

博士学位論文

RTP 依存的嗅覚受容体膜輸送機構に関する研究

Study on the RTP dependent transport mechanism of
olfactory receptor

指導教官：養王田 正文 教授

東京農工大学 工学府 生命工学専攻 博士後期課程

井上 亮祐

要旨

生物にとって嗅覚は、環境中で自己の生命活動を維持するのに必要不可欠な感覚の 1 つである。1991 年に嗅覚の受容体が G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属する嗅覚受容体 (OR) であることが同定され、以後のゲノム解析からマウスで 1000 種以上、ヒトで約 400 種の OR 遺伝子が存在することが明らかになった。OR の同定後、培養細胞を用いた機能解析が試みられたが、その細胞膜表面への発現の低さから測定は困難であった。2004 年に Matsunami 博士らによって RTP1 および RTP2、REEP1 が OR の発現を促進するシャペロンであることが明らかとなり、さらに 2012 年に N 末端側が 36 残基短い RTP1 short (RTP1S) が実際に嗅上皮組織に発現していることが報告され、これらシャペロンを共発現させることで培養細胞下でも ORs の機能解析が進められるようになった。現在、RTP1S の共発現は、多くの OR の細胞膜局在を促進することが判明している。しかし、RTP1S を含む RTP ファミリータンパク質はその立体構造が一切不明であり、OR と RTP1S のタンパク質間相互作用状態についても一切分かっていない。そのため、RTP1S がどのようなメカニズムで多数の OR の細胞膜輸送を促進することができるのか、その全容は未解明である。さらに、RTP1S 共発現時も機能的発現が改善しない OR も存在し、現状の嗅覚組織中の OR 発現系への理解は不十分であると考えられる。そこで、OR の機能的発現機構のさらなる解明に向け、シャペロンタンパク質 RTP1S の部分的機能解析と、OR 発現機構に関わる新規シャペロンタンパク質の探索を研究目的とした。

3 章では RTP1S のオリゴマー形成測定と機能構造に重要なアミノ酸の特定を行った。RTP1S を含む RTP ファミリーは立体構造の一切が判明していない。この解明は OR との相互作用部位特定や、RTP 自身の活性部位解析に繋がっていく。そこで、RTP1S 変異体の *in vitro* 単一精製系を構築し、精製 RTP1S の獲得と分子量測定を実施した。SEC-MALS および HPLC により RTP1S が単量体とホモ二量体の 2 状態を取ることが判明し、二量体が N 末端 2 残基目のシステインのジスルフィド結合により形成されることが示唆された。細胞内でも同様のオリゴマー形成を示すことを NanoBiT アッセイで確認した。

また、N 末端領域の中で OR 輸送能に重要な残基を特定するため RTP1S N 末端変異体を作製し機能解析を行った。OR 膜発現量測定とリガンド応答測定の結果、2 残基目システインの影響は小さく、4 残基目セリンが非常に重要な残基であることが判明した。これは、RTP1S の二量体形成がその機能に必須ではないことを示した。一方で、RTP1S 中の全システインを対象に 1 残基ごとにセリンに置換した変異体の機能解析により、いくつかのシステイン変異が OR 輸送に致命的な影響を及ぼすことが明らかとなった。これら変異体は OR との相互作用を失っていないことから、輸送経路に関わる他のタンパク質との相互作用等に関与すると考えられる。

4 章では OR の機能的発現機構に関わるシャペロンタンパク質のさらなる解明に向けスクリーニングを行った。OR の発現には RTP1S, 2、REEP のような現在判明しているシャペロン以外にも未知のシャペロンが関与している可能性が示唆されている。そこで、近位依存性ビオチン標識法(BioID)を使用することで、OR および RTP1S と各種条件において相互作用するタンパク質の網羅的な探索を実施し、新規未知シャペロンタンパク質の同定を試みた。結果、RTP1S を PoI としたときに Olfr544 共発現時特異的に検出されるタンパク質として Heat Shock 70 kDa Protein 6(HSPA6)と Double-stranded RNA-binding protein Staufien homolog 2 (STAU2)が特定された。

5 章では、4 章で Olfr544 共発現時の RTP1S の近傍タンパク質として特定された HSPA6 と STAU2 について、OR の発現に与える影響を検証した。HSPA6 は HSP70 に属するタンパク質であり、HSP70 は進化の中で高度に保存されているシャペロンタンパク質ファミリーである。ストレス応答分子として知られるほか、細胞内小胞輸送や免疫反応、小胞膜挿入等さまざまな細胞内分子機構へ関与することが明らかになっている。一方で Staufien は RNA 結合性タンパク質であり、ショウジョウバエの胚発生において mRNA の局在や翻訳調節に関与する因子として知られる。哺乳類のホモログも RNA への結合が示されており、ラットの神経中では mRNA の局在に重要な機能を持っていることが明らかになっている。

