

博士学位論文

嗅覚受容体の匂い分子応答に対するシトクロム P450 の効果

Effect of cytochrome P450 on the response of olfactory receptors

指導教官：養王田 正文 教授

東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻 博士後期課程  
浅川 賢史





## 目次

|   |    |
|---|----|
| 第1章 序論.....                                     | 6  |
| 1-1. 嗅覚研究の動向.....                               | 6  |
| 1-2. 嗅覚システム.....                                | 7  |
| 1-3. 嗅覚受容体(Odorant receptor: OR).....           | 7  |
| 1-3-1. 嗅覚受容体の多様性.....                           | 7  |
| 1-3-2. 嗅覚受容体が介するシグナル伝達機構.....                   | 9  |
| 1-3-3. 嗅覚受容体の基本構造.....                          | 11 |
| 1-4. 嗅覚受容体の匂い分子応答.....                          | 11 |
| 1-4-1. 嗅覚受容体と匂い分子との相互作用.....                    | 11 |
| 1-4-2. 匂い分子認識ポケット.....                          | 14 |
| 1-4-3. 匂い分子の結合による構造変化.....                      | 15 |
| 1-4-4. 嗅覚受容体の匂い分子認識以外の役割.....                   | 16 |
| 1-5. 嗅覚受容体の機能的発現を向上させる因子.....                   | 17 |
| 1-5-1. Rho-tag.....                             | 17 |
| 1-5-2. 嗅覚受容体の膜局在を助けるアクセサリータンパク質.....            | 17 |
| 1-6. 匂い分子に作用する因子.....                           | 19 |
| 1-6-1. 一般的な匂い物質の特徴.....                         | 19 |
| 1-6-2. 匂い分子結合タンパク質.....                         | 19 |
| 1-6-3. 鼻の粘液に存在している匂い分子の構造を変化させる酵素.....          | 20 |
| 1-7. シトクロム P450.....                            | 21 |
| 1-7-1. シトクロム P450 の基本構造.....                    | 21 |
| 1-7-2. 鼻の粘膜に発現しているシトクロム P450.....               | 21 |
| 1-7-3. CYP1a2.....                              | 22 |
| 1-8. 嗅覚受容体の機能発現解析.....                          | 22 |
| 1-8-1. 嗅覚受容体発現細胞を用いた機能解析.....                   | 22 |
| 1-8-2. 嗅覚神経細胞における嗅覚受容体の発現解析.....                | 23 |
| 1-8-3. 嗅覚受容体の発現.....                            | 24 |
| 1-9. 本研究の目的.....                                | 24 |
| 第二章 培養細胞における嗅覚受容体の匂い分子応答に対するシトクロム P450 の効果..... | 26 |
| 2-1. 緒言.....                                    | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 2-2. 実験材料 .....                                     | 26 |
| 2-2-1. 使用した匂い分子、リガンド試薬.....                         | 26 |
| 2-2-2. 使用したプラスミド.....                               | 27 |
| 2-2-3. 菌株 .....                                     | 29 |
| 2-2-4. 宿主細胞 .....                                   | 29 |
| 2-2-5. 菌体培養用の液体培地 .....                             | 29 |
| 2-2-6. 細胞培養液.....                                   | 29 |
| 2-2-7. 試薬 .....                                     | 30 |
| 2-2-8. 使用した機器 .....                                 | 30 |
| 2-3. 実験方法 .....                                     | 31 |
| 2-3-1. 細胞の培養.....                                   | 31 |
| 2-3-2. OR のリガンドアッセイ .....                           | 32 |
| 2-3-3. P450 activity assay.....                     | 33 |
| 2-3-4. Surface staining .....                       | 34 |
| 2-3-5. GC-MS .....                                  | 35 |
| 2-4. 実験結果.....                                      | 36 |
| 2-4-1. アセトフェノン応答する OR のスクリーニング .....                | 36 |
| 2-4-2. CYP による OR のアセトフェノン応答性の変化.....               | 37 |
| 2-4-3. CYP1a2 の機能的発現の確認 .....                       | 38 |
| 2-4-4. Surface staining による OR の細胞膜局在の確認 .....      | 39 |
| 2-4-5. GC-MS による Hana3A 細胞培地の成分分析.....              | 40 |
| 2-4-6. MOR161-2 のサリチル酸メチル応答および CYP1a2 の効果.....      | 44 |
| 2-4-7. アセトフェノンとサリチル酸メチルの混合物をリガンドとしたアッセイ .....       | 45 |
| 2-4-8. 反応中間体をリガンドとしたアッセイ .....                      | 46 |
| 2-4-9. CYP1a2 発現細胞の培養上清をリガンドに用いたアッセイ.....           | 47 |
| 2-4-10. CYP1a2 の効果を検証する $\beta$ 2AR のリガンドアッセイ ..... | 48 |
| 2-5. 考察および小括.....                                   | 49 |
| 第三章 マウスの嗅上皮における嗅覚受容体の匂い分子応答の解析.....                 | 52 |
| 3-1. 緒言 .....                                       | 52 |
| 3-2. 実験材料.....                                      | 52 |
| 3-3. 実験方法 .....                                     | 54 |
| 3-3-1. マウスの嗅上皮の取得 .....                             | 54 |

|  |    |
|--|----|
| 3-3-2. Fluorescence in situ hybridization..... | 54 |
| 3-4. 実験結果.....                                 | 58 |
| 3-4-1. MOR161-2 の匂い分子応答.....                   | 58 |
| 3-4-2. Olf1505 の匂い分子応答.....                    | 61 |
| 3-5. 考察および小括.....                              | 63 |
| 第四章 総合考察.....                                  | 65 |
| 参考文献.....                                      | 69 |
| 謝辞.....  | 76 |

## 第 1 章 序論

### 1-1. 嗅覚研究の動向

味覚や嗅覚といった生物のケミカルセンシング機構は、食の喜びから子供時代の思い出まで、我々の経験に深く影響を与えている。特に嗅覚は、多くの生物にとってエサとなる物質の探求や識別、親や天敵といった他個体とのコミュニケーションなど重要な役割を担っている。こういった生物学的な重要性があるにもかかわらず、嗅覚に関する研究は歴史的に視覚・聴覚分野に比べ遅れていた。意識する・しないに関わらず起こる刺激の多用さ・複雑さに加え、シグナル伝達のメカニズムの基盤さえ未解明であるという難点があったからである。

嗅覚の媒体となる匂い物質は揮発性の低分子有機化合物であるが、我々の生活空間に数十万種類も存在するといわれている。これら多種多様な低分子化合物はそれぞれ特有の「匂い」をもっているが、匂い物質ひとつひとつに対する感じ方には個人差があるだけでなく、同じ匂い物質でも嗅ぐときの環境や体調によって匂いの質が異なったり、濃度の違いで全く異なる匂いとして認識されたりする。その一方で、匂い物質の光学異性体や立体異性体を正確に嗅ぎ分けることができる。このように曖昧な評価と正確な識別という相反する特徴を併せ持つ嗅覚システムの、匂い認識機構を分子レベルで解明することは大変興味深く、基礎研究的にも生物工学的にも期待されている。

嗅覚研究分野の進展は、生体の嗅覚機構の原理を人工物で模倣したバイオミメティクス的嗅覚センシングシステム(バイオエレクトロニックノーズ)への応用という魅力的なアイデアを生み出した【1】。こういったシステムは、医療、食品や化粧品分野に加え、毒ガス・爆薬などの危険化学物質、病原体の検出など、近年急速に意識の高まる環境面への応用も見込める。より嗅細胞に近い感度と特異性、多数の匂い認識能を持つセンシングシステムの開発のためにも、嗅覚分野の知見集積が望まれている。



## 1-2. 嗅覚システム

環境中に数十万種類存在するとも言われている多種多様な匂い物質を、受容し情報処理しているのが嗅覚系である(Fig. 1-1)。鼻腔に入ってきた匂い分子は、嗅上皮(Olfactory epithelium)に並んだ嗅覚神経細胞(Olfactory Sensory Neuron)に発現している嗅覚受容体(Olfactory receptor/Odorant receptor: OR)に結合する【2】。嗅覚神経細胞は受容した匂い分子の情報を電気信号に変換し、1本の軸索を介して脳の嗅球(Olfactory Bulb)へと伝える。嗅球の表面には約 2,000 個の糸球体(glomerulus)が存在しており、1つの嗅覚神経細胞の軸索は 1つの糸球体へと投射し、そこで嗅球の2次ニューロンである僧帽細胞(Mitral Cell)及び房飾細胞(Tufted Cell)の樹状突起とシナプスを形成する。すなわち、糸球体は末梢からの匂い情報を脳の中へと伝える入り口であり、匂いの識別のための重要なモジュール構造である【3, 4】。2次ニューロンは糸球内で受け取った情報を、嗅索(Lateral Olfactory tract)を介して嗅皮質(Olfactory cortex)の様々な領域へと伝達する。その後、匂いの情報は脳新皮質、視床など、脳の他の領域へと伝えられる【5】。

り、匂いの識別のための重要なモジュール構造である【3, 4】。2次ニューロンは糸球内で受け取った情報を、嗅索(Lateral Olfactory tract)を介して嗅皮質(Olfactory cortex)の様々な領域へと伝達する。その後、匂いの情報は脳新皮質、視床など、脳の他の領域へと伝えられる【5】。

## 1-3. 嗅覚受容体(Odorant receptor: OR)

### 1-3-1. 嗅覚受容体の多様性

1991年に Linda Buck 博士と Richard Axel 博士が、嗅覚受容体は G タンパク質共役受容体(GPCR)であること、多重遺伝子ファミリーを形成していること、嗅覚神経細胞に特異的に発現していること、これら三点の仮説を立て、約 1000 個からなる嗅覚受容体遺伝子群を

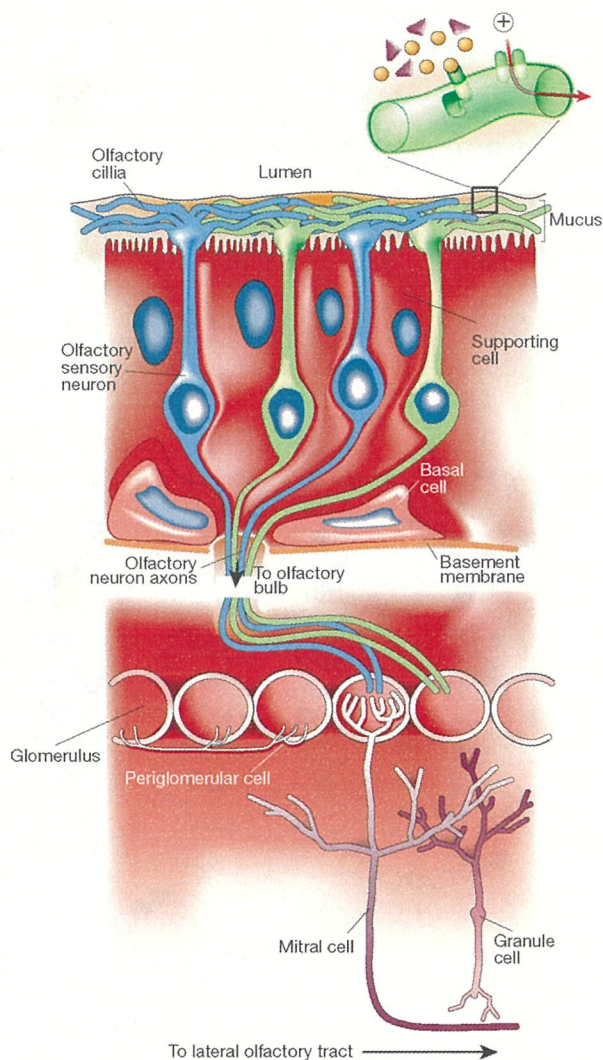


Fig. 1-1 嗅覚神経系の模式図

鼻腔に入ってくる匂い分子の情報は嗅上皮の嗅細胞で受容され、軸索を介して脳の嗅球へと伝えられる。その情報は糸球内シナプスで2次ニューロン(僧帽細胞)へと伝達され、さらに嗅上皮へと運ばれる。【6】より引用

クローニング、同定することに成功した【7】。ラット嗅細胞の mRNA を基に、既知の G-タンパク質関連受容体(グアノシン三リン酸結合タンパク質関連受容体 GCR、ロドプシンやβアドレナリン受容体など)のアミノ酸配列を基にしたオリゴヌクレオチドをプライマーにし、RT-PCR 法で原形質膜を 7 回膜貫通するドメインを持つ嗅覚受容体をコードする cDNA が、初めてクローニングされた(Fig. 1-2)。この研究結果は 2004 年にノーベル医学生理学賞の対象論文となり、ケミカルセンシング研究を最前線へと押し上げるのと同時に、嗅覚分野の関心を嗅覚受容体へと集中させるきっかけとなった。

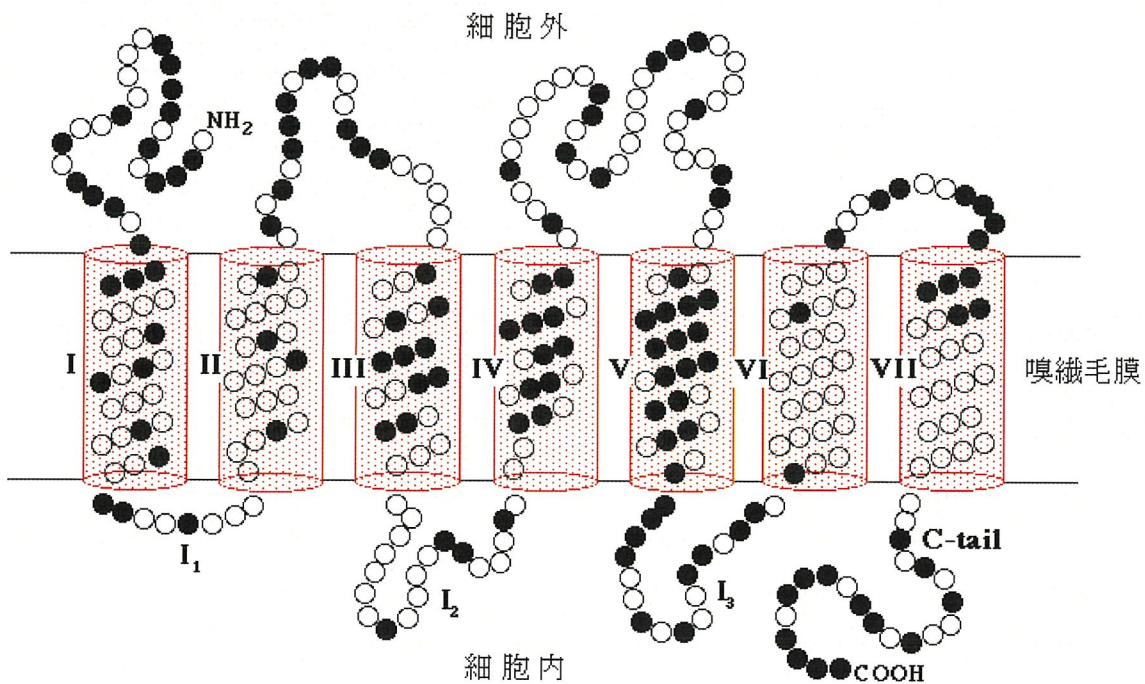


Fig. 1-2 嗅覚受容体の分子モデル

嗅覚受容体は、細胞外に N 末端、細胞内に C 末端がある膜 7 回貫通型受容体(GPCR)で、アミノ酸配列が異なる多数の種類のものがある。ラットやマウスでは、約 900 種類、ヒトでは約 350 種類ある。白丸印は、他の受容体と相同なアミノ酸残基を、黒丸印は受容体による変異するアミノ酸残基を示す。変異の大きい膜ドメイン III、IV、V が匂い分子と結合するポケット部位、細胞内ドメイン I<sub>2</sub>、I<sub>3</sub>、C 末鎖が G-タンパク質との関連部位である。

嗅覚受容体遺伝子の総量は生物種によって様々である。マウスなどのげっ歯類は 1200 以上の遺伝子をもっているがそのうち実際に機能を有するのは約 900 個とされ【8, 9】、一方ヒトでは 700 個の遺伝子のうち機能を持つものは半数の 350 個程度にとどまると言われている【10】。こうした違いはマウス側の遺伝子重複とヒト側の大規模な遺伝子欠失の両方に起因している【11】。それでいて嗅覚受容体遺伝子は、他の遺伝子と比べて急速に多様化し、マウスとヒトとの間ですらオルソログな遺伝子対を認識することが難しい【12】。嗅覚受容体ファミリーは魚類から哺乳類に至るまで広範に存在しているが、シンプルな脊索動物の祖先である *Ciona*(ユウレイゴヤ: 脊索動物であるホヤの一種)には存在していない【13】。



遺伝子レベルのみならずその発現戦略も生物種間で様々である。脊椎動物は約一千万の嗅覚神経細胞を持つが、一細胞につき発現する嗅覚受容体は一種類しかない”One receptor, one neuron”という厳密な発現様式にのっとっている(Fig.1-3) 【14, 15】。

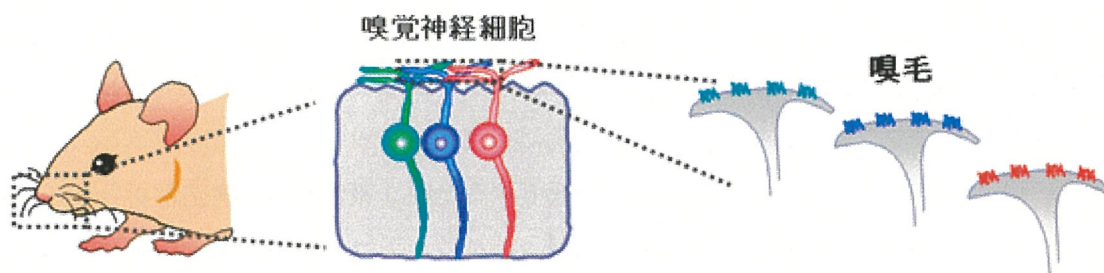


Fig.1-3 哺乳類の嗅覚受容体発現様式

哺乳類の嗅覚神経細胞は鼻粘膜上皮にある。各神経細胞はそれぞれ一種類の嗅覚受容体を発現している。嗅覚神経細胞の嗅毛を3つ右に示した。嗅毛上に示した色違いの受容体はそれぞれ異なる嗅覚受容体である。

### 1-3-2. 嗅覚受容体が介するシグナル伝達機構

嗅覚神経細胞の先端部は外界（外気）と接触している。この先端部の膜に、N末端を細胞外側に、C末端を細胞質側に突出させた形で嗅覚受容体が存在している。Gタンパク質は細胞膜の細胞質側に存在し、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ のサブユニットから成る三量体構造をとっている。 $\alpha$ サブユニット( $G\alpha$ )はGTPase活性をもつスイッチタンパク質で、GTPを結合すると活性化型( $G\alpha$ -GTP)になり、GDPを結合すると不活性化型( $G\alpha$ -GDP)になる。

呼吸により鼻腔へ入り込んだ匂い分子は、粘液層に拡散して嗅覚神経細胞先端へ到達し嗅覚受容体と結合する。嗅覚受容体は、細胞質側でGタンパク質 $\alpha$ サブユニット Golf と相互作用しているが、リガンドとなる匂い分子が結合すると構造変化を起こして Golf を活性化する。活性化された Golf はアデニル酸シクラーゼⅢ(ACⅢ)を活性化し、細胞内の環状アデノシンリン酸(cAMP)濃度を上昇させる。cAMPによって環状ヌクレオチド開口型カチオンチャンネルが開き、細胞外から  $Ca^{2+}$ イオンが流入し先端膜が脱分極し、また二次作用として  $Ca^{2+}$ 開口型塩素イオンチャンネルが開くことでさらに脱分極が進行する(Fig. 1-4)。この脱分極には、ナトリウムカリウム塩素イオン共輸送体も関わっているとされる【16】。匂い分子の情報はこうして電気刺激に変換されて嗅覚神経細胞の軸索を伝わり、嗅球にある糸球体へ収束・濃縮される。糸球体は二次神経細胞の樹状突起と接続しており、匂い刺激信号は嗅上皮に投射されて最終的に脳で処理される(Fig. 1-1)【17】。

前述の”One receptor, one neuron”の法則に則り、一つの嗅覚神経細胞はただ一種類の嗅

覚受容体を選択的に発現しており【14, 15】、同種類の嗅覚受容体を発現する嗅覚神経細胞の軸索はただ一つの糸球体へと収束する【18】。電気刺激がどの糸球体からもたらされたものなのか、その組み合わせパターンによって匂い分子の判別がなされていると考えられている。

また、GPCR と G タンパク質の間にはある程度の特異性が見られるため、特定の GPCR を実験的に発現させる場合はそれに対応した G タンパク質を用いることが必要である。さらに GPCR の G タンパク質結合部位に特異的に作用する G タンパク質  $\alpha$  サブユニットや代替する物質がないと、アゴニストの結合が低下するという報告が結晶構造解析と分子シミュレーションの双方から報告された【19, 20】。これは、アゴニストの結合によって GPCR が構造変化を引き起こすが、その後 G タンパク質が結合しないと構造変化した GPCR が不安定化になり、アゴニストの結合が解除され不活性状態に戻ってしまうということである。

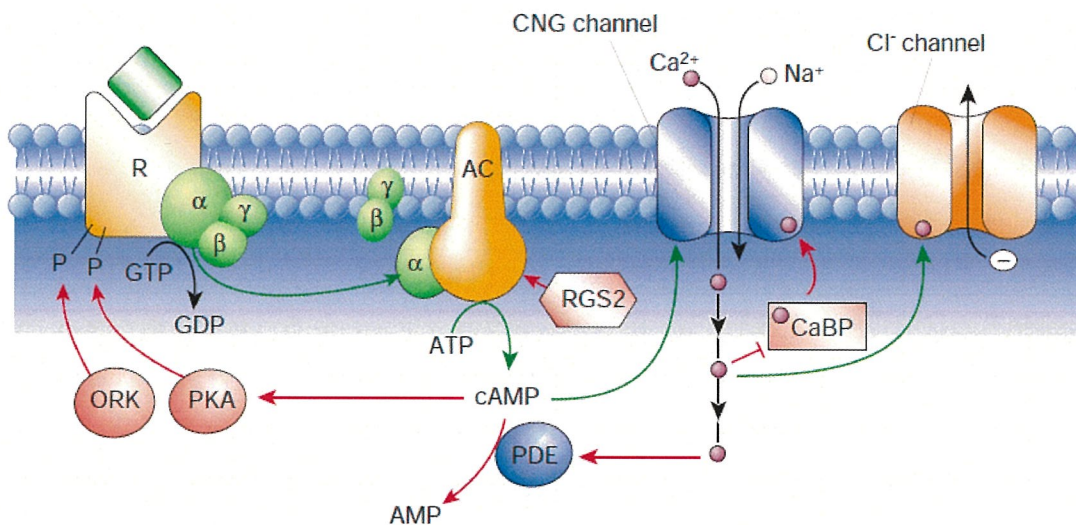


Fig.1-4 哺乳類の嗅覚神経細胞でのシグナル伝達機構

緑矢印:受容体の匂い認識を発端とする、一連の流れ。

リガンドとなる匂い分子と結合した嗅覚受容体は三量体 G タンパク質を活性化させる。活性化した Golf はアセチルコリン受容体 (ACIII) を活性化し、遊離している ATP を cAMP へと変換させる。cAMP の増加は環状ヌクレオチド開口型カチオンチャネルの開門を促し、Na<sup>+</sup>や Ca<sup>2+</sup>が細胞内に流入することにより脱分極、さらに Ca<sup>2+</sup>依存的なアニオンチャネルが開きさらに脱分極が進行する。加えて、cAMP は細胞内シグナル伝達を制御するプロテインキナーゼ A (PKA) を活性化、さらに cAMP を転写因子とする遺伝子発現にも作用する。

