

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本味と匂学会誌 (2006) 13:561-562.

匂い応答発現における電位依存性カルシウムチャネル β 3サブユニットの役割

白岩剛, 柏柳誠, 高橋陽一郎, 渡邊博之, 三好一郎, Bernd Lindemann, 飯島俊彦, 村上学

匂い応答発現における電位依存性カルシウムチャネル 3 サブユニットの役割

白岩剛¹、柏柳誠²、高橋陽一郎³、渡邊博之³、三好一郎⁴、Bernd Lindemann⁵、
飯島俊彦⁶、村上学⁶

(¹北大・院薬、²旭川医大・第二生理、³秋田大・医・第二内科、⁴名古屋市大・医・実験動物、
⁵ザールランド大・第二生理、⁶秋田大・医・機能制御医学)

目 的

嗅覚の特徴の一つは、匂い刺激が続けられても応答が順応することである。この性質を有するために、ある匂い物質が存在していてもその匂いに順応が生じ、新たに出現した他の匂いを感じることができる。このために、順応は生物の生存に非常に重要な機能である。cAMP、あるいは、cAMP 濃度を全く変化させない匂い物質やアミノ酸などの水溶性の匂い物質の応答に関与していると考えられる IP₃ による応答の順応には、Ca²⁺が関与していることが報告されている¹⁾。また、嗅細胞には Ca²⁺作動性 Cl⁻チャネルが存在し、細胞内で増加した Ca²⁺により匂い応答が増強される可能性が考えられている。一方、嗅細胞には電位依存性 Ca²⁺チャネルが存在している。電位依存性 Ca²⁺チャネルが脱分極により開口すると、匂い応答はより増強されることと流入した Ca²⁺による順応を増強する可能性が考えられる。そこで、電位依存性 Ca²⁺チャネルを構成するβ3サブユニットを欠損したマウスを用いて匂い応答に対する電位依存性 Ca²⁺チャネルの働きを検討した。

方 法

実験は、北海道大学動物実験指針に従って行った。β3 欠損マウスは先に報告した DNA クローンを用いて作成した²⁾。嗅上皮から常法により RNA を分離し、各サブユニットの mRNA の発現を検討した。抗 CaV1.2、CaV1.3、CaV2.1、CaV2.2、CaV2.3、β1、β2、β3 およびβ4 抗体を用いて、Western 解析により嗅覚器における各サブユニットの発現を検討した。また、抗 CaV2.2 抗体を用いて、CaV2.2 の遊離嗅細胞内における発現を免疫染色法により解析した。電位依存性 Ca²⁺電流は、遊離嗅細胞から常法により測定した。嗅球における匂い応答は、抗 Fos 抗体を用いて免疫染色し、興奮した神経細胞の密度を測定することにより評価した。

結 果 および 考 察

RT-PCR 法により、CaV2.1、CaV2.2、CaV1.2、β1、β2、β3 およびβ4 サブユニットに対応するフラグメントを検出した CaV2.1、CaV2.2、CaV1.2 サブユニットは、P/Q-、N-および L-type Ca²⁺チャネルを構成するので、嗅上皮には様々なタイプの電位依存性 Ca²⁺チャネルが存在し、匂い情報の伝達に関与している可能性を示唆した。

Roles of calcium channel β3 subunit in olfactory signal transduction. Takeshi Shiraiwa¹, Makoto Kashiwayanagi², Yoichiro Takahashi³, Hiroyuki Watanabe³, Ichiro Miyoshi⁴, Bernd Lindemann⁵, Toshihiko Iijima⁶ and Manabu Murakami⁶, ¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo 060-0812, ²Dep. Physiol., Asahikawa Med. Coll., Asahikawa 078-8510, ³II Dep. Internal Med., Akita Univ. Sch. Med., Akita, ⁴Cent. Exp. Ani. Sci., Nagoya City Univ., Nagoya, ⁵Inst. II Physiol., Univ. Saarlandes, Germany, ⁶Dep. Pharmacol., Akita Univ. Sch. Med., Akita 010-8543; yanagi@asahikawa-med.ac.jp, Fax +81-166-68-2339