これらのタンパク質が OR の機能的発現に関与するのか、共発現させた時の細胞膜発現量や相互作用の有無を観察した。すると両タンパク質共に Olfr544 の膜発現を向上することが確認されたが、Olfr599 と Olfr1484 においてはその促進を示さなかった。これは STAU2 と HSPA6 が RTP1S のように広く機能す

るものではなく、特定の ORs 群に機能することを示唆している。また NanoBiT アッセイからは、BioID での検出の結果通り STAU2 と HSPA6 は OR の近傍には配位しておらず、かつ RTP1S-STAU2-HSPA6 の三者間での相互作用様式が存在する可能性が示唆された。

内容

| | |
|--|----|
| 1 章 序論..... | 8 |
| 1 - 1 嗅覚研究について | 8 |
| 1 - 2 嗅覚システム..... | 9 |
| 1 - 3 嗅覚受容体(Odorant receptor: OR) | 10 |
| 1 - 3 - 1 嗅覚受容体の多様性 | 10 |
| 1 - 3 - 2 嗅覚受容体の発現..... | 12 |
| 1 - 3 - 3 嗅覚受容体が介するシグナル伝達機構..... | 15 |
| 1 - 3 - 4 G タンパク質 | 17 |
| 1 - 3 - 5 G タンパク質 α サブユニット | 19 |
| 1 - 3 - 6 嗅覚受容体の基本構造..... | 20 |
| 1 - 3 - 7 匂い分子との相互作用..... | 22 |
| 1 - 3 - 8 匂い分子認識ポケット | 25 |
| 1 - 3 - 9 匂い分子の結合による構造変化 | 27 |
| 1 - 3 - 10 嗅覚受容体の匂い分子認識以外の役割 | 28 |
| 1 - 4 生化学的実験手法構築の紆余曲折 | 29 |
| 1 - 5 嗅覚受容体の機能的発現を向上させる因子 | 30 |
| 1 - 5 - 1 Rho-tag..... | 30 |
| 1 - 5 - 2 嗅覚受容体と相互作用する受容体..... | 30 |
| 1 - 5 - 3 嗅覚受容体の膜局在をアシストするアクセサリタンパク質..... | 31 |
| 1 - 6 Receptor transporting protein (RTP)..... | 32 |
| 1 - 6 - 1 RTP の発見 | 32 |
| 1 - 6 - 2 RTP の機能 | 33 |
| 1 - 6 - 3 RTP による OSN 成熟..... | 35 |
| 1 - 6 - 4 OR の構造不安定性を RTP1S が補助する..... | 35 |
| 1 - 7 本研究の目的..... | 38 |
| 2 章 実験方法..... | 39 |
| 2 - 1 培地および試薬の組成 | 39 |
| 2 - 1 - 1 大腸菌の培養..... | 39 |
| 2 - 1 - 2 RTP1S の精製 | 40 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2-1-3 | 哺乳類細胞の培養..... | 41 |
| 2-1-4 | SDS-PAGE およびウェスタンブロット | 43 |
| 2-2 | DNA およびプラスミドの準備 | 45 |
| 2-2-1 | <i>in vitro</i> 精製用 RTP1S 変異体の作製..... | 45 |
| 2-2-2 | NanoBiT アッセイ用 RTP1S および OR の作製 | 48 |
| 2-2-3 | <i>In vivo</i> 発現用 RTP1S N 末端変異体の作製..... | 50 |
| 2-2-4 | <i>In vivo</i> 発現用 RTP1S システイン変異体の作製..... | 51 |
| 2-2-5 | BioID 用融合タンパク質の作製..... | 54 |
| 2-2-6 | 細胞発現用 STAU2 および HSPA6 作製 | 58 |
| 2-3 | RTP1S 変異体の精製 | 59 |
| 2-3-1 | 大量培養・集菌 | 59 |
| 2-3-2 | 超音波破碎..... | 59 |
| 2-3-3 | アフィニティークロマトグラフィー | 59 |
| 2-3-4 | イオン交換クロマトグラフィー | 59 |
| 2-3-5 | サイズ排除クロマトグラフィー | 60 |
| 2-3-6 | SEC-MALS による絶対分子量測定 | 60 |
| 2-3-7 | SEC-HPLC による相対分子量測定 | 60 |
| 2-4 | NanoBiT assay | 61 |
| 2-4-1 | NanoBiT assay 用細胞の培養 | 61 |
| 2-4-2 | 培養細胞への形質転換..... | 61 |
| 2-4-3 | 発光値測定..... | 61 |
| 2-5 | FACS..... | 62 |
| 2-5-1 | FACS 用細胞の培養..... | 62 |
| 2-5-2 | 培養細胞への形質転換..... | 62 |
| 2-5-3 | FACS 解析 | 62 |
| 2-6 | Dual-Glo Luciferase assay | 64 |
| 2-6-1 | Dual-Glo Luciferase assay 用細胞の培養 | 64 |
| 2-6-2 | 培養細胞への形質転換..... | 64 |
| 2-6-3 | 匂い添加 | 64 |
| 2-6-4 | 発光値測定..... | 64 |
| 2-7 | 共免疫沈降法..... | 66 |
| 2-7-1 | 抗体結合ビーズの準備..... | 66 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2-7-2 | 抗原抗体反応 | 66 |
| 2-7-3 | 溶出 | 66 |
| 2-8 | BioID | 67 |
| 2-8-1 | BioID 用細胞の培養 | 67 |
| 2-8-2 | 培養細胞への形質転換..... | 67 |
| 2-8-3 | ビオチン含有培地での培養..... | 67 |
| 2-8-4 | 細胞ライセート調整 | 67 |
| 2-8-5 | ビオチン化タンパク質精製..... | 67 |
| 2-8-6 | LC-MS/MS..... | 68 |
| 2-9 | SDS-PAGE およびウェスタンブロット | 69 |
| 2-9-1 | ローディングサンプルの調整 | 69 |
| 2-9-2 | 転写 | 69 |
| 2-9-3 | 抗体反応 | 69 |
| 2-9-4 | 発光検出 | 69 |
| 3 章 | RTP1S オリゴマー形成および機能的な重要残基の特定 | 70 |
| 3-1 | 緒言 | 70 |
| 3-2 | 結果 | 71 |
| 3-2-1 | <i>In vitro</i> で RTP1S は単量体と二量体を形成する | 71 |
| 3-2-2 | Cys-2 を欠損させると二量体形成が失われる | 72 |
| 3-2-3 | <i>In vivo</i> での二量体形成評価..... | 74 |
| 3-2-4 | <i>In vivo</i> での RTP1S N 末端変異体の OR 機能促進評価..... | 76 |
| 3-2-5 | OR 輸送機能に重要なシステインの特定 | 80 |
| 3-2-6 | 亜鉛結合性モチーフが予測される | 82 |
| 3-3 | 小括 | 84 |
| 4 章 | OR 発現機構関連新規シャペロンタンパク質候補の選出 | 85 |
| 4-1 | 緒言 | 85 |
| 4-2 | 結果 | 86 |
| 4-2-1 | 用いるビオチンリガーゼの選定 | 86 |
| 4-2-2 | ビオチンリガーゼ融合時の RTP1S の機能観察..... | 87 |
| 4-2-3 | TurboID 融合時の OR のリガンド応答測定 | 89 |
| 4-2-4 | 膜内/膜外コントロール融合タンパク質の作製 | 91 |
| 4-2-5 | 融合体のビオチン化活性の観察 | 92 |

