

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24227003

研究課題名(和文) 嗅覚受容体のナチュラルリガンドの同定とその生物学的機能の解明

研究課題名(英文) Identification of natural ligands for olfactory receptors and elucidation of biological function

研究代表者

東原 和成 (Touhara, Kazushige)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：00280925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスが自然界で感知する匂いと嗅覚受容体の対応付けは進んでいない。また、嗅覚受容体は、精巣、心臓、筋肉など、鼻以外の組織でも発現しているが内在性リガンドは同定されていない。本研究では、これら嗅覚受容体のナチュラルリガンドを同定することを目的とした。活性物質精製に適した効率のよい嗅覚受容体アッセイ系を確立した。嗅覚受容体のナチュラルリガンドとして、包皮腺から脂質関連物質の精製・構造決定に成功した。卵巣に発現する嗅覚受容体の内在性リガンドの同定及び機能解析に成功した。動物の社会性行動の理解、化学生態環境の制御、創薬フィールドの拡大という、脳科学、環境問題、医薬領域への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has not been known what kind of odorants mice recognize via olfactory receptors in a natural environment. Olfactory receptors are expressed in non-olfactory tissues, although their endogenous ligands have not been identified. In this study, we aimed to identify natural or endogenous ligands for olfactory receptors. We developed an efficient odorant response assay that was suitable for natural ligand screening. A novel fatty acid derivative released in the preputial gland was found to be a natural ligand for an olfactory receptor. An endogenous ligand for an ovary-expressing olfactory receptor was identified. This study gives insights into areas of animal social behavior and neuroscience, ecology and environmental science, and pharmacology and drug development.

研究分野：生命科学

キーワード：嗅覚受容体 匂い物質 リガンド 生理活性物質 嗅覚

1. 研究開始当初の背景

生物は、生態系の多様かつ複雑な匂い情報のなかから、仲間、敵、異性などの信号を正確に抽出できる能力をもつ。匂い物質は嗅上皮の嗅神経細胞に発現する嗅覚受容体によって感知される。マウスは約千種類の嗅覚受容体をもつ。しかし、そのうち、10%に満たない受容体のリガンドしか見つかっていない。また、現在までの研究は、合成香料リガンドとの対応付けがほとんどであり、自然界で生活するマウスが実際に感知している匂い情報と嗅覚受容体と対応付けされた報告はほとんどない。

一方、嗅覚受容体遺伝子は、脳、精巣、脾臓、心臓、筋肉、腎臓など、鼻以外の組織でも発現していることが明らかにされている。なかでも、精巣と筋肉では嗅覚受容体が機能的に発現しており、それぞれ精子の走化性および筋細胞の凝集に関わっていることが示唆されている。しかし、内在性のリガンドを同定した報告は未だない。

我々はここで、自然界で生活するマウスが嗅上皮に発現する嗅覚受容体で感知する匂い情報、そして生体内で発現する嗅覚受容体の内在性の生理活性物質を総称して「ナチュラルリガンド」と定義する。

2. 研究の目的

本研究では、嗅上皮に発現する嗅覚受容体と鼻以外の生体内組織に発現するマウス嗅覚受容体のナチュラルリガンドを同定することを目的とする。まず、組織や分泌腺の抽出液などクルードなサンプルから受容体リガンドをスクリーニングすることができるアッセイ系を確立する。そして、生体内で合成され、内分泌的に嗅覚受容体発現組織に作用して機能する、嗅覚受容体の内在性ナチュラルリガンドを同定する。また、外分泌されて個体間コミュニケーションに使われる嗅覚受容体のナチュラルリガンドを明らかにする(図1)。

マウスの社会性行動がどのような化学信号とどの嗅覚受容体の組合せで制御されているかが明らかにし、その相互作用をターゲットとして、マウスの繁殖の制御という応用を目指す。また、嗅上皮以外の組織における嗅覚受容体の機能を明らかにして、嗅覚受容体による生体内分子のセンシングという、新たな生命機能の維持戦略を浮き彫りにする。

