

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14060

研究課題名(和文)匂いを多様化するタンパク質の嗅粘液内発現機構の解明と匂い受容体応答の遷移

研究課題名(英文)Functional analysis of the proteins expressing in the olfactory mucus and transition of odor receptor response

研究代表者

福谷 洋介 (FUKUTANI, Yosuke)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50747136

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)：哺乳類の嗅覚が匂いを高感度、高識別能で感じることができる詳細な分子機構は解明されていない。本研究では、匂いの溶け込みを模倣した嗅覚受容体(ORs)アッセイ技術を基盤に、代謝酵素や匂い結合タンパク質などがORsの匂い分子応答に与える影響を網羅的に調べた。嗅覚粘液発現タンパク質は、ORs個々に影響が異なることを発見し、網羅的なスクリーニングの重要性を示す結果となった。また、ORsシャペロンであるRTP1Sの機能解析も行い、ORsの細胞膜輸送に重要なアミノ酸部位を同定した。本研究で、哺乳類の嗅覚における嗅覚粘液発現タンパク質の重要性を示すだけでなく、その解析技術基盤の構築を達成したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚はその基礎原理の解明だけでなく、嗅覚を模倣したセンシング技術などの応用も広く期待されている。本研究で構築した気相からの溶け込みを模倣した新規アッセイ技術と嗅粘液に発現する代謝酵素などのタンパク質を組み合わせた研究手法は、嗅覚の匂いの感じ方の多様性を解明する上で1つのプラットフォームになると期待される。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of how the olfaction of mammal senses environmental odors with high sensitivity and high discrimination has not been clarified. In this study, we succeeded in comprehensively investigating the effect of the protein expressed in olfactory mucosa, such as metabolic enzymes and odorant binding proteins, on the olfaction because we constructed the new assay technology that mimic the dissolution of odorants from vapor phase. It was shown that the protein expressed in the olfactory mucus selectively affects the olfactory receptors, which indicates the importance of comprehensive screening. In addition, we also show the important residue of RTP1S, which is the chaperone of Odorant receptors, for the cell membrane transport of them in heterologous expression. Altogether, it is considered that this study not only confirmed the importance of the proteins expressed in olfactory mucus in mammalian olfaction, but also established the analytical technology.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：嗅覚受容体 嗅粘液 代謝酵素 レポーターアッセイ ニオイ分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の嗅覚において、嗅覚神経細胞に発現する匂い受容体(Odorant receptors、以下 ORs)が、生物の匂い分子センサーとして機能している。ORs は G タンパク質共役型受容体に属し、マウスでは約 1200 の機能遺伝子がある(1)。ORs の機能発現において、1 つの嗅覚神経細胞に 1 種類の OR が選択的に発現することなど、ORs の発現制御機構や匂い分子結合で生じるシグナル伝達経路などは既に明らかとなっている。生物の匂いの認識において、個々の ORs の異なる匂い分子応答性が『組み合わせコード』として活用されていると考えられる。空気中に漂う匂い分子が ORs と結合するまでの過程については未解明な点が多い。匂い分子は嗅覚神経細胞の表層を覆う嗅粘液に溶け込んだ後に ORs にたどり着く。ある OR の匂い分子応答を、マウスの嗅神経細胞と OR 発現培養細胞で比較すると、同一の匂い分子に対して異なる応答を示す場合がある。この原因の 1 つに、嗅粘液中のタンパク質が匂い分子に作用し、分子構造を変化させていることが考えられる。例えば 2010 年に、マウスの嗅粘液に含まれる酵素群が一部の匂い分子を代謝していることが初めて報告された(2)。また、申請者を含む複数のグループは、嗅上皮に発現するシトクロム P450 タンパク質が匂い分子を代謝し、ORs の応答を変化させることを報告している(3)。しかし、これら過去に報告された酵素は既知の分泌シグナルをもたないものが多く、実際にどの酵素が嗅覚粘液に分泌し、匂い分子代謝を行っているか、詳しい分子種や分泌経路は明らかになっていない。酵素反応により複雑な匂い分子環境が生み出される。嗅覚の優れた匂い識別機構をより深めるためには、嗅粘液発現タンパク質の嗅粘液における役割の実態解明は欠かせない。

