



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

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2014-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉本, 弘文 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.15118/00005116

博士學位論文

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

2014年 3月

室蘭工業大学大学院 工学研究科

創成機能工学専攻 博士後期課程

杉本 弘文

目次

論文内容の要旨	1
1. 序論	5
1-1. 感覚器	6
1-2. 主嗅覚系の情報伝達経路	7
1-3. 嗅覚システムと嗅粘液	9
1-4. 嗅覚特異的リポカリンタンパク質	10
1-5. 研究目的	11
2. 実験方法	13
3. 抗 Cp-Lip1 血清、および抗 Cp-Lip2 血清の評価	24
4. 組織化学的解析	29
4-1. Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の組織特異性の検討	30
4-2. Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の嗅組織での分布	32
5. 嗅神経細胞の Ca^{2+} イメージング	39
5-1. アカハライモリ嗅組織切片を用いた Ca^{2+} イメージング法	40
5-2. Cp-Lip1 タンパク質の匂い受容への関与	45
6. 総括・考察	49
参考文献	53
謝辞	55

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

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 systems which perceive environmental information. Odorants are 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* or *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 sensitivity 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 the odorant mixture (1 mM) 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.

第一章

序論

1-1. 感覚器

動物には視覚、嗅覚、味覚、聴覚、触覚といった五感がある。それぞれ異なる感覚器に存在する受容体が刺激され引き起こされる。受容体が刺激を受け、その構造が変化する。受容体の構造変化により感覚細胞は受容器電位を発生し、神経細胞の活動電位へと変換される。視覚、聴覚、触覚は物理刺激により引き起こされる。嗅覚、味覚は化学刺激により引き起こされる。この活動電位は神経線維を通じて脳の特定部位に伝達され、そこに分布する神経細胞を刺激する。このようなシグナル伝達カスケードにより感覚が生じている。このようなシグナル伝達カスケードには様々なタンパク質が分子機械として関与している。

化学感覚は生物にとって最も原始的な感覚であり、高等生物では嗅覚と味覚に区分される。嗅覚は「匂い分子」と「フェロモン」の認識を担っている。陸棲生物の嗅覚を刺激する匂い分子は分子量約 300 以下の揮発性の低分子有機化合物であり、水棲生物では不揮発性のものも多い。匂いは様々な情報源として重要である。例えば食物であれば、それが腐敗物ではないか、または毒物ではないかといった情報である。また、フェロモンは匂いとして認識されるかどうかに関わらず、個体から個体へと発せられ特定の行動や生理的な変化を誘発する。嗅覚は生物の生存や子孫を残すといった行動において大きな役割を担っている。

1-2. 主嗅覚系の情報伝達経路

嗅覚受容体は嗅組織の嗅粘膜に存在する嗅神経細胞の嗅繊毛に局在する膜タンパク質である。匂い分子は嗅覚受容体に受容される。ゲノム解析の結果からヒトで 396 種類、マウスで 1063 種類の嗅覚受容体遺伝子があると報告されている。ヒトの場合は約 5000 種程度の匂いを嗅ぎ分けることが出来るとされる¹⁾。このように限られた種類の嗅覚受容体でより多くの匂いを識別している。これは、嗅覚受容体と匂い分子の組合せが 1 対 1 ではなく、ある一つ種類の匂い分子を結合して活性化する嗅覚受容体が複数存在することが考えられている。また、匂い分子と嗅覚受容体の間における結合親和性の違いから、匂い分子の濃度に依存して活性化する嗅覚受容体の種類が変化する。これにより多種多様な匂いを感じることができる。

主嗅覚系は嗅上皮から主嗅覚への情報伝達経路である。嗅上皮には嗅神経細胞があり、鼻腔側先端に伸びる樹状突起の先端にある嗅小胞からは嗅繊毛が伸びている。嗅繊毛の細胞膜には嗅覚受容体が存在する。嗅覚受容体は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体である。嗅覚受容体が匂い分子と結合して活性化すると、G タンパク質から遊離した α サブユニットがアデニル酸シクラーゼ type III (ACIII) を活性化させる。ACIII は ATP から cAMP を合成して嗅神経細胞内の cAMP 濃度を上昇させる。細胞内 cAMP 濃度上昇により cAMP-gated cation channel (CNG) が開口して細胞外から Na^+ と Ca^{2+} が流入する。これにより細胞内電位が変化し、分極状態から脱分極状態になる。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することで Ca^{2+} -activated Cl^- channel (ANO2) が開口して細胞内の Cl^- が細胞外へと放出され、さらに脱分極が促進される。そして活動電位が発生し、このシグナルは主嗅球へ伝達される。

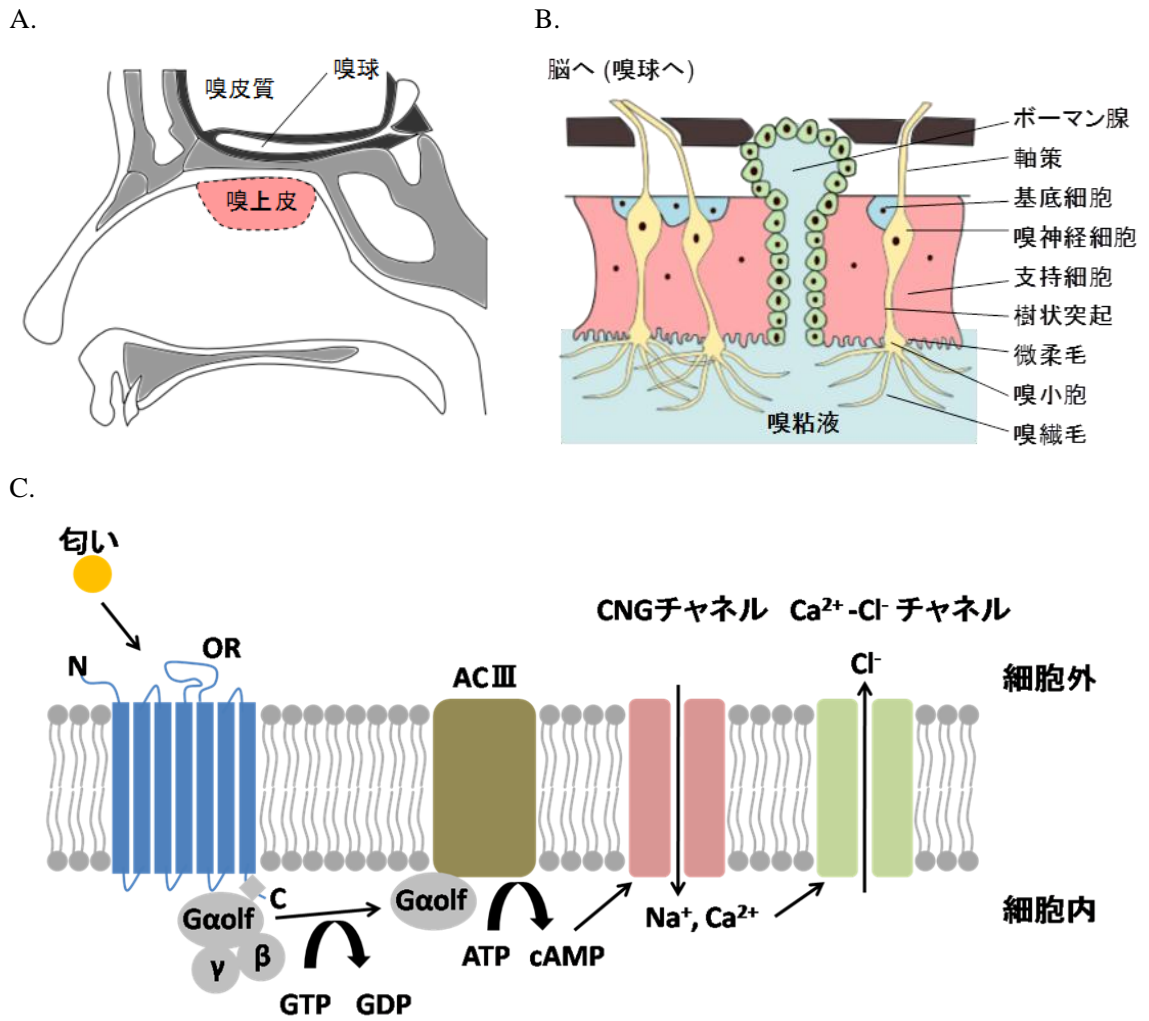


図1 嗅覚組織の模式図

A：ヒト頭部縦断面の模式図。B：嗅上皮の模式図。C：嗅繊毛の細胞膜にある嗅覚受容体近傍の模式図

1-3. 嗅覚システムと嗅粘液

嗅粘液には様々なタンパク質が含まれており、外界から侵入した物質の除去や免疫システムなど組織の保護といった役割を担っている。これまでに嗅覚システムについて様々な研究が行われており、その中で生体レベルでの匂い応答と培養細胞レベルでの匂い応答においてその特性が異なることが示されている。マウスにおける *in vivo* の実験では、嗅粘液を除去することで匂いの知覚に影響を与えることが示されている²⁾。またマウスにおいて、嗅粘液がアルデヒドやアセチル基を持つ匂い分子を代謝する酵素活性を有することが示され、その酵素反応の阻害処理前後で匂い応答性が変化することが明らかになっている³⁾。このことから匂い分子が嗅覚受容体に到達する以前に嗅粘液中に含まれるタンパク質により匂い分子の分解や修飾、または運搬されることで特異性や感度が維持されると推察され、嗅覚において嗅粘液は重要な役割を担うと考えられる。

1-4 嗅覚特異的リポカリンタンパク質

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し、分子量が 20 kDa 程度の分泌タンパク質である。複数の β -ストランドからなる樽型の構造をしており、構造による保存性の高いタンパク質である。これらは低分子化合物との結合能を有し、結合した化合物を運搬するなどの役割を果たす。脳や肝臓、腎臓など多くの組織で発現・分布し、機能する。特に嗅組織で発現す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。その役割として匂い分子の粘液への取り込みやスカベンジャーなどが考えられているが、その詳細な生理的な役割は明らかになっていない。

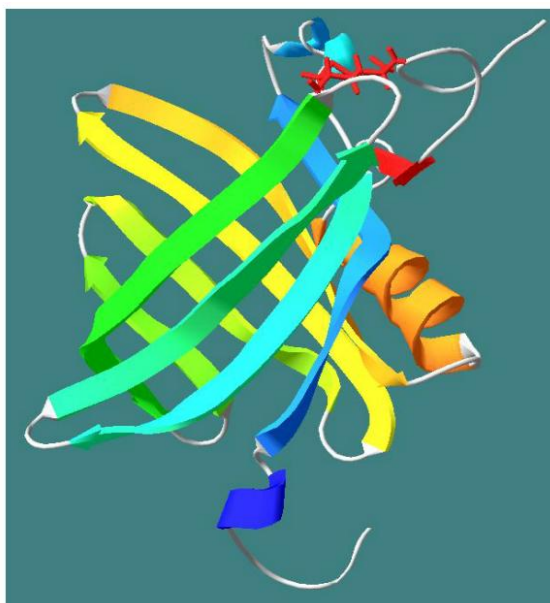


図2 リポカリンタンパク質の分子構造モデル
構造が明らかになっている Q83 の分子構造モデル
(Accession No. 1JZU_A)

研究目的

これまでに、嗅覚システムに関して嗅神経細胞以降の嗅球及び脳領域におけるシグナル伝達経路が明らかにされている。しかし、生体レベル (*in vivo*) の匂い応答と培養細胞や単離した嗅神経細胞レベルの実験系 (*in vitro*) での匂い応答ではその感度が異なる。その感度の差は *in vivo* では pM から nM レベルの閾値であるのに対して、*in vitro* では μ M レベルであると言われている。この感度の違いは嗅上皮表層に存在する嗅粘液に由来すると考えられている。マウスでの研究では、嗅粘液がアルデヒドやアセチル基をもつ匂い物質を代謝する酵素活性を有することが示されている³⁾。さらにその酵素を阻害したときに匂い応答に変化があることも示されている。このように嗅粘液が匂い認識に対して何らかの影響を与えている。

嗅覚には匂いの認識に関与する主嗅覚系と、フェロモンの認識に関与する副嗅覚系（鋤鼻系）が存在する。魚類の嗅組織においてはこのように主嗅覚系と副嗅覚系に分かれておらず、両生類以降で初めて分離したと考えられている。両生類アカハライモリは繊毛タイプと微絨毛タイプの神経細胞を嗅上皮に持ち、魚類の特徴を残している⁴⁾。鋤鼻上皮には微絨毛タイプの神経細胞のみを持ち、四肢動物の特徴も持つ。アカハライモリは進化的側面から研究するには優れたモデル生物であると言える。これまでに、アカハライモリにおいて2種のOBPが見つかり、それぞれ Cp-Lip1 及び Cp-Lip2 と名付けた⁵⁾。ウシやブタなど様々な動物でも OBP が見つかり、これらは匂い分子との結合能を有し、嗅組織に存在している。一方、魚類では OBP の存在は報告されていない。これまでに Cp-Lip1 及び Cp-Lip2 タンパク質の匂い分子に対する結合特性や発現細胞の分布を明らかにしている⁵⁾。匂い分子に対する結合特性を比較すると、Cp-Lip1 は Cp-Lip2 よりも結合する匂い分子の種類が少ない。また、これらのタンパク質を発現している細胞はボウマン腺を構成する細胞であることがわかっている。ボウマン腺は粘液の産生に関わる細胞であることからこれらのタンパク質は粘液中に存在することが推測される。

in vivo において嗅粘液が匂い認識に影響を与えること、アカハライモリ嗅組織において匂い分子結合能を有するタンパク質が存在することを考慮して、本研究では Cp-Lip1 及び Cp-Lip2 の嗅組織における分布を明らかにするために免疫組織化学的手法を用いて解析を行った。また、嗅組織における Cp-Lip1 の

