

嗅覚センサーの開発と匂い分子とその結合タンパク質の作用機構

著者	澤田 研, 浦野 和雄, 竹内 義和, 高橋 司, 満都拉, 岩佐 達郎
雑誌名	サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー年報
巻	6
ページ	76-76
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10258/340

嗅覚センサーの開発と匂い分子とその結合タンパク質の作用機構

著者	澤田 研, 浦野 和雄, 竹内 義和, 高橋 司, 満都拉, 岩佐 達郎
雑誌名	サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー年報
巻	6
ページ	76-76
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10258/340

嗅覚センサーの開発と匂い分子とその結合タンパク質の作用機構

澤田 研、浦野和雄、竹内義和、高橋 司、満 都拉、岩佐達郎

室蘭工業大学 材料物性工学科

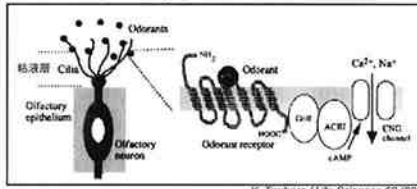
1. Abstract

脊椎動物の嗅覚情報伝達はGタンパク質共役型匂い分子受容体からGsクラスのGタンパク質を介し、cAMP感受性カチオンチャネルの開口に至る一連の酵素カスケードとして知られている。しかし、嗅上皮はボウマン腺から分泌される粘液に覆われており、外界から鼻腔に侵入した匂い分子は、嗅粘液表面に付着した後、「匂い分子結合タンパク質」により嗅繊毛まで運ばれ、受容体タンパク質に受容されると考えられている。

我々はイモリ嗅上皮cDNAライブラリーから高頻度で見出されるクローンとして、Olfactory specific protein (OSP)、Lipocalin、Odorant binding proteinにそれぞれ高い相同性を示す3種類の遺伝子を得た。推定されるアミノ酸配列より分子系統樹を作成したところ、Lipocalin類似遺伝子とOSP類似遺伝子は互いに類似していて、共にリボカリン・スーパーファミリーに属することがわかった。Northern blotting法により、これらの遺伝子mRNAの発現の組織特異性を調べたところ、嗅上皮に特異的に発現していることがわかった。また、嗅上皮での*in situ* Hybridizationを行ったところ、ボウマン腺においてそれぞれの発現が確認された。さらに、イモリ鼻腔全体を含む連続切片を用いてこれらの遺伝子の発現特異性を調べたところ、発現部位に違いがあった。

Lipocalinタンパク質は脂溶性リガンドと結合し、それを輸送する分泌タンパク質として知られているので、我々は上記2種のタンパク質も嗅上皮の異なる部位で「匂い分子結合タンパク質」として働いているものと予想している。

2. 匂い分子受容・情報伝達システム



匂いの受容は、匂い分子が水を含む粘液層を通り、嗅神経細胞から伸びる嗅繊毛に局在するodorant receptorと結合することから始まる。そしてGタンパク質(Golf)、アデニル酸シクラーゼが順次活性化され、それに伴うcAMPの上昇によってCNGチャネルが開く。これによる陽イオンの細胞内流入によって嗅神経細胞は脱分極し、化学信号が電気信号に変換される。外界から鼻腔に侵入した匂い分子は、嗅粘液表面に付着した後、「匂い分子結合タンパク質」により嗅繊毛まで運ばれ、odorant receptorに受容されると考えられている。

3. イモリ嗅上皮由来のcDNAライブラリーから高頻度で見出されるクローンとして、Olfactory specific protein(OSP)、Lipocalinにそれぞれ高い相同性を示す遺伝子(No.75, No.89)を得た