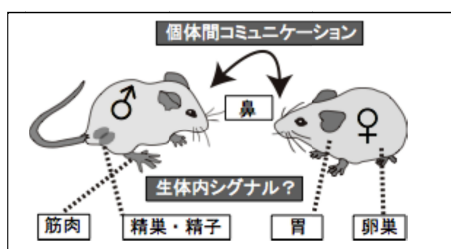


図1 研究の概略

3. 研究の方法

ナチュラルリガンドのスクリーニングの対象とするマウス嗅覚受容体として、鼻に発現している現在までに合成香料リガンドがわかっている嗅覚受容体、鼻以外の組織で発現することが確認されている嗅覚受容体を対象とする。計画は、1)バックグランド応答のない効率の良い嗅覚受容体のアッセイ系の確立、2)各生体内組織や外分泌腺の抽出物に対する嗅覚受容体の応答活性測定、3)ナチュラルリガンドのカラム精製・構造決定、4)同定したナチュラルリガンドの生物学的・生理的機能の解析の順におこなう。これと平行して、バイオインフォマティクス的手法を用いて哺乳類のゲノムワイド解析を行い、保存度の高い嗅覚受容体遺伝子を選抜し、ナチュラルリガンドの同定及び機能解析をおこなう。この研究戦略に成功した場合、他のオフアン嗅覚受容体のナチュラルリガンド大規模スクリーニングを行い、嗅覚受容体ナチュラルリガンドの多くを明らかにする。

4. 研究成果

(1) バックグランド応答のない効率の良い嗅覚受容体のアッセイ系の確立

生体内組織や外分泌腺の抽出物を HEK293 などの培養細胞に投与すると大きなバックグランド応答が引き起こされる。つまり、一般的な培養細胞は内在性のナチュラルリガンドを精製・同定するためのリガンドスクリーニング系として適していない。そこで、組織抽出物からのリガンドスクリーニングに適切な細胞を探索した結果、アフリカツメカエル卵母細胞に、膜移行促進シャペロン RTP1、G タンパク質 Golf、CFTR (cAMP 応答チャネル) を導入した卵母細胞で、バックグランド応答のない最も効率のよい嗅覚受容体の機能発現条件を見出した。これは本研究課題の目的を達成するためのキーとなるアッセイ系である。また、ここで確立した方法は、嗅覚受容体だけでなく他の多くの G タンパク質共役型受容体についても、ナチュラルリガンドのスクリーニングに使えるものであり汎用性が高い。本成果は Nature Chem. Commun. 2013(IF:12.7)で発表した。

(2) Olf288 のナチュラルリガンドの同定

マウスの個体から発せられる匂い物質の産生源として、尿、涙、唾液などの体液を作る7つの外分泌腺に着目した。それぞれの外分泌腺に含まれる物質を抽出し、(1)で確立したアッセイ系を使って、本研究課題で着目した嗅覚受容体のひとつである Olf288

(Olfactory receptor 288) に投与したところ、尿道の横にある外分泌腺である包皮腺の抽出物が電気応答を引き起こした。この応答活性を指標に包皮腺から活性物質を HPLC 精製

し構造解析を行った結果、Olf288 のリガンドとして、哺乳類で新規の物質である(Z)-5-tetradecen-1-ol (Z5-14:OH) を同定することができた。さらに解析を行った結果、Z5-14:OH は性ホルモンの制御を受けて雄マウスでのみ包皮腺から尿に分泌されることが分かった。したがって、Z5-14:OH は雄という性の情報をもつ物質であると考えられた。実際に行動実験を行うと、雌マウスは Z5-14:OH を含む雄マウスの尿に嗜好性を示すことが明らかになった。以上、自然界で雌マウスが Olf288 を使って感じている情報物質、すなわちナチュラルリガンドの一つは、雄の尿から発せられる Z5-14:OH であることを示した。本成果は Nature Chemical Biology 2013 (IF:12.7)に掲載された。

