい．この損傷を避けるために，Hironoによって開発された単離方法がtissue-printing法である[35]．カエルの場合の手順を例として図9に示す．Tissue-printing法は，簡単にいえば，組織片を版木としてカバーグラスなど適当な用紙の上に組織片表面の細胞を印刷するように移し取る細胞単離法である．従って，細胞間接着力よりもカバーグラス上にコーティングされた細胞接着剤との結合力の方が強くなければ，細胞の単離はできない．この為には，嗅細胞と隣接の支持細胞との間の強い結合力を産み出しているtight-junctionを酵素処理で十分に消化・切断しておくことが必要な条件となる．

Tissue-printing法は，以下に述べるように，光学的測定用の単離細胞調整用として非常に優れている．

1．ピペッティングによる損傷が少なく，長い樹状突起の嗅細胞を単離することが可能である．

2．Trituration法よりも長い樹状突起の嗅細胞を単離することが容易であり，嗅小胞と細胞体との信号を分けて測定・比較する実験に適している．

3．約300 μm角の嗅上皮小片1つからでも，顕微画面内に複数の嗅細胞を高密度に単離することが可能な高単離収率を持っている．

4．単離嗅細胞をカバーグラス上に高密度に接着できるため，同時測定できる細胞数を増やすことができる．

5．組織片表面に並んだ嗅細胞は，酵素処理によって相対的位置関係を大きく変化させることなく疑似的に解離状態となると仮定すれば，tissue-printing法による単離嗅細胞は，組織内の相対的な位置関係をほぼ保存した状態とみなすことができる．従っ

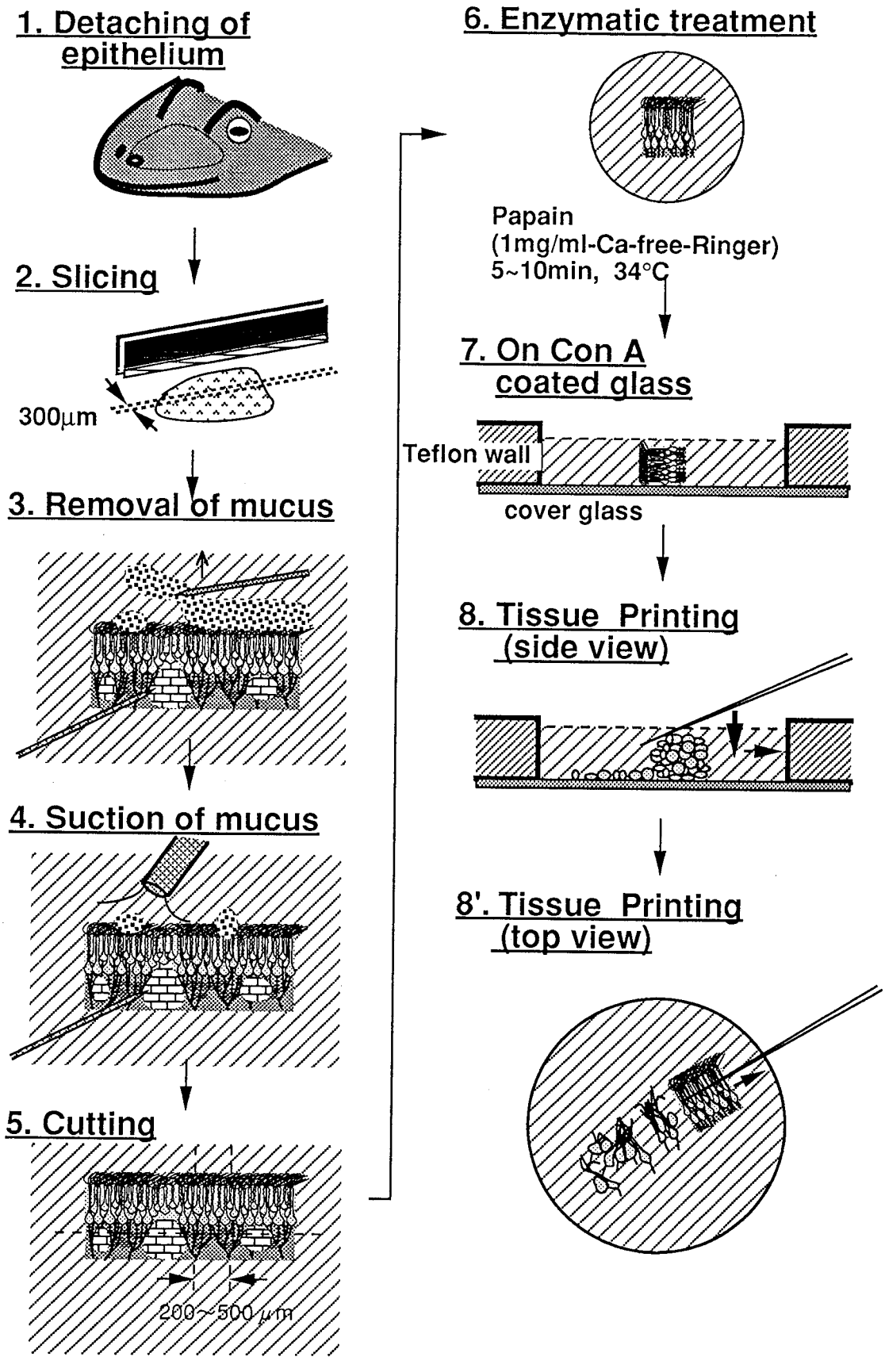


図 9　Tissue-printing法の手順 [35)]

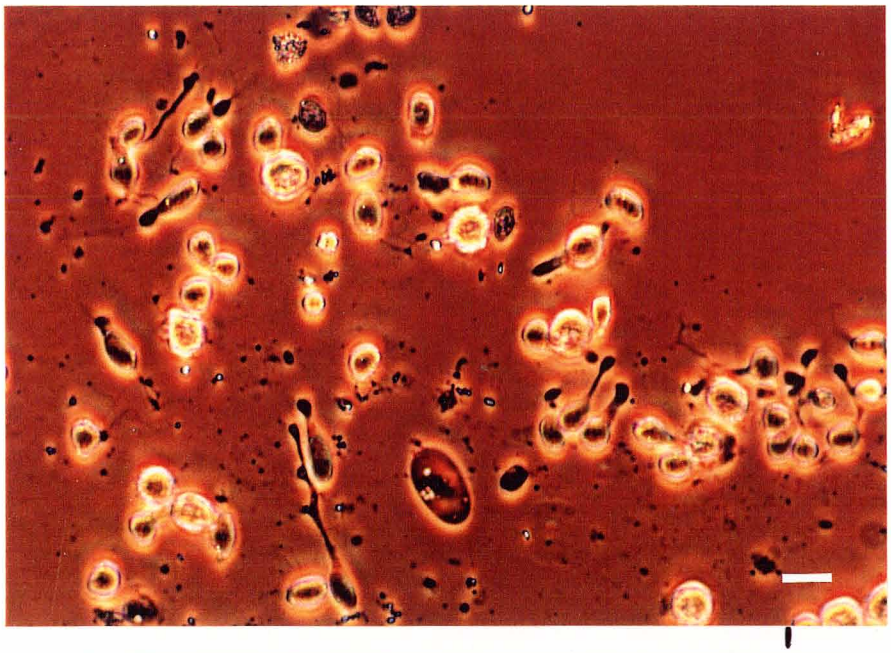
て，300 μm程度の距離内で細胞の相対的な位置関係とニオイ応答性の関係を調べることが可能となる．

6．単離細胞であるので光学測定において高いS/N比の信号が得られる．

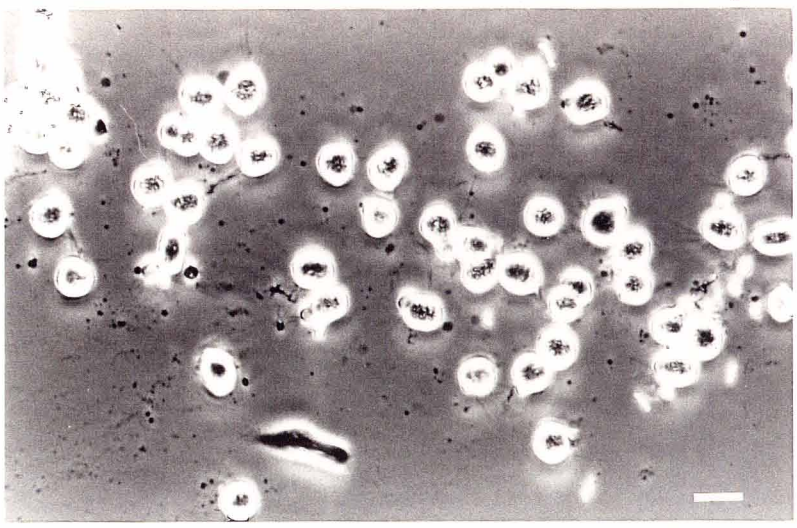
Tissue-printing法は，酵素処理した嗅上皮小片を弾力性を持つガラスピペットで細胞接着剤をコートしたカバーグラス上にそっと押し当てるようにして転がすことによって，細胞をカバーグラス上に直接かつ連続的に単離する方法である．従って，単離される嗅細胞は組織表面にある疑似的に解離状態になった細胞のみである．また，用いるガラスピペットは，パッチピペットよりも弾力性を持つように作成し，printing中に組織片がカバーグラスに強く押しつけられるのを防ぐことが重要である．過度の圧迫は，単離嗅細胞を潰してしまう結果となる．図10に得られた単離嗅細胞を動物ごとに１例ずつ示す．図８に比べて，非常に密度が高く，底面への接着がしっかりしている様子が理解される．

6．　fura-2の細胞内負荷

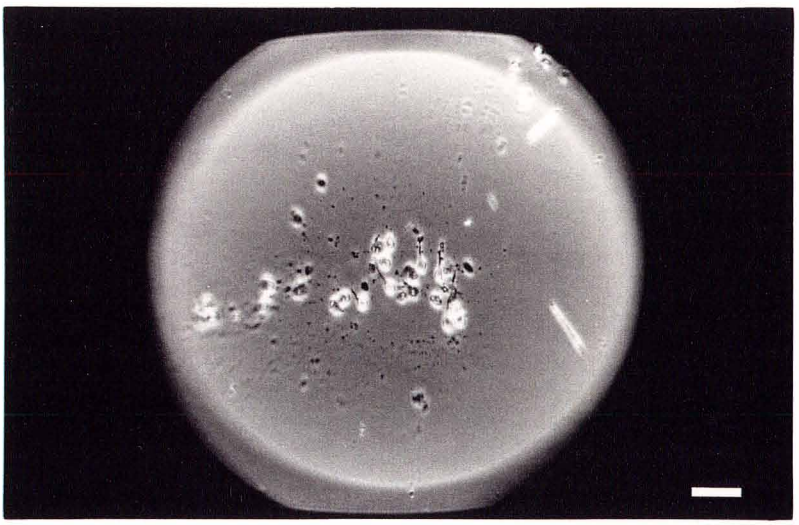
カバーグラス上に単離嗅細胞を接着後，fura-2/AM溶液へのインキュベーションによりfura-2の細胞内負荷を行なった．カエル嗅細胞に対しては，DMSOに溶かしたfura-2/AMを５μMの濃度でGIT培養液に溶かし，25℃で1.5～２時間暗所でインキュベーションした[10]．インキュベーション溶液中のDMSO濃度は，１％となるように調整した．fura-2/AMによるfura-2の負荷効率は，マウス，イモリ，カエルの中ではカエルの嗅細胞が最も低かった．イモリ嗅細胞は，パッチクランプ下での電流応答と$[Ca^{2+}]_i$変化の同時測定に用い，パッチピペットから直接fura-2を負荷した．マウス嗅細胞に対しては，最終濃度で５μMとなるようにDMSOで溶かしたfura-2/AMを正常リンゲル液とDulbecco修正Eagle培地の等量混液に加えた溶液に細胞を浸し，CO_2インキュベータ（日立製）中に37℃で20分間静置した．DMSOの最終濃度は，0.5％になるように調整した．嗅細胞は，fura-2/AM溶液へのインキュベーション終了後，正常リンゲル液で20～30分洗浄した．



(a)



(b)



(c)

図10　Tissue-printing法によって得た単離嗅細胞の例

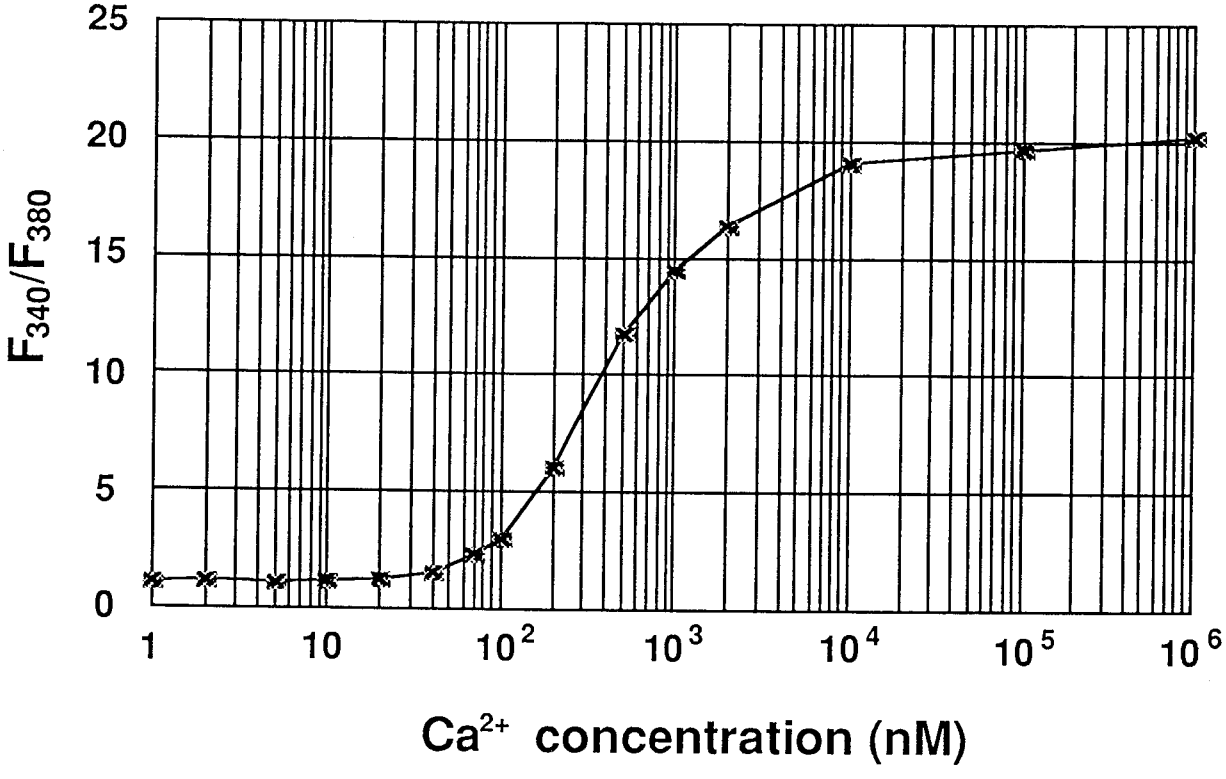
(a)カエル単離嗅細胞，2.5倍投射レンズ，バーの長さは20 μmを表す．(b)イモリ単離嗅細胞，2.5倍投射レンズ，バーの長さは20 μmを表す．(c)マウス単離嗅細胞，TV用 1 倍投射レンズ，バーの長さは50 μmを表す．対物レンズは全て40倍．

7．　$[Ca^{2+}]_i$の算出法

$[Ca^{2+}]_i$の算出は，Tsienらの方法に従い[32]，Ca^{2+}-EGTA緩衝系によりCa^{2+}濃度を調整したfura-2標準溶液を用い，２励起波長での蛍光強度の比：$R_{340/380}=F_{340}/F_{380}$と$Ca^{2+}$濃度の関係を求めた．カエル嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$算出用の標準$[Ca^{2+}]_i$溶液は，EGTAと$Ca^{2+}$の解離定数をKd＝$1.51\times10^{-7}$として，110 mM KCl，10 mM K-MOPS，５μM fura-2，２ mM $CaCO_3$，pH 7.2と110 mM KCl，10 mM K-MOPS，５μM fura-2，10 mM EGTA，pH 7.2を混合・調整した．340 nm励起及び380 nm励起での蛍光強度それぞれから暗時の背景雑音を引いた値，F_{340}とF_{380}とを用いて計算した比：$R_{340/380}=F_{340}/F_{380}$を求めたグラフが，図11に示す$[Ca^{2+}]_i$の校正曲線である．ここで，40 nM～500 nMの範囲は$\log([Ca^{2+}])$と$\log(R_{340/380})$の直線回帰でよく近似でき，誤差は10％以内であったので，この回帰係数を用いて$[Ca^{2+}]_i$を計算した．

嗅細胞での刺激に対する$[Ca^{2+}]_i$変化を求める為に，同じ刺激に対して励起波長を変えて２度測定して$R_{340/380}$を計算し，これを上記の回帰式にあてはめた．しかしながら，全ての刺激に対して励起波長を変えて２度ずつ測定を行なえば，紫外線照射時間も増え，細胞活性の劣化につながることが予想される．従って，同一細胞で様々な刺激に対する応答を調べる為には，照射時間を少なくする工夫が必要になる．また，刺激に応答する度にfura-2の蛍光強度は減少していったが，各刺激前の蛍光強度で規格化すると，同じ刺激に対する蛍光強度変化に比較的良好な再現性がみられた．そこで，多くの刺激に対しては一方の励起波長のみで測定を行ない，これを蛍光消光分を補正して$[Ca^{2+}]_i$を算出のために測定したペアの励起波長データの内の同じ波長データと対応させて$[Ca^{2+}]_i$の値を算出した．

マウスに対する標準$[Ca^{2+}]_i$溶液は，152 mM KCl，10 mM K-MOPS，５μM fura-2，２ mM $CaCO_3$，pH 7.4と152 mM KCl，10 mM K-MOPS，５μM fura-2，10 mM EGTA，pH 7.4をEGTAのCa^{2+}に対する解離定数Kd＝5.52×10^{-8}として，混合・調整した．後者の解離定数は，Blinksらの方法[36]により，EGTAの解離定数Kd＝1.51×10^{-7}をpH，温度，イオン強度に対して補正して求めた[37]．イオン強度I_sに対する補正は，Restrepoらの結果[38]から補正係数



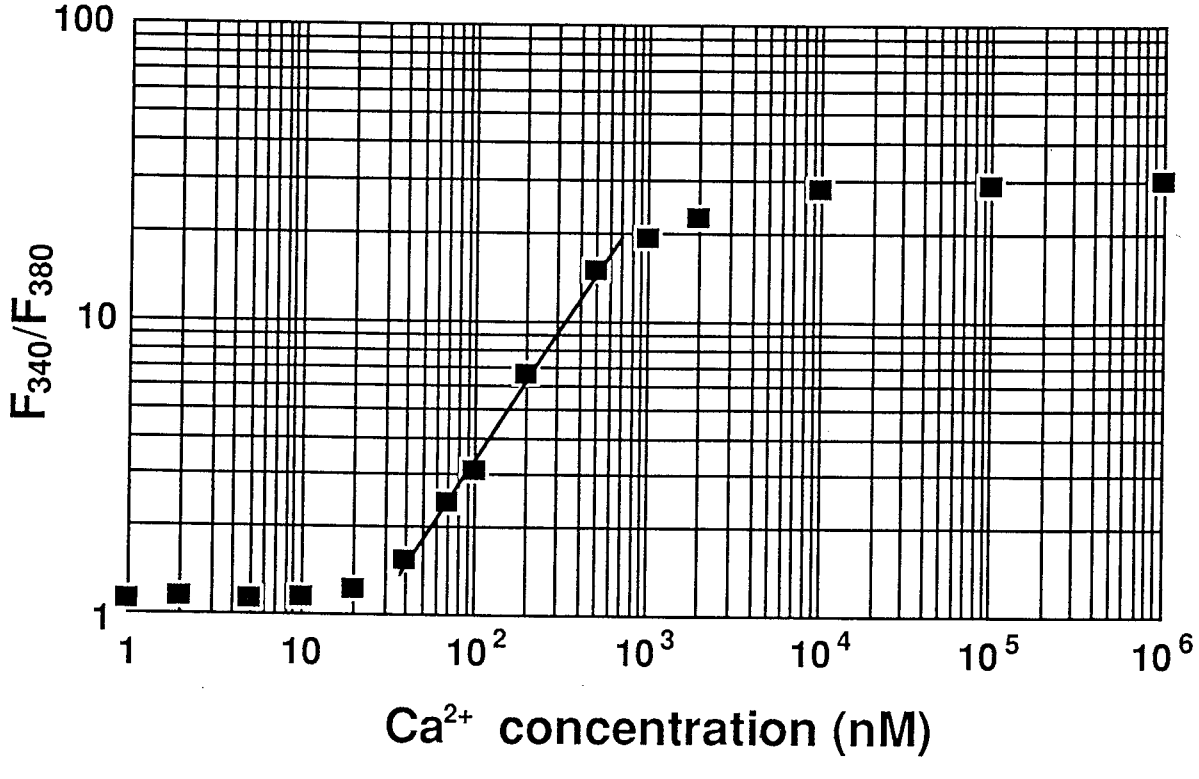


図11　カエル嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$測定における蛍光強度比と$[Ca^{2+}]_i$校正曲線