2. 研究の目的

本研究は、嗅覚の多様な匂い分子認識機構の解明のため、哺乳類の嗅覚受容体(ORs)の活性化に影響を与えると考えられる嗅粘液発現するタンパク質に焦点を当て、どのタンパク質が ORs の匂い分子応答に影響を与えるのか、これら分子機構の解明を目指した。そのために、代謝酵素や匂い結合タンパク質といった嗅粘液発現タンパク質と申請者らが独自に開発した Vapor stimulation 法を用いた ORs リガンドアッセイを組み合わせ、タンパク質が OR の匂い分子応答に影響を与えるかどうかモニタリングできるアッセイシステムを構築することを目的とした。さらに、実際に構築した手法を用いて、様々なタンパク質に対して、ORs の機能活性への影響を分析した。

3. 研究の方法

2-1. 嗅覚受容体発現ベクター調整

本研究で用いたマウス ORs 遺伝子は N 末端にヒトロドプシンの N 末端 20 アミノ酸(Rho-tag)を付加するように、pCI expression vector に導入されている。この各 ORs 発現ベクターは、大腸菌 XL10 Gold ウルトラコンピテントセル(アジレント)を利用して増幅し、Nucleospin Plasmid TF(タカラバイオ)により精製した。嗅覚受容体発現ベクター以外の Receptor transporting protein 1S(RTP1S)発現 pCI ベクター、Glosensor 発現 pGlosensor F-22(プロメガ社)も同様の方法で増幅、精製した。

2-2. 細胞培養、遺伝子導入

Hana3A 細胞(4)を 10% FBS、ペニシリンストレプトマイシン、アンフォテリシン B を含む MEM 培地を用いて、37℃、5%CO₂ 環境下で培養した。コンフルエントになった Hana3A 細胞を 96 ウェルプレートに播種した。18~24 時間培養後に Hana3A 細胞に ORs 発現 pCI ベクター、RTP1S 発現 pCI ベクター、Glosensor 発現ベクター pGlosensor F-22 を Viafect Transfection reagent(Promega)を用いてトランスフェクションした。18~24 時間培養し、ORs 発現細胞を獲得した。

2-3. 匂い気相刺激アッセイ

トランスフェクション後の細胞の培地を除去し、HBSS バッファーで洗浄した後に、発光基質 Glosensor cAMP reagent(プロメガ)を含む同 HBSS バッファーに置換した。遮光、常温環境下で 2 時間静置し、発光基質を細胞内に取り込ませた。ニオイ刺激前に、ミネラルオイルを用いて、設定した希釈濃度に匂い溶液を調整し、新しい 96 ウェルプレートの全ウェルに添加した。そのプレートを 30℃ に温めておいたルミノリーダー内に挿入し、5 分間静置することで匂いを気化させ、ルミノメーター内に充満させた。5 分後に、細胞培養 96 ウェルプレートをルミノメーターに挿入し、匂いが充満した気相から匂い分子を自然に溶け込ませることで細胞を刺激した。発光計測は 30℃ で行い、最大で 15 サイクル測定した。発光値は ORs を発現させていないベクターコントロール細胞の発光値、ならびに各ウェルの匂い刺激前の発光値で標準化を行うことで、各 ORs の匂いへの応答を数値化し、比較した。細胞外タンパク質の影響を調べる場合には、匂い分子で刺激する前にバッファーに精製タンパク質を添加し、同様に気相刺激によって ORs 発現細胞を刺激した。

4. 研究成果

(1)Vapor stimulation 法の確立を行った。これまで、嗅覚の気相からのにおい分子の溶け込み過程を模倣したリガンドアッセイ系がなかったため、まずそのアッセイ手法の確立を進めた。プレートリーダー内を揮発したにおいで充満させた環境中に ORs 発現細胞を入れることで、気相からの溶け込みを再現した刺激方法を再現し、ルシフェラーゼの生物発光で ORs のにおいに対する応答を評価する手法を確立した(図1)。OR のにおい分子の反応が高い組み合わせでは、0,0001%に希釈したにおい分子溶液から揮発させた匂いに応答することが分かり、気相刺激でも高い感度を示した。さらに31種類の ORs の異なる応答を、リガンド応答に応じて発するルシフェラーゼ発光を時間経過で測定することで、メチル基1つ違うにおい分子の識別が可能であることを示した。

