

アカハライモリ嗅組織特異的リポカリンタンパク質 の組織化学的研究

著者	杉本 弘文
学位名	博士（工学）
学位の種類	課程博士
報告番号	甲第361号
学位授与年月日	2014-03-24
URL	http://doi.org/10.15118/00005116

氏名	すぎもと ひろふみ 杉本 弘文
学位論文題目	アカハライモリ嗅組織特異的リポカリンタンパク質の組織化学的研究
論文審査委員	主査 教授 岩佐 達郎 教授 佐々木 眞 教授 長谷川 靖 准教授 澤田 研

論文内容の要旨

生物は周りの環境の情報を得る手段の一つとして嗅覚を備えている。嗅覚では匂い分子を嗅覚受容体が受容して、その情報は嗅球へと伝達され、匂いとして認識される。我々はアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の嗅組織 cDNA ライブラリーから 2 種のタンパク質遺伝子 *Cp-lip1* と *Cp-lip2* を単離した。*in situ* hybridization により両遺伝子の発現箇所を調べた結果、それぞれ分布は異なるがボウマン腺を構成する細胞で発現していた。これらのタンパク質はリポカリンスーパーファミリーに属する。リポカリンタンパク質は多くの場合、疎水性低分子化合物を結合する。嗅組織から単離されるリポカリンタンパク質として Odorant binding protein (OBP) が知られている。*Cp-Lip1, 2* タンパク質の結合特性を解析した結果、匂い分子結合能を有することが明らかとなった。また、両タンパク質の間で匂い分子結合特性が異なっていた。嗅神経細胞の応答感度は *in vivo* において nM から pM のレベルの感受性を示す。しかし、*in vitro* では μ M レベルの感受性を示し、感度が異なることが報告されている。本研究では、*Cp-Lip1, 2* タンパク質がこの感度の差異に関係しているのではないかと考え、これらのタンパク質の嗅組織における分布と嗅神経細胞の匂い応答性に与える影響について調べた。

本論文の第 1 章では、嗅覚システムとリポカリンタンパク質についてまとめた。また、本研究の目的を述べた。

第 2 章では、本研究で用いた分子生物学的手法や組織化学的手法について述べた。

第3章では、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質に対する抗血清の作製と評価を行った結果を示した。免疫組織化学的染色には目的タンパク質を検出するために抗体が必要となる。精製した Cp-Lip1, 2 タンパク質をマウスに免疫し、抗血清を作製した。これらの抗血清の反応性について、精製した Cp-Lip1, 2 タンパク質やアカハライモリ嗅組織から抽出したタンパク質を用いたウエスタンブロット法により評価した。その結果、組織から抽出したタンパク質において特異的に Cp-Lip1 タンパク質、または Cp-Lip2 タンパク質を検出可能な抗血清が得られた。

第4章では、まずウエスタンブロッティングによりアカハライモリ各組織における Cp-Lip1, 2 タンパク質の分布を調べた。また、免疫組織化学的染色にて嗅組織内でのより詳細な分布を解析した結果を示した。その結果、両タンパク質は嗅組織のみに分布していることを明らかにした。嗅組織では共にボウマン腺と嗅上皮表層に多く見られたが、その分布はそれぞれ異なっていた。Cp-Lip2 タンパク質は嗅組織全体に幅広く分布していた。一方、Cp-Lip1 タンパク質は Cp-Lip2 タンパク質と比較して狭い範囲に局在していることが明らかとなった。また、嗅上皮表層では両者共に嗅繊毛部分に見られた。

第5章では、Cp-Lip1 タンパク質存在下と非存在下における嗅神経細胞の匂い応答性を解析した結果を示した。Cp-Lip1 タンパク質と結合親和性の高い4種の匂い分子を混合した溶液で嗅神経細胞を刺激した。10 mM 匂い分子混合溶液では、Cp-Lip1 タンパク質非存在下において嗅神経細胞の興奮が観察されたが、1 mM 匂い分子混合溶液では興奮が観察されなかった。しかし、Cp-Lip1 タンパク質存在下においては、1 mM 匂い分子混合溶液で刺激した際にも嗅神経細胞の興奮が観察された。このことから Cp-Lip1 が嗅神経細胞の匂い応答性を変化させることが示された。