(3) 哺乳類で高度に保存されている嗅覚受容体の発見と生体内機能の解析

現在データベースに登録されている 100 種類以上にも及ぶ哺乳類ゲノム情報を用いて、バイオインフォマティクス的手法を使って、嗅覚受容体遺伝子を探索した結果、アフリカゾウはこれまでに報告されたどの動物よりも多い約 2000 個の嗅覚受容体遺伝子を持つことがわかった。さらに、動物間で比較した結果、有袋盤類の進化の過程で、遺伝子の重複や欠失がなく、しかも遺伝子配列もほとんど変化していない、進化的に高度に保存された嗅覚受容体遺伝子を 3 種類発見した。

そのうち二つの嗅覚受容体は、鼻だけでなく様々な組織に発現していることがわかった。そこでこれらの受容体遺伝子をノックアウトしたところ、ダブルノックアウトマウスで、心臓の変化及び血中のいくつかの因子の顕著な上昇が見られた。これらの結果は、これらの受容体が心臓及び筋組織において重要な機能を担っていることを示唆する。また、これらの受容体の合成香料リガンドを同定することに成功した。現在(1)で確立したアフリカツメガエル卵母細胞を用いたリガンド応答アッセイ系で、内在性のリガンドの探索を行なっている。

今回見出した結果は、嗅覚受容体は、ただ単純に匂いを感知するという役割だけでなく、生体内の組織で化学センサーとして働いているということを示している。本成果の一部は Genome Research 2014 (IF: 11.4)に掲載され、国内外の新聞やマスメディアで広く取り上げられた。

(4) ムスク受容体の発見とナチュラルリガンドの探索

ムスクは麝香鹿のフェロモンとして知られているが、その魅惑的な香り故に産業的にも有用である。我々は先に同定していたマウスのムスク受容体に加えて、ヒトを含む 5 種類の霊長類でムスク受容体を見出し、詳細なリガンド構造活性相関を行った。また、マウ

スはムスクに誘引されるが、マウスが自然界で感じているナチュラルリガンドは雄の包皮腺に存在することが明らかになった。そこで、(1)で確立したアフリカツメガエル卵母細胞でのリガンド応答アッセイ系を用いて、その内在性リガンドの同定に着手し、現在構造決定を行なっている。マウス同士のコミュニケーションに関わる分子であると予想される。本成果の一部は J. Neurosci. 2016 (IF: 6.3)に掲載された。

(5) 精巣、胃、卵巣に発現する嗅覚受容体のナチュラルリガンドの探索と機能解析

嗅上皮以外に精巣と胃に発見が見られる MOR-S1 と、卵巣に特異的に発現している MOR-O1 に着目した。これらの嗅覚受容体を(1)のアッセイ系に供したところ、MOR-O1 は卵巣の抽出物に、MOR-S1 は胃、血、精巣の抽出物に応答を示した。MOR-O1 に関しては、ODS カラムおよび C30 逆相カラムの HPLC によって卵巣から活性物質を精製したところ、ナチュラルリガンドの構造決定に成功した。MOR-O1 ノックアウトマウスの表現系とナチュラルリガンドの卵細胞への効果を検証したところ、MOR-O1 は卵細胞の成長過程に関わるという知見を得ることができている(投稿準備中)。MOR-S1 に関しては、複数の HPLC 精製を経て精巣抽出物から活性物質を得ることができており、現在構造決定を行なっている。

(6) 成果のインパクトと今後の展望

マウス Olf288 受容体のナチュラルリガンド Z5-14:OH は、合成香料リガンドとは構造が全く異なるものであった。今まで対応づけられてきた嗅覚受容体とリガンドの関係のほとんどは自然界での状況を反映しない人工的なものであるということを示したという点で、嗅覚研究領域に大きな学術的インパクトを与えた。その結果、天然物関係の雑誌で一番評価の高い Nature Chemical Biology 誌に発表することができた。本成果は、学術的にも社会的にも影響を与える成果として紹介された。