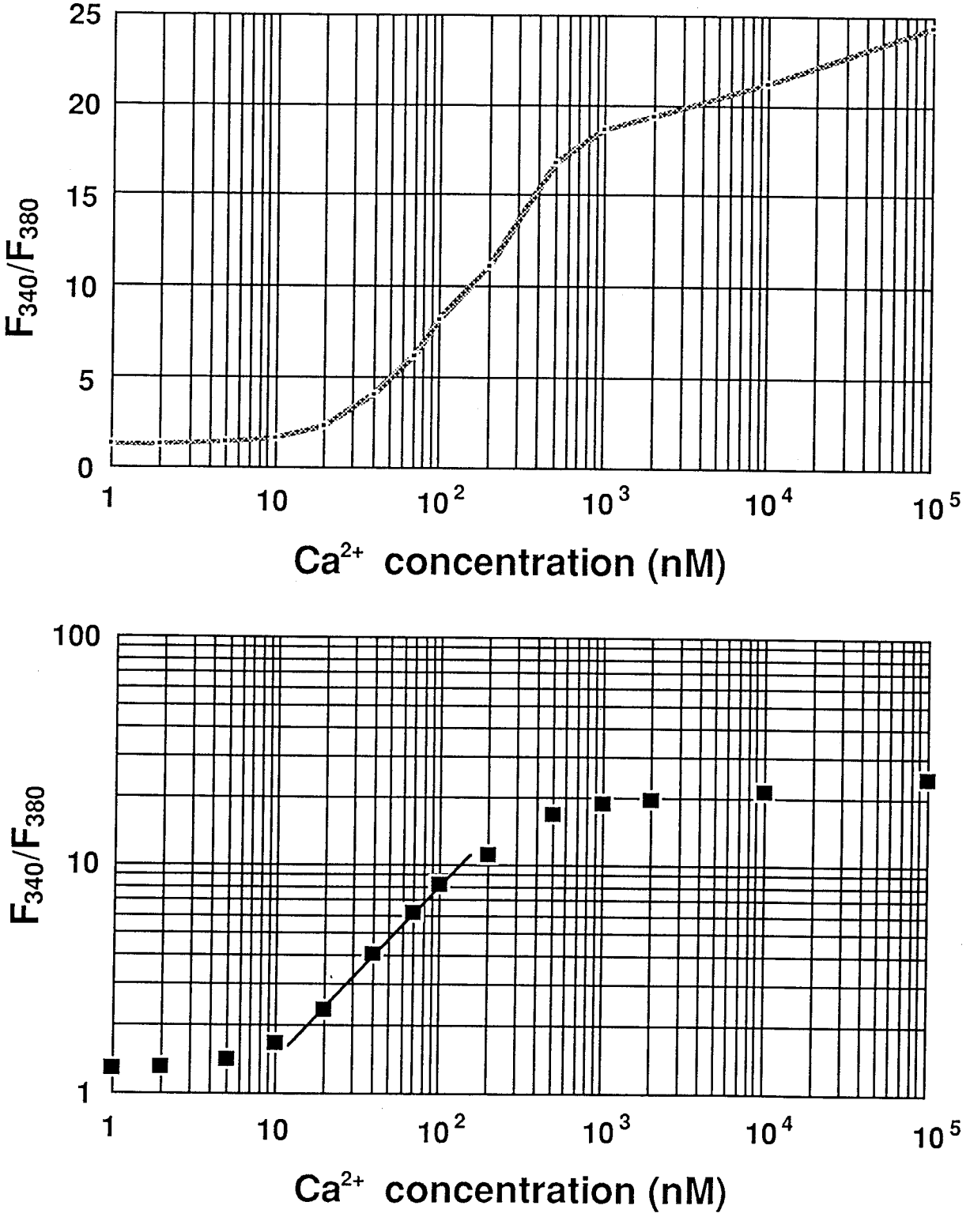


図12　マウス嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$測定における蛍光強度比と$[Ca^{2+}]_i$校正曲線

を求めて得た関係式：$\log(Kd) = 4.8 \times I_s^2 - 2.7152 \times I_s + 7.1168912$ によって行なった．マウスの実験条件に対して得られた蛍光強度比と$[Ca^{2+}]_i$との校正曲線を図12に示す．

第Ⅳ章.　ニオイ刺激による電気生理的応答と$[Ca^{2+}]_i$応答

1.　嗅細胞の蛍光性と静止状態での$[Ca^{2+}]_i$

カエル嗅粘膜スライスは，紫外線照射時に嗅上皮部分のみが白く光ってみえた．これが強い背景光になり，fura-2による$[Ca^{2+}]_i$測定において高いS/N比が得られなかった[33]．一方，単離嗅細胞は，510nm付近に自家蛍光をほとんど持たず，fura-2の細胞内ロードによって初めて蛍光が検出された[34, 39]．細胞内でfura-2/AMからfura-2への変換が行なわれていることを確認するために，Ca^{2+}イオノフォアであるイオノマイシン投与によるCa^{2+}流入で生じる$[Ca^{2+}]_i$上昇とMn^{2+}流入によるfura-2の消光を調べた．イオノマイシン投与により，非常に長い遅延時間を持つ蛍光強度比F_{340}/F_{380}の増大が生じ$[Ca^{2+}]_i$上昇が示され，Mn^{2+}投与によって嗅細胞の蛍光が不可逆的に消光し，F_{340}/F_{380}は減少し１に近づいた（図13）[34, 39]．これらの結果は，fura-2/AM溶液によるfura-2の細胞内ロードの成功を示唆している．図13は，３つの嗅細胞の測定結果を示しており，グラフ中の部位名の後ろに付けた“１”は，細胞１の異なる部位であることを意味している．この結果は，部位によらず同様の蛍光変化が生じていることが示されている．カエル嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$は，静止状態で38±19 nM（平均値±標準偏差，細胞数14）であった．マウスでは，さらに低く数nMの細胞も見られた．

2.　ニオイ刺激による嗅細胞内$[Ca^{2+}]_i$上昇

ニオイ刺激により一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じることが，380nm励起時の蛍光減少と340nm励起時の蛍光増大により示された[39]．カエルの結果を図14に，マウスの結果を図15に示す．これらのデータは，２つの励起波長の蛍光強度変化が鏡像関係に近いものになっており，fura-2/AMからfura-2への変換が細胞内で十分に行なわれていることを示している．ニオイ刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇の開始時期について35個のカエル嗅細胞で調べた結果，69％が明らかに刺激期間中に$[Ca^{2+}]_i$上昇が開始し，９％で刺激終了後の開始が示唆された．残り

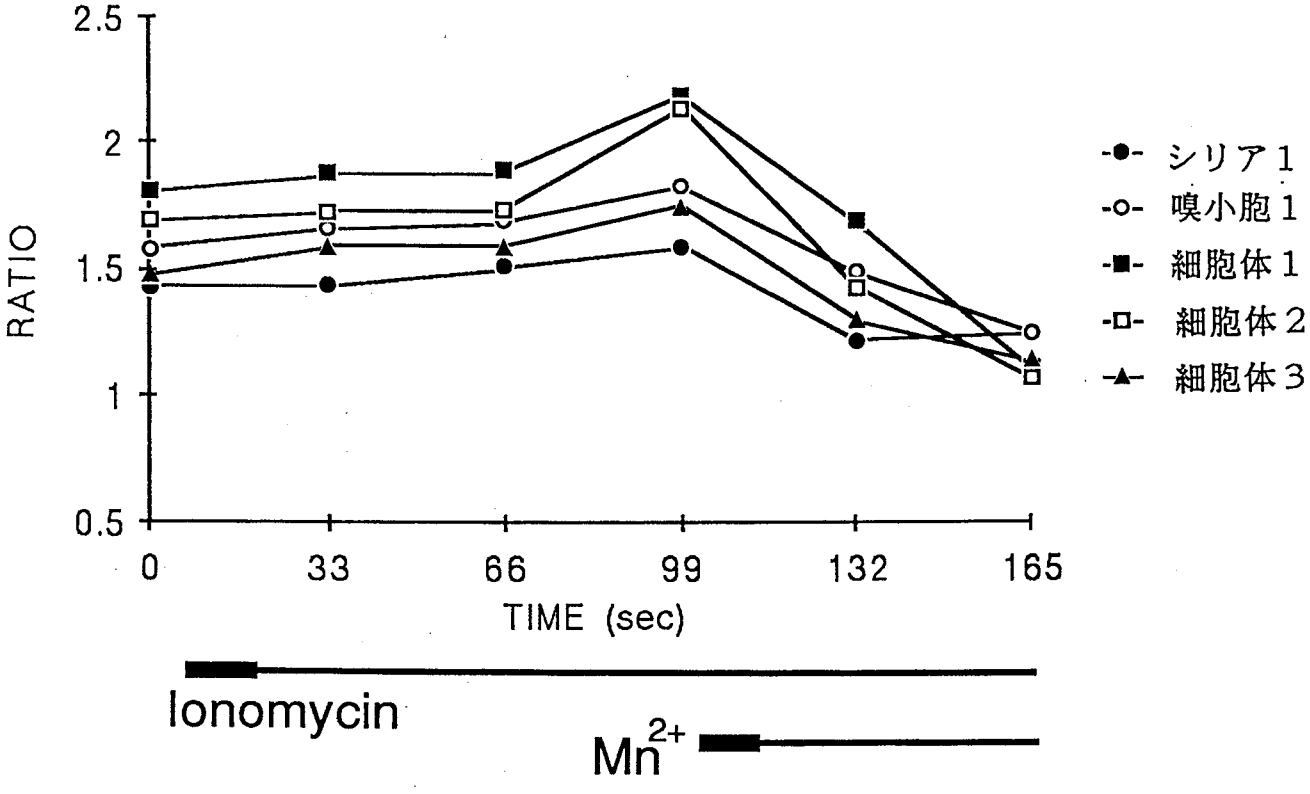


図13　イオノマイシンによる$[Ca^{2+}]_i$上昇とMn^{2+}の細胞内流入による消光[34)]

縦軸のRATIOは，340 nm励起での蛍光強度と380 nm励起での蛍光強度の比を示す．部位名の後ろに付いた数字は，細胞の番号を表している．グラフは３つの嗅細胞の部位毎の$[Ca^{2+}]_i$変化を示すものである．

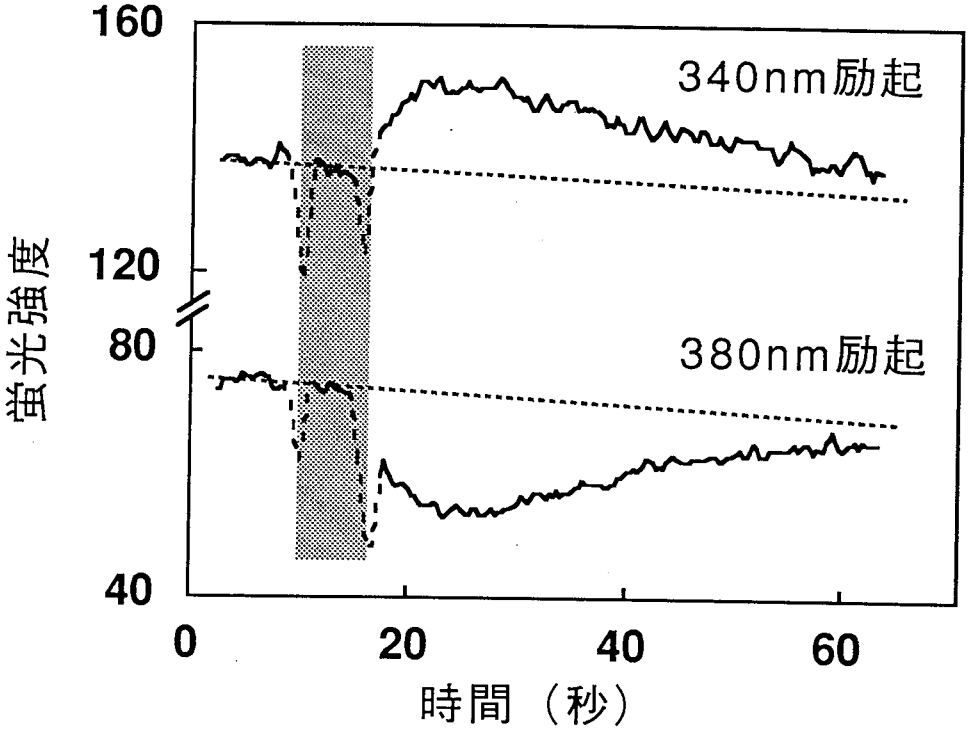


図14　ニオイ刺激によるカエル嗅細胞内fura-2の蛍光強度変化.

380 nmの励起波長での蛍光強度は一過性に減少し，340 nmの励起波長での蛍光強度は一過性に増大する．両者の変化はほぼ鏡像関係にあり，fura-2に変換されないfura-2/AMが無視できる程度であることとニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$変化は濃度増大であることを示している．10 mMのイソアミルアセテート刺激（バナナ臭）は影を付けた期間だけ与えた．トレースの破線部分は，刺激溶液交換時の泡によるアーティファクト．

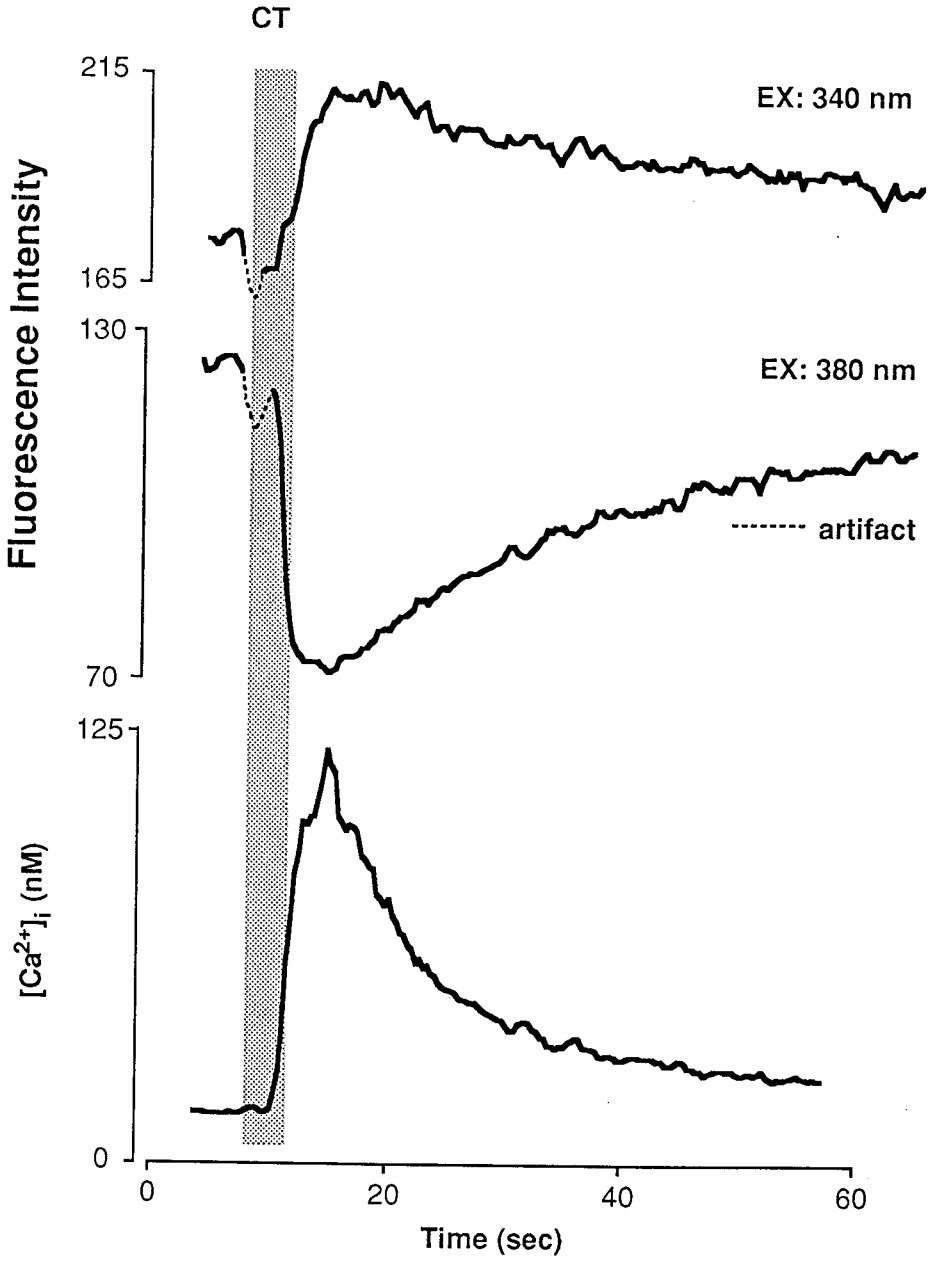


図15　ニオイ刺激によるマウス嗅細胞内fura-2の蛍光強度変化と$[Ca^{2+}]_i$の計算値

380 nmの励起波長での蛍光強度は一過性に減少し，340 nmの励起波長での蛍光強度は一過性に増大する．両者の変化はほぼ鏡像関係にあり，fura-2に変換されないfura-2/AMが無視できる程度であることとニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$変化は濃度増大であることを示している．100 μMのシトラルバ刺激（柑橘臭）は影を付けた期間だけ与えた．トレースの破線部分は，刺激溶液交換時の泡によるアーティファクト．$[Ca^{2+}]_i$は，F340/F380を計算し図11の校正曲線によって求めたもの．

の22%は刺激終了前後のいずれか同定出来なかった．図14，15の結果は，刺激直後あるいは刺激中に$[Ca^{2+}]_i$上昇が開始する例である．刺激後に$[Ca^{2+}]_i$上昇が開始する例として，カエル嗅細胞でシトラルバ刺激に対して得られた結果を図16に示す．また，ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇のピーク値は，最大で静止状態の３～４倍程度であった．ニオイ応答時，数十秒周期の$[Ca^{2+}]_i$振動の起こる細胞もみられた．

３．　嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$に対する考察

カエルの嗅細胞では，静止状態の$[Ca^{2+}]_i$が38 nMとなり，ナマズで得られた23 nM[13] の1.5倍程度で比較的近い値であった．これらの結果は，いずれも蛋白質を含まないCa^{2+}標準溶液を用いて算出された$[Ca^{2+}]_i$であり，他の測定方法による結果や蛋白質の影響を考慮した結果と比較すると低くなっている．実際の細胞内には多量の蛋白質が存在し，fura-2の見かけのCa^{2+}解離定数を高めるなどの特性変化を生じさせる[40] と考えられている．80 mgのアルブミンを加えたCa^{2+}標準液で算出した神経細胞の$[Ca^{2+}]_i$は，他の測定結果と良く一致すると報告されている[40]．従って，実際の嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$は，本稿での計算値より１桁前後は大きいと考えた方がよいだろう．

一部には応答開始の早い細胞もあったが，一般的に，ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇の遅延時間は，秒単位の細胞が多かった．この原因として，３つの可能性が考えられる．第１は，投与したニオイ物質に対する感度が低い場合である．この時，細胞内でのcAMPの蓄積に時間を要するため，トランスダクションチャネルの活性化も早く起こらず，$[Ca^{2+}]_i$上昇開始も遅くなると考えられる．第２には，細胞内の蛋白質などによりCa^{2+}が緩衝されるため，初期のCa^{2+}増加は濃度の増大につながらないということも考えられる．しかしながら，Ⅵ章で述べるように，この可能性は高K^+刺激を用いた実験によって主要因からは排除される．第３の点は，ニオイ刺激が高濃度の為に嗅細胞の興奮が抑制されている場合である．この時，ニオイ物質はK^+チャネルブロッカーとして働いているのかも知れない．