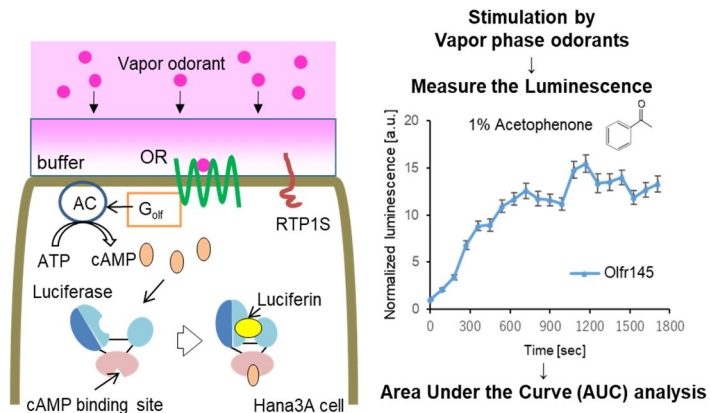


図1 Vapor stimulation Glo sensor assay の概要
ORs と cAMP 依存型ルシフェラーゼを共発現させ、気相から溶け込んだ匂い分子に OR が応答するとルシフェラーゼが活性化する。匂い分子の曝露後、ルシフェラーゼ発光を経時的に測定し、AUC 分析によって各 ORs の匂い分子応答を数値化する。

また、嗅粘液に発現しているカルボキシルエステラーゼ(Ces1d)を気相アッセイに導入すると、試験に用いた3種類のカルボキシルエステルのいずれにおいても複数の OR のリガンド応答が大きく変化した(図2)。これらの研究結果は、Nature communications 誌に掲載された。

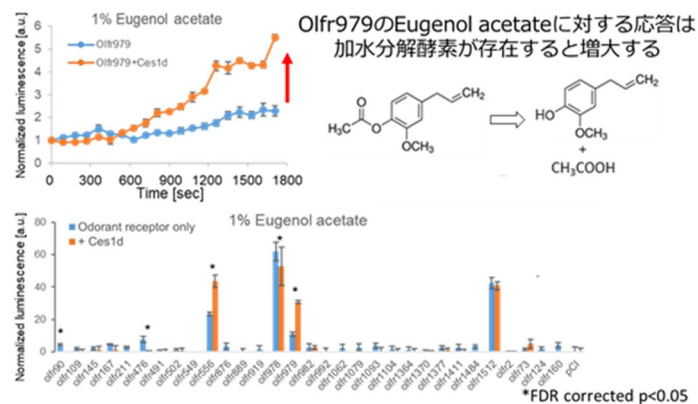


図2 Carboxyl esterase1d の ORs 応答への影響
Eugenol acetate を匂い分子として、31種類 ORs を刺激した。Olfr979 は Eugenol acetate 単体にはほとんど応答を示さなかったが、Ces1d を加えた場合に応答を示すようになった。他にも Ces1d 存在下で応答変化を示す ORs が複数見られた。このことから、代謝酵素による匂い分子の代謝が一部の ORs の応答を変化させることが示された。

この結果は、嗅粘液中の代謝酵素だけでなく、OBP も ORs の応答を選択的に影響することが示唆している。また、Vapor stimulation 法が精製 OBP の機能解析にも応用可能であることを示した。

(3) ORs の機能に影響を与える新規タンパク質として、フォスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1(PEBP1)に対して Vapor stimulation 法を用いて研究を行った。PEBP1 が一部の ORs を活性化し、嗅神経細胞の軸索誘導に影響することについて、海外の研究者との共同研究として論文を発表した。この発見は、これまで低分子化合物が以外にもタンパク質が ORs リガンドとなる新規な知見となり、ORs が応答する分子の対象を広げる成果となる。

(4) 異種細胞での機能発現ができない ORs が多々あり、より多くの ORs を用いた機能解析研究を可能とすることが重要となるため、ORs の細胞膜輸送シャペロンである Receptor transporting protein (RTP) の機能解析を行った。RTP が2量体を形成することや、ORs の輸送