役割を解析するために、アカハライモリ嗅組織切片と Cp-Lip1 を用いた Ca^{2+} イメージングを行った。これらの実験では多量の Cp-Lip1 が必要となるため、大腸菌により発現、精製を行った。また、免疫組織化学的な解析には Cp-Lip1 及び Cp-Lip2 に対する抗体が必要となるため、それぞれに対するマウス抗血清を作製した。

第二章

実験方法

一般的な分子生物学実験手法

本論文に未記載の一般的な実験手法に関しては、室蘭工業大学生体分子科学研究室（岩佐研究室）のプロトコル集に従った。

抗血清の作製

マウス (BALB/c、雄) に 30 μg の Cp-Lip1 または Cp-Lip2 タンパク質を抗原として含むエマルジョンをそれぞれ免疫し、定期的に免疫と採血を行った。免疫は1週間毎にエマルジョンをマウスの背の上皮下に注射して行った。初回の免疫には Freund's Complete Adjuvant (Rockland) を用い、2回目以降は Freund's Incomplete Adjuvant (Rockland) を用いてエマルジョンを調製した。初回を除き、免疫の3日後に採血を行い、マウスの尾の静脈から1度の採血で1匹当たり 50 μL 採血した。8週目まで免疫を行い、その後全採血した。採血後の血液を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間静置した後、10,000 rpm、10分間遠心し血清を回収した。血清と 70% グリセロールを 3:1 で混合し -80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

アカハライモリ各組織のタンパク質の抽出

アカハライモリは長榮商店 (東京) から購入し、水生環境にて飼育した。氷冷麻酔をしたアカハライモリから嗅組織、脳、肝臓、腸を摘出し、表に示す氷冷した Sampling buffer に入れた後、95 $^{\circ}\text{C}$ で5分間静置した。その後、ホモジナイザーを用いて組織を粉砕し、さらに Sonopuls HD 2070 (BANDELIN electronic GmbH & Co) を用いて 30 power、20秒、5回超音波破碎した。次に、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間、3,000 g で遠心した後の上清を、更に 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間、20,000 g で遠心し、可溶化したタンパク質を抽出した。

表 1 タンパク質抽出に用いた試薬の組成

Sampling buffer	
Sodium dodecyl sulfate	1 %
2-mercaptoethanol	1 %
0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8	50 mM
Glycerol	20 %
Bromo Phenol Blue	0.5 %

ウエスタンブロット

各組織から抽出したタンパク質を SDS-PAGE にて泳動分離し、PVDF 膜 (GE Healthcare) へ転写した。膜をブロッキング液 (5 % skim milk / TPBS) に浸し、4 °C にて一晩静置した。その後、膜を順に一次抗体 (TPBS にて 1/1,000 希釈したマウス抗 Cp-Lip1 血清、またはマウス抗 Cp-Lip2 血清)、二次抗体 (TPBS にて 1/10,000 希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体、Kirkegaard & Perry Laboratories) に浸し、それぞれ 2 時間振盪した。抗原抗体反応後の膜を CDP-Star chemiluminescent detection reagent (GE Healthcare) により化学発光させてシグナルを検出した。それぞれの工程の後に、TPBS により室温にて 5 分間 3 回の洗浄を行った。また、CDP-Star chemiluminescent detection reagent を反応させる前に、CDP-Star 二次洗浄バッファーで 5 分間 3 回の洗浄を行った。化学発光はマルチプル CCD イメージャー (ImageQuant400, GE Healthcare) により画像を取得した。

表 3 使用した試薬の組成

TPBS	
Tween-20	0.5 %
NaCl	137.0 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM

CDP-Star 二次洗浄バッファー	
Tris	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	2 mM

アカハライモリ嗅組織切片の作製 (免疫組織化学的染色)

嗅組織凍結切片を作製するにあたり、水生環境で飼育していたアカハライモリを1週間陸生環境で飼育した個体を用いた。氷冷麻酔をしたアカハライモリを断頭し、下顎を切除した。嗅組織全体を含むアカハライモリの上顎を -80 °C エタノールに浸漬し素早く凍結、固定反応を行い、その容器ごと -30 °C にて24時間静置した。その後、室温のエタノールに浸漬し、脱水反応を行った。250 mM EDTA により 4 °C にて24時間脱灰反応を行った。この時、初期は3時間毎に3回脱灰液を交換した。次に、10%、20%、30% sucrose solution の順に、4 °C にてそれぞれ12時間、12時間、24時間浸漬した。包埋液に室温にて2時間浸漬した後に、液体窒素で凍結させながら包埋液にて包埋しブロック状にして -80 °C にて保存した。切片の薄切には凍結マイクローム (CM1850, Leica Microsystems) を用いた。庫内の温度を -20~-24 °C に設定し、厚さ 3~10 μm の冠状切片を作製した。作製した切片はアミノシランコートスライドガラス (Matsunami Glass Ind) に貼り付け、使用時まで -80 °C で保存した。

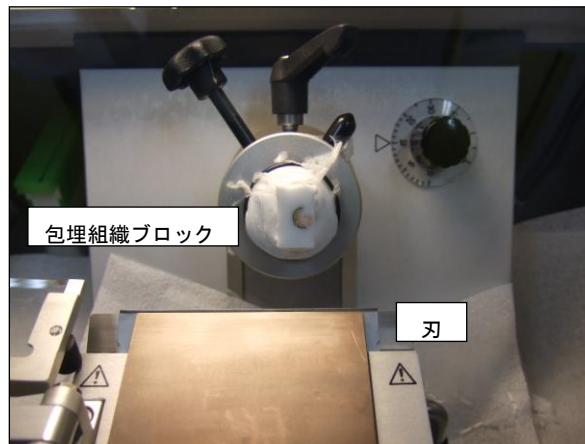


図3 凍結マイクロトーム (CM1850, Leica Microsystems) の庫内.

免疫組織化学的染色

アカハライモリの嗅組織切片を風乾した後、順に PBS (Phosphate buffered saline) にて 5 分間 3 回、ブロッキング液 (3 % bovine serum albumin / 0.1 % TritonX 100 / PBS) にて 30 分間、室温にて処理した。その後、切片に一次抗体の希釈液を滴下した。このとき一次抗体反応の反応時間は、抗 Cp-Lip1 血清及び抗 Cp-Lip2 血清 (希釈倍率 : 100 倍) は 4 °C にて 2 週間、Cy3 標識マウス抗ラット β -tubulin モノクローナル抗体 (希釈倍率 : 200 倍, C4585, SIGMA-ALDRICH) は 4 °C にて 24 時間静置して行った。二次抗体反応は、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (希釈倍率 : 400 倍, A11001, Molecular Probes) の希釈液を切片に滴下して室温にて 1 時間静置して行った。それぞれの工程の後に、PBS により室温にて 5 分間 3 回の洗浄を行った。抗体の希釈には 0.1 % TritonX 100 / PBS を用いた。また、必要に応じて核を蛍光観察するために、TO-PRO3 (希釈倍率 : 400 倍, T3605, Molecular Probes) による染色を行った。TO-PRO-3 の希釈には PBS を用いた。各種処理後、切片を Fluoromount (ABIN377045, Diagnostic BioSystems) にて封入した。ネガティブコントロールは未免疫のマウス血清を用いて、同様の手順で処理した。観察には共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus) を使用した。

表 4 使用した試薬の組成

PBS	
NaCl	137.0 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM

観察方法 (免疫組織化学的染色)

蛍光抗体法により作製した嗅組織切片標本を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus) により観察した。取得した画像の解析には FV10-ASW Viewer (Olympus)、ImageJ (National Institutes of Health) を使用した。顕微鏡の光路の概略を図 4 に示す。本システムに装備されている光源レーザーは、マルチアルゴンレーザー (458 nm, 488 nm, 514 nm)、ヘリウムネオンレーザー (green) (543 nm)、ヘリウムネオンレーザー (red) (633 nm) である。蛍光ミラーユニットは励起フィルター、ダイクロイックミラー、吸収フィルターから構成され、本システムに装備されている組合せを表 5 に示す。また、対物レンズの開口数を表 6 に示す。

励起フィルターは適切な励起光波長帯域の光を透過する。ダイクロイックミラーは励起光波長帯域の光を反射し、落射照明光が対物レンズの試料側の焦点に収束する。この照明光が蛍光色素を励起し、そこから蛍光が発せられる (青線)。ダイクロイックミラーは励起波長以上の波長帯域の光を透過するため、その波長帯域の光のみが吸収フィルターに導かれ、最適な蛍光波長帯域以外の光は吸収される。吸収フィルターを透過した蛍光はコンフォーカルレンズにより結像し、ピンホールを通過し、検出器で電気信号に変換される (緑線)。X-Y スキャナーにより焦点面上に光を走査させることにより、光学的切片像を取得する。また、焦点位置をずらしながら走査することにより、切片の連続した断層画像を取得し、立体画像を得ることができる。焦点から外れた位置では、焦点位置に比べて励起強度が低いため、そこから発せられる蛍光も弱い。また、その蛍光はピンホールから外れた位置で結像し、検出器に届きにくい (赤線)。このため、コントラストの低下を防ぎ、鮮明な画像を取得することができる。

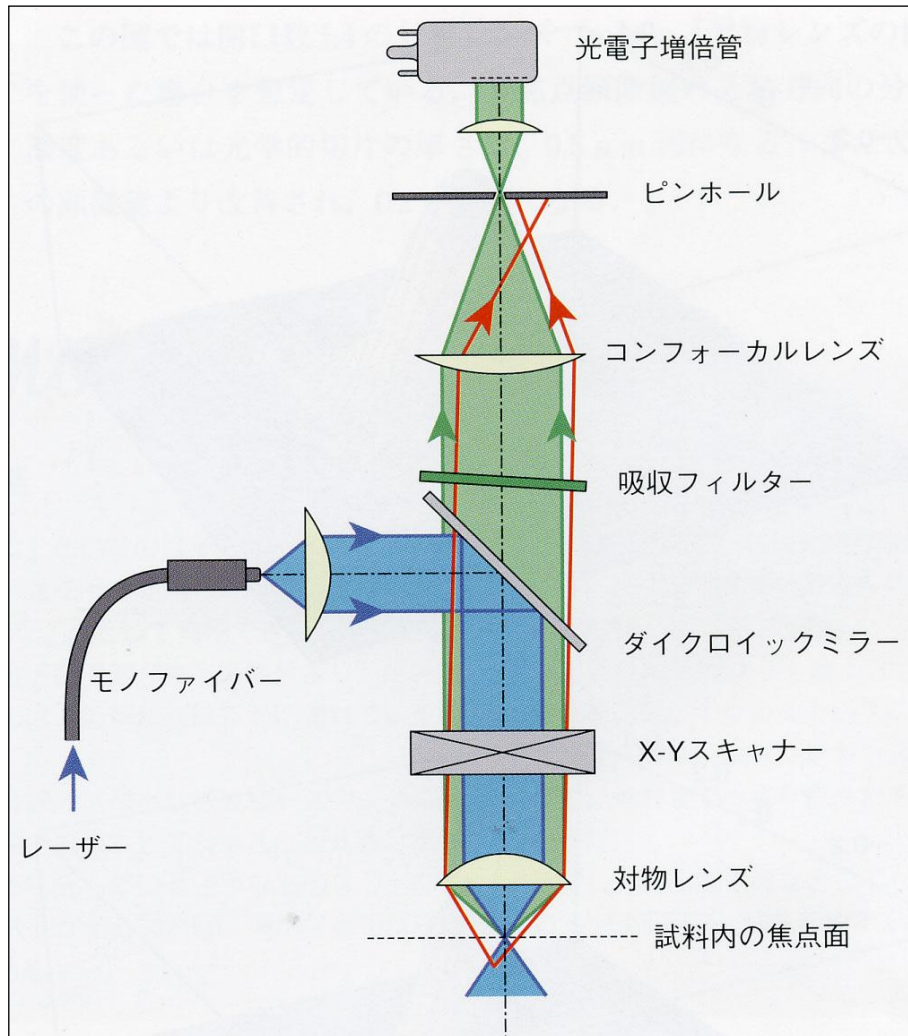


図4 共焦点レーザー走査型顕微鏡の光路の概略図

高田邦昭: 共焦点顕微鏡活用プロトコル, 株式会社洋土社, 東京, 2008 より 21 頁, 図1 を引用。

表 5 蛍光ミラーユニット

蛍光ミラーユニットガイド (Olympus) を参照して作成した。

励起法	励起フィルター*1	ダイクロイックミラー*2	吸収フィルター*3	対応する蛍光色素の例
U 励起 (広帯域)	BP330-385	DM400	BA420	DAPI, Hoechst 33342
BV 励起 (広帯域)	BP400-440	DM455	BA475	Alexa Fluor 430, Thioflavin
B 励起 (広帯域)	BP470-495	DM505	BA510-550	Alexa Fluor 488, Cy2, GFP
G 励起 (広帯域)	BP520-550	DM565	BA580	Alexa Fluor 594, Cy3, DiI