| | |
|---|-----|
| 4 - 2 - 6 TurboID による BioID | 93 |
| 4 - 2 - 7 新規ビオチンリガーゼ AirID 付加 RTP1S および OR の機能観 察..... | 95 |
| 4 - 2 - 8 RTP1S-OR 共発現時に特異的に検出されるタンパク質 | 95 |
| 4 - 3 小括 | 98 |
| 5 章 STAU2 と HSPA6 の OR 機能への影響..... | 99 |
| 5 - 1 緒言 | 99 |
| 5 - 2 結果 | 100 |
| 5 - 2 - 1 FACS による ORs の細胞膜発現量への影響評価 | 100 |
| 5 - 2 - 2 リガンドアッセイによる匂い応答への影響評価 | 106 |
| 5 - 2 - 3 NanoBiT アッセイによる RTP1S-OR との複合体形成の評価 | 107 |
| 5 - 3 小括 | 111 |
| 6 章 総括 | 112 |

1 章 序論

1 - 1 嗅覚研究について

生物にとって嗅覚は食物や交配相手の発見、捕食者からの逃避のために不可欠な重要な感覚である。嗅覚についての研究は視覚、聴覚研究に比べ遅れており、その原因として数十万種類にも及ぶ匂い物質の多様さ、また匂い物質を認識するシグナル伝達のメカニズムが未解明であったことが挙げられる。

匂い物質は揮発性の低分子有機化合物であり、その種類は数十万種類と非常に多様である。それぞれの低分子有機化合物は特有の匂いを持っていると考えられるが、匂い物質に対する感じ方は個人差が大きく、人によっては他人が匂いを感じられる物質から匂いを感じないということすらある。しかし構造がわずかに異なる化合物も別々の匂いとしてかぎ分けることもできるという精密さも持ち合わせる。

