

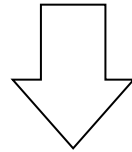
# 感覚受容細胞の研究を中心として

先進理工学専攻  
仲村厚志

## ニワトリの光受容蛋白質の解析

### ピノプシン

目以外の組織より同定された初めての光受容蛋白質  
(遺伝子クローニングは1994年)

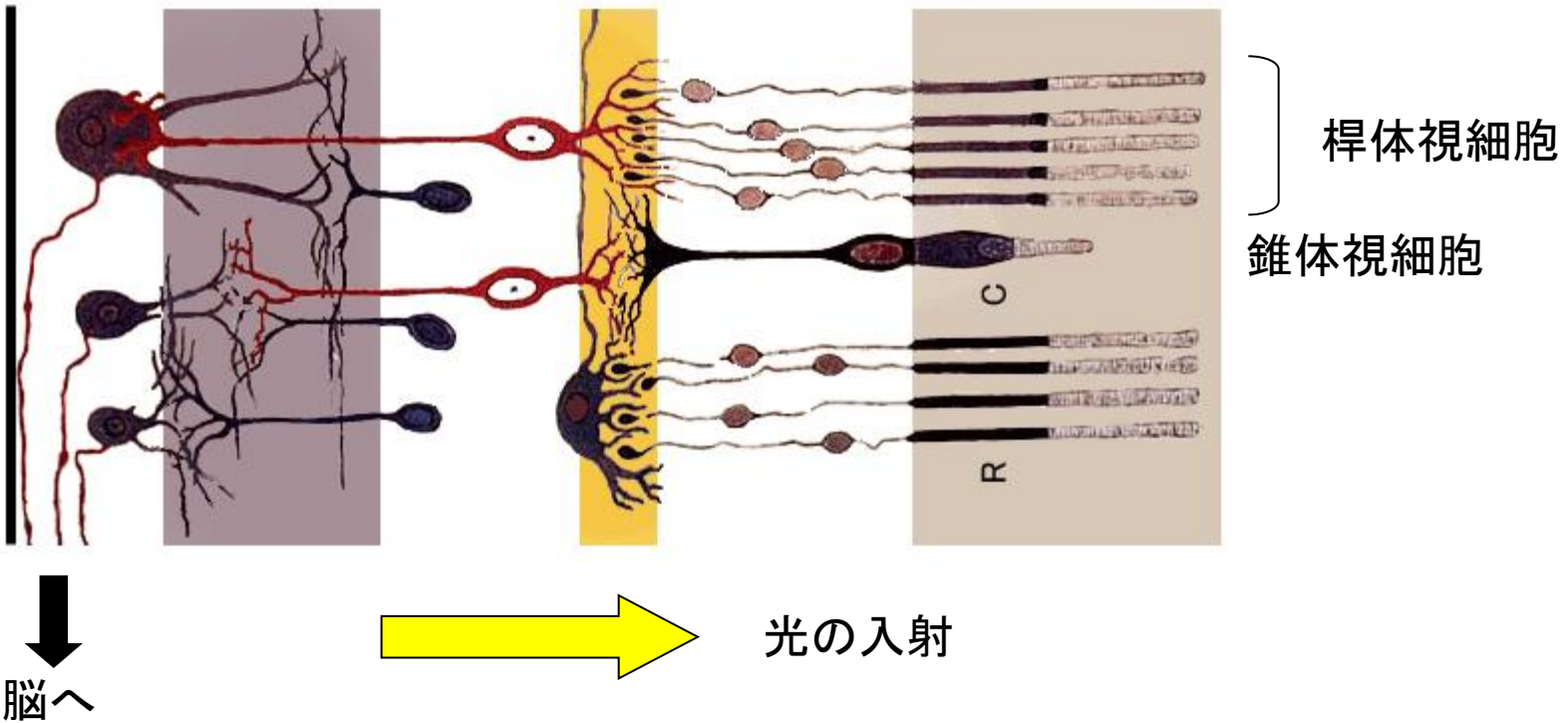
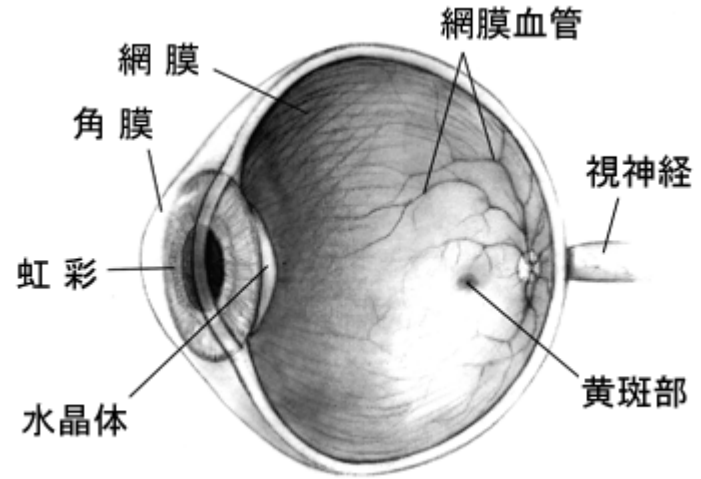


