

フェロモン受容におけるシグナル伝達系

柏柳誠（旭川医科大学生理学第二講座）

はじめに

嗅覚系は、一般的な匂いを受容する主嗅覚系とフェロモンを受容する鋤鼻系（副嗅覚系）から構成されている。嗅細胞の形態的な特徴は、匂い分子を受容する部位が嗅繊毛と呼ばれている繊毛に存在していることにある。一方、鋤鼻感覚細胞は、フェロモン受容分子が微繊毛に存在している。ただし、例外も存在するので、全てが簡潔にこのように分類されるわけではない。鋤鼻感覚細胞と嗅細胞が果たす生理的な意義は、フェロモン分子や匂い分子が有する化学的な情報を脳で処理することが可能な電気的な情報に変換することにある。フェロモン分子は、鋤鼻感覚細胞に存在する受容体に結合して、感覚細胞の細胞電位を変化させる。細胞の電位変化はインパルス信号に変換され、鋤鼻神経を介してフェロモン情報が脳に送られる。本章では、嗅細胞における匂い受容機構と対比させつつ、鋤鼻感覚細胞におけるフェロモンの受容・識別機構について解説する。

1 嗅細胞における匂い受容

2004年における Buck 博士と Axel 博士のノーベル賞を受賞した嗅覚受容体に連なる匂いの受容に関する研究は、匂い情報の電気的な情報への変換機構を明らかにすることから進展した。現在、一番広く受け入れられている匂いの受容機構は、cAMP をセカンドメッセンジャーとして介する経路である¹⁾。すなわち、匂い物質が嗅覚受容体（嗅覚 GPCR）に結合すると、GTP 結合蛋白質を介して、アデノシン 3 リン酸（ATP）を cAMP に変換する酵素を活性化し、嗅細胞内の cAMP 濃度を増加させる。その結果、cAMP は cAMP 作動性チャネルを開けることにより細胞が脱分極する。

ただし、全ての揮発性の匂い物質が cAMP を産生する性質を持っているわけではない。例えば、一番数多くの種類の匂い物質について調べられているウシガエルでは、40%近い匂い物質は cAMP を産生させない²⁾。この実験結果を cAMP だけがセカンドメッセンジャーと考える立場で説明しようとする、60%を占めるゲラニオールなどの cAMP を産生させる匂い物質に反応する嗅細胞の数は非常に多いが、40%近いリリアルなどの AMP を産生させない匂い物質に対して反応する嗅細胞の数が圧倒的に少ないと考える必要がある。すなわち、本当はリリアルなどの cAMP を産生させない匂い物質も実は cAMP を産生させているが、嗅細胞を全部集めて cAMP の産生を測定する生化学的な実験では cAMP の産生が反映されないという論理である。しかしながら、生化学的な測定が行われてウシガエルの嗅細胞を用いてこの推測が正しいかが検証されている。一つ一つの嗅細胞から匂い反応を測定し、cAMP の増加を示すゲラニオールと

cAMP を産生させないライラールに対して応答する細胞の割合を比べてみると、ゲラニオールは60%の嗅細胞で応答が測定され、ライラールは75%の嗅細胞で応答が測定された³⁾。この結果は、ウシガエルの嗅細胞でライラールによる cAMP の産生が記録できなかったのは、ライラールに
応答する細胞の数が少なかったためではないことを示している。cAMP を増加させないにもか
かわらず匂い応答を引き起こす匂い物質の存在は、生化学的な実験が行われている限りでは揮発
性の匂い物質を受容する動物の間では種間の違いを越えて成立する。たとえば、ウシガエルの嗅
細胞で cAMP 産生を引き起こさない匂い物質は、ラット⁴⁾、ヒツジ⁵⁾およびカメ⁶⁾などの嗅細胞
でも cAMP 産生を引き起こさない。

水中に生息している動物の嗅覚器は気体と接することはなく、水と常に接触している。このた
めに、サカナなどの嗅覚器は、種々のアミノ酸や胆汁酸などの水溶性の物質を匂い物質として感
じている。ただし、サカナの嗅細胞も神経細胞が匂い物質を受容するために分化した細胞であり、
揮発性匂い物質を受容する嗅細胞と同様に嗅繊毛を有する特徴的な形態を有している。当初、水
溶性の匂い物質は cAMP を産生させる効果を有する可能性が報告された。しかし、嗅繊毛を用
いた精密な測定の結果、いずれのアミノ酸も匂い応答が十分に生ずる濃度でありながら cAMP
の産生を促さなかった⁷⁾。以上のようにセカンドメッセンジャーの産生を測定する生化学的な研
究は、cAMP だけが匂い応答の発現に寄与しているのではないことを示している。

Breerのグループは、cAMPの産生を引き起こさない揮発性の匂い物質の中にはイノシトールト
リスリン酸 (IP₃) を産生させる匂い物質が存在することを見出した⁴⁾。彼らが測定した匂い物質
は、cAMPかIP₃のいずれか一つのセカンドメッセンジャーしか増加させなかった。また、ヒツジ
の嗅細胞でも匂い物質がIP₃の産生を促した⁵⁾。このように、揮発性匂い物質の中にはcAMP濃度
を増加させるグループとIP₃濃度を増加させるグループが存在する。また、サカナの嗅上皮には
IP₃合成酵素が存在することが知られており、IP₃がセカンドメッセンジャーとして匂い応答の発
現に関係している可能性が考えられていた。Breerの研究グループは、種々のアミノ酸がナマズ
の嗅繊毛にIP₃の産生を引き起こすことを示した⁷⁾。

カエル⁸⁾、カメ⁹⁾、ラット、ヒト、ナマズやロブスターなどの嗅細胞にIP₃を注入すると、興奮
性の応答が発現することが報告された。これらの結果は、匂い物質により嗅細胞内のIP₃濃度が
増加すると嗅細胞が興奮することを示唆した。一般的にはIP₃で開くチャネル (IP₃作動性チャ
ネル) は、Ca²⁺を貯蔵している細胞内小胞に存在している。しかしながら、Restrepoのグループは、
この細胞内小胞が含まれていない嗅繊毛膜標品からIP₃で活性化するコンダクタンスの上昇を記
録した¹⁰⁾。また、膜電位固定下でCa²⁺感受性の蛍光色素fura2を負荷し、IP₃が引き起こす応答につ
いて解析した結果から、IP₃は細胞膜に存在するIP₃作動性チャネルに直接作用することにより応
答を発現させることを示唆された⁸⁾。

アフリカツメガエルは生活のほとんどを水中で送っているが、時々水面に顔を出して空気を鼻から吸い込んで呼吸している。このために、アフリカツメガエルの嗅覚器は、水上に顔を出したときに空気が入り込む主憩室と水中で水が流れ込む中憩室とに弁により分割されている(図1A)。このような構造的な特徴から、アフリカツメガエルは揮発性の匂い物質を受容するために主憩室

