

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15745

研究課題名（和文）嗅覚の多様性を司る嗅覚受容体の細胞膜輸送機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of the membrane transport mechanisms of olfactory receptors for diverse odorant recognition in olfaction

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）：本研究では、嗅覚の優れた二オイの知覚を支える嗅覚受容体の機能発現機構の解明を目指した。構造安定性が高く、異種細胞での機能発現性の高い嗅覚受容体のアミノ酸配列を指標にした部位特異的変異導入によって、野生型では異種細胞での発現性の低い嗅覚受容体の高発現化に成功した。また、近位依存性ビオチン標識法によって、嗅覚受容体を細胞膜に輸送するRTP1Sと協調する新規シャペロンタンパク質を同定に成功した。これら成果は、嗅覚受容体の細胞膜輸送経路の解明だけでなく、嗅覚受容体の工学的応用への貢献も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嗅覚が多様な二オイ分子を高感度に嗅ぎ分けることができるメカニズムは解明されていなく、嗅覚を模倣した二オイセンサーなども開発されていない。生物は数百種類におよぶ嗅覚受容体の二オイ分子選択性の違いを利用していると考えられるが、多くの嗅覚受容体の生産が難しく、機能解析が困難であった。本研究での成果である嗅覚受容体の高発現化と新規シャペロン分子の同定により、嗅覚受容体の安定生産に繋げることができ、多彩な匂い分子機構の解明と嗅覚受容体を利用した実用的な二オイセンサー開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the functional expression mechanism of mammalian odorant receptors involved in odor perception through olfaction. Using site-directed mutagenesis, we targeted a conserved amino acid among odorant receptors with high functional expression in heterologous cells as an indicator, successfully enhancing the expression of low-expressing odorant receptors. Additionally, we discovered a novel chaperone protein that works in conjunction with RTP1S, facilitating the transport of odorant receptors to the cell membrane. These findings not only shed light on the expression process of odorant receptors but also hold promise for engineering applications of these receptors.

研究分野：分子生物学

キーワード：嗅覚受容体 RTP1S 細胞膜輸送 BioID 異種細胞発現 匂い分子

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類嗅覚受容体 (**Olfactory receptors** 以下 **ORs**) は、**G** タンパク質共役型受容体に属す膜タンパク質で、ヒトでは約 **400** 種の **ORs** が機能している。複数の **ORs** のリガンド応答を脳で集約処理することで、嗅覚の高感度なニオイ知覚が発揮される。そのため、多くの **ORs** が機能することが嗅覚にとって重要である。しかし、多様なニオイ分子を認識するために **ORs** の数を増やした結果、その立体構造が不安定になったと考えられる。そのため、異種細胞で **ORs** を発現させると、多くの **ORs** は翻訳後に小胞体に停留し分解されてしまう。しかし、**Receptor transporting protein 1S** や **2 (RTP1S/2)** が共存すると、多くの **ORs** が細胞膜に局在できるようになる (Saito et al., *Cell* 2004, Sharma et al., *eLife*, 2017)。この **RTP1S/2** は、**zf-3cxc** というモチーフを形成する **N** 末端側の細胞質ドメイン、**C** 末端側の膜貫通ヘリックス、短い細胞外領域から構成される。**RTP1S** の **C** 末端部は脂質ラフト局在シグナルとして機能している。代表者は **RTP1S/2** がシステイン残基を介したホモダイマーを形成すること、**RTP1S** の **N** 末端 **4** 番目のセリン残基が **ORs** の膜輸送に重要な役割を持つことを報告している (Fukutani et al., *J Biol Chem*, 2019)。また、代表者らは **RTP1S/2** による助けを受けず、単独で細胞膜に局在し機能することができる **ORs** (**Traffic ORs**) の探索に成功している (Ikegami, Fukutani et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020)。**Traffic ORs** のアミノ酸配列から構築した立体構造モデルの分子動力学シミュレーションから、他の **ORs** と比べ、**Traffic ORs** は立体構造の安定性が高いと予測されたことから、**RTP1S/2** が **ORs** の構造を安定化させることで、**ORs** の膜輸送を促進している可能性が考えられた。