概日時計の光リセットを行っている可能性

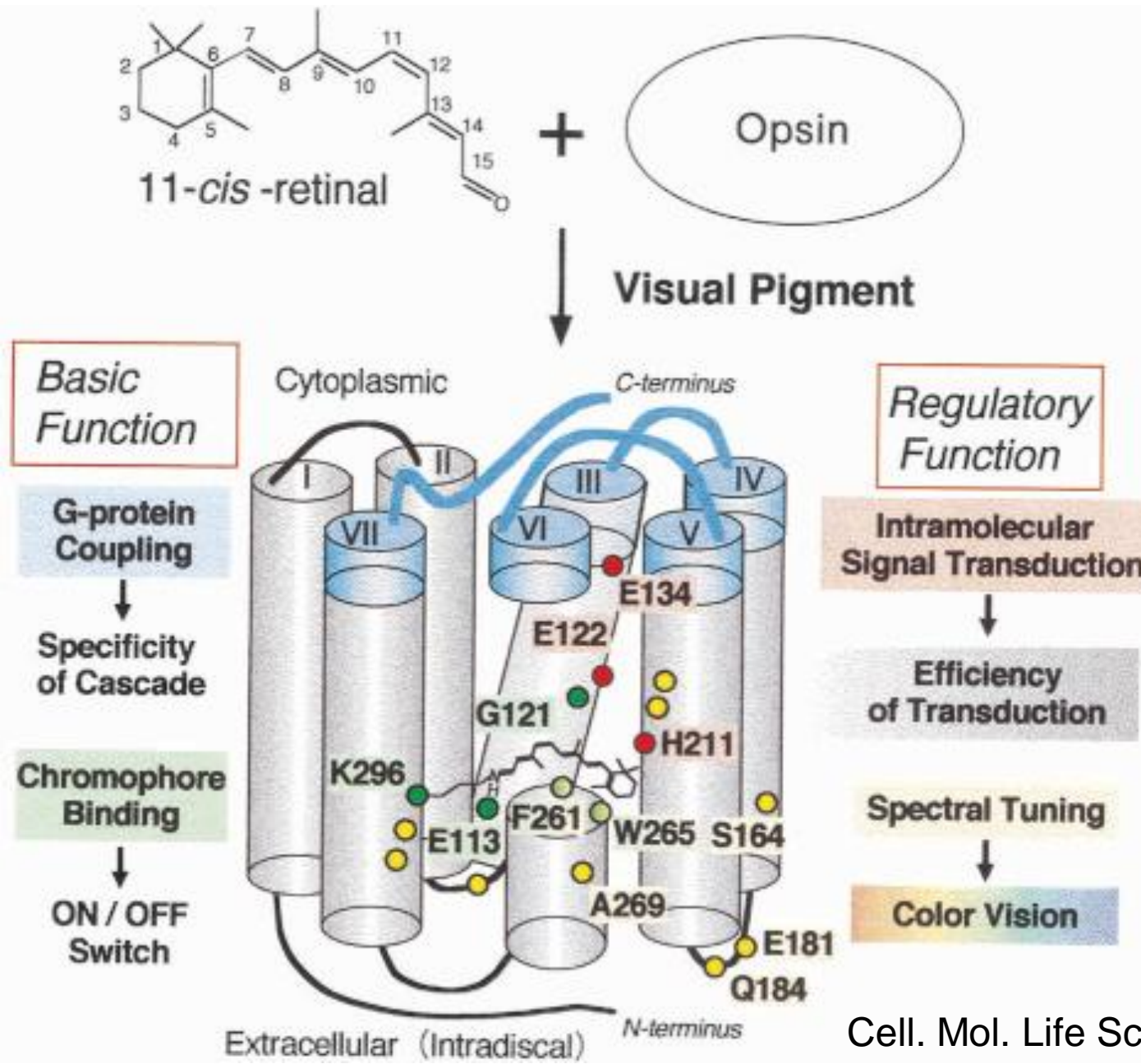


# 電通大着任前

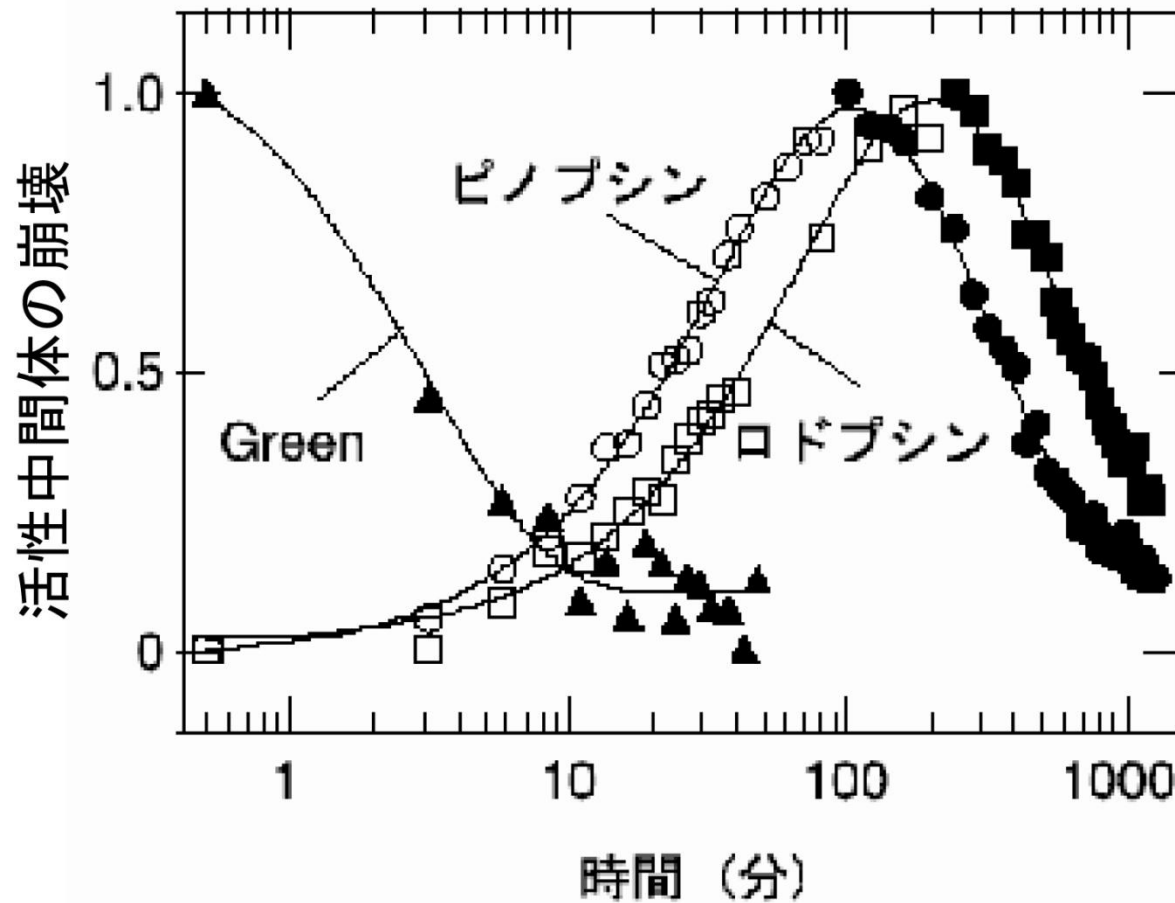
## ヒト網膜の構造



桿体と錐体の光受容蛋白質とは性質が大きく異なる  
⇒脳内光受容蛋白質であるピンプシンはどんな性質か？



# 電通大着任前

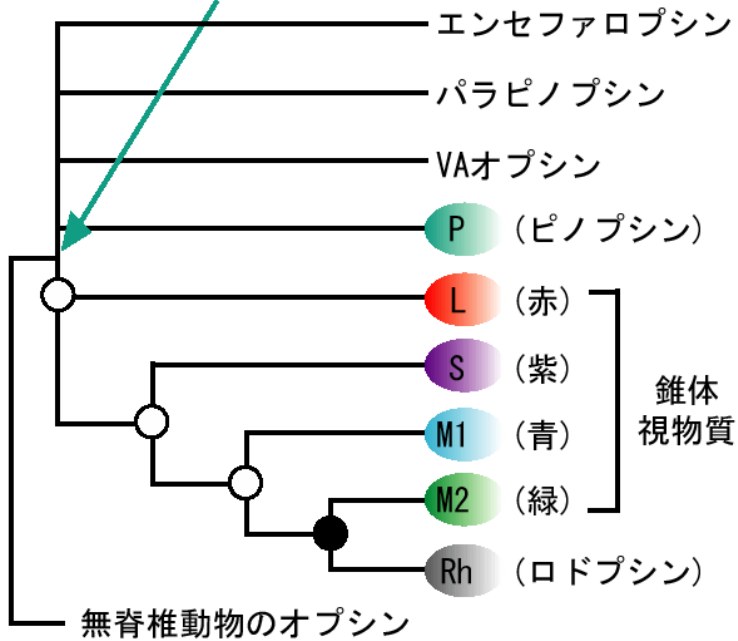


ピノプシンは桿体光受容蛋白質と同様に活性中間体の寿命が長い

# 電通大着任前

## 1. オプシンの系統関係

ピノプシンと錐体視物質の分岐



○ 錐体視物質間の分岐

● 錐体視物質とロドプシンの分岐

ピノプシンはロドプシンが錐体視物質から分岐する以前に祖先型のオプシンから分岐した

ロドプシンが出現する以前に活性化状態の長い光受容蛋白質が存在していた可能性がある

味覚、嗅覚  
新規遺伝子の探索

Differential screening

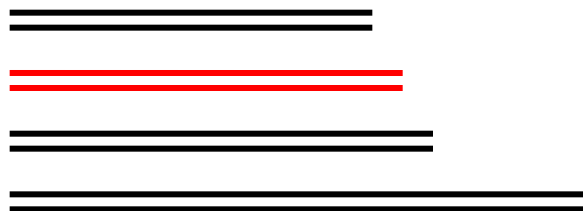
⇒ Differential Display法 (DD法) へ

## DD法の原理

調べたい組織・細胞

↓ 発現遺伝子の抽出

↓ PCR



基準となる組織・細胞

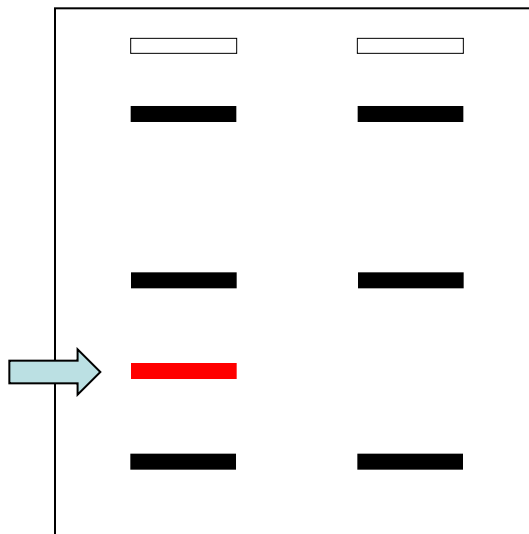
↓ 発現遺伝子の抽出

↓ PCR



調べたい  
組織・細胞

基準となる  
組織・細胞



調べたい組織・細胞  
に特異的な遺伝子

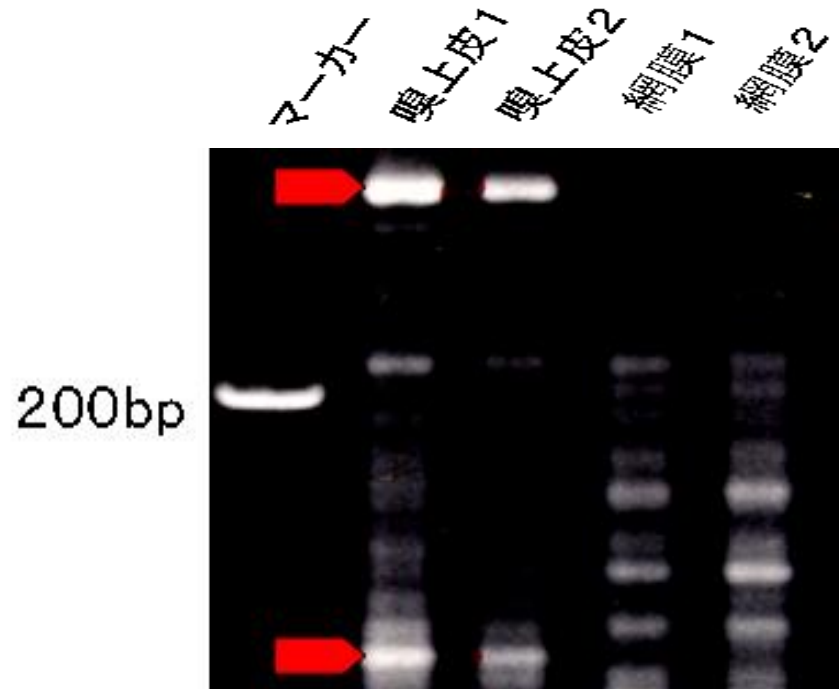


## 味覚

百を超える候補遺伝子を同定する  
も、その後の解析が進まず

## 嗅覚

調べたい組織として嗅上皮を、基準となる組織として網膜を用いた



DD法の泳動像(菅原, 2008)

80種類のプライマーセットを用い、嗅上皮特異的なバンドをクローン化

## 発現組織の解析結果例

Sample No.

No. 5



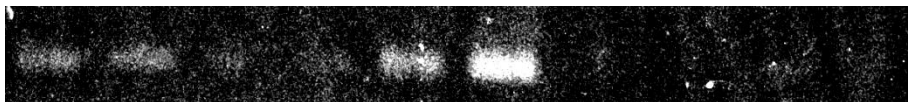
オス大脳    メス大脳    オス嗅球    メス嗅球    網膜    嗅上皮    オス肝臓    メス肝臓    腎臓    精巣

No. 126



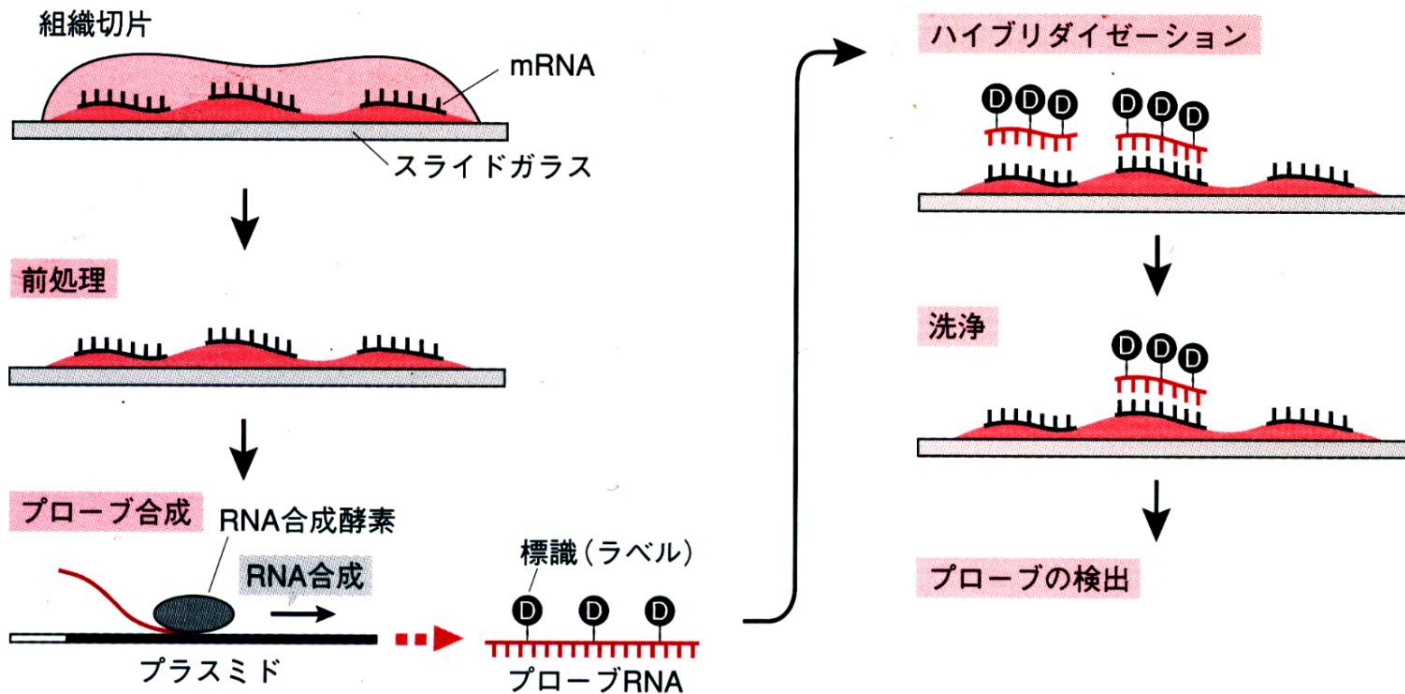
オス大脳    メス大脳    オス嗅球    メス嗅球    網膜    嗅上皮    オス肝臓    メス肝臓    腎臓    精巣

