

嗅覚受容体の効率の良い匂い応答測定系の確立

2008年3月修了

先端生命科学専攻 分子認識化学分野

学生証番号 66555 氏名 吉川 敬一

指導教員 片岡宏誌教授、東原和成准教授

キーワード：嗅覚受容体、匂い、Gタンパク質共役型受容体、Ca²⁺ imaging 法、Myr-Ric8A

【序論】

匂い分子は鼻腔内において G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属する嗅覚受容体によって受容される。嗅覚受容体遺伝子はヒトでは 802 個、マウスでは 1391 個が存在し、哺乳類の GPCR ファミリーにおいて最大の多重遺伝子群を形成する。一方、匂い分子は数十万種類ともいわれ、さらにその組み合わせや量比によって膨大な種類の「匂い」が存在する。これらの複雑な匂い情報を約千個あまりの嗅覚受容体で認識、識別する仕組みを包括的に理解するためには、個々の嗅覚受容体について匂いリガンドを決定し、リガンド特異性を明らかにすることが重要である。一般的に GPCR の機能解析には、培養細胞を用いた *in vitro* での発現系が有効である。しかし、嗅覚受容体は培養細胞における細胞膜上の発現量が極めて少なく、匂い応答を測定することが困難である。そのため、未だ殆どの嗅覚受容体が、匂いリガンドと対応付けられていないオーファン受容体である。本研究では、嗅覚受容体と匂いリガンドとの対応付け、およびリガンド特異性の解析に有効な、培養細胞における効率の良い匂い応答測定系を確立することを目指した。

【結果および考察】

1. cAMP assay 法における効率の良い匂い応答測定系の確立

嗅覚受容体を HEK293 細胞に発現させ、匂いリガンドで刺激を行うと、HEK293 細胞内在性の G タンパク質 α サブユニット $G_{\alpha s}$ を介して、細胞内 cAMP 量を増加させる。この cAMP 量の増加を測定する手法が cAMP assay 法である。近年、嗅覚受容体の細胞膜移行を促進させるシャペロン因子 RTP1、および *in vivo* で嗅覚受容体が共役する $G_{\alpha olf}$ に対する GDP-GTP 交換促進因子 (GEF) として Ric8B が報告された。そこで、リガンドが既知である 3 種類のマウス嗅覚受容体を用いて cAMP assay 法を行い、最も効率の良い匂い応答測定条件を検討した。その結果、培養細胞における cAMP 応答測定には、嗅覚受容体、RTP1、Ric8B を HEK293 細胞に共発現させ、HEK293 細胞内在性の $G_{\alpha s}$ を介した cAMP 濃度の上昇を測定する条件が最適であることが示された。

2. Ca²⁺ imaging 法における効率の良い匂い応答測定系の確立

Ca²⁺ imaging 法は、培養細胞に Ca²⁺ 感受性の蛍光指示薬を導入することで細胞内 Ca²⁺ 濃度変化を測定する手法であり、GPCR のリガンドアッセイに広く用いられてきた。嗅覚受容体については、様々な GPCR と共役する $G_{\alpha 15}$ を共発現させることで、匂い応答を細胞内 Ca²⁺ 濃度として測定することができる。 $G_{\alpha s}$ 経路の活性促進効果を示した Ric8B のホモログとして Ric8A がある。2006

年、脂質修飾（ミリスチル化）配列を加えた Ric-8A（Myr-Ric8A）が $G\alpha_q$ に対して GEF として作用し、HEK293T 細胞においてフォスホリパーゼ C（PLC）を介したシグナルを増幅するという報告がなされた。そこで、Myr-Ric-8A が同じ $G\alpha_q$ ファミリーに属し、PLC 経路を活性化する $G\alpha_{15}$ にも GEF として作用するのではないかという仮説を立て、Myr-Ric-8A を嗅覚受容体の Ca^{2+} imaging 法に適用した。その結果、Myr-Ric-8A が $G\alpha_q$ だけでなく $G\alpha_{15}$ に対して GEF として機能し、嗅覚受容体の匂い応答が顕著に増幅されることが明らかとなった。さらに条件検討を行った結果、 Ca^{2+} imaging 法においては RTP1、Myr-Ric8A 共発現条件が最適であることが示された。

3. オーフアン嗅覚受容体の匂いリガンド同定

Myr-Ric8A を適用した Ca^{2+} imaging 法を用いて、オーファン嗅覚受容体の 1 つである MOR139-3 のリガンドスクリーニングを行った。その結果、MOR139-3 と RTP1、Myr-Ric8A を共発現させることで eugenol、m-cresol、2-heptanone に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が測定された。一方、これらの匂い応答は MOR139-3 と RTP1 のみを共発現させた細胞では測定されなかった（図 1）。また、Ric8B、RTP1 共発現条件を用いた cAMP assay 法を用いても、 Ca^{2+} imaging 法によって示されたリガンド特異性と整合性のある結果が得られた。これらの結果は、嗅覚受容体と匂いリガンドとの対応付け、およびリガンド特異性の解析を行うために、本研究において確立した匂い応答測定系（図 2）が極めて有効であることを示すものである。

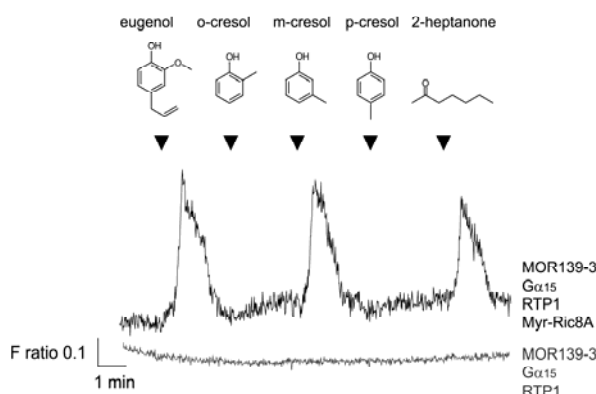


図1 Myr-Ric8Aを適用した Ca^{2+} imaging法によるオーファン嗅覚受容体のリガンド同定

オーファン嗅覚受容体MOR139-3と共に $G\alpha_{15}$ 、RTP1、Myr-Ric8A（上）もしくは $G\alpha_{15}$ 、RTP1（下）をHEK293細胞に発現させ、各匂い分子に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を測定した。各匂い分子の濃度は $300\mu M$ であり、矢頭の時間に投与した。

【結論】

- ・嗅覚受容体、Ric8B、RTP1 共発現条件が、cAMP assay 法を用いた匂い応答測定に最適であることを示した。
- ・ Ca^{2+} imaging 法において、Myr-Ric8A が嗅覚受容体の Ca^{2+} 応答を上昇させることを明らかにした。
- ・改善した Ca^{2+} imaging 法を用いて、オーファン嗅覚受容体 MOR139-3 のリガンドを同定した。

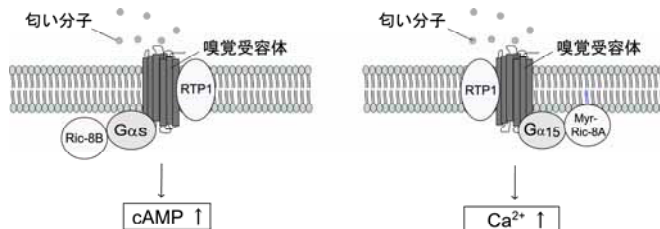


図2 本研究で確立した匂い応答測定系