第6章では、本論文の内容を総括した。

ABSTRACT

Olfactory system is one of the system which of perceive environmental information. Odorants is received by olfactory receptor. And then, the information of the odorants is transmitted to olfactory bulb. We constructed a

cDNA library from olfactory epithelium of the Japanese common newt, *Cynops pyrrhogaster*. Two types of lipocalin genes (*Cp-lip1* and *Cp-lip2*) were isolated from the cDNA library. The distribution of cells that express *Cp-lip1* and *Cp-lip2* genes was elucidated by *in situ* hybridization. Two genes were expressed in Bowman's gland. Cp-Lip1 and Cp-Lip2 are a member of a lipocalin super family. Generally, lipocalin binds hydrophobic compounds. Odorant binding protein (OBP) is known as an olfactory specific lipocalin. Cp-Lip1 and Cp-Lip2 had odorant binding capacity. Odorant binding properties were different between two proteins. Olfactory receptor neurons show sensibility to odorants in range of μM *in vitro*. In contrast, glomeruli can response to lower concentration odorants (range of pM to nM) *in vivo*. In this study, I investigated distribution of Cp-Lip1 and Cp-Lip2 in olfactory epithelium of the common newt. Moreover, I found difference of olfactory response of olfactory receptor neurons with or without Cp-Lip1.

The contents of this thesis were shown below.

Chapter1: Introduction and purpose of this study. This chapter described the olfactory system and lipocalin.

Chapter2: Materials and methods.

Chapter3: Production and assessment of anti-Cp-Lip1 antiserum and anti-Cp-Lip2 antiserum. These antisera were produced by immunizing mice. These antisera were assessed by western blotting with recombinant Cp-Lip1, Cp-Lip2 and proteins included in olfactory epithelium of common newt. As a result, I obtained antisera that could specifically detect Cp-Lip1 or Cp-Lip2.

Chapter4: The distribution of Cp-Lip1 and Cp-Lip2 was investigated in the common newt by western blotting and by immunohistochemistry. These proteins were expressed in Bowman's glands and located in the surface of olfactory epithelium. However, the distribution was different between Cp-Lip1 and Cp-Lip2. The distribution of Cp-Lip1 was localized. In contrast, Cp-Lip2 distributed widely within olfactory epithelium.

Chapter5: I observed difference of olfactory response of olfactory receptor

neurons with or without Cp-Lip1. Odorant mixture utilized in this study was a mixture of 4 odorants with a high affinity to Cp-Lip1. Olfactory receptor neurons showed olfactory response at 10 mM odorant mixture. However, it didn't show olfactory response to 1 mM odorant mixture. When odorant mixture was pre-incubated with Cp-Lip1, olfactory receptor neurons showed olfactory response. In this study, I found that the sensitivity of olfactory response was increased by Cp-Lip1.

Chapter6: Summary.

論文審査結果の要旨

本論文が対象としているリポカリンタンパク質は原核生物から真核生物まで普遍的に存在する分泌タンパク質である。これらは低分子化合物を結合し、これを運搬または異性化する機能を担うことで知られている。特に嗅組織から単離されるリポカリンタンパク質として 匂い分子結合タンパク質が知られている。匂い分子結合タンパク質が嗅覚において果たしている役割については諸説有り、結論は出ていない。

本論文では、アカハライモリ嗅組織特的に発現される 2 種のリポカリンタンパク質、Cp-Lip1, Cp-Lip2 タンパク質（以下 Cp-Lip1, Cp-Lip2）の嗅覚における役割を明らかにすることを目的として、組織化学的手法を用いて、タンパク質の分布と嗅神経細胞の匂い応答感度に与える影響を調べた。

まず、特異的抗体を作製し、ウエスタンブロット解析により、Cp-Lip タンパク質が嗅組織特異的に分布することを明らかにした。ついで、嗅組織凍結切片を用いた免疫組織化学的観察をおこなった。その結果、Cp-Lip1 は背側のボウマン腺と嗅上皮表層に分布していた。一方、Cp-Lip2 は背側や腹側などすべてのボウマン腺と嗅上皮表層に分布していた。両者の嗅組織での分布は異なっていることが明らかになった。また、Cp-Lip1 は嗅上皮表層において嗅繊毛部分に分布することも明らかになった。

次に、Cp-Lip1 と親和性の高い 4 種類の匂い分子混合物を用いて、嗅神経細胞の応答性を解析した。その結果、各匂い分子の 1mM 混合溶液には応答を示さなかった

嗅神経細胞が Cp-Lip1 存在下では応答を示すようになることを見出した。この結果は、Cp-Lip1 によって匂い分子の受容感度が増加したことを示していると結論した。本観察は嗅組織切片上の嗅覚受容体の匂い分子の受容感度がリポカリンによって増加することを示した最初の例である。

嗅組織特異的なリポカリンタンパク質は様々な動物種で報告されており、その働きを調べることは匂い分子の受容機構を知る上で学術的に重要である。本論文はアカハライモリの嗅組織で発現する 2 種のリポカリンタンパク質の分布と Cp-Lip1 による嗅神経細胞の匂い応答感度の変化について、学術的に重要な新知見を与えており、博士（工学）の学位に値すると認められる。