赤矢印:嗅覚受容体の活性化により、嗅覚神経細胞核内で生じる機構。

PKA による遺伝子発現と活性化 G タンパク質による遺伝子発現が制御されている。



### 1-3-3. 嗅覚受容体の基本構造

光、匂い、味、フェロモンなどの外来刺激や、神経伝達物質、ホルモン、ヌクレオチド、Ca イオンなど内因性刺激を感知する細胞センサーは大部分が G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) スーパーファミリーに属する。このスーパーファミリーの中でも、嗅覚受容体はその半分近くを占めている。

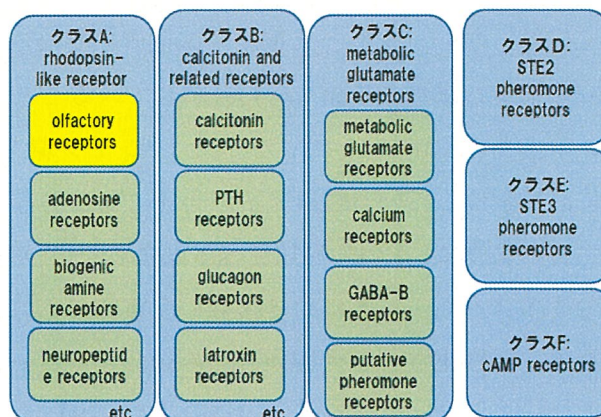


Fig.1-5 GPCR の各クラスに属する受容体  
嗅覚受容体は class A に属する

GPCR は、配列モチーフに基づいて

class A、class B、class C、class D、class E、およびサブファミリーF/S の6種類に区分される(Fig. 1-5)【21】。その中で嗅覚受容体は class A に属し、さらに水棲動物が保持する class I と、陸棲動物になってから出現したと考えられる class II とに分けられる【22】。2000年に、class A に属し、GPCR の代表例として研究されてきたロドプシンの結晶構造が明らかにされ【23】、これを鋳型として嗅覚受容体のモデル構造が推測されるようになった。2007年には class A に属するアドレナリンβ2 受容体(β2AR)の結晶構造が明らかにされた【24】。しかし嗅覚受容体の結晶構造は未だ明らかとなっていない。

### 1-4. 嗅覚受容体の匂い分子応答

#### 1-4-1. 嗅覚受容体と匂い分子との相互作用

嗅覚受容体の特性はロドプシンをはじめとする class A GPCR と基本的に共通しているが、相違点があることも明らかになってきた。ロドプシンやβ2-アドレナリン受容体など class A に属する他の GPCR のリガンド選択性は高く、閾値も nM オーダーと非常に低い。しかし嗅覚受容体の閾値は数百 nM~数百μM と比較的高いうえ、リガンド選択性は他の GPCR のものと比べると低く、嗅覚受容体の種類や、リガンドとなる匂い分子によって大きく変動する【25】。これは、嗅覚受容体が匂い分子をその全体構造でなく、部分的な構造で大まかに認識しているためと考えられている【26】。例えば、可動性の長鎖を有する脂肪酸分子は様々な構造をとることが可能で、そのため脂肪酸分子に対応する嗅覚受容体は近縁の分子ファミリーも認識することができる【27】。強固な環構造を持つ分子の場合はもう少し複雑なようである。マウスの嗅覚受容体 mOR-EG は Eugenol (Fig. 1-6) をはじめとする基本骨格の類似した 22 種類の匂い分子に応答するが、置換基がアルデヒド基、アリル基、エチル基など全く異なるものでも同程度の親和性で認識するなど、リガンド認識能の柔軟

性が示唆される一方で、同じ位置にカルボキシル基やアミノ基を持つ別の匂い分子には全く応答しない。また、二重結合の位置の異なる異性体はリガンドにならないなど、厳密に立体構造を識別する面も持ち合わせていることもわかっている。さらに、mOR・EGのリガンドである **Eugenol** に関しては、ベンゼン環上の置換基の配置が重要であり、ベンゼン環に直接配位している酸素原子が共通に存在することが分かった【25】。

このように、1つの嗅覚受容体は複数の匂い分子を異なる親和性で認識する。一方、匂い分子のほうも一種類につき複数の受容体の応答を誘導し、それぞれ異なる親和性で認識される。活性化される受容体の組み合わせパターンが、多種多様な匂い分子それぞれの特有のコードとなっている(Fig. 1-7a)【27, 28】。同じ匂い分子でも、濃度によって違った匂いとして認識されるという現象も、低濃度のときと高濃度のときとで活性化される嗅覚受容体コードが異なるということで説明できる(Fig. 1-7b, 1-8)【27, 29, 30】。

近年の研究で、嗅覚受容体にアンタゴニズムが存在することがわかってきた【31】。ある受容体にアンタゴニストとして働く匂い分子は、別の嗅覚受容体に対してアゴニストとして働くことが報告されている。匂い分子を二種類以上混ぜた際、混ぜる前の単純な足し算ではなく、全く新しい組み合わせパターンの応答が起こることもこのアンタゴニズムによるものと考えられている【32】。

このように、嗅覚受容体とそのリガンドとなる匂い分子の間には通常のリセプターとリガンドの関係よりも複雑な機構を介していると考えられる。

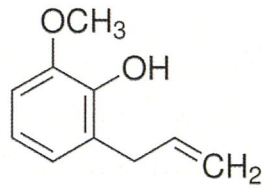


Fig. 1-6 Eugenol の化学構造式

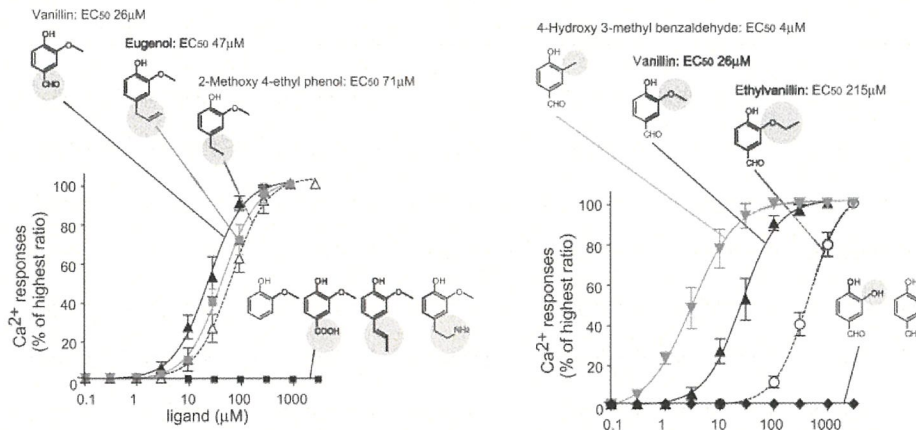


Fig. 1-7 Eugenol を加えたときの濃度依存曲線を相対比で表したもの。Ca<sup>2+</sup>イメージングで測定している。

- a) バニリンの官能基-CHO 位置について近縁分子に対する mOR-EG の応答性
- b) -OCH3 位置について近縁分子に対する mOR-EG の応答性

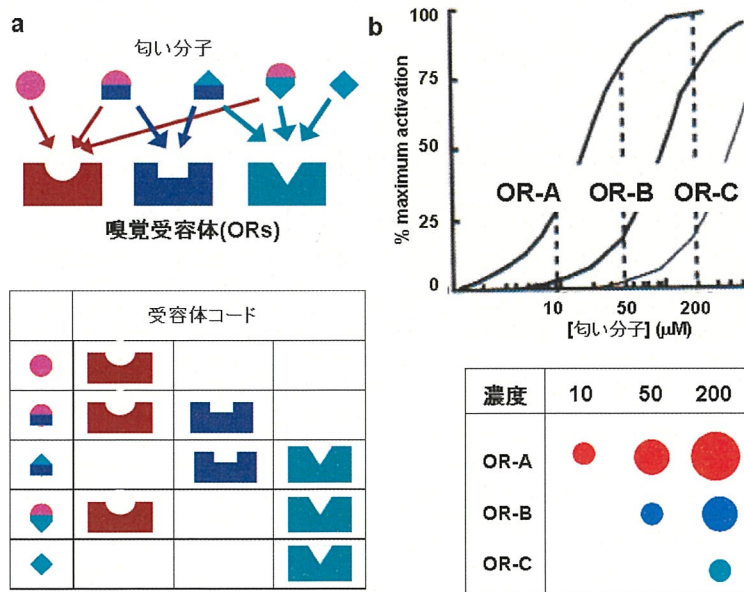


Fig. 1-8 匂いの受容体コード形成のモデル

- a) 活性化する受容体の組み合わせが各々の匂い物質の匂いの質を決めるコードとなる。
- b) 濃度が異なると同じ匂い物質でも受容体コードが異なり違う匂いとして感じる。



#### 1-4-2. 匂い分子認識ポケット

匂い分子の認識にどのアミノ酸残基が関わっているのか同定するために、変異分析や $\alpha$ ヘリックスの疎水性モーメント研究、系統学的な配列比較など様々な手法が試験されてきた【33】。中でも、コンピュータを用いた受容体の立体構造のモデル構築と匂い分子とのドッキングシミュレーションはロドプシンを鋳型に多くの嗅覚受容体に適用されてきた。一般に、コンピュータシミュレーションでは複数の候補構造が得られるため、最終的な構造決定には生化学的実験による検証が必要である。しかし、嗅覚受容体の培養細胞での発現が困難であることから、コンピュータシミュレーションに対する生化学的検証が十分に行われていない現状がある。双方向からの検証が行われた数少ない例としてマウス由来嗅覚受容体 mOR $\cdot$ EG が知られているので今回はそれを紹介する。

mOR $\cdot$ EG のリガンド結合部位を分析するため、ウシロドプシンの三次元座標を鋳型に、mOR $\cdot$ EG のコンピュータモデル構築が行われた。TM ドメインが形成する空洞部分の解析によって、26 アミノ酸残基からなるリガンド結合部位が推測された(Table 1-1)。このリガンド結合部位に様々なアゴニストを配してドッキングシミュレーションを行い、リガンドと高頻度に相互作用するアミノ酸候補として 12 個を特定した(Table 1-1)。リガンドとの結合様式については 15 個の配位構造候補が挙げられた。これら候補構造の中から最適なりガンド結合モデルを決定するため、シミュレーションで相互作用が予測された 12 個のアミノ酸全てについて部位特異的変異体が作製され、匂い応答への影響が解析された。その結果、15 個あった候補の中から、最適なりガンド結合様式が抽出された(Fig. 1-9)。点変異を導入した場合にリガンド特異性とアンタゴニスト活性にどのような影響が現れるか、抽出された結合様式に基づいて仮説が立てられ、実際に検証した結果、推測通りの応答変化が観察され、この結合様式の精度の高さが実証された【34】。これ以降、コンピュータシミュレーションと生化学的手法の双方向からのアプローチが採用されるようになり、2007 年にはこの戦略にのっとり MOR42-3 のリガンド結合様式が決定された【35】。

2015 年に Yiqun らは部位特異的変異体および計算モデルを用いて高い配列相同性を持ちながら異なる応答性を示す OR を検討し、アミノ酸 1 つの変異により MOR256-3 の応答が変化するかを示した【36】。また、MOR256-3 をモデルとして、嗅覚受容体の機能のために重要なアミノ酸残基が推定された。7 回膜貫通領域のうち、6 つ目のヘリックスにおけるチロシン残基でアゴニストを感知すること、3 つ目のヘリックスに存在するアスパラギン酸、アルギニン、チロシン残基の”DRY”モチーフ、および 5 つ目のヘリックスの正に荷電したアルギニンまたはリシン残基で固定することが示された【37】。

Table 1-1. 匂い分子結合ポケットを形成すると推測されるアミノ酸残基(リガンドと高頻度に相互作用する可能性のあるものを緑色で示した。)

| Location | Residues |         |         |         |
|----------|----------|---------|---------|---------|
| TM3      | Phe 102  | Phe 105 | Cys 106 | Phe 108 |
|          | Val 109  | Glu 112 | Ser 113 | Leu 116 |
| TM5      | Thr 205  | Phe 206 | Asn207  | Ser 210 |
|          | Thr211   | Leu 212 | Ile 215 |         |
| TM6      | Ala 248  | Ile 251 | Phe 252 | Thr 255 |
|          | Ile 256  | Phe 258 | Leu 259 |         |
| TM7      | Thr 280  | Ile 283 |         |         |

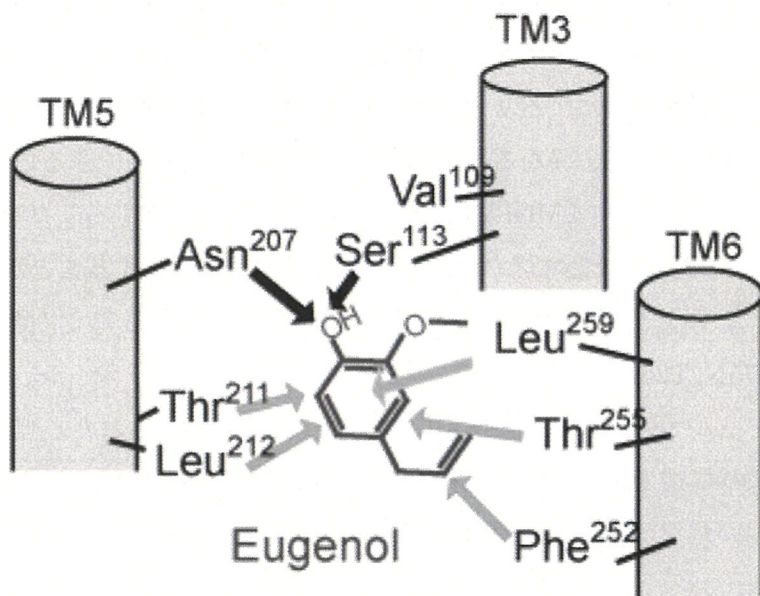


Fig. 1-9 変異導入試験とコンピューターモデル構築に基づいた mOR-EG とオイゲノールの結合様式概略(水素結合を黒の矢印で、疎水性結合を灰色の矢印で示してある) Ser113, Asn207 においてリガンドのフェノール性水酸基と水素結合を形成し、その周辺の複数のアミノ酸と疎水性相互作用を形成する。これは mOR-EG のリガンドとなるのに、このフェノール性水酸基の酸素原子が必要であったという知見と一致する。特に Leu259 は上方向からベンゼン環の中心に向かって側鎖を配置させ、リガンドを結合ポケット内に留める役割を担っていることが予測される。

#### 1-4-3. 匂い分子の結合による構造変化

匂い分子の結合によって嗅覚受容体がどのような構造変化を起こすのか、いまだ詳細は解明されていないが、他の GPCR と似たメカニズムを持つと考えられている。ロドプシン

【38】、 $\beta$ 2-アドレナリン受容体【39】、セロトニン受容体【40】についての知見から、受容体がリガンド結合により活性化すると、受容体自身の回転と、膜貫通ドメイン TM6 が TM3 に向かって傾くことがわかっている。また、TM3 と TM4 をつなぐループ構造上に配する DRY(アスパラギン酸・アルギニン・チロシン)モチーフも若干の差異があるものの ([DE][RH][YF])、嗅覚受容体と他の GPCR 間でよく保存されており、いくつかの GPCR に対する部位特異的変異導入によりこのモチーフが GPCR の活性化の中心的役割を果たしていることが明らかになっている【33】。

Gタンパク質との詳しい相互作用機構も未解明だが、ラットの嗅覚受容体OR-I7は、リガンド結合によってTM3ヘリックスを細胞質側へシフトさせ、DRYモチーフの細胞内への露出を促してGタンパク質との共役することが示唆されている【41】。類似のメカニズムが mOR-EGでも提唱されている【34】。また、アドレナリン $\beta$ 2受容体の立体構造が明らかになったことを受けて、2011年にはリガンド結合状態での構造解析の結果、TM6の細胞質末端がリガンド結合により構造変化していることが示された【19】。2015年にはMOR256-3およびMOR256-8を対象として部位特異的変異によるリガンド応答の変化の解析の結果、リガンド認識に重要なアミノ酸残基が同定され、異なるリガンドにも応答する改変ができることが示された【42】。10のリガンドを認識するMOR256-3のTM3において、認識するリガンドが2つのMOR256-8のアミノ酸に置換したところ(Y102F, L107I)、応答が減少することが示された。MOR256-3のTM3においてリガンド認識部位として重要と考えられるアミノ酸残基の置換(Y102F, L107I, D175N, T254S)により、オクタノール、カルボン、クマリン、酢酸ベンジル、フェニル酢酸アリルへの応答が増大あるいは減少することが示された。嗅覚受容体が匂い分子の結合により構造変化することを利用して、電位変化から匂い分子の応答を検知する嗅覚受容体を用いた匂いセンサーの開発の研究も進められている。

#### 1-4-4. 嗅覚受容体の匂い分子認識以外の役割

近年、嗅覚受容体は単に匂いを感知する役割をもっているだけでなく、嗅覚システムの機能構築、神経回路形成においても重要な役割をしていることが示唆されている。脊椎動物は約一千万の嗅覚神経細胞を持つが、一細胞につき発現する嗅覚受容体は一種類という厳密な発現様式を採用していることは先に述べた。このような、遺伝子クラスターの中から一つ選択されて転写される正の制御に加えて、発現した受容体が残りの受容体遺伝子の発現をシャットダウンする負のフィードバック制御が存在することもわかってきている【15, 43, 44】。また、外界からの匂い分子と接触しない神経軸策終末においても嗅覚受容体が発現していることや【45, 46】、同種類の嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の軸策はただ一つの糸球体へ収束すること【18】、ジーンターゲッティング技術によってゲノム上のある



嗅覚受容体の遺伝子座位に他の嗅覚受容体遺伝子を置き換えたところ、収束する位置がもとの糸球体からずれたことなど【47, 48, 49】、嗅覚受容体の軸策誘導における役割が強く示唆されている。また、嗅覚受容体は、脳、脾臓、発生初期の心臓、精巣など嗅神経細胞以外の組織で発現が確認されている【50】。精巣で発現する嗅覚受容体が精子の走化性に関与するという報告もある【51, 52】。OR7C1 はがん幹細胞特異的に発現していると報告されている【53】。嗅覚受容体が匂いの受容以外にどのような機能を担っているのか今後の研究が期待される場所である。

## 1-5. 嗅覚受容体の機能的発現を向上させる因子

### 1-5-1. Rho-tag

嗅覚受容体は細胞膜へ正しく局在することで機能する。1999年にロドプシンのN末端20残基アミノ酸を嗅覚受容体のN末端に付加すると、HEK293T細胞(ヒト胎児由来腎臓細胞)での細胞膜局在を増加させることが分かった【54】。このロドプシンN末端20アミノ酸のタグをRho-tagという。異種細胞に嗅覚受容体を発現させる場合には、このRho-tagを嗅覚受容体の遺伝子のN末に付加することで、発現量を増大させている。

### 1-5-2. 嗅覚受容体の膜局在を助けるアクセサリタンパク質

2004年に Matsunami らが、HEK293T 細胞で哺乳類の嗅覚受容体を機能発現させることに成功した【55】。

それまで、GPCR が細胞膜に正しく局在するためにはなんらかのアクセサリタンパク質が必要であることが知られていた【56】。ショウジョウバエのロドプシンに対する NinaA タンパク質【57】、錐体光受容体オプシンに作用する RanBP2 タンパク質【58】、カルシトニン受容体様受容体を助ける RAMPs タンパク質【59】、哺乳類のフェロモン受容体 V2R に働く M10 タンパク質ファミリーの発見【60】に続き、線虫の嗅覚受容体のアクセサリタンパク質として ODR-4 が同定されていた【61】。興味深いことに、NinaA と RanBP を除いてこれらの間に配

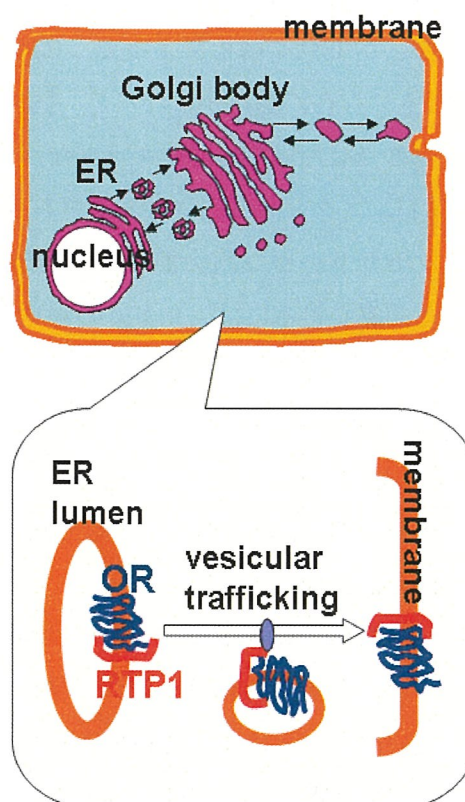


Fig. 1-10 アクセサリタンパク質による嗅覚受容体の膜輸送アシストモデル

列の相同性はまったくないが、全て一回膜貫通型構造をしていた【62】。

Matsunami らは、哺乳類の嗅覚受容体の発現にもアクセサリータンパク質が必要と推測し、嗅神経細胞に発現する DNA ライブラリーの中から、膜貫通ドメインをコードし既存のシャペロンタンパク質と類似性を示すことを条件に設定して候補遺伝子の探索を行った。挙げられた候補遺伝子をそれぞれマウス由来嗅覚受容体とともに HEK293T 細胞へ形質転換したところ、2 種類のクローンが嗅覚受容体の膜局在を改善し、受容体の機能的発現を可能にした【55】。

膜局在改善能を示した 2 種類のタンパク質はそれぞれ RTP1(Receptor Transporting Protein1)と REEP1(Receptor Expression Enhancing Protein1)と命名された【55】。続いて RTP2 が同定された。RTP1 と RTP2 はアミノ酸レベルで 73%の相同性を示し、両者とも N 末端側が細胞内、C 末端側を細胞外に突出している一回膜貫通型構造をしていると推測されている。RTP1 と RTP2 は嗅上皮に選択的に発現していることから、この RTP による膜輸送が、嗅覚神経細胞の細胞膜に特異的に嗅覚受容体を発現させているメカニズムにつながると考えられる。

さらに 2007 年に、RTP1 から 36 アミノ酸残基削った RTP1S が HEK293T 細胞において OR の膜局在量をより増大させることが報告された【63】。先の報告【55】で RTP1 と呼ばれていたものは RTP1S と区別するために RTP1L と命名され、生体内では RTP1L ではなく RTP1S が主に存在していることも同時に報告された【63】。