β3 欠損にともなう嗅上皮における各種 Ca²⁺チャネルの発現変化を、抗 CaV1.2、CaV1.3、CaV2.1、CaV2.2、CaV2.3、β1、β2、β3 およびβ4 抗体を用いて、嗅覚器における各サブユニットの発現を Western 解析した。β3 を欠損したマウスでは、N-タイプチャネルを構成する CaV2.2 と L-タイプチャネルを構成する CaV1.2 の発現が減少した。しかしながら、P/Q-タイプチャネルを構成する CaV2.1 の発現は顕著な変化は認められなかった。また、β1、β2 サブユニットの発現にも顕著な変化が認められなかった。一方、β4 サブユニットはβ3 欠損マウスにおいて顕著な発現の増加がみられた。この結果は、β4 サブユニットが補償的な役割を果たしている可能性を示唆した。また、β3 欠損マウスではβ3 の発現は認められなかった。

抗 CaV2.2 抗体を用いて野生型マウス遊離嗅細胞における CaV2.2 の発現の局在を免疫組織化学的に解析したところ、デンドライトおよび細胞体に明らかな免疫陽性像を確認した。一方、β3 欠損マウスでは、弱い染色像が観察された。L-タイプチャネルを構成するα_{1C} サブユニットは、感覚細胞に発現していた。β3 欠損マウスでは、α_{1A} サブユニットおよびα_{1B} サブユニットの発現が顕著に減少していた。一方、α_{1C} サブユニットの発現は欠損マウスでも変化が見られなかった。β3 欠損の Ca²⁺電流に対する効果を解析するために、膜電位固定下でホールセル電流を測定した。β3 欠損マウスの嗅細胞で記録したピーク電流の強度 (10.2 ± 2.7 pA) は、野生型マウス (24.7 ± 3.2 pA) の半分以下であった (p < 0.05)。

先に我々は、電位依存性β3 欠損マウスのトリエチルアミンに対する応答は、野生型マウスの応答と比べて、約 3 倍近くに増大することを報告した³⁾。嗅細胞で受容された匂い情報は嗅球に伝えられる。そこで、β3 欠損マウスの匂い応答性を嗅球における神経細胞の応答性で評価した。コントロール塩溶液(尿と同じ塩組成の溶液)と尿サンプルを与えると、β3 欠損マウスと野生型マウスで Fos 陽性細胞密度に有意な違いが見られた (F(1, 12) = 15.831, P = 0.0018; Two-way ANOVA)。β3 欠損マウスにおける 2 倍および 10 倍希釈尿による匂い刺激後に発現した Fos 陽性細胞密度は、野生型マウスよりも有意に高かった。

本実験で、N-型 Ca²⁺チャネルを構成するβ3 サブユニットを欠損するマウスでは、尿匂い刺激時の嗅球の僧帽細胞層における Fos 陽性細胞は野生型マウスと比べて高いことが明らかになった。嗅球の僧帽細胞層には、CaV2.2 が発現している(未発表)。このため、β3 を欠損すると匂い応答が伝えられないために Fos 陽性細胞密度が減少することも考えられる。しかしながら、β3 欠損マウスでは匂い応答 (EOG) が増強されることから、β3 サブユニットを欠損すると、脱分極により生ずる嗅細胞内への Ca²⁺の流入が減少し、トランスダクションチャネルの順応が押さえられるために結果的に匂い応答が増強される可能性を示唆した。

文 献

- 1) Kashiwayanagi M: Dialysis of inositol 1,4,5-trisphosphate induces inward currents and Ca²⁺ uptake in frog olfactory receptor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 666-671 (1996)
- 2) Murakami M, Wissenbach U and Flockerzi V: Gene structure of the murine calcium channel β3 subunit, cDNA and characterization of alternative splicing and transcription products. *Eur. J. Biochem.* 236, 138-143 (1996)
- 3) 白岩剛, 村上学, 柏柳誠: 電位依存性カルシウムチャネル β3 サブユニット欠損マウスで見られた嗅覚系における神経興奮の亢進. *日本味と匂誌* 7, 413-416 (2000)