数百種類の **ORs** はアミノ酸配列中に保存されている領域はあるものの、多くの **ORs** に対して機能する **RTP1S/2** と **ORs** の相互作用部位は分かっていない。また、**RTP1S/2** を共発現させても機能的発現しない **ORs** が存在するため、**RTP1S/2** 以外にも **ORs** の機能発現を補助するタンパク質が存在すると予測された。

## 2. 研究の目的

多様な **ORs** タンパク質の機能発現メカニズムの解明と **ORs** タンパク質の高発現化手法の開発のため、**ORs** の細胞膜局在を向上させる手法の開発、**RTP1S** の機能構造解析に向けた精製法の確立、**RTP1S** と協調して **OR** の細胞膜輸送を促進する新規タンパク質を同定しその役割の解明を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 哺乳類嗅覚受容体の異種細胞発現によるリガンド応答解析

本研究で用いた哺乳類 **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** (プロメガ) に挿入している。**Receptor transporting protein 1S (RTP1S)** 発現 **pCI** ベクター、**Glosensor** 発現 **pGlosensor F-22** (プロメガ) 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。**HEK293T** 細胞を **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 **D-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 **HEK293T** 細胞を **96** ウェルアッセイプレートに播種し、**18~24** 時間培養後に **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** (プロメガ) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、**18~24** 時間培養し、**ORs** 発現細胞を獲得した。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 **HBSS** バッファーに置換した。遮光、室温環境で **2** 時間静置し、発光基質を細胞内に取り込ませた。刺激するリガンド分子を設定した濃度に調整し、各ウェルに添加した。すぐに、ルミノメーターにアッセイプレートを挿入し、リガンド応答に伴う発光値の増加を測定した。分析は、受容体を発現していないコントロール細胞の応答、もしくは、リガンド分子で刺激をしていない受容体発現細胞の発光値を指標として標準化を行い、比較した。

### (2) 哺乳類嗅覚受容体の細胞膜局在解析

各 **ORs** 発現細胞と **GFP** 発現ベクターを細胞にトランスフェクションし、**18 - 24** 時間後の細胞を **Cell stripper** (コーニング) によって回収した。**PBS** で洗浄後、**Anti-Rho4D2** 抗体 (**Merck**) により染色を行った。さらに、**APC** 標識 **Anti-Mouse IgG** 抗体を用いて蛍光標識を行った。**7-AAD** によって死細胞を染色した上で **Cytoflex** フローサイトメーター (ベックマンコールター) によって、生細胞、単一細胞、**GFP** 陽性細胞の条件を満たす細胞群に対し、**APC** の蛍光強度を比較することで **OR** の細胞膜発現性を比較した。

### (3) **BioID** 融合体を用いた近位依存性ビオチン標識法による相互作用タンパク質の同定

**BioID** として、**TurboID** と **AirID** の各遺伝子をマウス **RTP1S** とマウス **Olf454** に融合した

pCI ベクターを構築した。HEK293T 細胞にそれぞれの発現ベクターを導入した。細胞ライセートを調整し、Streptavidin Mag Sepharose (Cytiva)を用いてビオチン化されたタンパク質を回収した。回収したビオチン化タンパク質はトリプシン/LysC によってフラグメント化した後に、Q-Exactive hybrid mass spectrometer and the Easy-nLC1000 nanoflow HPLC system (Thermo Fisher Scientific)を用いて、LC-MS/MS 解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 部位特異的変異導入による哺乳類 ORs の機能発現の向上