また、ホモログ解析によって、RTP3、RTP4、REEP2、REEP3、REEP4、REEP5、REEP6 の存在が明らかになった【55】。そのうち RTP3、RTP4 は、マウス由来嗅覚受容体に対しては膜局在促進能を示さなかったが、ヒトの味覚受容体 hTAS2R とは相互作用した【64】。アクセサリータンパク質と受容体との間に特異性が存在するようである。

アクセサリータンパク質はどのように嗅覚受容体の膜移行を改善するのか。この問いに対する回答を得るにはより多くの知見を待たねばならないが、現在、以下に示す 3 つの仮説が挙げられている【55】。

1. アクセサリータンパク質は、嗅覚受容体タンパク質のフォールディングの段階に作用し正しい構造へと導く。
2. 嗅覚受容体を取り込んだ小胞に働きかけて、間接的に受容体の輸送経路への合流を促す。
3. 嗅覚受容体のコレセプターとして直接輸送経路へ誘導する。

特に 3.の仮説は嗅覚受容体との共発現により自身の膜局在も促進される RTP1 の挙動と一致する。嗅覚受容体は小胞体貯留シグナルを有しており、アクセサリータンパク質がそれを覆い隠すことによって膜輸送経路への合流を促すものと思われる(Fig. 1-10)。

2012 年に Wu らは RTP1S の C 末端側に存在する膜貫通ドメインを除いた欠損体でも、



OR と相互作用することを示した。【65】

興味深いことに、RTP、REEP ファミリーは、嗅神経細胞(RTP1, 2、REEP1)、味覚細胞(RTP2, 3, 4 および全 REEP)だけでなく、嗅覚受容体同様、精巣でも発現が観察された(全 RTP と数種の REEP) 【55, 64】。RTP4 に至っては、味覚細胞、精巣にとどまらず、小脳扁桃、膀胱、骨髄、大腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、マクロファージ、乳腺、メラニン形成細胞、鼻咽腔、下垂体、前立腺、網膜色素上皮、脊髄、脾臓、胸腺、子宮と広範に発現していた 【63】。各組織のどのような GPCR に寄与するのか、GPCR のアシスト以外に機能はあるのか、今後の研究が期待される。

## 1-6. 匂い分子に作用する因子

### 1-6-1. 一般的な匂い物質の特徴

ヒトが匂いを感じる元となる化学物質、すなわち匂い物質はその種類が非常に多く、数万種類とも数十万種類とも言われている。またその化学構造も多様であり、共通した立体構造のようなものは認められていない。しかしながら唯一共通する性質として、常温付近の温度で気体になりうるということが挙げられる。すなわち、元々常温で気体として存在するものか、あるいは揮発性がある化合物が、匂い物質になりえる。一般には、分子量の小さい低分子の方が、分子量の大きい物質よりも揮発性が高いため、匂い物質には比較的 low molecular weight のものが多い。また、エーテル類やエステル類などのように、比較的疎水性の高い低分子には、特徴的な匂いを有するものが多く存在する。例えば、様々な植物に含まれる精油成分は揮発性が高く、典型的な匂い物質として知られている。しかし、気体であることや揮発性があることだけで匂い物質になるわけではなく、その他に何らかの特徴がある立体構造を持つことが必要である。例えば、窒素や二酸化炭素などはいずれも気体だが無臭であり、匂い物質ではない。一方、硫黄分子や窒素分子を含む低分子の有機化合物には、独特の匂いを持つものが多く知られている。

なお、ヒトを含めた陸上の動物では、このように匂い物質は空気に混じった状態で嗅覚器に到達する必要があるが、一方で魚類などの水生動物には、匂い物質は水に溶けた形で作用する必要がある。

### 1-6-2. 匂い分子結合タンパク質

OR に正しい機能活性を持たせるためには、匂い分子と OR の結合も重要な要素となる。OR が発現している嗅覚神経細胞の繊毛は粘液など水溶性成分で覆われているが、OR のリガンドとなり主に空気中に飛散している匂い分子の多くは疎水性分子である。そのため何らかの要因によって、疎水性の匂い分子は水溶性の嗅粘液中を輸送されて、OR に結合してい

ると考えられる。

この匂い分子の可溶化の問題に対し、1986年に Pevsner らはウシの嗅覚繊毛から単離したタンパク質が数種類の香料に結合したことから、匂い分子結合タンパク質 (Odorant-binding protein: OBP) と命名し、これらのタンパク質が空気中の疎水性匂い分子を吸着し、嗅覚神経細胞まで輸送している可能性を報告した。その後、OBP の生化学的、構造的解析が行われ、OBP は高濃度で繊毛内に発現していること、水溶液中で小さな疎水性分子を細胞外へ輸送するタンパク質のリポカリンファミリーに属することが明らかとなった【66】。

### 1-6-3. 鼻の粘液に存在している匂い分子の構造を変化させる酵素

匂い分子と結合する嗅覚受容体の組み合わせについては、ある匂い分子が様々な嗅覚受容体と結合できる場合や、ある嗅覚受容体が様々な匂い分子と結合することが出来る場合など、複雑な仕組みとなっている【67】。

また、ある特定の匂い分子に対して、マウス嗅覚神経細胞における生体レベルでの匂い分子応答と、HEK293 培養細胞系での応答を比較すると、その応答性に違いが見られていた【68】。また、マウス生体では嗅粘液を除去すると、ある特定の匂い分子に対する応答強度が増大することが分かった。これらのことから、OR のリガンドとなる匂い分子は、嗅粘液に溶解してから OR に結合するまでの間に、嗅液中で代謝されて構造変化が起きることによって、匂い応答に影響を与えているのではないかとされていた。

2010年に Nagashima らにより、マウスの嗅粘液に存在するタンパク質が、匂い分子を変換し官能基を変化させる酵素として機能することが報告された(Fig. 1-11)【69】。マウスにアルデヒド基やアセチル基を持つ匂い分子を嗅がせた後、嗅粘液を採取し溶解している物質を測定したところ、酵素反応によって生成されたと考えられる別の物質を検出した。また、嗅球において酵素反応の阻害剤処理前後で、匂いに応答した糸球体の分布パターンを比較したところ、嗅液中で変換される匂い分子に対する応答のパターンが阻害剤処理前後で異なった。この結果から、空気中から嗅粘液に溶け込んだ匂い分子は一部が酵素群により別の物質に変換され、この反応が活性化される OR のパターンと匂い知覚に影響を与えていることが明らかとなった。

このことから、嗅覚受容体と結合する匂い分子は、外界に存在する天然の匂い分子そのものと、この酵素で変換された物質との混合物の場合があると考えられる。またこの粘液は、匂い物質を嗅覚神経細胞に発現しているセンサー(受容体)に運んだり、有害な匂い物質を分解したりする役割があると考えられる。一般に匂い分子は芳香族化合物など疎水性であることが多く、嗅粘液に溶け込んでから嗅覚受容体に結合することも考えられ、この過

程で匂い分子が嗅粘液中の酵素に代謝されている可能性が考えられる。

この粘液中の酵素の量は年齢や性別のほか、体調によって異なる可能性があり、ヒトの場合でも匂いの感じ方の違いの一因になっていることが示唆されている。

### 匂い物質A+匂い物質B

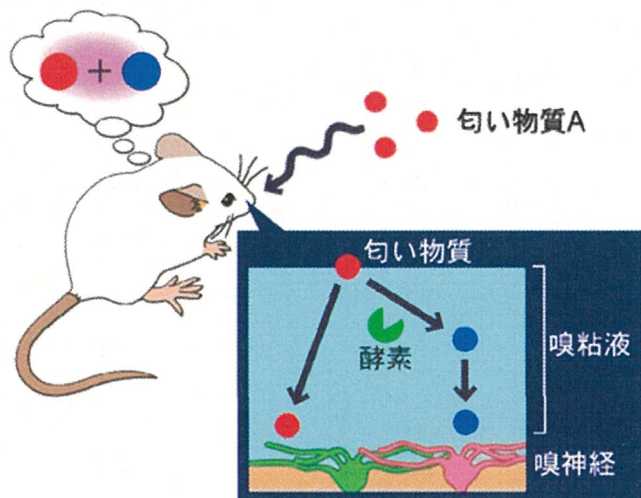


Fig.1-11 粘液中で起こる匂い物質変換反応とその匂い知覚への影響

空気中の漂う匂い物質 A(赤丸)の一部が、鼻腔内の嗅粘液中で酵素(緑)による反応を受けてにおい物質 B(青丸)となる。その結果、脳では純粋に匂い物質 Aを感じるのではなく、匂い物質 Aと匂い物質 B の混合物として知覚される。

## 1-7. シトクロム P450

### 1-7-1. シトクロム P450 の基本構造

シトクロム P450 は、細菌から植物、哺乳動物に至るまでのほとんどすべての生物に存在する、分子量約 45000 から 60000 の酸化酵素で、異物 (薬物) 代謝においては主要な第一相反応の酵素である【70】。約 500 アミノ酸残基からなり、活性部位にヘムを持つ。保存されたシステイン残基と水分子がヘムの鉄原子にリガンドとして配位する。還元状態で一酸化炭素と結合して 450nm に吸収極大を示す色素という意味でシトクロム P450 (P450) と命名された。動物では主に肝臓に存在し、肝以外にも腎、肺、消化管、副腎、脳、皮膚などほとんどすべての臓器に少量ながら存在する。触媒する反応として、例えば NADPH の存在下で基質を水酸化する。P450 は基質特異性の異なる複数の分子種からなる遺伝子スーパーファミリーを形成している。全生物では 700 種類以上、ヒトでは 50 種類程度の分子種が報告されている。各々の分子種は基質特異性ではなくアミノ酸の相同性に基づいて命名されており、CYP1A1 のように接頭語 CYP ファミリーを示すアラビア数字、サブファミリーを示すアルファベット、分子種番号を示すアラビア数字の組合せで表される。

### 1-7-2. 鼻の粘膜に発現しているシトクロム P450

シトクロム P450 は、薬物代謝酵素のファミリーであり、脂溶性を水溶性に変えて体に入ってきた毒を解毒する役割を持っている。このシトクロム P450 は肝臓細胞に発現している



ことが一般的に知られている。しかし、肝臓以外でも肺臓、鼻の粘膜などにも発現していることが分かっている【71】。鼻粘膜に発現しているシトクロム P450 は匂い分子の代謝に関係している可能性がある。ヒトのシトクロム P450 遺伝子は約 60 種類があるが、その中の数十種類がヒトの嗅粘膜に発現している。CYP2A13 は、嗅粘膜に発現しているヒトのシトクロム P450 の一つであるが、この CYP2A13 を芳香成分に与えてみると、様々な匂い分子を基質として代謝酵素反応が起こることが示された(Fig. 1-12)【72】。

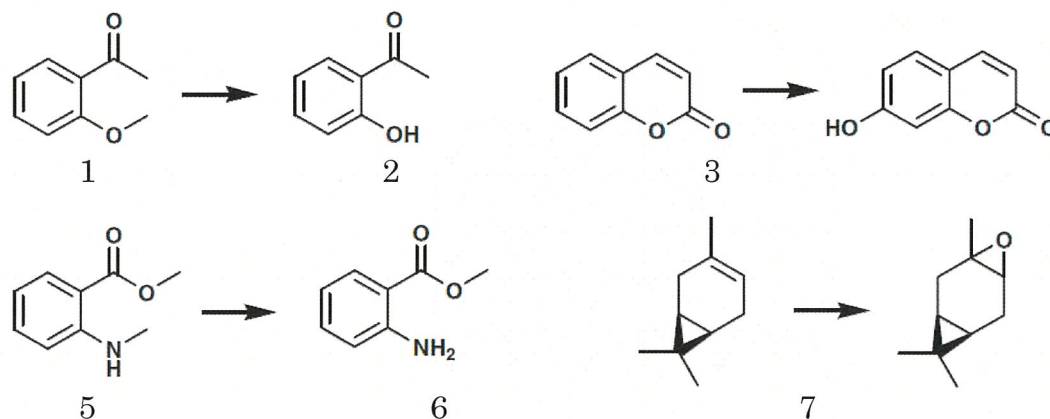


Fig. 1-12 CYP2A13 によって酸化された匂い分子

0-脱メチル化: 2-methoxyacetophenone(1), 2-hydroxyacetophenone(2)

水酸化: Coumarin(3), 7-hydroxycoumarin(4)

N-脱メチル化: N-methylantranilate(5), methylantranilate(6)

エポキシ化:  $\delta$ -3-carene(7),  $\delta$ -3-carene-epoxide(8)

### 1-7-3. CYP1a2

CYP1a2 はヒト、ラット、およびマウス由来のものが知られており、代表的な異物代謝酵素の一つである。ヒトの CYP1A2 は、アセトアミノフェン、カフェイン、テオフィリンなどを基質とする。ラットの CYP1A2 やマウスの CYP1a2 は、アニリンやエストラジオール、ゾキサゾールアミンなどを水酸化する酵素として報告されている【70】。

## 1-8. 嗅覚受容体の機能発現解析

### 1-8-1. 嗅覚受容体発現細胞を用いた機能解析

嗅覚神経細胞中における OR の機能は、RTP1S やムスカリン受容体(M3-R)なども含め、様々なタンパク質との相互作用によって確立されている可能性が高いと考えられる。また、ある特定の匂い分子に対して、マウス嗅覚神経細胞における匂い分子への応答と、HEK293 培養細胞系での応答を比較すると、その応答性に違いが見られている【68】。

OR を発現させた実験細胞を用いた機能解析方法として、2008 年に Matsunami らは OR

の活性をルシフェラーゼの発光強度で評価するシステムを確立した【73】。種々のアクセサリータンパク質を発現させた HEK293T 細胞を Hana3A 細胞と命名し【63】、OR の匂い分子応答の検出に、cAMP の細胞内濃度の増加を利用した cAMP Response Element (CRE) ルシフェラーゼアッセイを用いた。

CRE 遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んでいるため、OR に匂い分子が結合すると、細胞内で産生された cAMP によって CRE binding protein (CREB) がリン酸化され、CRE が活性化することによって下流のルシフェラーゼが発現する(Fig. 1-13)。このように嗅覚神経細胞内のシグナル伝達を模倣した系を Hana3A 細胞内に構築したことで、特定の OR に対しての、異種細胞発現から匂い分子への応答までをモニ

タリングすることができるようになった。実際に、この Hana3A 細胞を用いたアッセイにおいても、リガンド濃度依存的なルシフェラーゼ発光を示しており、これまでに OR とアクセサリータンパク質との関係も明らかにされている。

### 1-8-2. 嗅覚神経細胞における嗅覚受容体の発現解析

マウスの嗅上皮において嗅覚神経細胞は 1000 以上ある嗅覚受容体の遺伝子から一つを選んで発現する。そのため、ある匂い分子への OR の応答は、その OR を発現している嗅覚神経細胞の活性化と連動する。

真核生物の細胞質リボソームは 40S サブユニットと 60S サブユニットからなり、40S サブユニットを構成するタンパク質の一つであるリボソームタンパク質 S6 は、神経細胞の活性化の後にリン酸化することが報告されている【74】。嗅覚神経細胞に発現する OR が活性化したとき、リボソームタンパク質 S6 のリン酸化(S6 phosphorylation: pS6)が起こる。匂い分子による刺激によって生じるマウスの嗅上皮における pS6 が、嗅覚神経細胞の活性化のマーカーとして用いることが出来ることが報告されている【75】。この *in vivo* でのマウス嗅覚受容体の De-orphanization 解析により、アセトフェノンおよび 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline(TMT)に反応する嗅覚受容体が同定された。嗅覚神経細胞における嗅覚受容体のアセトフェノン反応の結果が、*in vitro* の異種細胞発現させた

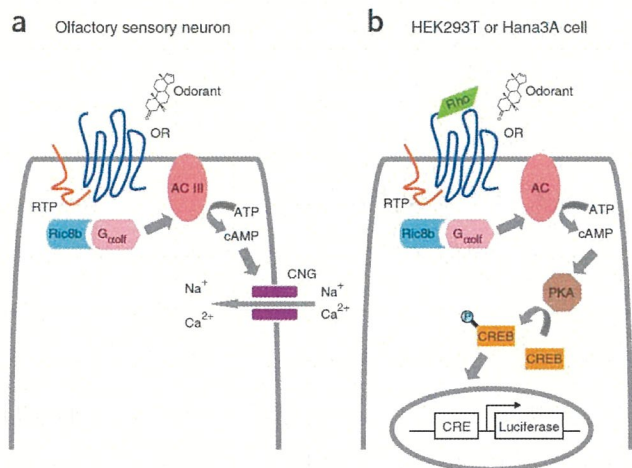


Fig. 1-13 嗅覚神経細胞内シグナル伝達を模倣した Hana3A 細胞内シグナル伝達経路  
a) 嗅覚神経細胞内シグナル伝達経路  
b) Hana3A 細胞内に構築したシグナル伝達機構

嗅覚受容体のアセトフェノン応答の結果と異なることから、嗅覚受容体と匂い分子の単なる相互作用ではなく、嗅粘液の嗅覚受容体への影響があることが示唆される。またマウスおよびヒトの嗅上皮のトランスクリプトーム解析により、CYP といった代謝酵素など、嗅覚受容体の匂い分子応答に影響すると考えられる種々のタンパク質が発現していることが明らかとなった【76, 77】。

### 1-8-3. 嗅覚受容体の発現

大腸菌発現はタンパク質を大量発現することができ、種々のクロマトグラフィーなどの精製によって目的のタンパク質だけを獲得する手法があるが、可能であるかはそのタンパク質によって異なる。嗅覚受容体は GPCR ファミリーに属する膜タンパク質で、未だ結晶構造は解明されていない。膜タンパク質は両親媒性の性質を持ち、発現、精製することが困難であり、構造が不安定である。そこで膜タンパク質をリポソームに挿入することによって安定性を高めることができると報告されている【78】。

GPCR のヒスタミン受容体はコムギ胚芽無細胞発現系によって発現できることが報告され、リポソームに挿入された形で構造をとり、トリチウム・ピリルアミンへ結合能を持つことが報告された【79】。このように大腸菌発現で精製することが難しい膜タンパク質もコムギ胚芽無細胞発現系で高発現することが示されている。嗅覚神経細胞において OR はタンパク質の N 末が細胞外側に、C 末が細胞内側にある。しかしコムギ胚芽無細胞発現系においてはその向きを制御することができていないため、逆向きにプロテオリポソームに挿入された OR も存在していると考えられる。また用いたプロテオリポソームはアズレクチンリポソームであるが、その脂質の組成は嗅覚神経細胞の繊毛の細胞膜の組成と異なる可能性がある。最適な OR の発現のためにはリポソームの条件検討を行うことが望ましい。

### 1-9. 本研究の目的

これまでに述べてきたように、環境には様々な揮発性分子が存在し、生物はこれらを匂いとして感知している。匂い分子は鼻から吸入され、鼻腔を通して嗅覚神経細胞に発現している嗅覚受容体(Odorant receptor: OR)へ輸送されて結合する。するとシグナル伝達が脳へと伝わり、匂いとして認識される。1つの嗅覚神経細胞には1種類の OR のみが発現しており、各細胞の異なる応答を集約することで、生物の嗅覚は高感度・高識別性を有している。しかしながら OR と匂い分子の関係には未解明な点が多く、応答する匂い分子が同定された OR の数は少ない。その一因として、ある匂い分子応答する嗅覚神経細胞に発現している OR の遺伝子を獲得し、その OR 遺伝子を実験細胞に導入し発現させても、嗅覚神経細胞で見られた匂い分子応答と同等には応答が見られない、すなわち応答しないあるい



は応答が低いことが挙げられる。近年、マウスの嗅粘液中の酵素群が嗅覚神経細胞の感受性や特異性に影響を与えることが指摘された。また嗅粘膜中のシトクロム P450 (CYP) の関与が示唆された。これらのことから、CYP が匂い分子を代謝し OR の匂い分子応答に影響している可能性が考えられる。

そこで本研究では、OR の匂い分子応答に CYP が影響しているか解析することを目的とした。MOR161-2 のアセトフェノン応答が CYP1a2 共発現により増大することから、CYP1a2 によるアセトフェノンの代謝産物の特定および、MOR161-2 の匂い分子応答性の変化を解析した。また他の OR においてもアセトフェノン応答性を測定し、CYP とアセトフェノンの関係性が OR のアセトフェノン応答性に関与するのかを解析した。

実際の動物の鼻においても、嗅粘膜に発現している CYP が匂い分子を代謝してから、その代謝産物に OR が応答していることが考えられる。そこで *in vivo* の実験も行い、CYP が OR の匂い分子応答に関与しているかどうかを解析した。

## 第二章 培養細胞における嗅覚受容体の匂い分子応答に対するシトクロム P450 の効果

### 2-1. 緒言

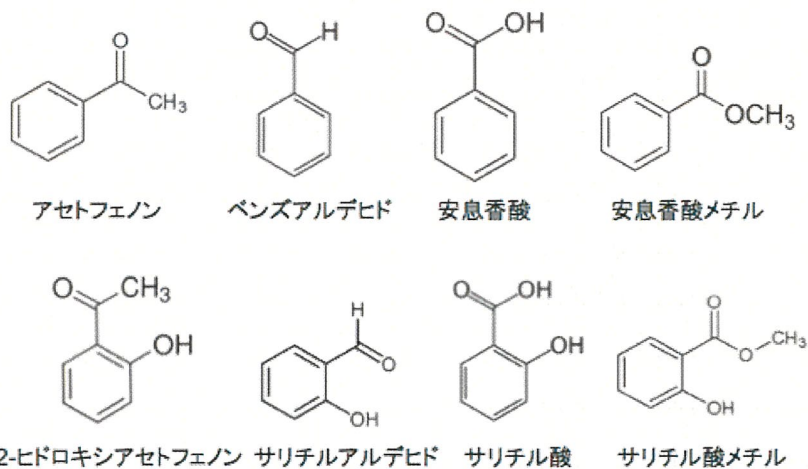
OR の匂い分子応答に CYP が影響しているか解析することを目的として、OR の匂い分子応答を異種細胞発現とルシフェラーゼアッセイにより *in vitro* の系で調べることにした。当研究室の先行研究で明らかとなっていた、MOR161-2 のアセトフェノン応答が CYP1a2 共発現により増大するという結果を踏まえて、まずどの OR と CYP を対象に追求するかスクリーニングから始めることにした。Duke 大学松波研究室の嗅上皮のトランスクリプトーム解析【76】、および pS6 によるアセトフェノン応答するマウス嗅覚受容体のスクリーニング【75】から、アセトフェノンに反応する 29 種類のマウス由来嗅覚受容体を選定した。これらの MORs に対して、Hana3A 細胞に発現させた時にアセトフェノンに反応するか、cAMP 応答性ルシフェラーゼアッセイにより調べた。スクリーニングの結果から MOR161-2 のアセトフェノン反応に対する CYP1a2 の効果に関してその原因を調べることにした。GC-MS を用いて CYP1a2 によるアセトフェノンの代謝産物の特定を行った。また CYP1a2 共発現による MOR161-2 の匂い分子反応性の変化および代謝産物に対する MOR161-2 の反応を解析した。

### 2-2. 実験材料

#### 2-2-1. 使用した匂い分子、リガンド試薬

- ・ アセトフェノン Acetophenone 和光純薬工業(株)
- ・ サリチル酸メチル Methyl salicylate 和光純薬工業(株)
- ・ ベンズアルデヒド benzaldehyde 和光純薬工業(株)
- ・ 安息香酸 benzoic acid 和光純薬工業(株)
- ・ 安息香酸メチル methyl benzoate 和光純薬工業(株)
- ・ 2-ヒドロキシアセトフェノン 2-hydroxyacetophenone 和光純薬工業(株)
- ・ サリチルアルデヒド salicylaldehyde 和光純薬工業(株)
- ・ サリチル酸 salicylic acid 和光純薬工業(株)
- ・ Isoprenaline hydrochloride Sigma





