

令和元年8月30日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11206

研究課題名(和文) 匂い分子結合タンパク質の生理機能の解明とドラッグ・デリバリーへの応用

研究課題名(英文) Analysis of the physiological function the odorant binding protein and application to drug delivery

研究代表者

澤田 研 (Sawada, Ken)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50304308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：嗅粘液層に存在する匂い結合タンパク質の生理機能の解明とこのタンパク質を用いた脳への薬剤輸送系の確立のための基盤研究を行うことを目的とした。

匂い分子結合タンパク質はこれまでにアカハライモリから2種類単離してきた。このうちCp-Lip1は嗅神経細胞の匂い受容感度を上昇させていることを見出した。また、この上昇に関与しているCp-Lip1の領域がC末端側の10アミノ酸に存在していることを見出した。

本タンパク質をマウス鼻腔内に投与すると海馬領域と小脳で分布していることを見出した。また、アルツハイマーの初期症状である嗅覚障害マウスを作成したところ海馬の萎縮見られた。現在治療の研究を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両生類の嗅組織にある匂い分子結合タンパク質の生理機能を解析を行った結果、Cp-Lip1は陸棲生活に順応するために粘液に存在しその役割は嗅神経細胞の匂い受容感度の上昇であることが分かった。このように嗅覚の進化において獲得した機能であると予想される。また、このタンパク質を使用した脳へのドラッグデリバリー系の確立の基礎研究においてこのタンパク質を鼻腔から投与すると記憶に関わっている脳の領域に分布できることから脳へのドラッグデリバリーの可能性を示すことができた。現在は、アルツハイマーの初期症状である嗅覚障害マウスを用いて治療の検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the physiological function the odorant binding protein and application to drug delivery to brain by this protein.1 The odorant binding proteins were isolated from Japanes newt. Cp-Lip1 increased the odorant reception sensitivity of olfactory neuron. 10 amino residues in C-terminal of this protein were involved in this function.2 This proeins were distributed with hippocampus and cerebellum when this protein was administered to mouse nasal cavity. The olfctory dusturbanze is initial symptom of Alzheimer disease. We prepared model mouse of olfctory dusturbanze. The hippocampus of this mouse was atrophied. We are going to treat this olfctory dusturbanze mouse using our protein.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：匂い分子結合タンパク質 ドラッグデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嗅覚の機構は匂い分子の受容とその認識の2つの機構に分かれている。現在、認識機構に関する研究が中心に行われているが、嗅覚受容体の匂い分子結合選択性など受容機構においても不明な点が多々ある。その中でも申請者は、粘液層の存在しない時、嗅覚受容体の匂い分子の感度の低下と結合選択性が高くなることに注目し、嗅粘液層に存在する匂い分子結合タンパク質が関与していると考えた。このタンパク質は進化の過程において両生類以降の生物種では存在するが、その生理機能はほとんど知られていない。申請者は有尾両生類であるアカハライモリに注目し研究を行ってきた。

このタンパク質はリポカリン・ファミリーに属している。このファミリー関係の研究論文は2015年10月現在すでに約600報近く発表され、発表内容も基礎研究から応用研究まで幅広く活発に研究されている。このファミリーの特徴は、熱やpHに対して安定で共通の樽型構造とフタの役割をする構造をもちその内腔に低分子が結合することである。このため、汚染物の除去やセンサー開発などの応用研究がなされている。一般的に血液循環による薬剤は血液脳関門がある脳への輸送が困難である。そのため、中枢神経疾患の治療が困難となっている。このための研究の一つが血液循環を用いない嗅覚輸送による輸送方法がある。薬剤を直接或いは有機小胞に入れ鼻腔内に投与方法である。本申請では薬剤を目的タンパク質に結合した形での投与方法による脳への薬剤輸送系の構築を目指す。



匂い分子結合タンパク質と結合した低分子の立体構造モデル

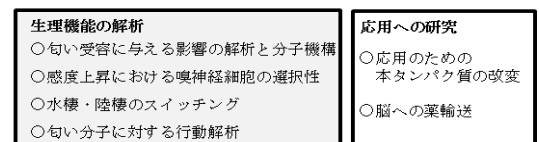
2. 研究の目的

嗅粘液層に存在し、匂い分子と結合する匂い分子結合タンパク質のまだ解明されていない生理的役割を解明し、本タンパク質を用いた脳への薬剤輸送系の確立のための基盤研究を行う。

(本研究計画)

匂い分子結合タンパク質の生理機能解析

匂い分子結合タンパク質の応用への基盤研究 の2つの研究を平行して行う。



匂い分子結合タンパク質の生理機能の解析とドラッグ・デリバリーへの応用

3. 研究の方法

匂い分子結合タンパク質の生理機能の解明とその分子機構の解析

アカハライモリの嗅上皮切片を用いて Ca^{2+} イメージング法により嗅神経細胞の匂い受容に与える影響を以下の点に注目して解析した。

1 嗅神経細胞に与えた影響 2 その分子機構

3 水棲・陸棲での本タンパク質の分布のスイッチングを時間軸に注目し免疫組織学的染色法を用いて解析する。

4 匂い分子の生理的役割をY字迷路を用いて解析する。

本タンパク質を用いた脳への薬剤輸送系の確立のための基盤研究を以下の点に注目して解析した。

1 ドラッグ・デリバリーに用いるため本タンパク質の分子選択機構を部位特異的変異体を作成しその結合特性変化を解析することでその結合機構を解明し薬剤が結合出来る変異体の作製を行う。

