

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580358

研究課題名（和文）p53ファミリーによる嗅覚器発生の制御

研究課題名（英文）Control of the olfactory organ development by p53 family members

研究代表者

中牟田 信明（NAKAMUTA NOBUAKI）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：00305822

研究成果の概要（和文）：本研究では嗅覚器の発生における p53 ファミリーの機能を解明するため、嗅覚器の *in vitro* 培養系において p53 ファミリー遺伝子の発現を抑制する実験を行い、組織を構成する細胞の増殖や細胞死、遺伝子発現、および形態に及ぼす影響を調べた。その結果、p53 ファミリーはメンバー同士が互いに協力しながら嗅覚器の発生に関わる遺伝子発現を調節し、鋤鼻ニューロンと嗅覚ニューロンの分化や増殖を誘導することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of p53 families in the development of olfactory organs, we cultured olfactory organs, repressed the p53 family gene expression *in vitro*, and investigated the effects on the cellular proliferation, death, gene expression, and morphology. Results in this study suggest that p53 family members coordinately regulate the expression of genes involved in the development of olfactory organs and induce the differentiation and proliferation of the olfactory cells and the vomeronasal receptor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：発生・分化、嗅覚器、p53

## 1. 研究開始当初の背景

(1) p53 ファミリーは p53、p63、p73 と呼ばれる 3 つのメンバーからなる転写因子ファミリーである。p53 ファミリーの各メンバーには共通した働きがあり、ストレスに対する細胞の応答や、個体の発生過程において、p53 ファミリーは重要な役割を果たすと言われている。しかし、個々のメンバーにはそれぞれ

れ固有の働きがあり、中でも p73 は嗅覚器にとって重要である。p73 ノックアウトマウスはフェロモン受容に障害をもち、そのため、生殖器には異常が無いにもかかわらず、雌雄ともに生殖能力を欠くことが知られている。さらに、p73 ノックアウトマウスにおける脳の成長を調べると、生後間もない時期は正常マウスと変わらないが、生後 14 日頃からア

ポトーシスの亢進や細胞数の減少、脳室の拡張等が起こる。このような特徴は、p53 ノックアウトマウスが正常に発生し繁殖可能なことや、p63 ノックアウトマウスが四肢、顔面、表皮の発生に異常を示し、生後間もなく死亡するのと全く異なっている。

(2) 嗅覚器の発生は、マウスやラットで胎生 10 日頃、頭部の前外側部に上皮の肥厚が生じることによって始まる。肥厚した部分は嗅板と呼ばれ、やがて嗅板は凹んで鼻窩となり、左右の鼻窩が正中へ向かって移動するにつれて鼻中隔が生じる。鼻窩は後方へ深く陥入して鼻腔となり、鼻腔の後方部からは嗅上皮が、鼻中隔に溝が生じ、それが閉じてつくられる管からは鋤鼻器が分化する。鋤鼻器の鋤鼻感覚細胞や嗅上皮の嗅細胞は、それぞれ樹状突起の先端に微絨毛や線毛を生じ、軸索を終脳の嗅球へ伸ばすが、その一方で、嗅覚器の発生過程では多くの細胞がアポトーシス細胞死を起こしている。すなわち、嗅覚器では発生に伴う上皮のダイナミックな形態形成と細胞の分化過程、そして細胞死が同時に進行している。

(3) ラットの組織における p53 ファミリーの発現を免疫組織化学等によって解析したところ、発生初期の嗅覚器には p53 ファミリーのメンバーが全て発現し、それらの内あるものは組織内で共局在し、またあるものは相互に補完するような分布を示していた。p53 ファミリーの発生における役割を解明するにはいくつかの条件を満たす器官・組織を材料に用いる事が不可欠である。すなわち、発生過程において p53 ファミリーのメンバーを全て発現すること、細胞が特徴的な形態を現し分化マーカーが明らかになること、遺伝子発現に関する情報が豊富であること、等である。そこで我々は、これらの条件を満たす発生初期の嗅覚器を培養して p53 ファミリーの発現を抑制し、それらが発生において本来果たしている役割を明らかにする研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