異種細胞である HEK293T 細胞で発現させた際に、RTP1S の共発現をしなくとも細胞膜に局在することができる RTP independent ORs の中で保存性の高いアミノ酸を指標としたアミノ酸変異導入によって OR の細胞膜局在を向上することができるか検証した。Olf544 に対して D115E(BW3.39) という変異を加えると Olf544 の細胞膜局在が著しく向上することが分かった(図 1)。そこで、他のマウスとヒトの OR を対象に、BW3.39 がグルタミン酸 (E) ではない OR に対し、同位置のアミノ酸をグルタミン酸 (E) に変える変異を導入したところ、多くの OR の細胞膜局在が向上し、リガンド応答性が向上した。同様に、BW3.43 をロイシン (L) に変える変異を導入した場合も、OR の細胞膜局在が向上することを発見した。発現が向上した変異体の中には、野生型では RTP1S の共発現がないと HEK293T 細胞の細胞膜に局在しなかったものが、RTP1S の共発現をしなくとも単独で細胞膜に局在ができるほどに細胞膜局在が向上するものもあった。ヒト OR に対しても、アンドロステノン受容体の OR7D4 に変異導入を行うことで、より低濃度でのアンドロステノン刺激に対する応答を検出することができた。OR 自体の立体構造安定性を高めるアミノ酸変異導入を行うことで、RTP 非依存的に OR の発現を向上させたことから、RTP は OR の構造安定性の低さを補填する役割をしていることが予想された。

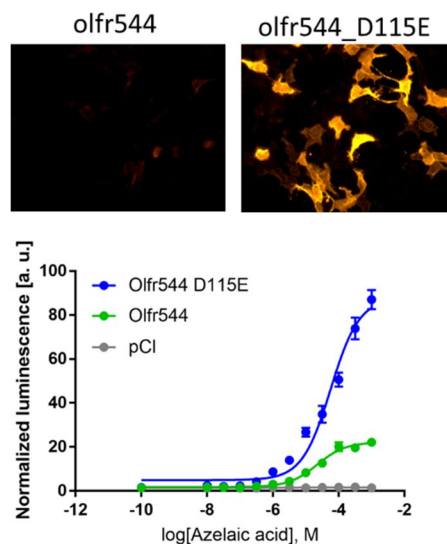


図 1 Olf544 D115E 変異導入による細胞膜局在向上効果  
上: 免疫染色による Olf544 の細胞膜局在観察  
下: アゼライン酸に対する Olf544 変異体の応答向上

##### (2) RTP1S の機能発現に重要なシステイン残基の同定

RTP1S は Zf-3CXXC というモチーフを有しており、システイン残基が RTP1S の機能構造に重要な役割をしていると考えた。RTP1S の持つシステインをセリンにそれぞれ置換した変異体を構築し、機能活性に影響するシステイン残基を同定した。単変異では機能消失しなかった変異でも複数変異を加えるといずれも RTP1S の機能が消失した。この結果は大腸菌組み替え体で発現させた RTP1S の精製を試みたときに凝集して沈殿してしまう原因が、RTP1S 内在の複数のシステイン残基が立体構造形成に重要で、大腸菌組み換え体の精製過程で正しいジスルフィド結合をとっている RTP1S が少ないことが原因の 1 つであると示唆された。また、AlphaFold2 により RTP1S の立体構造モデルを検証したところ、RTP1S の機能発現に欠かせないシステイン残基が、システイン残基 4 つから構成される Zinc finger モチーフとシステイン残基 2 つ、ヒスチジン残基 2 つからなる Zinc finger モチーフの構造形成にかかわっていることが分かった。