2 嗅覚輸送による脳への薬輸送への応用を検討するため本タンパク質をマウスの鼻腔に投与し脳での分布を免疫組織学的染色法を用いて解析する。

3 嗅覚輸送による治療実験のためアルツハイマーの初期症状である嗅覚障害マウスを作成し、そのマウス脳への影響を免疫組織学的染色法を用いて解析をおこない、記憶障害と嗅覚障害は行動学実験により解析を行う。

4. 研究成果

匂い分子結合タンパク質の生理機能の解明とその分子機構の解析

イモリから単離している2種類のCp-Lip1とCp-Lip2を用いて嗅神経細胞の匂い受容に与える影響を解析した結果、Cp-Lip1では感度上昇を示すことが見られたがCp-Lip2では見られなかった。また、Cp-Lip1で見られた影響はすべての細胞に見られたわけではなく選択的に感度上昇が見られた。これらのことからCp-Lip1は嗅粘液層に存在し嗅神経細胞の匂い受容感度を上げていることがわかったが、Cp-Lip2ではこの機能ではなく他の機能おそらく匂い分子の除去機能に関わっている可能性が考えられる。

Cp-Lip1の匂い感度上昇に関わっているCp-Lip1内の領域を解析した。まず初めに匂い分子に結合する領域であるN末端から106アミノ酸残基までのタンパク質を作成しこれを用いてCa²⁺イメージング法により嗅神経細胞に与える影響を調べた結果、嗅神経細胞の匂い受容に影響を与えなかった。これはこの匂い分子結合領域には関与する領域はないことを意味している。そこでC末端側40アミノ酸を2次構造などを考慮に入れて4種類のペプチドを作成した。これを用いてCp-Lip1の機能にどのように影響するかを解析した。その結果、C末端側にある α ヘリックスを形成していると思われる10残基のペプチドがCp-Lip1の機能を阻害したが、その他の3つのペプチドでは阻害は見られなかった。以上のことからCp-Lip1による嗅神経細胞の匂い受容感度上昇にはこの α ヘリックスの領域が関与していることが分かった。

水棲・陸棲でのCp-Lip1とCp-Lip2タンパク質の分布変化の違いがあるのかを解析した結果、Cp-Lip1では水棲・陸棲時ともに発現細胞である粘液を分泌するボウマン腺の細胞でのシグナルは見られた。また、生理機能を有する粘液層での分布を解析した結果、水棲時では粘液層にはCp-Lip1の分布は見られなかったが、陸棲時では粘液層にタンパク質のシグナルは確認できた。また、水棲時から陸棲時への粘液層での分布変化は陸棲10分程度あることも分かった。陸棲から水棲時への分布変化は5分以内には分布変化が起こることも明らかにした。これらのことからCp-Lip1の生理機能は両生類が陸棲生活に対応できるように獲得した機能であると推測された。一方、Cp-Lip2ではCp-Lip1で見られた水棲時・陸棲時間での違いは見られずどちらの場合も発現細胞であるボウマン腺細胞と嗅粘液層および鋤鼻神経がある粘液層に分布が見られた。この結果は上記したCp-Lip2の機能が匂い分子の除去機能に関わっていることを示唆している可能性が推察される。

匂い分子の生理的な役割を解析した結果、Cp-Lip1に結合できる匂い分子(ピラジン系化合物・ベンゼン系化合物)のほとんどは忌避行動を誘発することを示した。ピラジン系化合物はオオカミなどの尿に含まれていることが知られておりシカなどの草食動物が忌避行動を起こすことが分かっている。これらのことはアカハライモリが陸棲生活を行う際、Cp-Lip1を粘液層に分泌することで捕食動物から身を守るために獲得した機能であると推測される。

本タンパク質を用いた脳への薬剤輸送系の確立のための基盤研究

Cp-Lip1タンパク質の匂い受容機構を解析するため立体構造をもとに11種の変異体を作成した。これらすべての変異体において5グループの匂い分子約40種の匂い分子の結合特性に与える影響を解析した。その結果、樽型構造をもつCp-Lip1はその内腔にあるアミノ酸残基で匂い分子の側鎖の塩基性・酸性・疎水性を認識しており内腔の入り口付近でベンゼン環などの環構造を認識している結果が得られた。本来Cp-Lip1は鎖式炭化水素構造をもつ匂い分子とは結合しないが内腔の入り口に陽電荷をもつリジン・アルギニンを配置することで鎖式炭化水素とも結合できかつベンゼン系化合物でも結合できなかった基本構造であるベンゼンとも結合できるようになった。この変異体は本研究で用いた40種すべての匂い分子と μ Mオーダーの結合親和性を示した。この変異体を用いて薬剤を脳へ運ぶキャリアーに用いることができると考えた。

