

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18967

研究課題名(和文)Olfactory Marker Proteinの生理的機能の解明

研究課題名(英文)Investigating the role of a conventional marker protein in ORNs

研究代表者

中島 則行(NAKASHIMA, Noriyuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80625468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：まず発現細胞系を用いて、複数のGPCRが相互に増幅的または抑制的な基底活性を示すことでcAMPプールが形成されることを明らかにした。そして、嗅覚マーカー蛋白質が環状アデノシンリン酸および核酸バリエーションと物理的に結合することを、生物発光共鳴エネルギー転移によるイメージング解析により解明した。また、競合アッセイを用いて両者の生化学的な解離定数を決定した。該当遺伝子を破壊したネズミを用いて、行動実験および組織切片での電気生理学実験を実施した。生理学的機能として、嗅覚神経細胞の安定した発火に重要な蛋白であることを証明した。以上の成果は、国際シンポジウムおよび学術論文として発表した(投稿中を含む)。

研究成果の概要(英文)：Neurons and cells often express various G_s-protein-coupled receptors (GPCRs), many of which show ligand-independent basal activity. HCN2 channels opens in response to the basal cAMP pool size produced by basally active GPCRs. Here, we utilized an exogenous HEK293 expression system and voltage-clamp patch-clamp recordings to investigate basal HCN2 channel activity in the presence of two GPCRs with diverse basal activities. We used the β -2-adrenoceptor (β 2AR) together with odorant receptors (ORs), as both GPCR families are known to show strong basal activity. We found that β 2AR alone strongly enhanced the activity of HCN2 channels, and co-expression of ORs further diversified the HCN2 channel activity, which was abolished by an adenylate cyclase inhibitor. Olfactory marker protein shows the capability to modulate the basal nucleotide pool. We demonstrated the actions by employing the knock-out mice (under review for publication).

研究分野：神経生理学

キーワード：ヌクレオチド イオンチャネル 神経細胞 自発発火 行動生理学

1. 研究開始当初の背景

Olfactory Marker Protein (OMP)は文字通り嗅細胞のマーカーとして広く知られている。OMP は嗅細胞以外では味細胞などに発現しているが、1972 年によって発見されてから未だにその機能は不明である。我々は蛋白構造データベースの検索から OMP にサイクリックヌクレオチド結合モチーフが存在することを発見した。

2. 研究の目的

cAMP は匂い受容体の second messenger であると同時に匂い刺激の無い基底状態でも細胞内にある程度の濃度で存在し、cAMP 感受性チャンネルを活性化して嗅細胞の自発発火特性を決定している (Nakashima et al., 2013, J. Physiol.)。そこで本研究では cAMP がどのように細胞内でプールされるかを明らかにし、OMP が cAMP 濃度変化を介して嗅細胞の発火特性に及ぼす影響を明らかにすることをめざす。

3. 研究の方法

G 蛋白共役受容体 (GPCR) である匂い受容体 (Odorant receptors ; OR) を複数クローニングし、嗅細胞に発現する cAMP 依存性 HCN チャンネルとともに HEK 細胞に共発現して、HCN チャンネルの基底活性化レベルを明らかにする。

(1) OR を可視化するために、黄色蛍光蛋白 (YFP) を融合させた cDNA を作成する。同時に、基底 cAMP プールを形成するアドレナリン $\beta 2$ 受容体 ($\beta 2AR$) を赤色蛍光蛋白 (mCherry; mChry、成果参照) と融合した cDNA を作成した(成果 1 A)。それらの cDNA を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、共発現系を構築した(成果 1 B)。蛍光組織観察を用いて、HEK293T 細胞の表面に YFP および mCherry が輸送されていくことを確か

めた(成果 1 C)。

(2) 一方で、HEK293T 細胞に HCN2 チャンネルのみを強制発現させて、パッチクランプ法にて電流を計測した(対照区)。テストパルスを与えた後、-120 mV に再固定することでテール電流解析を行い、活性化半値 ($V_{1/2}$) を決定した(成果 2 A、B ; Ctrl)。

この条件に加えて、OR-YFP と $\beta 2$ -mCherry を共発現させた状態で、HCN2 チャンネルの $V_{1/2}$ を決定した(成果 2 B-D)。