## 2-2-2. 使用したプラスミド

### ■ マウス嗅覚受容体(Mouse Odorant Receptor: MOR)遺伝子

いずれも、哺乳類細胞発現ベクターpCI(Promega)に、MluI/NotI サイトでMOR 遺伝子を挿入したものである。

| Name      | ORDB     | Accession      |
|-----------|----------|----------------|
| MOR110-6  | Olfr811  | NM_146552.1    |
| MOR161-2  | Olfr874  | NM_146882.2    |
| MOR184-6  | Olfr178  | NM_146997.2    |
| MOR202-15 | Olfr1467 | NM_146691.1    |
| MOR123-2  | Olfr432  | NM_146716.2    |
| MOR171-24 | Olfr937  | NM_146439.1    |
| M71       | Olfr151  | NM_207664.2    |
| MOR230-8  | Olfr1199 | NM_146458.1    |
| MOR161-3  | Olfr922  | NM_146781.2    |
| MOR200-1  | Olfr1031 | NM_001011759.2 |
| MOR264-5  | Olfr1126 | NM_146837.2    |
| MOR232-1  | Olfr1257 | NM_146982.1    |
| MOR228-4  | Olfr1274 | AY318479.1     |
| MOR264-3  | Olfr1124 | NM_147028.2    |
| MOR188-2  | Olfr1054 | AY318250.1     |
| MOR161-1  | Olfr876  | NM_146883.2    |
| MOR204-15 | Olfr488  | NM_146732.1    |

|           |          |                |
|-----------|----------|----------------|
| MOR246-2  | Olfr727  | NM_146319.2    |
| MOR184-1  | Olfr174  | AY317259.1     |
| MOR177-5  | Olfr153  | NM_206823.1    |
| MOR164-3  | Olfr918  | NM_146375.2    |
| MOR127-1  | Olfr1496 | NM_146989.2    |
| MOR167-1  | Olfr905  | NM_146804.2    |
| MOR224-9  | Olfr958  | NM_146330.1    |
| MOR224-5  | Olfr961  | NM_146504.1    |
| MOR230-6  | Olfr1183 | NM_146529.2    |
| MOR164-2  | Olfr923  | NM_146816.2    |
| MOR231-5  | Olfr1242 | NM_146968.2    |
| MOR159-3  | Olfr361  | NM_146368.1    |
| MOR211-4P | Olfr1505 | NM_001011850.1 |

また、挿入した MOR 遺伝子の N 末端には NheI/EcoRI サイトで Rho-tag を挿入している。Rho-tag の配列は以下の通りである。

5'-ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG  
TACGC-3'

N- MNGTEGPNFYVPFSNATGVVR -C

MOR のプラスミドは、Duke 大学の松波宏明教授よりご提供頂いた。

#### ■ シトクロム P450(CYP)遺伝子

哺乳類細胞発現ベクター pCI(Promega)に、MluI/NotI サイトでシトクロム P450 遺伝子を挿入したもので当研究室の福谷洋介博士、および卒業生 Savangsuksa Aulaphan 氏が作製した。

- CYP1a2 (NM\_009993.3)
- CYP2a5 (NM\_007812.4)
- CYP2f2 (NM\_007817.2)
- CYP2b10 (NM\_009999.3)
- CYP2b19 (NM\_007814.1)
- CYP2g1 (NM\_013809.1)
- CYP2j6 (NM\_010008.4)

#### ■ RTP1S 遺伝子

#### ■ M3-R 遺伝子

## ■ $\beta$ 2AR 遺伝子

RTP1S、M3-R、および  $\beta$  2AR プラスミドは Duke 大学の松波宏明教授よりご提供頂いた。

### 2-2-3. 菌株

プラスミド調整には *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 株を用いた。

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ : F,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

### 2-2-4. 宿主細胞

宿主細胞には HEK293T 細胞(Thermo Fisher Scientific)と Hana3A 細胞を使用した。Hana3A 細胞は Duke 松波宏明教授よりご提供頂いた。

Hana3A 細胞は、HEK293T 細胞に RTP1L, RTP2, REEP1 および G $\alpha$ olf を恒常的に発現させるように構築された細胞である【83】。

### 2-2-5. 菌体培養用の液体培地

Circle grow:

Circle grow (Qbiogene, Inc. [GEN]), 40 g

dH<sub>2</sub>O up to 1 L

Ampicillin, 100 mg/mL

### 2-2-6. 細胞培養液

MEM

Minimum Essential Medium Eagle with L-glutamine, Earle's salt and bicarbonate (Sigma)

M10

MEM

10% Fetal Bovine Serum (HyClone)

M10PSF

M10

Penicillin-Streptomycin (Pen: 50 units/ml, strep: 50  $\mu$ g/mL)

Amphotericin B solution (1.25  $\mu$ g/mL)

### CD293

CD293 Medium (Invitrogen)

L-Glutamine 2  $\mu$ M

### M10-HN

MEM 45 mL

FBS 5 mL

1M HEPES 0.5 mL

1.5M NaN<sub>3</sub> 0.5 mL

### HBSS

Hank's balanced salt solution 500 mL

1M HEPES 5 mL

1.5M NaN<sub>3</sub> 5 mL

### 匂い分子ストック溶液

各種匂い分子は、DMSO 溶媒に溶かして 1M 溶液とした。

## 2-2-7. 試薬

PBS (D-PBS(-) without Ca and Mg, liquid) (ナカライテスク)

TrypLE Express without Phenol Red (Thermo Fisher Scientific)

Anti-Rhodopsin antibody [Rho4D2] (Abcam, ab98887)

Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Cy3 conjugate [A10521] (Thermo Fisher Scientific)

Lipofactamine 2000 (Invitrogen)

細胞保存液セルバンカー1 (日本全薬工業)

Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)

## 2-2-8. 使用した機器

サーマルサイクラー                      GeneAmp<sup>®</sup> PCR System9700 (Applied Biosystems)

低温インキュベーター                      Cool Pad3 (GelleX)

電気泳動装置                                  Mupid-eXu (ADVANCE)

紫外可視吸光光度計                      nanodrop(Thermo fisher)

|              |  |
|--------------|--|
| 遠心分離機        | 微量高速冷却遠心機 MX-150 (トミー精工)                 |
| スイングローター     | 卓上遠心機 H-18F (コクサン)                       |
| CO2 インキュベーター | Prescyto MG-70M (タイテック)                  |
| 蛍光顕微鏡        | M1 imager (ZEISS)                        |
| ルミノメーター      | GloMax®-Multi Detection System (Promega) |
| 二重収束磁場型質量分析計 | JMS-700(日本電子)                            |

## 2-3. 実験方法

### 2-3-1. 細胞の培養

#### ■ 培養細胞

Hana3A 細胞を、8 mL の M10PSF が入っている 100 mm cell culture dish (日本ジェネティクス) で、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。細胞が dish にコンフルエントになるタイミングで細胞を継代した。

#### ■ 細胞継代

100 mm cell culture dish から M10PSF 液体培地を吸引して除去した。次に、8 mL の PBS をゆっくりと加えて細胞を洗浄した。それから、PBS を吸引して除去した後に、3 mL TrypLE Express Stable Trypsin Replacement Enzyme without Phenol Red を Dish に加え、2 分間静置した。そして、5 mL PBS を加え懸濁し細胞をよく分散させた (Total 8 mL)。細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に移し、1000 rpm で 5 分間遠心した。

細胞継代においては、細胞のペレットに 8 mL の M10PSF を加えて懸濁して、新しい 100 mm dish に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。

トランスフェクションの実験においては、細胞のペレットに 8 mL の M10 を加えて懸濁して、96-well プレートまたは 35 mm dish に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### ■ 細胞の凍結

細胞がコンフルエントとなった 100 mm cell culture dish から M10PSF 液体培地を吸引して除去した。次に、8 mL の PBS をゆっくりと加えて細胞を洗浄した。それから、PBS を吸引して除去した後に、3 mL TrypLE を dish に加え、2 分間静置した。そして 5 mL PBS を加えて懸濁した (Total 8 mL)。細胞懸濁液を 15 mL 遠沈管に移し、1000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去して細胞のペレットに 10 mL の PBS を加え再懸濁した。1000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。細胞保存液セルバンカー1(日本全薬工業)を 4 mL 加えて懸濁し、Cryovial に 1 mL ずつ分注して、保管用ボックスに移して -80 °C で冷凍保存した。

## ■ 細胞の解凍

Hana3A 細胞が入っている凍結された 1.5 mL Cryovial を 37°C の Water bath で素早く解凍させた。次に、5 mL の M10 を含んでいる 15 mL 遠沈管に細胞液を加えた。1000 rpm で 5 分間遠心した。上清を細胞のペレットから吸引して捨てた。そして 8 mL の M10PSF を加えて懸濁し、100 mm cell culture dish に移して 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。翌日に M10PSF に培地交換した。

### 2-3-2. OR のリガンドアッセイ

*In vitro* において、Hana3A 細胞に発現させたマウス由来 OR の匂い分子に対する応答性が CYP の有無条件下で異なるのかを調べるために、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて OR のリガンドアッセイを行った。このアッセイに関する実験の手順は以下の通りである。

#### 1) 細胞の培養

Hana3A 細胞を M10 液体培地で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。100 mm cell culture dish で培養しておいた Hana3A 細胞から古い M10 を除去し、3 mL の TrypLE を加えて細胞をプレートの表面からはがした。そして、5 mL の M10 を加え、細胞をよく分散させてから、5 分間 1000 rpm で遠心した。上清を除去し、新たに 6.5 mL の M10 を加えて細胞のペレットと良くピペッティングした。96-well poly-D-lysine のプレート(NUNC, ThermoScientific)に細胞液を 60 μL/well ずつ移して、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。

#### 2) トランスフェクション

各プラスミドのトランスフェクション量は以下の通りである。

Table 3-1. 各プラスミドのトランスフェクション量

| DNA                       | Amount per well |
|---------------------------|-----------------|
| Rho-tagged Ors or Rho-pCI | 5 ng            |
| CYP                       | 5 ng            |
| pRL-SV40                  | 5 ng            |
| CRE-luciferase            | 10 ng           |
| M3-R                      | 2.5 ng          |
| RTP1S                     | 5 ng            |



※ホタルルシフェラーゼ (CRE-Luciferase(Stratagene))は cAMP 応答配列(cAMP responsive element: CRE)に構築されており、OR のリガンド応答性の指標として用いた。

※Renilla ルシフェラーゼはサルウイルス 40(SV40)プロモーター(pRL-SV40 ; Promega)に構築され、トランスフェクションの効率や細胞の生存率のための指標として用いた。

※Muscarinic acetylcholine receptor (M3-R) と RTP1S (Reporter Transporter Protein) は、OR の細胞膜発現を向上させる目的で用いた。

トランスフェクション用の DNA(上記の表)を 500  $\mu$ L の MEM (96well プレート 1 枚あたり)に混合した。次に、20  $\mu$ L の Lipofactamine 2000 (Invitrogen)を 500  $\mu$ L の MEM (96well プレート 1 枚あたり)に混合した。この溶液を先の DNA を含んでいる MEM とさらに混合し、15 分間室温で静置した。そして、5 mL の M10(96well プレート 1 枚あたり)を加え、この溶液を、細胞播種済のプレートの各ウェルに 50  $\mu$ L/well ずつ培地交換し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。

### 3) 匂い分子の添加

匂い分子を終濃度 30  $\mu$ M ~ 1 mM で溶かした CD293+Q 培地を 50  $\mu$ L/well ずつ培地交換し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。3 時間後に化学発光を測定した。

### 4) 化学発光の測定

ホタルルシフェラーゼと Renilla ルシフェラーゼの測定手順は Promega のプロトコル通りに行った。まず、10  $\mu$ L の Dual-Glo Luciferase バッファーを各ウェルに入れて、10 分間振盪させた。次に Glomax(Promega)にてホタルルシフェラーゼの化学発光を測定した。それから、10  $\mu$ L の Renilla ルシフェラーゼ基質を含んでいる Stop-and-Glo バッファーを各ウェルに加えて、10 分間振盪させた。そして、Renilla ルシフェラーゼの化学発光をマルチモードリーダー GloMax®-Multi Detection System(Promega)で測定した。

データ解析については、まずホタルルシフェラーゼの化学発光値を、Renilla ルシフェラーゼの化学発光値で割った。この値を CRE-Luc/RL とした。また、各条件のうち濃度ゼロの発光値を 1 として相対化した値を Relative response とし、OR の活性値として考察した。ルシフェラーゼ活性の基準値は、 $(L_N - L_{min}) / (L_{max} - L_{min})$  の式で計算した。ここで、 $L_N$  は CRE-Luc/RL であり、 $L_{min}$  はプレートの中で一番低い値で、 $L_{max}$  は一番高い値である。得られたデータは、Microsoft Excel にて解析した。

## 2-3-3. P450 activity assay

### 1) 細胞の培養

Hana3A 細胞を M10 液体培地で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> にて培養した。培養しておいた Hana3A 細胞が

ら古い M10 を除去し、3 mL の TrypLE を加えて細胞をプレートから剥がした。そして、5 mL の M10 を加え、TrypLE と良く混合させてから、5 分間 1000 g で遠心をかけた。上清を除去して、新しい M10 を加えて細胞のペレットと良くピペッティングした。最後に、24 well plate に細胞液を移して、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。

## 2) トランスフェクション

0.2 μL の CYP1a2 を 25 μL の MEM 培地に混合した。そしてトランスフェクション用の酵素 1 μL の Lipoctamine 2000 を 25 μL の MEM に混合した。それから、この 2 つの溶液を混合して 15 分間室温で静置した。その後、500 μL の M10 を加えて細胞に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。

## 3) 匂い分子の添加

5mM 10μL の Luciferin-ME を加えた 500 μL CD293 培地(Invitrogen)を well に添加して刺激し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 3 時間培養した。培養液を 100 μL 回収し、100 μL の Luciferin Detection Reagent と混合したのち、10 分間静置した。そしてルミノメーターにより化学発光を測定した。添加した Luciferin-ME および Luciferin Detection Reagent は P450 activity assay(Promega)のキットのものを使用した。

### 2-3-4. Surface staining

#### 1) 細胞の培養

ポリ-L-リジン(0.1% w/v) を 10 倍希釈し、14 μL を 35 mm dish 上のカバーガラスに塗布し乾燥させた。これで Hana3A 細胞がカバーガラス上に接着し増殖できるようになる。

Hana3A 細胞を M10 液体培地で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> にて培養した。培養しておいた Hana3A 細胞から古い M10 を除去し、3 mL の TrypLE を加えて細胞をプレートから剥がした。そして、5 mL の M10 を加え、細胞をよく分散させてから、細胞液 3 mL を 5 分間 1000 rpm で遠心した。上清を除去して、12 mL の M10 を加えて細胞のペレットを懸濁した。35mm dish に 1.5 mL の細胞液を移して、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。

#### 2) トランスフェクション

900 ng の OR、400 ng の RTP1S、50 ng の GFP を 100 μL の MEM 培地に混合した。そしてトランスフェクション用の酵素として 4 μL の Lipoctamine 2000 を 100 μL の MEM に混合した。それから、この 2 つの溶液を混合して 15 分間室温で静置した。その後 1 mL の M10 を加えて細胞に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。



### 3) 抗体染色

35mm dish を氷上に置いて冷やし、プレートの上にパラフィルムをひいてその上に細胞が接着しているカバーガラスを取り出して載せた。一次抗体 Anti-Rhodopsin antibody [Rho4D2]を含む M10-HN 100  $\mu$ L を添加し、氷上で 45 分間静置した。カバーガラスを dish に戻し、冷やした HBSS で 3 回洗浄した。二次抗体 Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Cy3 conjugate [A10521]を含む M10-HN 100  $\mu$ L を添加し、氷上で 30 分間静置した。冷やした HBSS で 3 回洗浄したのち、1%PFA を含む PBS を添加し、氷上で 60 分間静置した。スライドガラスにマウント剤のパラ-フェニレンジアミン/グリセロール溶液を 40  $\mu$ L 添加し、カバーガラスを反転して細胞がマウント剤と接着するように置いてプレパラートを作製した。その後 dW でカバーガラス表面を洗浄した。暗室にて蛍光顕微鏡 Axioimager M1 Epifluorescence and Brightfield Microscope(Carl Zeiss)を用いて観察した。

## 2-3-5. GC-MS

### 1) サンプルの準備

#### ■ 細胞の培養

Hana3A 細胞を M10 液体培地を用いて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。培養しておいた Hana3A 細胞から古い M10 を除去し、3 mL の TrypLE を加えて細胞をプレートの表面からはがれさせた。そして、5 mL の M10 を加え、TrypLE と良く混合させてから、5 分間 1000 g で遠心をかけた。上清を除去し、新しい M10 を加えて細胞のペレットと良くピペティングした。最後に、6 well plate に 1.5 mL の細胞液を移して、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で培養した。

#### ■ トランスフェクション

各 10  $\mu$ L の CYP を 100  $\mu$ L の MEM 培地に混合した。そして、トランスフェクション用の酵素 4  $\mu$ L の Lipoctamine 2000 を 100  $\mu$ L の MEM に混合した。それから、この 2 つの溶液を混合して 15 分間室温で静置した。その後、1 mL の M10 を加えて細胞に移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で一晩培養した。

#### ■ 匂い分子の添加

匂い分子を溶かした CD293 培地 1 mL を細胞に培地交換して刺激し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 3 時間培養した。その後、培養液 500  $\mu$ L を回収し、有機溶媒と 1 対 1 で混合した。有機溶媒として、トルエン、酢酸エチル、ヘキサンのいずれかを用いた。14,000 rpm で 2 分間遠心し、上清を 1  $\mu$ L 取り、GC-MS にて測定を行った。

## 2) GC-MS の測定

二重収束磁場型質量分析計 JMS-700(日本電子)を用いて、GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) を行った。

使用したカラム：

Agilent Technologies DB-WAX (length 30 m, ID 0.250 mm, Film 0.15 micro-meter, Temp. 25° C – 250° C カラムの条件：

- 注入量：1  $\mu$ l at 250° C
- Carrier Gas：Helium (1  $\mu$ l/min)
- Column 温度：50 °C (1.5 min)→180 °C (25 °C per min)→250 °C (10 °C per min),3 min
- Transfer line 温度は 250 °C
- ion source 温度は 200 °C

以上の条件で GC-MS を測定開始した。

測定結果は Total Ion Chromatography の形で算出され、目的の位置をピックアップする形で MS スペクトルを表示させることができる。

## 2-4. 実験結果

### 2-4-1. アセトフェノン応答する OR のスクリーニング

Duke 大学松波研究室の嗅上皮のトランスクリプトーム解析【76】、および pS6 によるアセトフェノン応答するマウス嗅覚受容体のスクリーニング【75】から、アセトフェノンに応答する 29 種類のマウス由来嗅覚受容体を選定した。これらの MORs に対して、Hana3A 細胞に発現させた時にアセトフェノンに応答するか、cAMP 応答性ルシフェラーゼアッセイにより調べた。添加したアセトフェノンの終濃度は 300  $\mu$ M である。

その結果、M71, MOR123-2, MOR161-2, MOR164-2, MOR184-1, MOR264-5 の 6 種類の OR が応答することが分かった(Fig. 2-1)。またマウス嗅上皮由来 CYP の共発現によりアセトフェノン応答が変化することも明らかとなった。MOR161-2 は CYP1a2 の共発現により増大し、CYP2a5, 2f2 の共発現により減少した。

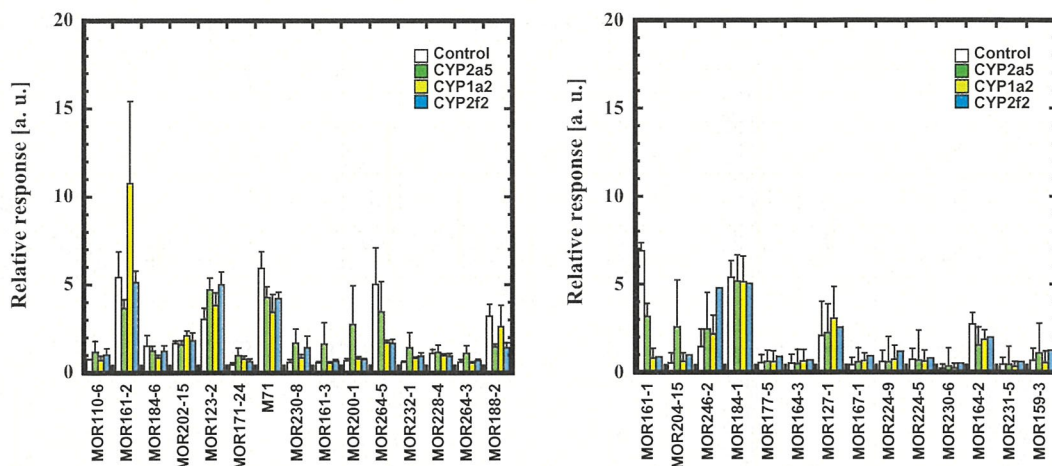


Fig. 2-1 アセトフェノン応答する OR のスクリーニング

マウス嗅上皮由来 CYP の CYP2a5, 1a2, 2f2(緑、黄、水色)を共発現させた場合とさせなかった場合(Control, 白)で応答の強度も変化している

添加した匂い分子アセトフェノンの終濃度は 300  $\mu\text{M}$  と実際のヒトの鼻における匂い分子の濃度よりも 1000~1 万倍高い濃度となっている。これは細胞に発現させた嗅覚受容体に匂い分子が結合するにあたって、培地に溶かし込んだ匂い分子ではある程度高い濃度でないと反応しないためである。

#### 2-4-2. CYP による OR のアセトフェノン応答性の変化

アセトフェノンに反応するマウス OR の選定ができたため、OR のアセトフェノン反応に最も変化を及ぼすマウス CYP を探索することとした。そこで、共発現させる CYP を CYP1a2, 2a5, 2f2, 2b10, 2b19, 2g1, 2j6 の 7 種類に増やし、これらの CYP 共発現下で 6 つの OR のアセトフェノン反応性が変化するかどうかを調べた。その結果、M71, MOR123-2, MOR161-2, MOR164-2, MOR184-1, MOR264-5 のいずれも、アセトフェノンの濃度が高くなるほどに反応も増大した。また CYP の共発現によって反応性が変化していた(Fig. 2-2)。

特に、CYP1a2 を共発現させた場合、MOR161-2 のアセトフェノン反応性が顕著に増大した( $p < 0.05$ )。このことから、CYP1a2 がアセトフェノンに何らかの作用を及ぼしたか、あるいは MOR161-2 自体に働きかけて反応性を向上させたことが考えられる。前者であれば、CYP1a2 が酵素として匂い分子アセトフェノンを代謝している可能性が考えられる。後者であればタンパク質同士の相互作用により嗅覚受容体の働きに変化が生じていると考えられる。