また、味覚に関して味物質は数多く存在するが、甘味、苦味、塩味、酸味、旨味と大きく 5 種類(五基本味)に分けることができる。それに対し嗅覚は大きく分けて甘い香り、芳香、腐敗臭など 10 種類ほどといわれており、その点において嗅覚は味覚に比べ複雑であるといえる。

嗅覚研究の進展は、嗅覚機構を模倣した匂いセンサーの開発につながり、香りへの関連が強い食品、化粧品分野のみならず、ガスなどの危険な化学物質の検出などへの応用が期待される。そのほかには医療面への応用も考えられている。生体内における詳細な嗅覚システムの匂い認識機構解明することは基礎研究的にも重要であり、社会をさらに豊かにするため嗅覚研究の進展、知識の集積が期待されている。

1-2 嗅覚システム

哺乳類において、環境中に数十万種類存在するといわれる匂い物質を認識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: OE) に並んだ嗅覚神経細胞 (Olfactory Sensory Neuron: OSN) の繊毛に発現している嗅覚受容体 (Olfactory receptor/Odorant receptor: OR) に結合する【2】。1つの嗅覚神経細胞の軸索は嗅球 (Olfactory Bulb: OB) の表面に約 2,000 個存在する糸球体 (glomerulus) のうちの 1 つに投射しており、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している【3, 4】。上記のような組織構造によって、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、軸索を介して脳の嗅球へと伝える。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) に伝達する。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】。

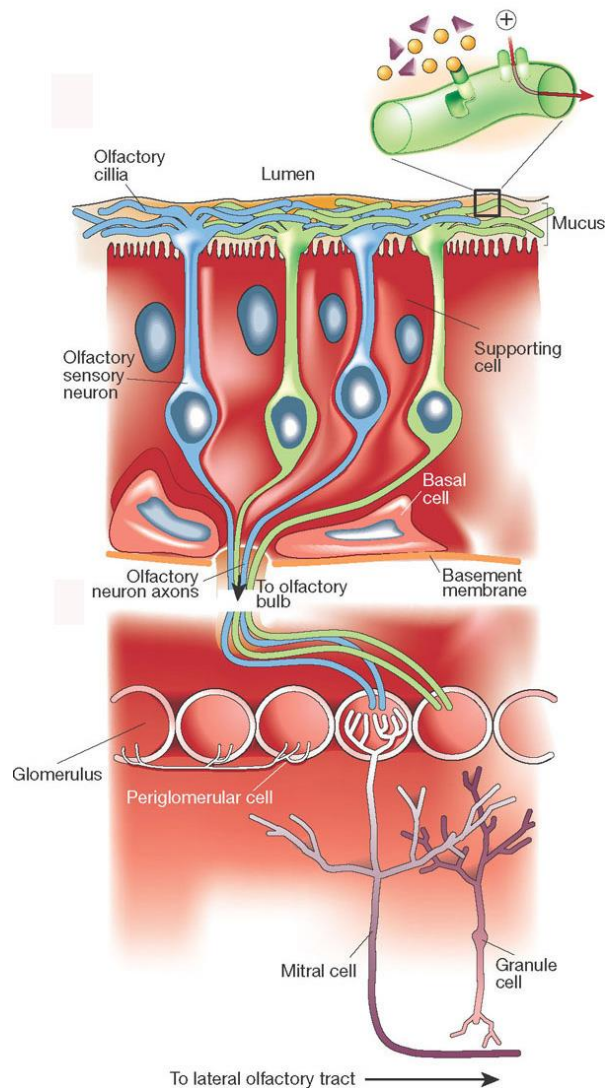


Fig. 1-1 嗅覚神経系の模式図

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

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 と Richard Axel は哺乳類が多様な匂い物質の識別が可能であることから、匂い物質の受容体にもまた多様性があると考えた。そこで嗅覚受容体は 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