次に、HCN2 チャンネルがどの程度の細胞内 cAMP 濃度幅で活性化曲線が動くかを定量化するために、cAMP を含有した内液を用いて HCN2 チャンネルの活性化曲線を決定した(成果 2 E,F)。

(3) これらの条件のもと、さらに $\beta 2AR$ の Inverse agonist (ICI) を投与することで基底活性化成分を抑制した状態で HCN2 チャンネルの $V_{1/2}$ を決定し、残存する OR による基底 cAMP 活性を検討した(成果 3 A-F)。

さらに、アデニル酸シクラーゼ阻害薬(SQ)を投与することで、HCN2 チャンネルの活性化に、基底 cAMP プールが関与していることを確かめた(成果 3 G,H)。

4. 研究成果

(成果 1 A-C)

OD-YFP および、 $\beta 2$ -mCherry は、いずれも HEK293T 細胞の膜に輸送されたことを蛍光観察にて確認した。

(成果 2 A,B ; Ctrl)

HCN2 チャンネルの電位固定における電流トレースが記録できた。さらに、テストパルスの最後にテール電流が記録できた(A ; □で囲った部分。特に $V_{1/2}$ に近いトレースを茶色で、-120 mV のトレースをピンクで示す)。

(成果 2 B-D)

共発現する GPCR の種類とコンビネーション依存的に HCN2 チャネルの活性化曲線は決定され、それぞれの $V_{1/2}$ 値はおおよそ -110 mV ~ -80 mV まで大きく幅を示した。

(成果 2 E,F)

細胞内 cAMP を 0 μ M -10 μ M まで変化させた時の HCN2 チャネルの活性化 $V_{1/2}$ 値は -100 mV ~ -80 mV まで大きく幅を示した。これは、GPCR 共発現系における結果とほぼ同じ程度となった。

以上の結果より、複数の GPCR が発現している場合、基底 cAMP プールには、(i)複数の GPCR の基底活性化によって決定されること、(ii)それらが増幅的または抑制的に協調して働いていること、(iii)細胞内 cAMP 濃度はおおよそ 0 μ M -10 μ M であることが示唆された。

(成果 3 A-H)

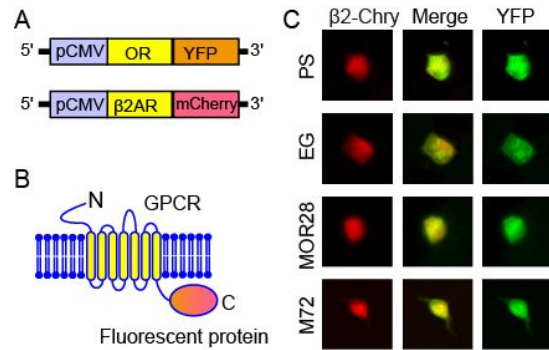
ICI により β 2AR の基底活性化を阻害すると、基底活性化の成分が OR の種類によって大きく異なることが分かった。さらにアデニル酸シクラーゼ阻害薬によって、HCN2 チャネルの $V_{1/2}$ は、対照区と同じ程度まで抑制されたことから、複数の GPCR の基底活性化によって、細胞内に基底 cAMP プールが形成されることが明らかとなった。

以上の所見に加えてさらに OMP を実際に発現する嗅細胞を用いた電気生理学実験を行い、OMP の存在が基底 cAMP に影響を与えることを示唆する所見が得られた。結果は、国際シンポジウムにて発表を行った(業績参照)。それらの結果に OMP ノックアウトマウスの行動解析所見を加えて、現在、学術雑誌に投稿中である。