*1 バンドパスフィルター (BP) : 表示波長帯域を透過

*2 ダイクロイックミラー (DM) : 表示波長以下の波長帯域を反射、以上の波長帯域を透過

*3 バリアフィルター (BA) : 表示波長帯域以上 (または表示帯域) を透過

表 6 対物レンズの開口数

カタログ (Olympus) を参照して作成した。

対物レンズ	倍率	開口数
UPlanSApo	× 10	0.40
UPlanSApo	× 20	0.75
UPlanFL N	× 40	1.30
PlanApo N	× 60	1.42
UPlanFI	× 100	1.30

アカハライモリ嗅組織切片の作製 (Ca²⁺ イメージング)

嗅組織切片の作製には水生環境で飼育していた個体を用いた。氷冷麻酔をしたアカハライモリを断頭し、下顎を切除した。その後、嗅組織全体を含む上顎を Leica 818 High Profile Microtome Blades (Leica Microsystems) を用いて手作業で厚さ 1 mm 程度の冠状切片を作製し、PBS に浸した。さらに、切片の腹側の組織を切除し、PBS にて洗浄した。

蛍光カルシウム指示薬の導入

作製した嗅組織切片を 1 mL の Loading Buffer が入ったエッペンに入れ、37 °C、暗室にて 15 分間静置して細胞内に蛍光カルシウム指示薬 Fluo4-AM (F311, DOJINDO LABORATORIES) を導入した。その後、Recording Medium で洗淨、置換を行った。観察は灌流系にて共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus) を用いて行った。

表 7 使用した試薬の組成

Recording Medium (pH 7.8)	
HEPES	10 mM
NaCl	98 mM
KCl	2 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	5 mM

Loading Buffer	
Recording Medium	
Fluo4-AM	4.6 μM
Cremophor EL	0.04 %

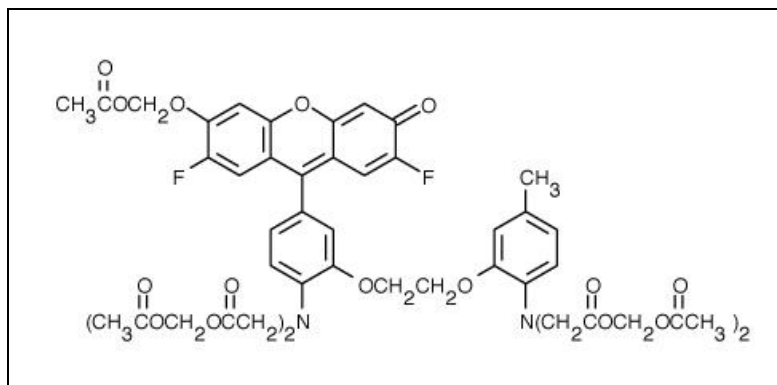


図 5 Fluo4-AM の構造式

刺激に使用した匂い分子と Cp-Lip1 タンパク質の調製

アカハライモリの嗅神経細胞の刺激には Cp-Lip1 と親和性の高い匂い分子 4 種類 (3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde, Quinoline, 2,3,5,6-tetramethylpyrazine, 2-acetylthiazole) を選択した。2,3,5,6-tetramethylpyrazine は 0.5 M となるように DMSO に溶解し保存した。3-ethoxy-4-hydroxybenzaldehyde、2-acetylthiazole、Quinoline はそれぞれ 2 M となるように DMSO に溶解し保存した。嗅神経細胞の刺激には、それぞれの匂い分子の終濃度が 1 mM または 10 mM となるように混合し、Recording Medium にて希釈した混合溶液を用いた。また、Cp-Lip1 タンパク質存在下の実験では 1 mM 匂い分子混合溶液に Cp-Lip1 タンパク質を終濃度が 5 μ M となるように加えた溶液を用いた。

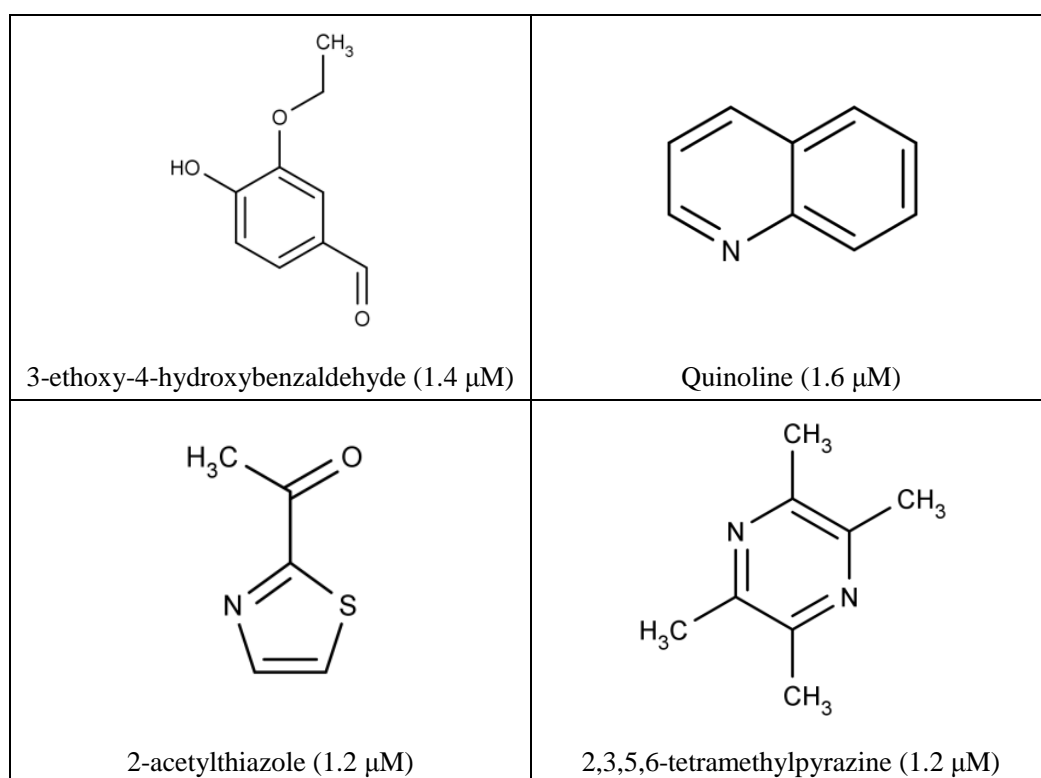


図 6 使用した匂い分子 括弧内の数値は Cp-Lip1 タンパク質との結合定数

観察方法

嗅組織切片に導入した蛍光カルシウム指示薬 Fluo4 の蛍光強度変化を、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus) により観察した。灌流チャンバーを顕微鏡のステージ部分にセットし、Recording Medium を灌流しながら実験を行った。Recording Medium と刺激溶液の流速は 1.2 mL/min で行った。画像の取得は 2 秒毎に行い、120 フレームまで経時的に取得した。撮影開始から 20～30 秒後に刺激溶液を 50 秒 (1 mL) 導入した。刺激溶液導入終了から 120 フレームまでを洗浄とした。取得した画像の解析には FV10-ASW Viewer (Olympus)、ImageJ (National Institutes of Health) を使用した。

刺激による蛍光強度変化量の算出

経時的に取得した画像より、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に由来する Fluo4 の蛍光強度変化量を算出し、グラフ化した。画像中の匂い刺激により蛍光強度に変化が見られた細胞の一部のピクセルを選択し、そのピクセルのシグナル強度の平均値 (F) を算出した。また、観察開始から刺激を導入するまでの間に含まれる 10 フレームの F の平均値をベースライン (F_0) とした。F、 F_0 から蛍光強度変化量 ($\Delta F/F$) を下記の式に従い算出しグラフ化した。

$$\Delta F/F (\%) = (F - F_0) / F_0$$

第三章

抗 Cp-Lip1 血清、および抗 Cp-Lip2 血清の評価

3-1. 抗 Cp-Lip1 血清、及び抗 Cp-Lip2 血清の評価

アカハライモリ嗅覚特異的に発現する匂い分子結合タンパク質 (OBP)、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質について、嗅覚における役割を明らかにするために、嗅組織での両タンパク質の分布を調べた。このために、蛍光抗体法に用いる抗 Cp-Lip1 血清と抗 Cp-Lip2 血清を作製した。また、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質のアミノ酸配列は 43 % が同一であり、作製した抗血清が交差反応をする可能性が考えられた。そのため、精製した Cp-Lip1 タンパク質、Cp-Lip2 タンパク質、そしてアカハライモリの嗅組織より抽出したタンパク質について抗血清の反応性を評価した。

Cp-Lip1	1:MSAMWISLGLLFSGLLQLQAMEIPVMSNFDPOKILGKWAYAVAVASNCPEFVQKSVMKMPITIFSVLDDG	70
Cp-Lip2	1:MFVLWVSLGLALTSLLQVEAMDVPVVKDFETDKFLGRWYSVVVASNCTQFMKMKSMKMPVNVITAHENG	70
	* ..* ..** ..** ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*	
Cp-Lip1	71:DLYAATGVAGPSGCMTMDMVY-HTAKHGQYTSVLDNSDIRFVDGDFDHSVLEYTQNVSESGDACKMVKL	139
Cp-Lip2	71:DLDVRMGFPGKDGCMKKDMYY-QMISPGRYTQSTATQTEVRIVETDYKHTAIEYSRKVSELEVVSVMVKL	139
	** . *..* ** ** * . * ** ***..* * *...** . ** . ****	
Cp-Lip1	140:LARQPEVAEIPALAIHFHKLIPVVGLSMEDVTHLPRDIDCVGGEF	185
Cp-Lip2	140:YAREADV--HPGV-FTLFKMLMEGLGLTEENMVVLPHDVECVPGTF	182
	** ..* *.. . ****.* . * ..*..**** *	

図 7 Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質のアミノ酸配列

「*」は同一性、「.」は類似性を示す。同一性：43%、類似性：66%。

結果と考察

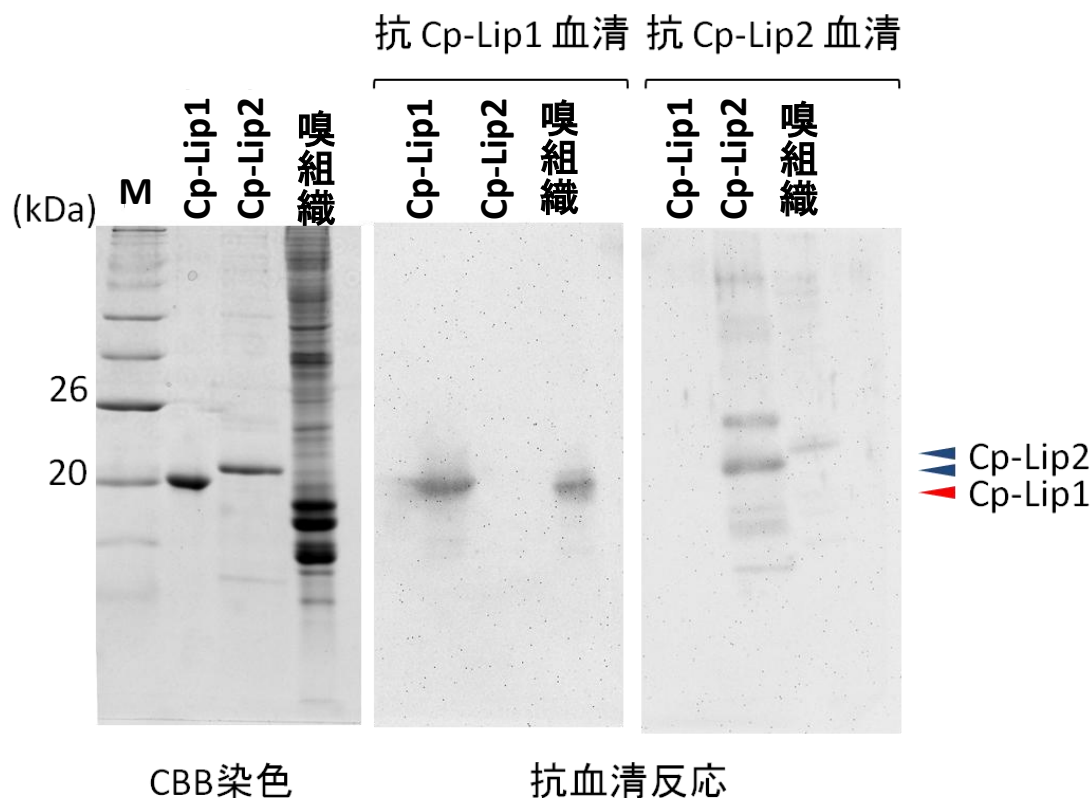


図8 抗 Cp-Lip1 血清及び抗 Cp-Lip2 血清によるウエスタンブロッティング
CBB 染色：左からマーカ、精製した Cp-Lip1 タンパク質、Cp-Lip2 タンパク質、嗅組織から抽出したタンパク質を電気泳動し、CBB 染色した結果。抗血清反応：電気泳動により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 Cp-Lip1 血清又は抗 Cp-Lip2 血清で検出した結果。Cp-Lip1 タンパク質の計算分子量：18.3 kDa。Cp-Lip2 タンパク質の計算分子量：19.8 kDa。