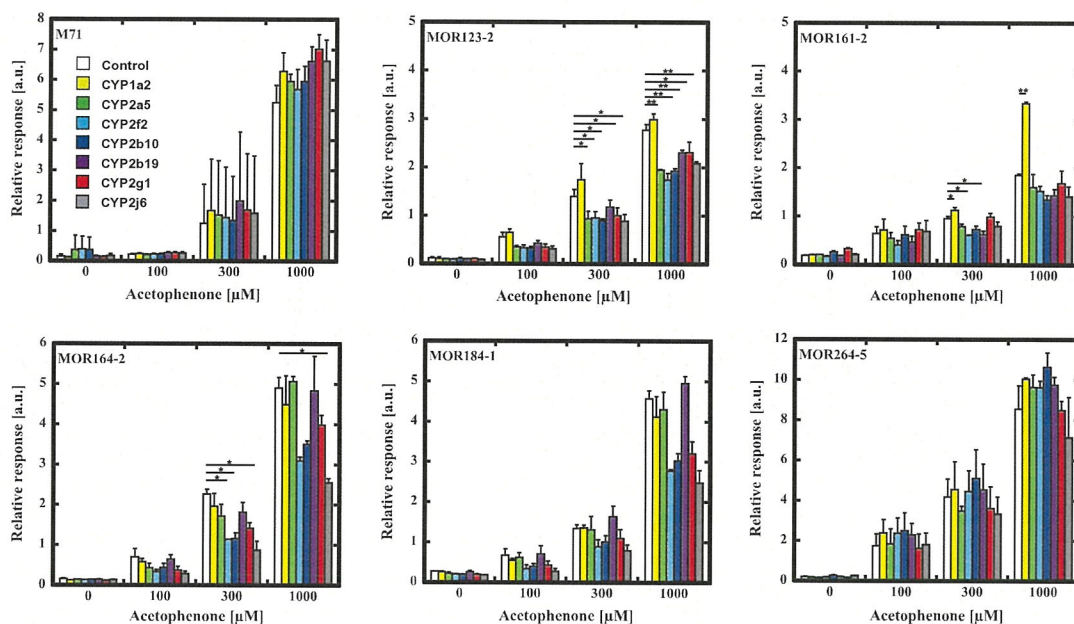


Fig. 2-2 CYP 共発現による OR のアセトフェノン応答性の変化

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

### 2-4-3. CYP1a2 の機能的発現の確認

MOR161-2 のアセトフェノン応答が CYP1a2 の共発現により顕著に増大したことについて、CYP1a2 が Hana3A 細胞内で発現し、かつ機能していることを確かめる必要があったため、P450 activity assay(Promega)を用いて CYP1a2 の活性を調べた。その結果、CYP1a2 を発現させた Hana3A 細胞は、前駆体である Luciferin-ME を代謝しルシフェリンを産生して、化学発光することが分かった(Fig. 2-3)。また CYP1a2 の基質特異性も見られ、トランスフェクションするプラスミド量が多いと化学発光値も強まった。基質を添加してから時間経過により応答が増大したことからも、CYP1a2 は Hana3A 細胞内で発現し、かつ機能していることが確認された。

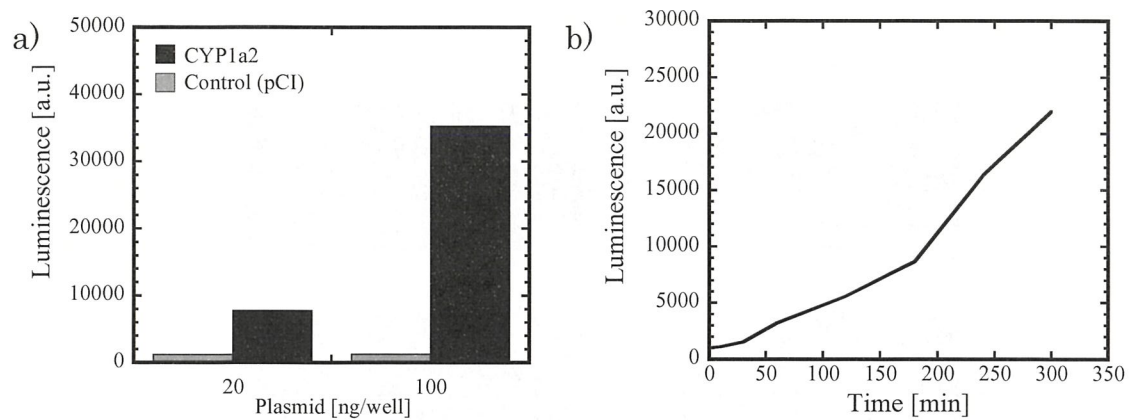


Fig. 2-3 Hana3A 細胞における CYP1a2 の活性

- a) トランスフェクション量に応じて活性が増大した  
 b) 時間経過により応答が増大した

#### 2-4-4. Surface staining による OR の細胞膜局在の確認

OR は膜タンパク質であり、細胞膜上に発現しなければ匂い分子を受容する機能が発揮できない。そこで、Hana3A 細胞に OR 遺伝子をトランスフェクションし発現させたことにより OR が細胞膜上に発現しているかどうか、抗体染色して蛍光顕微鏡で Hana3A 細胞を観察した。OR、RTP1S、およびトランスフェクション効率を確認するための GFP の遺伝子をそれぞれ Hana3A 細胞にトランスフェクションして発現させたのち、抗体染色を行い Hana3A 細胞におけるタンパク質発現を可視化した。その結果、OR が細胞膜表面に局在していることが分かった(Fig. 2-4a)。OR は Anti-Rho-tag および Anti-IgG Cy3 conjugate の抗体により標識している。GFP の蛍光が見られる細胞はトランスフェクションしてタンパク質が発現したことを示している。

また、MOR161-2 の Hana3A 細胞発現において、RTP1S および CYP1a2 の有無により細胞膜局在が変化するかを調べた。その結果、CYP1a2 の共発現により OR の膜局在量が増大することはなかった(Fig. 2-4b)。このことから、CYP1a2 の共発現が OR の発現量を増やす効果はないと示唆された。

以上より OR および CYP1a2 は Hana3A 細胞内で機能的発現していることから、MOR161-2 のアセトフェノン応答が CYP1a2 の共発現により増大したのは、CYP1a2 がアセトフェノンに何らかの作用を及ぼしたと考えられる。

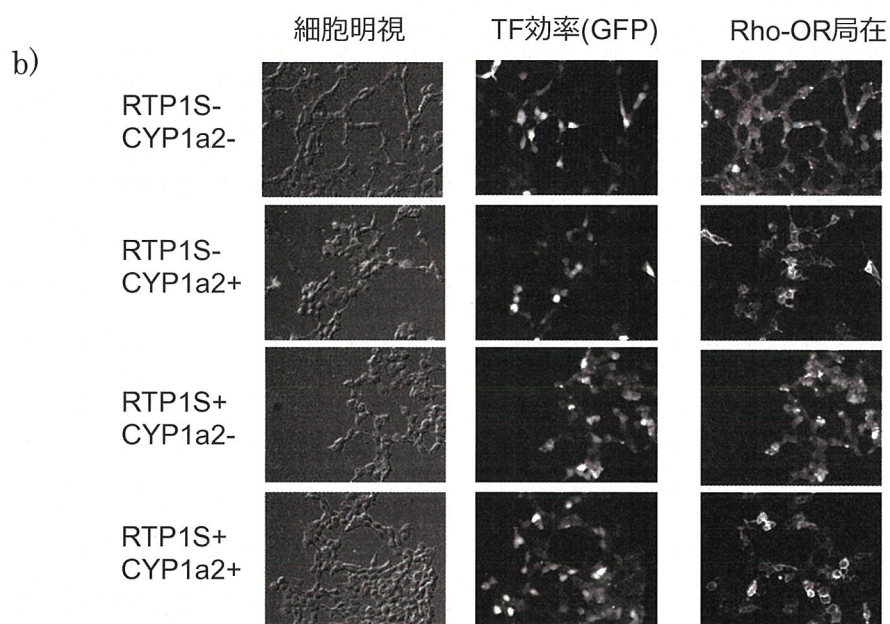
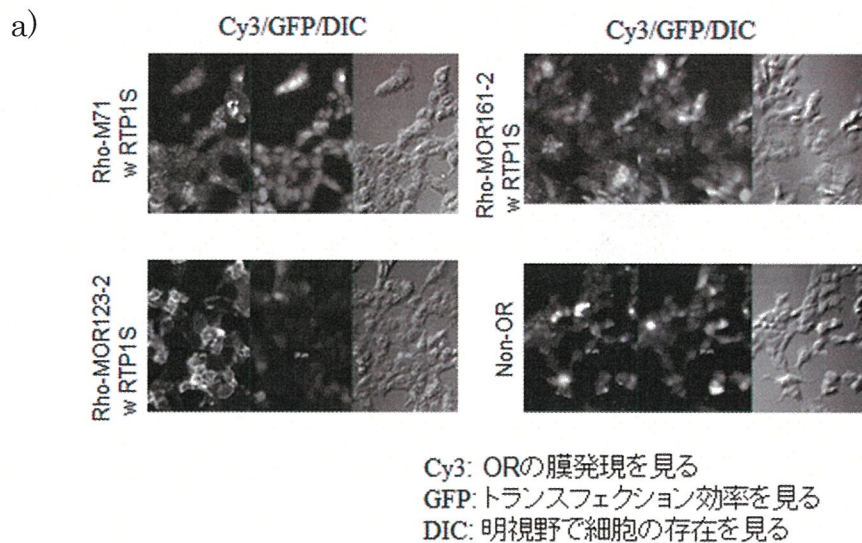


Fig. 2-4 OR の細胞膜局在

a) M71, MOR123-2, MOR161-2 の細胞膜局在

b) MOR161-2 の RTP1S, CYP1a2 存在下での細胞膜局在

#### 2-4-5. GC-MS による Hana3A 細胞培地の成分分析

CYP1a2 が水酸化酵素としてアセトフェノンを代謝しているか調べるため、GC-MS による成分分析を行うこととした。CYP1a2 発現細胞にアセトフェノンを含む培地を添加し、3 時間培養後の上清を溶媒の酢酸エチルに溶かして、GC-MS により成分分析した。その Total Ion Chromatography (TIC) 結果において、CYP1a2 を発現させていない細胞と比べ、強度の強い



イオンピークを検出した(Fig. 2-5)。

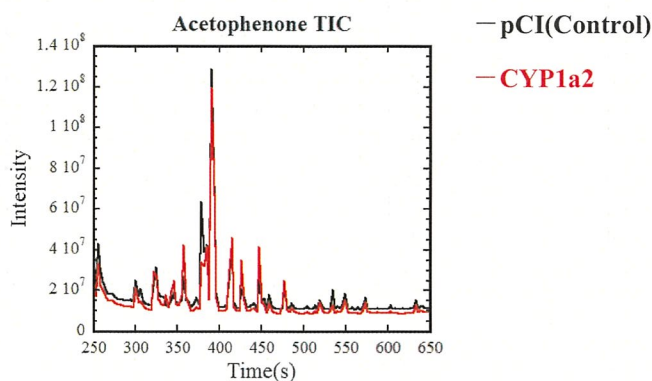


Fig. 2-5 TIC 結果

Control (黒) および CYP1a2 (赤) で RT=393s にピークを検出

しかしこの結果からは、バックグラウンドのベースラインが高く考察が難しかったため、試料を GC にインジェクションする時の導入量をスプリットして、イオン化される試料の量を 20 分の 1 に減らした。その結果、ベースラインが 0 の綺麗なピークが検出された(Fig. 2-6)。CYP を発現させていないコントロールには RT=393 s(6.55 min)にしかピーク検出されなかった。一方、CYP1a2 発現細胞の方は RT=6.55 min のピークの他に 370 s, 385 s, 420 s の 3 つのピークを検出し、これらが代謝産物の候補であると考えられた。分子量はそれぞれ 78, 77, 152 であった。

さらに代謝産物候補の分子量を精密に分析するため、分解能を 1000 から 3000 に上げて測定した。測定方法の都合上、パーフルオロケロセン標準化合物(PFK)を導入しながら試料をイオン化して測定しているため、普段の TIC 結果とは異なりベースラインが 0 にはならず、また目的のピークが検出される前後に PFK を導入することによって Intensity がその分強くなっている。RT=6.55 min にアセトフェノンと考えられるピークを検出し、RT=420s(7.18 min)に代謝産物と思われるピークを検出した(Fig. 2-7)。

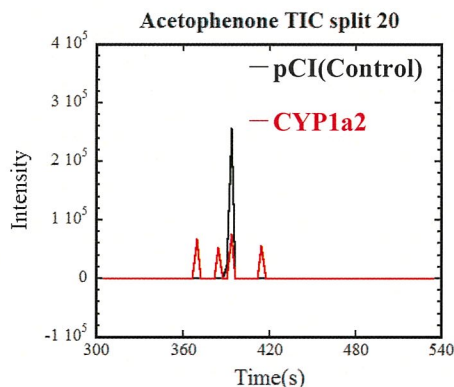


Fig. 2-6 スプリット 20 での TIC 結果

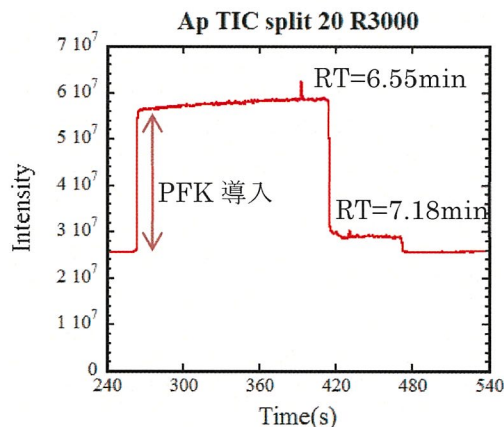


Fig. 2-7 精密分子量測定結果

RT=6.55 min のピークを解析した結果、分子量 77, 105, 106, 120 のピークが検出され、120 のピークは C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O であることが予想された(Fig. 2-8)。この結果はアセトフェノンの MS スペクトルデータ(Fig. 2-9)とも一致し、このピークはアセトフェノンであることが明らかとなった。同様に RT=7.18 min のピークを解析した結果、分子量 92, 120, 121, 152 のピークが検出され、152 のピークは C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> であることが予想された(Fig. 2-10)。この結果はサリチル酸メチルの MS スペクトルデータ(Fig. 2-11)と一致したことから、アセトフェノンの CYP1a2 による代謝産物はサリチル酸メチルであることが示唆された。

RT=370s, 385sに見られたピークは、添加したアセトフェノンを溶かした溶媒の DMSO および、細胞成分であると考えられる。

以上より、MS スペクトルのパターンから代謝産物はサリチル酸メチルだと同定し、CYP1a2 発現細胞がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝することが示唆された。

| Observed m/z | Int%  | Err[ppm / mmu] | U.S. Composition                                 |
|--------------|-------|----------------|--|
| 1 77.0058    | 44.15 | +39.7 / +3.1   | 5.5 C <sub>5</sub> H O                           |
| 2            |       | -234.6 / -18.1 | 0.5 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> |
| 3            |       | +237.9 / +18.3 | 1.5 C H O <sub>4</sub>                           |
| 4 105.0196   | 95.71 | -137.5 / -14.4 | 5.5 C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O              |
| 5            |       | +7.8 / +0.8    | 1.5 C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> |
| 6 106.0168   | 7.47  | +106.8 / +11.3 | 6.0 C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 7            |       | -92.5 / -9.8   | 1.0 C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> |
| 8 120.0558   | 42.02 | -14.3 / -1.7   | 5.0 C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O              |
| 9            |       | +112.8 / +13.5 | 1.0 C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> |

Fig. 2-8 RT=6.55 min のピークの精密分子量測定結果

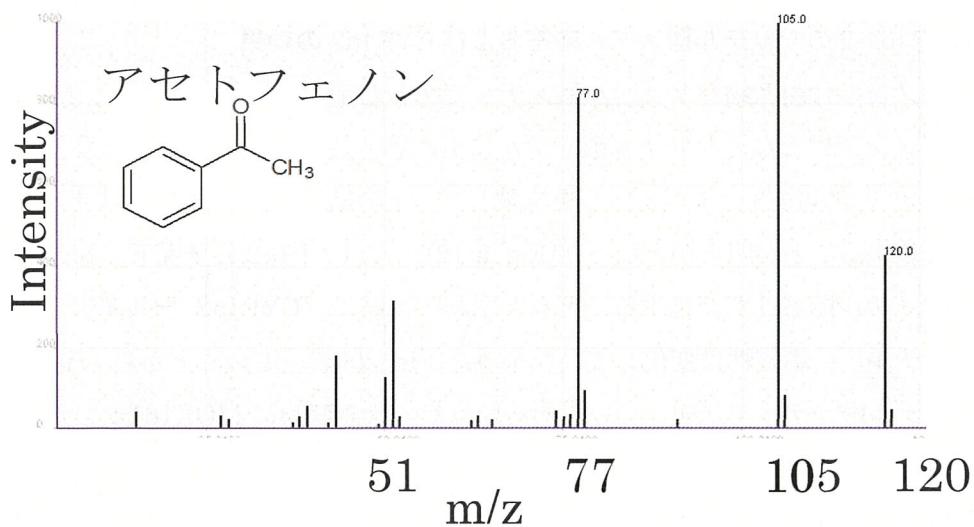


Fig. 2-9 アセトフェノンの MS スペクトルデータ

| Observed m/z | Int%     | Err [ppm / mmu] | U.S. Composition |               |
|--------------|----------|-----------------|------------------|---------------|
| 1            | 91.9988  | 43.43           | +97.5 / +9.0     | 6.0 C5 O2     |
| 2            |          |                 | -132.2 / -12.2   | 1.0 C2 H4 O4  |
| 3            | 120.0061 | 95.49           | -125.2 / -15.0   | 6.0 C7 H4 O2  |
| 4            |          |                 | +1.9 / +0.2      | 2.0 C3 H4 O5  |
| 5            | 121.0278 | 40.89           | -9.5 / -1.2      | 5.5 C7 H5 O2  |
| 6            |          |                 | +116.5 / +14.1   | 1.5 C3 H5 O5  |
| 7            | 152.0311 | 56.29           | +32.1 / +4.9     | 10.0 C11 H4 O |
| 8            |          |                 | -106.8 / -16.2   | 5.0 C8 H8 O3  |

Fig. 2-10 RT=7.18 min のピークの精密分子量測定結果

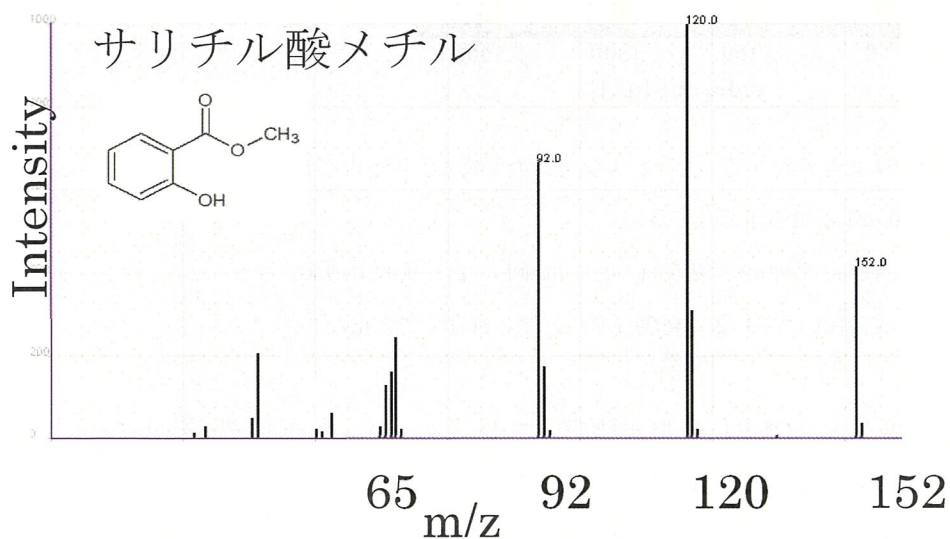


Fig. 2-11 サリチル酸メチルの MS スペクトルデータ



#### 2-4-6. MOR161-2 のサリチル酸メチル応答および CYP1a2 の効果

アセトフェノンの代謝産物がサリチル酸メチルであると示唆されたことから、MOR161-2 はアセトフェノンだけでなくサリチル酸メチルにも応答する可能性が示唆された。そこで MOR161-2 のサリチル酸メチルへの応答を試験した。その結果、MOR161-2 はサリチル酸メチルにも応答することが明らかとなった(Fig. 2-12)。また CYP1a2 共発現下で MOR161-2 のサリチル酸メチル応答性が変化するかどうかを調べた結果、CYP1a2 を共発現させてもサリチル酸メチルへの応答性は変化していなかった(Fig. 2-12)。このことから CYP1a2 発現細胞はサリチル酸メチルを代謝しない、あるいはその代謝産物に MOR161-2 は応答しないことが示唆された。

また、MOR161-2 のサリチル酸メチル応答性の方が、アセトフェノン応答性に比べて高いことが明らかとなった。これは CYP1a2 共発現下でのアセトフェノン応答性よりも高かった。

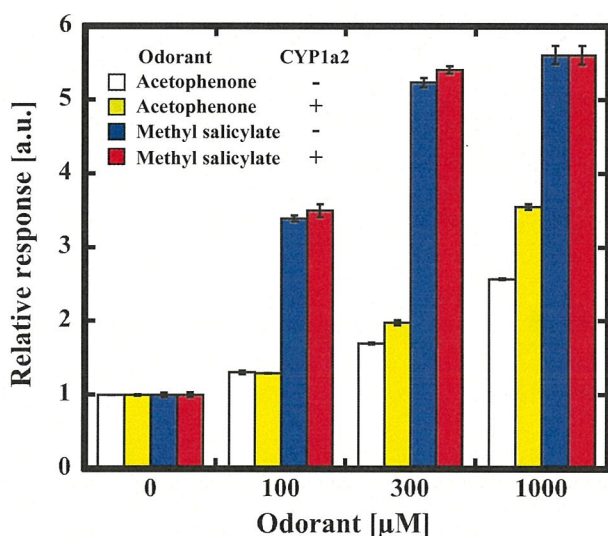


Fig. 2-12 MOR161-2 のアセトフェノンおよびサリチル酸メチルへの応答  
匂い分子の濃度 0 μM の値を 1 として算出  
アセトフェノン応答が CYP1a2 共発現 (黄) では無し (白) よりも増大  
サリチル酸メチル応答は CYP1a2 共発現 (赤) と無し (青) で変化なし

これらの結果から、CYP1a2 発現細胞がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝し、その結果として MOR161-2 の応答性が増大したことが示唆された。

以上より OR の匂い分子応答を評価するルシフェラーゼアッセイによって、CYP1a2 を共発現させると MOR161-2 のアセトフェノン応答が増大すること、またその原因としてアセトフェノンがサリチル酸メチルに代謝されること、サリチル酸メチルの方がアセトフェ

