

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14576

研究課題名(和文) ヒト嗅覚受容体の新規リガンド同定法の確立

研究課題名(英文) Deorphanizing human odorant receptors

研究代表者

竹内 春樹 (Takeuchi, Haruki)

東京大学・大学院薬学系研究科・研究員

研究者番号：70548859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト嗅覚受容体のリガンドを同定することは、ヒトの匂い受容の理解にとって必須である。本申請課題では、ヒト嗅覚受容体のリガンドを同定するアッセイ系の確立するため、ヒト嗅神経を *in vitro* で作出する方法を計画した。発生期の嗅覚神経細胞の遺伝子発現プロファイルデータから候補となる転写因子を絞り込んだ。現在、レンチウイルスを用いてヒト線維芽細胞に遺伝子導入し、嗅覚神経細胞への分化誘導を試みている。

研究成果の概要(英文)：Deorphanizing human odorant receptors (OR) is inevitable for understanding our sense of smell. In the present study, we attempted to generate human olfactory sensory neurons *in vitro* to establish a novel ligand screening system for human ORs. Based on gene expression profile of developing olfactory sensory neurons, we narrowed down candidate transcription factors which might be important for differentiation of olfactory sensory neurons. We are currently trying to differentiate human fibroblasts into olfactory sensory neurons through lentivirus-mediated direct lineage reprogramming.

研究分野：神経発生学

キーワード：嗅覚 神経細胞 嗅覚受容体 直接変換法

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、感覚器官の中でも最も原始的で多くの生物にとって天敵からの忌避、食物の探索、本能行動の誘発など個体の生存に重要な役割を担う。空気中を漂う匂い分子は、鼻腔奥に存在する嗅覚神経細胞(嗅細胞)によって検知される。個々の嗅細胞には、1種類の嗅覚受容体(olfactory receptor: OR)が発現しており⁽¹⁾、匂い分子の構造の違いを識別している。ORと匂い分子は多対多の関係にあり、単一の匂い分子は複数のORを活性化し、一つのORは複数の匂い分子によって活性化される。従って、異なる匂い分子は活性化されたORの異なる組み合わせとして表現される。匂いの知覚は、このORの組み合わせという情報が、電気信号に変換され脳へと伝達されることによって生じることから、匂いの感覚(嗅覚)はその動物が持つOR遺伝子のレパートリーによって規定される。

OR遺伝子は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に属し多重遺伝子ファミリーを構成している。OR遺伝子ファミリーは、生物種ごとにレパートリーが異なっており、遺伝子の数だけを見ても、マウス(約1100個)、イヌ(約800個)、アフリカゾウ(約2000個)と大きな違いが存在する⁽²⁾。また個体差も大きいことが知られ、ヒトOR遺伝子群においては多数のpolymorphismが存在し、特定のORの欠失は匂い分子に対する感覚の違いが生じる“嗅盲”として認知レベルでの違いとして表される⁽³⁾。従って、特定の動物の匂い受容のメカニズムを明らかにするには、その動物のゲノムにコードされたOR遺伝子の機能を解析することが不可欠であると考えられる。

ところが我々ヒトのゲノムには、全遺伝子の1%強に相当する約400個ものOR遺伝子が存在するが、それらの90%以上は未だリガンドが同定されていないオーファン受容体である⁽⁴⁾。これはOR以外のGPCRの半分以上についてすでにリガンドが同定されていることを考慮すると驚くほど低い数字である。このことは、OR遺伝子の同定以降、マウスなどのモデル動物における嗅覚の情報処理メカニズムの理解が進んでいるものの、我々ヒトの嗅覚に関しては、何を匂い分子としているかということさえ殆どわかっていないことを意味している。

ORのリガンド同定が進まない理由として、多くのORタンパク質を異なる細胞種において異所的に発現させた場合には、培養細胞中できちんとした立体構造をとれないため、*in vitro*のアッセイ系を用いたスクリーニングができないことが原因となっている。

2. 研究の目的

匂い受容を担う嗅覚受容体遺伝子は生物種ごとにレパートリーが大きく異なっており、ヒトの匂い受容のメカニズムを理解するためには、ヒト嗅覚受容体の機能を解析することが不可欠である。本申請課題では、遺伝学的手法を駆使して、ヒト嗅覚受容体の新し

いリガンドスクリーニング法の確立を目指した。

3. 研究の方法

先述の問題を解決するには、ヒトORを内在性の状態に近い環境、すなわちヒトもしくはヒト以外の嗅細胞を用いた実験系を構築することが妥当な方策であると考えられる。そこで本申請課題では、