に重要なアミノ酸部位を同定し、論文発表をした。本研究成果は、より多くの ORs を本来の機能をもった状態での機能解析実験が可能になることが期待される。

引用文献

- 1, Buck and Axel, *Cell* 1991
- 2, Nagashima et al., *J. Neurosci* 2010
- 3, Asakawa et al., *Sci Rep*, 2017
- 4, Zhuang et al., *Nat Protocol* 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kida Hitoshi, Fukutani Yosuke, Mainland Joel D., de March Claire A., Vihani Aashutosh, Li Yun Rose, Chi Qiuyi, Toyama Akemi, Liu Linda, Kameda Masaharu, Yohda Masafumi, Matsunami Hiroaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06806-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 de March Claire A., Fukutani Yosuke, Vihani Aashutosh, Kida Hitoshi, Matsunami Hiroaki	4. 巻 146
2. 論文標題 Real-time In Vitro Monitoring of Odorant Receptor Activation by an Odorant in the Vapor Phase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikegami Kentaro, de March Claire A., Nagai Maira H., Ghosh Soumadwip, Do Matthew, Sharma Ruchira, Bruguera Elise S., Lu Yueyang Eric, Fukutani Yosuke, Vaidehi Nagarajan, Yohda Masafumi, Matsunami Hiroaki	4. 巻 117
2. 論文標題 Structural instability and divergence from conserved residues underlie intracellular retention of mammalian odorant receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2957 ~ 2967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1915520117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zamparo Ilaria, Francia Simona, Franchi Sira Angela, Redolfi Nelly, Costanzi Elisa, Kerstens Axelle, Fukutani Yosuke, Battistutta Roberto, Polverino de Laureto Patrizia, Munck Sebastian, De Strooper Bart, Matsunami Hiroaki, Lodovichi Claudia	4. 巻 29
2. 論文標題 Axonal Odorant Receptors Mediate Axon Targeting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4334 ~ 4348.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.11.099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukutani Yosuke, Tamaki Ryohei, Inoue Ryosuke, Koshizawa Tomoyo, Sakashita Shuto, Ikegami Kentaro, Ohsawa Ikuroh, Matsunami Hiroaki, Yohda Masafumi	4. 巻 294
2. 論文標題 The N-terminal region of RTP1S plays important roles in dimer formation and odorant receptor- trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14661 ~ 14673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.007110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimura Mayu, Sasaki Kanae, Fukutani Yosuke, Yoshida Hiderou, Ohsawa Ikuroh, Yohda Masafumi, Sakurai Kaori	4. 巻 29
2. 論文標題 Anticancer saponin OSW-1 is a novel class of selective Golgi stress inducer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1732 ~ 1736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yosuke Fukutani, Hitoshi Kida, Joel Mainland, Masaharu Kameda, Masafumi Yohda, Hiroaki Matsunami.
2. 発表標題 Vapor Detection And Discrimination With A Panel Of Odorant Receptors Expressed In Heterologous Cells.
3. 学会等名 AchemS XL (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上亮祐、玉木良平、福谷洋介、池上健太郎、松波宏明、養王田正文
2. 発表標題 嗅覚受容体膜輸送機構の解明に向けたアクセサリタンパク質RTP1Sの機能構造解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅川賢史、福谷洋介、竹田浩之、松波宏明、養王田正文
2. 発表標題 マウス嗅覚受容体のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系による発現およびリガンド結合解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Fukutani、Hitoshi Kida、Joel Mainland、Clair A.De March、Masaharu Kameda、Masafumi Yohda、Hiroaki Matsunami
2. 発表標題 Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors
3. 学会等名 9thFAOPS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福谷洋介、阿部雅司、池上健太郎、浅川賢史、越澤知世、竹田浩之、松波宏明、養王田正文
2. 発表標題 生化学的解析を目指した高発現嗅覚受容体の生産
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福谷洋介、木田仁、Joel D Mainland、養王田正文、松波宏明
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体発現細胞パネルによる気相中におい分子検出技術の開発と官能評価応用への展開
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yosuke Fukutani
2. 発表標題 Functional expression of the mammalian odorant receptors toward the development of odorant sensing technology
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 2019年度大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福谷洋介
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体の 機能的発現とニオイセンシング応用技術開発
3. 学会等名 2020年 日本生物工学会 賀詞交換会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>マウスのにおい受容体発現細胞パネルを用いて気相中において分子の検出と分子種の識別を実現 https://www.tuat.ac.jp/outline/disclosure/pressrelease/2018/20181106_01.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考