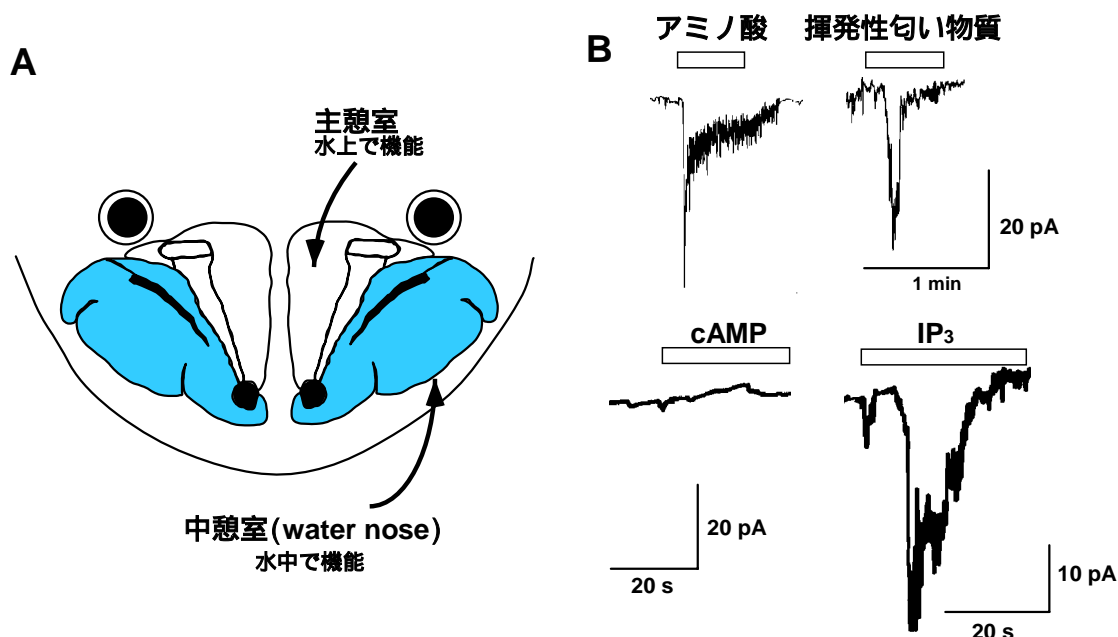


図1 アフリカツメガエル中憩室嗅細胞の応答特性

A)アフリカツメガエルには水中の匂いを感じる中憩室と空気中の匂いを感じる主憩室の二つの嗅覚器が存在。B)中憩室嗅細胞では、アミノ酸および揮発性匂い物質を投与すると内向き電流が生ずる。cAMPを細胞内投与しても内向き電流は生じないが、IP₃を投与すると内向き電流が生ずる。11、13より改変。

を用い、水溶性の匂い物質を受容するために中憩室を用いると考えられてきた。実際、アミノ酸は中憩室の嗅細胞に匂い応答を引き起こした(図1B)¹¹⁾。また、中憩室嗅細胞には揮発性匂い物質に対する受容体が見つかっていない¹²⁾のために、水溶性匂い物質にのみ応答すると推測されていた。予想外であったが揮発性の匂い物質も同様の応答を引き起こした。一方、高濃度のcAMPをパッチピペットから中憩室の嗅細胞内に投与しても応答は見られなかったが、IP₃を投与した場合は興奮性の応答が見られた¹³⁾。この結果は、アフリカツメガエル中憩室の嗅細胞では、水溶性の匂い物質に対する応答の発現にcAMPが寄与していないこととともに揮発性の匂い物質に対する応答にもcAMPが関与していないことを明らかにした。このような結果から、アミノ酸の受容の際にはIP₃がセカンドメッセンジャーとして働いている可能性を示唆している。

2 鋤鼻器感覚細胞の電氣的性質

フェロモンは、爬虫類、両生類およびほとんどの哺乳類で主として鋤鼻器と呼ばれる器官で受

容される。鋤鼻器は鼻腔内には存在するが、匂いを受容する嗅上皮とは独立している。嗅細胞は嗅繊毛を有するが、鋤鼻器感覚細胞は微絨毛を有していると点で形態的な違いが見られる。鋤鼻器感覚細胞は、フェロモンが持つ化学的な情報を脳における情報処理が可能となる電気的な情報に変換する役割を担っている。鋤鼻器感覚細胞は、嗅細胞と同様に神経細胞がフェロモンを受容できるように特殊化した細胞である。このため、鋤鼻器感覚細胞におけるフェロモン受容機構を解明するためには、鋤鼻器感覚細胞における電気的な測定が不可欠である。しかしながら、鋤鼻器感覚細胞の大きさが小さかったために研究は進んでいなかった。

一般的に、個々の細胞の電気生理学的な測定を行う際には、トリプシンやコラゲナーゼなどの酵素処理を行って単離する。しかしながら、筆者らが嗅細胞の単離を行ってきた過程から、酵素で処理すると匂い応答が測定できにくい傾向があることを経験してきた。また、後に述べるように、細胞内にIP₃を投与したときに応答が見られないと報告している研究グループは、ほとんどが細胞を単離する際に酵素処理を行っている。一方、嗅細胞の場合には単離した後に嗅細胞を同定するときに嗅繊毛を有しているかどうかを有力な判断材料にできるが、鋤鼻器感覚細胞は嗅繊毛よりも微細な微絨毛を有しているために光学顕微鏡で鋤鼻器感覚細胞を特定することが難しい。そこで、筆者らは鋤鼻器感覚上皮のスライスを作成し、スライス断面からパッチ電極をアプローチする方法を適用することにより、フェロモンに対する電気的な応答を測定できる系を確立した^{14,15)}。

鋤鼻器感覚細胞は、神経細胞由来の細胞であるために、フェロモンを受容した際に生ずる脱分極性の受容器電位により活動電位が発生し、神経軸索を活動電位が伝播することにより一次中枢に存在する副嗅球の僧帽細胞にフェロモン情報を伝達すると考えられていた。しかしながら、鋤鼻器感覚細胞に活動電位が発生するために必要な電位依存性のNaチャンネルやKチャンネルなどが存在するかは不明だった。そこで、スライスパッチ系を用いて電気生理学的に解析したところ、フェロモンの一般の神経細胞と同様に、電位依存性Naチャンネル、電位依存性Caチャンネルや電位依存性Kチャンネルを有していることが判明した^{14,15)}。カエル、カメやラットの鋤鼻器感覚細胞に1 pA程度の微弱な電流を通電して脱分極させると、神経インパルスが発生する^{14,15)}。この結果は、フェロモンが鋤鼻器感覚細胞をほんのわずかに興奮させることにより、その情報は神経インパルスに変換されて脳にフェロモン情報が伝えられることを示唆している。実際、ラットの鋤鼻器感覚細胞にフェロモン作用を有する尿標品を与えると、わずかな脱分極により神経インパルスが発生する。

3 フェロモン応答に関与するカンドメッセンジャー

3-1 爬虫類におけるcAMPとIP₃の関与

爬虫類でも、フェロモンが重要な働きをしている。ガーターヘビのオスは、メスから分泌される誘因物質を鋤鼻器で感知して、一匹のメスに群がり生殖を行う。脊椎動物におけるフェロモン受容のしくみは、まず、爬虫類で解明された。Halpernのグループは、餌から分泌されるガータ

ヘビの誘引物質を単離・精製し、その物質が糖蛋白質であることを明らかにしてES20と命名した。ES20は、同種の個体間の化学的なコミュニケーションを司るのではないために正式にはフェロモンと呼べないが、鋤鼻器を介して受容される。ES20は、ヘビ鋤鼻器上皮膜標品のIP₃濃度を増加させ、cAMP濃度を減少させた¹⁶⁾。