【1】ヒト嗅覚受容体を内在性のヒト嗅細胞に近い環境、すなわち遺伝学的アプローチが比較的容易であるマウス嗅細胞に発現させる、【2】ヒト嗅細胞自体を*in vitro*で作出するという二つの方法を提案した。

4. 研究成果

【1】に関して、(1)マウス嗅細胞にウイルスを用いてヒトOR遺伝子を異所的に発現させるという方法と(2)遺伝子改変技術によってマウスOR遺伝子の代わりにヒトOR遺伝子を発現する変異マウスを作製するという2つの方法を試みた。

(1)マウス嗅細胞の*in vitro*の初期培養系は確立されていないため、マウス個体に鼻腔を通じてウイルスを感染させる手法を用いた。ウイルスには、アデノウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスの三種類を用いた。アデノウイルスの場合、過去の知見から嗅細胞に効率よく発現することが知られていた⁽⁵⁾にも関わらず、ヒトORをコードするウイルスはタイターが低くなることと、感染後時間経過と共に細胞毒性により細胞死が起きることなどからリガンドアッセイの実験には至らなかった。レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(D/J serotype)に関しては、1個体あたりの嗅細胞への感染細胞数が極めて少なく、同様に実験に用いることができなかった。

(2)遺伝子改変動物に関して、当グループで以前同定した嗅覚受容体遺伝子の発現を誘導するエンハンサーとプロモーターの下流にヒトOR遺伝子をつないだDNAコンストラクト⁽⁶⁾を作り、トランスジェニックマウスを作製した。この方法の場合、トランスジェン由来のORを発現した嗅細胞は内在性のORの発現を抑制するために、マウスの嗅細胞にトランスジェン由来のORのみが発現するという理想的な状況が作り出せることが期待された。ところが、新生時期に確認されたトランスジェンの発現が週齢を追うにつれ大幅に減少していくという現象によりリガンドアッセイの実験に移行できる程発現細胞数を得ることができなかった。

【2】に関して、ダイレトリプログラミング法に習ってヒト由来の線維芽細胞にレンチウイルスを用いて複数の転写因子を同時に導入することで嗅細胞を作出することを目指した。発生工学の目覚ましい進展により、幹細胞や線維芽細胞に複数の遺伝子を導入

することで、*in vitro*で目的の細胞を選択的に作出する方法が報告されてきている。2010年に線維芽細胞に転写因子 Brn2, Ascl1, Myt1l を強制発現することによる神経細胞へのリプログラミングが確認されて以降⁽⁷⁾、近年ではドーパミン神経やセロトニン神経、末梢の感覚神経など神経細胞の特定のサブタイプへと選択的に分化させる手法が次々と報告されている。

我々は、嗅上皮におけるマイクロアレイ解析を行い嗅細胞の遺伝子発現プロファイルから嗅細胞への分化誘導に必要な転写因子の候補を約 20 種類同定した。さらに、嗅細胞特異的のプロモーター下で Ca²⁺濃度の変化を可視化する GCaMP6f を発現させる遺伝子改変マウスを作製し、このマウスから線維芽細胞を樹立した。このマウス線維芽細胞に対して Brn2, Ascl1, Myt1l の 3 つの転写因子に加えて、嗅細胞の成熟に重要であると考えられている OR を強制発現させたところ神経細胞のマーカーである TUJ1 の発現は確認されたが、嗅細胞のマーカーである OMP の発現は確認できなかった(図1)。

現在、作製したマウス線維芽細胞に対してレンチウイルスを用いて候補となる複数の転写因子の導入を行い、強制発現させた際に GFP 蛍光の有無を指標に、どの遺伝子の組み合わせが嗅細胞への分化誘導に必要なかを絞り込んでいる。これまでの多くの誘導実験から、マウスで得られた知見はそのままヒト細胞に応用できることがわかっていることから、今後、分化誘導に必要な転写因子を明らかに出来次第、ヒト嗅細胞へと応用していく予定である。

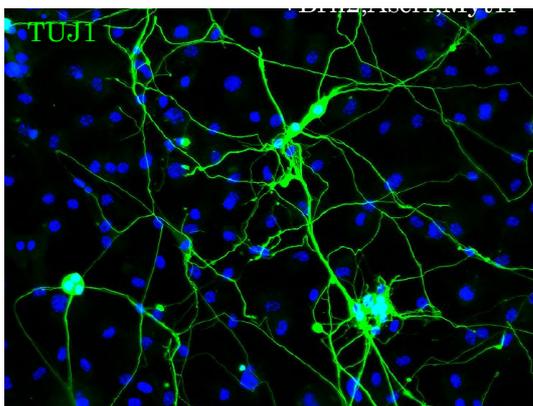


図1 マウス線維芽細胞への転写因子強制発現による神経細胞へのダイレクトプログラミング 神経細胞マーカーである TUJ1(緑)および DAPI(青)の免疫染色像。

<参考文献>

- (1) Mori K and Sakano H. *Annu. Rev. Neurosci* **35**, 467-499 (2011).
- (2) Niimura Y et al. *Genome. Res* **24**, 1485-1496 (2014).