ノンより強く応答することが示唆された(Fig. 2-13)。

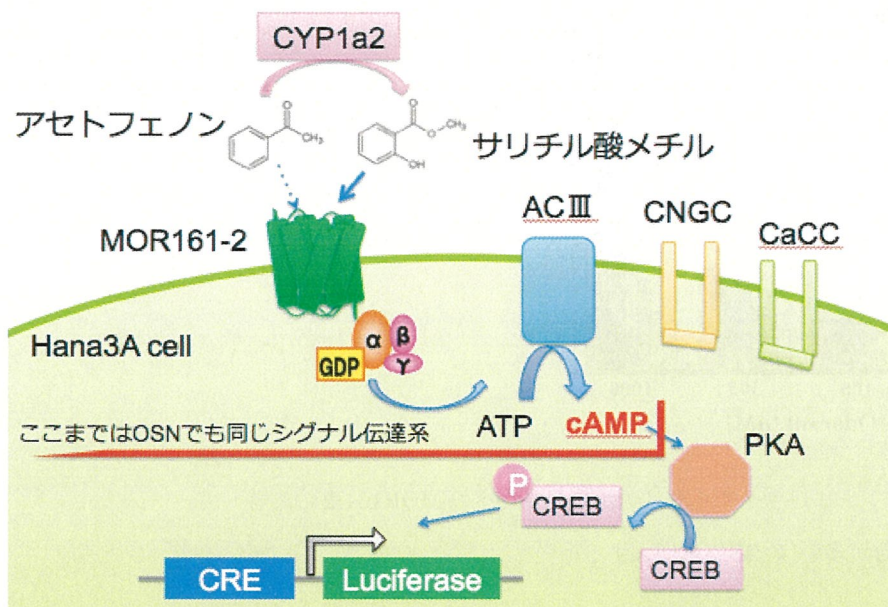


Fig. 2-13 CYP1a2 共発現下での MOR161-2 のアセトフェノン応答の概略図

アセトフェノンもサリチル酸メチルも MOR161-2 に結合する。アセトフェノンは CYP1a2 の代謝を受けてサリチル酸メチルが産生される。

#### 2-4-7. アセトフェノンとサリチル酸メチルの混合物をリガンドとしたアッセイ

MOR161-2 はアセトフェノンおよびサリチル酸メチルに応答するが、両方が存在する場合には発光値がどのようになるのかを調べた。アセトフェノン(Ap)とサリチル酸メチル(Ms)をそれぞれ 100:0, 90:10, 75:25, 50:50, 25:75, 10:90, 0:100 の割合で混合し、それらをリガンドとしてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、いずれの混合物にも MOR161-2 が応答することを確かめた。また合計の濃度が 300, 1000  $\mu\text{M}$  のときにおいて、サリチル酸メチルの割合が多いほど応答が増大する傾向が見られた(Fig. 2-14)。このことから、MOR161-2 はアセトフェノンよりもサリチル酸メチルにより応答することが示唆された。

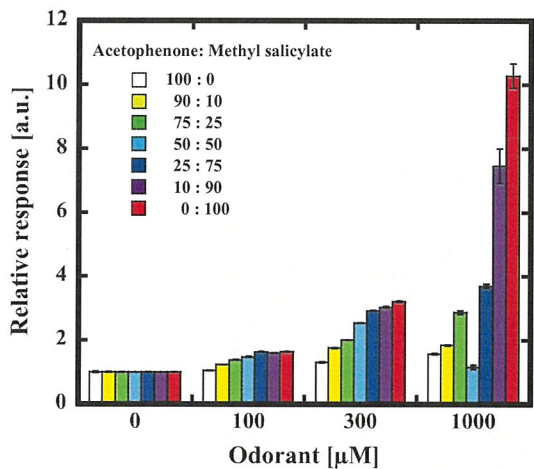


Fig. 2-14 アセトフェノンおよびサリチル酸メチルの混合物への MOR161-2 の応答  
サリチル酸メチルの割合が多いほど応答は増大する

#### 2-4-8. 反応中間体をリガンドとしたアッセイ

アセトフェノンからサリチル酸メチルへの構造変化を予想した際に、6種類の反応中間体が推察された(Fig. 2-15)。それらをリガンドとして MOR161-2 を対象にルシフェラーゼアッセイを行った。

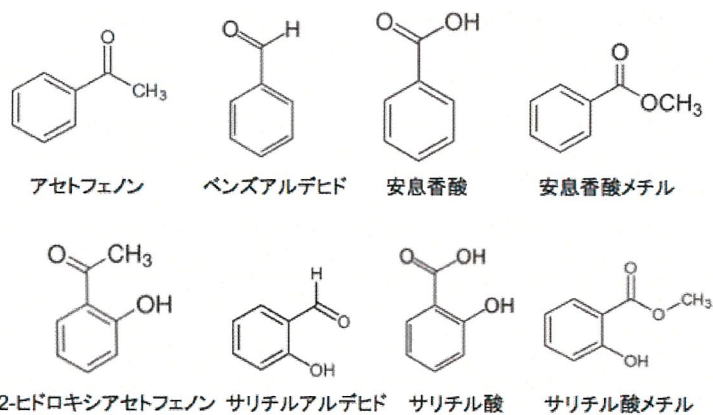


Fig. 2-15 アセトフェノンからサリチル酸メチルへの代謝において予想される反応中間体

その結果、MOR161-2 はサリチル酸および安息香酸メチルにも応答することが明らかとなった(Fig. 2-16)。ベンズアルデヒド、安息香酸、サリチルアルデヒド、2-ヒドロキシアセトフェノンには応答しなかった。



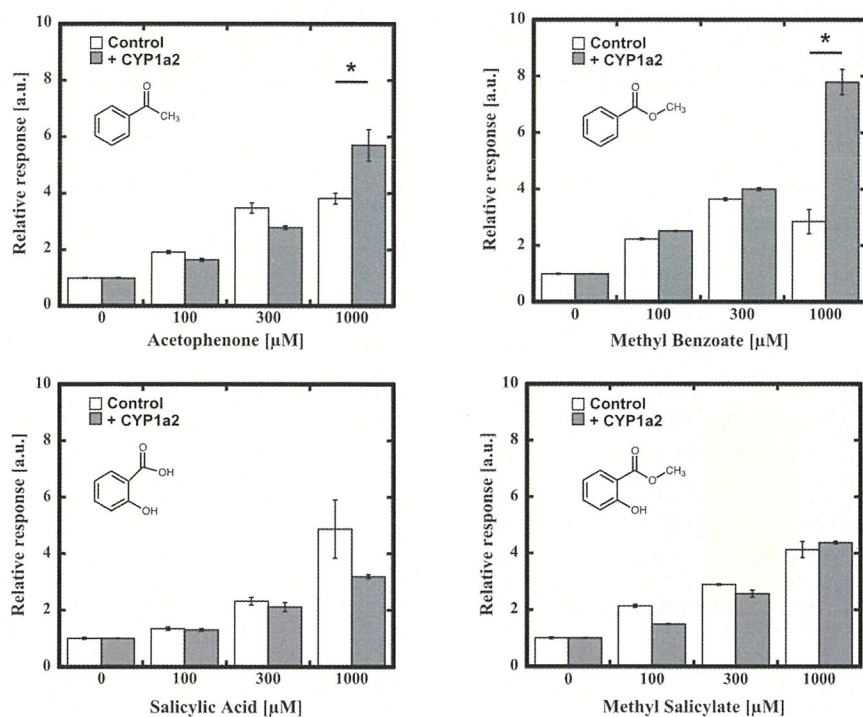


Fig. 2-16 反応中間体への MOR161-2 の応答

CYP1a2 共発現により安息香酸メチルへの応答は増大、サリチル酸への応答は減少する傾向が見られた。MOR161-2 が安息香酸メチルおよびサリチル酸に応答することは示されたが、アセトフェノンからサリチル酸メチルが代謝される反応における反応中間体が何であるかについてはこの結果からは分からない。

#### 2-4-9. CYP1a2 発現細胞の培養上清をリガンドに用いたアッセイ

アセトフェノンを含む培地で CYP 発現細胞を培養した培養上清を MOR161-2 発現細胞に添加することで、アセトフェノンの代謝産物に MOR161-2 が応答するかを調べた。CYP 発現細胞に 300 μM アセトフェノンを含む CD293 培地を添加して 1 時間培養したのち、その培養上清を MOR161-2 発現細胞に添加した。3 時間後、発光強度を測定する形でアッセイを行った。発現させた CYP は、CYP1a2, CYP2a5, CYP2f2 であり、コントロールとして CYP の発現なしも行った。また CYP1a2 はトランスフェクションするプラスミド量を 2 倍、3 倍にしても行った。さらにポジティブコントロール(PC)として、300 μM アセトフェノンを添加した CD293 培地で MOR161-2 発現細胞を 3 時間培養後、発光強度を測定した。ネガティブコントロール(NC)としてはアセトフェノン未添加の CD293 培地で MOR161-2 発現細胞を 3 時間培養後、発光強度を測定した。その結果、ポジティブコントロールに比べて、各種の値は低かった。1 時間培養した上清をリガンドに用いているため、匂い分子が

揮発してしまい、その分発光値も低減したことが考えられる(Fig. 2-17)。Control に比べると CYP1a2 発現細胞の培養上清の方が応答が高いことから、サリチル酸メチルが産生されていることが示唆された。

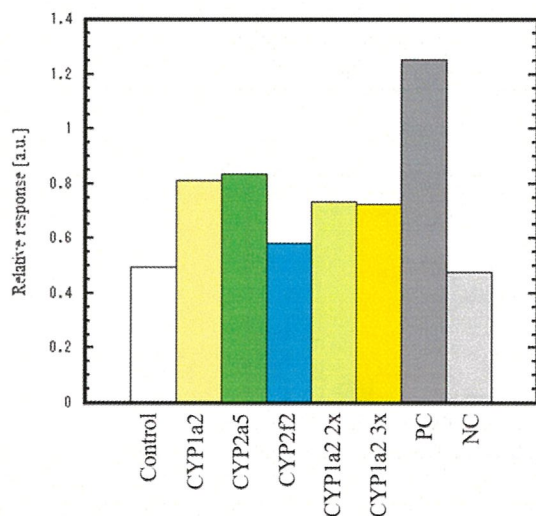


Fig. 2-17 CYP 発現細胞の培養上清に対する MOR161-2 の応答

添加したアセトフェノンは 300  $\mu$ M

CYP1a2 はトランスフェクションするプラスミド量を 2 倍、3 倍でも行った

PC: 300  $\mu$ M アセトフェノンを添加した CD293 培地で 3 時間培養後

NC: アセトフェノン未添加の CD293 培地で 3 時間培養後

#### 2-4-10. CYP1a2 の効果を検証する $\beta$ 2AR のリガンドアッセイ

アドレナリン $\beta$ 2 受容体( $\beta$ 2AR)は GPCR でありリガンドのイソプロテレノールへの応答において、下流のシグナル伝達経路では OR の匂い分子応答と同じく細胞内の cAMP の増大を引き起こす。そこで $\beta$ 2AR のイソプロテレノールへの応答との比較によって、CYP1a2 の効果を検証することができると考えた。その結果、CYP1a2 の共発現による $\beta$ 2AR のイソプロテレノール応答の変化は有意差が見られなかった。このことから CYP1a2 が cAMP 応答シフェラーゼのシグナル伝達系には影響していないことが示唆された(Fig. 2-18)。

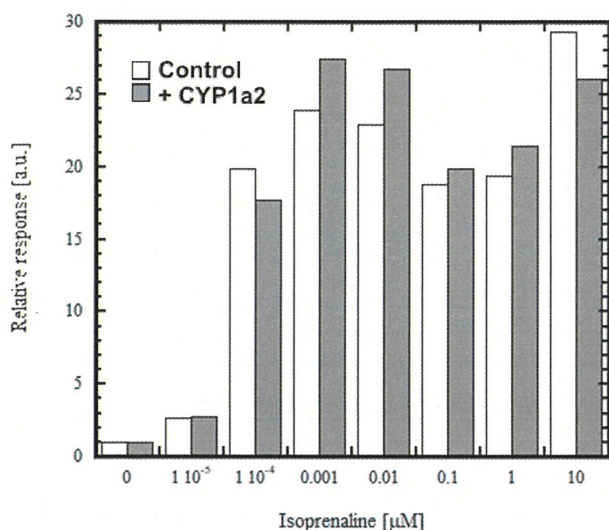


Fig. 2-18  $\beta$ 2AR のイソプロテレノール応答に対する CYP の効果

## 2-5. 考察および小括

本研究は、嗅粘液において匂い分子を代謝する酵素が CYP であると考え、CYP1a2 を共発現させると MOR161-2 のアセトフェノン応答性が増大するのは、CYP1a2 によるアセトフェノンの代謝が関与しているからだを示すことを目的とした。そこで大きく分けて 3 つの実験を行った。

### 1. CYP 共発現による OR のアセトフェノン応答性測定

CYP を共発現させることで OR のアセトフェノン応答性が変化するかをルシフェラーゼアッセイで調べた結果、MOR161-2 のアセトフェノン応答性に対して CYP1a2 の増大の効果が顕著に見られることを確かめた。他の CYP を共発現させても応答性は増大しなかったことから、CYP1a2 のみが MOR161-2 のアセトフェノン応答性に関与することが示唆された。

匂い分子にアセトフェノンを用いたのは、低分子で代謝反応を追いかけやすいと考えたためである。29 種類のアセトフェノン ORs と 7 種類の CYPs から MOR161-2 と CYP1a2 を選んだのは、CYP が及ぼす効果が最も大きかったためである。

アセトフェノンの濃度を  $100\text{--}1000 \mu\text{M}$  と高い濃度で添加して反応を見ているのは、ある程度高い濃度でないと代謝反応による代謝産物の産生も起こらないためである。実際のヒトの鼻における匂いの検知に比べて応答が低くなっているのは、実験系が匂い分子を培地中に溶かして分散させていること、シグナル伝達を利用したルシフェラーゼアッセイでの活性での評価になっていることが要因である。



## 2. CYP1a2 によるアセトフェノンの代謝産物の成分分析

CYP1a2 がアセトフェノンを代謝して別の化合物を産生しているかを調べるために、CYP1a2 発現細胞にアセトフェノンを含む培地を添加して培養後の培地上清を GC-MS により成分分析した結果、CYP1a2 を共発現させたときに特異的なピークを検出し、サリチル酸メチルと同定した。この結果から、CYP1a2 はアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝していることが示唆された。

CYP1a2 は単独で代謝反応を起こしているとは考えにくく、細胞内に元々存在していた酵素や電子伝達系が共役していることが考えられる。GC-MS において検出されたピークはサリチル酸メチル、細胞由来と考えられる低分子化合物のみで、反応中間体と見られるピークは検出されなかった。GC-MS のイオン化の設定や検出時間、CYP1a2 発現細胞でアセトフェノン添加後の培養時間などを変化させることにより、反応中間体を検出することが出来ると考えられる。また、CYP1a2 をタンパク質として精製し、アセトフェノンの代謝反応を調べる方法も考えられる。

## 3. CYP 共発現による OR のサリチル酸メチル応答性測定

MOR161-2 はサリチル酸メチルにも応答することが明らかとなった。また、CYP1a2 を共発現させてもサリチル酸メチル応答性に変化はなかった。さらに、MOR161-2 のサリチル酸メチル応答性の方がアセトフェノンに比べて高いことが明らかとなった。これらのことから、CYP1a2 がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝し、その結果 MOR161-2 の応答性が増大したことが示唆された。

本研究では異種細胞であるヒト由来 Hana3A 細胞にマウス由来 OR および CYP を発現させてルシフェラーゼアッセイを行なっているが、嗅覚神経細胞を用いていないのは嗅覚神経細胞が培養できないためである。

CYP1s2 の共発現において、中にはトランスフェクションがうまくいかず CYP1a2 を発現していない細胞もあるままにアッセイしていることが考えられる。より精度の高い結果を得るためには CYP1a2 発現していると確認できた細胞だけを抽出してアッセイを行うことが考えられる。

本研究から、CYP1a2 がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝したことが示唆された。MOR161-2 はサリチル酸メチルにも応答すること、その応答性に CYP1a2 共発現による影響はないことから、CYP1a2 はアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝することで、MOR161-2 のアセトフェノン応答性を増大させる効果を持つことが示唆された。



実際の動物の鼻においても、嗅粘膜に発現している CYP が匂い分子を代謝してから、その代謝産物に OR が応答していることが考えられる。以上のことから、匂い分子に対する OR の受容体特異性を解明するには、OR と匂い分子の関係性の他に、CYP による匂い分子の代謝の関与している可能性を考えることが必要だと示唆された。

## 第三章 マウスの嗅上皮における嗅覚受容体の匂い分子応答の解析

### 3-1. 緒言

第二章では Hana3A 細胞に発現させた OR の匂い分子応答を Dual-Glo Luciferase assay (Promega)により測定した。これらの結果から *in vitro* において、MOR161-2 は CYP1a2 の共発現によりアセトフェノン応答が増大することが示されたが、この CYP1a2 の効果が *in vivo* においても見られるのかどうかを確かめることとした。そこでマウスの嗅上皮を対象に *in situ hybridization* によって、OR の匂い分子応答の評価をする実験を行った。CYP の効果を確かめる目的で、CYP 阻害剤をマウスの鼻腔に注入することで、OR の匂い分子応答が低減するかどうかを調べた。

マウスの嗅上皮において、嗅覚神経細胞は 1000 以上ある OR の遺伝子から一つを選んで発現するため、ある匂い分子への OR の応答は、その OR を発現している嗅覚神経細胞の活性化と連動する。真核生物の細胞質リボソームは 40S サブユニットと 60S サブユニットからなり、40S サブユニットを構成するタンパク質の一つであるリボソームタンパク質 S6 は、神経細胞の活性化の後にリン酸化することが報告されている【74】。また、嗅覚神経細胞に発現する OR が活性化したとき、リボソームタンパク質 S6 のリン酸化(S6 phosphorylation: pS6)が起こる。匂い分子による刺激によって生じるマウスの嗅上皮における pS6 が、嗅覚神経細胞の活性化のマーカーとして用いることが出来ることが報告されている【75】。そのため、嗅上皮の切片を pS6 の抗体染色することによって活性化した嗅覚神経細胞を蛍光顕微鏡で観察することができる。

また、特定の OR に対しても RNA プローブを作製、利用して *in situ hybridization* することにより、その OR を発現している嗅覚神経細胞を蛍光顕微鏡で観察できる。

そこで、マウスに特定の匂い分子による刺激を行い、特定の OR を発現している嗅覚神経細胞の数における、OR の標識でも pS6 の抗体染色でも反応している嗅覚神経細胞の数を算出することで、その匂い分子にその特定の OR が応答したかどうかを評価することができる。

### 3-2. 実験材料

- RNA プローブの設計
  - 5x RNA pol buffer (Promega)
  - DIG RNA labeling mix
  - RNase inhibitor mix
    - 1:1 mixture or prime RNase inhibitor (Qiagen) and RNasin (Promega) or

equivalent

- RNA pol (Promega)
- DTT (100 mM)
- Alkaline buffer
  - ◇ 1M NaHCO<sub>3</sub>
  - ◇ 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Micro Bio-Spin 30 (Bio-Rad)

■ Prehybridization 溶液

- 50% formamide,
- 5x SSC,
- 5x Denhart's, Baker's yeast RNA (Sigma R-6750, 250 µg/ml),
- Herring sperm DNA (Sigma, P/C 100 µg/ml),
- 1mM DTT,
- Heparin (Sigma H 3393, 300 U/ml)

• Triethanolamine

- ◇ 700ml dW + 8.2ml triethanolamine (Sigma)

Gently stir on stir plate (no heat)

• Slide holders (hybridization 用)

1 ml ピペットからレールを作り、シャーレの中に敷く形で 2 本置いた。その上にスライドガラスを載せることで、hybridization が出来るようにした。レールを敷く dish の底には 50% formamide, 5x SSC で浸したペーパータオルを敷いた。複数のシャーレをまとめてインキュベートする際に、タッパーウェアの中に入れる形をとった。

• PBS-DEPC

- Add 1ml of DEPC to 1L of 1x PBS just before starting. Shake well

- 10ug/ml proteinase K (mix by inverting the tube just before use)
- Acetic anhydride
- Parafilm



- Hybridization 用
  - DIG or FITC probe
  
- TSA (FITC or Cy3)用
  - 0.5% Blocking solution (Roche) in PBS
  - Anti-DIG-POD (HRP)
  - 0.1% BSA-PBS
  - 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution
  - FITC (1/400) in Amplification Buffer (or PBS) containing 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  
- pS6 を用いた抗体染色用
  - Triton X-100
  - 5% skim milk in PBS with 0.1-0.5% Triton X-100
  - Primary antibodies (rabbit anti-pS6 240/244)
  - Secondary antibodies (Cy3 labeled)
  - 1% bisbenzimidazole
  - Mowiol

### 3-3. 実験方法

#### 3-3-1. マウスの嗅上皮の取得

21日齢のマウスを単独で紙のボックスの中に1時間放置した。その後、フィルターペーパーに10 μLの匂い分子（例えば100%アセトフェノン）をしみ込ませ、プラスチック製のカセットに入れた。これを先ほどのマウスと一緒に紙のボックスの中に入れて1時間放置し、匂い刺激を行った。その後、マウスを解剖し、鼻組織から嗅上皮を採取した。得られた嗅上皮は-80°Cで凍らせたのち、マイクロトームにより厚み20 μmの切片にした。

マウスの鼻に阻害剤を与えるにあたっては、注射器によるインジェクションを行った。酸素濃度を低下させた容器内でマウスを眠らせた状態で、CYPの阻害剤としてABTを、コントロールとしてはPBSを鼻腔に注射した。その後、覚醒したマウスに対して匂い刺激を同様に行い、嗅上皮を採取した。

#### 3-3-2. Fluorescence in situ hybridization

##### 1) サンプルの準備

スライドガラス(Superfrost plus)に厚み 20  $\mu\text{m}$  にスライスした嗅上皮切片を載せた。

## 2) RNA probe の準備

Taq polymerase を用いた PCR により目的のプラスミド DNA を増幅した。溶液の組成、プライマー配列、および温度条件は以下の通りである。

|                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| Plasmid DNA (1-10 ng/ $\mu\text{l}$ ) | 1 $\mu\text{l}$    |
| 10x Buffer                            | 1 $\mu\text{l}$    |
| 2 mM dNTP                             | 1 $\mu\text{l}$    |
| 5 $\mu\text{M}$ primer (pCI 5'A)      | 1 $\mu\text{l}$    |
| 5 $\mu\text{M}$ primer (T3-pCI 3'A)   | 1 $\mu\text{l}$    |
| Taq (Qiagen)                          | 0.05 $\mu\text{l}$ |
| dW                                    | 6 $\mu\text{l}$    |
| Total                                 | 11 $\mu\text{l}$   |

### Primers

pCI 5'A      CTCCACAGGTGTCCACTC

T3-pCI3'    GAAATTAACCCTCACTAAAGGCACTGCATTCTAGTTGTGG

### PCR cycles

|      |                  |
|------|------------------|
| 95°C | 15 min           |
| 95°C | 15 s             |
| 55°C | 15 s             |
| 72°C | 2 min (1 min/kb) |
|      | for 20-25 cycles |
| 72°C | 5 min            |

Qiagen column を用いて精製した。200  $\mu\text{l}$  の PB を加え、30 秒遠心した。次いで 750  $\mu\text{l}$  の PE を加え、30 秒遠心し、その後 2 分遠心した。10  $\mu\text{l}$  の EB を加えて 2 分遠心し、溶出した。