鼻以外に発現する嗅覚受容体のうち、卵巣に発現する MOR-O1 の内在性リガンドを初めて同定することに成功した(投稿準備中)。また、卵成熟という生物学では大変重要な細胞の成長過程に関わるという知見を得ることができた。哺乳類で高度に保存されている嗅覚受容体は心臓や筋組織において重要な役割を持っていることが示唆された。嗅覚受容体は、創薬ターゲットである G タンパク質共役型受容体ファミリーの約半数、全遺伝子の 1% をも占めているが、嗅上皮以外の組織における嗅覚受容体の機能を明らかにしたということは、嗅覚受容体による生体内分子のセンシングという、新たな生命機能の維持戦略を浮き彫りにしたということでも意義のある成果である。G タンパク質共役型受容

体の大半を占める嗅覚受容体は創薬のターゲットとして無視されていたが、今後、製薬関係で注目されることが期待される。

Z5-14:OH は、哺乳類で初めてみつかった物質であり、脂質代謝産物である。一方で、卵巣での MOR-01 のナチュラルリガンドも、異なった構造をもつもののやはり脂質代謝産物である。これらの結果は、多くの脂質代謝産物が、嗅覚受容体のナチュラルリガンドとなる可能性を示唆しており、ヒトの体臭も脂質代謝産物であることを考慮すると、今後、脂質代謝産物を個体間コミュニケーションのキー物質として着目することによって研究が発展すると思われる。

本研究成果は、マウスの社会性行動がどのような匂いとどの嗅覚受容体で制御されているかが明らかになるだけでなく、その化学分子認識をターゲットとして、マウスの繁殖の制御などにもつながる発展性を持つという点で応用性も高い。動物の社会性行動の理解、化学生態環境の制御、および創薬フィールドの拡大という、脳科学、環境問題、医薬領域への波及効果が見込まれるという点で波及効果が高い。

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8件)

- (1) Sato-Akubara, N., Horio, N., Kato-Namba, A., Yoshikawa, K., Niimura, Y., Ihara, S., Shirasu, M., and Touhara, K. "Ligand specificity and evolution of mammalian musk odor receptors: the effect of single receptor deletion on odor detection"(査読付)
J. Neurosci. 36, 4482-4491 (2016)
- (2) Niimura, Y., Matsui, A., and Touhara, K. "Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals"(査読付)
Genome Research 24, 1485-1496 (2014)
- (3) Yoshikawa, K., Nakagawa, H., Mori, N., Watanabe, H., and Touhara, K. "Unsaturated aliphatic alcohol as a natural ligand for mouse odorant receptor"(査読付)
Nature Chem. Biol. 9, 160-162 (2013)

[学会発表](計31件)

- (1) Kazushige Touhara, "Deciphering ligand-receptor pairs in the olfactory and vomeronasal systems" 17th International Symposium on Olfaction and Taste (Yokohama Pacifico, Japan)
2016年6月5-9日

- (2) Kazushige Touhara, "Chemosensory signals, receptors, and behavior"(Plenary lecture) XXIVth International Conference of European Chemoreception Research Organization (Dijon, France)
2014年9月10-13日
- (3) Kazushige Touhara, "Chemosensory receptors in insects and vertebrates" Gordon Research Conference: Molecular Biology (Lucca, Italy)
2013年4月28日~5月3日

[図書](計2件)

- (1) Yoshikawa, K. and Touhara, K., In Handbook of Olfaction and Gustation, Wiley Blackwell (2015)
- (2) Touhara, K., Niimura, Y., and Ihara, S. In Chemosensory Transduction, Academic Press (2015)

[産業財産権]

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/biological-chemistry/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
東原 和成 (Touhara, Kazushige)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 0280925

(2)研究協力者
伊原 さよ子 (Ihara, Sayoko)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号: 80292788

新村 芳人 (Niimura, Yoshihito)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授
研究者番号: 90396979

吉川 敬一 (Yoshikawa, Keiichi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

堀尾 奈央 (Horio, Nao)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員
研究者番号: 80726448

高井 佳基 (Takai, Yoshiki)
阿部 峻之 (Abe, Takayuki)
佐藤 成見 (Sato, Narumi)

金古 昇士 (Kaneko, Shoji)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・大学
院生