No. 139



オス大脳    メス大脳    オス嗅球    メス嗅球    網膜    嗅上皮    オス肝臓    メス肝臓    腎臓    精巣

## *In-situ* Hybridization法による局在の解析



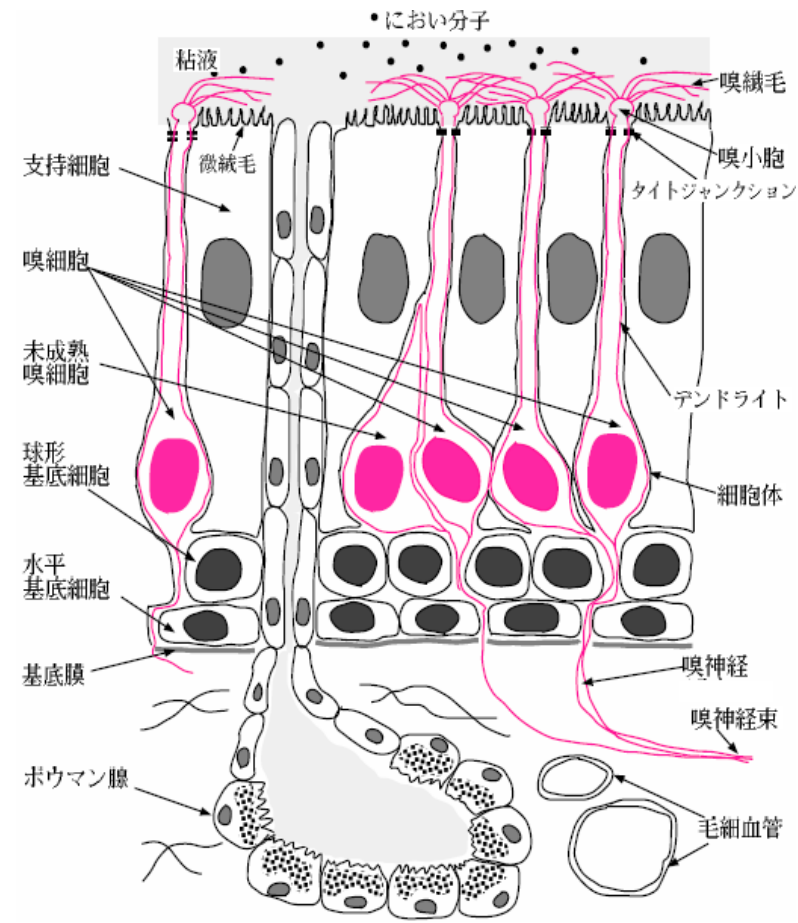
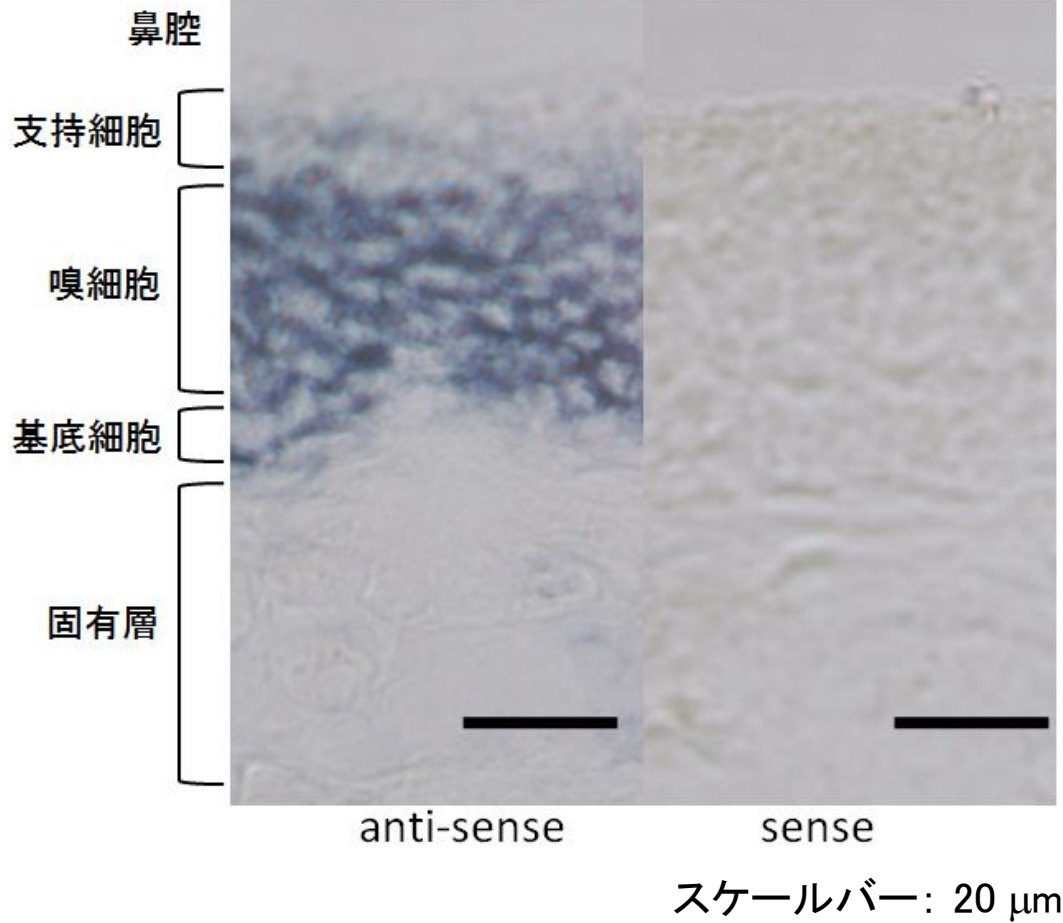
### *In situ* Hybridization法の原理

*In situ* Hybridizationは組織におけるmRNAを検出する方法  
→遺伝子の局在を調べることができる

嗅上皮のどの細胞において発現しているかを調べる

# 電通大着任後

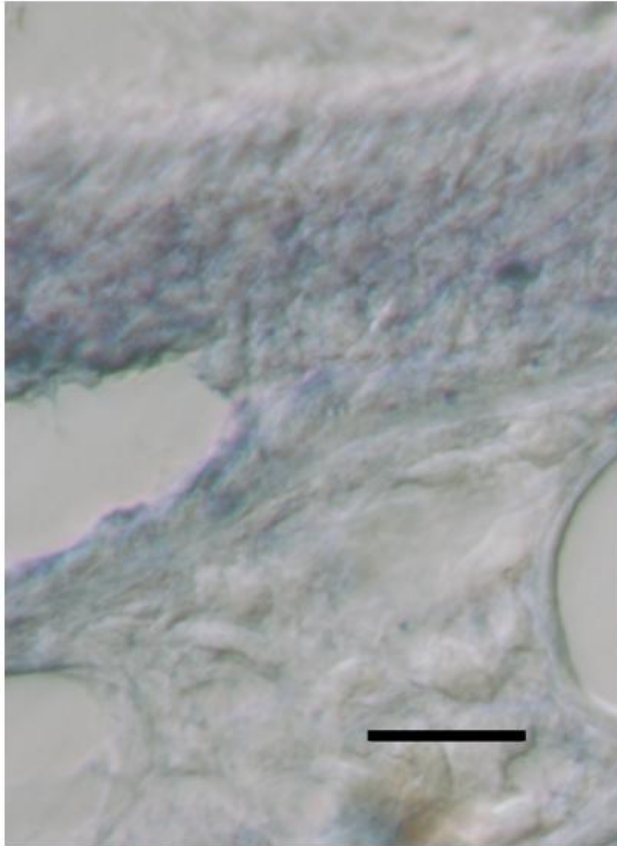
## Olfactory Marker Protein (OMP)



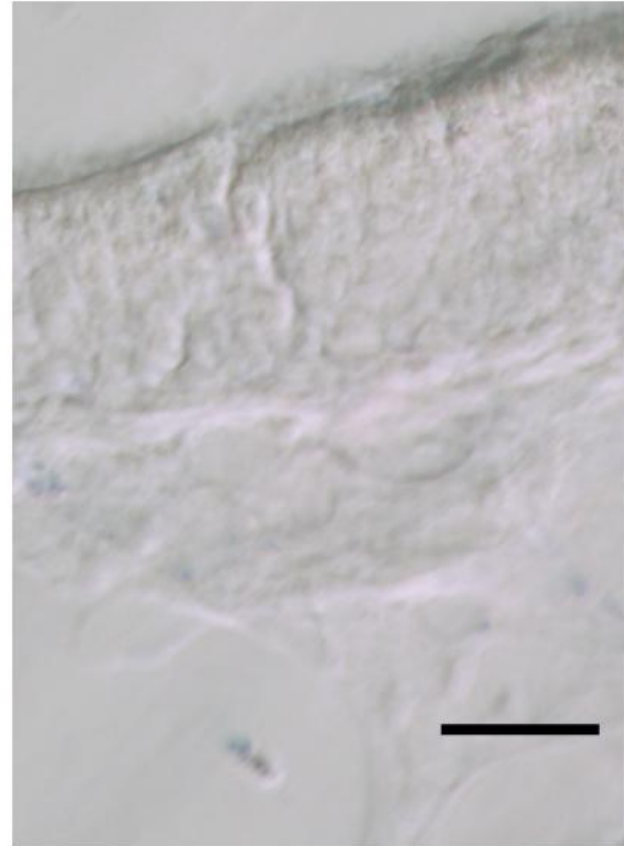
OMPは嗅細胞特異的に発現する

# 電通大着任後

嗅細胞



anti-sense

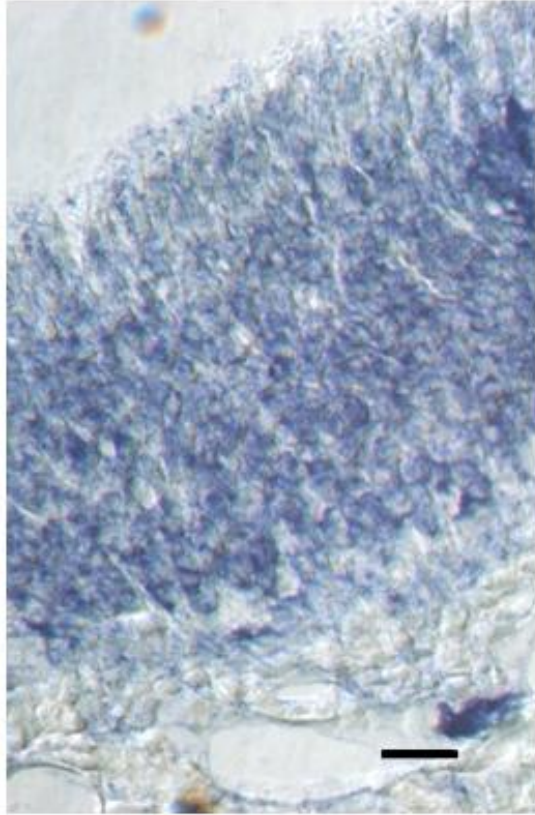


sense

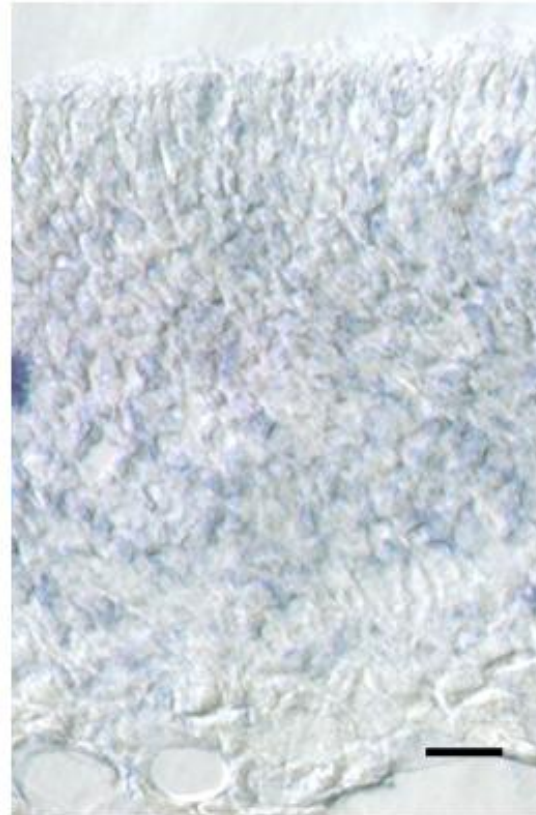
嗅細胞に発現

# 電通大着任後

嗅細胞



anti-sense

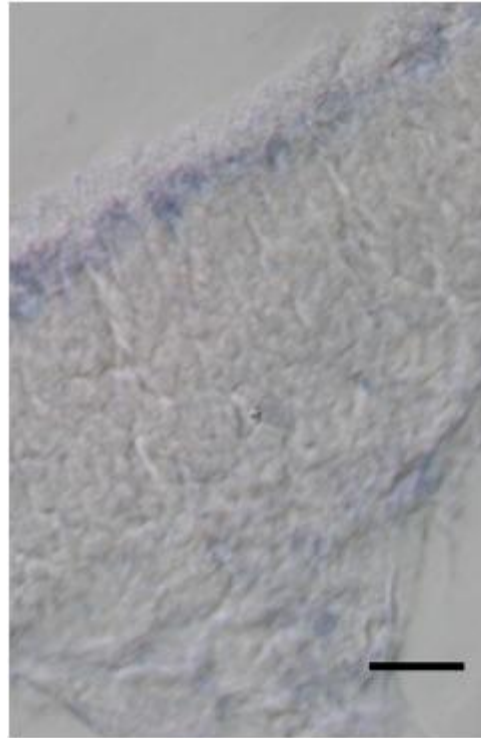


sense

嗅細胞に発現

# 電通大着任後

支持細胞



anti-sense



sense

支持細胞に発現

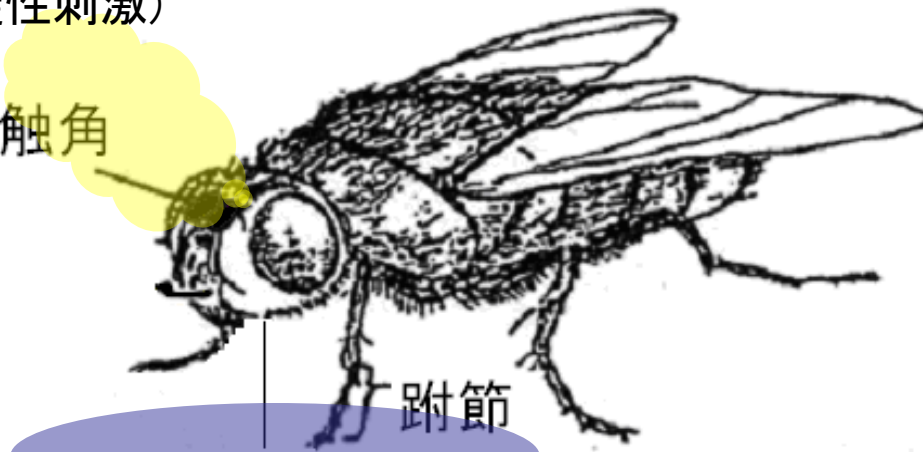


長期記憶成立時に発現量の変化する遺伝子を網羅的に探索することにより、長期記憶成立の分子メカニズムの解明を目指す。

## クロキンバエの嗅覚-味覚連合学習

リモネンの匂い  
(忌避性刺激)

触角



跗節

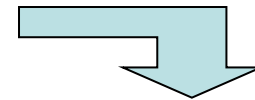
唇弁

シヨ糖溶液

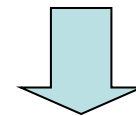
(嗜好性の食物)

吻伸展反射

条件付け1日後



シヨ糖溶液に対する  
食欲が減退した。



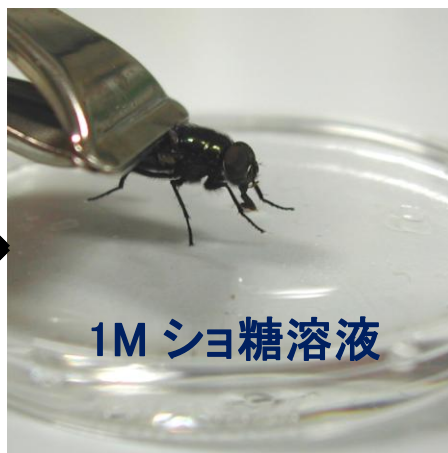
長期記憶成立

<条件づけ群>

× 5 (60 ± 10 s)



跗節にショ糖溶液を接触



吻伸展反射

× 5 (60 ± 10 s)

1 s



リモネンを近づける (10 s)

× 5 (60 ± 10 s)

