

嗅覚受容体における G タンパク質活性化および脱感作の分子メカニズムの解析

2006 年修了 学生証番号 46522

分子認識化学分野 加藤 綾

指導教員 東原和成助教授

キーワード：嗅覚受容体、GPCR、G タンパク質、脱感作、リン酸化

【序論】

我々の周りには常に匂いが存在する。その匂い環境は決して一定ではなく、匂いを構成する分子の種類も、その濃度も、刻一刻と変化する。視覚から大半の情報を得るヒトと異なり、他の動物にとって匂いの情報は生存に必須なもので、食べ物の在処や天敵の存在といった情報を嗅覚から得ている。周囲の匂い環境の変化を察知するセンサーとして働くのが嗅覚受容体である。嗅覚受容体が属する 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーは、リガンドの結合に伴い構造を変化させて G タンパク質を活性化し、その後すぐに不活性化し定常状態に戻ることが知られている。リガンドを受容し、そのシグナルを伝達するという受容体のオン/オフのスイッチングメカニズムは、生物が外界からの情報に敏捷に対応するために必要な機構である。嗅覚系においても、生物が常に変化する匂い環境に適応するために、匂い受容のスタート地点である嗅覚受容体が素早く活性化し、また素早く定常状態に戻ること、次の匂い受容に備えることが重要であると考えられる。しかし、嗅覚受容体はリガンドと受容体の対応づけがほとんどなされていないため、嗅覚受容体における活性化機構、および脱感作機構に関する知見はほとんど得られていない。そこで本研究は、培養細胞系での効率のよい発現に成功し、詳細なリガンド解析がされているマウス嗅覚受容体 mOR-EG を用い、嗅覚受容体が G タンパク質を活性化する際の分子機構、および活性化後に定常状態に戻るための過程である脱感作機構を明らかにすることを目的とした。

【結果および考察】

1. 嗅覚受容体における G タンパク質活性化機構の解析

mOR-EG を HEK293 細胞に発現させ、アゴニストであるオイゲノール (EG) で刺激を行うと、mOR-EG は HEK293 細胞内在性の $G\alpha_s$ と共役し、その結果細胞内 cAMP 量が増加する。一方、様々な GPCR と共役する $G\alpha_{15}$ と mOR-EG を HEK293 細胞に共発現させ EG 刺激を行うと、ホスホリパーゼ C 経路を介した細胞内 Ca^{2+} の上昇が見られる [図 1]。そこで、G タンパク質と相互作用を持つと考えられる細胞内ループおよびカルボキシル末端領域に存在するアミノ酸の部位特異的変異体を作製し、cAMP アッセイでの $G\alpha_s$ を介した EG 応答と Ca^{2+} イメージングでの $G\alpha_{15}$ を介した EG 応答を比較することで、mOR-EG において $G\alpha_s$ との共

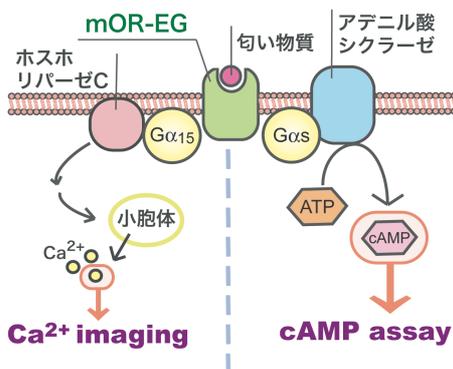


図1. 本研究で用いた匂い応答解析法

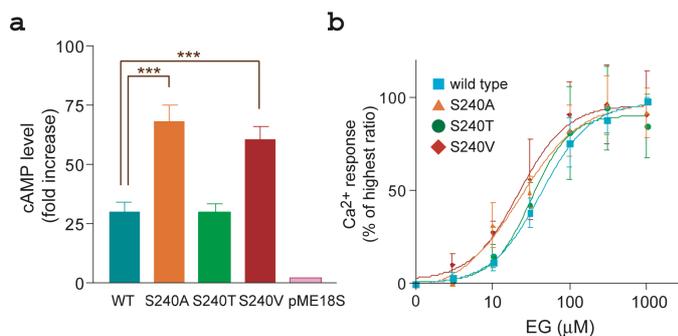


図2 S240AおよびS240V変異体では $G\alpha_s$ 活性化効率が上昇する
(a) Ser²⁴⁰をアラニンもしくはバリンに置換した変異体では、EG刺激による $G\alpha_s$ を介したcAMP産生量が有意に上昇する。(b) 一方、EG刺激による $G\alpha_{15}$ を介した細胞内 Ca^{2+} の上昇は野生型と変わらない。