精製した Cp-Lip1 タンパク質、Cp-Lip2 タンパク質、嗅組織から抽出したタンパク質を対象とした抗 Cp-Lip1 血清による検出の結果と CBB 染色の結果を比較すると、精製した Cp-Lip1 タンパク質または嗅組織サンプルを電気泳動したレーンにおいて Cp-Lip1 タンパク質の分子量で抗 Cp-Lip1 血清により検出されたバンドが見られた。一方、精製した Cp-Lip2 タンパク質を電気泳動したレーンではバンドが見られなかった。このことから抗 Cp-Lip1 血清は Cp-Lip1 タンパク質を特異的に検出可能な抗血清であると結論した。抗 Cp-Lip2 血清による検出の結果では、精製した Cp-Lip1 タンパク質を電気泳動

したレーンではバンドが見られず、精製した Cp-Lip2 タンパク質または嗅組織サンプルを電気泳動したレーンのみで抗 Cp-Lip2 血清由来のバンドが見られた。しかし、精製した Cp-Lip2 タンパク質を電気泳動したレーンにおいて Cp-Lip2 タンパク質の分子量でバンドが見られたが、他に複数のバンドも見られた。これは免疫に際に抗原として使用した Cp-Lip2 タンパク質の精製度が低く、大腸菌由来のタンパク質に対する抗体も産生されたためだと考えられる。また、嗅組織サンプルを電気泳動したレーンでは、Cp-Lip2 タンパク質の分子量付近にバンドが見られたが、CBB 染色の結果と比較すると分子量が 3 kDa 程度大きかった。

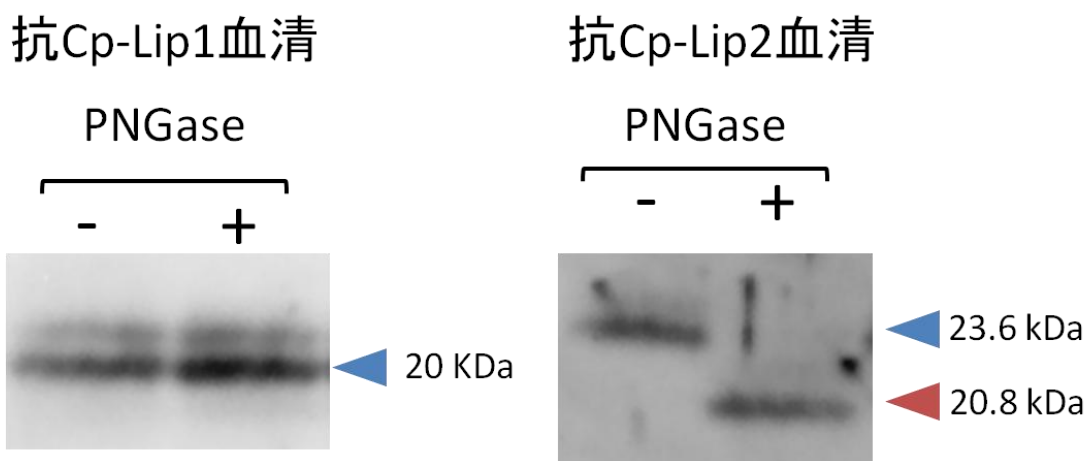


図9 PNGase による糖鎖の切断
PNGase による処理前 (-) と処理後 (+) の嗅組織サンプルに対する抗 Cp-Lip1 血清 (左) 又は抗 Cp-Lip2 血清 (右) の反応。

嗅組織サンプルにおいて PNGase 処理により糖鎖を切断し、処理前と処理後の抗血清反応を比較した。その結果、抗 Cp-Lip1 血清では変化が見られなかった。一方、抗 Cp-Lip2 血清では処理後のサンプルを電気泳動したレーンでは、精製した Cp-Lip2 タンパク質と同じ分子量にバンドが見られた。このことから、アカハライモリ嗅組織では Cp-Lip2 タンパク質は糖鎖により修飾されていることが考えられる。以上のことから抗 Cp-Lip2 血清はアカハライモリ嗅組織において Cp-Lip2 タンパク質を特異的に検出可能な抗血清であると結論した。以降ではこれらの作製した抗血清を用いて両タンパク質の嗅組織における分布を

調べた。

第四章

組織化学の解析

4-1. Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の組織特異性の検討

討

Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の特性に関して、mRNA レベルの解析によって両タンパク質遺伝子が嗅覚組織特異的に発現することが明らかになっている⁵⁾。本解析では、両タンパク質の組織特異的な分布を明らかにすることを目的として、アカハライモリの各組織より抽出したタンパク質に対する組織化学的検出を行った。

結果と考察

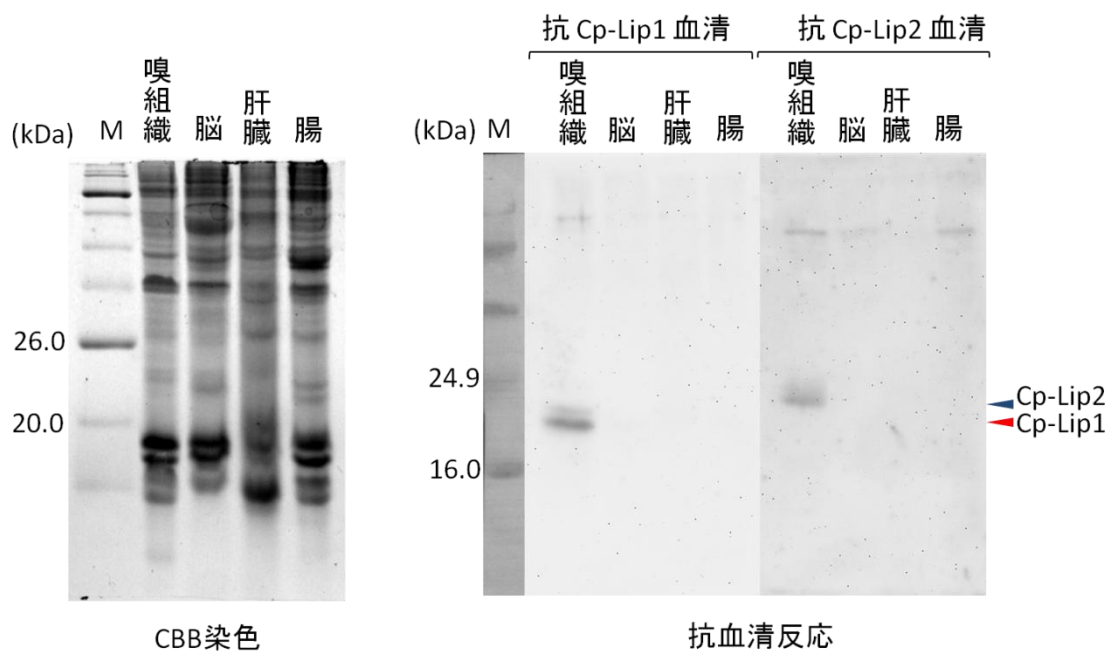


図 11 アカハライモリ各組織サンプルに対するウエスタンブロッティング
CBB 染色：左からマーカー、嗅組織、脳、肝臓、腸の 4 組織から抽出したタンパク質を電気泳動し、CBB 染色した結果。抗血清反応：電気泳動により分離したタンパク質を PVDF 膜に転写し、抗 Cp-Lip1 血清又は抗 Cp-Lip2 血清で検出した結果。

アカハライモリの嗅組織、脳、肝臓、腸から抽出したタンパク質を対象とした抗 Cp-Lip1 血清による検出の結果では、脳、肝臓、腸ではシグナルが検出されず、嗅組織のみで Cp-Lip1 タンパク質のシグナルが検出された。また、抗 Cp-Lip2 血清による検出の結果においても、嗅組織のみで Cp-Lip2 タンパク質のシグナルが検出された。以上の結果から、嗅組織特異的に発現したこれらのタンパク質は嗅組織特異的に分布する OBP であることが示された。この結果は、すでに既知である OBP の特性と一致している。次に、両タンパク質の嗅組織における分布を調べ、両タンパク質遺伝子の発現細胞の分布と比較した。

4-2. Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の嗅組織での分布

Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の特性に関して、mRNA レベルの解析より、両タンパク質遺伝子を発現する細胞は粘液の産生に関わるボウマン腺を構成する細胞であり、その分布は両タンパク質遺伝子の間で異なることが明らかになっている⁵⁾。その分布は、Cp-Lip1 遺伝子では背側に局在していた。一方、Cp-Lip2 遺伝子では背側、腹側と全体的に分布していた。本解析では、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の嗅組織における分布を明らかにすることを目的として、アカハライモリの嗅組織凍結切片に対する免疫組織化学的検出を行った。

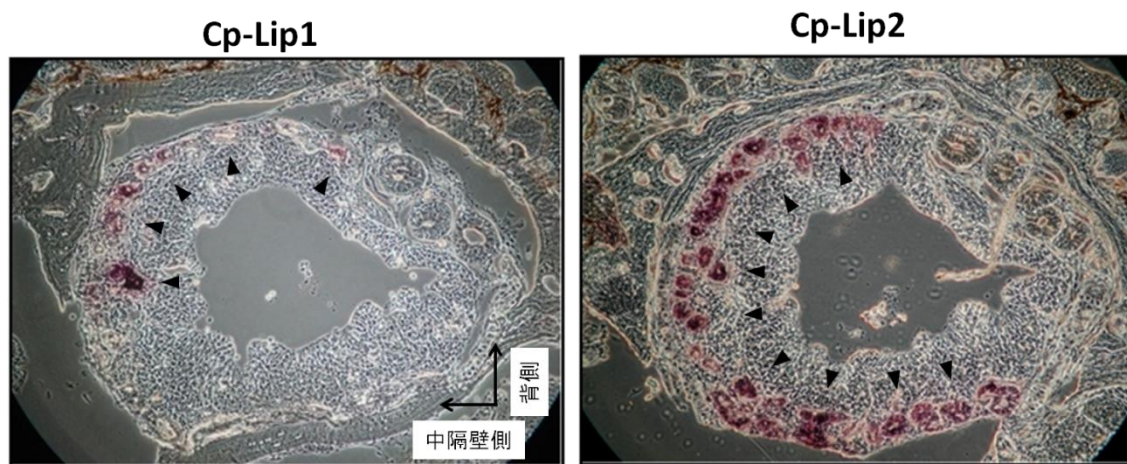


図 12 アカハライモリ嗅組織における Cp-Lip1 遺伝子及び Cp-Lip2 遺伝子を発現する細胞の分布⁵⁾

上部：背側、左：中隔壁側。矢頭：DIG 標識 antisense Cp-Lip1 RNA プローブによる検出 (左) 及び DIG 標識 antisense Cp-Lip2 RNA プローブによる検出 (右)。Scale bar : 200 μ m

結果と考察

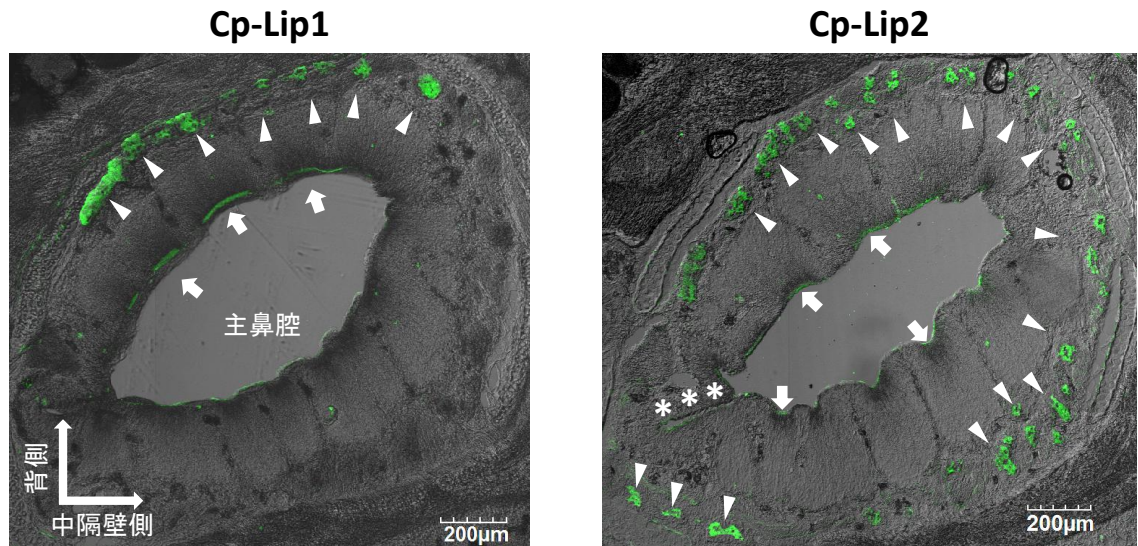


図 13 アカハライモリ嗅組織における Cp-Lip1 タンパク質及び Cp-Lip2 タンパク質の分布
 左図：抗 Cp-Lip1 血清、右図：抗 Cp-Lip2 血清。上部：背側、右側：中隔壁側。強いシグナルが見られた箇所、矢頭：ボウマン腺、矢印：鼻腔側表層、*：側鼻腔側表層。