- (3) Keller A et al. *Nature* **499**, 468-472 (2007).
- (4) Peterlin Z. et al. *J. Gen. Physiol* **143**, 527-542 (2014).
- (5) William CW. et al. *Neuron* **41**, 955-967 (2004)
- (6) Serizawa S et al. *Science* **302**, 2088-94 (2003)
- (7) Vierbuchen T et al. *Nature* **463**, 1035-41 (2010)

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 4 件)

Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, and Sakano H
Nat Commun, doi: 10.1038/ncomms15977 (2017).

Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H[†]
J. Vis. Exp. doi: 10.3791/55893 (2017).

Eerdunfu, Ihara N, BaoLigao, Ikegaya Y and Takeuchi H[†]*Neural. Dev* DOI 10.1186/s13064-017-0079-0 (2017).

Ihara N, Nakashima A, Hoshina N, Ikegaya Y and Takeuchi H[†]
Eur. J. Neurosci Vol.44(3), 1998-2003, 2016 **selected as a cover illustration**

[学会発表](計 18 件)

国際学会
Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H
Keystone Symposia A2: State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease[™] (Keystone, Colorado), 2018/1/14-18

Katori K, Manabe H, Ikegaya Y and Takeuchi H
Keystone Symposia A2: State of the Brain: Genetic Dissection of Brain Circuits and Behavior in Health and Disease[™] (Keystone, Colorado), 2018/1/14-18

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H
Keystone Symposia “Synapses and Circuits” (New Mexico, USA), 2017/3/5-8

Takeuchi H
KoSCL symposium (Seoul, Korea), 2016/10/28-29

Takeuchi H, Ihara N, Nakashima A and Ikegaya Y
Society for Neuroscience 2016 (San Diego, USA), 2016/11/12-16

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H
CSHL meeting “Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration” (New York, USA), 2016/9/20-24

Nakashima A, Ihara N, Ikegaya Y and Takeuchi H
ISOT2016 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

Inokuchi K, Takeuchi H, Imamura F, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, and Sakano H
ISOT2016 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

Ihara N, Nakashima A, Ikegaya Y and Takeuchi H
ISOT2016 17th International Symposium on Olfaction and Taste, 2016/6/5-9

国内学会
竹内春樹
The 5th Chemosensation and Behavior Workshop , 熱海, 2018/3-12-14

竹内春樹、中嶋藍、伊原尚樹、エルドンフ、池谷裕二
日本分子生物学会, 神戸, 2017/12/6 - 9, 3AW08-2 口頭

野仲航司、中嶋藍、伊原尚樹、井ノ口霞、エルドンフ、池谷裕二、竹内春樹
日本分子生物学会, 神戸, 2017/12/6 - 9, 3LBA-134

中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹
日本神経科学大会, 千葉, 2017/7/20 - 23, 1P-LBA002

野仲航司、中嶋藍、伊原尚樹、池谷裕二、竹内春樹
第 17 回東京大学生命科学シンポジウム, 東京, 2017/4/15 優秀ポスター賞

伊原尚樹、中嶋藍、池谷裕二、竹内春樹、
日本薬学会第 137 年会、仙台、2017/3/25、26PB-pm025 優秀発表賞(ポスター部門)

竹内春樹
The 4th Chemosensation and Behavior Workshop 2016, 岩手, 2017/2-17-19

Takeuchi H, Nakashima A, Ihara N and

Ikegaya Y
日本神経科学大会, 横浜, 2016/7/20-22

Ihara N, Nakashima A, Ikegaya Y and Takeuchi H
東京大学生命科学シンポジウム 2016/4/23
優秀ポスター賞

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 春樹 (TAKEUCHI, Haruki)
東京大学・大学院薬学系研究科・薬学部
研究員
研究者番号 : 70548859

(2) 研究協力者

中嶋 藍 (NAKASHIMA, Ai)
東京大学・大学院薬学系研究科・特任助教
研究者番号 : 60706331