RNA プローブを作製するため、以下の組成で溶液を混ぜた。

|                          |                 |
|--------------------------|-----------------|
| 5x RNA pol buf (Promega) | 2 $\mu\text{l}$ |
| DIG RNA labeling mix     | 1 $\mu\text{l}$ |
| Template DNA             | 100-300 ng      |

|                     |                            |
|---------------------|----------------------------|
| RNase inhibitor mix | 0.5 $\mu$ l                |
| RNA pol (Promega)   | 0.5 $\mu$ l                |
| DTT (100mM)         | 1 $\mu$ l                  |
| <u>dW</u>           | <u>4 <math>\mu</math>l</u> |
| Total               | 10 $\mu$ l                 |

37°Cで2時間インキュベートしたのち、4°Cで保存した。

25  $\mu$ l の alkaline buffer (80mM NaHCO<sub>3</sub>, 120mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)を加え、60° Cで15分インキュベートしたのち、4° Cで保存した。alkaline bufferの組成は以下の通りである。

|                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| 1M NaHCO <sub>3</sub>              | 24 $\mu$ l                   |
| 1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 36 $\mu$ l                   |
| <u>dW</u>                          | <u>240 <math>\mu</math>l</u> |
| Total                              | 300 $\mu$ l                  |

Micro Bio-Spin 30 (Bio-Rad)を用いて精製した。カラムを3400 rpmで2分遠心したのち、RNAプローブ溶液を加えて3400 rpmで4分遠心した。35  $\mu$ lのformamideを加えて3400 rpmで2分遠心し、溶出した。サンプルは-80°Cで保存した。

### 3) 試薬の準備

Paraformaldehydeは400 mlの1x PBSに4% PFAを含む形で作製した。16 gのPFAを300 mlのdWに加え、1000  $\mu$ lの10 M NaOHを加えた。常温のまま1時間かけて溶かした。17 mlの20x PBSを加え、pHが7から8になるまで10 M HClを加えた。Filtrationを行い、Paraformaldehyde溶液を作製した。

Prehybridization溶液は以下の組成で作製した。-20°Cで保存した。

|  |               |
|--|---------------|
| formamide                                      | 25 ml         |
| 20x SSC  | 12.5 ml       |
| Yeast RNA (Sigma R-6750, 10 mg/ml)             | 1.5 ml        |
| 1M DTT   | 0.5 ml        |
| dW   | 10 ml         |
| Heparin (Sigma H 3393, 30000 U/ml)             | 0.5 ml        |
| <u>Herring Sperm DNA (Sigma, P/C 10 mg/ml)</u> | <u>0.5 ml</u> |
| Total  | 50 ml         |

### 4) サンプルの前処理



厚み 20  $\mu\text{m}$  にスライスした嗅上皮切片を載せたスライドを乾かしたのち、ラックに入れた。ラックに 4% PFA を加えてスライドガラスを浸し常温で 15 分静置した。1x PBS に浸して常温で 5 分静置する洗浄の操作を 2 回行った。次いで、triethanolamine solution (700 ml dW + 8.2 ml triethanolamine) にスライドガラスを浸した。その中に 1.75 ml の acetic anhydride を滴下し、拡販子を用いて拡販しながら常温で 10 分置いた。1x PBS を浸して常温で 5 分静置した。

#### 5) Prehybridization

シャーレの中に 5x SSC, 50% formamide で浸したペーパータオルとレーンを敷き、スライドガラスをその上に置いた。1 枚のスライドガラスにつき、500  $\mu\text{l}$  の Prehybridization 溶液を加え、58° C で 1 時間置いた。

#### 6) Hybridization

Hybridization 溶液は 200  $\mu\text{l}$  の Prehybridization 溶液に 0.1  $\mu\text{l}$  の DIG or FITC probe を加え、85° C で 5 分温めて作製した。スライドガラスから Prehybridization 溶液を除き、200  $\mu\text{l}$  の Hybridization 溶液を加え、パラフィルムを載せて覆ったのち、58° C で一晩置いた。

#### 7) 洗浄

5x SSC および 0.2x SSC を 72° C に温めた。スライドガラスから Hybridization 溶液をのぞき、5x SSC で満たしたラックに浸した。パラフィルムは取り外し、別の 5x SSC で満たしたラックに浸した。0.2x SSC で満たしたラックに浸して 72° C で 30 分置いた。次いで、別の 0.2x SSC で満たしたラックに浸して 72° C で 30 分置いた。その後 1x PBS で満たしたラックに浸して 5 分置いた。

#### 8) TSA FITC

0.5% Blocking Solution (Roche) で slide mailer を満たしてその中にスライドガラスを入れた。常温で 30 分置いてブロッキングした。50 ml の Blocking Solution に 50  $\mu\text{l}$  の anti-DIG-POD (HRP) を加え、この antibody solution でスライドガラスを入れた slide mailer を満たし、常温で 45 分置いた。1x PBS で浸して常温で 10 分静置する洗浄の操作を 3 回行った。0.1% BSA-PBS に浸した。シャーレの中に 5x SSC, 50% formamide で浸したペーパータオルとレーンを敷き、スライドガラスをその上に置いた。200  $\mu\text{l}$  の TSA 溶液を加えて常温で 10 分置いた。TSA 溶液は 0.003%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 (5  $\mu\text{l}$  of 30% solution in 50 ml)

を含む 1x PBS に 1/400 の割合で FITC を加えて作製した。TSA 溶液を除き、1x PBS で浸して常温で 2 分置いた。

#### 9) pS6 を用いた抗体染色

0.1% Triton X-100 で浸して 5 分置いた。1x PBS で浸して常温で 5 分静置する洗浄の操作を 2 回行った。Blocking solution (5% skim milk in PBS with 0.1-0.5% Triton X-100) で浸して常温で 30 分以上置いた。シャーレの中に 5x SSC, 50% formamide で浸したペーパータオルとレーンを敷き、スライドガラスをその上に置いた。一次抗体(rabbit anti-pS6 240/244)を含む blocking solution を 200  $\mu$ l 加えて 4° C で一晩置いた。

1x PBS で浸して常温で 5 分静置する洗浄の操作を 3 回行った。二次抗体(Cy3 labeled)を含む blocking solution を 200  $\mu$ l 加え常温で 30 分から 1 時間置いた。1x PBS で浸して常温で 5 分静置する洗浄の操作を 2 回行った。1% bisbenzimidazole を 1/10000 の割合で加えた PBS で浸して 5 分置いたのち、PBS で 5 分浸して置いた。その後 dW で浸した。Mowiol を用いてプレパラートを作製した。

### 3-4. 実験結果

#### 3-4-1. MOR161-2 の匂い分子応答

1%、100% アセトフェノン、1%、100% D-アセトフェノン、100%サリチル酸メチル、コントロールとして水、これらをマウスに嗅がせて、FISH (fluorescence in situ hybridization) を行った。匂い分子溶液の希釈には水を用いた。また、CYP の阻害剤として ABT (1-aminobenzotriazole) を用いた。

核、嗅覚神経細胞における MOR161-2 の発現、匂い分子に応答した OR の局在を観察している。嗅覚神経細胞のうち MOR161-2 を発現しているか、pS6 で蛍光しているものが匂い分子に応答した MOR161-2 であることを示す。匂い分子に応答しているが MOR161-2 を発現していない嗅覚神経細胞は、他のアセトフェノン応答する OR を発現している。MOR161-2 を発現しているが pS6 で蛍光していない嗅覚神経細胞は、未成熟な細胞または匂い分子が届いていないことを示す(Fig. 3-1, 3-2)。

観察の結果、MOR161-2 はアセトフェノンおよびサリチル酸メチルに応答することが明らかとなった(Table 3-1, Fig. 3-3)。CYP 阻害剤である ABT の注射によってアセトフェノン応答が低減されたが、コントロールである PBS によっても低減されていた。このことから、溶液のインジェクション自体にアセトフェノン応答を低減させる効果があったと見られる。鼻腔への溶液の注射が、マウスの嗅粘液を洗い流す作用をもたらし、それゆえにアセトフ

フェノン応答が低減したことが考えられる。

ABT のインジェクションによりサリチル酸メチル応答は変化しなかったことから、MOR161-2 のサリチル酸メチル応答に嗅粘液内の酵素は影響していないと考えられる。この結果は *in vitro* でのアッセイの結果を支持するものである。

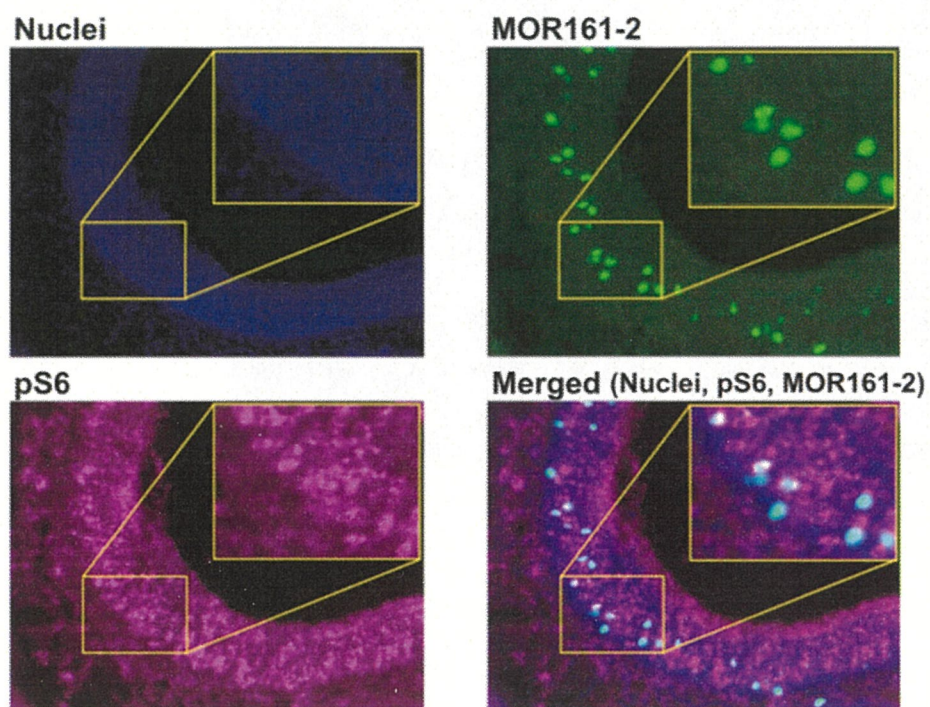


Fig. 3-1 嗅上皮における MOR161-2 のアセトフェノン応答の蛍光顕微鏡観察



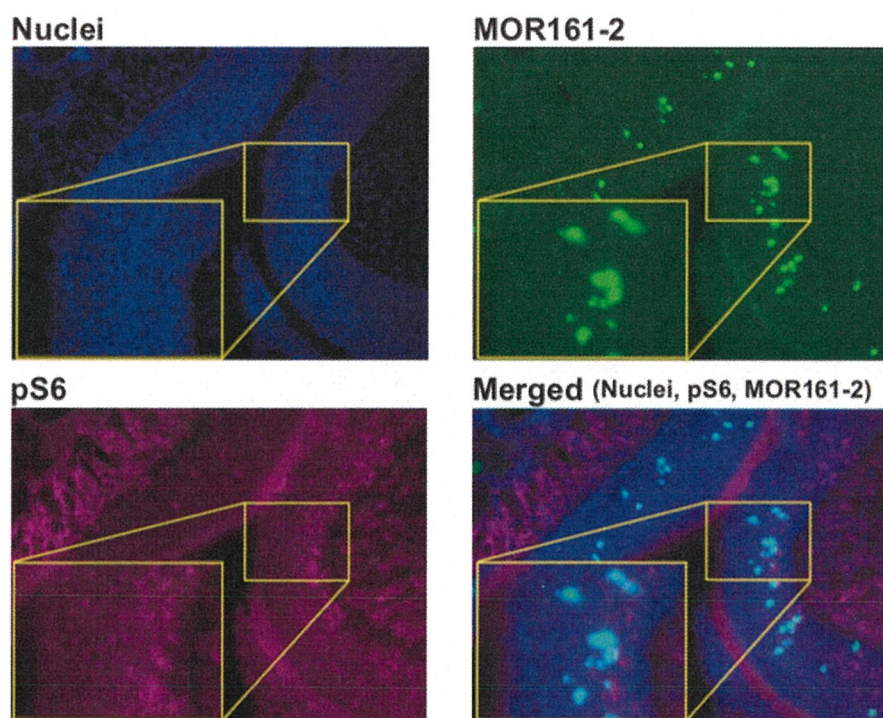


Fig. 3-2 嗅上皮における MOR161-2 の Control の蛍光顕微鏡観察

Table 3-1 FISH による MOR161-2 の匂い分子応答の評価

AC: アセトフェノン、MS: サリチル酸メチル 数値は割合、括弧内は特定の OR を発現している嗅覚神経細胞の数における、OR の抗体染色でも pS6 の抗体染色でも反応している嗅覚神経細胞の数

|             | 1 回目          | 2 回目           | 3 回目           | 4 回目           |
|-------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Control     | 0.05 (1/19)   | 0.044 (3/68)   | 0.066 (4/61)   | 0.039 (2/51)   |
| 1% AC       | 0.00 (0/7)    | 0.394 (26/66)  | 0.309 (42/136) | 0.328 (22/67)  |
| 100% AC     | 0.41 (9/22)   | 0.322 (55/171) | 0.420 (34/81)  | 0.368 (43/117) |
| 1% D-AC     | 0.37 (34/92)  | 0.023 (2/88)   |                |                |
| 100% D-AC   | 0.46 (73/168) | 0.175 (14/80)  |                |                |
| 100% MS     | 0.45 (13/29)  | 0.356 (37/104) | 0.414 (24/58)  | 0.438 (7/16)   |
| ABT control |               |                |                | 0.056 (10/179) |
| ABT 1% AC   |               | 0.237 (28/118) |                |                |
| ABT 100% AC |               | 0.234 (15/64)  |                | 0.163 (33/202) |
| PBS 100% AC |               |                |                | 0.189 (28/148) |
| ABT 100% MS |               |                |                | 0.474 (72/152) |

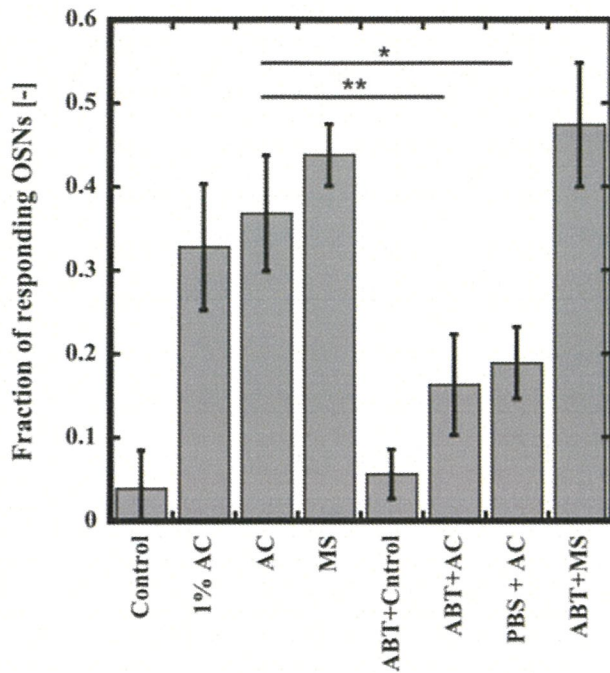


Fig. 3-3 嗅上皮における MOR161-2 の匂い分子応答

Control は匂い分子を未添加で水を使用

右 4 レーンは事前に ABT or PBS(mock)を鼻腔に注入。匂い分子濃度はいずれも 100%

### 3-4-2. Olfr1505 の匂い分子応答

Duke 大学松波研究室の嗅上皮のトランスクリプトーム解析【76】、および pS6 によるアセトフェノン応答するマウス嗅覚受容体のスクリーニング【75】から Olfr1505 はアセトフェノン応答することがわかっている。第二章のように Olfr1505 を Hana3A 細胞に発現させた時にアセトフェノン、安息香酸メチル、サリチル酸、サリチル酸メチルに反応するか調べた結果、いずれの反応も MOR161-2 に比べて低かった(Fig. 3-4)。

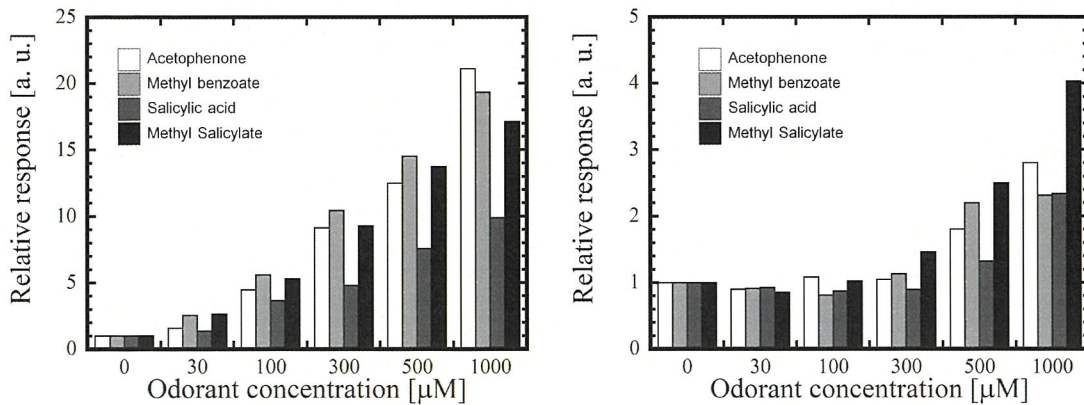


Fig. 3-4 ルシフェラーゼアッセイによる MOR161-2 および Olfr1505 の匂い分子応答

異種細胞発現における MOR161-2 および Olf1505 の匂い分子応答性の強さの違いが、嗅上皮における匂い分子応答においてもあるのかを調べる目的で、FISH による Olf1505 の匂い分子応答を解析した。その結果、Olf1505 はアセトフェノンおよびサリチル酸メチルに反応することが明らかとなった (Table 3-2, Fig. 3-5)。またその応答性の強さは MOR161-2 のアセトフェノンおよびサリチル酸メチルへの反応と同程度であった。このことから、Olf1505 は嗅上皮の嗅覚神経細胞における反応に比べて、異種細胞発現において匂い分子応答が低減していることが示唆された。

Table 3-2 FISH による Olf1505 の匂い分子応答の評価

AC: アセトフェノン、ME: サリチル酸メチル 数値は割合、括弧内は特定の OR を発現している嗅覚神経細胞の数における、OR の抗体染色でも pS6 の抗体染色でも反応している嗅覚神経細胞の数

|             | 1 回目          | 2 回目          | 3 回目           |
|-------------|---------------|---------------|----------------|
| Control     | 0.07 (2/27)   | 0.130 (7/54)  | 0.057 (3/53)   |
| 1% AC       | 0.37 (16/43)  | 0.163 (8/49)  | 0.158 (9/57)   |
| 100% AC     | 0.14 (2/14)   | 0.537 (36/67) | 0.361 (30/83)  |
| 1% D-AC     | 0.29 (15/51)  |               |                |
| 100% D-AC   | 0.22 (16/74)  |               |                |
| 100% MS     | 0.34 (54/158) | 0.437 (31/71) | 0.286 (4/14)   |
| ABT control |               |               | 0.109 (6/55)   |
| ABT 1% AC   |               | 0.359 (23/64) |                |
| ABT 100% AC |               | 0.358 (25/67) | 0.277 (36/130) |
| PBS 100% AC |               |               | 0.175 (10/57)  |
| ABT 100% MS |               |               | 0.223 (23/103) |



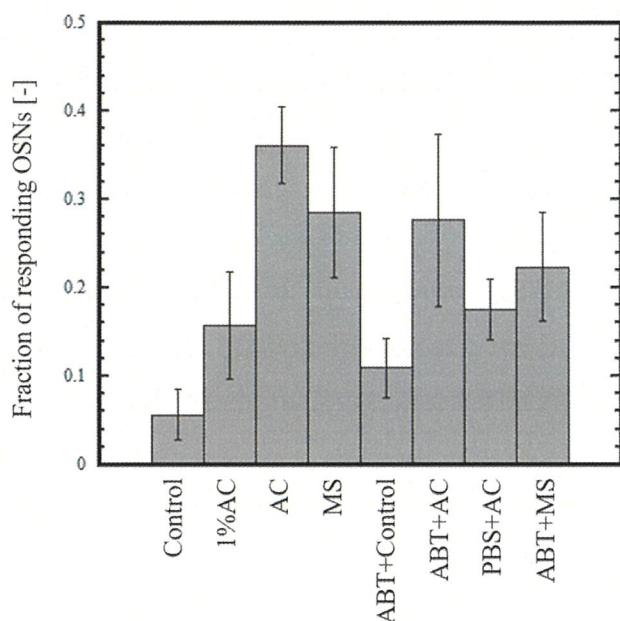


Fig. 3-5 Olfr1505 の匂い分子応答

Control は匂い分子を未添加、水を使用。

右 4 レーンは事前に ABT or PBS(mock)を鼻腔に注入。匂い分子濃度はいずれも 100%

### 3-5. 考察および小括

Hana3A 細胞に発現させた MOR161-2 のアセトフェノン応答が CYP1a2 の共発現により顕著に増大する効果が、嗅上皮の嗅覚神経細胞においても見られるのかどうか、マウスの嗅上皮を対象にした *in situ* hybridization によって OR の匂い分子応答の評価をする実験を行った。

MOR161-2 はアセトフェノンおよびサリチル酸メチルに反応し、本実験の手法により *in vivo* における匂い分子応答を測定できることが確かめられた。一般的に神経細胞の活性化のマーカーとして用いられているリボソーム S6 タンパク質のリン酸化が嗅覚神経細胞の匂い分子応答による活性化に対しても有効であり、本実験の手法に活用できた。また OR を RNA probe で標識したことによって、特定の OR に対して発現している嗅覚神経細胞を可視化することができ、anti-pS6 で免疫染色することによりある OR を発現しているかつ匂い分子応答している嗅覚神経細胞を算出することができた。

また、CYP の効果を確認する目的で、CYP 阻害剤をマウスの鼻腔に注入することで、OR の匂い分子応答が低減するかどうかを調べた結果、溶液を鼻腔に注入するという操作が嗅粘液の洗浄をもたらした。その結果としてアセトフェノンの応答が低減した。一方でサリチル酸メチルへの応答は変化しなかった。このことから嗅粘液が OR のアセトフェノン応答



に影響し、サリチル酸メチル応答には影響しないことが示唆された。

実験手法として、マウスに匂い分子を嗅がせて 1 時間静置したのちに嗅上皮を獲得するのは妥当である。また、**CYP1a2** ノックアウトマウスは発育に問題が生じて 3 週齢のマウスを用いることができなかったため、代替手段として **CYP** 阻害剤の鼻腔への注入としている。

**MOR161-2**、**Olf1505** のアセトフェノン応答およびサリチル酸メチル応答を、異種細胞発現において、嗅上皮の嗅覚神経細胞においてそれぞれで比較した結果、**Olf1505** は嗅上皮の嗅覚神経細胞における応答に比べて、異種細胞発現において匂い分子応答が低減していることが示唆された。