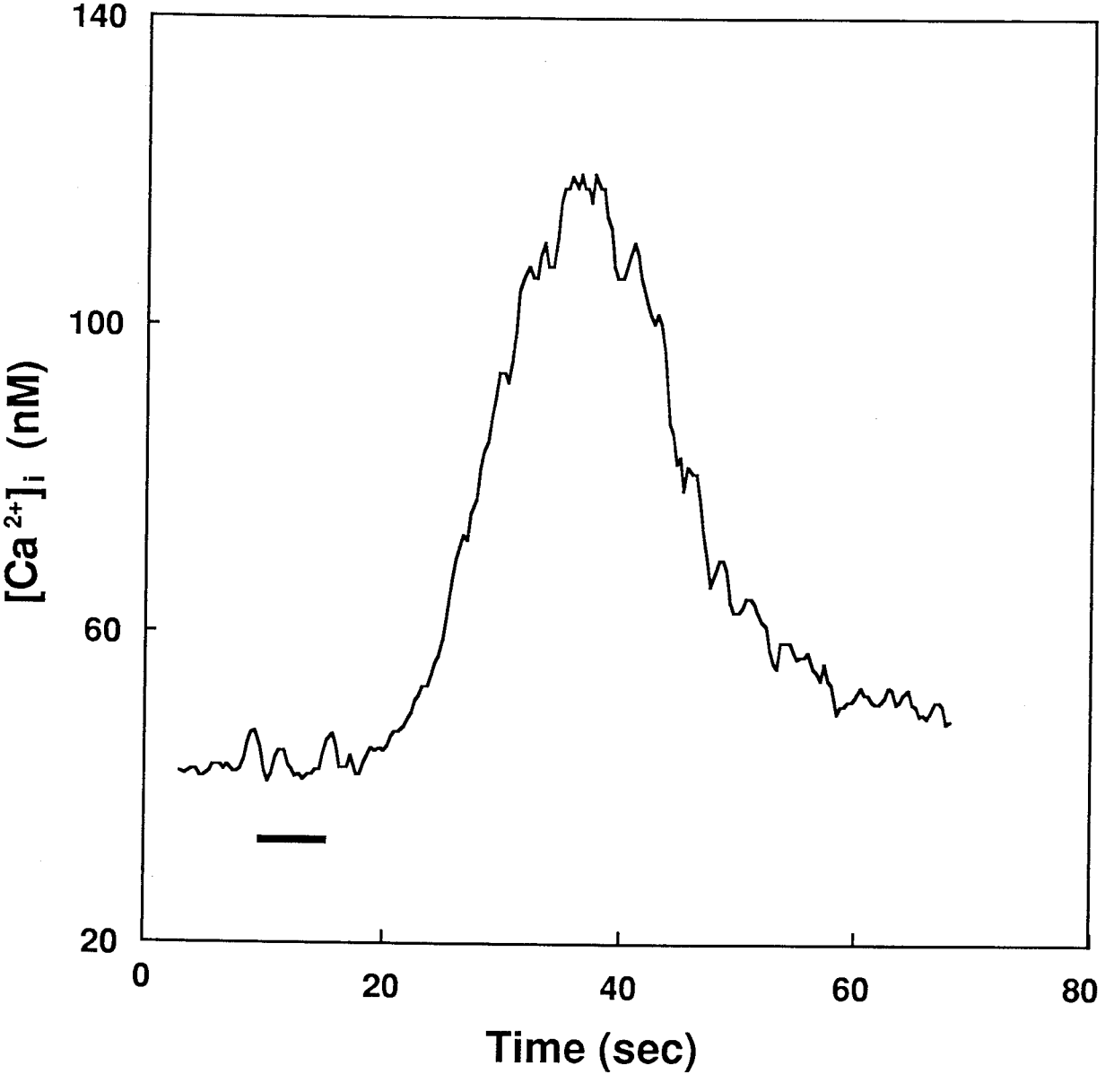


図16　ニオイ刺激終了後に$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じる応答例

刺激は，バーで示した７秒間にシトラルバ刺激を与えた．動物は食用カエル．

$[Ca^{2+}]_i$上昇の応答遅延時間については，on-，off-応答[41]と対応している可能性もあるが，この点に関してはまだ不明確である．但し，図16の細胞で，10秒以上はなして２連刺激を行なってみたところ，それぞれの刺激に対して$[Ca^{2+}]_i$上昇がみられたが，１度目のニオイ刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇期に２度目のニオイ刺激を投与した時，２度目の刺激に対する$[Ca^{2+}]_i$上昇に比べ１度目の$[Ca^{2+}]_i$上昇が抑制されるように思われた．これは，off-応答を支持する結果と解釈することができる．

４．　Patch-clamp法による電気生理的応答測定と蛍光法による$[Ca^{2+}]_i$測定の同時記録の方法

ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇と電気生理的応答との対応関係を確認するために，イモリ単離嗅細胞を用いて$[Ca^{2+}]_i$とパッチクランプ法による電気生理的応答の同時測定を行なった．単離嗅細胞を常法に従いホールセルクランプし，膜電位固定下において嗅シリア付近にニオイ刺激溶液を吹き付けたときの電流応答を記録した．測定装置は，パッチ用アンプ（Axon Instrument社製，Axopatch-1B），A/D-D/Aインターフェイス（Scientific Solutions社製，Lab Master DMA；Axon Instrument社製，TL-1），IBM-PCコンパチ機（Sanyo，MBC-17JF）を用い，制御ソフトとしてpClamp Ver.3（Axon Instrument社製）を用いた．ニオイ刺激は，Kurahashiの方法[10]と同様に，ホールセル用のパッチピペットと同様の微小ピペットを用いて，電磁弁の開閉によりレギュレーターで設定した圧力がピペット内部にかかるようにして一定の時間だけニオイ刺激溶液を細胞にの吹き付けて投与した．$[Ca^{2+}]_i$を測定するためにfura-2を細胞内にロードすることが必要であるが，これはパッチピペット内にfura-2を含む疑似細胞内液を入れておくことによって，ホールパッチクランプ形成後におこる細胞内灌流により行なった．疑似細胞内液の組成は，K^+チャネルをブロックするために，120 mM CsCl，1 mM fura-2，2 mM HEPES，pH 7.2とした．ホールパッチクランプは，蛍光用40倍対物レンズでの観察下で行ない，クランプ形成後，１～２分程度経過し細胞内

灌流により細胞内にfura-2がロードされてから，同時測定を行なった．この時の励起波長は，380 nmを用いた．

5． 電気生理的応答と$[Ca^{2+}]_i$上昇の動特性の比較

5秒間の10 mMイソアミルアセテート刺激に対するイモリ単離嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$変化と電気生理的応答の同時測定結果を図17に示す．-70mVに膜電位を固定した条件では，ニオイ刺激によって誘起される内向き電流と$[Ca^{2+}]_i$上昇が同時に生じることが示された[18, 30]．この細胞では，受容器電位発生期と$[Ca^{2+}]_i$上昇の立ち上がり期の長さもほぼ一致していた．$[Ca^{2+}]_i$変化を時間微分した結果，内向き電流のピークと$[Ca^{2+}]_i$変化率のピークが一致した．これは，cAMPの細胞内注入による内向き電流と$[Ca^{2+}]_i$上昇の時間特性[22] と一致する結果である．上記の結果は，同じ嗅細胞で行なった3回の測定において確認されたが，ピペットからの持続的なfura-2ロードが原因と思われるバックグラウンド蛍光の上昇が重畳していた．また，内向き電流のピーク値は，刺激の度に徐々に小さくなる 傾向 が見られた．同時測定は，2例成功し，他の一例では，電流応答の回復が緩慢であり，内向き電流発生期の方が$[Ca^{2+}]_i$上昇期よりも長かった．但し，電流応答が終了するまで記録出来なかった為，時間の差の程度ははっきりとは分からない．

6． 電気生理的応答と$[Ca^{2+}]_i$上昇の関係についての考察

測定に成功した例数が少ない為にあいまいさは残っているが，$[Ca^{2+}]_i$上昇が嗅細胞のニオイ応答即ち，内向き電流による脱分極性の受容器電位発生を反映していることが示された．ニオイ刺激によって嗅細胞が脱分極すれば，電位依存性Ca^{2+}チャネルからCa^{2+}流入が生じるため，細胞内Ca^{2+}濃度は必ず上昇するはずである．ニオイ応答時の内向き電流は，phasicとtonicの2相性の応答があることが報告されている[21]．受容器電位の発生期間がニオイ刺激期間の長さに依存せず一過性で非常に短くなる場合，細胞内のCa^{2+}緩衝作用によ

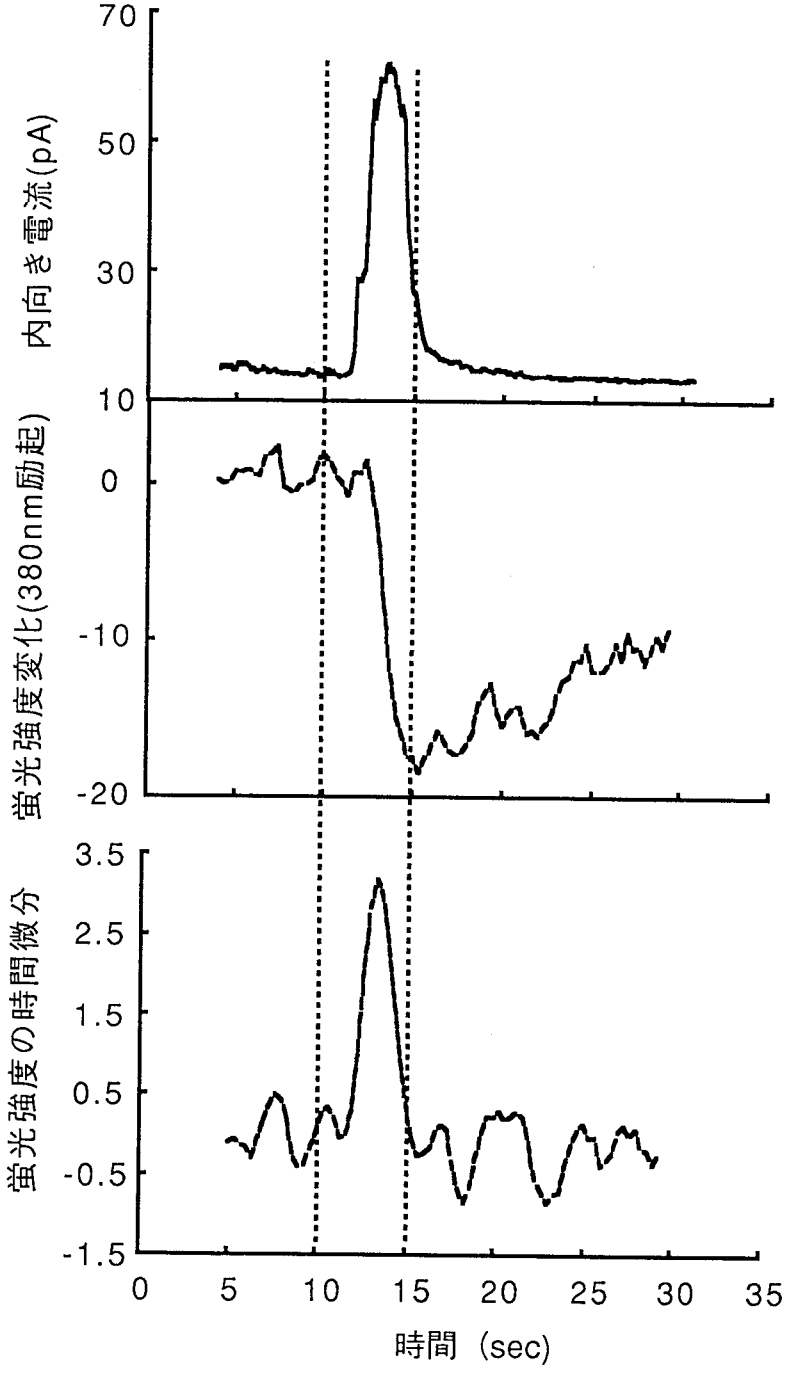


図17　ニオイ誘起内向き電流と$[Ca^{2+}]_i$応答の同時測定[18)]

patch-clamp法を用いてwhole-cell-clamp状態で細胞膜電位を-70 mVに固定し，イモリ嗅細胞の電流応答と380nmの励起波長での$[Ca^{2+}]_i$変化に対応する蛍光変化を同時記録したもの．蛍光強度の減少が$[Ca^{2+}]_i$上昇に対応する．10 mMのイソアミルアセテート刺激は２本の破線で挟まれた期間だけ与えた．

って，応答が有為な$[Ca^{2+}]_i$上昇として検出されない可能性もあるが，内向き電流のphasic成分は１秒程度は持続している[21]ことから，ニオイ応答時に$[Ca^{2+}]_i$上昇がみられないケースはごく稀であろうと推測される．

第Ⅴ章.　同一細胞でのニオイ応答とcAMP誘起応答の比較

ニオイ受容の信号増幅機構として，cAMP系セカンドメッセンジャーが提唱され，これを裏付ける多くの生理学的あるいは生化学的データがこれまでに報告されている．しかしながら，同一の細胞においてニオイ応答とその応答へのcAMP系の寄与を確認した実験はなかった．そこで，個々の細胞の応答としての$[Ca^{2+}]_i$測定によって，同一の細胞においてニオイ応答とcAMP誘起応答の比較を試みた．cAMP系の活性化による応答を起こさせるために，cAMP合成酵素の特異的活性化剤として知られているフォルスコリン（FK）を用い，ニオイ刺激とフォルスコリン刺激を独立に与えた時の$[Ca^{2+}]_i$変化を記録し比較した．

1．　forskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇とニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇の比較

図18，図19に，単一のカエル嗅細胞から得られたニオイ応答とcAMP誘起応答（刺激投与は点線で挟まれた期間）の典型的な例を示す[11]．図18の嗅細胞は，100 μMシトラルバ(CT，柑橘臭)に対して一過性の大きな応答を示し，10 mMイソアミルアセテート(AM，バナナ臭)及び無臭刺激には明確な応答を示さなかった．また，図19に示す別の嗅細胞は，ニオイ選択性が異なりCTとAMいずれにも応答し，$[Ca^{2+}]_i$上昇は，図18の細胞と同様にニオイ刺激期間中に開始した．刺激順は，図18の嗅細胞ではAM（380 nm），AM（340 nm），FK（380 nm），CT（380 nm），CT（340 nm），FK（380 nm），リンゲル（380 nm），FK（380 nm），図19の嗅細胞ではCT（380 nm），AM（380 nm），…，CT（380 nm），…，FK（380 nm），…で与えた．複数回与えた刺激においては，再現性が確認された．

一方，FKによる$[Ca^{2+}]_i$上昇は，多くの嗅細胞でニオイ応答の応答開始より少し遅れて始まる傾向にあった[11, 18, 35]．この結果は，図18，図19の測定結果にも明確に現われている．図18の嗅細胞では，立ち上がり特性がシトラルバに対する応答と非常に良く似ていた．FKに対して応答した嗅細胞は，カエルでもマウスでも調べた細胞の５割以上であった．カエル嗅細胞では，フォルスコリンによる$[Ca^{2+}]_i$上昇は，ニオイ応答と同程度かニオイ応

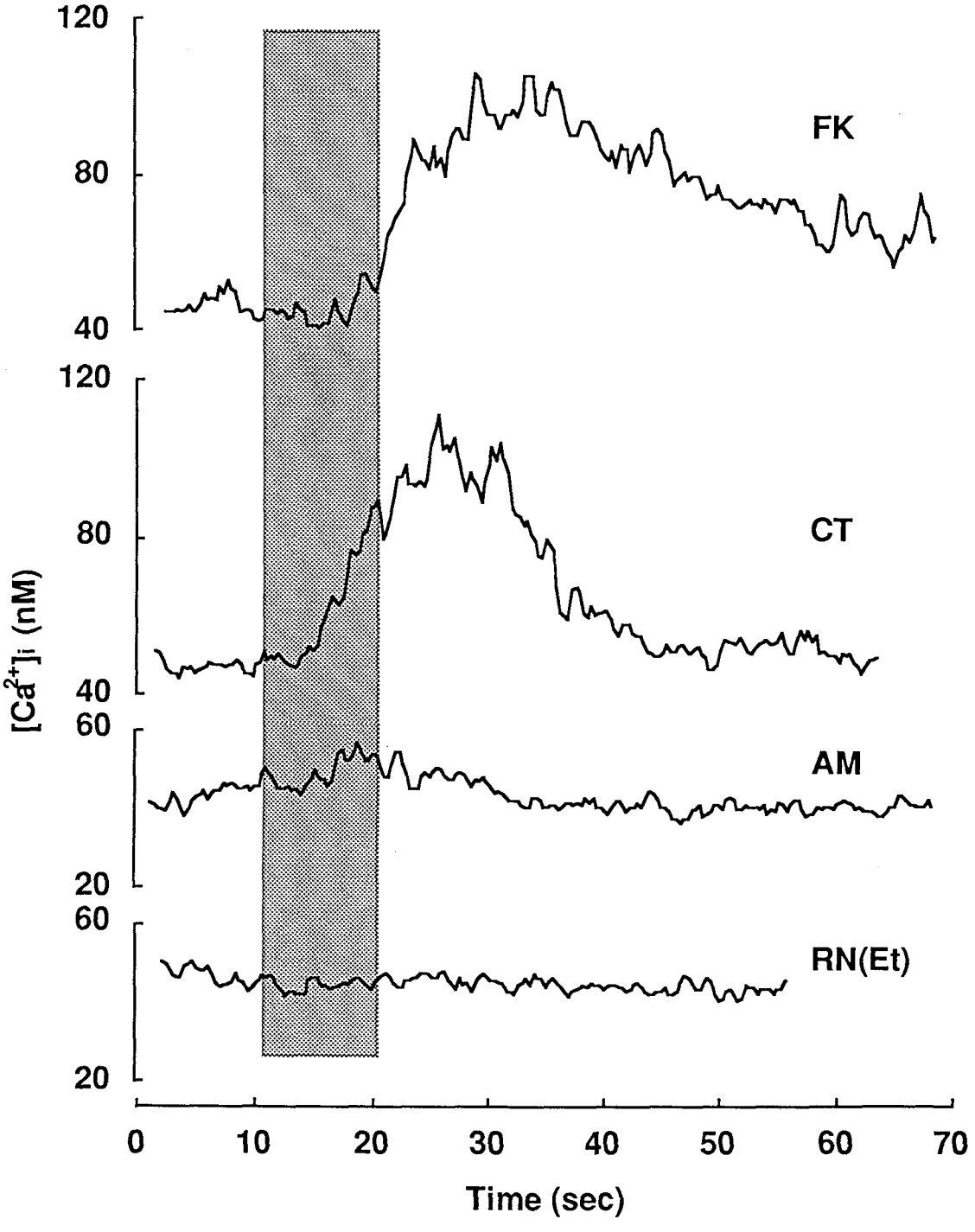


図18　嗅細胞のニオイ誘起及びforskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$応答[11)]

ニオイ刺激（100 μM シトラルバ：CT，10 mM イソアミルアセテート：AM）とforskolin（2 μM：FK）刺激によって誘起される一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇．これらの記録は，1つのカエルの嗅細胞の細胞体から記録した．刺激は，影をつけた10秒間だけ与えた．RN(Et)は，FKに対するコントロール刺激でFKの溶媒としてのエタノールを含むリンゲル液．CT，AMに対する応答の$[Ca^{2+}]_i$値は，2励起波長での測定データの比から求め，FK，RN(Et)は380 nm励起で測定したデータから本文に記述した方法により求めた．