筆者らは、カメの鋤鼻器感覚上皮から調製した膜標品には、cAMP合成酵素の活性化剤として作用するホルスコリンで刺激したところ、濃度依存的なcAMPの産生が認められることを示した⁶⁾。また、GTP結合蛋白質を刺激するためにGTPを加えたところ、濃度依存的なcAMPの産生を認めた。鋤鼻感覚上皮の膜表品で認められたホルスコリンおよびGTPに対する濃度依存性は、カメの嗅上皮で見られたものと同じ濃度範囲で見られた。これらの結果は、嗅上皮と同程度のホルスコリン感受性あるいはGTP感受性を有するアデニル酸シクラーゼ活性が鋤鼻感覚上皮に存在することを示した⁶⁾。次に、筆者らはcAMPが嗅細胞と同じように興奮性のセカンドメッセンジャーとして機能するかどうかを鋤鼻感覚細胞内にcAMPをパッチ電極から投与することにより解析した。その結果は、cAMPは嗅細胞と同様の濃度依存性を有する興奮性の応答をカメの鋤鼻器感覚細胞に引き起こした⁶⁾。このような結果から、鋤鼻感覚細胞でもcAMPをセカンドメッセンジャーとして活用するメカニズムが機能していることが予想された。さらに、IP₃をカメ鋤鼻感覚細胞に投与したところ、興奮性の電流応答が生じた¹⁷⁾。これらの結果から、カメのフェロモンに対する応答は、cAMPやIP₃を介して発現している可能性が考えられる。しかしながら、筆者らの結果からカメ以外の爬虫類や哺乳類でもcAMPが興奮性の応答を引き起こすかと予想されたが、cAMPは興奮性のセカンドメッセンジャーとして機能することを示す結果は得られていない。たとえば、谷口らはガーターヘビの鋤鼻感覚細胞に高濃度のcAMPを投与したが、興奮性の応答は見られなかった。一方、IP₃はガーターヘビの鋤鼻感覚細胞に興奮性の応答を引き起こした¹⁸⁾。この結果から、全ての爬虫類のフェロモン受容にcAMPが必ずしも必要ではないことが示唆された。

3-2 哺乳動物のフェロモン受容で重要なホスファチジルイノシトール系

哺乳動物の鋤鼻器感覚細胞の情報変換機構も、揮発性の匂い物質を受容する嗅細胞やカメの鋤鼻器感覚細胞のそれとは異なっている。嗅細胞には、cAMP作動性チャネルのタイプIサブユニットとタイプIIサブユニットが存在している。このため、嗅細胞にcAMPを投与すると興奮性の応答が生ずる。しかしながら、マウスの鋤鼻器感覚細胞には、タイプIIサブユニットしか存在しない¹⁹⁾。一般に、タイプIIのみでは機能的なチャネルを構成しないと言われている。事実、我々は、ラットの鋤鼻器感覚細胞に嗅細胞では最大レベルの応答を引き起こす1 mMという高濃度のcAMPを注入しても応答はみられなかった(図2A)²⁰⁾。同様に、マウスの鋤鼻感覚細胞でもcAMPは興奮性の応答を引き起こさなかった¹⁹⁾。

また、生化学的な実験からもcAMPの関与は否定的な結果しか得られていない。尿中には、さ

さまざまな作用を有するフェロモンが含まれているので、フェロモンの作用を調べる際によく用いられている。同じ種類の動物で用いられているフェロモンは、一種類ではない。たとえば、オスラットの尿の中には、排卵周期の復活を引き起こすフェロモンが存在する。また、メスラットを高密度で飼育すると、発情が停止してしまうが、これはメスラット尿中には発情を停止させるフェロモンが存在しているためである。後に述べるように電気生理学的な測定ではウイスター系オス、ウイスター系メスおよびドンリユー系オスラット由来の尿はウイスター系メスラットの鋤鼻

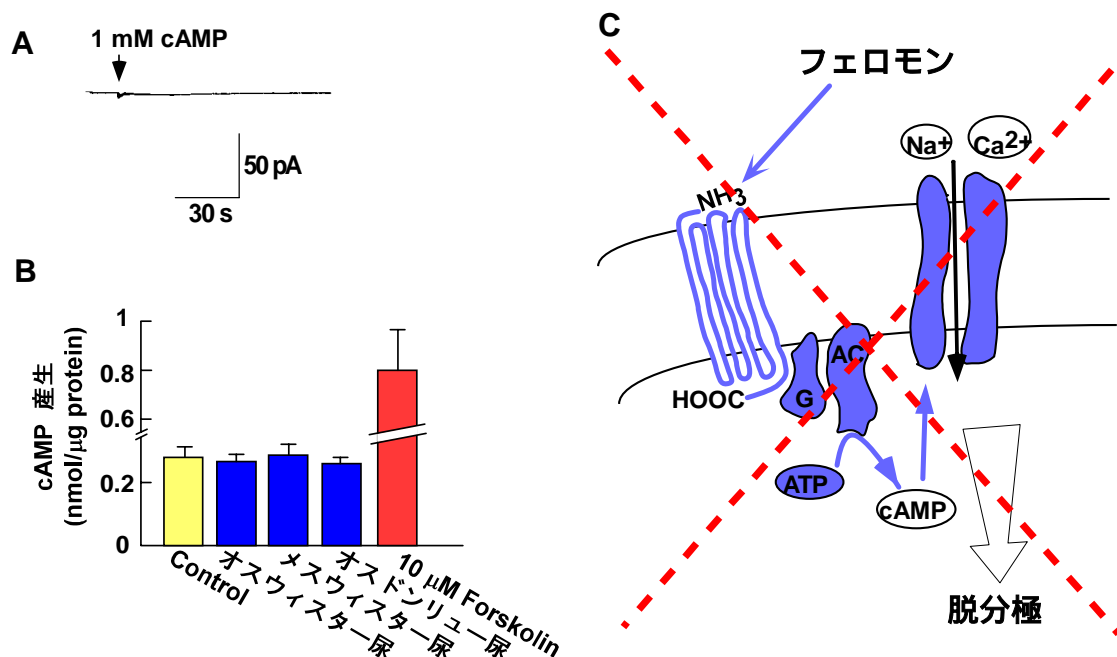


図2 フェロモン受容における cAMP 系の役割

A) 1 mM cAMP 細胞内投与時の感覚細胞における膜電流変化。B) ウイスター系メスラット鋤鼻感覚上皮膜標品における各種尿フェロモン投与時の cAMP 産生。C) 鋤鼻感覚細胞におけるフェロモン応答には cAMP 系は関与しない。20 より改変。

器感覚細胞に興奮性の応答を引き起こす。しかしながら、ウイスター系メスラットの鋤鼻感覚上皮の膜標品にウイスター系オス、ウイスター系メスおよびドンリユー系オスラット由来の尿で刺激しても、cAMPの産生はみられない(図2B)²⁰⁾。この結果は、尿に含まれるフェロモンでしか調べられていないが、ラットにおいてはcAMPはセカンドメッセンジャーとしてフェロモン受容に関与していないことを強く示唆する。

また、マウスでは、揮発性のフェロモンとして同定されているデヒドロプレビコミンとブチルジヒドロチアゾールは、鋤鼻感覚上皮表品のcAMP濃度を減少させることが報告されている²¹⁾。この場合、cAMP濃度が低下することにより鋤鼻感覚細胞を興奮させる機構が存在する可能性も考えられる。しかしながら、次のような理由でこの可能性は低いと考えられる。鋤鼻器で受容されたフェロモン情報は、鋤鼻神経を介して副嗅球に伝えられる。一般に、神経細胞に興奮性の活

動が生ずると、Fos蛋白質が産生される。マウスの副嗅球でFos蛋白質をコードするmRNAの発現の変化を調べると、これらの揮発性の2種類のフェロモンを与えてもmRNAの発現量が変わらなかった²²⁾。これは、cAMP濃度が揮発性フェロモンにより減少したとしても、鋤鼻感覚細胞は興奮することがなく、その情報はフェロモン受容の一次中枢を興奮させることがないことを示している。これらの結果は、cAMPカスケードに関連した分子が哺乳動物の鋤鼻器感覚細胞にも存在しているが、フェロモン受容における主要な情報伝達経路には寄与しないことを示唆している。すなわち、調べられている範囲ではフェロモンはcAMPの合成を引き起こすことはなく、仮にcAMPの濃度がまだ生化学的な実験が試みられていないフェロモンにより増加したとしても、cAMPで開口する機能的なイオンチャンネルが存在しないので鋤鼻感覚上皮に興奮性の電氣的応

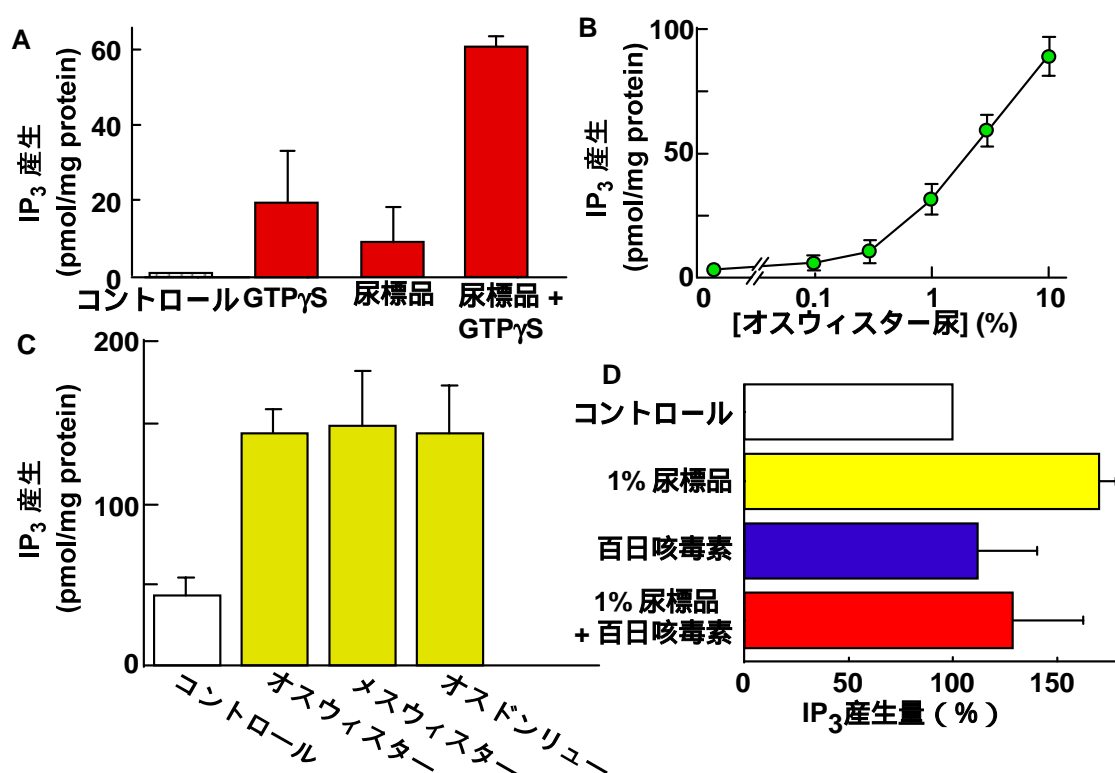


図3 ウイスター系メスラット感覚上皮標品で見られた IP₃ の産生

A)GTP 依存的なウイスター系オス尿標品による IP₃ の産生。B) ウイスター系オス尿標品による濃度依存的な IP₃ の産生。C)ウイスター系メスおよびドンリユー系オス由来の尿標品も IP₃ を産生。D)百日咳毒素は IP₃ の産生を抑制。20 より改変。

答である脱分極が生ずることはない。嗅細胞と鋤鼻器感覚細胞はともに外界の化学物質を受容する機能を有している神経細胞であるが、ほとんどの動物の鋤鼻器感覚細胞はcAMPをセカンドメッセンジャーとして用いないという点で揮発性の匂い物質を受容する嗅細胞とは大きく異なっている。

外界からの刺激により受容体が活性化され、GTP結合蛋白質のGqあるいはGi/Goが活性化されるとホスホリパーゼCが活性化され、ホスファチジルイノシトール二リン酸がIP₃とジアシルグリ

セロール (DAG) に分解される。哺乳動物の場合は、このホスファチジルイノシトール系をもちいてフェロモン情報を電気的な情報へ変換している。筆者らは、様々なフェロモンが受容される際にホスファチジルイノシトール系が関与しているかどうかを調べた²⁰⁾。ウイスター系オスラットの尿をウイスター系メスラット鋤鼻器感覚上皮の膜標品に与えると、濃度依存的なIP₃の産生が見られた(図3B)。ウイスター系メスラットの尿およびドンリュウ系オスラットの尿も、IP₃の産生を引き起こした(図3C)。このような結果は、様々なフェロモンがラットの鋤鼻感覚細胞でホスファチジルイノシトール系を活性化することを示している。また、ハムスターでは膺分泌液から精製されたフェロモン(アホロディシン)²³⁾が、ブタでは精液中のフェロモン²⁴⁾が、鋤鼻器感覚上皮の膜標品のIP₃産生を促進させることが報告されている。(注:当初、フェロモン応答発現には、cAMPあるいはIP₃がセカンドメッセンジャーとして関与することが予想されていた。このため、生化学的な測定は、全てのグループは両者に注目して行われていた。ただし、ホスファチジルイノシトールがホスホリパーゼCにより分解されるとIP₃とともにDAGも同時に産生される。このため、IP₃の産生を測定することは間接的にDAGの産生を見ていることになる。)

先に述べたように、IP₃はGTP結合蛋白質のG_q、G_iあるいはG_oを介してホスホリパーゼC (IP₃合成酵素)が活性化されることにより合成される。齧歯類や有袋類では、鋤鼻感覚細胞でG_iを発現している細胞が感覚細胞体層の上部に、G_oを発現している細胞が感覚細胞体層の下部に存在している^{25,26)}。このようなGTP結合蛋白質の鋤鼻感覚上皮における局在は、フェロモン受容に関係している可能性が予想された。一方、百日咳毒素(PTX)はG_iもしくはG_oをADPリボシル化することにより、これらのGTP結合蛋白質を介した細胞内情報伝達を阻害することから、細胞内シグナル伝達にはどのようなGTP結合蛋白質が関与しているかを特定するために広く使用されている。ラット鋤鼻器感覚上皮をあらかじめ百日咳毒素で処理してG_iおよびG_oをADPリボシル化してこれらのGTP結合蛋白質が機能できない状態にして、尿フェロモンで刺激した。その結果、完全にはなかったが尿フェロモンによるIP₃の産生が抑制された(図3D)²⁰⁾。この結果は、フェロモンによるIP₃あるいはDAGの産生がG_iあるいはG_oを介して行われることを示唆した。

尿フェロモンを鋤鼻器感覚細胞に与えると、鋤鼻神経にインパルスが発生する。ホスホリパーゼCの阻害剤であるU73122は、尿フェロモンが引き起こす神経インパルスの発生をラットラット鋤鼻感覚細胞で阻害した(図4A)²⁷⁾。一方、U73122と類似の分子構造を有するがホスホリパーゼCを阻害する作用をもたないU73343が存在しても尿フェロモンに対する応答が記録できたことから、U73122によるフェロモン応答の抑制は非特異的なものではなく、ホスホリパーゼCを阻害したためであることが示された。また、ネオマイシンはホスファチジルイノシトールに結合することによりU73122とは異なる機構でIP₃およびDAGの産生を阻害する。ラット鋤鼻感覚細胞を尿フェロモンで刺激する際、ネオマイシンを共存させるとフェロモン応答の発生が抑制された。マウス鋤鼻感覚細胞でも尿フェロモンにより引き起こされる内向き電流応答もU73122で抑制された²⁸⁾。以上の結果は、フェロモンが鋤鼻感覚細胞のホスファチジルイノシトール系を活性

化することによりDAGもしくは、IP₃の産生を引き起こすことが鋤鼻感覚細胞におけるフェロモ

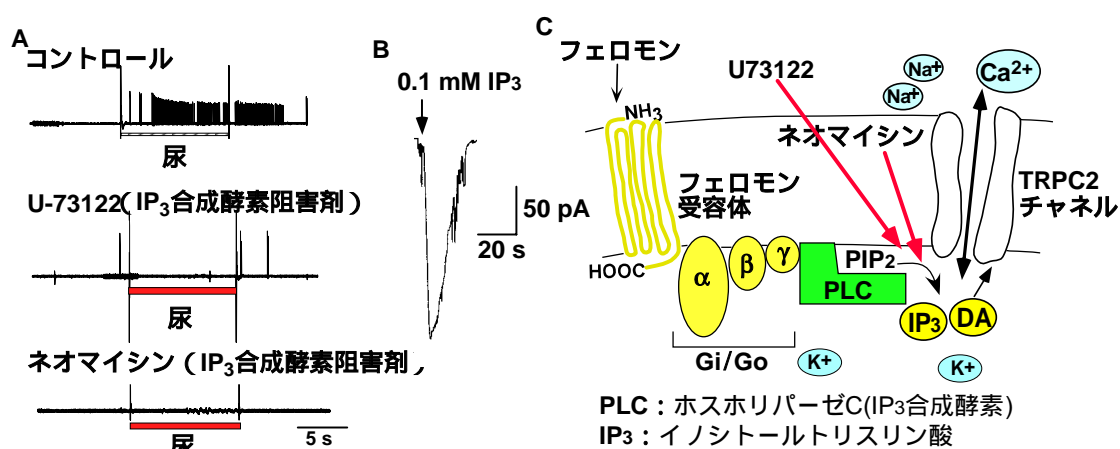


図4 ホスホリパーゼC合成酵素の阻害剤によるフェロモン応答の抑制とIP₃に対する鋤鼻感覚細胞の応答

A) U73122 およびネオマイシンはウイスター系メスラット鋤鼻感覚細胞のフェロモン応答を抑制した。B)0.1 mM IP₃ を感覚細胞内に投与すると内向き電流が生じた。C)ホスファチジルイノシトール系を介した細胞内情報変換機構。27 より改変。
ン情報のシグナル伝達に欠かせないことを示している。

ラットの鋤鼻感覚細胞を尿フェロモンで刺激すると、膜電位固定化で内向き電流応答が生ずる。この応答は、逆転電位がほぼ0 mVで、Na⁺がおもなカレントキャリアーとなることが示された²⁹⁾。一方、ラット¹⁵⁾やハムスターの鋤鼻器感覚細胞にIP₃を注入すると、興奮性の電気的な応答が生ずる(図4B)。哺乳動物ではないが、カエル鋤鼻感覚細胞を光照射によりIP₃を放出する薬物で刺激すると活動電位が生ずる³⁰⁾。また、ラットの鋤鼻感覚細胞に引き起こした応答の電気的な性質は、フェロモン応答の電気的な性質とよく類似していた²⁹⁾。また、IP₃に由来する電流応答を阻害するルテニウムレッドを投与すると、尿中フェロモンを与えたときに生じた神経インパルスの増加が抑制された²⁷⁾。これらの結果から、哺乳動物においては、フェロモンがGiまたはGoを介してIP₃の産生を引き起こし、IP₃作動性チャネルを開口させる経路が鋤鼻感覚細胞を脱分極させる応答に寄与していることが示唆された(図4C)。

最近、TRPチャネルが様々な感覚系で注目されている。ショウジョウバエの視覚異常ミュータントで初めて見つかったTRPチャネルは、哺乳動物にも存在することがわかり、現在では30を超えるファミリーを形成していることが示されている³¹⁾。TRPチャネルは感覚系で機能することを示すデータが次々と示されている。たとえば、後根神経節からクローニングされたTRPV1チャネルは、体性感覚器の温線維が感じる温度により活性化することから温度受容に関与していることが示されている³²⁾。また、味覚受容にもTRPM5が関与している可能性が考えられている³³⁾。さらに、音を受容する蝸牛の有毛細胞にも、TRPA1が発現していて感覚毛の変位により開口する可

能性が示された³⁴⁾。鋤鼻感覚細胞では、TRPC2が存在することが報告された²⁸⁾。TRPC2は、DAGで開口するためにフェロモン受容の際にホスファチジルイノシトール系が活性化された際に生ずるDAGのターゲットとして受容器電位の発生に関与する可能性が考えられた³⁵⁾。TRPC2が開口した際の逆転電位は、0 mV付近であり、これは我々が尿フェロモン応答で得た結果を一致した²⁹⁾。また、TRPC2チャンネルをロックアウトしたマウスを尿フェロモンで刺激して、フェロモン応答を鋤鼻感覚上皮に接触させた電極で電気的な変化を調べると、マウスでフェロモンとして機能する2-heptanolおよび尿フェロモンに対する応答が低濃度で刺激したときには見られなくなり、高濃度で刺激したときには半分から1/3の強度に減弱した³⁶⁾。このような結果は、ホスファチジルイノシトール系が活性化された際に産生されるDAGがTRPC2チャンネルを開口させることにより、第一次的な応答が生じ、さらに強い刺激でIP₃が十分量産生するとTRPC2以外の陽イオンチャンネルが開口してフェロモン応答の増強に寄与することを示唆している。なお、TRPC2チャンネルを欠損したオスマウスでは、自分のテリトリーに進入してきた他のオスマウスを攻撃して追い払う行動が見られなくなることや、オスに対してもメスに対して示すような性行動を示すことから、オスとメスの識別が不能になることが示されている³⁶⁾。

4 フェロモン情報の選択的受容

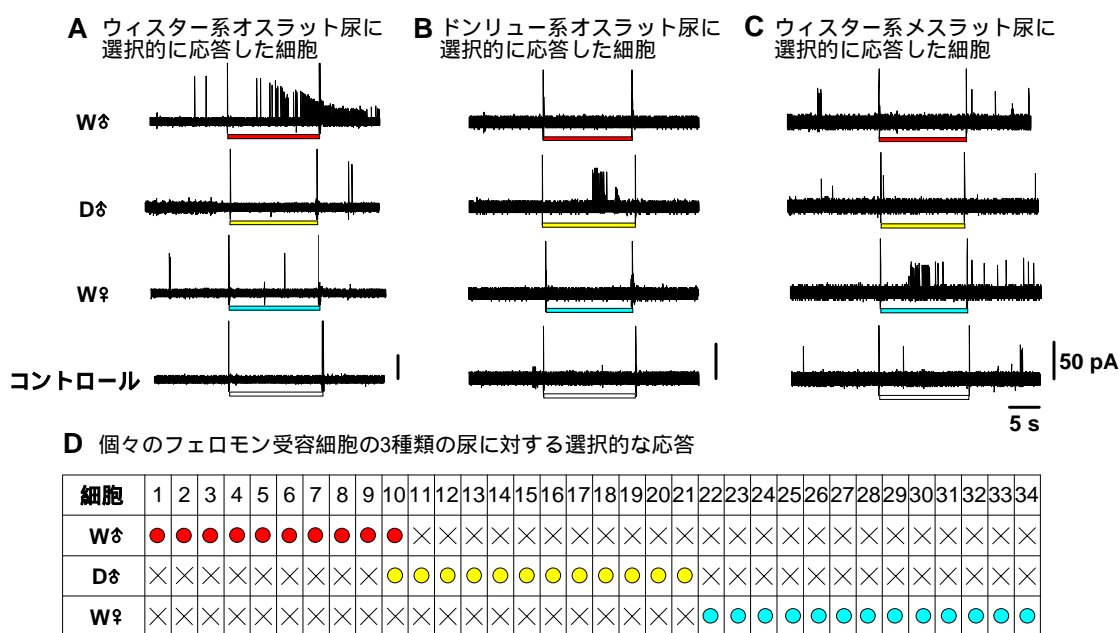


図5 ウィスター系メスラット鋤鼻感覚細胞の各種尿フェロモンに対する選択的応答
A-C) 単一の鋤鼻感覚細胞にウィスター系オスラット尿、ドンリユー系オスラット尿およびウィスター系メスラット尿を与えたときの応答。D) 34個の鋤鼻感覚細胞から得られた結果のまとめ。37より改変。

フェロモンは、受け取った情報が妊娠の中止などの重篤な変化を引き起こすために、その情報は厳密に識別されることが必要である。このために、鋤鼻器感覚細胞の選択性が非常に高いこと

が予想される。そこで、筆者らは、同系統のオスとメスのウィスター系ラットの尿、他系統のドンリュウ系ラットおよびSD系ラットのオスの尿で、ウィスター系メスラットの鋤鼻感覚上皮の

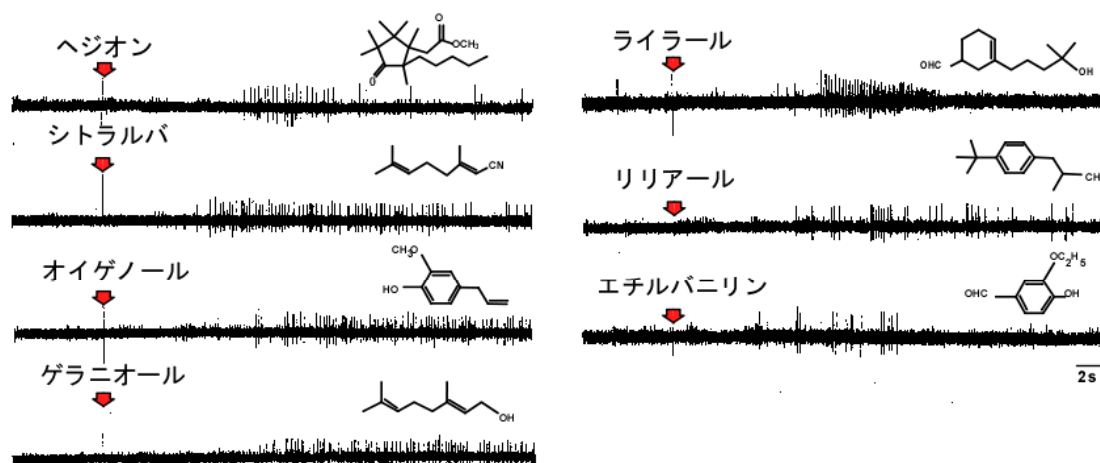


図6 カエル嗅細胞の幅広い匂い選択性

一つの嗅細胞は、匂いの質、分子構造および細胞内情報変換に用いるセカンドメッセンジャーの異なる匂い物質に応答する。3より改変。

急性スライス標品を刺激し、個々の鋤鼻器感覚細胞のフェロモン選択性を調べた(図5)³⁷⁾。その結果、調べた62個の細胞の中で5個の細胞をのぞいて、いずれか一種類のみの尿フェロモンに反応した。この結果は、雌雄を厳密に識別するような鋤鼻感覚細胞が非常に高いフェロモン選択性を有することを示している。また、マウスの個々の鋤鼻感覚細胞でも既に同定された各種フェロモンに対して選択的に応答することが確認されている³⁸⁾。現在のところどのような行動に反映されるかは不明だが、ラットがウィスター系、ドンリュウ系およびSD系などの系統を識別していることも明らかになった。また、マウス、ハムスターおよびヒトの尿で刺激したところ、ラット鋤鼻感覚細胞で反応が測定された。これらの反応は非特異的なものではなく、個々の鋤鼻感覚細胞がいずれかの尿にしか反応を示さなかった。ゾウの尿からフレーメンと呼ばれる行動を引き起こすフェロモンは、ガヤシャクトリ虫でもフェロモンとして作用することが報告されている³⁹⁾。このようなことから、ラット、マウス、ハムスターおよびヒトが、共通した物質をフェロモンとして用いている可能性も考えられる。このようなフェロモンのラット、マウス、ハムスターおよびヒトにおける生理的な意義については不明である。

嗅細胞の匂い選択性は、鋤鼻感覚細胞と大きく異なっているウシガエルに種々の匂い物質を与えると、ほとんどの細胞がcAMPを選択的に増加させる匂い物質と増加させない匂い物質の両者に反応する³⁾。すなわち、一つの嗅細胞は非常に幅広い反応選択性を有している(図6)。

先に述べたように、フェロモンによりIP₃およびDGが産生されるためには、GiやGoなどのGTP結合蛋白質を介することが必要となる。Halpernのグループは、ラットやマウスなどの鋤鼻器感覚上皮内のGTP結合蛋白質の分布を解析した。その結果、感覚上皮内の感覚細胞が存在する層の上部ではGiを有する細胞が存在し、下部ではGoを有する細胞が存在していた^{25,26}。DulacとAxelは、ラットの鋤鼻器のGiが存在している細胞に特異的に発現している受容体 (VR1) をクローニングした⁴⁰。In situ hybridization法による解析から、鋤鼻器VR1はGiを発現している細胞が局在している感覚上皮の上部の感覚細胞に発現していることが示された。また、マウスやラットの鋤鼻器から、通常のGPCRよりも細胞外に露出しているN-端側の構造が長い受容体ファミリー (VR2) がクローニングされた⁴¹。このタイプの受容体は、Goを発現している細胞が存在している感覚上皮の下部に存在する細胞に局在していた。

筆者らは、GiおよびGoを発現している感覚細胞が層状に存在することのフェロモン受容における生理的な意義を解明するために、感覚上皮内のどの位置にある細胞が各種尿フェロモンに対して電気的な応答を示すかを調べた³⁷。すると、図7に示すように、各尿フェロモンに応答する感覚細胞は、鋤鼻器GPCRやGTP結合蛋白質に対応するように層状に存在していた。図9.7にウィ

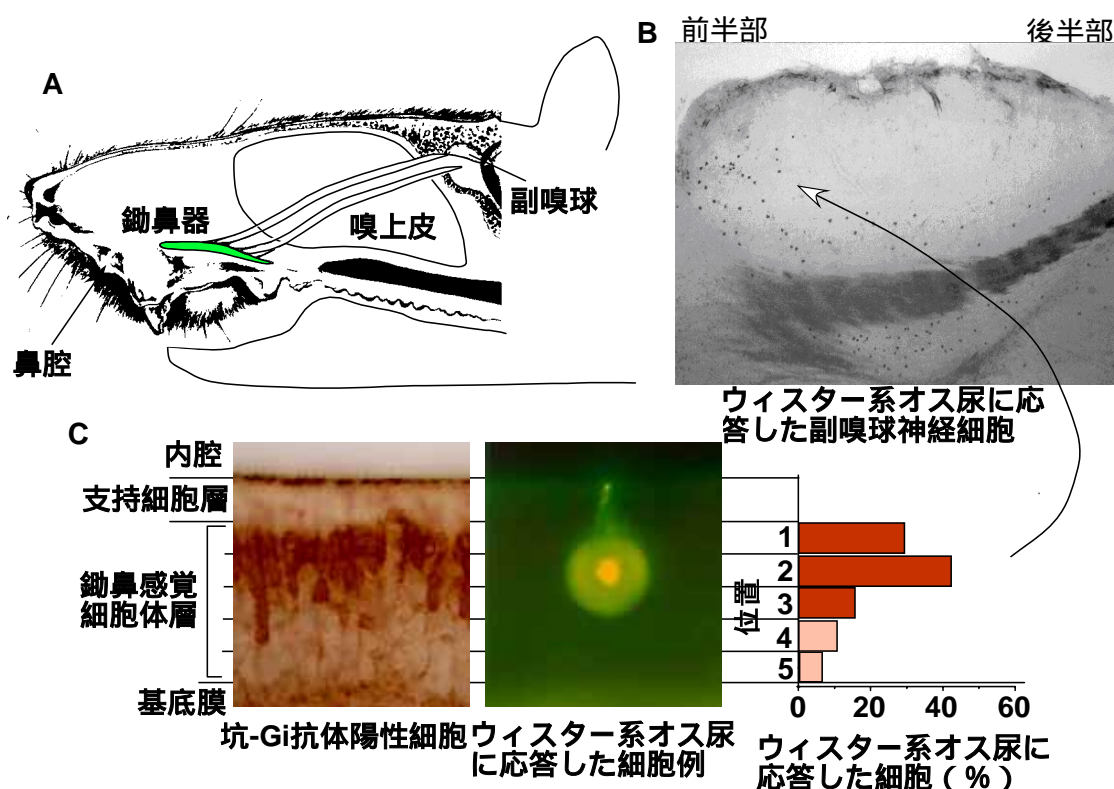


図7 覚上皮に層状に分布する選択性の異なるラット鋤鼻感覚細胞と副嗅球への投射
A) ラットの鋤鼻器と嗅上皮。B) ウイスター系オス尿提示によりウイスター系メスラット副嗅球に発現した Fos 陽性細胞。C) ウイスター系メスラット感覚上皮に存在するウイスター系オス尿に応答する感覚細胞。感覚上皮上部に存在する抗 Gi 抗体陽性細胞が多く応答した。37、42 より改変。

スター系オスラット由来の尿フェロモンに応答した鋤鼻感覚細胞に蛍光色素を注入してその細胞体が感覚体細胞層のどの程度の深さに存在しているかを示している。この細胞は、Gi陽性細胞が存在する層に存在していた。このような結果が定量的に見られるかを感覚体細胞が存在する層を便宜的に5つに分け、それぞれの層に存在する細胞がどのようなフェロモンに反応するかを解析した(図9.7C)。その結果、メスの感覚上皮の上部に存在しているGiを発現している感覚細胞の多くは、オスのウイスター系ラットの尿フェロモンに反応をした。また、ドンリユー系オスラットおよびウイスター系メスラットの尿は、感覚上皮の下部に存在するGoを発現している感覚細胞に反応を引き起こした。尿フェロモンは、先に述べたようにGiもしくはGoを介してホスファチジルイノシトール系が活性化される。百日咳毒素のGTP結合蛋白質がリガンドと結合した受容体と共役していると、GTP結合蛋白質は百日咳毒素によりADPリボシル化されない。ウイスター系のオスの尿が存在すると、ウイスター系メスラットの鋤鼻器感覚上皮に存在するGoは尿が存在しないときと同じようにリボシル化されるが、Giのリボシル化は有意に抑制された²⁰⁾。生化学的に得られた結果と電気生理学的に得られた結果は、ウイスター系オスラットの尿中フェロモンは、Giと共役する受容体で受容されることを示唆する。

抗Gi抗体を用いた副嗅球の免疫染色法を用いた実験から、抗Gi抗体陽性の鋤鼻神経終末が副嗅球の吻側部に局在することが示されている²¹⁾。先に述べたように、神経細胞が活動すると、Fosと呼ばれる蛋白質が産生することが知られている。Fos蛋白質の生理的な作用は明らかにされていないが、抗体を用いてFos蛋白質の発現を解析することにより、脳内のどの部位に存在する神経細胞が活動したかを知ることができる。副嗅球におけるFos蛋白質の発現を免疫染色法により調べると、ウイスター系オスラットの尿を提示した後に副嗅球の吻側部に抗Fos抗体陽性細胞を数多く認めた(図9.7B)⁴²⁾。これらの結果は、抗Gi抗体陽性の鋤鼻器感覚細胞においてGiを介して神経インパルスに変換されたフェロモン情報が、副嗅球の吻側部に伝えられることを示唆している。

5 嗅覚器と鋤鼻器の受容機構からの比較¹⁾

嗅覚器と鋤鼻器は、外界の化学物質を受容するという共通した性質を有する。一方、嗅覚器は匂い物質を受容し、鋤鼻器はフェロモンを受容するという異なる機能を有している。ただし、嗅覚器も大きく2種類に分かれる。揮発性の匂い物質を受容する嗅覚は、匂いの種類も40万種類にもおよぶ多様な匂いを受容するために、多様な受容サイトが存在し、電気的な情報変換機構も複数存在する。一方、水溶性の匂い物質に対する受容体の種類は、揮発性を受容する嗅細胞と比べて少ない。また、細胞内情報伝達経路もIP₃を介する経路が主として働いている。このような観点からみると、水溶性の匂い物質を受容する嗅覚器は、鋤鼻器に近い。すなわち、鋤鼻器に存在する受容体の種類もフェロモンが無数に存在するわけではないので限られている。また、細胞内情報伝達経路もホスファチジルイノシトール系が主要な役割を演じている。解剖学的見地からも、

嗅覚器と鋤鼻器の関係は複雑である。魚類では嗅覚器と鋤鼻器が解剖学的に分かれて存在しているわけではないが、フェロモンを生殖に利用している。両生類以上になると、解剖学的に嗅覚器と鋤鼻器が分離するが、高級なサルやヒトでは鋤鼻器が退化している。ヒトの場合では、魚類と同様に嗅覚器にフェロモン受容体(フェロモン受容細胞)が存在する可能性が示されている。このように、鋤鼻器と嗅覚器は、類似している点と相違している点が動物の種類により複雑に絡み合っている。