<対照群>



跗節にショ糖溶液を接触



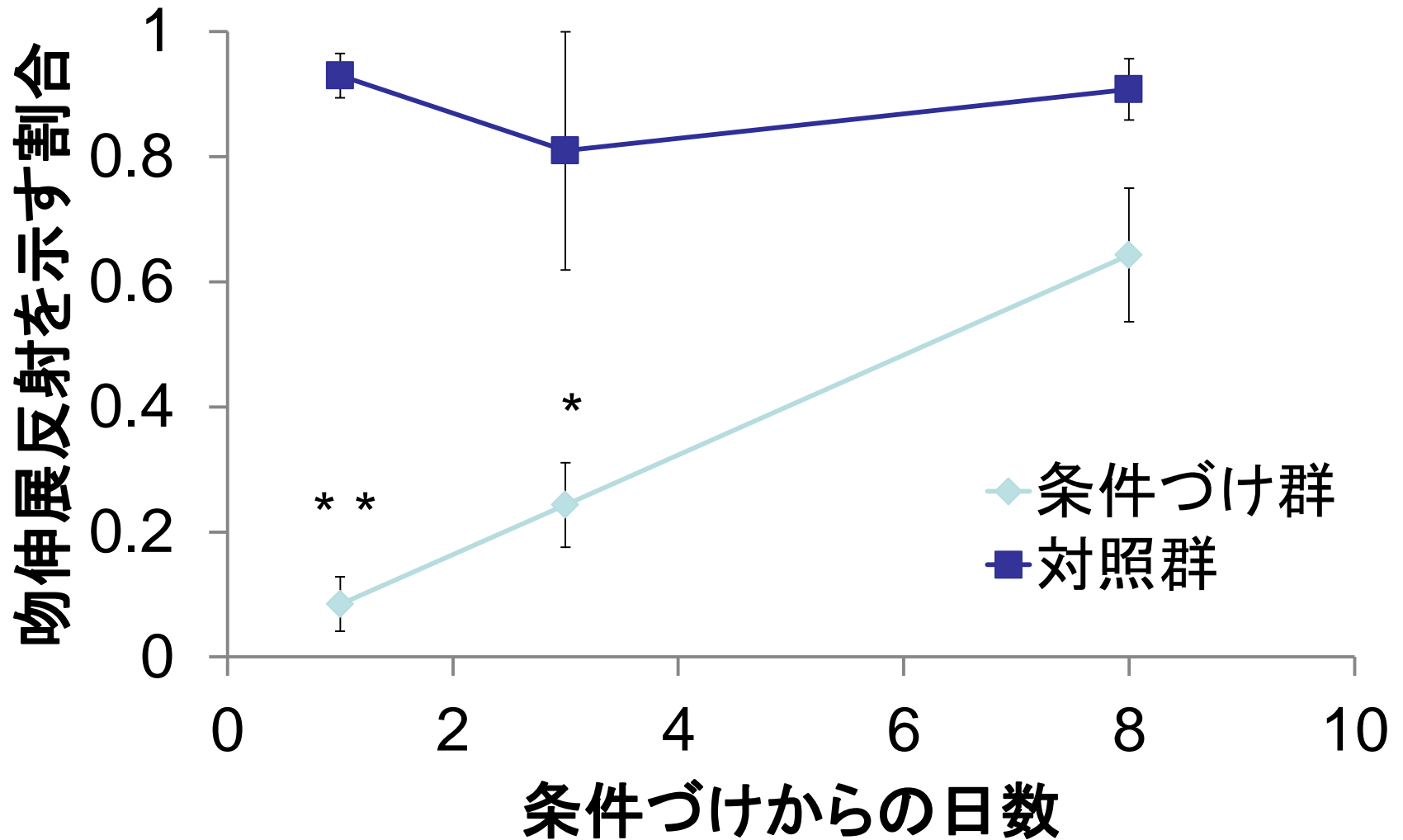
吻伸展反射

1 h



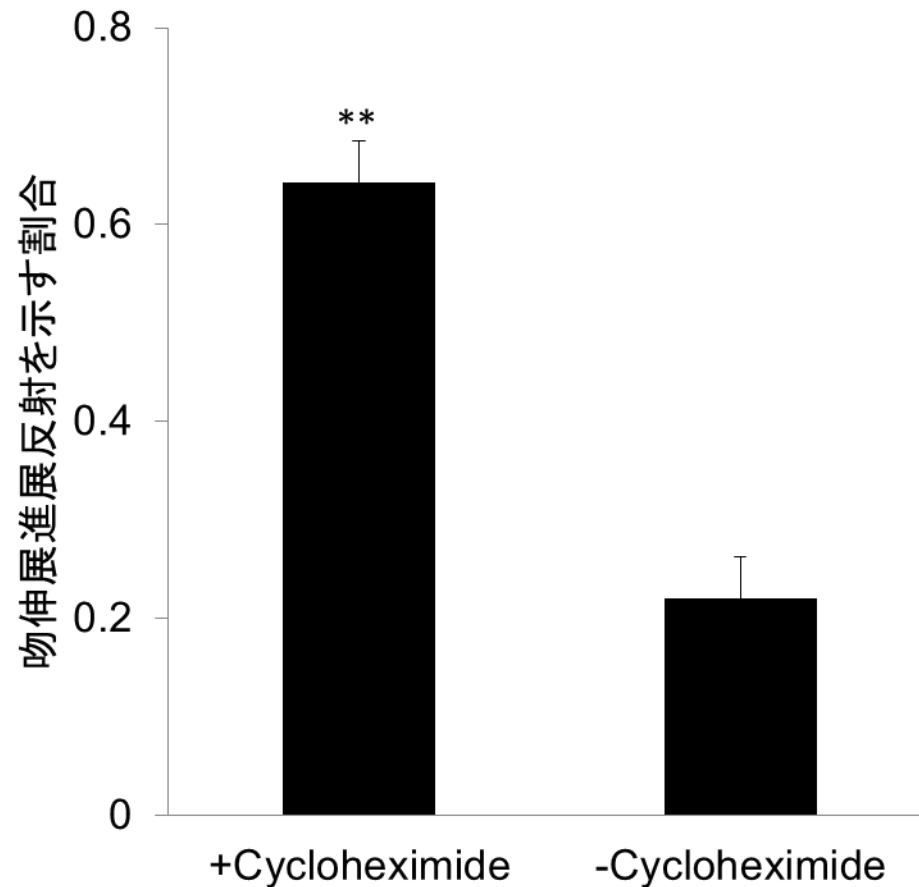
リモネンを近づける (10 s)

# 条件づけによる記憶保持期間



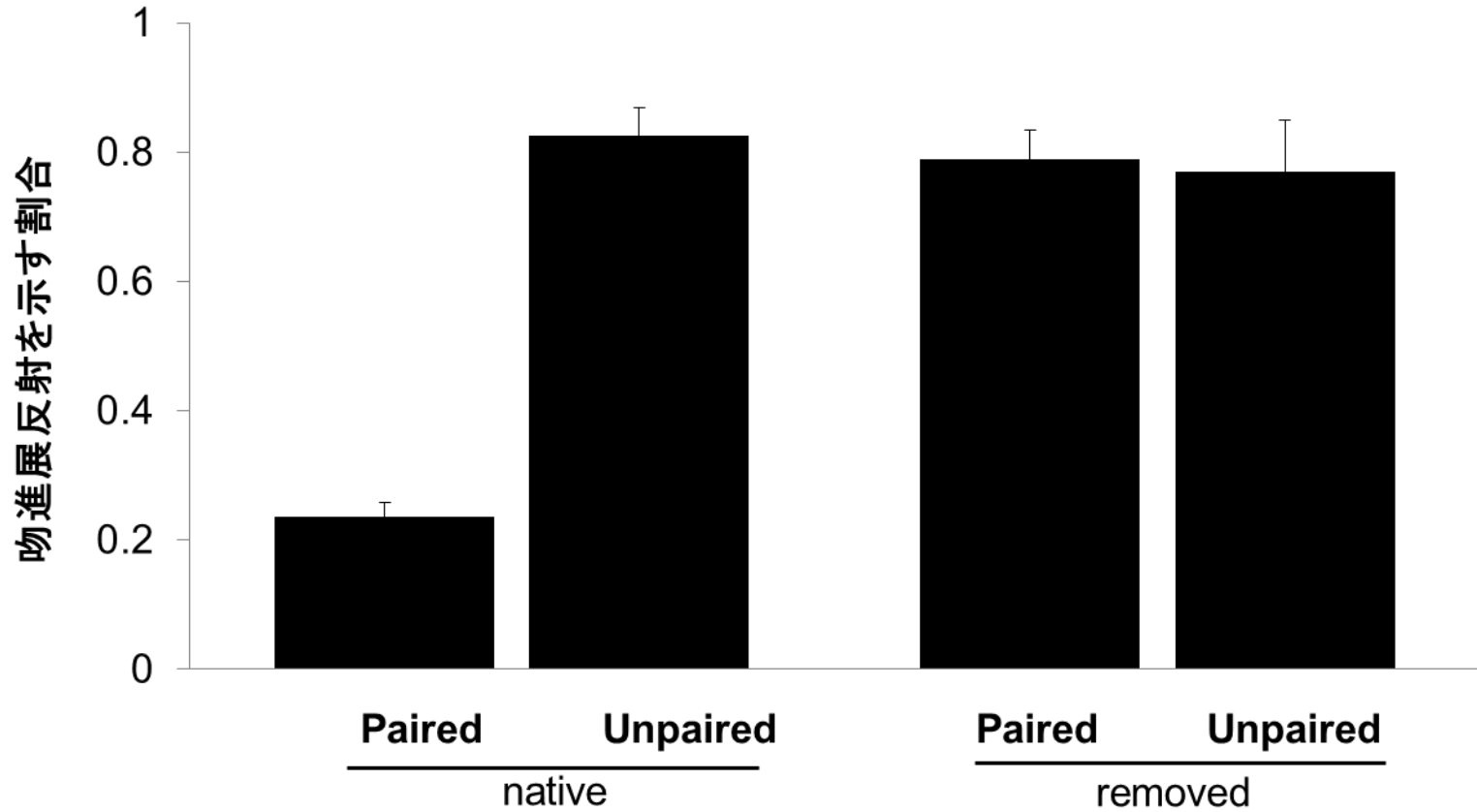
( $t$  検定、\*\*; $P < 0.01$ 、\*; $P < 0.05$ )