## 第四章 総合考察

嗅覚機構の解明に向けた嗅覚受容体の機能構造解析のため、本研究では嗅覚受容体を発現させた異種細胞における匂い分子応答が、嗅覚神経細胞における嗅覚受容体の匂い分子応答に比べて低いもしくは応答しない点に着目した。このことから嗅覚受容体と匂い分子の関係性のみで匂い分子応答を考えるのではなく、嗅粘液中のタンパク質も含めて嗅覚機構を捉える必要があると考えるに至った。そして嗅粘液中に含まれる酵素が匂い分子を代謝しているという報告および嗅上皮にシトクロム P450 が発現しているという知見から、OR の匂い分子応答に対する CYP の効果を解析することとした。

本研究では OR の匂い分子応答において嗅粘液中に含まれる CYP が変化をもたらしていることを解析するため、分子生物学的な *in vitro* のアプローチを始め、マウスの嗅上皮そのものを対象とした *in vivo* の実験を行った。

第二章では、匂い分子はアセトフェノンを対象とし、応答することが知られているマウスの嗅覚受容体 MOR161-2 を中心としてアッセイを行った。マウスの嗅粘膜に発現することが報告されている CYP のうち、CYP1a2 の共発現によって MOR161-2 のアセトフェノン応答が増大することが明らかとなった。CYP1a2 を発現させた Hana3A 細胞がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝したこと、サリチル酸メチルはアセトフェノンよりも強く MOR161-2 が応答したこと、CYP1a2 はアセトフェノンを代謝することによって MOR161-2 の匂い分子応答を増大させる効果をもつことが示唆された。

このアセトフェノンからサリチル酸メチルへの代謝反応を追究するため、予想される反応中間体を対象としてアッセイを行った。その結果、安息香酸メチルおよびサリチル酸も MOR161-2 が応答することが明らかとなったが、いずれも代謝産物として産生されるのかは不明である。GC-MS を用いた成分分析により代謝反応を追いかけることで、反応中間体を検出し代謝経路を推定することが期待される。サリチル酸メチルはアセトフェノンよりも強く MOR161-2 が応答し、アセトフェノンとサリチル酸メチルの混合物ではサリチル酸メチルの割合が多いほど MOR161-2 が強く応答したこと、CYP1a2 発現細胞がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝するほど応答も強くなると考えられる。MOR161-2 のサリチル酸メチルへの応答は CYP1a2 の共発現により変化はなかったため、サリチル酸メチルは CYP1a2 発現細胞により代謝されないと考えられる。

MOR161-2 のアセトフェノン応答に対する CYP1a2 の効果について、アドレナリンβ2 受容体のイソプロテレノールへの応答における CYP の影響と比較した結果、アドレナリンβ2

受容体のイソプロテレノール応答は CYP1a2 の共発現で変化しなかったことから、CYP1a2 はイソプロテレノールに影響せず、また細胞内の cAMP 応答性ルシフェラーゼに関わるシグナル伝達系にも影響していないことが示唆された。この結果は、CYP1a2 発現細胞は匂い分子のアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝することにより MOR161-2 の応答を増大させるという知見を支持するものである。

本研究では CYP1a2 の効果について追求したが、MOR161-2 のアセトフェノン応答は CYP2f2 の共発現により低下する一方で、MOR246-2 のアセトフェノン応答は CYP2f2 の共発現により増大していた。このことから CYP2f2 発現細胞はアセトフェノンを別の代謝産物に代謝している可能性が考えられる。また嗅粘液中には複数の CYP が発現していて *in vivo* では匂い分子の代謝が複雑に起きており、匂い分子の代謝と、代謝産物が OR に結合することが競合することが考えられる。

第三章では、マウスに特定の匂い分子による刺激を行い、特定の OR を発現している嗅覚神経細胞の数における、OR の標識でも pS6 の抗体染色でも反応している嗅覚神経細胞の数を算出することで、その匂い分子にその特定の OR が応答したかどうかを評価した。嗅上皮において MOR161-2 はアセトフェノンおよびサリチル酸メチルに反応することを確認し、*in vitro* の結果と同じくサリチル酸メチルはアセトフェノンよりも強く MOR161-2 に反応した。この手法を用いて MOR161-2 のアセトフェノン応答に対する CYP1a2 の効果を解析するため、CYP 阻害剤の ABT をマウスの鼻に注射してから匂い刺激を行い匂い分子応答の評価を行った。CYP 阻害剤の ABT の添加でも、PBS の添加でも MOR161-2 のアセトフェノン応答が低下したことから、マウスの鼻への溶液の注射により嗅粘液の洗浄が引き起こされ、結果として匂い分子が代謝されなかったことが示唆された。一方で MOR161-2 のサリチル酸メチル応答は変化しなかったことから、この応答に嗅粘液中のタンパク質の代謝は影響していないことが考えられる。この結果は *in vitro* の OR 発現細胞における cAMP 応答性ルシフェラーゼアッセイによる結果を支持するものである。

本研究の結果から、嗅粘膜に発現している CYP が匂い分子を代謝してから、その代謝産物に OR が応答していることが考えられる。そのため匂い分子に対する OR の受容体特異性を解明するには、OR と匂い分子の関係性の他に、CYP による匂い分子の代謝の関与している可能性を考えることが必要だと示唆された。

本研究では CYP1a2 が匂い分子の代謝をどこで行っているのかを明らかにできていない。また、CYP1a2 の発現と OR の発現が同じ一つの細胞においてされているかどうかは確かでない。発現した CYP は細胞内の小胞体またはミトコンドリアに局在していると考え

られる。そのため CYP による代謝産物の OR への結合のためには、細胞内への匂い分子の輸送、CYP による代謝、代謝産物の細胞外への輸送、OR への結合が起きていると考えられる。この実験系ではそのような非効率的な経路のために CYP の過剰発現が必要となっていると考えられる。しかし嗅上皮においては、嗅粘膜から嗅粘液中のエキソソームに含まれる分泌タンパク質として存在している可能性が考えられる。エキソソームは上皮細胞、造血細胞、および一部の腫瘍細胞を含むさまざまな細胞によって分泌される小胞である。嗅粘液においてもエキソソームおよび分泌タンパク質は豊富でその中に CYP が含まれていると考えられる。CYP の発現はどこでされているのかを確かめることは、嗅粘液中のタンパク質が匂い分子を代謝することを追求するのに重要であり、今後、嗅上皮における CYP および代謝産物の局在を解明することが望まれる。

嗅粘膜における CYP の役割は、嗅粘液中に溶け込んだ匂い分子の代謝であるがその意義としては有毒な化合物の酸化等による解毒の他、水酸化により親水性を高めること、そして嗅覚受容体がより応答しやすい代謝産物を産生することが考えられる。またヒトでは 400 種類、マウスでは 1000 種類存在する嗅覚受容体の応答の組み合わせで匂いを知覚しているレパトリーに対して嗅粘液における匂い分子の代謝が起きることで、知覚できる匂い分子のパターンと濃度に対してより広域な幅をもたせることができている可能性が考えられる。本研究により、CYP1a2 発現細胞がアセトフェノンをサリチル酸メチルに代謝し、そのいずれもが MOR161-2 に応答することが明らかとなった。アセトフェノンの濃度が少ない状態でも、CYP1a2 によりサリチル酸メチルに代謝されるとアセトフェノンよりサリチル酸メチルを応答しやすい MOR161-2 は反応すると考えられる。

嗅粘液における匂い分子の代謝は 2 つのステップがあり、第一ステップでは分子の酸化、加水分解、還元といった官能基の変化が起きる。第二ステップではその化合物と親水性化合物の結合が起きる。CYP による代謝は第一ステップに該当し、複数の酵素が共役して匂い分子の代謝に関与している。本研究では単独の酵素について代謝反応を調べたが、実際の鼻腔においては複数の酵素が働いているため、代謝反応は複雑に起こっていると考えられる。より実際に即した匂い分子の嗅粘液における溶け込みから代謝、嗅覚受容体への結合を調べるためには、複数の酵素を用いて代謝反応を追いかけたり *in vivo* なマウスを用いた系で嗅上皮から匂い分子の成分を抽出、分析することが必要と考えられる。

本研究は *in vitro* および *in vivo* の双方向のアプローチにより、マウスの嗅覚受容体が応答する匂い分子が嗅粘液中の酵素により代謝されること、具体的にアセトフェノンがサリ



チル酸メチルに代謝することを初めて示したものである。近年の研究では匂い分子の代謝をリアルタイムに測定する手法の開発【80】や、嗅粘液中のタンパク質のプロテオーム解析【81, 82】が行われている。嗅粘液中の酵素の解析および匂い分子の代謝の詳細な分析が進められることで、嗅覚受容体の匂い分子応答における嗅粘液の役割も明らかとなり、嗅覚機能の解明に寄与すると考えられる。

## 参考文献

- [1] Marrakchi M. A new concept of olfactory biosensor based on interdigitated microelectrodes and immobilized yeasts expressing the human receptor OR17-40. *Eur Biophys J.* **36**, 1015-8 (2007)
- [2] Mombaerts, P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* **286**, 707-11 (1999)
- [3] Mori, K., Yoshihara, Y. Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Prog. Neurobiol.* **45**, 585-619 (1995)
- [4] Mori, K., Nagao, H. *et al.* The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* **286**, 711-5 (1999)
- [5] Shipley, M. T., Ennis, M. Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.* **30**, 123-76 (1996)
- [6] Firestein, S. How olfactory system makes sense of scents. *Nature* **413**, 211-8 (2001)
- [7] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-87 (1991)
- [8] Zhang X, Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci.* **5**, 124-33 (2002)
- [9] Nei, M., Y. Niimura, and M. Nozawa. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 951-63 (2008)
- [10] Niimura Y, Nei M. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **5**, 124-33 (2002)
- [11] Niimura Y, Nei M. Evolutionary changes of the number of olfactory receptor genes in the human and mouse lineages. *Gene* **346**, 23-8 (2005)
- [12] Niimura Y, Nei M. Comparative evolutionary analysis of olfactory receptor gene clusters between humans and mice. *Gene* **14**, 13-21 (2005)
- [13] Bargmann CI. Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature* **444**, 295-301 (2006)
- [14] Chess, A., Simon, I., Cedar, H. and Axel, R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* **78**, 823-34 (1994)
- [15] Serizawa, S. *et al.* Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* **302**, 2088-94 (2003)

- [16] Elsaesser, R. and Paysan, J. The sense of smell, its signaling pathways, and the dichotomy of cilia and microvilli in olfactory sensory cells. *BMC Neurosci.* **8** Suppl 3:S1. (2007)
- [17] S. DeMaria and J. Nagai The cell biology of smell *J. Cell Biol.* **191**, 443-52 (2010)
- [18] Mombaerts, P., Wang, F, Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelshon, M. et al. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675-86 (1996)
- [19] Rasmussen SG, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, Kobilka BK. Structure of a nanobody-stabilized active state of the b2 adrenoceptor, *Nature* **469**, 175-80 (2011)
- [20] Rosenbaum DM, Zhang C, Lyons JA, Holl R, Aragao D, Arlow DH, Rasmussen SG, Choi HJ, Devree BT, Sunahara RK, Chae PS, Gellman SH, Dror RO, Shaw DE, Weis WI, Caffrey M, Gmeiner P, Kobilka BK. Structure and function of an irreversible agonist-b2 adrenoceptor complex. *Nature* **469**, 236-40 (2011)
- [21] Horn, F., Weare, J., Beukers, M. W., Horsch, S., Bairoch, A., Chen, W., Edvardsen, O., Campagne, F. and Vriend, G. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Research* **26**, 275-9 (1998)
- [22] Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., Rossler, P. and Breer, H. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A* **183**, 635-50 (1998)
- [23] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-45 (2000)
- [24] Søren G. F. Rasmussen\*, Hee-Jung Choi\*, Daniel M. Rosenbaum, Tong Sun Kobilka, Foon Sun Thian, Patricia C. Edwards, Manfred Burghammer, Venkata R. P. Ratnala, Ruslan Sanishvili, Robert F. Fischett, Gebhard F. X. Schertler, William I. Weis & Brian K. Kobilka Crystal structure of the human b2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-8 (2007)
- [25] 堅田明子、東原和成 匂いの分子基盤：嗅覚受容体の薬理学的研究 日薬理誌 **124**, 201-9 (2004)
- [26] Turin, L. and Yoshii, F. Structure-odor relations: a modern perspective. In *Handbook of Olfaction and Gustation*, (ed. R. L. Doty), 275-94. Marcel Dekker, New York (2003)

- [27] Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. and Buck, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**, 713-23 (1999)
- [28] Araneda, R. C., Peterlin, Z., Zhang, X., Chesler, A. and Firestein, S. A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *Journal of Physiology* **555.3**, 734-56 (2004)
- [29] Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H. and Touhara, K. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J. Neurosci.* **21**, 6018-25 (2001)
- [30] Ma, M and Shepherd, G. M. Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**, 12869-74 (2000)
- [31] Oka, Y., Omura, M., Kataoka, T. and Touhara, K. Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO J.* **23**, 120-6 (2004)
- [32] Zou, Z. and Buck, L. B. Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science* **311**, 1477-81 (2006)
- [33] Manuel. Zarzo, The sense of smell: molecular basis of odorant recognition. *Biological reviews* **82**, 455-79 (2007)
- [34] Katada, S., Hirolawa, T., Oka, Y., Suwa, M. and Touhara, K. Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J. Neurosci.* **25**, 1806-15 (2005)
- [35] Abaffy, T., Malhotra, A. and Luetje, C. W. The molecular basis for ligand specificity in a mouse olfactory receptor: a network of functionally important residues. *J. Biol. Chem.* **282**, 1216-24 (2007)
- [36] Jiang Y, Li YR, Tian H, Ma M, Matsunami H. Muscarinic acetylcholine receptor M3 modulates odorant receptor activity via inhibition of  $\beta$ -arrestin-2 recruitment. *Nat Commun.* **24**; 6:6448 (2015)
- [37] de March CA, Yu Y, Ni MJ, Adipietro KA, Matsunami H, Ma M, Golebiowski J. Conserved Residues Control Activation of Mammalian G Protein-Coupled Odorant Receptors. *J Am Chem Soc.* **8**:137(26):8611-6 (2015)
- [38] Lin, S. W. and Sakmar, T. P. Specific tryptophan UV-absorbance changes are probes of the transition of rhodopsin to its active state. *Biochemistry* **35**, 11149-59 (1996)
- [39] Ghanouni, P., Steenhuis, J. J., Farrens, D.L. and Kobilka, B. K. Agonist-induced conformational changes in the G protein-coupling domain of the  $\beta$ 2 adrenergic



- receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 5977-6002 (2001)
- [40] Shapiro, D.A., Kristiansen, K., Weiner, D. M., Kroeze, W. K. and Roth, B. L. Evidence for a model of agonist-induced activation of 5-hydroxytryptamine 2A serotonin receptors that involves the disruption of a strong ionic interaction between helices 3 and 6. *J. Biol. Chem.* **277**, 11441-9 (2002)
- [41] Vaidehi, N., Floriano, W. B., Trabanino, R., Hall, S. E., Freddolino, P., Choi, E. J., Zamanakos, G. and Goddard III, W. A. Prediction of structure and function of G protein-coupled receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 12622-7 (2002)
- [42] Yu Y, de March CA, Ni MJ, Adipietro KA, Golebiowski J, Matsunami H, Ma M. Responsiveness of G protein-coupled odorant receptors is partially attributed to the activation mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**(48):14966-71 (2015)
- [43] Lewcock, J.W. and Reed, R. R. A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 1069-74 (2004)
- [44] Shykind, B. M. *et al.* Genes switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell* **117**, 801-15 (2004)
- [45] Barnea, G., O'Donnell, S., Mancina, F., Sun, X., Nemes, A., Mendelshon, M. *et al.* Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* **304**, 1468 (2004)
- [46] Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A. and Mombaerts, P. Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the beta 2 adrenergic receptor. *Cell* **117**, 833-46 (2004)
- [47] Wang, F., Nemes, A., Mendelshon, M. and Axel, R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* **93**, 47-60 (1998)
- [48] Bozza, T., Feinstein, P., Zheng C. and Mombaerts, P. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J. Neurosci.* **22**, 3033-43 (2002)
- [49] Feinstein, P. and Mombaerts, P. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* **117**, 817-31 (2004)
- [50] 福田七穂、東原和成 嗅覚受容体は鼻以外の組織で機能しているか? *生化学* **76** 1462-6 (2004)
- [51] Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J. A., Wetzel, C. H., Zimmer, R. K. *et al.* Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* **299**, 2054-8 (2003)
- [52] Fukuda, N., Tomogida, K., Okabe, M. and Touhara, K. Functional characterization

of a mousetesticular olfactory receptor and its role in chemosensing and regulation of sperm motility. *J. Cell Sci.* **117**, 5835-45 (2004)

- [53] Morita R, Hirohashi Y, Torigoe T, Ito-Inoda S, Takahashi A, Mariya T, Asanuma H, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Kutomi G, Mizuguchi T, Terui T, Ishitani K, Hashino S, Kondo T, Minagawa N, Takahashi N7, Taketomi A, Todo S, Asaka M, Sato N. Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 Is a Novel Marker of Colon Cancer-Initiating Cells and Is a Potent Target of Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **1;22(13):3298-309** (2016)
- [54] Krautwurst, D., Yau, K. W. & Reed, R. R. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* **95**, 917-26 (1998)
- [55] H. Saito, M. Kubota, R. Roberts, Q. Chi, H. Matsunami. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* **119**, 679-91 (2004)
- [56] Brady, A. E. and Limbird, L. E. G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal* **14**, 297-309 (2002)
- [57] Baker, E. K., Colley, N. J. and Zuker, C.S. The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *EMBO J.* **13**, 4886-95 (1994)
- [58] Ferreira, P. A., Nakayama, T. A., Pak, W. L. and Travis, G. H. Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature* **383**, 637-40 (1996)
- [59] MaLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G. and Foord, S. M. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**, 333-9 (1998)
- [60] Loconto, J., Papes, F., Chang, E., Stowers, L., Jones, E., Takada, T., Kumánovics, A., Ficcher Lindahl, K. and Dulac, C. Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell* **112**, 607-18 (2003)
- [61] Dwyer, N. D., Troemel, E. R., Sengupta, P. and Bargmann, C. I. Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell* **93**, 455-66 (1998)
- [62] Matsunami, H. Functional expression of mammalian odorant receptors. *Chemical Senses* **30(suppl 1)** i95-6 (2005)

- [63] Zhuang H, Matsunami H. Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. *J Biol Chem.* **282**, 15284-93 (2007)
- [64] Bartelt, J., Reichling, C., Winnig, M., Kuhn, C. and Meyerhof, W. Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *Epub* **281**, 20650-9 (2006)
- [65] Wu L, Pan Y, Chen GQ, Matsunami H, Zhuang H. Receptor-transporting protein 1 short (RTP1S) mediates translocation and activation of odorant receptors by acting through multiple steps. *J Biol. Chem.* **22**:287(26):22287-94 (2012)
- [66] Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, Spinelli S, Campanacci V, Grolli S, Ramoni R, Cambillau C, Mammalian odorant binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1482**, 229-40 (2000)
- [67] H. Saito, H. Matsunami. Odor coding by mammalian receptor repertoire. *Neuroscience* **2**, Issue 60 (2009)
- [68] Oka Y, Katada S, Omura M, Suwa M, Yoshihara Y, Touhara K. Odorant receptor map in the mouse olfactory bulb: in vivo sensitivity and specificity of receptor - defined glomeruli. *Neuron* **52**, 857-69 (2006)
- [69] Nagashima A, Touhara K. Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor Perception. *Neuroscience* **48**, 16391-98 (2010)
- [70] 大村恒雄、石村巽、藤井義明 P450 の分子生物学 講談社 (2003)
- [71] Ting Su, et.al. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosmino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer research* **60**, 5074-79 (2000)
- [72] Boris S, Roman K, Andreas N, Investigation of odors in the fragrance industry. Review paper, *Chemoecology* **20**, 135-47 (2010)
- [73] Zhuang H, Matsunami H. Evaluating cell-surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. *Nat Protoc.* **3**, 1402-13 (2008)
- [74] Knight ZA, et al. Molecular profiling of activated neurons by phosphorylated ribosome capture. *Cell.* **151**:1126–1137 (2012)
- [75] Jiang Y, Gong NN, Hu XS, Ni MJ, Pasi R, Matsunami H. Molecular profiling of activated olfactory neurons identifies odorant receptors for odors in vivo. *Nat*



*Neurosci.* 18(10):1446-54. (2015)

- [76] Ibarra-Soria X, Levitin MO, Saraiva LR, Logan DW. The olfactory transcriptomes of mice. *PLoS Genet.* 4;10(9):e1004593 (2014)
- [77] Olender T, Keydar I, Pinto JM, Tatarsky P, Alkelai A, Chien MS, Fishilevich S, Restrepo D, Matsunami H, Gilad Y, Lancet D. The human olfactory transcriptome. *BMC Genomics.* 11;17(1):619. (2016)
- [78] Kimura T, Yeliseev AA, Vukoti K, Rhodes SD, Cheng K, Rice KC, Gawrisch K. Recombinant cannabinoid type 2 receptor in liposome model activates g protein in response to anionic lipid constituents. *J. Biol. Chem.* 3;287(6):4076-87 (2012)
- [79] Suzuki Y, Ogasawara T, Tanaka Y, Takeda H, Sawasaki T, Mogi M, Liu S, Maeyama K, Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycosomes. *Front Pharmacol.* 6;9:38 (2018)
- [80] Robert-Hazotte A, Schoumacker R, Semon E, Briand L, Guichard E, Le Quéré JL, Faure P, Heydel JM. Ex vivo real-time monitoring of volatile metabolites resulting from nasal odorant metabolism. *Sci. Rep.* 21;9(1):2492.(2019)
- [81] Yoshikawa K, Wang H, Jaen C, Haneoka M, Saito N, Nakamura J, Adappa ND, Cohen NA, Dalton P. The human olfactory cleft mucus proteome and its age-related changes. *Sci. Rep.* 21;8(1):17170. (2018)
- [82] Heydel JM, Menetrier F, Belloir C, Canon F, Faure P, Lirussi F, Chavanne E, Saliou JM4, Artur Y, Canivenc-Lavier MC, Briand L, Neiers F. Characterization of rat glutathione transferases in olfactory epithelium and mucus. *PLoS One.* 24;14(7):e0220259 (2019)



## 謝辞

本研究を進めるにあたって、ご多忙の中、ご指導ご鞭撻を賜りました東京農工大学大学院生命工学専攻 養王田正文教授に心より感謝を申し上げます。

研究や発表にあたり、数多くの助言と温かいご指導を賜りました野口恵一准教授、篠原恭介准教授に、深く御礼を申し上げます。

デューク大学の松波宏明教授には来日していただくたびに研究における助言をいただき、留学中には動物実験を一から教えていただきました。心より感謝を申し上げます。

愛媛大学の竹田浩之准教授にはコムギ胚芽発現系について丁寧に教えていただきました。心より感謝を申し上げます。

福谷洋介助教には、研究の面でも研究室生活の面でも大変お世話になりました。研究室に助教としてまた来ていただき、アドバイスをたくさんいただくことができました。心より御礼申し上げます。

秘書の皆様には事務面において支えていただき安心して実験を進めることができました。誠にありがとうございます。

研究室の皆様とはイベント事が多い中で一緒に楽しむことができ、良かったです。研究面でもディスカッションをして、テーマが異なる中でも新たな発見をシェアして助かりました。ありがとうございます。

最後に、経済面および生活面で支え続けてくれた家族に心より感謝し、御礼申し上げます。これからもお世話になりますが、よろしく願いいたします。