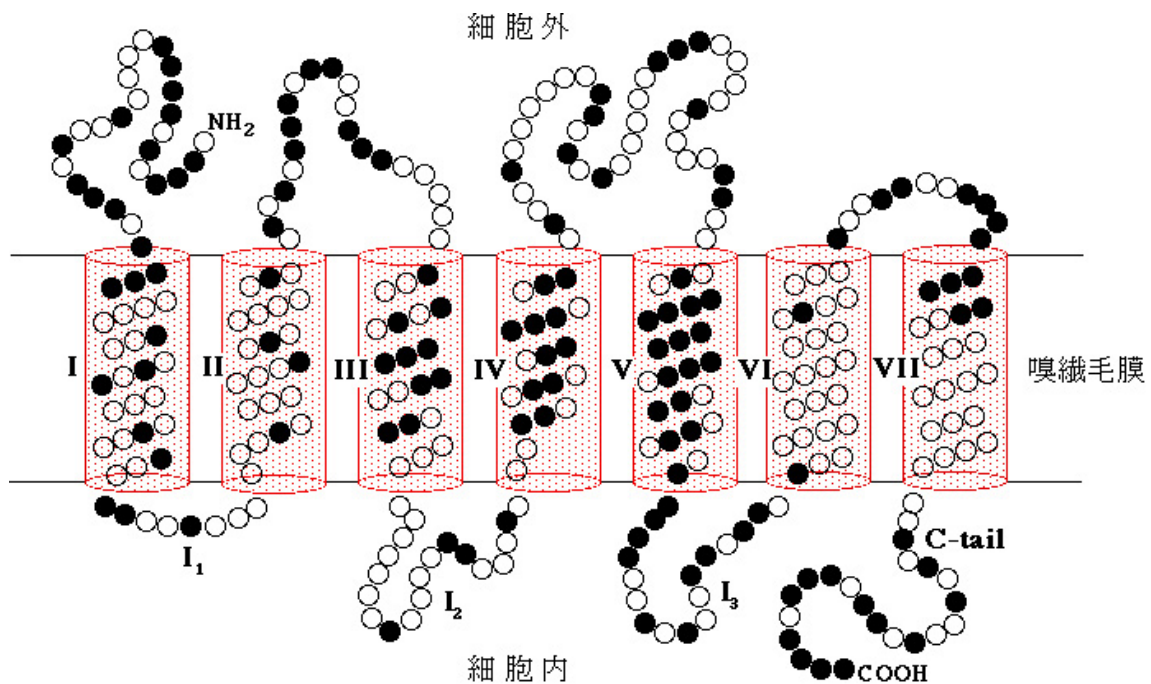


Fig. 1-2 匂い受容体の分子モデル

匂い受容体は、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 1,000 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、I、V が、匂い分子が結合するポケット部位、細胞内ドメイン I₂、I₃、C 末鎖が G-タンパク質との関連部位である。

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。

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。

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. 1-3) 【19】。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 【8, 9, 20】。

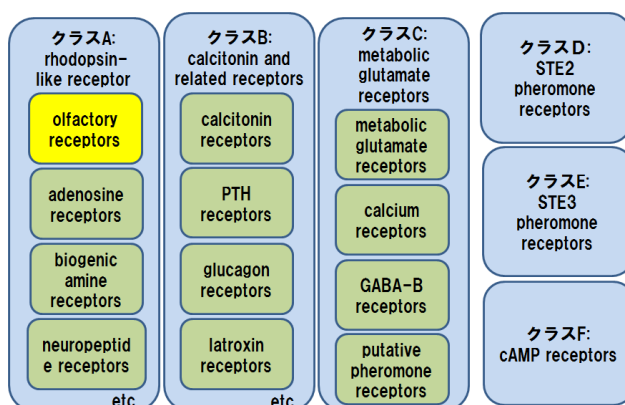


Fig.1-3 GPCR の各クラスに属する受容体

嗅覚受容体は class A に属する

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た。【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

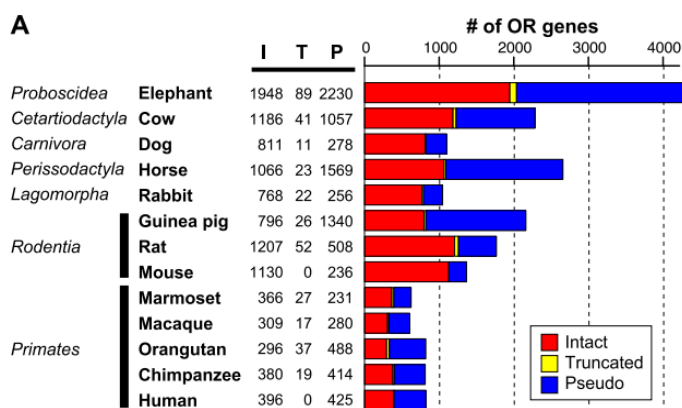


Fig. 1-4 13 種の哺乳類がもつ嗅覚受容体の数

Intact(赤)は実際に機能を持つと考えられる遺伝子

Truncated(黄)は機能を持つか偽遺伝子のどちらかと予想される遺伝子

Pseudo(青)は偽遺伝子と予想される遺伝子 [76]より引用

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(ユウレイボヤ: 脊索動物であるホヤの一種)には存在していない【13】。2014 年、新村らは 13 種の哺乳類がもつ嗅覚受容体遺伝子のなかで機能を持つ遺伝子、偽遺伝子の数を推定した[76]。新村らの定義によるとマウスの 1366 個の嗅覚受容体遺伝子のなかで実際に機能を持つと考えられる遺伝子は 1130 個で偽遺伝子と考えられる遺伝子は 236 個、また 821 個のヒトの嗅覚受容体遺伝子のなかで機能を持つと考えられる遺伝子は 396 個で偽遺伝子と考えられる遺伝子は 425 個であった(Fig. 1-3)。