# 翻訳阻害剤の投与により、学習が阻害



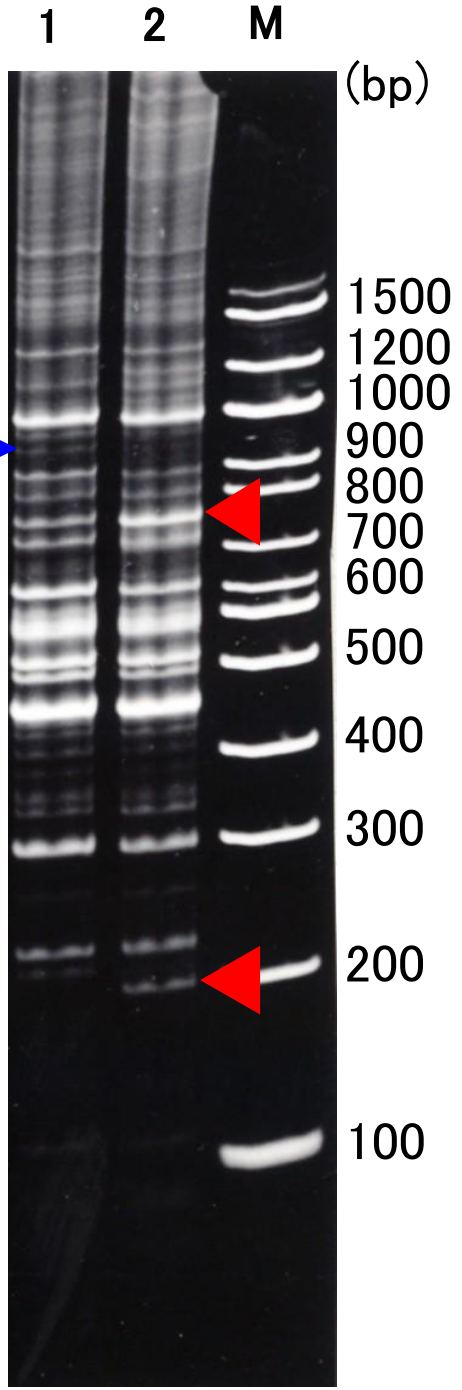
⇒ 遺伝子発現の必要な長期記憶

# 嗅覚器官の切除により学習が阻害



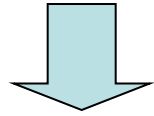
嗅覚味覚の連合学習による記憶形成

# < 発現遺伝子の比較 >

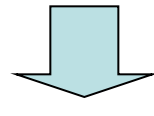


M: 100 bp DNA Ladder  
1: 対照群  
2: 条件付け群

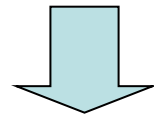
約3000本のバンドを比較した。



サンプル間でシグナル強度の異なる38本のバンドを検出できた。

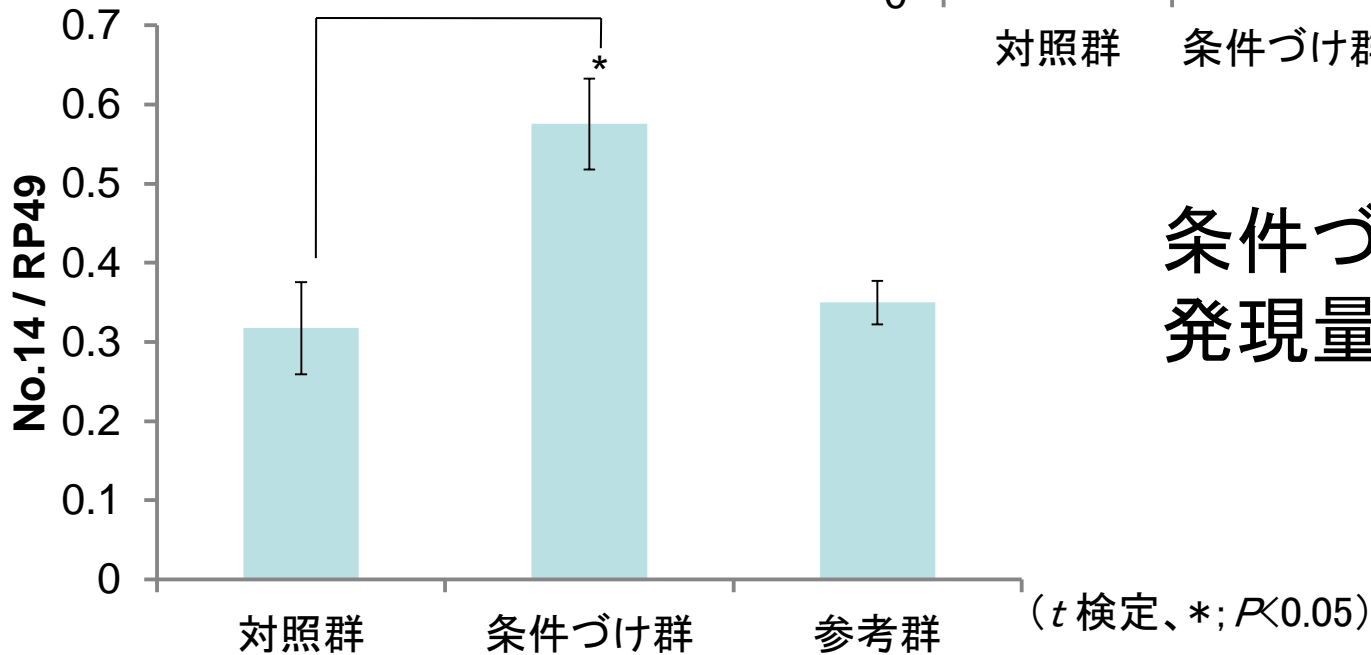
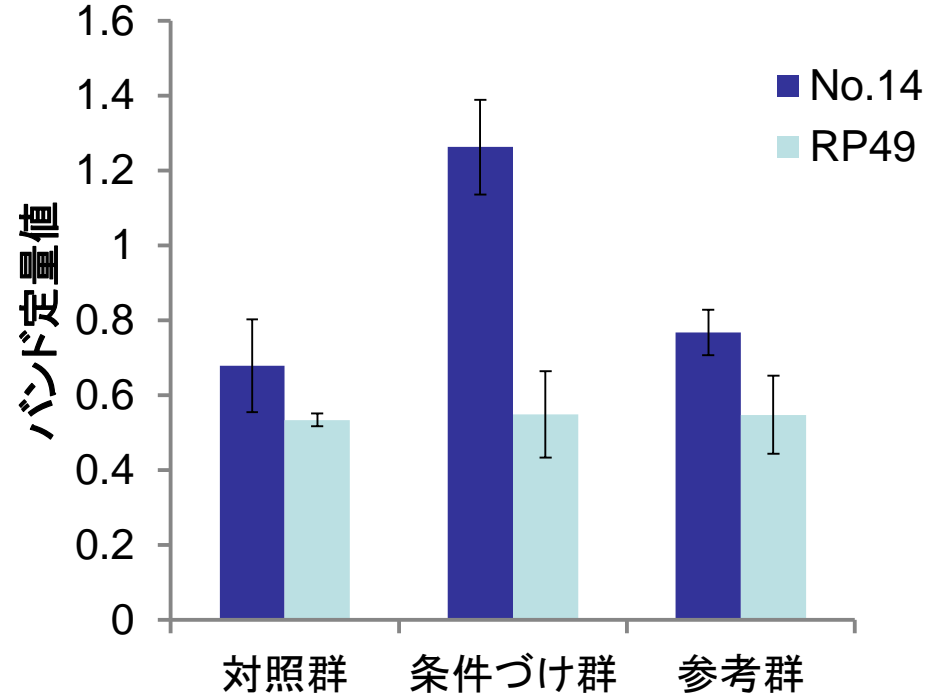
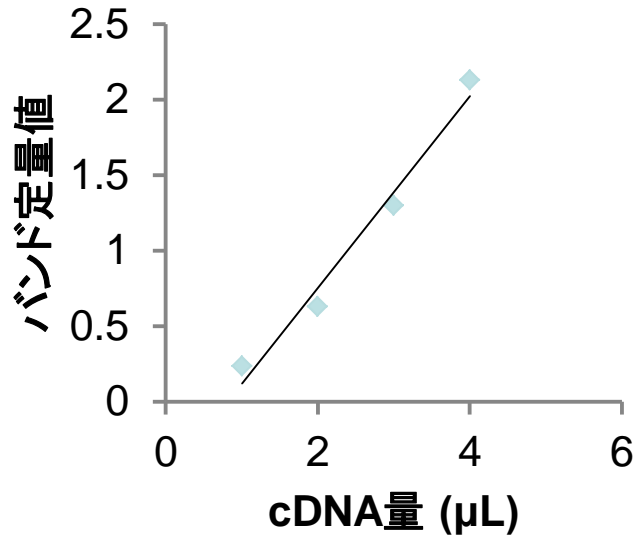