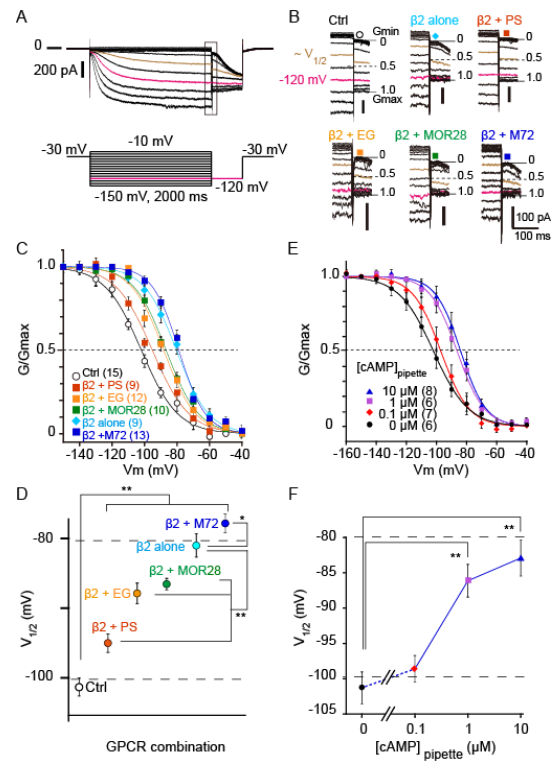
研究は当初の予定通り進み、予期しなかった事案は特になかった。

結果 Figure

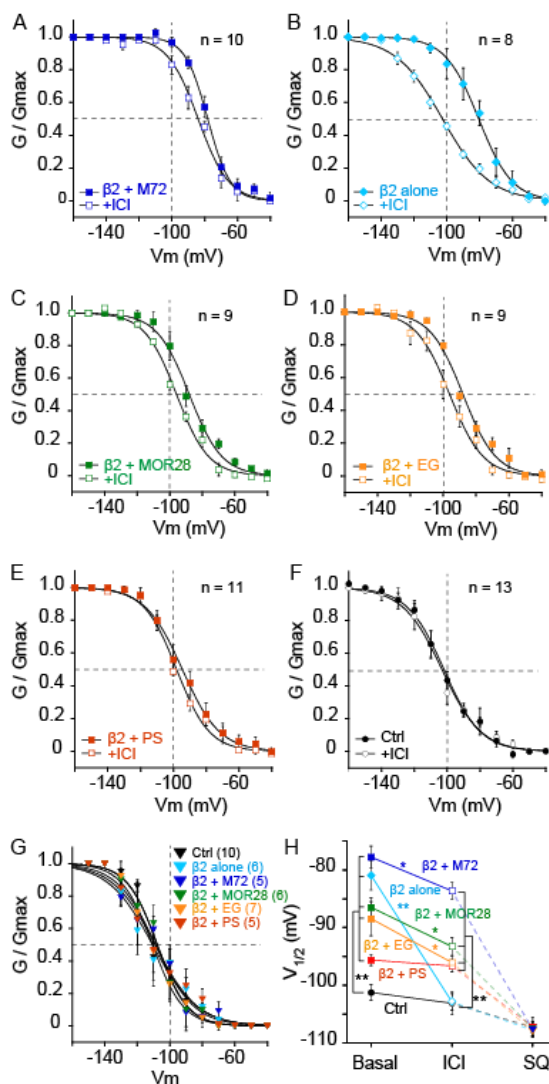
(成果 1)



(成果 2)



(成果3)



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 1 件) 査読有

Nakashima Noriyuki, Nakashima Kie, Nakayama Takeo, Takaku Akiko, Kanamori Ryosuke, Dual expression of constitutively active G_{α_s} -protein-coupled receptors differentially establishes the resting activity of the cAMP-gated HCN2 channel in a single compartment. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol.494 No.1-2 76-81, 2017

[学会発表](計 3 件)

Nakashima Noriyuki, Nakashima Kie, Taura

Akiko, Takaku Akiko, Ohmori Harunori, Takano Makoto, Buffering cAMP in olfactory receptor neurons. *J Physiol Sci*, The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Vol.68 No.Supplement 1 S140, 2018年 3月

Nakashima Noriyuki, Buffering cAMP in olfactory receptor neurons. The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2017: in conjunction with YR Umami Forum 2017, AISCRIB 2017), 2017年 11月

Nakashima Noriyuki, Basal cAMP levels can be diversely determined by a set of multiple GPCRs. 鹿児島神経科学研究会第 9 回研究発表会, 2017年 2月

[図書](計 0 件)

なし

[産業財産権]

なし

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

久留米大学医学部生理学講座 HP

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol2>

/

久留米大学研究者紹介

<http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=76085632895167>

[de=76085632895167](http://research.kurume-u.ac.jp/data.php?scode=76085632895167)

6．研究組織

(1)研究代表者

中島 則行 (NAKASHIMA, Noriyuki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80625468

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし