

Expresion of Golf in the rat placenta: possible implication in olfactory receptor transduction

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 板倉, 称 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/255

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 3 5 号	学位授与年月日	平成 1 7 年 3 月 1 5 日
氏 名	板 倉 称		
論文題目	Expresion of Golf in the rat placenta: possible implication in olfactory receptor transduction (ラット胎盤における Golf の発現:嗅覚受容体シグナル伝達への関与の可能性)		

博士(医学) 板 倉 称

論文題目

Expression of Golf in the rat placenta: possible implication in olfactory receptor transduction

(ラット胎盤におけるGolfの発現：嗅覚受容体シグナル伝達への関与の可能性)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

嗅覚受容体は細胞膜を7回貫通するG蛋白共役型受容体に属する。嗅上皮には約1000種類ものこうした嗅覚受容体が発現し、生体内で最も大きな受容体ファミリーを形成している。近年、嗅覚受容体は嗅上皮のみならず舌上皮、精子などにも発現していることが明らかになってきた。また嗅覚受容体の細胞内シグナル伝達にはGolfという名の特殊なG蛋白が関わるが、GolfのmRNAも精巣、網膜などで発現が確認されている。こうした嗅覚受容体、Golfの異所性発現は、匂い分子が生体内のシグナルとして様々な場面で利用されている可能性を示唆している。本研究では胎盤機能が匂い分子によって調節されているのではないかという仮説のもと、胎盤における嗅覚受容体とGolfの発現について検討した。

〔材料ならびに方法〕

- 1) 材料 妊娠8日から18日のWistar ratの胎盤と嗅上皮を用いた。
- 2) RT-PCRとDNAシーケンス 各嗅覚受容体間で共通にみられる第2、6、7番目の膜貫通領域のアミノ酸配列を元にdegenerative primerを作製し、胎盤および嗅上皮に含まれるmRNAよりRT-PCRを行い胎盤における嗅覚受容体の発現を検討した。
- 3) ウェスタンブロット法 一次抗体にはratのGolfのC末端に対する抗ウサギポリクローナル抗体を用い、二次抗体にはHRP標識抗体をもちいた。
免疫染色 一次抗体にはratのGolfのC末端に対する抗ウサギポリクローナル抗体を用い、ABC法によってGolf陽性細胞を免疫組織化学的に同定した。

〔結果〕

- 1) ラット胎盤における嗅覚受容体の発現：degenerative primerを用いたRT-PCRでpositive controlである嗅上皮サンプルと同様に胎盤でも予想されたサイズのcDNA fragmentが増幅された。我々はこのDNA fragmentをサブクローニングし、増幅されたPCR産物の遺伝子配列を解析した。解析した40クローンのうち32クローンがGen Bankに登録されたマウス嗅覚受容体遺伝子と相同であり、全部で11種類の嗅覚受容体遺伝子が同定された。我々は同時にUnigene databaseを検索し胎盤に発現する10種類の嗅覚受容体遺伝子の存在を確認したが、それらはいずれも今回我々がRT-PCRによって同定したものと異なるものであった。
- 2) 胎盤に発現する嗅覚受容体の特徴：嗅覚受容体は2つのクラスに分類される。クラス1は魚類に発現し水性のにおいを受容し、クラス2は哺乳類に発現し揮発性のにおいを認識する。今回我々が同定した嗅覚受容体遺伝子について調べてみると、これらは全てクラス2に属する嗅覚受容体であった。
- 3) ラット胎盤でのGolfの局在：胎盤に発現するmRNAを抽出し、RT-PCRによってGolf mRNAの発現を

検討したところ予想される大きさのバンドが認められた。我々はこのバンドをサブクローニングし、その塩基配列を解読することによってGolf遺伝子が確かに増幅されていることを確認した。次に胎盤におけるGolfタンパクの発現をウェスタンブロット法にて検討し、Golf蛋白が確かに胎盤組織に含まれることを明らかにした。さらに妊娠8日目から18日目の胎盤でGolfの発現量を比較したところ妊娠がすすむにつれてGolfの発現量が多くなる傾向を認めた。Golf発現が最も高い妊娠18日目の胎盤を用い免疫組織化学的検討を行なうと、Golf陽性反応はgiant cell trophoblasts (GC) と spongiotrophoblasts (STC) に認められた。

〔考察〕

- 1) 胎盤における嗅覚受容体の特性 今回我々はラット胎盤mRNAをもとにしたRT-PCRを行ない増幅されたcDNA fragmentについて遺伝子解析を行った。この結果、11種類の嗅覚受容体遺伝子が同定されたが、興味深いことに同じ遺伝子を複数のサブクローンに認めることになった。ゲノムDNAには1,000種類にも及ぶ嗅覚受容体遺伝子がコードされている。したがって同じ嗅覚受容体遺伝子が複数のサブクローンに認められたという事実は、限られた数の嗅覚受容体が胎盤に発現していることを示唆するものと思われた。
- 2) 胎盤における嗅覚受容体の役割 最近多数報告されている嗅覚受容体の異所性発現から、嗅覚受容体は外界のにおい分子の認識に加え、体内において様々な生理的機能を有していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

嗅覚受容体は7回膜貫通型のG蛋白共役型受容体ファミリーに属する。嗅上皮には約1000種の嗅覚受容体が発現し、最も大きな受容体ファミリーを形成している。近年、嗅覚受容体は嗅上皮以外(発達期の心臓、脾臓、舌上皮、精巣、脳など)にも発現していることが明らかになり、嗅覚受容体の細胞内シグナル伝達に特異的に関わるG蛋白であるGolfも、精巣、網膜などでmRNAの発現が確認されている。こうした嗅覚受容体やGolfの異所性発現は、匂い分子が生体内のシグナルとして広く利用されているという仮説も生んでいる。申請者は匂い分子が胎盤機能調節に関わる可能性を検討するため、胎盤における嗅覚受容体とGolfの発現を検討した。

材料には妊娠8日から18日のWistar ratの胎盤と嗅上皮を用いた。各嗅覚受容体間で共通にみられる第2、6、7番目の膜貫通領域のアミノ酸配列を元にdegenerative primerを作製し、胎盤および嗅上皮に含まれるmRNAよりRT-PCRを行いDNAシーケンスを行って胎盤における嗅覚受容体の発現を検討した。Golfの胎盤での発現の確認に、一次抗体にratのGolfのC末端に対するウサギポリクローナル抗体、二次抗体にHRP標識抗体を用いたウェスタンブロット法を用いた。Golfの局在は、ABC法を用いた免疫組織化学法で同定した。

degenerative primerを用いたRT-PCRでpositive controlである嗅上皮サンプルと同様に胎盤でも予想されたサイズのcDNA断片が増幅された。このDNA断片をサブクローニングし、増幅されたPCR産物の遺伝子配列を解析した。解析した40クローンのうち32クローンがGen Bankに登録されたマウス嗅覚受容体遺伝子と相同であり、全部で11種類の嗅覚受容体遺伝子が同定された。Unigene databaseを検索し胎盤に発現する嗅覚受容体遺伝子の存在を確認したところ、10種類の遺伝子が報告されていたが、それらはいずれも今回申請者らが同定したものと異なるものであった。また、嗅覚受容体は2つのクラスに分類され、ク

ラス1は魚類に発現し水性のにおいを受容し、グラス2は哺乳類に発現し揮発性のにおいを認識するとされるが、今回申請者らが同定した嗅覚受容体遺伝子は全てクラス2に属していた。

ラット胎盤に発現するmRNAを抽出し、RT-PCRによってGolf mRNAの発現を検討したところ予想される大きさのバンドが認められた。このバンドのサブクロニングを行い、塩基配列からGolf遺伝子であることを確認した。次にウェスタンブロット法を用いて、Golf蛋白が胎盤組織に含まれることを証明した。さらに妊娠8日目から18日目の胎盤でGolfの発現量を比較し、妊娠の進行とともにGolf蛋白発現量が増加することを明らかにした。Golf蛋白発現が最も高い妊娠18日目の胎盤を用いた免疫組織化学法により、Golf陽性反応はgiant cell trophoblastsとspongiotrophoblastsに限られていることを明らかにした。

審査委員会では、申請者が胎盤における11種類の嗅覚受容体遺伝子とGolfの発現を新たに同定し、ゲノムDNAには1000種類にも及ぶ嗅覚受容体遺伝子がコードされているにも関わらず、同じ遺伝子が複数のサブクローンに含まれることに着目し、限られた種類の嗅覚受容体のみが胎盤に発現していると考え、嗅覚受容体が胎児-母体間のシグナルを受容し、胎盤の形成や機能の調節に何らかの関与を持つという斬新な仮説を導いた点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) 嗅細胞から糸球体への軸索伸長で嗅覚受容体はどこでシグナルを受けるのか
- 2) RT-PCRでnested primerを用いない場合にバンドは確認できたか
- 3) Unigene databaseでは胎盤で発現する嗅覚受容体が既に登録されているのか
- 4) 胎盤だけに発現する嗅覚受容体はあるのか
- 5) giant cell trophoblastsとspongiotrophoblastsの機能は
- 6) 嗅覚受容体mRNAのin situ hybridizationが出来なかった理由
- 7) Golfは嗅上皮より胎盤に多いのか
- 8) Golfのウェスタンブロットでみられた77kDaの蛋白は何か
- 9) Golfと嗅覚受容体が複合体を形成している可能性はないか
- 10) 胞状奇胎でGolfの発現をみてみたことはあるか
- 11) 胎盤で同定した嗅覚受容体のリガンドは同定できるか
- 12) 卵から精子へのシグナルとしての匂い分子は同定されているか
- 13) 免疫染色でGolfが細胞質に充満している理由は何が考えられるか
- 14) Golfと他のG蛋白質との違いは何か
- 15) 妊娠時の嗅覚の変化と胎盤の嗅覚受容体との関連は考えられるか
- 16) 胎盤で発現する嗅覚受容体は何番の染色体にあるか
- 17) 卵管の線毛にもGolfは発現しているか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	福田 敦 夫		
	副査	峯 田 周 幸	副査	寺 川 進