27本について塩基配列を決定することができた。



既知の配列との類似性を調べた。

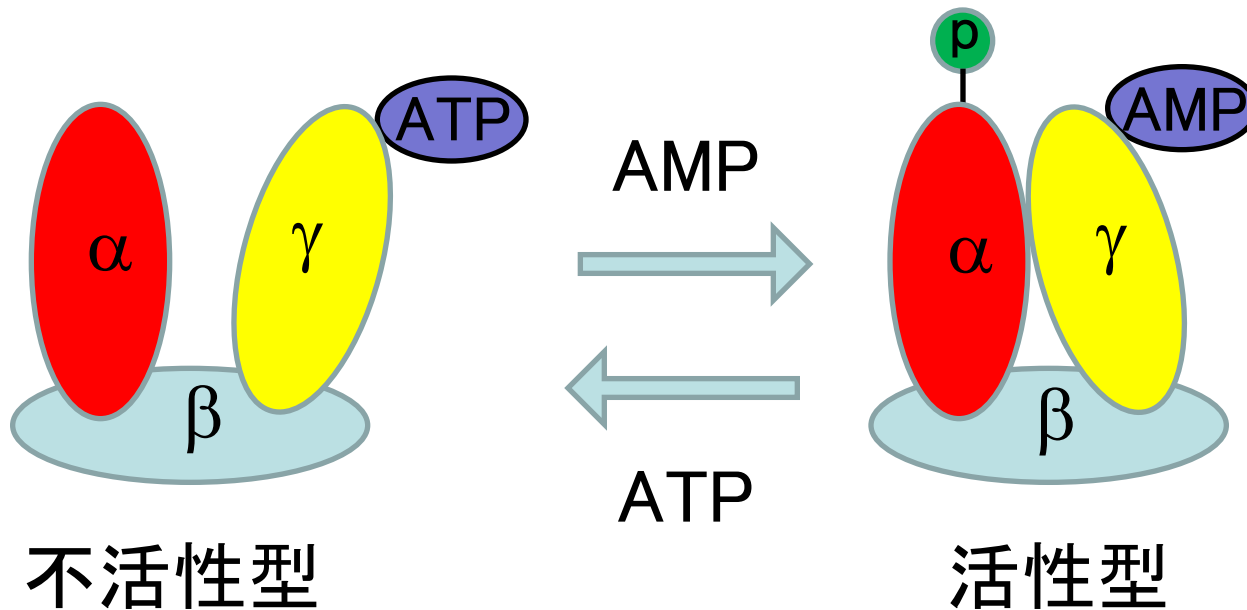
# No.14 の遺伝子について



条件づけによって  
発現量が**増加**

# AMPK (AMP-activated protein kinase)

## 細胞内エネルギーバランスの制御



新たに、

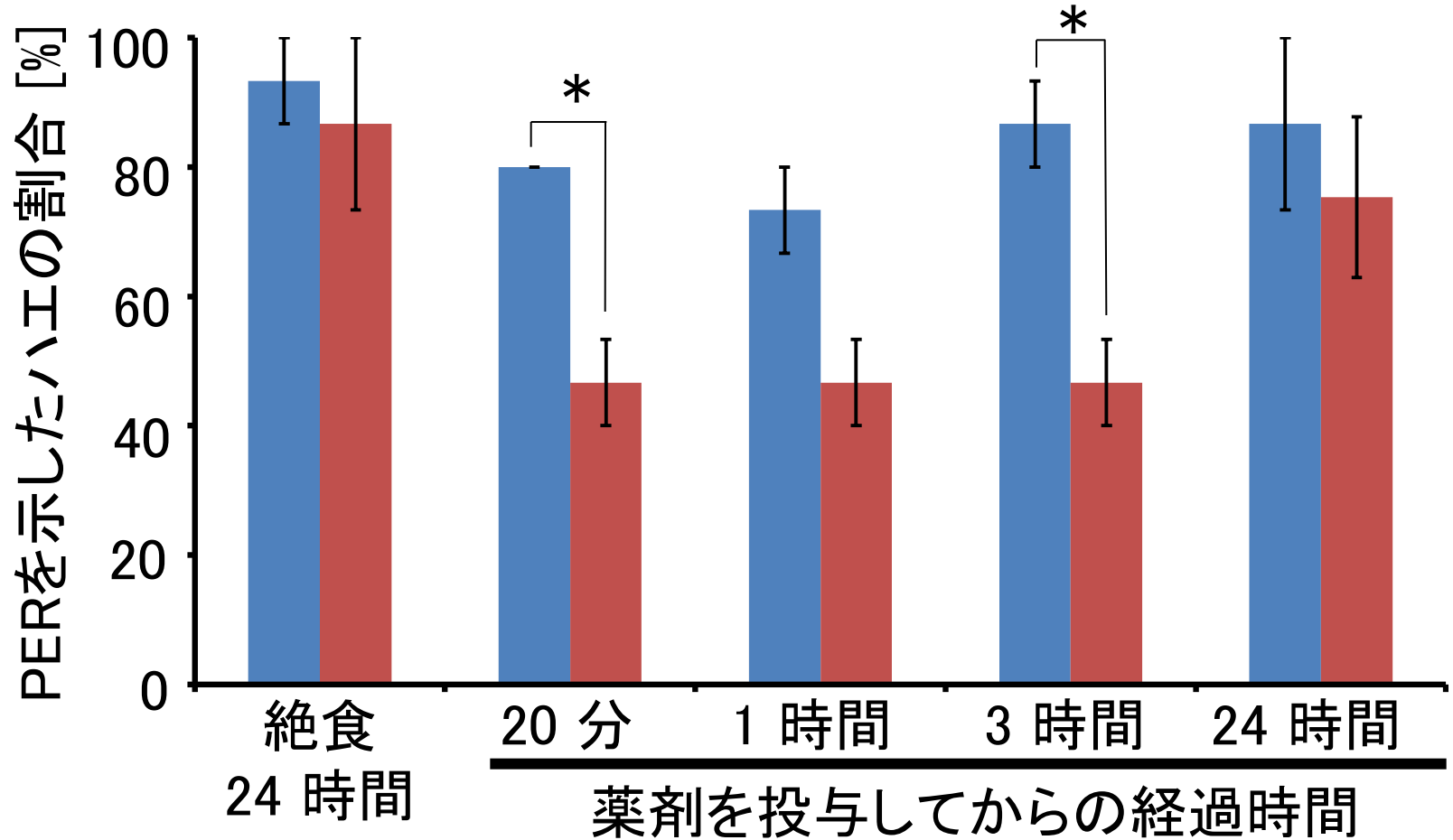
視床下部における摂食調節に  
重要な働き

代謝に関わる  
酵素の活性調節



# 【阻害剤投与後のPER変化】

■ vehicle ■ Comp. C (10  $\mu$ M) (n = 3, \*p<0.05, t-test)



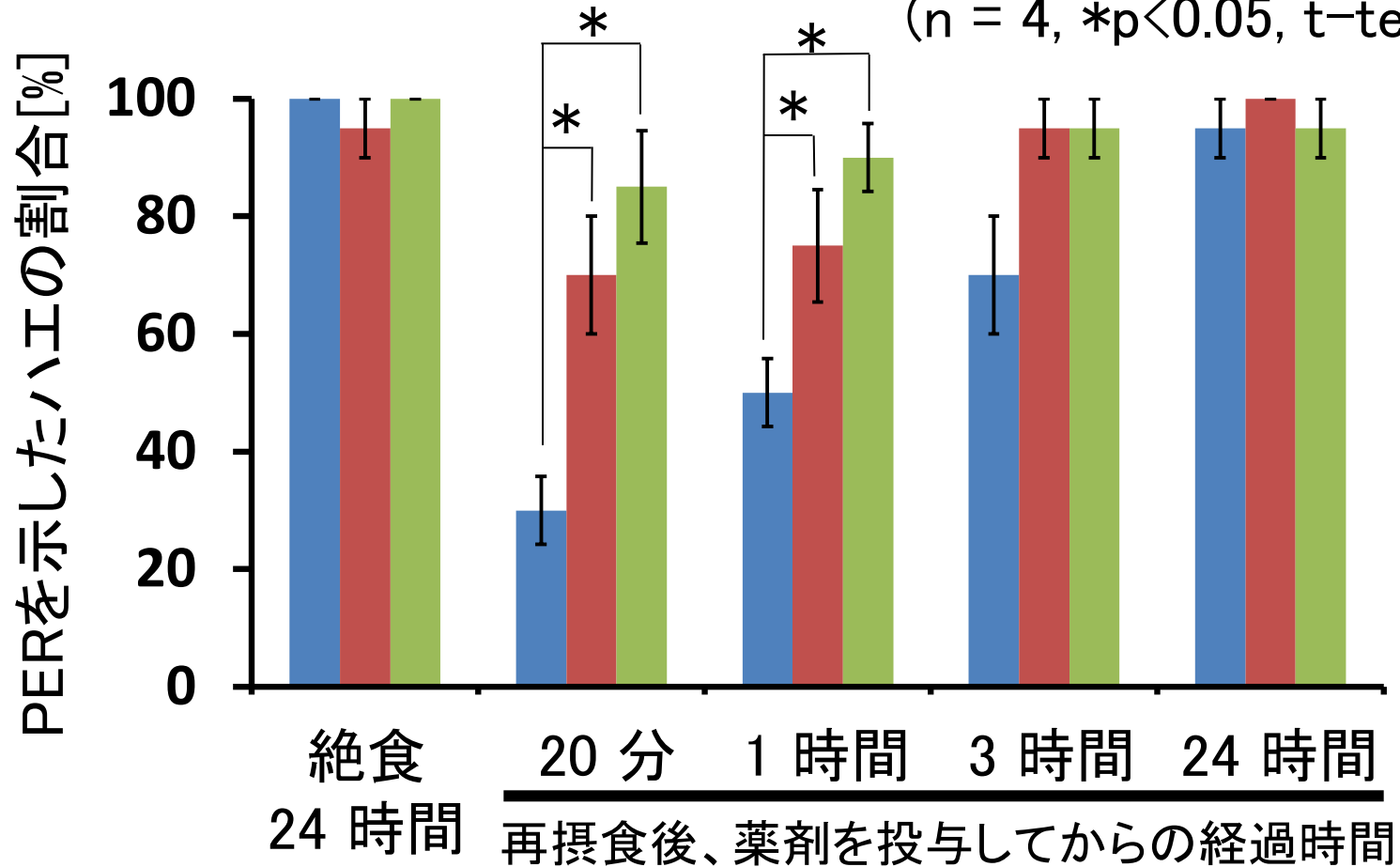
PERを示すハエの割合が阻害剤投与により低下

AMPKの活性低下が、食欲を低下させる

# 【活性化剤投与後のPER変化】

■ PBS ■ AICAR 10mM ■ AICAR 30mM

(n = 4, \*p<0.05, t-test)



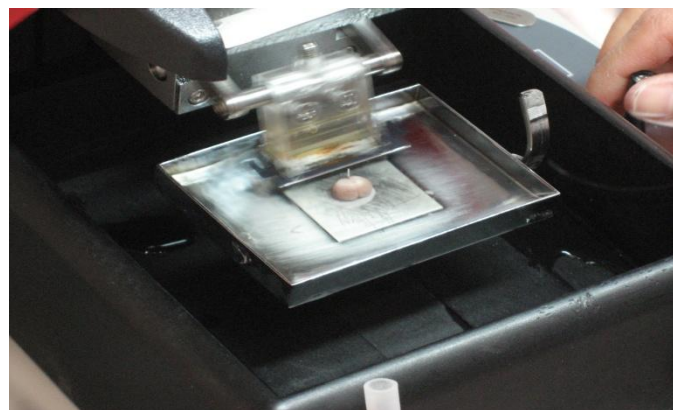
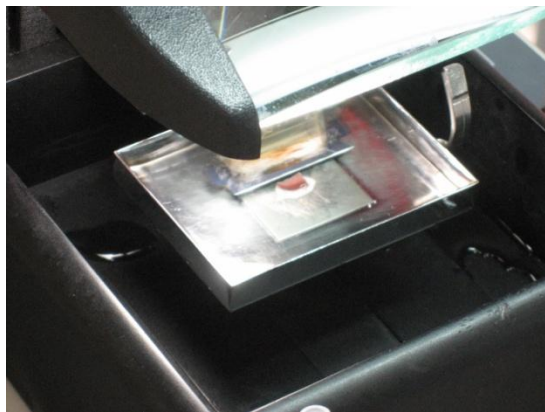
PERを示すハエの割合がAICARの投与により増加