Cp-Lip1をマウス鼻腔に投与し30分後に脳を抽出し凍結切片を作成した。この切片を調製した抗Cp-Lip1抗体と神経細胞マーカーである抗 β チューブリン抗体を用いて解析した結果、記憶をつかさどる海馬領域全体に均一に分布しており抗 β チューブリン抗体のシグナルともよく一致した。また、海馬の周辺領域でも同じようにシグナルは見られたが大脳脂質ではほとんどシグナルは見られなかった。また、小脳においてもCp-Lip1のシグナルは確認できた。現在は前後も時間での分布変化を解析中である。これらの結果はアルツハイマー病などの記憶疾患で見られる海馬領域での萎縮治療への可能性を示していると考えている。

Cp-Lip1を薬剤キャリアーとして用いた脳へのドラッグデリバリー系への可能性を解析するために本研究ではアルツハイマー病の初期症状である嗅覚障害に注目した。そこで嗅覚障害マウスの作成を試みた。これまでに嗅覚障害マウスの作成は拘束などの慢性ストレスを与えることで作成されていたがその効率は悪かった。本研究では拘束と水没を組み合わせた慢性ストレスを与えることで7割程度の確率で嗅覚障害マウスを調製できた。嗅覚障害の有無は行動実験より確認した。また、空間記憶への影響を解析するため水迷路とY字迷路を用いて解析した。慢性ストレスを与えることで軽度ではあるが記憶障害を示す結果も得られた。記憶障害が得られたマウスの脳の凍結切片を作成し核染色と神経細胞マーカーである抗NeuN抗体を用いて海馬領域へ与える影響を解析した。その結果、健常マウスの海馬CA1領域での細胞数には影響見られなかったが細胞間が狭まっていることが見られた。そこでCA1領域の細胞層の幅を比較した結果、嗅覚障害マウスでは健常マウスの海馬CA1の細胞層の約半分になっておりこの領域での萎縮が見られた。また、CA1の下にある放線層にあるグリア細胞数が健常マウスの70%程度に低下していた。これらの海馬での影響と軽度の記憶障害を考慮するとこの海馬でのストレス

による変化は萎縮の初期段階である可能性が考えられる。現在は、ストレスを与えるマウスの週齢と慢性ストレス期間を与えることでの嗅覚障害マウスへの影響を解析中である。並行して嗅覚障害マウスの治療を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

森 俊毅・石澤祐太郎・杉本弘文・岩佐達郎・澤田 研、匂い分子結合タンパク質 Cp-Lip 1 による嗅神経細胞の匂い分子受容感度の上昇の分子機構の解析 日本味と匂学会誌, 査読有, 2017、101 ~ 102

石澤祐太郎・皆森俊毅・梅田直之・杉本弘文・小山瑠衣・岩佐達郎・澤田 研、嗅神経細胞の匂い分子選択性は、匂い分子結合タンパク質の選択性と類似する 日本味と匂学会誌, 査読有, 2017、107 ~ 110

上野山 修平・石澤 佑太郎・本間 優一・梅田 直之・澤田 研、アカハライモリ嗅上皮での匂い分子依存的な嗅神経細胞の分布 日本味と匂学会誌, 査読有, 2018、33 ~ 34

大村 勇人・金沢 裕美・鳥井 綾乃・杉本 弘文・澤田 研、水棲時と陸棲時でのアカハライモリの匂い分子結合タンパク質の嗅上皮での分布の違い 日本味と匂学会誌, 査読有, 2018、35 ~ 38

遠藤 翔太・上野山 修平・石澤 佑太郎・梅田 直之・澤田 研、アカハライモリの嗅神経細胞の分布 日本味と匂学会誌, 査読有, 2018、31 ~ 32

〔学会発表〕(計4件)

Syuhei Uenoyama, Toshiki Minamori, Yutaro Ishizawa, Tatsuo Iwasa and Ken Sawada, Analysis of the molecular mechanism of increase of sensitive of odorant response in olfactory neuron cell by odorant binding protein, JSED2018, 2018

Toshiki Minamori, Hirofumi Sugimoto, Tsukasa Takahashi, Tatsui Iwasa, Ken Sawada, Biochemical chracterization and function of Cp-Lip1 in Japanese common Newt, JSED2017, 2017

皆森 俊毅・石澤 祐太郎・杉本 弘文・岩佐 達郎・澤田 研, 匂い分子結合タンパク質 Cp-Lip 1 による嗅神経細胞の匂い分子受容感度の上昇の分子機構の解析 日本味と匂学会 第51回大会, 2017

石澤 佑太郎・皆森 俊毅・梅田 直之・杉本 弘文・小山 瑠衣・岩佐 達郎・澤田 研, 嗅神経細胞の匂い分子選択性は、匂い分子結合タンパク質の選択性と類似する 日本味と匂学会 第51回大会, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。