##### (3) AirID を用いた OR の細胞膜輸送を促進する新規シャペロンタンパク質の同定

RTP1S による OR の細胞膜輸送過程に関わる新規タンパク質の同定に向け、ビオチンリガーゼによる BioID 法での探索を進めるための BioID 融合体の最適化のため TurboID ならびに AirID 融合した Olf544 と RTP1S を構築した。各 BioID 融合タンパク質を HEK293T 細胞に発現させ、OR のリガンド応答性と RTP1S の OR の膜輸送機能を確認した結果、Olf544 の C 末端側 (細胞膜内側) と RTP1S の C 末端側 (細胞膜外側) に BioID を付加した場合は、機能活性を維持した。そこで、ビオチンリガーゼ活性の特性から AirID 融合体の Olf544 と RTP1S をそれぞれ発現させ、細胞内でビオチン化されたタンパク質を LCMS で解析した。その結果、Olf544 単独発現ならびに RTP1S 単独発現では見られず両者を共発現させたときのみビオチン化されるタンパク質として HSPA6 と STAU2 を確認した。分割ルシフェラーゼの再構成を利用した分子間相互作用解析によって、RTP1S と HSPA6、STAU2 が細胞内で相互作用関係にあることを確認した。そして、HEK293T 細胞に、OR とともに HSPA6 と STAU2 を過剰発現させると、OR の細胞膜局在量が増えたことから、HSPA6 と STAU2 がそれぞれ OR の細胞膜輸送に関わっていることを確認した(図 2)。

**HSPA6** と **STAU2** が **RTP1S** と協調して **OR** の細胞膜輸送を促進する分子メカニズムの解明までは至っていない。**RTP1S** 自体が 1 回膜貫通タンパク質であり、組み換え体での精製が困難なタンパク質であるため、今後安定した **RTP1S** の獲得ができた場合には、同定した新規タンパク質との分子レベルでの協調作用機構の解析が進むと考えられる。**LCMS** 解析では他にも **OR** 単独発現、**RTP1S** 単独発現、**OR** と **RTP1S** 共発現でそれぞれビオチン化されたタンパク質が見つかった。これらタンパク質の中にも **OR** の細胞膜輸送に関わっているものが存在すると思われることから、今後解析するタンパク質の幅を拡げ、**RTP1S** による **OR** の細胞膜輸送機構の解明を進めたいと考えている。

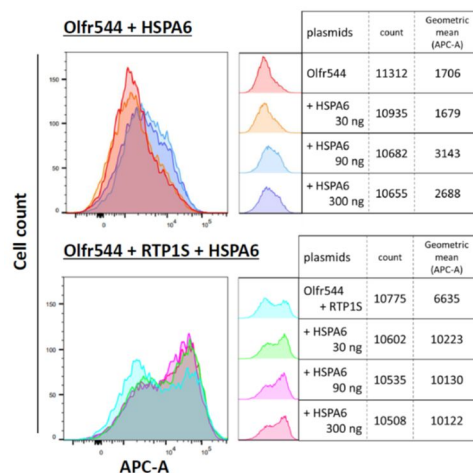


図 2 HSPA6 共発現による Olf544 の細胞膜局在量変化解析

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 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Inoue Ryosuke, Fukutani Yosuke, Niwa Tatsuya, Matsunami Hiroaki, Yohda Masafumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Identification and Characterization of Proteins That Are Involved in RTP1S-Dependent Transport of Olfactory Receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7829 ~ 7829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24097829	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, Abe Masashi, Saito Haruka, Eguchi Ryo, Tazawa Toshiaki, de March Claire A., Yohda Masafumi, Matsunami Hiroaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Antagonistic interactions between odorants alter human odor perception	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2235~2245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2023.04.072	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 Inoue Ryosuke, Fukutani Yosuke, Niwa Tatsuya, Matsunami Hiroaki, Yohda Masafumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Identification and Characterization of Proteins That Are Involved in RTP1S-Dependent Transport of Olfactory Receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7829 ~ 7829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24097829	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, Nakamura Yuko, Muto Nonoko, Miyanaga Shunta, Kanemaki Reina, Ikegami Kentaro, Noguchi Keiichi, Ohsawa Ikuroh, Matsunami Hiroaki, Yohda Masafumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Hot Spot Mutagenesis Improves the Functional Expression of Unique Mammalian Odorant Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 277 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010277	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 Yoshii Tomoya, Takayama Ikumi, Fukutani Yosuke, Ikuta Takashi, Maehashi Kenzo, Yohda Masafumi	4. 巻 38
2. 論文標題 Development of an odorant sensor with a cell-free synthesized olfactory receptor and a graphene field-effect transistor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 241 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00073-y	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 -