役に関わるアミノ酸の同定を目指した。その結果、細胞内第 3 ループに存在する Ser²³¹、およびカルボキシル末端領域に存在する Ser²⁹²、Thr³⁰¹ の変異体では、Gα15 を介した細胞内 Ca²⁺ の上昇は野生型と変わらず認められるが、Gαs を介した細胞内 cAMP 量の増加が認められなくなる事が明らかとなった。そのため、これらのアミノ酸は G タンパク質との共役に関わると考えられる。

次に、嗅覚受容体の活性型への構造変化メカニズムを解明するための足がかりとして、活性型への構造変化の際にダイナミックな動きをすることが知られている第 6 番目の細胞膜貫通領域のアミノ酸に部位特異的変異を導入し、匂い応答解析を行った。その結果、Ser²⁴⁰ 変異受容体では、Gα15 を介した Ca²⁺ の上昇は野生型と変わらないが、Gαs を介した細胞内 cAMP 産生量が有意に増大した [図 2]。そのため Ser²⁴⁰ は、G タンパク質の活性化を調節するアミノ酸であると考えられる。

2. 嗅覚受容体における脱感作機構の解析

部位特異的変異体を用いた匂い応答解析より、匂い分子の受容に伴う G タンパク質の活性化に関わるアミノ酸を同定した。次に、G タンパク質の活性化後に起こる、嗅覚受容体の脱感作の分子メカニズムの解明を目指した。まず、嗅覚受容体における脱感作の有無を検証するために、アゴニストで前処理した細胞を用いて匂い応答解析を行った。その結果、mOR-EG のアゴニストで前処理を行った細胞では、その後の EG 応答が有意に抑制されることを見いだした [図 3]。この匂い応答の抑制は、mOR-EG のリガンドとならない分子や、mOR-EG と同様に Gαs と共役し cAMP を介した情報伝達経路を活性化するβ₂-アドレナリン受容体のアゴニスト (Iso) で前処理を行った場合には見られない。すなわち、細胞内情報伝達に関わる分子ではなく、mOR-EG そのものがアゴニスト刺激によって不活性化することが示唆される。次に、嗅覚受容体の不活性化に受容体のリン酸化に関わるかどうか検証するため、嗅上皮に多く発現する GPCR リン酸化酵素である GRK3、およびリン酸化されたタンパク質を認識するβアラレスチン 2 を嗅覚受容体と共発現させ、匂い応答を測定した。その結果、GRK3 およびβアラレスチン 2 を共発現した細胞において EG 応答が抑制された。この結果は、嗅覚受容体のリン酸化にこれらの分子に関わる可能性を示唆している。

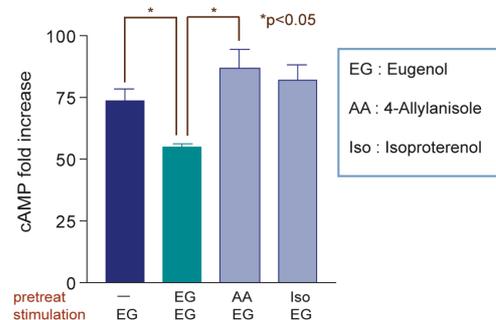


図3. mOR-EGのアゴニストで前処理を行うとその後のオイゲノール応答が抑制される

mOR-EGを発現させたHEK細胞を、mOR-EGのアゴニスト(EG)、mOR-EGのアゴニストとならない分子(AA)、mOR-EGと同じcAMP経路を介した情報伝達を行うβ₂-アドレナリン受容体のアゴニスト(Iso)で前処理し、cAMPアッセイによりオイゲノール刺激に対する匂い応答を測定した。mOR-EGのアゴニストで前処理を行った細胞では、オイゲノール応答が有意に抑制された。

【結論】

- マウス嗅覚受容体 mOR-EG において、Gαs との共役に関わるアミノ酸を同定した。
- 嗅覚受容体の活性型への構造変化において、保存性の高いアミノ酸である Ser²⁴⁰ が重要であることを明らかにした。
- アゴニスト刺激によって、GRK3 およびβアラレスチン 2 が関与する嗅覚受容体の脱感作が起きることを明らかにした。