AMPKの活性上昇が、食欲を増加させる

# AMPK 生物時計への関与

ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだマウス  
を用いて概日リズムを可視化

スライサーによる切片作製





マウス解剖イラストレイテッド(秀潤社)より

## クロノスDioを使ったサンプル計測の流れ

クロノスDioはカルチャーディッシュ内の細胞中の発光を測定します。



### ①サンプル調製

レポーター遺伝子を導入した検体細胞、組織切片に刺激を加え、発光基質を培地に添加します。クロノスDioにカルチャーディッシュをセットします。

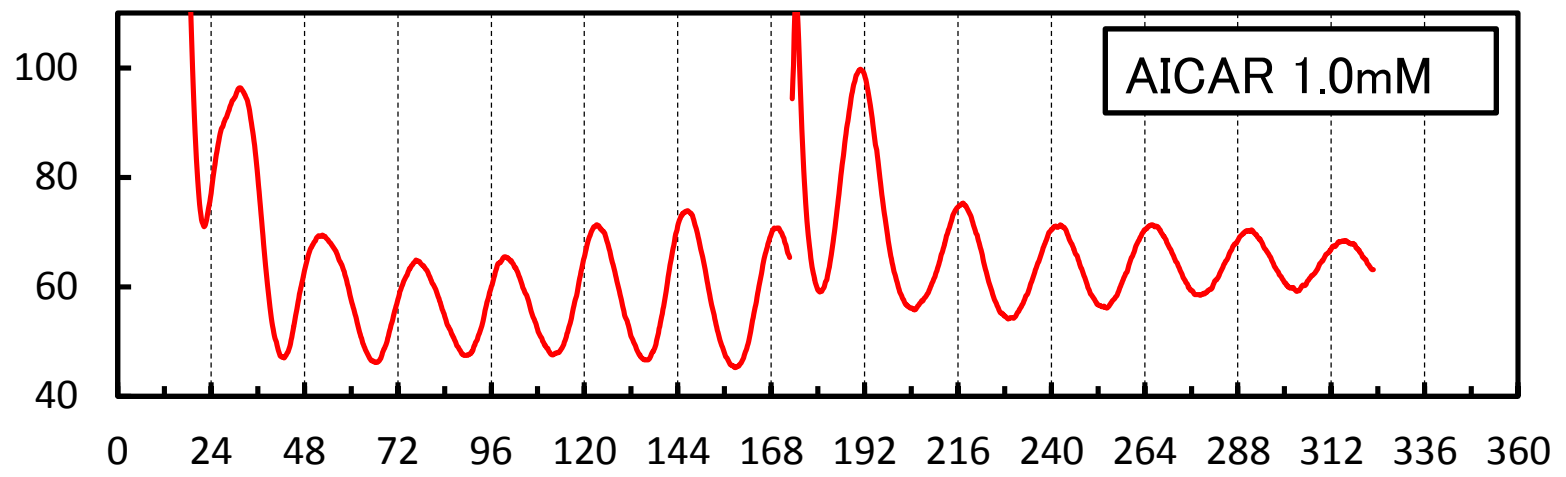
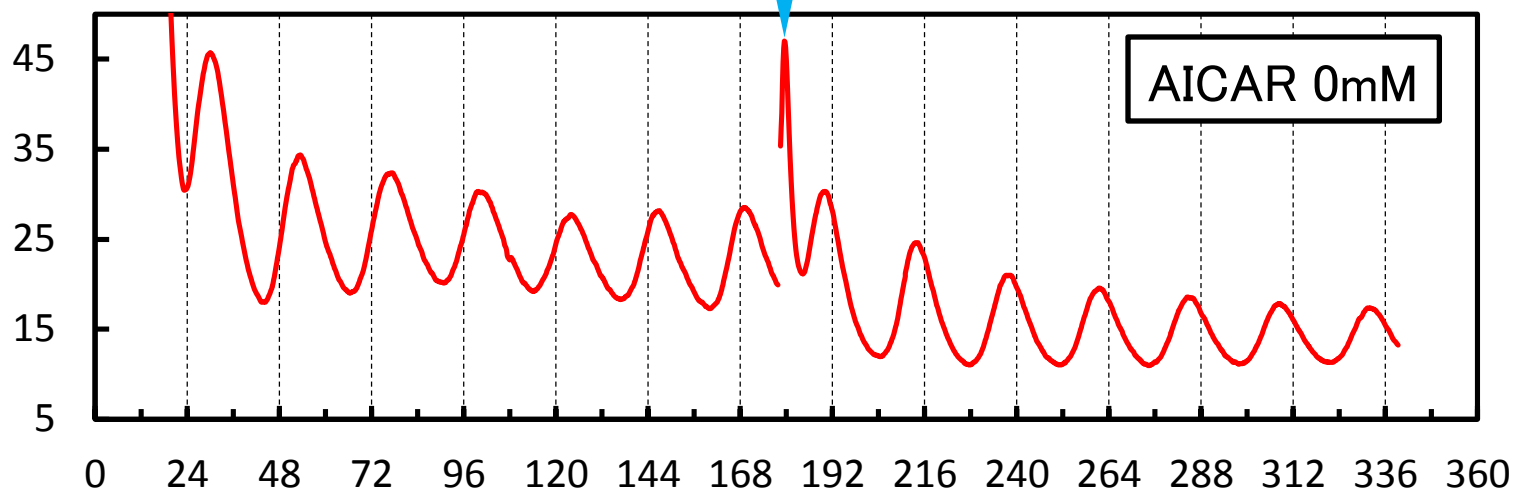
- 一定間隔で発光計測
- 温度&CO<sub>2</sub>コントロール
- フィルター内蔵・色分離機能
- PC制御
- 培養条件モニター可能  
(温度・CO<sub>2</sub>濃度)

### ②リアルタイム測定

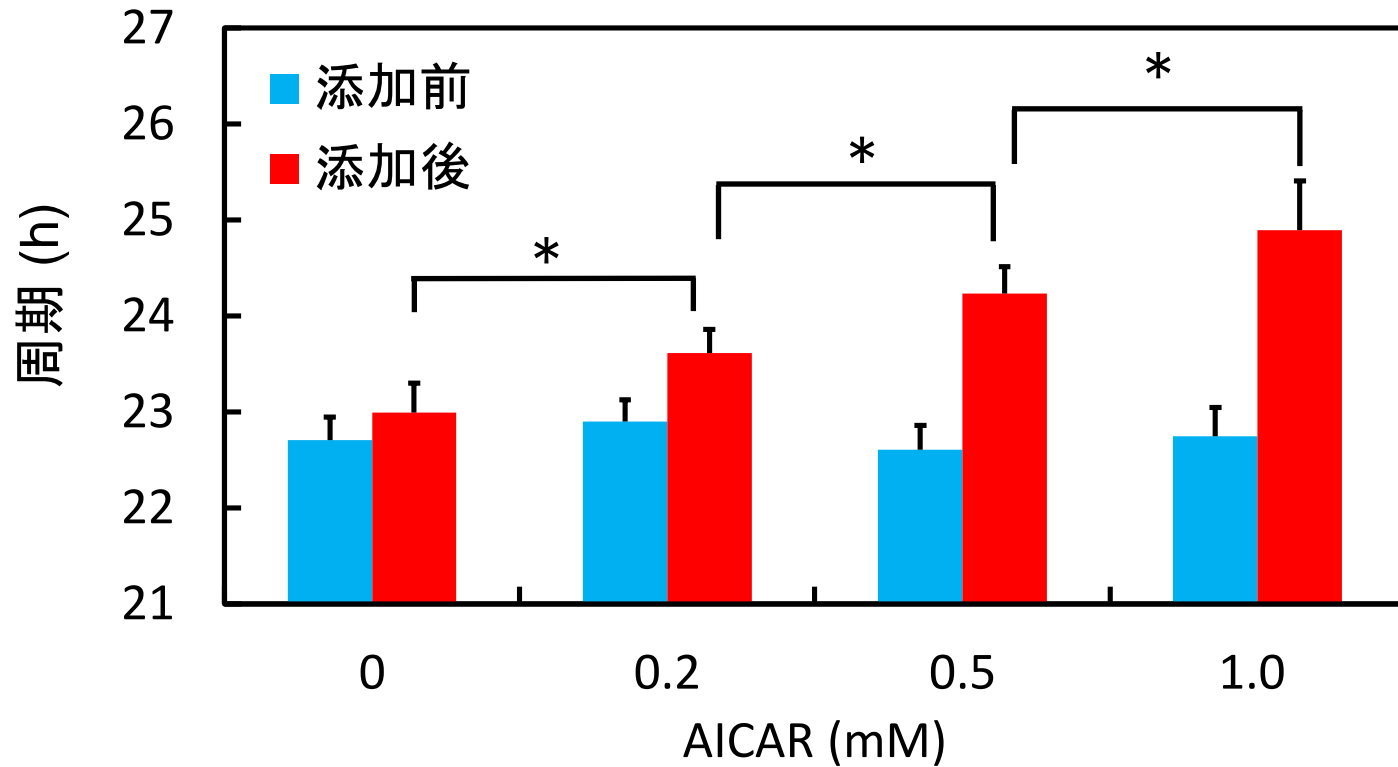
室内は培養に適した温度に一定に保たれます。必要に応じてCO<sub>2</sub>を導入可能です。一定の間隔で発光を計測し、ターゲット遺伝子の発現をモニターします。

# AMPK活性化剤 AICARの効果

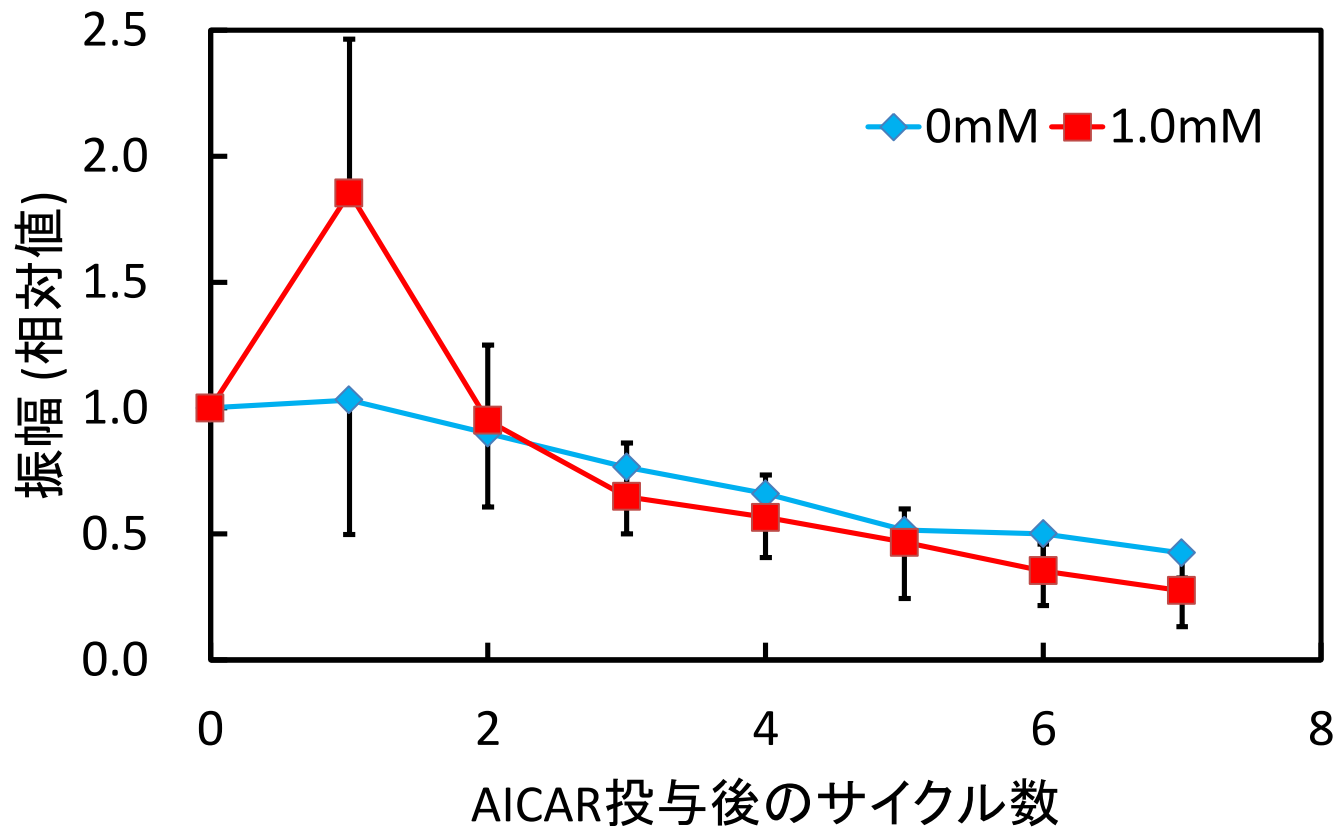
AICAR添加



培養開始後の時間



AMPK活性化剤 AICARの添加により、周期の延長が見られた



AMPKは概日リズム形成に何らかの寄与があるのでは



# 画像解析装置