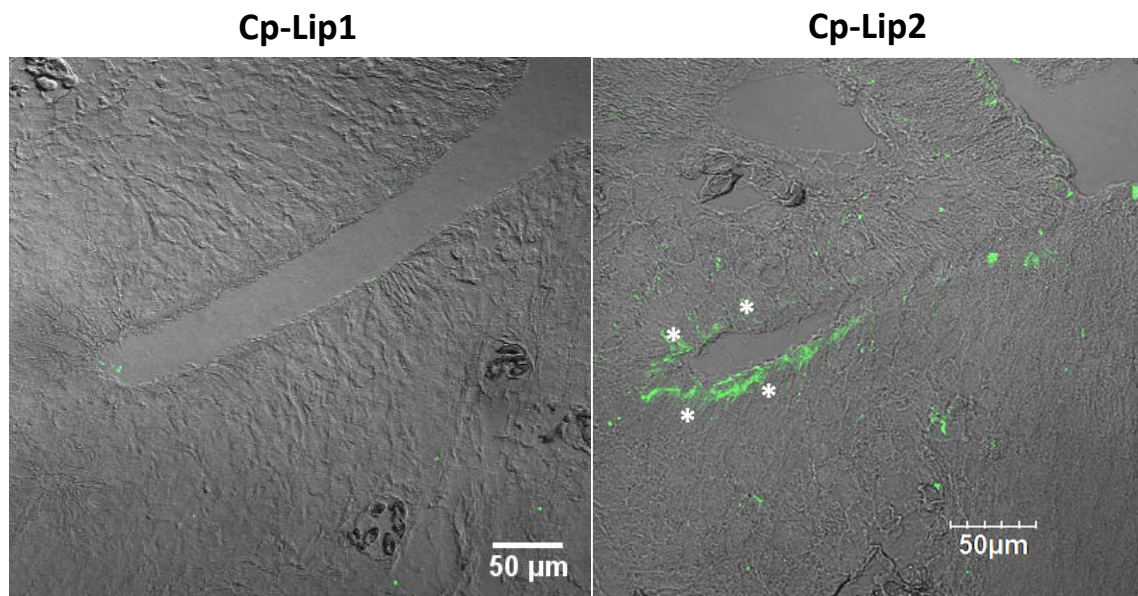


図 14 側鼻腔における Cp-Lip1 タンパク質及び Cp-Lip2 タンパク質の分布
 左図：抗 Cp-Lip1 血清、右図：抗 Cp-Lip2 血清。*：強いシグナルが見られた箇所

アカハライモリの嗅組織凍結切片に対して、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の分布を調べた結果、Cp-Lip1 タンパク質は背側のボウマン腺と鼻腔側表層に分布していることが示された (図 13 左)。一方、Cp-Lip2 タンパク質は背側、腹側、側鼻腔のボウマン腺、鼻腔側表層、側鼻腔側表層に分布していることが示された (図 13 右、図 14 右)。mRNA レベルでの解析による両タンパク質遺伝子を発現する細胞を調べた結果では、両タンパク質遺伝子がボウマン腺を構成する細胞で発現することを示している⁵⁾。その分布は、Cp-Lip1 遺伝子では背側に分布し、Cp-Lip2 遺伝子では背側、腹側と全体に分布していた。両タンパク質遺伝子の発現細胞の分布と両タンパク質の分布はそれぞれで良く一致していた。また、それぞれのタンパク質で、発現細胞の分布に対応するように鼻腔表層においてもシグナルが見られた。この鼻腔表層でシグナルが見られた部分は嗅神経細胞が存在する嗅上皮という組織である。両タンパク質はそれぞれボウマン腺で産生され、粘液と共に表層へと分泌され、嗅上皮に分布すると考えられる。更に嗅組織全体における両タンパク質の分布を調べるため、アカハライモリ嗅組織の連続切片を作製し、免疫組織化学的検出を行った。

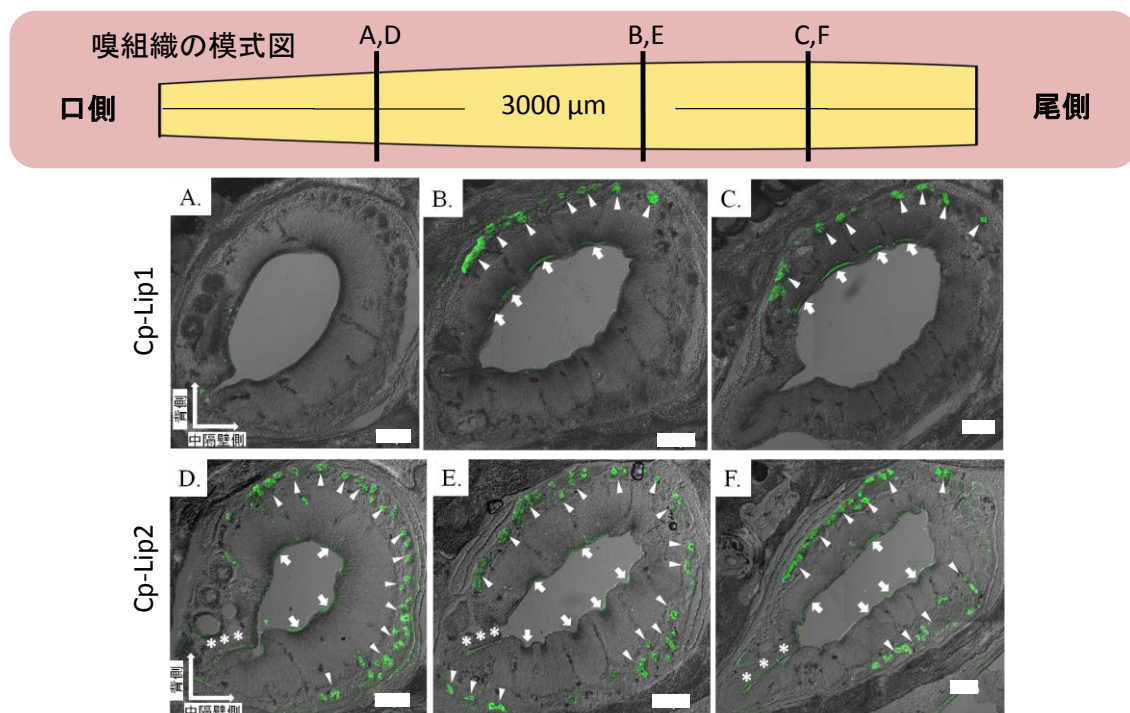


図 15 アカハライモリ嗅組織全体における Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の分布

A, B, C : Cp-Lip1 タンパク質、D, E, F : Cp-Lip2 タンパク質。A, D : 口側、B, E : 中央、C, F : 尾側の切片を示している。上部：背側、右側：中隔壁側。強いシグナルが見られた箇所、矢頭：ボウマン腺、矢印：鼻腔側表層、*：側鼻腔側表層。Scale bar : 200 μm

アカハライモリの嗅組織は口側から尾側まで 3000 μm 程度ある。嗅組織の連続切片に対して、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の分布を調べた結果の一部を図に示した (図 15)。嗅組織全体での両タンパク質の分布を調べた結果、Cp-Lip1 タンパク質は嗅組織の中央から尾側の範囲に分布していることが示された (図 15 A, B, C)。一方、Cp-Lip2 タンパク質は口側から尾側まで全体に分布していることが示された (図 15 D, E, F)。

以上の結果から、Cp-Lip2 タンパク質は嗅組織の全体に分布するが、Cp-Lip1 タンパク質の分布は中央から尾側の背側に局在することが明らかになった。この様に嗅組織で発現する複数の種類の OBP についてそれぞれの分布については初めて得られた知見である。次に、Cp-Lip1 タンパク質の嗅上皮における詳細な分布を調べた。

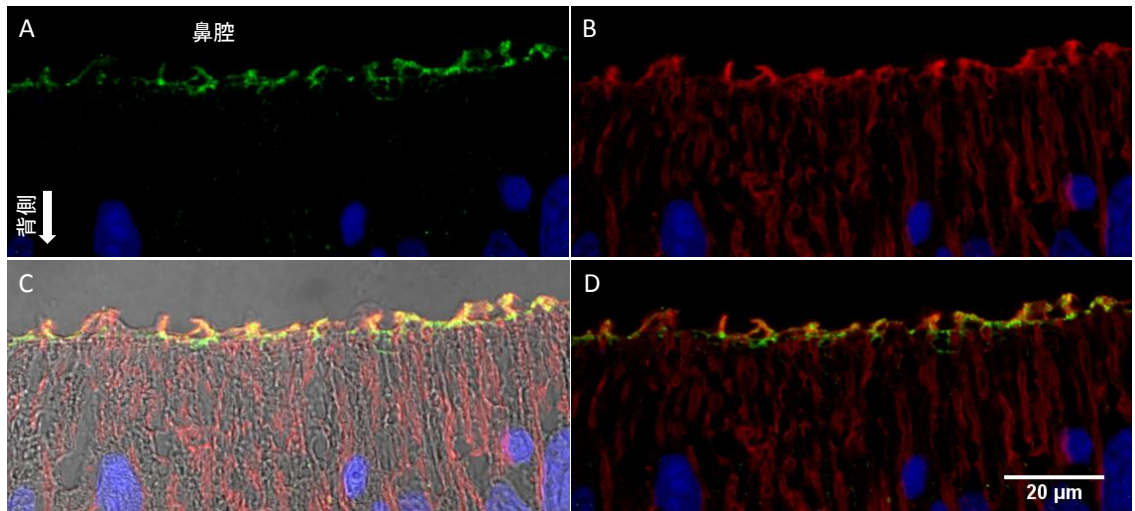


図 16 嗅上皮表層における Cp-Lip1 タンパク質の分布
 A : Cp-Lip1 + 核、B : β -tubulin + 核、C : Cp-Lip1 + β -tubulin + 核 + DIC、D : Cp-Lip1 + β -tubulin + 核。Green : 抗 Cp-Lip1 血清、Red : 抗 β -tubulin 抗体、Blue : TO-PRO-3。Scale bar : 20 μ m

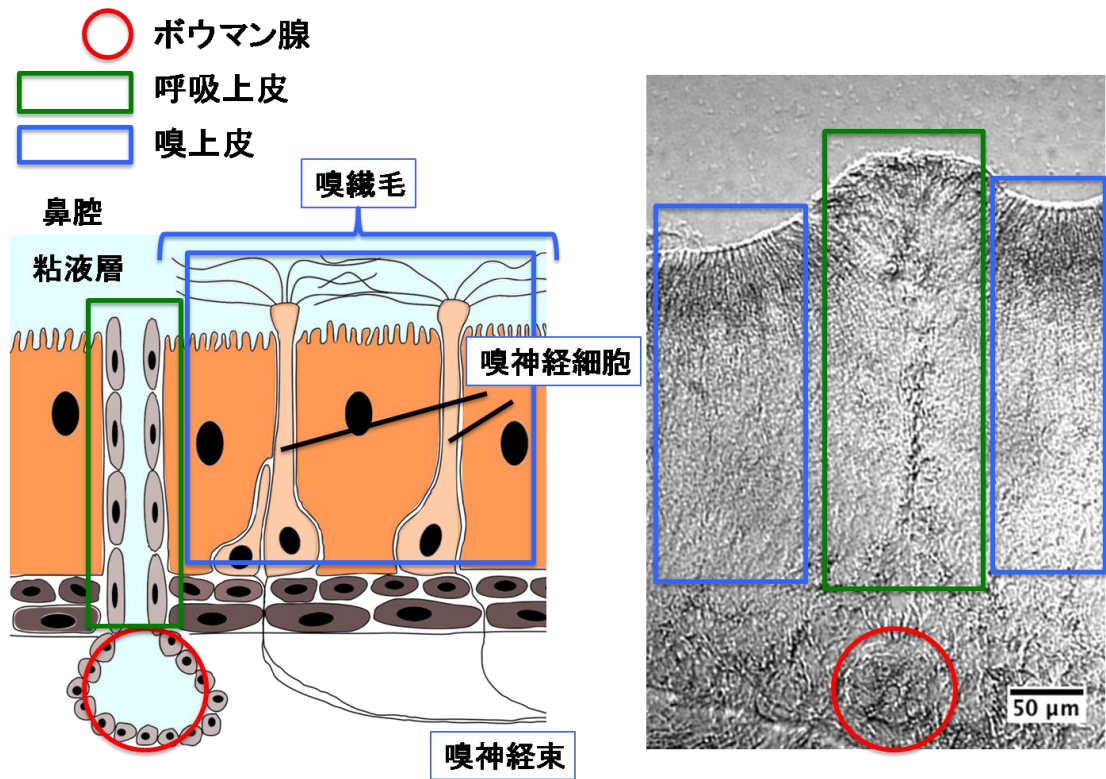


図 17 嗅組織の構成する細胞
 左図：嗅組織の模式図、右図：アカハライモリ嗅組織の微分干渉像

嗅上皮表層における Cp-Lip1 タンパク質の詳細な分布を調べた結果を図 16 に示した。また、アカハライモリの嗅組織を構成する細胞について図 17 に示した。嗅組織は基底膜側にボウマン腺を構成する細胞などが有る。その上層は支持細胞や嗅神経細胞がある。鼻腔側表層側は嗅神経細胞が並ぶ嗅上皮と分泌に関わる呼吸上皮に分かれている。そして、その表層は嗅粘液で覆われている。