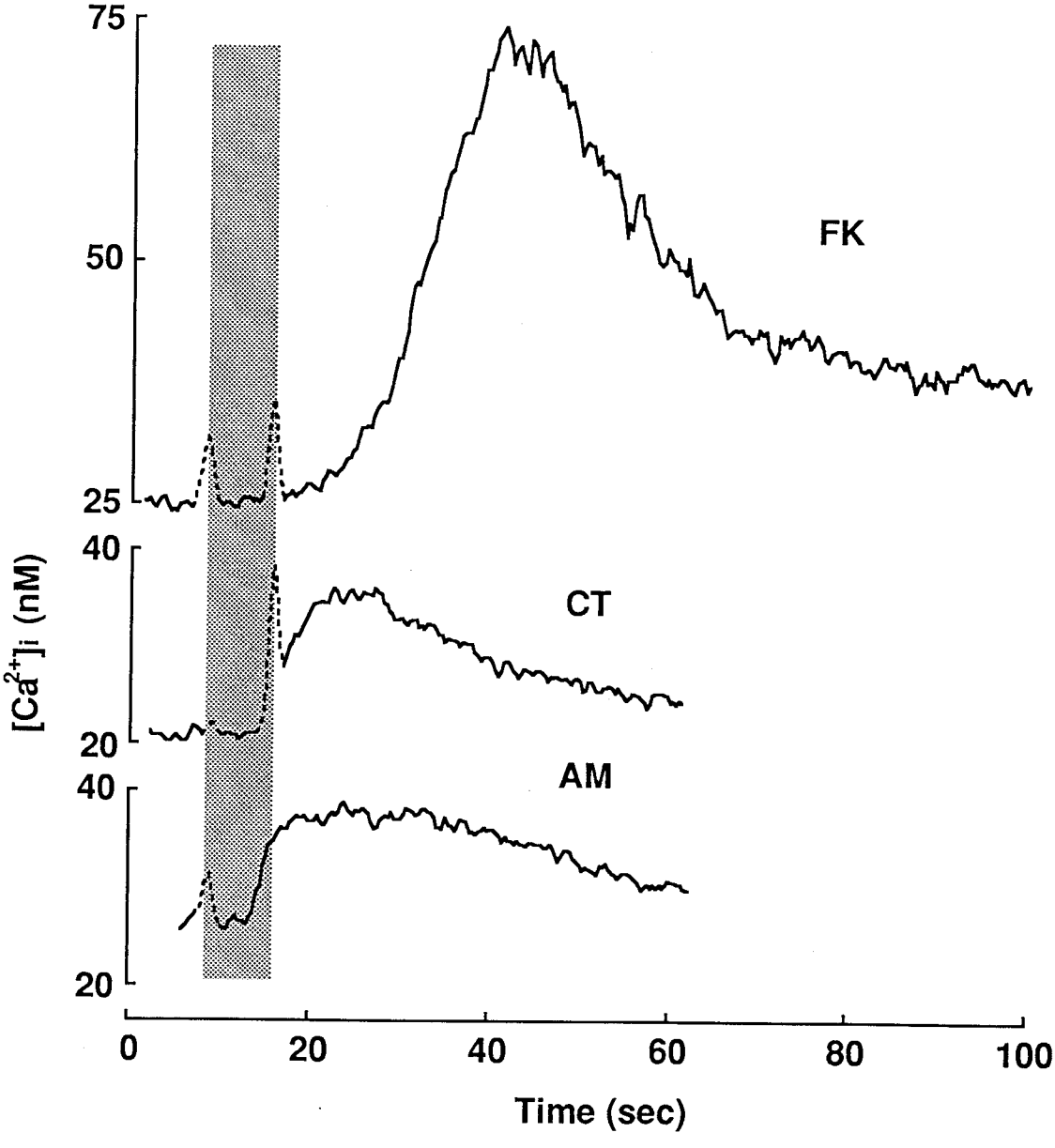


図19　嗅細胞のニオイ誘起及びforskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$応答[18)]

ニオイ刺激（100 μM シトラルバ：CT，10 mM イソアミルアセテート：AM）とFK刺激によって誘起される一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇．これらはCTとAM両者に応答し，図18のカエル嗅細胞とはニオイ選択性において異なるサブタイプであることが分かる．刺激は，影をつけた７秒間だけ与えた．$[Ca^{2+}]_i$値は，380 nm励起で測定したデータと混合臭応答の２励起波長測定データを用い本文に記述した方法により求めた．

答よりも大きいものがみられたが，マウスでは，一般的にフォルスコリン応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇は，ニオイ応答に比べて小さいように思われた．

2．　個々の嗅細胞のニオイ応答性とcAMP誘起応答

これまで，生理学的には１つの嗅細胞が複数のニオイに応答することが古くから知られていた[42-46]．ニオイ物質には，cAMPセカンドメッセンジャー系を活性化するものとIP_3セカンドメッセンジャー系を活性化するものがあると言われている[3]．嗅細胞のサブタイプとセカンドメッセンジャー系の関係を検討するために，cAMPセカンドメッセンジャー系のニオイ物質とIP_3セカンドメッセンジャー系のニオイ物質に対するニオイ選択性とcAMP誘起応答を比較した．cAMPセカンドメッセンジャー系のニオイ物質としてシトラルバ[3, 5]とイソアミルアセテートを用い，IP_3セカンドメッセンジャー系のニオイ物質としてピラジン（0.1～2 mM，PY，ピーマン臭）[3]を用い，個々の嗅細胞のニオイ選択性を同定し，同じ細胞のcAMP誘起応答の有無を$[Ca^{2+}]_i$応答を指標にして調べた．ニオイ刺激の濃度は，ニオイ選択性の完全な独立性を確認するために，高濃度に設定した．この結果，用いたニオイ種の組み合わせの数だけ，ニオイ選択性のサブタイプが存在していた．

図18のカエル嗅細胞は，100 μMシトラルバ(CT，柑橘臭)に対して一過性の大きな応答を示し，10 mMイソアミルアセテート(AM，バナナ臭)及びリンゲル液による無臭刺激には明確な応答を示さないことから，２種のニオイ刺激に限ればシトラルバ選択性の応答を持つといえる．また，図19に示す別の嗅細胞は，シトラルバとイソアミルアセテートいずれにも応答した．このように，カエル嗅細胞においてシトラルバとイソアミルアセテートに対する応答性を調べ，まとめたものが図20である[35]．両者のニオイに応答した細胞は，１例を除いて全てフォルスコリンに対しても応答を示した．tissue-printing法によって得た単離嗅細胞でも，trituration法による単離嗅細胞と良く一致する応答率を示した（図21）[18]．また，マウス単離嗅細胞をCELL-TAKで接着し，シトラルバ，イソアミルアセテート，ピ

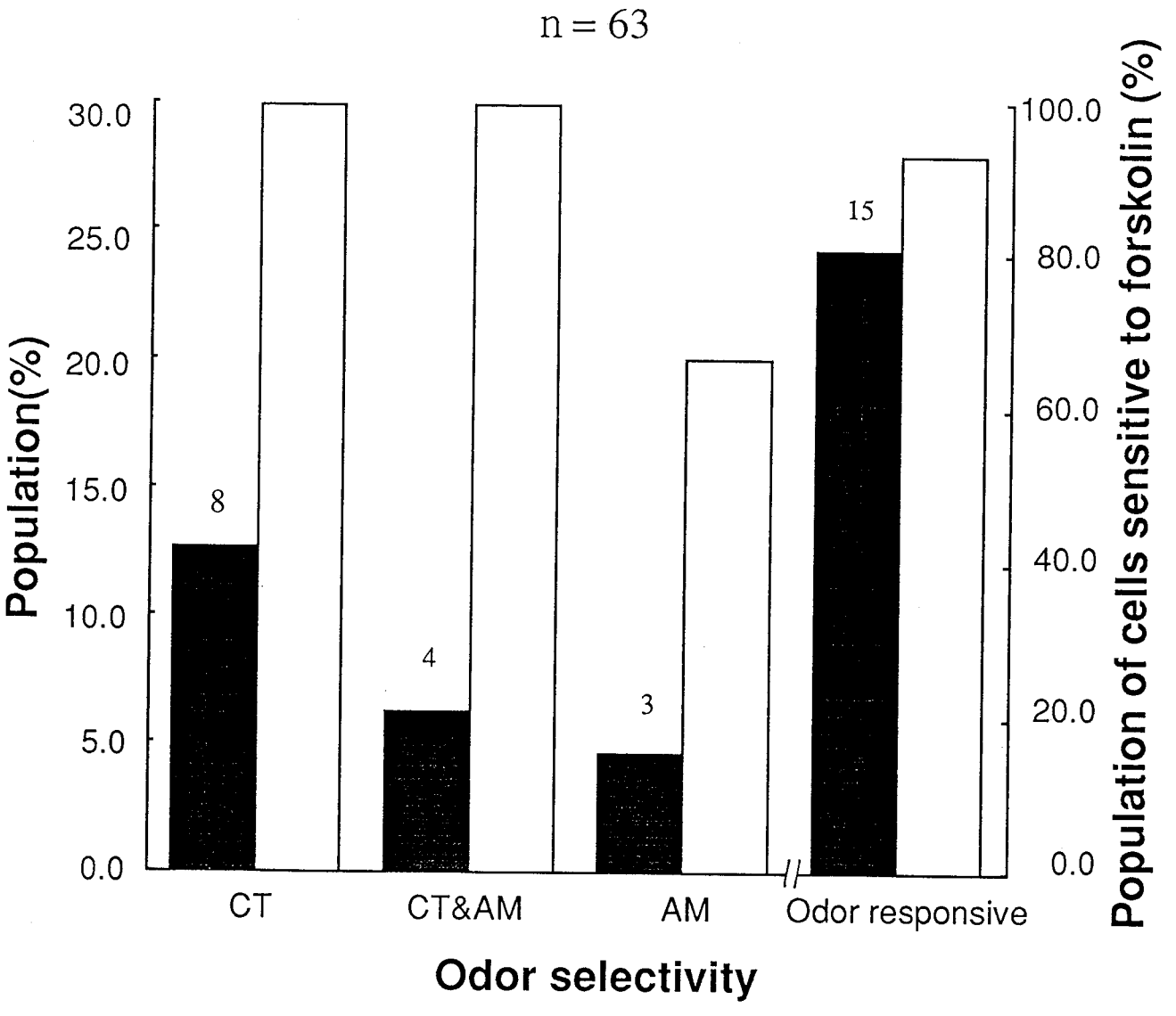


図20　tissue-printing法で得たカエル単離嗅細胞のニオイ応答性[35)]

刺激は，CT：100 μM シトラルバ（柑橘臭），AM：10 mM イソアミルアセテート（バナナ臭），CT&AM：CTとAMのいずれにも応答する細胞．比率は，測定した63個の嗅細胞に対して計算した．黒色の棒グラフはサブタイプの比率（左縦軸）を表し，白抜きの棒グラフはフォルスコリン(FK)に対して応答した細胞の比率（右縦軸）を表す．グラフ内の数字は，それぞれのサブタイプの細胞数を示した．動物は食用カエル．

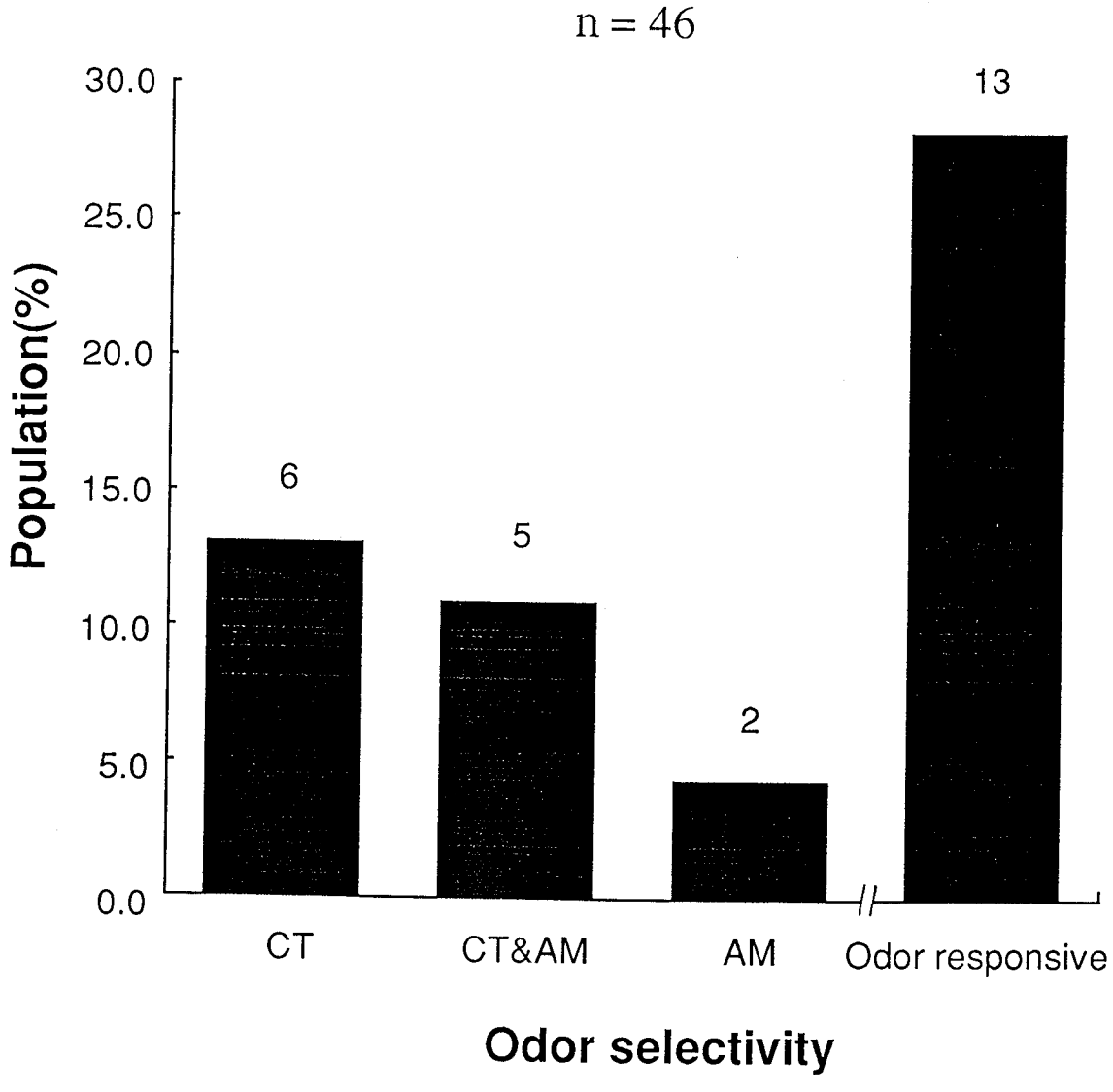


図21　trituration法で得たカエル嗅細胞のニオイ応答性[18)]

刺激は，CT：100 μM シトラルバ（柑橘臭），AM：10 mM イソアミルアセテート（バナナ臭），CT&AM：CTとAMのいずれにも応答する細胞．比率は，測定した46個の嗅細胞に対して計算した．グラフ内の数字は，それぞれのサブタイプの細胞数を示した．動物は食用カエル．

ラジンに対する応答性を調べた結果は，カエルの応答率の1/2程度であったが，相対的な応答率はカエルと大差なかった（図22）．マウスでは，cAMP系のニオイ物質といわれるシトラルバとイソアミルアセテートに対していずれかに応答した嗅細胞は，全てフォルスコリンにも応答した．一方，IP_3系のニオイといわれるピラジンにのみ応答した嗅細胞は，フォルスコリンに対しては応答しなかった．応答性は，細胞の応答率はシトラルバあるいはイソアミルアセテートに比べ数分の一以下と少なく，$[Ca^{2+}]_i$応答の立ち上がりも緩慢[47]であった．

3．考　察

ニオイ応答とフォルスコリン応答における$[Ca^{2+}]_i$上昇は，図18では立ち上がり速度はほぼ等しく，上昇開始までの遅延時間のみが異なっている．このことから考えて，両者の開始時間の相違は，cAMP合成酵素を活性化する為に必要な時間の差と解釈することができる．つまり，フォルスコリンはニオイ物質としてニオイレセプタに作用しているのではなく，アデニル酸シクラーゼを直接活性化し，細胞内cAMP濃度の上昇を介して応答を生じさせていることを示唆している．フォルスコリンによる応答が，ニオイ応答より遅く開始する理由としては，ニオイ応答時のニオイレセプタとGTP結合蛋白質の活性化ステップをスキップし，より時間のかかる細胞膜へのフォルスコリンの拡散過程を経ることが要求されていると解釈される．

5割以上の嗅細胞がフォルスコリンに対する応答性を示したことは[11, 18, 35]，多くの嗅細胞でcAMPがニオイ受容の信号増幅系として機能することを裏付けていると考えられる．残りの半数以下の細胞が応答しない原因としては，IP_3など他の信号増幅系がcAMPに代わって機能している場合だけでなく，フォルスコリンに対する感度の低さや細胞単離の際の細胞損傷，単離に使用する酵素やレクチンの副作用で応答が抑制されている可能性も考慮する必要がある．シトラルバあるいはイソアミルアセテートに応答した嗅細胞に限ってみ

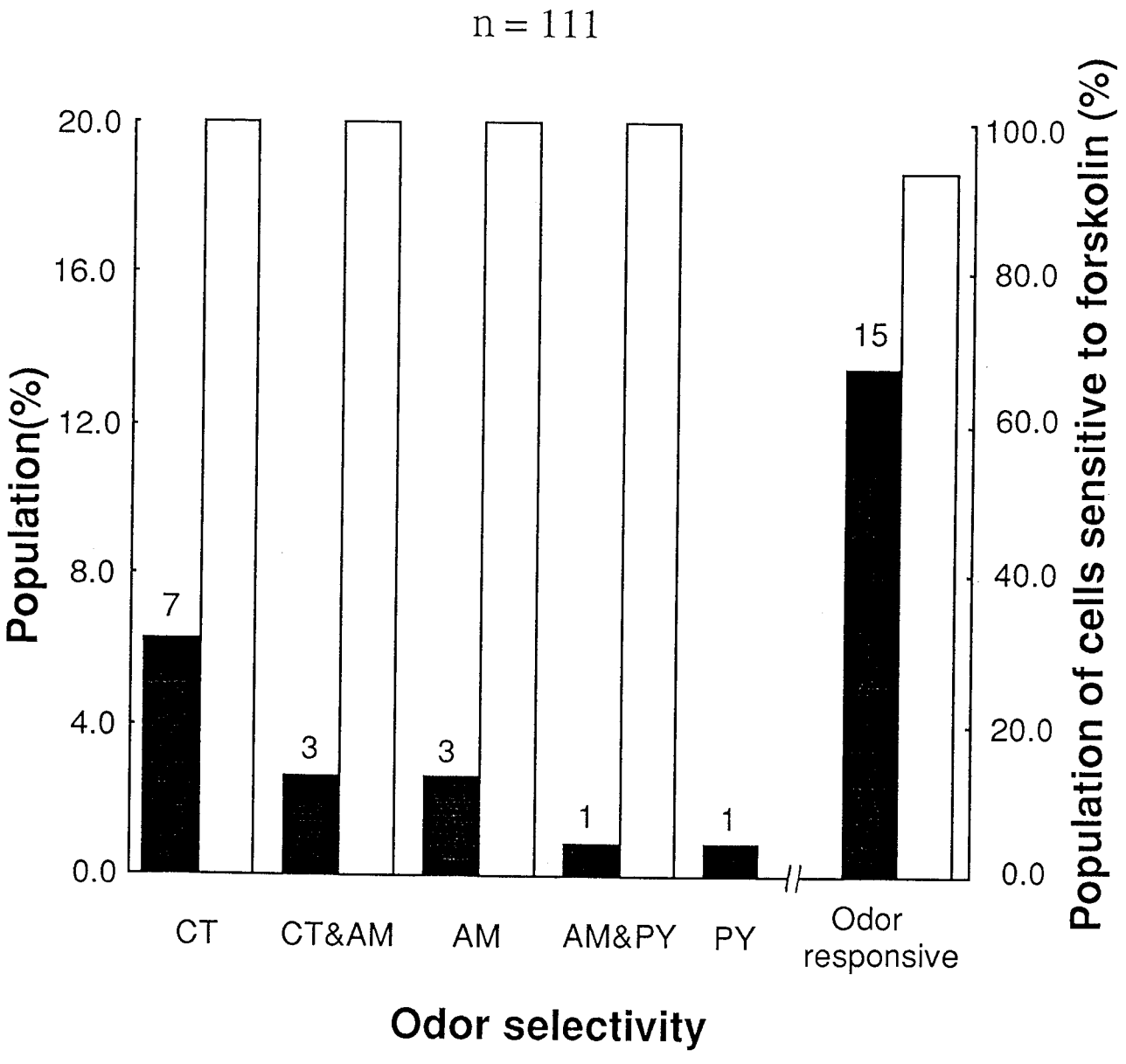


図22　tissue-printing法で得たマウス嗅細胞のニオイ応答性

刺激は，CT：100 μM シトラルバ（柑橘臭），AM：10 mM イソアミルアセテート（バナナ臭），PY：0.1～2 mM ピラジン（ピーマン臭）の3種類．CT&AM：CTとAMのいずれにも応答する細胞．AM&PY：AMとPYのいずれにも応答する細胞．比率は，測定した111個の嗅細胞に対して計算した．黒色の棒グラフはサブタイプの比率（左縦軸）を表し，白抜きの棒グラフはフォルスコリン(FK)に対して応答した細胞の比率（右縦軸）を表す．グラフ内の数字は，それぞれのサブタイプの細胞数を示した．動物はマウス．