参考文献

- 1) Kashiwayanagi M: Molecular Recognition and Intracellular Transduction Mechanisms in Olfactory and Vomeronasal Systems. *In* Hormones, Brain and Behavior (Pfaff D ed), Academic press, San Diego, pp. 1-16 (2002)
- 2) Sklar PB, Anholt RRH and Snyder SH: The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells:differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* 261, 15538-15543 (1986)
- 3) Kashiwayanagi M, Shimano K and Kurihara K: Existence of multiple receptors in single neurons: Responses of single bullfrog olfactory neurons to many cAMP-dependent and independent odorants. *Brain Res.* 738, 222-228 (1996)
- 4) Breer H and Boekhoff I: Odorants of the same odor class activate different second messenger pathways. *Chem. Senses* 16, 19-29 (1991)
- 5) Fabbri E, Ferretti ME, Buzzi M, Cavallaro R, Vesce G. and Biondi C: Olfactory transduction mechanisms in sheep. *Neurochem. Res.* 20, 719-725 (1995)
- 6) Okamoto K, Tokumitsu Y and Kashiwayanagi M: Adenylyl cyclase activity in turtle vomeronasal and olfactory epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 98-101 (1996)
- 7) Restrepo D, Boekhoff I and Breer H: Rapid kinetic measurements of second messenger formation in olfactory cilia from channel catfish. *Am. J. Physiol.* 264, C906-C911 (1993)
- 8) Kashiwayanagi M: Dialysis of inositol 1,4,5-trisphosphate induces inward currents and Ca^{2+} uptake in frog olfactory receptor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 666-671 (1996)
- 9) Kashiwayanagi M, Tatani K, Shuto S and Matsuda A: Inositol 1,4,5-trisphosphate and adenophostin analogues induce responses in turtle olfactory sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 606-612 (2000)
- 10) Restrepo D, Teeter JH, Honda E, Boyle AG, Marecek JF, Prestwich G.D and Kalinoski DL: Evidence for an $InsP_3$ -gated channel protein in isolated rat olfactory cilia. *Am. J. Physiol.* 263, C667-C673 (1992)
- 11) Iida A and Kashiwayanagi M: Responses of *Xenopus laevis* water nose to water-soluble and volatile odorants. *J. Gen. Physiol.* 114, 85-92 (1999)
- 12) Freitag J, Krieger J, Strotmann J and Breer H: Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15, 1383-1392 (1995)
- 13) Iida A and Kashiwayanagi M: Responses to putative second messengers and odorants in water nose olfactory neurons of *Xenopus laevis*. *Chem. Senses* 25, 55-59 (1-1-2000)
- 14) Taniguchi M, Kashiwayanagi M and Kurihara K: Intracellular dialysis of cyclic nucleotides induces inward currents in turtle vomeronasal receptor neurons. *J. Neurosci.* 16, 1239-1246 (1996)
- 15) Inamura K, Kashiwayanagi M and Kurihara K: Inositol-1,4,5-trisphosphate induces responses in receptor neurons in rat vomeronasal sensory slices. *Chem. Senses* 22, 93-103 (1997)
- 16) Luo Y, Lu S, Chen P, Wang D and Halpern M: Identification of chemoattractant receptors and G-proteins in the vomeronasal system of garter snakes. *J. Biol. Chem.* 269, 16867-16877 (1994)
- 17) Taniguchi M, Kashiwayanagi M and Kurihara K: Intracellular injection of inositol 1,4,5-trisphosphate increases a conductance in membranes of turtle vomeronasal receptor neurons in the slice preparation. *Neurosci. Lett.* 188, 5-8 (1995)
- 18) Taniguchi M, Wang D and Halpern M: Chemosensitive conductance and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced conductance in snake vomeronasal receptor neurons. *Chem. Senses* 25, 67-76 (2000)

- 19) Berghard A, Buck LB and Liman ER: Evidence for distinct signaling mechanisms in two mammalian olfactory sense organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2365-2369 (1996)
- 20) Sasaki K, Okamoto K, Inamura K, Tokumitsu Y and Kashiwayanagi M: Inositol-1,4,5-trisphosphate accumulation induced by urinary pheromones in female rat vomeronasal epithelium. *Brain Res.* 823, 161-168 (1999)
- 21) Zhou AW and Moss RL: Effect of urine-derived compounds on cAMP accumulation in mouse vomeronasal cells. *Neuroreport* 8, 2173-2177 (1997)
- 22) Guo J, Zhou A and Moss RL: Urine and urine-derived compounds induce *c-fos* mRNA expression in accessory olfactory bulb. *Neuroreport* 8, 1679-1683 (1997)
- 23) Kroner C, Breer H, Singer AG and O'Connell RJ: Pheromone-induced second messenger signaling in the hamster vomeronasal organ. *Neuroreport* 7, 2989-2992 (1996)
- 24) Wekesa KS and Anholt RRH: Pheromone regulated production of inositol-(1, 4, 5)trisphosphate in the mammalian vomeronasal organ. *Endocrinology* 138, 3497-3504 (1997)
- 25) Halpern M, Shapiro LS and Jia C: Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res.* 677, 157-161 (1995)
- 26) Jia CP and Halpern M: Subclasses of vomeronasal receptor neurons: Differential expression of G proteins ($G_{i\alpha 2}$ and $G_{o\alpha}$) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* 719, 117-128 (1996)
- 27) Inamura K, Kashiwayanagi M and Kurihara K: Blockage of urinary responses by inhibitors for IP_3 -mediated pathway in rat vomeronasal sensory neurons. *Neurosci. Lett.* 233, 129-132 (1997)
- 28) Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T and Zufall F: A diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron* 40, 551-561 (2003)
- 29) Inamura K and Kashiwayanagi M: Inward current responses to urinary substances in rat vomeronasal sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3529-3536 (2000)
- 30) Gjerstad J, Valen EC, Trotier D and Døving K: Photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate induces action potentials in frog vomeronasal microvillar receptor neurons. *Neuroscience* 119, 193-200 (2003)
- 31) Inoue R: TRP channels as a newly emerging non-voltage-gated Ca^{2+} entry channel superfamily. *Curr. Pharm. Des.* 11, 1899-1914 (2005)
- 32) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824 (1997)
- 33) Liu D and Liman ER: Intracellular Ca^{2+} and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15160-15165 (2003)
- 34) Gillespie PG, Dumont RA and Kachar B: Have we found the tip link, transduction channel, and gating spring of the hair cell? *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 389-396 (2005)
- 35) Liman ER, Corey DP and Dulac C: TRP2: A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5791-5796 (1999)
- 36) Kelliher KR, Ziesmann J, Munger SD, Reed RR and Zufall F: Importance of the CNGA4 channel gene for odor discrimination and adaptation in behaving mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 4299-4304 (2003)
- 37) Inamura K, Matsumoto Y, Kashiwayanagi M and Kurihara K: Laminar distribution of pheromone-receptive neurons in rat vomeronasal epithelium. *J. Physiol. (Lond.)* 517, 731-739 (1999)
- 38) Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT and Zufall F: Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405, 792-796 (2000)
- 39) Rasmussen LE, Lee TD, Roelofs WL, Zhang A and Daves Jr. GD: Insect pheromone in elephants. *Nature* 379, 684-684 (1996)
- 40) Dulac C and Axel R: A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195-206 (1995)
- 41) Matsunami H and Buck LB: A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 90, 775-784 (1997)
- 42) Inamura K, Kashiwayanagi M and Kurihara K: Regionalization of Fos immunostaining in rat accessory olfactory bulb when the vomeronasal organ was exposed to urine. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2254-2260 (1999)