1-3-2 嗅覚受容体の発現

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、1 つの嗅神経細胞は 1 つの嗅覚受容体を選択的に発現している(Fig.1-5)【14, 15】。

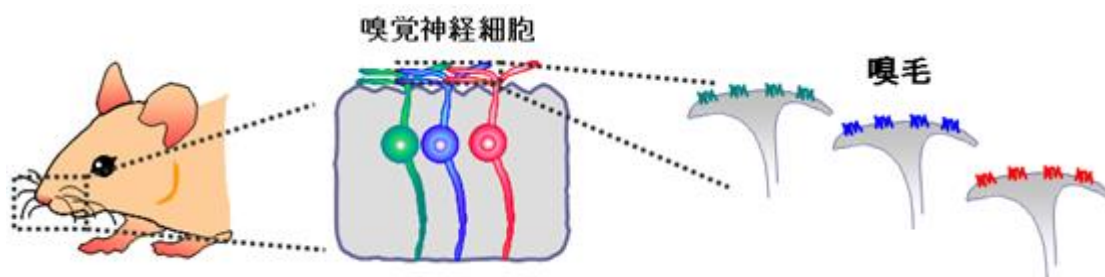


Fig.1-5 哺乳類の嗅覚受容体発現様式

嗅覚機構は嗅毛上にある。嗅毛は嗅覚神経細胞が外部環境と直接連絡するための分化組織である。嗅覚神経細胞を 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。哺乳類の嗅覚神経細胞は鼻粘膜上皮にある。各神経細胞はただひとつの嗅覚受容体を発現している。

この”One receptor, One Neuron”という厳密な発現様式をもつ嗅覚受容体だが、近年その発現制御について新たな知見が得られている[73]。

ヒストンリジン脱メチル化酵素である Lysine demethylase 1 (LSD1)は OR の発現に必要である事が示唆されている。またアデニルシクラーゼ 3 (Adcy3) は OR のシグナルカスケードの構成因子であり、OR の発現によって、発現が誘導される。

嗅上皮組織において LSD1 は成熟した OSN で発現しておらず、また LSD1 と Adcy3 の局在が異なっていること、Adcy3 KO マウスでは、OR 発現が不安定化している事が示唆されていた。

Adcy3 KO マウスの嗅上皮組織では、LSD1 を発現している細胞が増大しており、成熟細胞はわずかだった。さらに、MOR28-cre 及び cre レポーターを導入した Adcy3 KO マウスの解析から、Adcy3 KO マウスでは OR の発現が不安定化している事が示された。

これらの結果から、Adcy3 の発現による LSD1 の抑制が OR 発現の安定化に寄与する事が示唆された。

このことからヒストン脱メチル化酵素である LSD1 と嗅覚受容体依存的に発現する Adcy3 が嗅覚受容体の発現の惹起および安定した発現に必要であることが分かった(Fig. 1-6)。

さらに研究は進展し、LSD1 は選択された OR 遺伝子上の抑制性の lysine 9 methyl marker を除去することが分かった[74]。

また Dalton, R.らは OR の機能発現の際の翻訳後修飾に時間がかかることから OR の機能発現を感知し、LSD1 の発現を抑制する因子が存在すると推測し

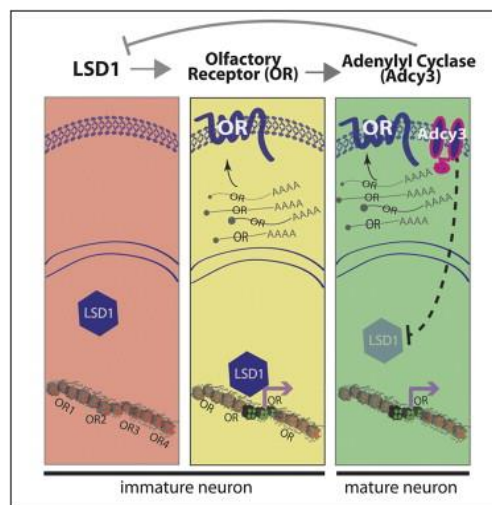


Fig. 1-6 嗅覚受容体の発現制御

未成熟の嗅覚神経において LSD1 が単一の OR の発現を促進し、OR の機能発現によって増加した Adcy3 が LSD1 の発現抑制および嗅覚神経の分化を促す。【73】より引用