様々な動物の嗅覚器に関する形態学的研究は数多くあったが、嗅覚器、特に鋤鼻器を構成する細胞の発生運命を決定する因子の実体に関する報告はわずかしかない。嗅覚器の発生には、様々な遺伝子が関わっていると予想されるが、Pax 6、Mash 1、Neurogenin 1、Lhx 2、Neuro D、NSCL 1、Hes 1、Hes 5、Hes 6、Notch 1、Notch 2、IGF、BDNF、NGF、TGF-beta、GDNF 等、幾つかの転写因子、膜タンパク質、成長因子の発現が in situ ハイブリダイゼーションや免疫組織化学

によって示され、各遺伝子のノックアウトマウスに見られる表現型もそれを裏付けている。しかし、転写因子である p53 ファミリーとこれらの遺伝子発現との関係を調べた研究はこれまで全くなかった。そこで本研究では嗅覚器の発生に関わるこれらの遺伝子のうち、p53 ファミリーによって発現調節を受けているのはどれかを精査し、嗅覚器の発生に関わる遺伝子カスケードの中で p53 ファミリーの占める位置を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 概要

初年度には胎生ラットから採取した鋤鼻器を副嗅球と共培養して実験に用いた。遺伝子発現の抑制は、培養液中へ p53 ファミリーの各遺伝子に対するアンチセンス塩基配列をもったオリゴヌクレオチドを添加することで行った。数日間培養した後、ウェスタンブロッティングと蛍光免疫染色によって細胞に含まれる p53 ファミリーのタンパク質が減少するかを調べた。その後、細胞の各種分化マーカーと嗅覚器の発生に関わる遺伝子の発現、細胞増殖、アポトーシス、微絨毛の発達、軸索の伸長等を指標として、p53 ファミリー遺伝子の発現抑制による影響を多面的に評価した。次年度以降は鋤鼻ニューロンを用いた研究と並行して、嗅上皮と主嗅球の共培養系を同様の方法で作製し、p53 ファミリー遺伝子の発現抑制を行って鋤鼻培養系との比較を行った。

### (2) 平成 21 年度

① 鋤鼻器と副嗅球の共培養系の確立:実験には、胎生ラットから採取した鋤鼻器を副嗅球と共培養して得られる鋤鼻ニューロンを用いた。まず胎生ラットから鋤鼻器を微小なハサミで切り出し、酵素処理によって周囲の余分な組織を取り除いた後、ピペッティングで機械的に分散し、フィーダー細胞上で培養した。鋤鼻培養細胞による細胞塊が形成されたら、次にそれを培養副嗅球細胞上へ移植した。副嗅球細胞はあらかじめ胎生ラットから副嗅球部分をハサミで切り出して培養しておいた。

② 共培養系を生化学的・形態学的に評価する基準の確立:細胞種の同定や軸索の観察のため、細胞特異的マーカータンパクに対する抗体を用いて蛍光染色を行った。汎ニューロンマーカーである protein gene product 9.5 (PGP 9.5)や嗅覚ニューロンマーカーである olfactory marker protein (OMP)、olfactory cell adhesion molecule (OCAM)、グリア細胞マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)、S100 protein 等の蛍光免疫

染色によって、培養細胞の形態を明確にし、細胞種を同定した。さらに、嗅覚器の発生に関与することが示唆されている成長因子等の発現を、*in situ* ハイブリダイゼーションや蛍光免疫染色、RT-PCR等によって検出した。細胞の形態は光学顕微鏡だけでなく、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡によって観察した。アポトーシスによる細胞死はTUNEL法によって、増殖細胞はBrdU法によって、それぞれ検出した。

③ p53ファミリー遺伝子の発現抑制:鋤鼻器と副嗅球の共培養系を用いて、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるp53ファミリー遺伝子の発現抑制実験を行った。陰性対照には、オリゴヌクレオチドを加えずに培養した無処置群と、遺伝子発現抑制作用の無い mismatch配列を含んだアンチセンスオリゴヌクレオチド、ないし、センス配列のオリゴヌクレオチドを添加して用いた。遺伝子発現がアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑制され、タンパク質レベルの発現量が低下することは、特異的抗体を用いた蛍光免疫染色とウェスタンブロットによって確かめた。各遺伝子の発現抑制に必要なオリゴヌクレオチド濃度や培養日数等の条件を決定した。

#### (3) 平成22年度以降

① p53ファミリー遺伝子の発現抑制による影響の評価:p53ファミリー遺伝子の発現抑制による影響は、初年度に確立した共培養系の生化学的・形態学的指標を用いて評価した。細胞特異的マーカーと嗅覚器の発生に関わる遺伝子の発現は、*in situ* ハイブリダイゼーションや蛍光免疫染色、RT-PCR等によって解析した。細胞の形態は光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡によって観察した。アポトーシスによる細胞死はTUNEL法によって、増殖細胞はBrdU法によって、それぞれ検出した。

② 嗅上皮と主嗅球の共培養系の確立とp53ファミリーの発現抑制による影響の評価:鋤鼻ニューロンの場合と同様にラットの胎子から嗅上皮と主嗅球を採取して共培養系を確立し、アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加して培養を行い、分化マーカーや発生に関わる遺伝子の発現、細胞増殖、アポトーシス、線毛の発達、軸索の伸長等を指標として、p53ファミリー遺伝子の発現抑制による影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 嗅覚器を培養してp53ファミリー遺伝子の発現を抑制し、鋤鼻ニューロンと嗅覚ニューロンに対する影響を調べることが可能になった。生化学的および形態学的手法を用いて、p53ファミリーの発現抑制による影響を解析した結果、嗅覚器の発生に関わる遺伝

子カスケードの中でp53ファミリーの占める位置が完全に明らかになった訳ではないが、p53ファミリーのメンバーが互いに協力しながら嗅覚器の発生に関わる遺伝子発現を調節し、鋤鼻ニューロンと嗅覚ニューロンの分化や発生に伴う形態の変化、細胞死が誘導されることが示唆された。

(2) p73ノックアウトマウスにおけるフェロモン受容障害の原因は、鋤鼻器におけるフェロモンレセプターV1RおよびV2Rの発現消失により起きると考えられているが、それらとp73遺伝子欠損との間に直接的な因果関係を証明することは出来ておらず、また、*in situ* ハイブリダイゼーションによって正常マウスの鋤鼻器と鼻腔上皮におけるp73の発現も示されたが、その意義に関しては不明なままである。

(3) 本研究では培養嗅覚器におけるp53ファミリーの遺伝子発現を抑制することによって、発現レベルが低下もしくは消失する遺伝子を特定し、p53ファミリーのメンバーが協力して嗅覚器の発生に関わる遺伝子発現を調節し、鋤鼻ニューロンと嗅覚ニューロンの分化や発生に伴う形態の変化、細胞死が誘導されるとの仮説を検証したが、データの一部は引き続き解析が必要であり、今後の課題である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Nakamuta, S., Nakamuta, N., Taniguchi, K. and Taniguchi, K. Histological and ultrastructural characteristics of the primordial vomeronasal organ in lungfish. *Anat. Rec.* 295 (2012) 481–491. 査読有り
- ② Nakamuta, S., Nakamuta, N. and Taniguchi, K. Distinct axonal projections from two types of olfactory receptor neurons in the middle chamber epithelium of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* 346 (2011) 27–33. 査読有り
- ③ Nakamuta, N., Yokoyama, N., Yamamoto, Y., Taniguchi, K. and Taniguchi, K.: Lectin histochemical analysis of the olfactory bulbs in the barfin flounder (*Verasper moseri*). *Anat. Histol. Embryol.* 39 (2010) 67–73. 査読有り

〔学会発表〕（計 11 件）

- ① 沖田敏朗、柏原篤、中牟田信明、谷口和之、ラットの嗅覚器におけるアクアポリン発現の免疫組織化学的解析、2012.3.27－2012.3.29、大宮ソニックシティ（埼玉県）
- ② 中牟田信明、p53 ファミリーと嗅覚器の発生について、平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会、2012.2.3－2012.2.5、札幌コンベンションセンター（北海道）
- ③ 長瀬大祐、遠藤大輔、中牟田信明、谷口和之、ラット胎子嗅上皮における p53 ファミリーの発現と局在、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010.3.26－2010.3.28、日本獣医生命科学大学（東京都）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中牟田 信明 (NAKAMUTA NOBUAKI)  
岩手大学・農学部・准教授  
研究者番号：00305822

### (2) 研究分担者

谷口 和之 (TANIGUCHI KAZUYUKI)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：70148089