1. 著者名 Fukutani Yosuke, Koshizawa Tomoyo, Yohda Masafumi	4. 巻 33
2. 論文標題 Application of Vapor Phase Stimulation Method for Screening of Human Odorant Receptors Responding to Cinnamaldehyde	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 4203 ~ 4203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/SAM.2021.3588	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 武藤野乃子、越澤知世、養王田正文、福谷洋介
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体のN末端システインの機能発現における役割
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齊藤遥、福谷洋介、阿部雅司、江口諒、田澤寿明、Claire A. de March、松波宏明、養王田正文
2. 発表標題 ヒト嗅覚受容体に対する拮抗作用による硫黄系悪臭知覚の抑制
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金牧怜奈、福谷洋介、養王田正文
2. 発表標題 マウス嗅覚受容体のシャペロン非依存的な機能発現に重要なアミノ酸部位の同定
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤野乃子、養王田正文、福谷洋介
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体の細胞膜輸送におけるN末端部位の役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嗅覚受容体のN末端およびC末端欠損の機能的発現に与える影響
2. 発表標題 武藤野乃子、養王田正文、福谷洋介
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野聖友 , 高山郁美 , 福谷洋介 , 養王田正文
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系を用いたRTP1S依存性嗅覚受容体の生産
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野聖友 , 高山郁美 , 福谷洋介 , 養王田正文
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系を用いたRTP1S依存性嗅覚受容体の生産
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮良俊汰、福谷洋介、大脇健、黒田浩介、養王田正文
2. 発表標題 嗅覚受容体の機能分析に関わる匂い分子溶媒の検証
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高山郁美、福谷洋介、吉井智哉、生田昂、前橋兼三、養王田正文
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体とグラフェンセンサーを使用したニオイ検出システムの構築
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤野乃子、越澤知世、養王田正文、福谷洋介
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体のN末端システインの機能発現における役割
3. 学会等名 日本味と匂学会第56回大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 福谷洋介、阿部雅司、斉藤遥、江口諒、田澤寿明、松波宏明、養王田正文
2. 発表標題 Vapor stimulation assayによる揮発性硫黄化合物応答ヒト嗅覚受容体の同定と実用的な悪臭抑制香料の探索
3. 学会等名 日本味と匂学会第55回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yosuke Fukutani
2. 発表標題 Expectations for ionic liquids in mammalian olfactory receptor research
3. 学会等名 Aiming the fusion of chemistry and life science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金牧怜奈、福谷洋介、養王田正文
2. 発表標題 単独で高発現するマウス嗅覚受容体のアゴニスト選択性解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武藤野乃子、福谷洋介、中村祐子、養王田正文
2. 発表標題 ヒトコンセンサス嗅覚受容体の機能活性におけるN末端およびC末端領域の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神津涼奈、福谷洋介、越澤知世、廣橋良彦、鳥越俊彦、養王田正文
2. 発表標題 大腸がん幹細胞における嗅覚受容体OR7C1の機能解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野聖友、福谷洋介、養王田正文
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系におけるReceptor transporting proteinの効果
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福谷洋介、池上健太郎、養王田正文、松波弘明
2. 発表標題 アミノ酸変異による嗅覚受容体の異所発現系での機能発現向上
3. 学会等名 2020年度 日本味と匂学会 第54回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野聖友、福谷洋介、養王田正文
2. 発表標題 哺乳類嗅覚受容体のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系におけるReceptor transporting proteinの効果
3. 学会等名 第9回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮良俊汰、福谷洋介、中村祐子、池上健太郎、松波宏明、養王田正文
2. 発表標題 部位特異的変異による哺乳類嗅覚受容体の機能発現向上
3. 学会等名 第9回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Duke university		