れば，カエルで93%，マウスでは100%の嗅細胞がフォルスコリンにも応答したことは，シトラルバ／イソアミルアセテート応答がcAMP系セカンドメッセンジャーを介して生じていることを強く示唆していると理解される．一方，IP_3系のニオイといわれるピラジンの応答率が，シトラルバあるいはイソアミルアセテートに比べ数分の一以下と低くなったことは，IP_3系の信号増幅系を持っている細胞が少数であることを示唆しているのかもしれない．また，ピラジンに対する$[Ca^{2+}]_i$応答の立ち上がりも緩慢[47]であった．この緩慢な$[Ca^{2+}]_i$上昇は，大きな受容器電位が生じていないか，持っている電位依存性のCa^{2+}チャネルが特殊なものであること等が原因として考えられる．

また，同じニオイ選択性を持つ嗅細胞のサブタイプの存在比率がカエルよりもマウスで低くなったことは，マウスのニオイ識別能が高く，サブタイプの種類が多いためであると推測される．

第VI章.　ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇の経路と機能

$[Ca^{2+}]_i$上昇に必要なCa^{2+}はどこから供給されるのであろうか？　この経路としては，細胞外からのCa^{2+}流入と細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の２つが考えられる．ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇への２つのCa^{2+}経路の寄与を確かめる為に，細胞外液にCa^{2+}が含まれる正常状態と含まれない状態（CF）で，嗅細胞のニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇特性を比較した．また，電位依存性Ca^{2+}チャネルの寄与を調べるために，高Ca^{2+}刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇とニオイ刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇の動特性を比較した．また，ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇への電位依存性Ca^{2+}チャネルの寄与を３種のCa^{2+}チャネルブロッカーの効果を通して調べた．

１．　$[Ca^{2+}]_i$上昇への細胞外からのCa^{2+}流入と細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の寄与

シトラルバ感受性の嗅細胞（n ＝ 6）で調べたところ，67％の細胞（Type I）に細胞外からのCa^{2+}流入と細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の経路が存在し，33％の細胞（Type II）では細胞外からのCa^{2+}流入のみであった．２つのタイプの嗅細胞の典型的な例を図23（Type I：b，Type II：a）に示す[11]．図23-(a)の嗅細胞は，ニオイ応答時に細胞外がCF状態の場合（図中の１）は$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じず，細胞外がCa^{2+}を含む正常リンゲル液に置換されるに従い$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じているのが分かる．コントロール実験として，正常リンゲル液中でニオイ刺激をした場合（図中の２），ニオイ刺激期間中から$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じる結果となった．両者の結果を比較すれば，この細胞におけるニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇には細胞外からのCa^{2+}流入が不可欠な細胞であることが分かる．

一方，図23-(b)の嗅細胞では，細胞外がCF状態でのニオイ刺激に対して２相性の$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じることが見い出された．第１相の$[Ca^{2+}]_i$上昇は，細胞外がCF期間中にみられる比較的遅延時間が短く一過性に起こる$[Ca^{2+}]_i$上昇である．第２相の$[Ca^{2+}]_i$上昇は，CF終了後に起こり$[Ca^{2+}]_i$上昇が数十秒の間持続する特徴を持つ．第１相の$[Ca^{2+}]_i$上昇は細胞外がCF期間中に回復し始めるが，細胞外が正常リンゲル液に交換されるに従い再び$[Ca^{2+}]_i$上昇

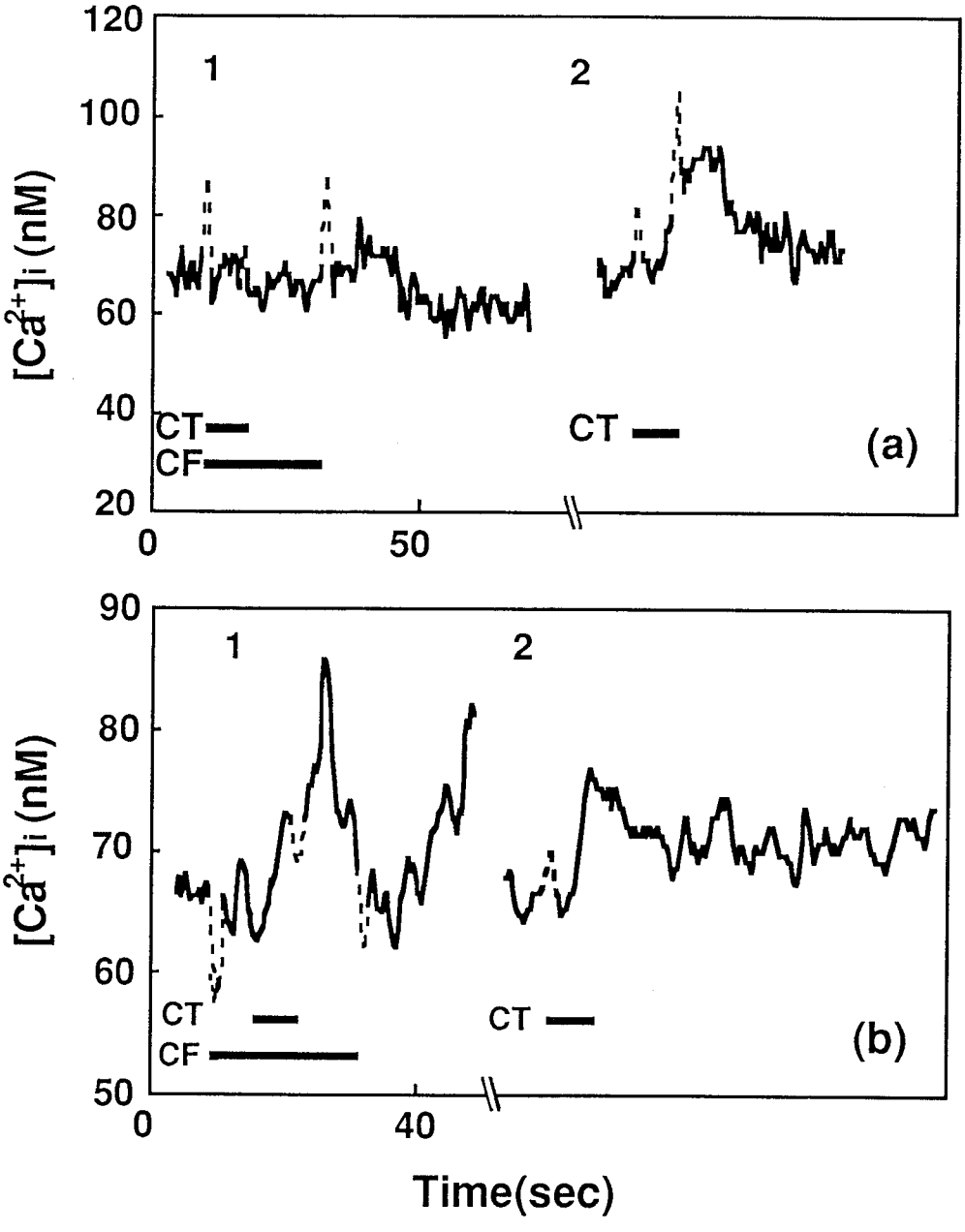


図23　ニオイ誘起Ca^{2+}放出の$[Ca^{2+}]_i$上昇への寄与[11)]

カエル嗅細胞のニオイ応答において，細胞外がCa^{2+}フリー(CF状態)の時，$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じない細胞(a)と$[Ca^{2+}]_i$上昇を起こす細胞(b)がある．後者は，細胞内Ca^{2+}ストアからのニオイ誘起Ca^{2+}放出と思われる．刺激は，100 μMシトラルバ．グラフにおける破線は溶液交換時のアーティファクトを示す．$[Ca^{2+}]_i$値は，２励起波長での測定データの比から求めた．

が生じる．第１相の$[Ca^{2+}]_i$上昇は，細胞外にCa^{2+}の供給源がないことから，ニオイ誘起の細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}は放出であると結論することができる．第２相の$[Ca^{2+}]_i$上昇は，細胞外へのCa^{2+}供給に伴い生じることから，細胞外からのCa^{2+}流入であると考えられる．

また，フォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に対するCa^{2+}流入阻害の影響を調べた（図24）[11]．この結果，細胞外をCFにしたCa^{2+}流入阻害期間が長い程（c → b → a），$[Ca^{2+}]_i$上昇の開始が遅れる傾向（c ＜ b ＜ a）が確認できた．また，細胞外をCFにする期間が短ければ（b，c），$[Ca^{2+}]_i$上昇は素早い回復過程を持つ一過性の応答になるが，正常応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇期にCa^{2+}流入が阻害されていると$[Ca^{2+}]_i$上昇が持続性に変化した（a）．この結果は，ニオイ応答時のCa^{2+}流入阻害による$[Ca^{2+}]_i$上昇持続と良く似た回復特性を持つように思えた．また，フォルスコリン刺激を細胞外がCF期間中に行なってみたが，CF期間中の$[Ca^{2+}]_i$上昇はみられなかった．この結果は，フォルスコリン誘起応答時には，細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}は放出は生じないことを示唆している．

２．　電位依存性Ca^{2+}チャネルの寄与

高K^+刺激は，電位依存性Ca^{2+}チャネルのみを活性化すると報告されている[48]．マウス単離嗅細胞に２秒間の高K^+刺激を与え$[Ca^{2+}]_i$上昇の有無を調べたところ，111個の嗅細胞の内，95.5％の細胞が高K^+刺激によって一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇を示した（図25-(a)）．図５より，この刺激時の細胞外K^+濃度は，89.6 mMまで上昇し細胞を脱分極させている．これによる$[Ca^{2+}]_i$上昇は，刺激投与とほぼ同時に開始し，ニオイ刺激時（図25-(b)）に比べると刺激終了後の回復も素早かった[31]．ニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇は，高K^+刺激時に比べ，$[Ca^{2+}]_i$上昇の遅延時間が明らかに大きかった（図25）．高K^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇のピーク値は，ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇よりも大きな細胞の方が多かった．これらの結果は，$[Ca^{2+}]_i$上昇に電位依存性Ca^{2+}チャネルが大きな寄与をしていること，細胞内のCa^{2+}緩衝効果はCa^{2+}流入による$[Ca^{2+}]_i$上昇を遅延させるほど大きくないことなどを示唆していると解釈される．

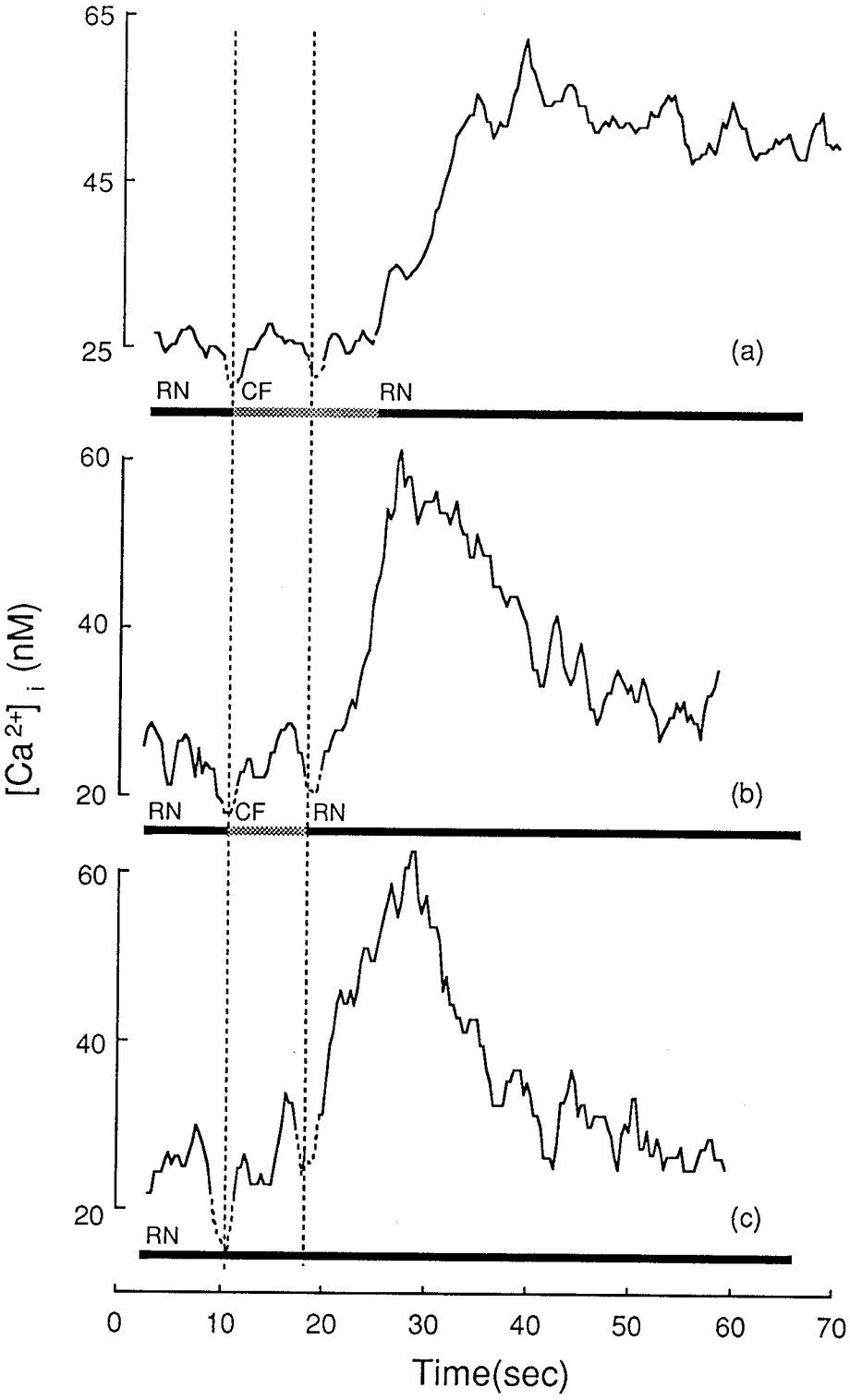


図24　Forskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇へのCa^{2+}流入阻害の効果[11)]

Forskolin（FK）誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇において，細胞外がCa^{2+}フリー(CF状態)の期間を長くするほど，$[Ca^{2+}]_i$上昇の開始は遅延し，上昇した$[Ca^{2+}]_i$レベルの持続性も大きくなった．FKは，８秒間破線で挟まれた期間与えた．グラフの下に示した直線は細胞外の溶液を表し，実線は正常リンゲル液で，斜線はCF状態であることを意味する．グラフにおける破線は溶液交換時のアーティファクトを示す．嗅細胞は，食用カエルから得た．

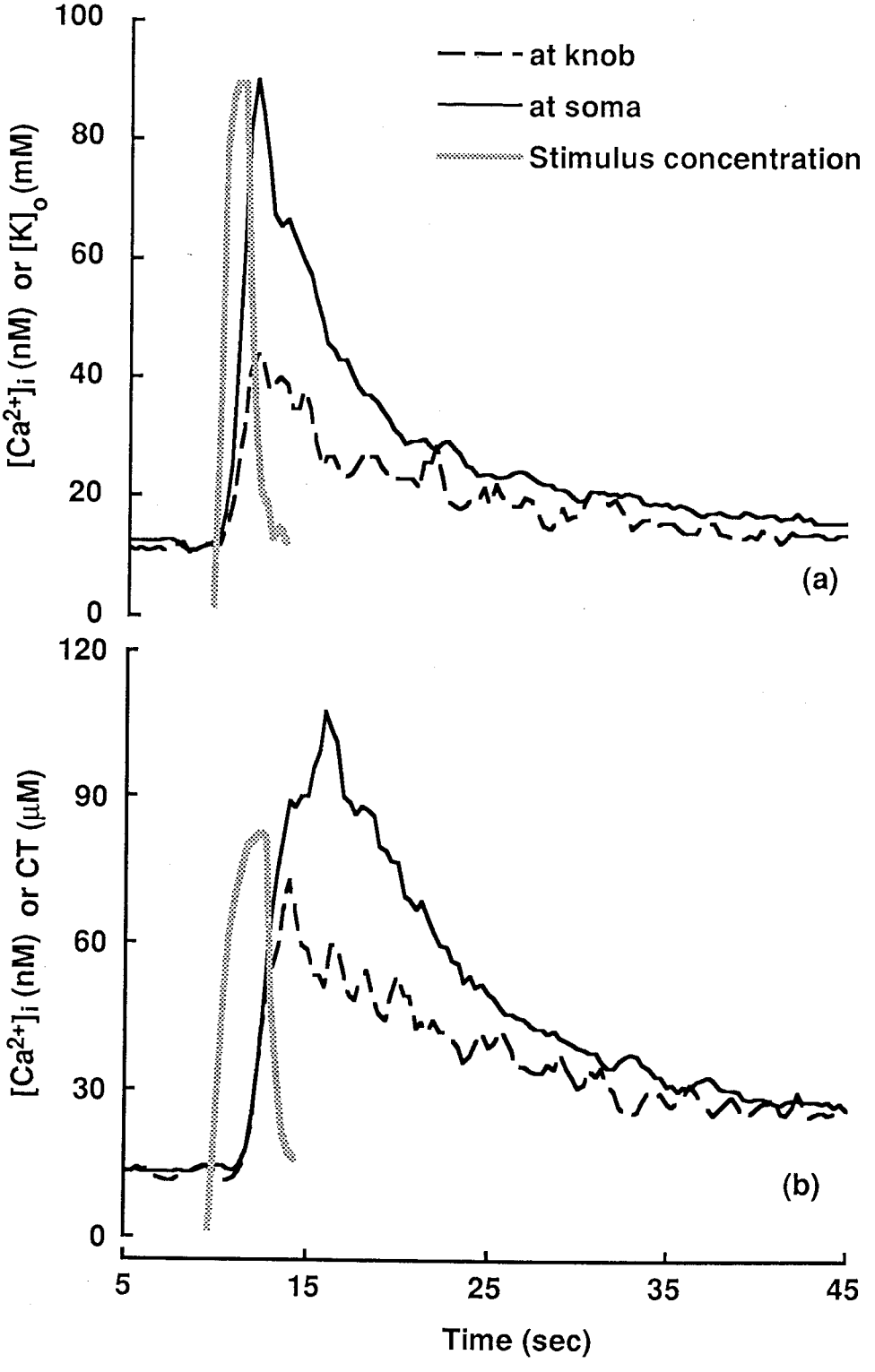


図25　嗅小胞と細胞体での$[Ca^{2+}]_i$上昇の相違[31)]

同一のマウス嗅細胞で，高K^+刺激(a)とシトラルバ（CT）によるニオイ刺激(b)による$[Ca^{2+}]_i$上昇を嗅小胞（knob）と細胞体（soma）で比較した．ニオイ応答時の方が細胞体での$[Ca^{2+}]_i$上昇に対して嗅小胞での$[Ca^{2+}]_i$上昇の方が相対的に大きくなっている．刺激濃度変化のグラフは，刺激投与期間と同じ長さだけ蛍光色素を投与し，その相対的強度変化から算出した．$[Ca^{2+}]_i$値は，２励起波長での測定データの比から求めた．

また，電位依存性Ca^{2+}チャネルブロッカーの効果の上からも，ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇におけるCa^{2+}チャネルの寄与とCa^{2+}の機能を検討した．３種のL型Ca^{2+}チャネルのブロッカーが，カエルの嗅細胞のニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に与える効果を調べた．更に，同じ細胞でフォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇において与える効果も調べ，比較検討した[29]．ブロッカーとして特異的といわれるnicardipine(NP, 5 μM)，Co^{2+}（1.5 mM）及びLa^{3+}（200 μM）を用い，10例前後の細胞から得た結果を抑制の程度に従って分類した（図26）．その内の典型的な例を図27，図28に示す．

nicardipineは，７割の細胞においてニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇を抑制し，２割の細胞で$[Ca^{2+}]_i$上昇を持続させ，１割の細胞では顕著な抑制効果が見られなかった．抑制のほとんどは部分的かつ不可逆的な抑制であった（図27-(a)）．これに対し，フォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に対するnicardipineの抑制効果はニオイ応答時より小さく，７割弱の細胞で部分的かつ不可逆的な抑制がみられ，１割の細胞で$[Ca^{2+}]_i$上昇が持続し，残り２割の細胞では顕著な抑制効果は見られなかった．１回目のnicardipine投与下でのフォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇抑制効果は小さい場合が多く，むしろ次のnicardipineを同時投与していないフォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇において顕著であった（図28-(a)）．

ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に対するCo^{2+}の抑制は，nicardipineよりもやや強く現われたが，フォルスコリン誘起応答ではニオイ応答時より２倍程度多い４割弱の細胞で顕著な抑制が見られなかった．La^{3+}の抑制効果はもっとも顕著で，テストした全ての細胞で完全なものから部分的なものまで程度の差はあれ，ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇を可逆的に抑制した（図27-(b)）．抑制から応答が回復するには10分以上を要し，回復は徐々に進行するようにみえた．FK誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に対しては部分的な抑制であり（図28-(b)），細胞外液にLa^{3+}がある間はほとんど$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じなかったが，細胞外液のLa^{3+}が除去されると顕著な$[Ca^{2+}]_i$上昇がみられた．

Ca^{2+}チャネル阻害が$[Ca^{2+}]_i$上昇を持続させる細胞の比率は，nicardipineよりCo^{2+}でやや多

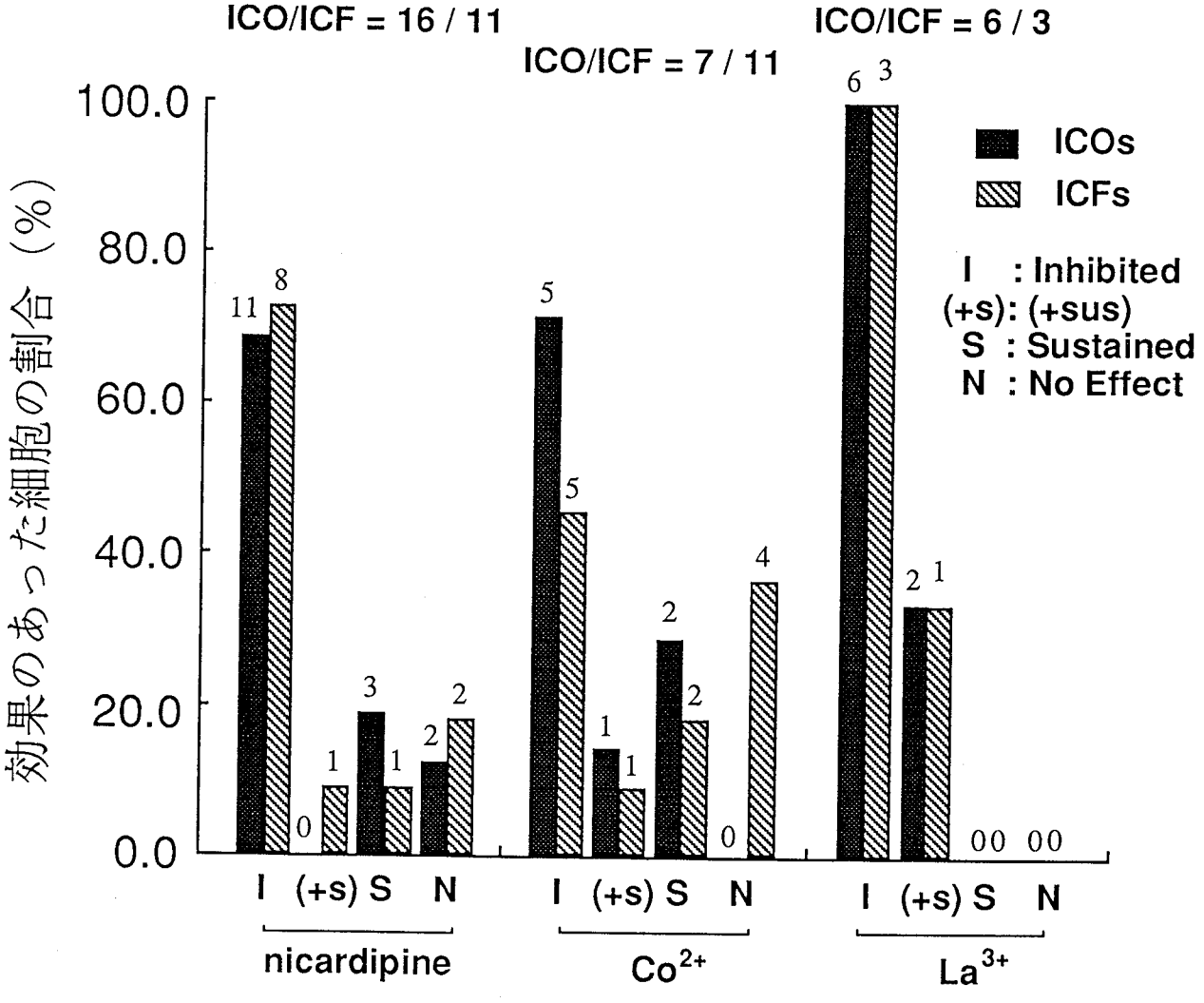


図26　Ca^{2+}チャネルブロッカーによる$[Ca^{2+}]_i$上昇の抑制効果[1)]

ICOは，ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇，ICFは，フォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇．グラフ内の数字は，それぞれの効果を示した細胞数．(+sus)は，抑制された応答例の内で$[Ca^{2+}]_i$上昇が持続した例数を示す．ブロッカーは，5 μM nicardipine（NP），2 mM Co^{2+}，200 μM La^{3+}を用い，ICOに対して16個，7個，6個の嗅細胞で，ICFに対して11個，11個，3個の嗅細胞で効果を調べ，抑制，持続，影響なしのそれぞれの比率を計算した．グラフ内の数字は，効果の見られた嗅細胞の例数．信号は食用カエル嗅細胞の細胞体からfura-2の蛍光変化測定により記録したもの．

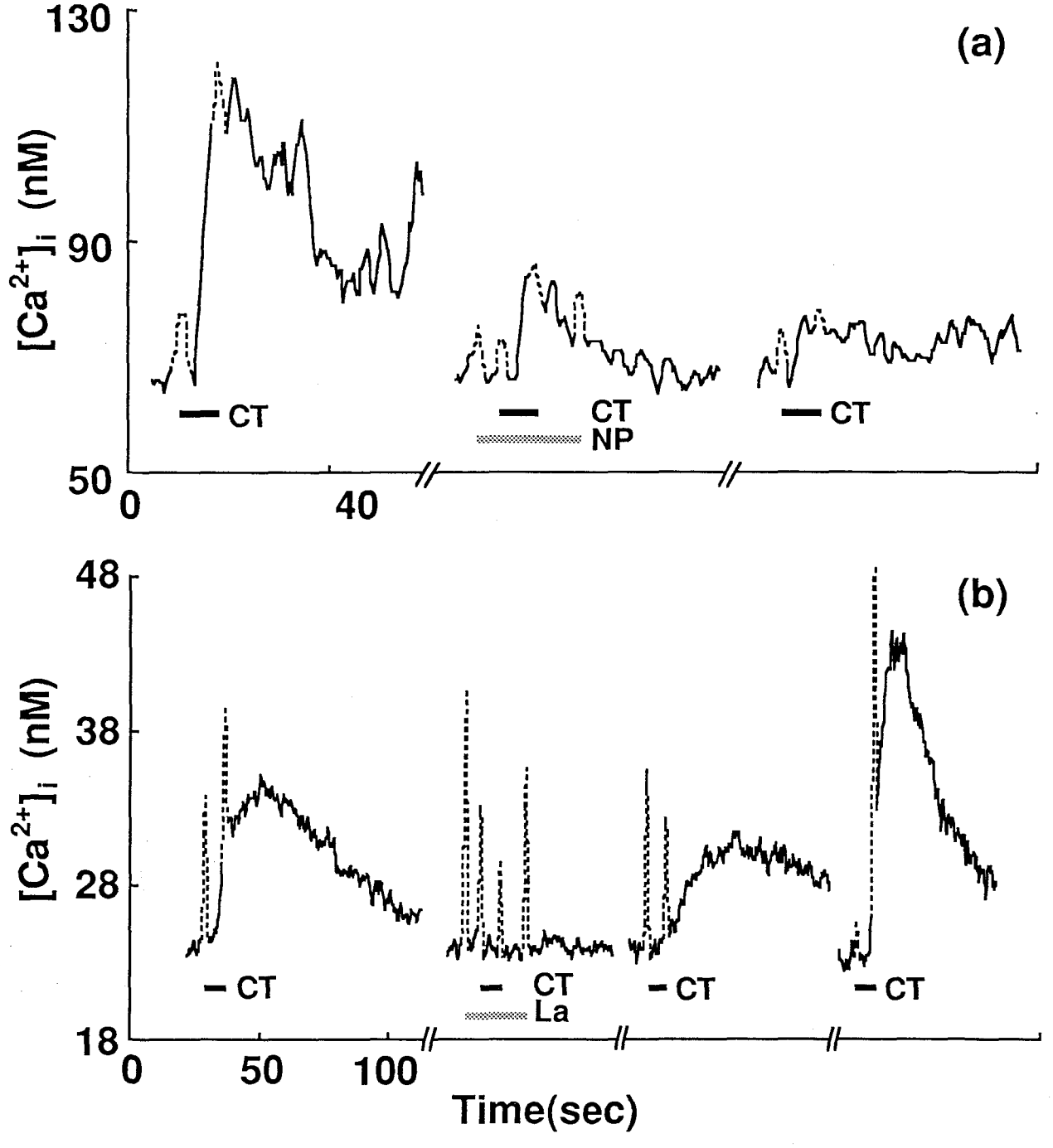


図27　Ca^{2+}チャネルブロッカーのニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇への効果[1)]

a：ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇への5 μM nicardipine（NP）の効果の例，b：ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇への200 μM La^{3+}の効果の例，グラフにおける破線は溶液交換時のアーティファクトを示す．$[Ca^{2+}]_i$値は，380 nm励起で測定したデータからⅢ章に記述した方法により求めた．嗅細胞は，食用カエルから単離したもの．

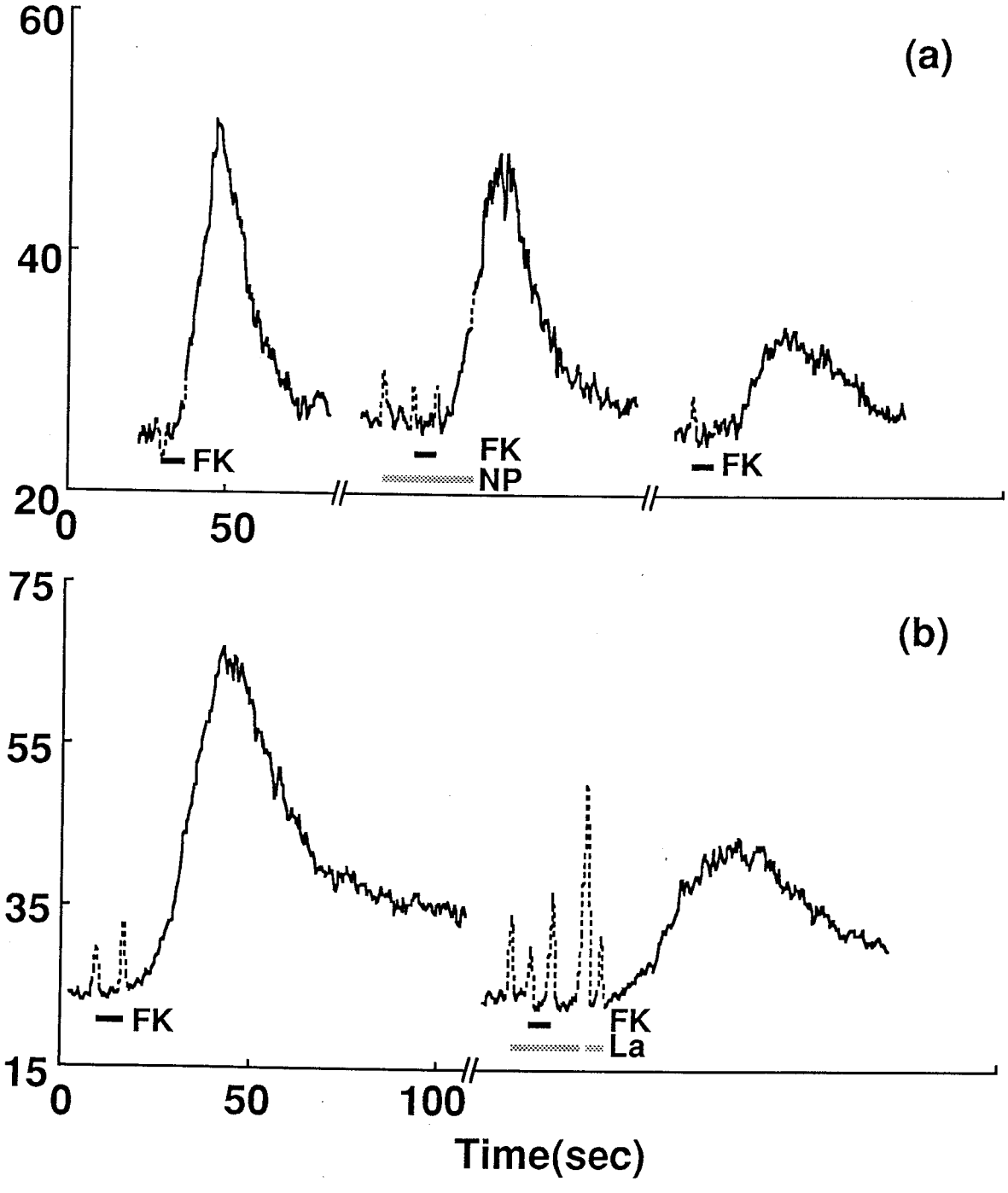


図28　Ca^{2+}チャネルブロッカーのforskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇への効果[1)]

a：forskolin（FK）誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇へのnicardipineの効果の例．b：forskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇へのLa^{3+}の効果の例．グラフにおける破線は溶液交換時のアーティファクトを示す．$[Ca^{2+}]_i$値は，380 nm励起で測定したデータからⅢ章に記述した方法により求めた．

くなった．このことは，Ca^{2+}チャネルから流入したCa^{2+}がcAMP-CHの制御に機能している可能性を示唆しているとも考えられる．抑制効果と持続性が同時に現われる場合（図26の“+sus”）を含めると，nicardipineに対してニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇とフォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇のいずれでも２割程度，Co^{2+}では４割，La^{3+}では３割であった．即ち，３種類のCa^{2+}チャネル阻害剤全てにおいて何らかの$[Ca^{2+}]_i$上昇持続効果がみられるものは，ニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇でもフォルスコリン誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇でも２割前後かそれより少し多い程度であった．

３．　cAMP依存性チャネルの寄与

ニオイ応答時には，電位依存性Ca^{2+}チャネル以外にcAMP-CHからCa^{2+}流入が生じると推定されていた[21, 22]．高K^+刺激とニオイ刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇を細胞体と嗅小胞で比較することによって，$[Ca^{2+}]_i$上昇へのcAMP-CHを通る経路の寄与を検討した[23]．図25において，それぞれの刺激（stim）に対して細胞体での$[Ca^{2+}]_i$上昇のピーク値（C_{soma}）に対する嗅小胞での$[Ca^{2+}]_i$上昇のピーク値（C_{knob}）の比：$R(stim)=C_{knob}/C_{soma}$を計算し，更に，ニオイ刺激のR(OD)と高$K^+$刺激のR(HK)の比：$R_{OD/HK}=R(OD)/R(HK)$を求めた．その結果，５つの嗅細胞のうち３つでは$R_{OD/HK}=1.3$と相対的に嗅小胞での$[Ca^{2+}]_i$上昇が大きくなった．他の２つの細胞では約１前後の値となり，嗅小胞と細胞体の$[Ca^{2+}]_i$上昇は相対的に同程度であった．高K^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇を基準にすると，フォルスコリンによって生じる$[Ca^{2+}]_i$上昇でも同様に，嗅小胞で相対的に大きな$[Ca^{2+}]_i$上昇が見られた．

４．　細胞外からのCa^{2+}流入と細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出の機能に関する考察

細胞外をCa^{2+}フリーにしてCa^{2+}流入を起こらなくした実験結果から，Ca^{2+}の機能は以下のように推定される．通常のニオイ応答時には，応答開始後素早くCa^{2+}流入が開始し$[Ca^{2+}]_i$上昇も一過性になる．ニオイ誘起Ca^{2+}放出系を持つ細胞では，ニオイ応答開始後10秒以上

Ca^{2+}流入が阻止された場合，Ca^{2+}流入の延長と数十秒も持続する$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じる結果となる．細胞外にCa^{2+}が存在する正常イオン環境でのニオイ刺激に対しては，第２相の持続性の$[Ca^{2+}]_i$上昇はみられなかったことから（図23-bの２），$[Ca^{2+}]_i$上昇の持続は応答開始後早い時期のCa^{2+}流入の阻害によるものであると考えられる．この持続のメカニズムとして２つの可能性がある．持続的なCa^{2+}流入による場合と，Ca^{2+}排出系が活性化されない結果，$[Ca^{2+}]_i$レベルが持続する場合である．前者は，cAMP-CHが閉じる為には細胞外からのCa^{2+}流入による$[Ca^{2+}]_i$上昇が必要であるとするKurahashi，Suzukiらの報告[8, 21]と一致する結果を示唆している．この問題に関して，cAMP-CHがMn^{2+}透過性であると仮定して，Mn^{2+}によるfura-2の消光を利用してcAMP-CHの開閉状態を調べた．２，３の細胞で調べた結果では，両者の現象が同時に起きていることが示唆された．つまり，cAMP-CHの閉塞とCa^{2+}排出系の活性化のいずれにもCa^{2+}流入が必要であると推定された[23]．

フォルスコリン誘起応答時にCa^{2+}流入を阻害した場合もニオイ応答時と同様に$[Ca^{2+}]_i$上昇が持続することは，Ca^{2+}流入はcAMP-CHの閉塞により受容器電位を素早く減少させ，細胞内Ca^{2+}の排出プロセスを活性化し，細胞を静止状態に回復させる為に機能することを強く推測させる結果である．また，Ca^{2+}チャネルブロッカーの効果は，Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入が応答回復過程の活性化に機能することを示唆している．更に，流入した細胞内Ca^{2+}はCa^{2+}依存性Cl^-チャネルを活性化し[15-17]，Cl^-電流を介して受容器電位を増幅していると考えられている[16, 17]．

２，３節の結果を考えると，電位依存性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入がニオイ応答時の$[Ca^{2+}]_i$上昇に大きな寄与をしていること，嗅小胞での$[Ca^{2+}]_i$上昇は，大部分が電位依存性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入によって起こるが，その一部は嗅シリアに高密度に存在するcAMP-CH[10]からのCa^{2+}流入も寄与していると解釈される．これは，-70mVの膜電位固定下での嗅細胞へのcAMP注入による$[Ca^{2+}]_i$上昇部位が時間経過に伴い嗅小胞から細胞体への移動すること[22]によっても示されている．

Ca^{2+}ストアから放出されたCa^{2+}によって$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じていてもCa^{2+}流入経路が閉塞していない結果は（図23-b），Ca^{2+}ストアから放出されたCa^{2+}はニオイ応答時のCa^{2+}流入経路となっているチャネルの閉塞に機能していないことを示唆している．また，これまで述べてきた実験結果は，Ca^{2+}流入経路となっているチャネルとして電位依存性Ca^{2+}チャネルとcAMP-CHが寄与していることを示している．予備的に，$[Ca^{2+}]_i$上昇の立ち上がりをロジスティック関数で近似して，立ち上がり速度を時定数として求めると，図23-b-1の$[Ca^{2+}]_i$上昇の第2相に対応する立ち上がり速度は，電位依存性Ca^{2+}チャネルのみが活性化される高K^+刺激時とフォルスコリン誘起応答時との中間的な値となった．これは，第2相のCa^{2+}流入には両者のチャネルが寄与していると解釈される．つまり，図23の現象は，Ca^{2+}が流入しないために，cAMP-CHの閉塞が促進されず，脱分極が維持され，電位依存性Ca^{2+}チャネルも開いたままになっていると推測される．また，cAMP-CHが高密度に存在する嗅シリア[6]内にはCa^{2+}ストアが存在しないことからも，Ca^{2+}ストアから放出されたCa^{2+}がcAMP-CHに作用する可能性の低いことが推測される．Ca^{2+}ストアから放出されたCa^{2+}の機能の一つとして予想されることは，Ca^{2+}依存性K^+チャネルを開かせることで膜電位の静止状態への回復を促進することである．

受容器電位回復過程のCa^{2+}依存性は，Kramerらにより報告されているcAMP-CHのcAMP感受性を$[Ca^{2+}]_i$依存的に調整する蛋白質[26]によっても説明される．もう一つの可能性として，Kawamuraらが視細胞で発見したCa^{2+}依存性PDE制御系[27]と類似のCa^{2+}依存性を持つcAMP-PDE制御系が嗅シリアに存在すれば，$[Ca^{2+}]_i$上昇によって活性化したcAMP分解系が嗅シリア内のcAMP濃度を低下させcAMP-CHの閉塞に至ると説明できる．

第Ⅶ章.　嗅細胞のニオイ特異性と嗅上皮内での分布の推定

1.　ニオイ分子の立体化学的構造に対する嗅細胞の特異性

これまで，ニオイ受容に関して10種以上の仮説が提出されていたが，それらを裏付ける決定的な証拠を欠き，どの仮説が正しいのか明言できない状態であった．提案されていた仮説を大きく分類すると，ニオイ受容蛋白質の存在を必要とするものと，必ずしも必要としないものの２つに分けることができる．前者の仮説の代表的なものとしては，Amooreの立体化学説[49]を挙げることができる．これは，ニオイ分子を７群に分け，各群のニオイ分子が共通に持つ分子の一部の立体化学的な構造が，ニオイ受容サイトとの相互作用に重要な決定因子になっているというものである．多くのニオイがこれで説明できたが，分子構造とニオイの質の相関は60%程度であり，決定的な仮説としては受け入れられなかった．また，ニオイ物質の吸着が脂質二重層の構造変化を起こし，表面電位変化により受容器電位が発生するという仮説は[50]，蛋白質を必ずしも必要としない点で明確に後者の立場を取り，他の仮説とは一線を画していた．

これまで，受容器レベルの生理データを基にし，通常のニオイ分子を検出する嗅細胞は，フェロモン等特殊なニオイを検出する嗅細胞と異なり，複数のニオイ種に応答するジェネラリスト型で，ニオイ特異性は低いと考えられていた[42-46]．しかしながら，ニオイ分子と呼ばれる化学物質は膨大な数があり，それぞれに対して応答感度を同定し，個々の嗅細胞のニオイ特異性を厳密に調べた報告はなかった．Moriらは，嗅球の僧帽細胞における脂肪酸に対するニオイ選択性が厳密であること[51, 52]を報告し，これが嗅細胞でのニオイ特異性を反映した結果であることを示唆していた．この結果を参考にし，脂肪酸は分子構造上の類似性が直感的に理解され易いと考えられたことから，個々の嗅細胞が類似する分子構造をもつニオイ物質に対する識別能について，直鎖炭化水素系ニオイ物質（表１参照）に対する応答性をマウス単離嗅細胞で$[Ca^{2+}]_i$上昇を指標に調べた．炭素数で３～９の直鎖脂

肪酸（$CH_3(CH_2)_nCOOH$）及び直鎖炭化水素アルコール（$CH_3(CH_2)_nOH$）を100 nM～1 mMの範囲で十倍希釈溶液として4秒間細胞に投与し，$[Ca^{2+}]_i$上昇の有無を測定した．閾値濃度を厳密に測定するためには，多数回の刺激投与による測定が必要になるが，細胞の活性は，無制限な測定に対しては保証されないため，濃度刻みは1桁おきとした．

この結果，個々の嗅細胞は，ニオイ分子の微細な立体化学的構造をかなり厳密に識別できることが示唆された（表2）[23, 47, 53]．ニオイ種は，グループを表すアルファベット1文字（直鎖脂肪酸：c，直鎖炭化水素アルコール：a）と炭素数の組み合わせで表した．検出閾値は，細胞によって様々であったが，高感度のものでは1 μM前後であり，中には100 nMで応答する細胞もあった．閾値レベルでは，多くの嗅細胞が1分子種か炭素数が1のみ違う類似した2種の分子種に対してのみ大きな応答を示すニオイ分子構造特異性を持ち，少数の細胞では，構造上連続的な3～4種のニオイ分子に対して特異性を持っていた．これらは表2の左側にニオイ特異性として示したが，上記の測定回数の制限により厳密な閾値濃度が測定できなかったので，応答した最も低い濃度で最も大きな応答振幅（蛍光強度変化）の70%以上の応答を生じさせたニオイ物質という基準を便宜的に設定し，これを満足した全てのニオイ種で代表させた．また，細胞活性を残しながら測定できた回数は，応答のない刺激も含めて刺激投与数で平均的に50回（31～68）であった．一般的に刺激濃度の上昇に従って，応答スペクトルは広がっていった．

脂肪酸とアルコールに対する選択性は，両者に応答する細胞と一方にしか応答しない細胞がみられた．多くの嗅細胞は，脂肪酸に対してより高感度であった．また，両者のニオイ群に応答する嗅細胞は，それぞれのニオイ群で最も高感度になるニオイ分子のサイズで一致するか良く似たものとなった．

2．　嗅細胞の立体化学的構造特異性に対する検討

ニオイ受容蛋白質は，齧歯類では最低でも100～200種多ければ1,000種以上存在して

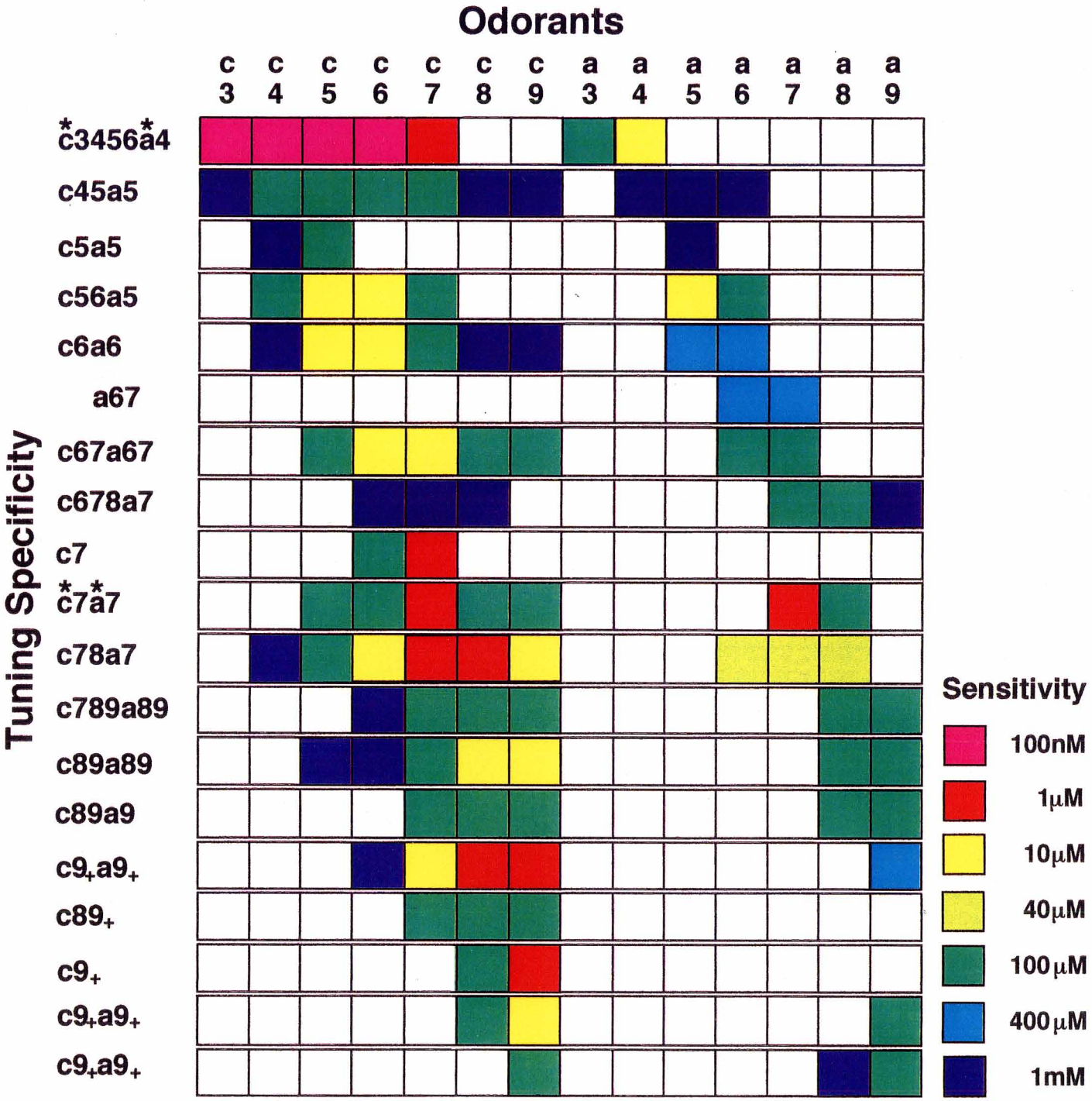


表２　マウス嗅細胞のニオイ特異性[53)]

各行は，構造的に類似する１４種のニオイ物質に対する異なる嗅細胞の感度を色で示したもので，紺色からピンク色になるに従い高感度であることを意味する．刺激は，アルファベットと数字で略記して示した．アルファベットがニオイ物質のグループ名を表し（脂肪酸：ｃと脂肪族アルコール：ａ），数字は炭素数を示す．左のニオイ特異性は，各細胞が応答した最低濃度で最大の蛍光強度変化の70％以上の応答を示したニオイ種の炭素数を脂肪酸と脂肪族アルコールそれぞれに対して示したもの．ニオイグループを表すアルファベット上の記号＊は，テストした刺激濃度の上限が100μMであることを示す．分子サイズを示す数字の後ろに付けた＋記号は，より大きな分子に対して特異性を示す可能性があることを表す．動物はマウス．

いると予想されている[2]．受容蛋白質のニオイ応答性については，IP_3系でRamingらが一例報告[14]しているだけで今後の課題となっている．個々の嗅細胞のニオイ物質の分子構造に対する識別能を調べた結果は，神経伝達物質のレセプタが持つ識別能に匹敵するようなかなり高度の識別能を持っていることが明らかになった．嗅細胞のニオイ応答が，神経伝達物質のアンタゴニストでブロックされるという報告もこれを支持するものと考えられるまた，これらの個々の細胞のニオイ分子特異性は，嗅球の僧帽細胞／房飾細胞で報告されているものと非常によく似ていた[51, 52]．この結果は，嗅細胞のニオイ識別が，ニオイ分子の立体化学的な構造をもとにした親和性によって決定されていることを強く示唆していると解釈される．従って，ニオイ受容における刺激種識別は，基本的にはAmooreの立体化学説[51]によって行なわれているということができる．今回得られた結果は，アリが警報フェロモンに対して行動を起こす感度と分子構造の関係[54]において，立体化学構造の類似が高い程感度も似ているとの報告とも共通性がみられた．しかしながら，Amooreは，ニオイ分子の一部と受容サイトの相互作用が受容細胞のニオイ分子選択性を決定していると考えたのに対し，今回得られた結果は，ニオイ分子の全体にわたって受容サイトとの相互作用サイトが分布していることが示唆され，Amooreの立体化学説と異なるものとなった．Amooreの７原臭のような刺激種のグルーピングは，中枢で行なわれる刺激種の共通項を抽出するための処理過程において行なわれているのかもしれない．

上記の特異性は，受容蛋白質の存在を仮定すれば，容易に理解できるものであるが，これにあてはまらないニオイ応答特性も報告されている．脂質二重層膜であるリポソームでは，膜電位感受性蛍光色素を用いてニオイ分子依存的な膜電位変化が生じること[50]，嗅覚と比較して低感度である粘菌などの走化性においては疎水性の大きさに従って高感度になること[58]などがこれに該当する報告であるが，複数の嗅細胞の受容器電位の和であるEOGではある分子サイズ範囲で疎水性の大きさと応答振幅の増大が対応すること[57]を併せて考えると，これらの変化は，特異性が低く比較的高濃度のニオイ刺激時に生じる応答

に寄与していると考えることができる．

3． Tissue-printing法による細胞レベルでの組織内ニオイ応答分布推定の試み

Mackay-Simらの行なった受容器電位の空間分布の解析によると，同じニオイ応答性の細胞は嗅上皮上である程度局在している[59]と考えられている．この結果は，膜電位感受性色素を用いた嗅上皮興奮パターンの計測によっても支持されている[60]．また，受容蛋白質の分布解析では，同種のニオイ受容蛋白質は嗅上皮上に離散的に分布し[14, 19, 61]，存在する領域に制限があること[61]が示されている．

共同研究者のHironoによって開発された細胞単離法（Tissue-printing法，第Ⅲ章5-2節を参照）[35]を用いれば，組織内の近傍に存在している嗅細胞のニオイ応答を比較することができる．Tissue-printing法は，組織片を版木としてカバーグラスなど適当な用紙の上に組織片表面の細胞を印刷するようにして細胞を単離するため，組織片における細胞の相対的な位置関係を単離後のカバーグラス上でもほぼ保存していると考えることができる．更に，細胞応答として$[Ca^{2+}]_i$上昇を光学的に計測することによって，複数の細胞応答の同時測定が可能になり，単離後測定が短時間で終了するなど細胞活性の経時的劣化を小さくすることができ，細胞応答の比較という点でも都合がよい．

4． 近傍の嗅細胞のニオイ応答の比較

Tissue-printing法を用いて，一つの支持細胞の周囲に存在すると思われる嗅細胞が全く異なるニオイ応答を示す例が見い出された[35]．それは，単離／接着したカバーグラス上で28μm離れている2つの嗅細胞は，一方がシトラルバ（CT）に選択的に応答し，もう一方がイソアミルアセテート（AM）にのみ応答するものであった．構造的に類似する7種の脂肪酸と7種のアルコールを用いて，個々の嗅細胞のニオイ特異性を決定し，その分布を調べると，近傍に類似するが異なるニオイ特異性の嗅細胞が集まる例がみられた(表3）[53]．

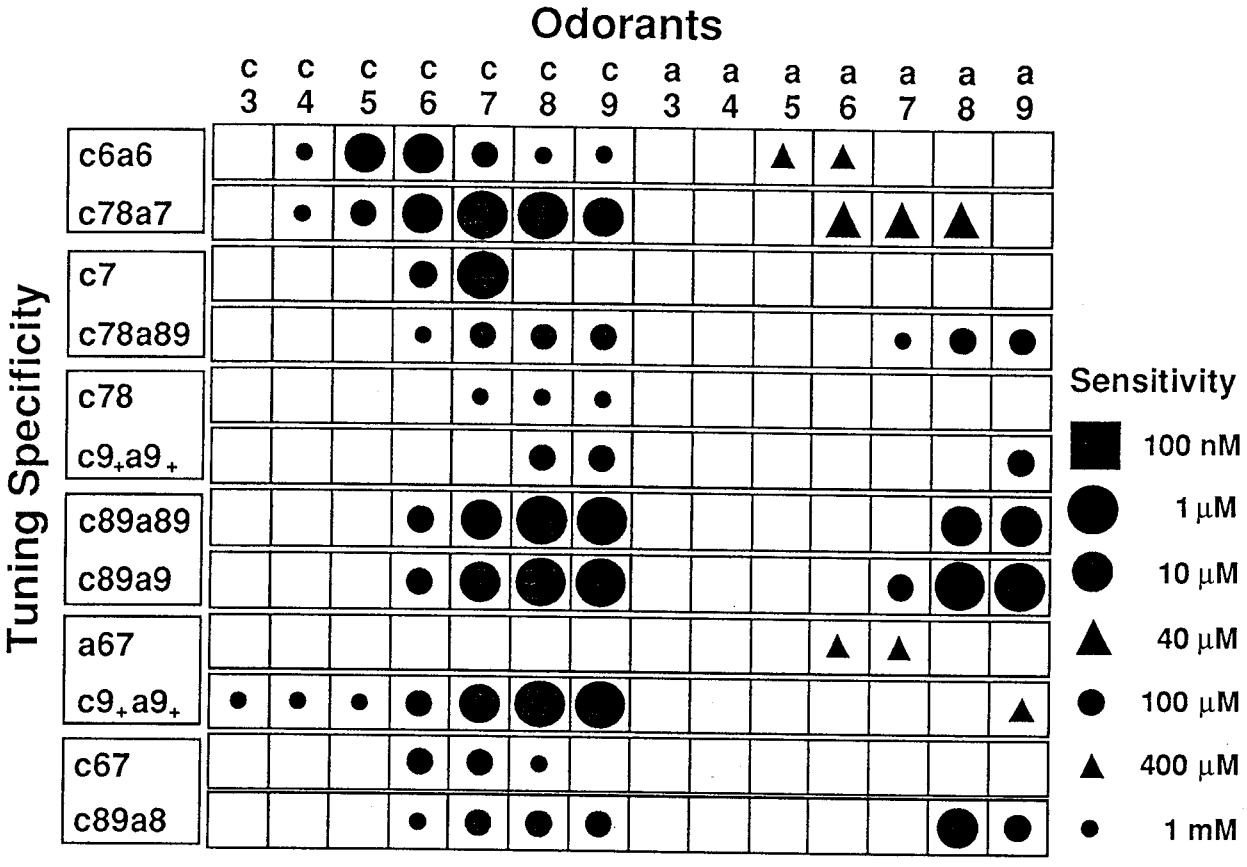


表３　近傍のマウス嗅細胞のニオイ特異性[53)]

Tissue-printing法で得た６つの単離嗅細胞試料において，同じ試料中の異なる嗅細胞（色の異なる枠で囲った６組のペア）のニオイ特異性の比較．各行は，構造的に類似する１４種のニオイ物質に対する嗅細胞の感度を色で示したもので，紺色からピンク色になるに従い高感度であることを意味する．刺激は，アルファベットと数字で略記して示した．アルファベットがニオイ物質のグループ名を表し（脂肪酸：ｃ，脂肪族アルコール：ａ），数字は炭素数を示す．左のニオイ特異性は，各細胞が応答した最低濃度で最大の蛍光強度変化の70％以上の応答を示したニオイ種の炭素数を脂肪酸と脂肪族アルコールそれぞれに対して示したもの．６組中５組の嗅細胞のニオイ特異性を表す分子の炭素数が隣り合う数字となり，非常に良く似ている．分子サイズを示す数字の後ろに付けた＋記号は，より大きな分子に対して特異性を示す可能性があることを表す．動物はマウス．

また，この領域には調べたニオイに応答しなかったが，フォルスコリンや高K^+刺激には応答する嗅細胞が共存していた．これらの実験結果は，嗅上皮内で近傍に存在すると考えられる嗅細胞は，まったく異なるニオイ応答性を持つ細胞と極めて類似しているが異なるニオイ応答性を持つ細胞がモザイク状に存在していること[35, 47, 53, 62]を示していると解釈される．

5．　近傍の嗅細胞のニオイ応答分布に関する考察

得られた結果は，同じニオイ応答性の細胞は嗅上皮上である程度局在しているというMackay-Simらの受容器電位の空間分布の解析結果[55]と矛盾しない．また，受容蛋白質候補の分布解析では，同種のニオイ受容蛋白質は嗅上皮上に離散的に分布し[14, 19, 61]，存在する領域が制限されているという報告[61]とも矛盾しない．筆者らの結果は，Mackay-Simらよりも短距離で，かつ，細胞レベルのニオイ選択性に関する知見を与えるものである．また，現状では，受容蛋白質候補の分布解析によっては，応答タイプが異なることは予想されるがニオイ応答性までは分からない為，本アプローチはこれらのギャップを埋める知見を与えるものである．嗅上皮上の近傍に非常に類似したニオイ特異性を持つ嗅細胞が複数存在し，全く異なるニオイ特異性の嗅細胞も共存することを示唆する結果は，「基底細胞から嗅細胞への分化において，一つの基底細胞から分化してくる嗅細胞群は類似のニオイ応答性を持ち，受容蛋白質の共通性が高くなるように制御が行なわれている」という仮説を支持するものであった[53]．

第Ⅷ章. 結　論

本研究により得られた結論を以下にまとめて示す.

1．単離嗅細胞は，嗅上皮スライスよりもfura-2を用いた細胞内Ca^{2+}濃度の光学的計測に適した試料であることが明らかになった.

2．蛋白質を含まない標準Ca^{2+}濃度溶液を用いて340 nm励起と380 nm励起のRatio法により計算すると，カエル嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$は，静止状態で38±19 nM（平均値±標準偏差，細胞数14）であった.