た。OR ははじめ小胞体で合成されるため OR の発現を検知する機構が小胞体内に存在すると考えた。

そこで unfolded protein が小胞体内で増加すると翻訳開始を抑制、シャペロンなどの発現を促進することによって、フォールディングを促進する機構である Unfolded Protein Response (UPR)がそのフィードバックに関わることを明らかにした(Fig. 1-7)。

LSD1 によって嗅覚受容体が発現すると、小胞体の Perk が unfolded protein が増加したことを感知し、 $eif2\alpha$ をリン酸化する。 $eif2\alpha$ のリン酸化によって、 $tRNA^{met}$ に制限がかかり翻訳の開始が抑制される。一方で、*ATF5* は $tRNA^{met}$ が制御されることで通常とは異なるフレームで翻訳され、nATF5 は核内に移行し、シャペロン

などの種々の遺伝子の転写を活性化するが、そのひとつとして、Adcy3 の発現を活性化する。Adcy3 は、LSD1 の発現を抑制する。また、分子シャペロンなどによって UPR が緩和され、一種類の OR が安定的に発現するようになると考えられる。

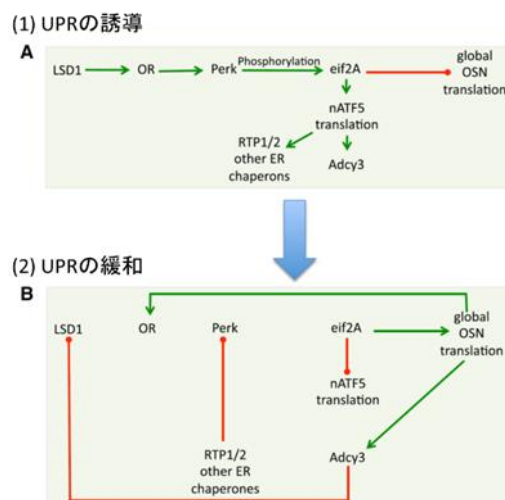


Fig. 1-7 UPR を介した OR 選択モデル

LSD1 によりある OR 遺伝子がデサイレンシングされる。OR の合成によって小胞体ストレスが生じ nATF5 が産生される。nATF5 によってシャペロンおよび Adcy3 の発現が誘導される。Adcy3 の発現に伴い LSD1 が抑制され、その他の OR 遺伝子のデサイレンシングが抑制される。またシャペロンによって OR のフォールディングが行われ、UPR が緩和される。【74】より引用

1-3-3 嗅覚受容体が介するシグナル伝達機構

嗅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。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 α 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ーリン酸(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ネルが開くことでさらに脱分極が進行する (Fig. 1-8)。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伝達される。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伝達されて最終的に脳で処理される (Fig. 1-1)【17】。

すなわち、一つの嗅覚神経細胞は約 1000 種類のうち一種類の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 1 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。

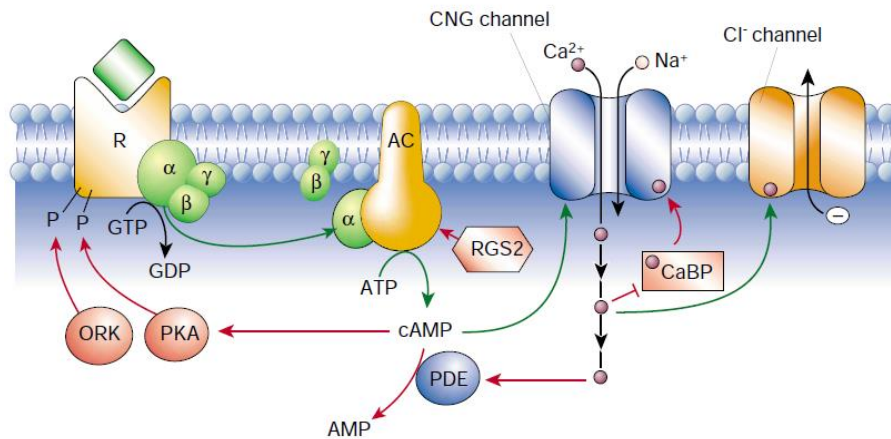


Fig. 1-8 哺乳類の嗅覚神経細胞でのシグナル伝達機構

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 Gα はアセチルコリン受容体 (AC3) を活性化し、遊離している ATP を cyclic AMP 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⁺や Ca²⁺が細胞内に流入することにより脱分極、さらに Ca²⁺依存性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。