本解析では嗅神経細胞のマーカーとして抗 β -tubulin 抗体を用いた。抗 β -tubulin 抗体は一般的な神経細胞のマーカーとして用いられる。アカハライモリにおいても神経細胞のマーカーとして利用できることはすでに報告されている⁶⁾。Cp-Lip1 タンパク質と多重染色を行うことで Cp-Lip1 タンパク質の詳細な分布を調べた。抗 Cp-Lip1 血清による検出では Cp-Lip1 タンパク質が存在する部分が緑色で示されている (図 16 A)。抗 β -tubulin 抗体による検出では嗅神経細胞とその先端から伸びる嗅繊毛が赤色で示されている (図 16 B)。これらの画像を重ね合わせた画像を図 16 C, D に示している。

抗 Cp-Lip1 血清によるシグナルは嗅上皮の鼻腔側表層で見られた。抗 β -tubulin 抗体によるシグナルと比較すると、抗 Cp-Lip1 血清のシグナルが嗅神経細胞の先端から伸びる嗅繊毛部分で抗 β -tubulin 抗体によるシグナルと重なっていた。このことから、Cp-Lip1 タンパク質は嗅上皮表層において、嗅繊毛部分に分布することが示された。

以上の結果を考慮すると、ボウマン腺で産生された Cp-Lip1 タンパク質は、粘液と共に嗅上皮表層の粘液層に分泌され、嗅覚受容体が存在する嗅繊毛部分に分布していると考えられる。これまでに、生化学的な解析により、Cp-Lip1 タンパク質は匂い分子結合特性を有していることが明らかになっている⁷⁾。一般的に、匂い分子は疎水性であり、嗅上皮を覆う粘液層への侵入が困難であると考えられる。OBP の機能として、匂い分子の粘液層への取り込みや嗅覚受容体への輸送が考えられている⁸⁾。また、マウス嗅組織において、匂い分子を結合していない OBP は嗅上皮表層に存在するが、匂い分子を結合した OBP は嗅上皮の支持細胞に存在する受容体によって細胞内に取り込まれ、スカベンジャーとしての役割が示唆されている⁹⁾。Cp-Lip1 タンパク質においても、匂い分子結合特性を有し、粘液層の嗅繊毛部分に存在することから、匂い分子の粘液層への取り込みや嗅覚受容体への輸送、スカベンジャーといった役割を担っていると推察される。また、Cp-Lip2 タンパク質についても匂い分子結合特性を有することが示されており、その結合特性は Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タ

ンパク質の間で異なっている^{7, 10)}。このことから、嗅覚受容体の前の段階で、嗅粘液中において Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質により匂い分子を選別している可能性が考えられる。また、Cp-Lip2 タンパク質は側鼻腔にも存在することが示された。側鼻腔はフェロモンの受容に関わると考えられており、Cp-Lip2 タンパク質はフェロモンの受容に関与する可能性が考えられる。次に、Cp-Lip1 タンパク質の嗅覚システムへの関与を検討するために、Cp-Lip1 タンパク質の存在下と非存在下における嗅神経細胞の匂い応答について解析した。

第5章

嗅神経細胞の Ca^{2+} イメージング

5-1. アカハライモリ嗅組織切片を用いた Ca^{2+} イメージング法

Cp-Lip1 タンパク質が匂い受容に与える影響を検討するために、 Ca^{2+} イメージング法を用いて嗅神経細胞の匂い応答の観察を試みた。これまでに、アカハライモリの嗅神経細胞の匂い応答に関する研究において、嗅組織より単離した嗅神経細胞を用いた報告がある。本研究で、匂い分子結合特性を有する 2 種のリポカリンタンパク質、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質がアカハライモリ嗅組織において異なる分布で存在することが示された。これらのタンパク質が匂い受容に関わる場合に、両タンパク質の分布と匂い応答を示す嗅神経細胞の分布の関係にも興味を持たれる。そこで本解析では、アカハライモリ嗅組織切片を用いた Ca^{2+} イメージングを試みた。

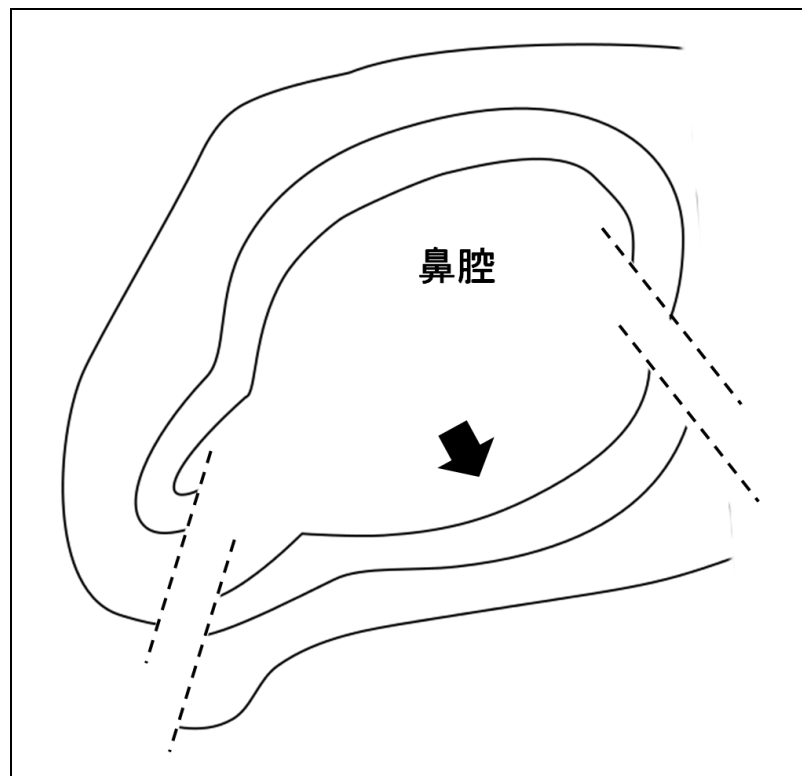
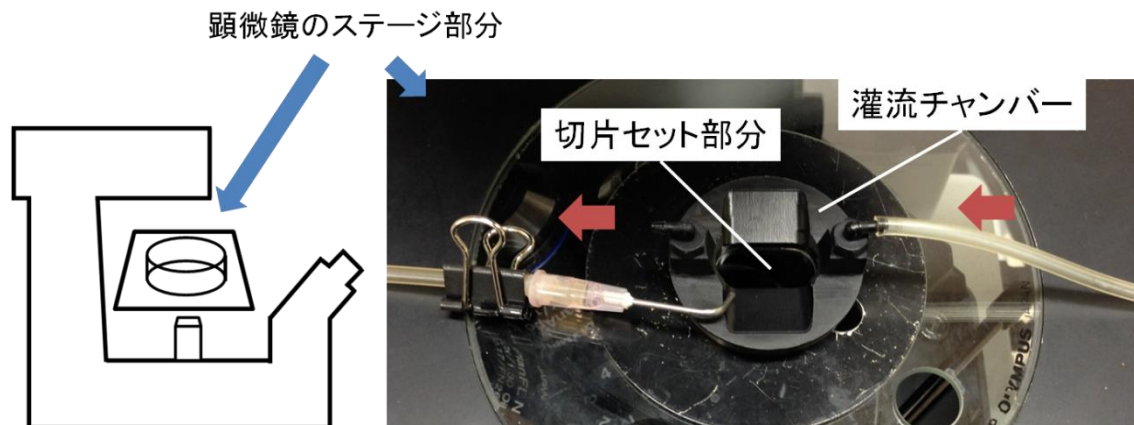


図 18 Ca^{2+} イメージングに使用する切片の作製
冠状切片の腹側の組織を切除した

A.



B.

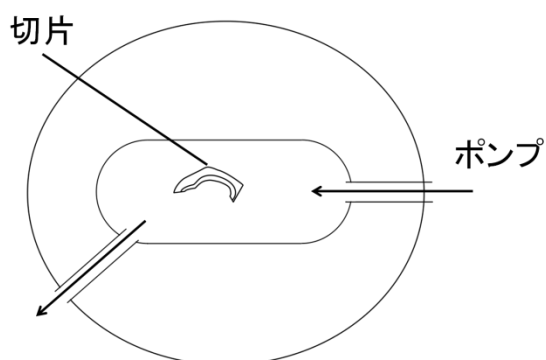


図 19 灌流チャンバー

A：顕微鏡のステージにセットしたチャンバーの図、B：切片をセットしたチャンバーの模式図。

嗅組織切片を用いた Ca^{2+} イメージングを行うために、嗅組織の冠状切片を手作業にて作製した。また、嗅上皮部分における灌流バッファーの循環と Cp-Lip1 タンパク質が背側に分布することを考慮して、本解析では腹側の組織を切除した (図 18)。その後、切片に蛍光カルシウム指示薬 Fluo4 を導入した。灌流チャンバーに切片をセットし、 Ca^{2+} 濃度変化に由来する蛍光強度変化を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV-1000, Olympus) にて観察した (図 19)。このとき、匂い刺激は Cp-Lip1 タンパク質と結合親和性の高い匂い分子 4 種を混合した溶液を用いた。

結果と考察

嗅組織切片に Fluo4 を導入し、共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した画像を図 20 に示した。RM にて灌流した後、10 mM 匂い分子混合溶液にて嗅神経細胞を刺激した結果、図 20 に示した視野内において 14 個の細胞で Ca^{2+} 濃度の変化が見られた (図 21)。また、 Ca^{2+} 濃度の変化が見られた細胞は嗅上皮切片上に分散していた。 Ca^{2+} 濃度の変化は嗅神経細胞の細胞体部分でよく観察された (図 21 B)。この細胞体部分の経時的な蛍光強度の変化について数値化したグラフを図 22 に示す。