3．ニオイ刺激による嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$変化は，一過性の上昇であった．$[Ca^{2+}]_i$上昇のピーク値は，静止状態の数倍以下であった．$[Ca^{2+}]_i$上昇の開始時期は，カエルの嗅細胞では７割が刺激期間中であり，約１割の細胞では刺激終了後であった．残りの２割はどちらか判断できなかった.

4．イモリ単離嗅細胞を用いて$[Ca^{2+}]_i$とパッチクランプ法による電気生理的応答の同時測定を行なった結果，ニオイ刺激によって誘起される内向き電流と$[Ca^{2+}]_i$上昇が同時に生じることが示された．また，受容器電位発生期と$[Ca^{2+}]_i$上昇の立ち上がり期の長さもほぼ一致していることが分かった.

5．forskolin投与によって，カエル及びマウスの嗅細胞の５割以上で$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じた．ニオイ応答をした嗅細胞の９割以上でforskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇が生じた．この結果は，cAMPセカンドメッセンジャー系による受容器電位発生仮説を支持している.

6．シトラルバ（柑橘臭）とイソアミルアセテート（バナナ臭）に対する嗅細胞のニオイ応答性は，応答の有無の組み合わせによって出来る４種のサブタイプすべての存在が確認された．少なくとも一つのニオイに応答する３種のサブタイプが全体に対して占める割合は，シトラルバにのみ応答するタイプの嗅細胞が最も多く，カエルでは約13%，マウスでは６%であった．マウスの応答率は，３種のサブタイプ全て

においてカエルのほぼ1/2であった.

7．マウス嗅細胞でニオイ選択性を調べた結果，IP_3系のニオイといわれるピラジンに対する応答率は，シトラルバあるいはイソアミルアセテートへの応答率に比べ数分の一以下と低かった．また，$[Ca^{2+}]_i$応答の立ち上がりもシトラルバなどcAMP系のニオイ応答時に比べ緩慢であった.

8．ニオイ応答時，嗅細胞の細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出が生じることが示唆された．シトラルバ感受性嗅細胞（n＝6）で調べたところ，67％の細胞においてニオイ誘起Ca^{2+}放出がみられた．これらの細胞では，同時に細胞外からのCa^{2+}流入も生じていることが示唆された.

9．ニオイ応答の活性化期に起こるCa^{2+}流入は，cAMP依存性カチオンチャネルの閉塞とCa^{2+}ポンプの活性化に必要であると推定された．Ca^{2+}チャネルブロッカーによるCa^{2+}流入の阻害によって，２割前後の嗅細胞でみられたニオイ誘起あるいはforskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇の持続も，この解釈を支持する結果であると考えられる.

10. Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出は，Ca^{2+}依存性K^+チャネルの活性化を介して，嗅細胞のニオイ応答からの回復を促進していると推測された.

11. 高K^+刺激によって，95.5％のマウス嗅細胞が一過性の大きな$[Ca^{2+}]_i$上昇を示した．この$[Ca^{2+}]_i$上昇は，刺激投与後ほとんど遅延時間なく開始し，電位依存性Ca^{2+}チャネルからのCa^{2+}流入は，素早い$[Ca^{2+}]_i$上昇を引き起こすことが示された.

12. 過半数の嗅細胞において，cAMP依存性カチオンチャネルからのCa^{2+}流入もニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に寄与していることが示唆された.

13. Ca^{2+}チャネルブロッカーは，ニオイ誘起あるいはforskolin誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇を０～100％の様々な程度で抑制した．抑制の程度は，nicardipine，Co^{2+}，La^{3+}の順で強かった．また，nicardipineによる抑制は不可逆的であった.

14. 高K^+刺激による$[Ca^{2+}]_i$上昇および電位依存性Ca^{2+}チャネルブロッカーの$[Ca^{2+}]_i$上昇へ

の効果は，電位依存性Ca^{2+}チャネルがニオイ誘起$[Ca^{2+}]_i$上昇に大きな寄与をしていることを示唆していた．

15. 直鎖炭化水素系ニオイ物質に対するマウス単離嗅細胞の$[Ca^{2+}]_i$上昇の濃度依存性を調べた結果，閾値レベルでは，直鎖炭化水素系ニオイ物質に対する応答スペクトルは，１分子種か炭素数が１のみ違う類似した２種の分子種に対してのみ応答し，刺激濃度の上昇に従って，応答スペクトルは広がっていった．これらの結果は，個々の嗅細胞はニオイ分子の微細な立体化学的構造をかなり厳密に識別できることを意味している．

16. 直鎖炭化水素系ニオイ物質に対する検出閾値は，細胞によって様々であったが，高感度のものでは１ μM前後であり，中には100 nMで応答する細胞もあった．

17. 上記に示すような同じ官能基を持つニオイ物質に対する嗅細胞の分子構造識別能は，Amooreの立体化学説のようにニオイ受容サイトとニオイ分子の相互作用が部分的に起こるのではなく，「ニオイ分子全体にわたって分布するニオイ受容サイトとの結合サイトがニオイ特異性を決定している」という仮説を支持するものであると考えられる．

18. Tissue-printing法と光学的応答計測法の併用は，組織内の近傍に存在している嗅細胞のニオイ応答を細胞レベルで比較する為に，有力な手法であることが示された．

19. 嗅上皮内で近傍に存在すると考えられる嗅細胞は，まったく異なるニオイ応答性を持つ細胞と極めて類似しているが異なるニオイ応答性を持つ細胞がモザイク状に存在していることが示唆された．

20. 嗅細胞のニオイ選択性の細胞レベルの分布特性は，「基底細胞から嗅細胞への分化において，一つの基底細胞から分化してくる嗅細胞群は類似のニオイ応答性を持ち，受容蛋白質の共通性が高くなるように遺伝子的な制御が行なわれている」という仮説を支持するものであった．

謝　辞

論文の最後に当り，本論文の内容についてご指導頂きました大阪大学基礎工学部生物工学科，葛西道生教授，村上富士夫教授，柳田敏雄教授，大阪大学工学部電気工学科，白藤純嗣教授に心より厚く御礼申し上げます．また，本研究を遂行するに当り多くの先生方からご指導を頂きました．細胞レベルの生物実験の経験がなかった筆者に，Ca^{2+}-ATPaseやイオンチャネルの実験を通して生体分子の機能を実験によって調べる感覚を指導して頂きました大阪大学基礎工学部生物工学科の葛西道生教授に深謝の意を表します．また，長期にわたり実際にCa^{2+}-ATPaseの実験を見せて頂きました北国英一氏，イオンチャネルの実験やストップドフローの装置の説明をして頂きました布垣一幾博士，谷藤　学博士（現在，福井大学工学部助教授）に感謝の意を表します．$[Ca^{2+}]_i$測定法については，見学の快諾と灌流のノウハウを始めとして多くの貴重な助言を頂きました三菱生命科学研究所の工藤佳久博士に深く感謝の意を表します．また，見学をさせて頂いただけでなく細胞単離用の酵素について情報を頂きました生理学研究所の大森治紀教授（現在，京都大学医学部）に深謝の意を表します．パッチクランプ法については，丁寧に技術の指導を頂きました生理学研究所助手の倉橋　隆博士（現在，慶応大学医学部）に，深く感謝致します．ニオイ受容に関する調査研究の際，実験の見学を快く承諾されて筆者に嗅覚系の動物実験に触れる機会を与えて頂きました北海道大学薬学部栗原堅三教授，北海道大学理学部鈴木教世博士，筑波大学生物科学系渋谷達明教授，群馬大学医学部小野田法彦助教授（現在，金沢医科大学教授）に深く感謝致します．アモルファスシリコンの光学的特性の研究を通して，光学的計測法の基礎をご指導頂きました大阪大学工学部犬石嘉雄名誉教授と大阪大学工学部白藤純嗣教授に心より深謝致します．アモルファスシリコンから嗅覚へ研究分野を転向する機会を与えて頂き，中々進展しない研究の遂行を暖かく見守って頂きました元電総研大阪支所長栗岡　豊博士（現在，近畿大学理工学部教授）に深く感謝致します．嗅覚に対する

知見を深めるため調査研究を行なうことをご助言頂き，本研究を支援して頂きました電総研大阪ライフエレクトロニクス研究センター長の南條　基博士に深謝の意を表します．研究予算について多大なご配慮を頂き，研究の遂行に際しても数々のご指導・ご鞭撻を頂いた電総研大阪ライフエレクトロニクス研究センター生体エレクトロニクス研究室長の武林正峯氏に深謝の意を表します．$[Ca^{2+}]_i$測定装置の購入予算について多大なご配慮を頂いただけでなく，必要な装置の借用を常に快諾頂き，また，研究の遂行に際して持ち上がる問題に関して貴重な議論・ご意見・ご指導を頂きました電総研大阪ライフエレクトロニクス研究センター環境エレクトロニクス研究室長の角井嘉美氏に深謝の意を表します．嗅覚研究への導入の指導と研究の遂行に際して数々のご指導・ご協力・ご鞭撻を頂いた電総研大阪ライフエレクトロニクス研究センター生体エレクトロニクス研究室の外池光雄主任研究官に深謝の意を表します．電総研超分子部長松本　元博士には，折に触れてご指導・ご協力・ご鞭撻頂き，研究推進上の大きな支えになりました．ここに深く感謝の意を表します．また，本研究は，共同研究者である電総研大阪ライフエレクトロニクス研究センター生体エレクトロニクス研究室の廣野順三氏の細胞単離技術と協力なくしては達成できなかったことを記し，深く感謝致します．さらに，研究の円滑な遂行にご協力頂きました大阪ライフエレクトロニクス研究センター庶務課の諸氏及び筑波の電総研の関係各位，大阪ライフエレクトロニクス研究センターの生体エレクトロニクス研究室及び環境エレクトロニクス研究室の諸氏に感謝致します．最後に影になって著者を支えてくれた家族に感謝します．

参考文献

1) 佐藤: 味と匂学会誌 (submitted)

2) Buck,L. & Axel,R.: A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition, Cell, 65 : 175-187 (1991)

3) Boekhoff,I., Tareilus,E., Strotmann,J. & Breer,H.: Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants, EMBO J., 9 : 2453-2458 (1990)

4) Pace,U., Hanski,E., Salomon,Y. & Lancet,D.: Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception, Nature, 316 : 255-258 (1985)

5) Sklar,P.B., Anholt,R.R.H. & Snyder,S.H.: The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells: differential stimulation by distinct classes of odorants, J.Biol.Chem., 261 : 15538-15543 (1986)

6) Kurahashi,T. & Kaneko,A.: High density cAMP-gated channels at the ciliary membrane in the olfactory receptor cell, NeuroReport, 2: 5-8 (1991)

7) Nakamura,T. & Gold,G.H.: A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia, Nature, 325 : 442-444 (1987)

8) Suzuki,N.: Voltage- and cyclic nucleotide-gated currents in isolated olfactory receptor cells, In Brand,J.G., Teeter,J.H., Cagan,R.H. & Care,M.R.(Eds.), Chemical Senses Vol.1, 469-493, Marcel Dekker, New York (1989)

9) Kurahashi,T.: The response induced by intracellular cyclic AMP in isolated olfactory receptor neurons of the newt, J.Physiol., 430 : 355-371 (1990)

10) Kurahashi,T.: Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt, J.Physiol., 419 : 177-192 (1989)

11) Sato,T., Hirono,J., Tonoike,M. & Takebayashi,M.: Two types of increases in free Ca^{2+} evoked by odor in isolated frog olfactory receptor neurons, NeuroReport, 2: 229-232 (1991)

12) Jones,D.T. & Reed,R.R.: G_{olf}: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction, Science, 244 : 790-795 (1989)

13) Restrepo,D., Miyamoto,T., Bryant,B.P. & Teeter,J.H.: Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the chennel catfish, Science, 249 : 1166-1168 (1990)

14) Raming,K., Krieger,J., Strotmann,J., Boekhoff,I., Kubick,S., Baumstark,C. & Breer,H.: Cloning and expression of odorant receptors, Nature, 361 : 353-356 (1993)

15) Kleene,S.J.: Origin of the chloride current in olfactory transduction, Neuron, 11 : 123-132 (1993)

16) Kurahashi,T. & Yau,K.-W.: Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells, Nature, 363 : 71-74 (1993)

17) Lowe,G. & Gold,G.H.: Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells, Nature, 366 : 283-286 (1993)

18) Sato,T., Hirono,J. & Tonoike,M.: Molecular mechanism of olfactory transduction: As viewed from the dynamics in cytoplasmic free calcium, Sensors and Materials, 4: 11-20 (1992)

19) Koshimoto,H., Katoh,K., Yoshihara,Y. & Mori,K.: Distribution of putative odour receptor proteins in olfactory epithelium, NeuroReport, 3: 521-523 (1992)

20) Strotmann,J., Wanner,I., Krieger,J., Raming,K. and Breer,H.: Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurons., NeuroReport 3: 1053-1056, 1992.

21) Kurahashi,T. & Shibuya,T.: Ca^{2+}-dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt, Brain Res., 515 : 261-268 (1990)

22) 中村: 嗅覚情報変換におけるサイクリックAMPとカルシウム・イオンの研究,味と匂のシンポジウム論文集, 25 : 1-4 (1991)

23) Sato,T., Hirono,J., Tonoike,M. & Takebayashi,M.: Study of olfactory transduction by analysis of dynamics of odor-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in receptor neurons,Proceedings of the 11th International Symposium of Olfaction and Taste, (in press)

24) Labarca,P. Simon,S.A. & Anholt,R.R.H.: Activation by odorants of a multistate cation channel from olfactory cilia., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 85 : 944-947 (1988)

25) Anholt,R.R.H. & Rivers,A.M.: Olfactory transduction: Cross-talk between second-messenger system, Biochem., 29 : 4049-4054, 1990.

26) Kramer,R.H. & Siegelbaum,S.A.: Intracellular Ca^{2+} Regulates The sensitivity of cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor neurons, Neuron, 9: 897-906 (1992)

27) Kawamura,S. & Murakami,M.: Calcium-dependent regulation of cyclic GMP phosphodiesterase by a protein from frog retinal rods, Nature, 349 : 420-423 (1991)

28) Shirley,S.G., Robinson,C.J., Dickinson,K., Aujla,R. & Dodd,G.H.: Olfactory adenylate cyclase of the rat: Stimulation by odorant and inhibitionby Ca^{2+}, Biochem.J., 240 : 605-607 (1986)

29) 佐藤,廣野,外池,武林: ニオイ誘起嗅細胞内Ca^{2+}濃度上昇の２つの経路とCa^{2+}チャンネルブロッカーによる抑制,味と匂のシンポジウム論文集, 25 : 17-20 (1991)

30) 廣野、佐藤、外池、武林: ニオイ刺激による嗅細胞内Ca^{2+}濃度変化と電気的応答の測定,味と匂のシンポジウム論文集, 25 : 193-196 (1991)

31) 佐藤,廣野,外池,武林: マウス嗅細胞のニオイ応答性と細胞内Ca^{2+}濃度の動態,味と匂のシンポジウム論文集, 26 : 229-232 (1992)

32) Grynkiewicz,G., Poenie,M. & Tsien,R.Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, J.Biol.Chem., 260 : 3440-3450 (1985)

33) 佐藤、外池: 嗅細胞の細胞内Ca^{2+}濃度測定,味と匂のシンポジウム論文集, 22 : 185-188 (1988)

34) 佐藤,廣野,外池,武林: ニオイ刺激による単離嗅細胞内Ca^{2+}濃度変化,味と匂のシンポジウム論文集, 23 : 285-288 (1989)

35) Hirono,J., Sato,T., Tonoike,M. & Takebayashi,M.: Simultaneous recording of $[Ca^{2+}]_i$ increases in isolated olfactory receptor neurons retaining their original spatial relationship in intact tissue, J.Neurosci.Method, 42 : 185-194 (1992)

36) Blinks,J.R., Wier,W.G., Hess,P. & Prendergast,F.G.: Measurement of Ca^{2+} concentrations in living cells, Prog.Biophys.molec.Biol., 40 : 1-114 (1982)

37) 廣野：未発表データ

38) Restrepo,D. & Teeter,J.H.: Olfactory neurons exhibit heterogeneity in deplarization-inuced calcium changes, Am.J.Physiol., 258 : C1051-C1061 (1990)

39) 佐藤,廣野,外池,武林: ニオイ受容における嗅細胞内カルシウムの動態とその機能,電子技術総合研究所彙報, 55 : 983-993 (1991)

40) 宮川,牧野,玉川,尾碕: 蛍光性カルシウム指示薬fura-2による神経細胞内カルシウムイオン濃度測定法の改良-カルシウム濃度の正確性と細胞内構造との対応,脳と学習のメカニズム(丸善)松本元著,194-205(1992)

41) Takagi,S.F. & Shibuya,T.: 'On'- and 'Off'-responses of the olfactory epithelium, Nature, 184 : 60 (1959)

42) Gesteland,R.C., Lettivin,J.Y., Pitts,W.H. and Rojas,A.: "Odor specificities of the frog's olfactory receptors" in Olfaction and Taste Vol.1, Zotterman,Y.(ed.), pp.19-34, Pergamon Press, Oxford (1963).

43) Gesteland,R.C., Lettivin,J.Y. and Pitts,W.H.: Chemical transmission in the nose of the frog. J.Physiol. 181 : 525-559 (1965).

44) Shibuya,T. & Tucker,D.: Single unit responses of olfactory receptors in vultures, In Hayashi,T.(ed), Olfaction and Taste II, 219-233, Pergamon Press, Oxford (1967)

45) Sicard,G. and Holley,A.: Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants, Brain Res. 292 : 283-296, 1984.

46) Getchell,T.V. and Shepherd,G.M.: Responses of olfactory receptor cells to step pulses of

odour at different concentrations in the salamander., J.Physiol. 282 : 521-540, 1978.

47) Sato,T., Hirono,J., Tonoike,M. & Takebayashi,M.: Olfactory receptor cells can discriminate similar structures of odorants and some different subtypes may exist in neighborhood, Abstracts of the 32nd International Congress of Physiological Sciences, (1993)

48) 吉岡: 電位依存性Caチャネル, 生体の科学, 40 : 217-225 (1989)

49) Amoore,J.E., Johnston,J.W.,Jr. and Rubin,M.: The stereochemical theory of odor, Sci.Amer. 210 : 42-49, 1964.

50) Kurihara,K.: Molecular mechanisms of reception and transduction in olfaction and taste., Jap.J.Physiol. 40 : 305-324 (1990).

51) Mori,K., Mataga,N. and Imamura,K.: Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules., J.Neurophysiol. 67 : 786-789 (1992).

52) Imamura,K., Mataga,N. and Mori,K.: Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds., J.Neurophysiol. 68 : 1986-2002 (1992).

53) Sato,T., Hirono,J., Tonoike,M. & Takebayashi,M.: submitted

54) Firestein,S. and Shepherd,G.M.: Neurotransmitter antagonists block some odor responses in olfactory receptor neurons. NeuroReport 3: 661-664, 1992.

55) Amoore,J.E., Palmieri,G., Wanke,E. and Blum,M.S.: Ant alarm pheromone activity: correlation with molecular shape by scanning computer, Science 165 : 1266-1269, 1969.

56) Amoore,J.E.: The stereochemical specificities of human olfactory receptors, Perfum.Essent.Oil Rec. 43 : 321-323, 330, 1952.

57) Ueda,T. and Kobatake,Y.: Changes in membrane potential, zeta potential and chemotaxis of Physarum polycephalum in response to n-alcohols, n-aldehydes and n-fatty acids, Cytobiol., 16 : 16-26, 1977.

58) Ottoson,D.: Studies on the relationship between olfactory stimulating effectiveness and physicochemical properties of odorant compounds, Acta Physiol.Scand. 43 : 167-181, 1958.

59) Mackay-Sim,A., Shaman,P. & Moulton,D.G.: Topographic coding of olfactory quality: odorant-specific patterns of epithelial responsivity in the salamander, J.Neurophysiol., 48 : 584-596 (1982)

60) Kent,P.F. & Mozell,M.M.: The recording of odorant-induced mucosal activity patterns with a voltage-sensitive dye, J.Neurophysiol. 68 : 1804-1819 (1992).

61) Ressler,K.J., Sullivan,S.L. and Buck,L.B.: A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium, Cell 73 : 597-609 (1993).

62) Hirono,J., Sato,T., Tonoike,M. & **Takebayashi,M.**: Optical recordings of calcium responses in neighboring olfactory receptors suggest that the distribution of subtypes of receptors is heterogeneous, Proceedings of the 11th International Symposium of Olfaction and Taste, (in press)