3-1. イモリ嗅上皮から得られた遺伝子No.75とNo.89の推定されるアミノ酸配列

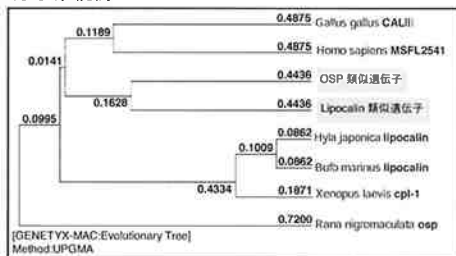
No.75	1	...MSTLGLFLSGLLQAMEIPVMSNFDPQKILGKRYAVAVASNCPEFVQMKSVKMP	57
No.89	1	MFVLYHSGLGALTSLLQEWANDPVVDETFDKLGRYSVIVASNCTQFKMKSMKMP	60
No.75	58	ITFVSLVDGDLVAATGAVGPGSGCMTMDHYHTAKHGQYTVSFLDMSDIRFVDFDHSV	117
No.89	61	VHVITAHENGDLDVRMGPPKQKCKMKDWTQMSIPURYSQATATQTEVETDVKHTA	120
No.75	118	LEYTVQVSESGDACKMVKLLARQPEVAE(IPA-LAIEHFKMLPPVLSMEDVTHLPROND	176
No.89	123	IEYSKRVSELEVVSWKLYAREADYH--PGVFL--PKHMEGLGTEENHVLPHDVE	176
No.75	177	CVPTGF	182
No.89	177	...	182

3-2 相同性検索の結果

No.75	No.89
0.4875	0.4875
0.4436	0.4436
0.4436	0.4436
0.0862	0.0862
0.0962	0.0962
0.1871	0.1871
0.7200	0.7200

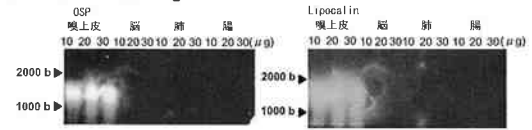
それぞれを検索した際に現れた同じ遺伝子を持組みで示した。

3-3 分子系統樹



推定されるアミノ酸配列より分子系統樹を作成したところ、Lipocalin類似遺伝子とOSP類似遺伝子は互いに類似していて、共にリボカリン・スーパーファミリーに属していた。

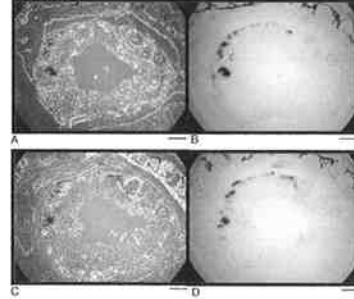
4. Northern blotting解析



左: DIG-labeled OSP antisense RNA probe, 右: DIG-labeled Lipocalin antisense RNA probeを用いたnorthern blotting解析の結果。共に嗅上皮に特異的なシグナルが認められた。

5. 連続切片での*in situ* Hybridization

5-1. OSP

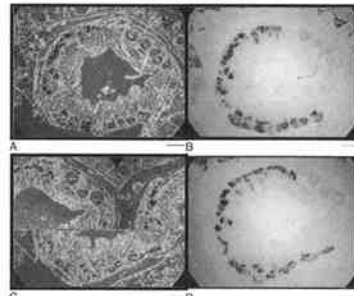


DIG-labeled OSP antisense RNA probeによる*in situ* Hybridizationの結果。鼻全体を含む連続した冠状切片を作製し用いた。A,Cは連続切片。B,DはA,Cそれぞれの顕微鏡像。

シグナルは背面から中間壁側にかけての範囲のボウマン腺において観察された。

Scale bar: 200 μm.

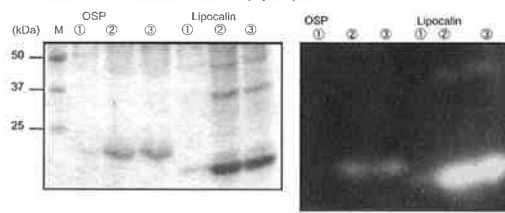
5-1. Lipocalin



DIG-labeled Lipocalin antisense RNA probeによる*in situ* Hybridizationの結果。鼻全体を含む連続した冠状切片を作製し用いた。A,Cは連続切片。B,DはA,Cそれぞれの顕微鏡像。シグナルは背面から中間壁側にかけての広範囲のボウマン腺において観察された。

Scale bar: 200 μm.

6. 大腸菌によるタンパク質発現



左 発現させたOSP, LipocalinのSDS-PAGE。両者の発現を確認することができた。
右 抗-His tag抗体によるOSP, Lipocalinのwestern blotting解析。共に特異的なシグナルを示すバンドが確認された。

まとめ

- ・嗅上皮よりLipocalin super familyに属する2種のタンパク質遺伝子をクローニングした。
- ・これらは嗅上皮を覆う粘液を分泌するボウマン腺で発現していた。
- ・OSP, Lipocalinでは発現しているボウマン腺の分布が異なっているようだ。
- ・大腸菌での両タンパク質の発現に成功した。