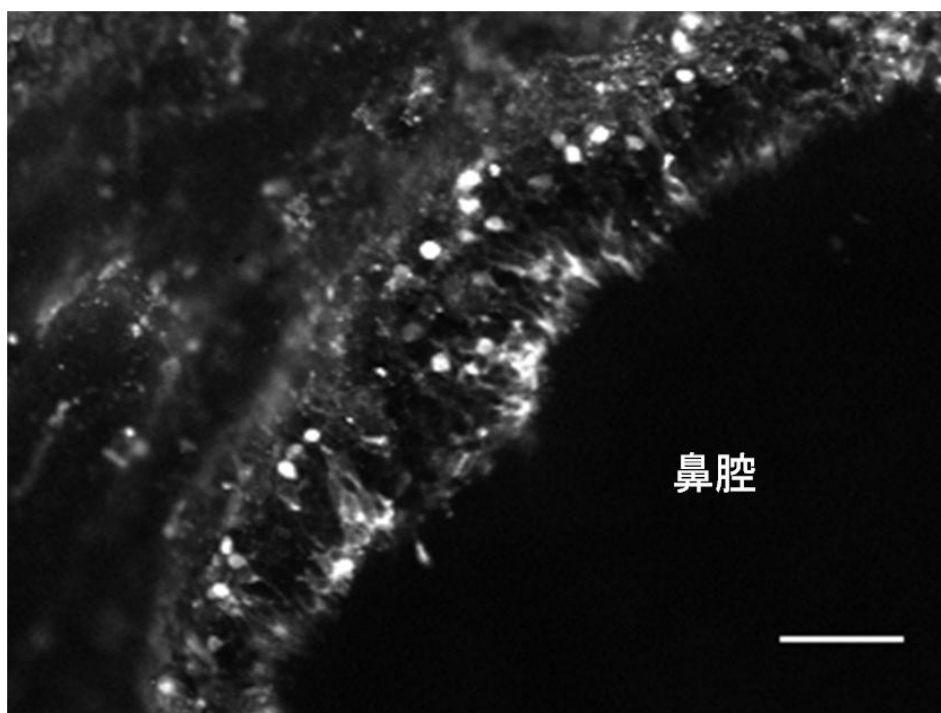
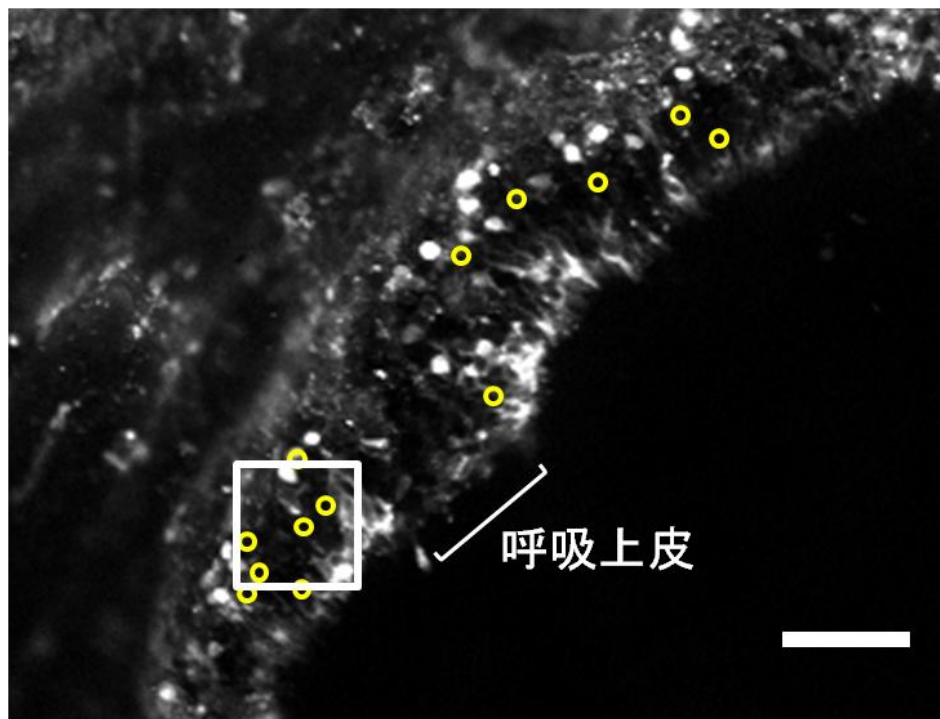
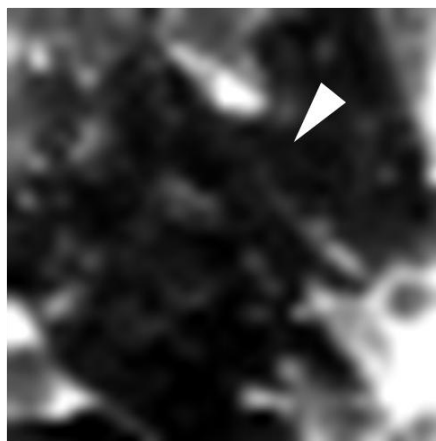


図 20 Fluo4 導入後の嗅覚組織切片
Scale bar : 100 μm

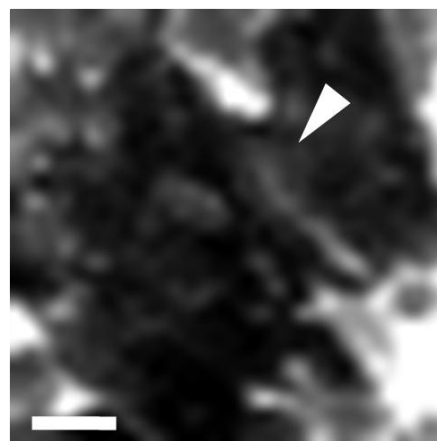
A.



B.



RM

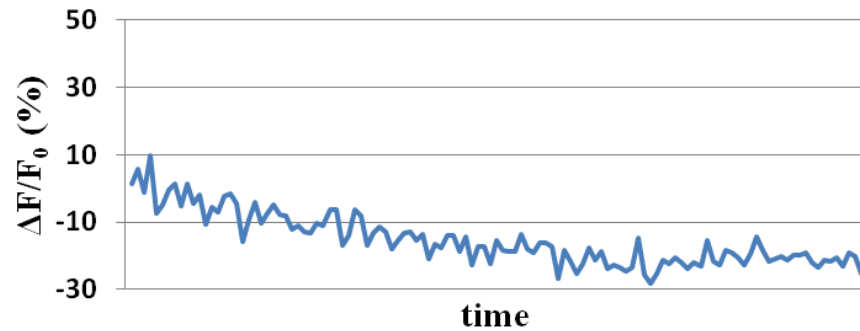


Odorants

図 21 嗅組織切片における Ca^{2+} イメージング

A : Fluo4 を導入した嗅組織切片。黄色の円 : Ca^{2+} 濃度の変化が見られた細胞。
Scale bar : 100 μm 。 B : A の枠内を拡大した画像。 RM : 匂い刺激前、 Odorants :
10 mM 匂い分子混合溶液による刺激後。 矢頭 : Ca^{2+} 濃度の上昇が見られた細胞。
Scale bar : 20 μm 。

A.



B.

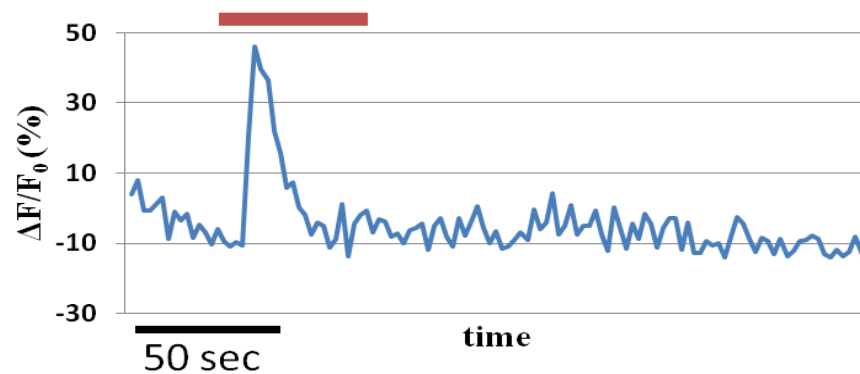


図 22 匂い刺激による嗅神経細胞内の Ca^{2+} 濃度変化量

図 21 B で示した矢頭部分の蛍光強度変化量 ($\Delta F/F_0$)。A: : 匂い刺激無し、B : 匂い刺激有り。赤いバー : 10 mM 匂い分子混合溶液をチャンバーに導入した時間。

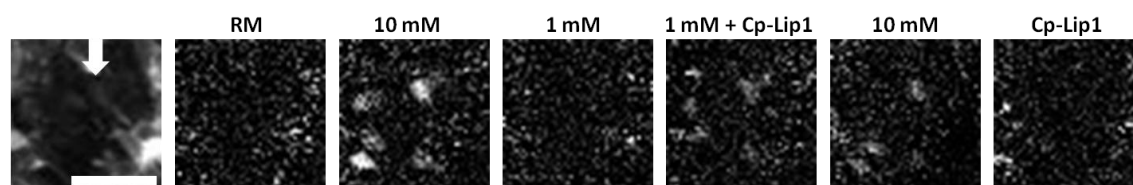
蛍光強度変化量を数値化した結果、RM のみを灌流し続けたときには蛍光強度変化量に大きな変化は見られなかった (図 22 A)。一方、匂い分子混合溶液を導入した実験では、匂い分子混合溶液を導入している間に、大きな蛍光強度変化が見られた (図 22 B)。また、匂い分子導入中に蛍光強度変化量は小さくなり、導入前と同じ程度に戻った。匂い分子混合溶液を導入する前と導入終了後では蛍光強度変化量に大きな変化は見られなかった。以上のことから、匂い分子混合溶液を導入したときの変化は匂い刺激による嗅神経細胞内の Ca^{2+} 濃度変化に由来すると考えられる。よって、アカハライモリ嗅組織切片における嗅神経細胞の匂い応答の観察が可能である結論し、嗅組織切片を用いて 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について調べた。

5-2. Cp-Lip1 タンパク質の匂い受容への関与

これまでにブタやウシなど様々な動物種において嗅組織特異的な OBP が報告されている。これらのタンパク質の役割としては、匂い分子の粘液層への取り込みや嗅覚受容体への輸送、嗅粘液層におけるスカベンジャーといった役割が考えられている。ブタで発現する OBP では、*in vitro* の実験において選択的に受容体に結合することが示されている¹¹⁾。スカベンジャーの役割としては、マウスでは嗅上皮において匂い分子結合タンパク質を共にインキュベートした時に匂い分子結合タンパク質が支持細胞表面の **Megalin** という受容体を介して支持細胞へと取り込まれることが報告されている⁹⁾。また、ウシの OBP では、細胞毒性のある 4-hydroxy-2-nonenal を除去することも報告されている¹²⁾。このように OBP について多様な役割が考えられている。また、マウスにおいて嗅粘液存在下と非存在下では匂い応答性に変化がみられたことが報告されており、嗅粘液中に存在するタンパク質が匂い受容に関与している可能性が考えられる¹⁾。本解析では、アカハライモリ嗅組織の嗅粘液中に存在する Cp-Lip1 タンパク質が匂い受容に関与すると考え、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について調べた。

結果と考察

A.



B.

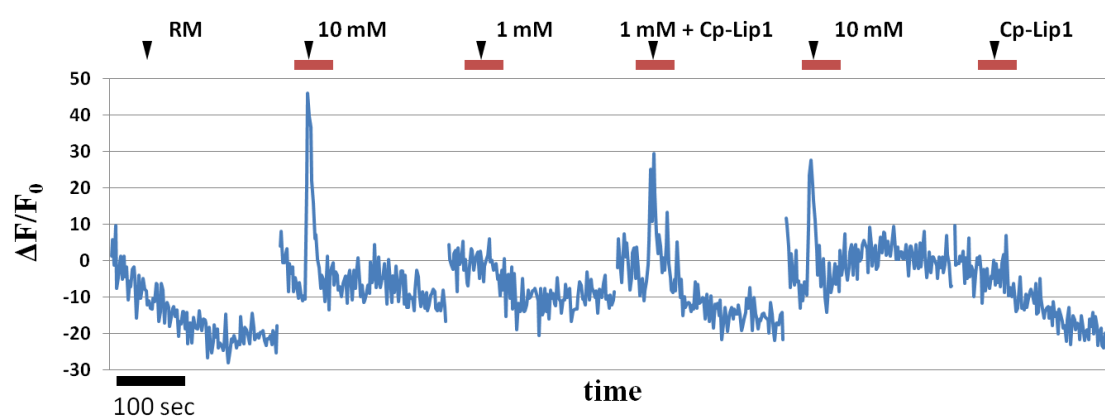


図 23 Cp-Lip1 タンパク質存在下と非存在下における嗅神経細胞の匂い応答

A: 各試行において測定部分 (図 A 矢頭) の蛍光強度が最大となる画像から数フレーム前の画像を除算した画像。矢印: 測定した嗅神経細胞。Scale bar: 50 μm 。B: 各試行ごとの嗅神経細胞の Ca^{2+} 濃度変化量。赤いバー: 混合溶液をチャンバーに導入した時間。刺激は 10 mM 匂い分子混合溶液、1 mM 匂い分子混合溶液、1 mM の匂い分子混合溶液と 5 μM の Cp-Lip1 タンパク質の混合溶液、5 μM の Cp-Lip1 タンパク質溶液で行った。

匂い分子混合溶液で嗅神経細胞を刺激する際の 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応答性について解析した。10 mM と 1 mM の匂い分子混合溶液を用いて嗅神経細胞を刺激した。10 mM の匂い分子混合溶液を導入したときには嗅神経細胞の応答が見られた (図 23 10 mM)。1 mM の匂い分子混合溶液を導入したときには興奮する嗅神経細胞が減少した (図 23 1 mM)。次に、1 mM の匂い分子混合溶液に終濃度が 5 μM の Cp-Lip1 タンパク質を混合して嗅神経細胞を刺激した。1 mM の匂い分子混合溶液では興奮が見られなかった嗅神経細胞で興奮が見られるようになった (図 23 1 mM + Cp-Lip1)。匂い分子を混合せずに 5 μM の Cp-Lip1 タンパク質のみを導入した

ときには嗅神経細胞の興奮は見られなかった (図 23 Cp-Lip1)。同様に終濃度が 5 μM の BSA を 1 mM の匂い分子混合溶液に加えて導入した場合、嗅神経細胞の興奮は見られなかった (data not shown)。以上の結果からアカハライモリの嗅神経細胞における匂い分子の受容に Cp-Lip1 タンパク質が関与していることが示唆された。10 mM の匂い分子混合溶液で刺激した際に応答を示したが、1 mM の匂い分子混合溶液では応答が見られなかった嗅神経細胞で 5 μM の Cp-Lip1 タンパク質存在下では応答が見られた。これまでに、Cp-Lip1 タンパク質と結合親和性の高い匂い分子で刺激したときに Cp-Lip1 タンパク質が嗅電図に与える影響を調べたところ、背側の嗅上皮において Cp-Lip1 タンパク質を添加したことにより嗅電図の増強効果が見られたことが報告されている¹³⁾。このことから Cp-Lip1 タンパク質が匂い分子の受容を促進する効果が示唆されており、本解析の結果と一致する。以上のことから、Cp-Lip1 タンパク質が嗅神経細胞の匂い分子受容に関与していることが考えられた。

1 mM の匂い分子混合溶液では応答が見られなかった嗅神経細胞で 5 μM の Cp-Lip1 タンパク質存在下では応答が見られた。本解析では 10 mM と 1 mM の匂い分子混合溶液で比較しており、感度が 10 倍になった。しかし、Cp-Lip1 タンパク質は 12 倍量の匂い分子を加えることですべてのタンパク質が匂い分子と結合する⁷⁾。1 mM の匂い分子混合溶液中に 5 μM の Cp-Lip1 タンパク質を加えた条件下では、すべての Cp-Lip1 タンパク質に匂い分子が結合している。このとき Cp-Lip1 タンパク質に結合した 5 μM の匂い分子を受容したと考えた場合、その感度は 10 mM の匂い分子混合溶液のときと比較して 2000 倍程度上昇したということも考えられる。増強する感度の倍率については、1 種類の匂い分子で異なる濃度を用いた実験や、混合する Cp-Lip1 タンパク質の濃度を変化させた実験を行う必要がある。

ブタの OBP がヒトの嗅覚受容体と相互作用することが報告されている¹¹⁾。このことから、嗅覚受容体は匂い分子と結合した OBP と相互作用することで匂い分子を受容していることが考えられる。しかし、マウスにおいて OBP が匂い分子のスキャベンジャーとして機能する場合には、支持細胞の微絨毛に存在する受容体に結合して細胞内に取り込まれることが示されている⁹⁾。また、マウスでは鉄輸送に関係するリポカリンタンパク質に対する受容体が心臓や肺などの組織の細胞表面に発現しており、リポカリンタンパク質はこの受容体と相互作用することがわかっている¹⁴⁾。これらのことから、Cp-Lip1 タンパク質が

匂い分子を結合し、その後嗅神経細胞の嗅繊毛膜に存在する受容体（嗅覚受容体、リポカリン受容体など）と相互作用することで嗅覚受容体が匂い分子を受容しているのではないかと推察される。しかし、アカハライモリ嗅組織においてこのようなリポカリン受容体の発現については不明である。

第六章

総括・考察

生物は周りの環境の情報を得る手段として嗅覚を備えている。嗅覚は化学受容であり匂い分子を嗅覚受容体が受容してその情報を感知する。嗅覚受容体は嗅神経細胞の繊毛部分に存在し、ゲノム解析の結果からヒトで 396 種類、マウスで 1063 種類の嗅覚受容体完全遺伝子があると報告されている。嗅覚受容体は 1 つの嗅神経細胞あたりに 1 種類の嗅覚受容体を発現する。匂い分子と嗅覚受容体の対応は 1 対 1 では無く、様々な組み合わせで実際に存在する嗅覚受容体の数以上の匂い分子を感知することができる。また、その感度は *in vivo* において nM から pM のレベルの感受性を示す。しかし、これまでの研究で *in vitro* では μM レベルの感受性を示す。このように *in vitro* と *in vivo* の実験系では匂い応答の感度が異なり、粘液の有無によりその応答性が異なることも報告されている¹⁾。嗅粘液の役割としては、嗅粘膜の細胞が外界にさらされることによる乾燥や、外界から流入する物質からの保護といった役割が考えられている。嗅粘液はボウマン腺などで産生され、様々なタンパク質を含む。実際の動物の嗅覚ではこれらの嗅粘液に含まれる様々なタンパク質により、匂い分子が分解、修飾、または運搬されることでより高い特異性や感度が維持されていると考えられている。

これまでに、ウシやブタなど、魚類を除く多くの脊椎動物で匂い分子結合タンパク質 (Odorant Binding Protein : OBP) がみついている。生物が水生環境から陸生環境へと進出する際に環境に適応するために体を様々に変化させてきた。嗅覚においては陸生環境へと進出する際に嗅覚受容体遺伝子の数が増加した^{15, 16)}。魚類には OBP がみられず、陸生環境へと進出する際に獲得したものと考えられる。他には、フェロモンの受容に関わる鋤鼻器と呼ばれる組織についても魚類ではみられず、陸生環境へと進出する際に獲得したと考えられる。このような進化的側面も考慮して、本研究では両生類であるアカハライモリを用いて研究を行っている。

これまでの研究により OBP についていくつかの役割が考えられている。ウシの OBP は細胞毒性を示す 4-hydroxy-2-nonenal と相互作用することで細胞の生存率を上昇させることが報告されている¹²⁾。また、ラットやブタの OBP では、嗅覚受容体と特異的に相互作用することが報告されており、匂い分子を嗅覚受容体へ輸送する役割を担うと推測されている^{11, 17)}。これまでに、アカハライモリの嗅組織 cDNA ライブラリーから 2 種のリポカリンタンパク質遺伝子 *Cp-lip1* と *Cp-lip2* 単離している⁵⁾。また、これらの遺伝子にコードされ

る Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質についてその特性を解析した結果、匂い分子結合特性を有することが明らかになり、両タンパク質はアカハライモリの OBP であることが示唆された^{7,10)}。本研究では Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質についてアカハライモリの嗅覚における役割に関する知見を得るために、両タンパク質の分布を調べた。また、Cp-Lip1 タンパク質が匂い受容に与える影響を調べた。総括として、本研究から得られた知見と考察を以下にまとめる。

両タンパク質の分布を調べた結果、両タンパク質ともに嗅組織特異的に分布し、発現細胞であるボウマン腺に分布することを明らかにした。これは RNA レベルでの発現細胞の分布を調べた結果と一致していた⁵⁾。ラットで単離されたりポカリンタンパク質も粘液の分布に関わる腺房細胞で発現していることが明らかにされている⁸⁾。また、嗅上皮表層でも両タンパク質が分布することを明らかにした。これらのことから両タンパク質はボウマン腺で発現され、粘液とともに表層へと分泌され、嗅上皮表層に分布すると推察される。また、Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質では嗅組織における分布が異なっていた。Cp-Lip1 タンパク質は嗅組織の中央から尾側の範囲の背側に局在していた。一方、Cp-Lip2 タンパク質は嗅組織全体に幅広く分布していた。この様に複数の種類の OBP の嗅組織におけるそれぞれの分布に関する知見は少なく、嗅覚における OBP の役割を調べる上で有意義である。また、Cp-Lip1 タンパク質について嗅上皮表層における詳細な分布を調べた結果、Cp-Lip1 タンパク質は嗅神経細胞の先端から伸びる嗅繊毛部分に存在していることが明らかになった。ラットやブタの OBP が嗅覚受容体と相互作用することを考慮し、Cp-Lip1 タンパク質も同様で有るならば、匂い分子を結合し嗅覚受容体へと輸送する役割を担うことが推察される。また、アカハライモリ嗅組織切片を用いた 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を解析した結果では、1 mM の匂い分子混合溶液で応答を示さなかった嗅神経細胞が Cp-Lip1 タンパク質存在下では応答を示し、Cp-Lip1 タンパク質が匂い分子の受容感度が上昇することを明らかにした。Cp-Lip1 タンパク質が嗅組織の中央から尾側の背側に局在することから、局部的に嗅覚受容体の感度を上昇させることが推察された。

マウスの嗅覚で嗅粘液の有無により匂い応答性に変化があることと今回得ら

れたアカハライモリの OBP について得られた知見を考慮すると、OBP など様々なタンパク質を含む嗅粘液は嗅覚において感度の調節など重要な役割を担うことが推察された。また、本研究では Cp-Lip1 タンパク質が匂い受容に与える影響のみを解析したが、Cp-Lip2 タンパク質も同様に匂い分子の受容感度を上昇させるならば、両タンパク質の間で匂い分子結合特性が異なることを考慮すると、受容体に匂い分子が受容される前の段階で匂い分子の選別を行っている可能性が考えらる。

本研究では、アカハライモリ嗅組織特異的に発現する Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の嗅組織における分布を明らかにした。また、Cp-Lip1 タンパク質が匂い分子の受容感度を上昇させることを明らかにした。これまでの研究で Cp-Lip1 タンパク質と Cp-Lip2 タンパク質の匂い分子結合特性については、Cp-Lip2 タンパク質と比較して、Cp-Lip1 タンパク質は結合する匂い分子の選択性が狭いことを示している。一部の匂い分子では両タンパク質に結合能を有しているものもある。また、両タンパク質の嗅組織における分布についても重なる部分もある。これらのことが匂い分子の受容にどのような影響を与えているのかということ明らかにするために、Cp-Lip2 タンパク質においても同様な実験や両タンパク質を混合した場合の実験を行い、両タンパク質と結合する匂い分子やどちらか一方と結合する匂い分子を用いて解析する必要がある。本研究で実験に使用する嗅組織切片の部位を詳細に調整することが困難であったため Cp-Lip1 タンパク質が分布する箇所と分布しない箇所において Cp-Lip1 タンパク質存在下と非存在下の嗅神経細胞の応答性について知見を得るために、更なる切片の作製方法や観察方法を検討する必要がある。また、Cp-Lip2 タンパク質はフェロモンの受容に関わると考えられている鋤鼻器にも分布しており、アカハライモリのフェロモンとして知られているソデフリンとの結合特性を解析し、同様にフェロモン受容体の応答に与える影響を解析することにも興味を持たれる。

参考文献

- 1) 高橋司: アカハライモリ嗅覚特異的リポカリンの低分子化合物結合特性の評価, 室蘭工業大学 博士論文, pp1-102 (2011)
- 2) Oka Y, Katada S, Omura M, Suwa M, Ysohihara Y, Touhara K: Odorant receptor map in the mouse olfactory bulb: in vivo sensitivity and specificity of receptor defined glomeruli. *Neuron* 52, 857-869 (2006)
- 3) Nagashima Y, Touhara K: Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception. *J Neurosci.* 30 (48), 16391-16398 (2010)
- 4) Jones FM, Pfeiffer CJ, and Asahima M: Ultrastructure of the olfactory organ of the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Ann Anat* 176, 269-275 (1994)
- 5) 岩佐達郎, 満都拉, 浦野和雄, 高橋司, 澤田研, 岡野恵子, 中村整: イモリ嗅上皮ポーマン腺に発現するリポカリンファミリータンパク質. 味と匂誌 15, 211-220 (2008)
- 6) 高島大貴, 澤田研, 岩佐達郎: アカハライモリの嗅上皮および鋤鼻上皮における G タンパク質の遺伝子クローニングとその局在. 味と匂誌 16, 533-536 (2009)
- 7) 高橋司, 澤田研, 岩佐達郎: アカハライモリ嗅覚特異的リポカリン Cp-Lip1 の低分子化合物結合特性: 味と匂誌 17, 417-420 (2010)
- 8) Pevsner J, Sklar PB and Snyder SH: Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4942-4946 (1986)
- 9) Stromann J and Breer H: Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochem Cell Biol.* 36, 357-369 (2011)
- 10) 岩佐達郎, 満都拉, 高橋司, 高島大貴, 澤田研: アカハライモリ嗅上皮のリポカリンタンパク質、Cp-Lip2. 味と匂誌 15, 587-590 (2008)
- 11) Matarazzo V, Zsurger N, Guillemot JC, Clot-Faybesse O, Botto J M, Farra DC, Crowe M, Demaille J, Vincent JP, Mazella J and Ronin C: Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor. *Chem. Senses* 27, 691-701 (2002)
- 12) Uchida K: 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res* 42, 318-343 (2003)
- 13) 野海芳博, 高橋司, 澤田研, 岩佐達郎, 中村整: アカハライモリのリポカリンによる嗅電図の修飾. 味と匂誌 16, 545-548 (2009)

- 14) Devireddy LR, Gazin C, Zhu X and Green MR: A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 123, 1293-1305 (2005)
- 15) Niimura Y, Nei M: Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6039-6044 (2005)
- 16) Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H, Touhara K: Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptor that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci.* 21, 6018-6025 (2001)
- 17) Ko HJ, Park TH: Enhancement of odorant detection sensitivity by the expression of odorant-binding protein. *Biosens Bioelectron* 23, 1017-1023 (2008)

謝辞

本論文は室蘭工業大学大学院創成機能工学専攻、岩佐達郎教授ならびに澤田研准教授の御指導のもとに行った研究をまとめたものです。本研究の遂行にあたり、学部4年生から現在に至るまで研究方針及び内容について、御指導、御鞭撻を頂いた岩佐達郎教授と澤田研准教授に心から感謝致します。また、様々な発表の機会を与えて頂いたことにつきまして深く感謝致します。

副査の本学創成機能工学専攻、佐々木眞教授、長谷川靖教授からは、博士論文予備審査ならびに本審査にて貴重な御意見を頂きましたことを感謝致します。

研究活動を行うにあたり、諸先生方を始め、生体分子科学研究室の皆様に変にお世話になりました。

大学院生活においてお世話になりました全ての方々に対し、ここに心からの感謝の意を表します。

最後に、博士後期課程への進学に理解を示していただいたばかりでなく、精神面、経済面、生活面において支え続けて下さった家族に対し、心から感謝致します。

2013年 3月

杉本 弘文

博士学位論文 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

二〇一四年 三月 杉本 弘文