1-3-4 G タンパク質

GPCR と共役して細胞外シグナルを細胞内へ交換する G タンパク質は、細胞膜の細胞質側に存在し、 α 、 β 、 γ のサブユニットから成る三量体構造をとっている。特に α 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 を結合すると活性型($G\alpha$ -GTP)になり、GDP を結合すると不活性型($G\alpha$ -GDP)になる。

GPCR に細胞外リガンドが結合していない休止状態では、 $G\alpha$ は GDP と結合した不活性状態にあり、 $G\beta\gamma$ と複合体を形成している。GPCR と細胞外リガンドが結合して GPCR が構造変化を起こすことにより、 $G\alpha$ が GPCR に結合できるようになる。これに伴って $G\alpha$ と結合していた GDP が GTP と交換され、 $G\alpha$ -GTP の活性化状態となる。 $G\alpha$ と複合体を形成していた $G\beta\gamma$ サブユニットは $G\alpha$ の活性化に伴い $G\alpha$ -GTP より解離する。解離した $G\alpha$ -GTP、 $G\beta\gamma$ の各サブユニットは膜上を移動し種々の酵素活性やイオンチャネル開閉の制御に参与する。 $G\alpha$ -GTP は $G\alpha$ 自身の GTPase 活性により数秒のうちに GTP が GDP へと加水分解され不活性型の $G\alpha$ -GDP に戻る。 $G\alpha$ -GDP は再び $G\beta\gamma$ と結合し不活性状態の三量体へ戻り、必要以上の細胞応答を起こさないような仕組みになっている (Fig.1-9)。

G タンパク質にはさまざまな種類があり、それぞれ特定の GPCR、あるいは下流にある標的タンパク質群と特異的に作用するが、構造や機能の仕方は基本的に共通している。普通、続く増幅器の調節は $G\alpha$ が行うが、ときには $G\beta\gamma$ が、また場合によっては、 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ が同時に増幅器を調節することもある

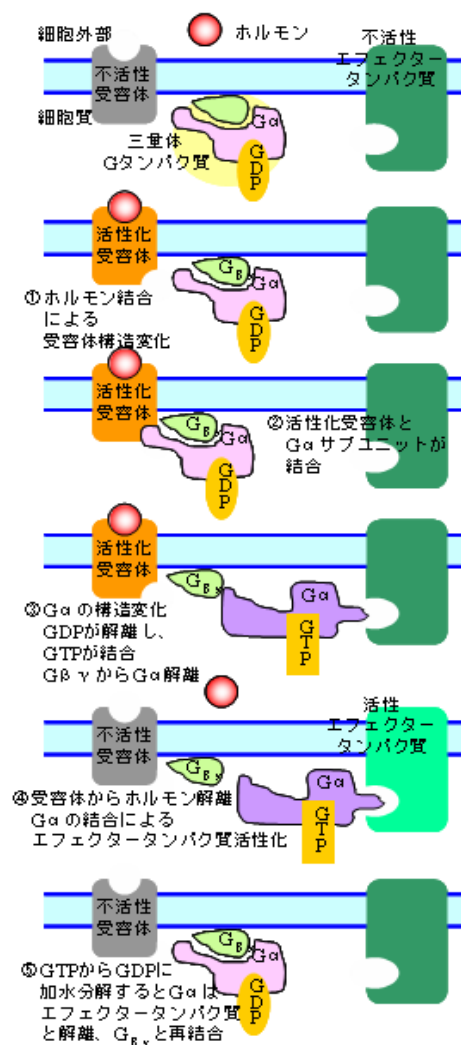


Fig. 1-9 リガンドが GPCR に結合してから増幅器が活性化されるまでの過程

G タンパク質の主なファミリーを Table. 1-1 にまとめて示す。アデニル酸シクラーゼに対し $G_s\alpha$ (stimulatory G protein, G_s) は活性化作用、 $G_i\alpha$ (inhibitory G protein, G_i) は阻害作用を示し、 $G_q\alpha$ はホスホリパーゼ $C\beta$ 活性化に関与する。他に、視覚に関わる変換応答系で働く G_t (transducin, G_t) や、嗅覚に特異的な G_{olf} (olfactory G protein, G_{olf}) などがある。このように、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。

また、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 α 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【70, 71】。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。

Table 1-1 主要な三量体 G タンパク質

| G タンパク質 | 機能仲介部分 | 増幅器への作用 |
|-----------|---------------------------|---|
| G_s | α | アデニル酸シクラーゼの活性化、 Ca^{2+} チャネルの活性化 |
| G_{olf} | α | 嗅覚ニューロンにおけるアデニル酸シクラーゼの活性化 |
| G_i | α | アデニル酸シクラーゼの抑制 |
| | $\beta\gamma$ | K^+ チャネルの活性化 |
| G_o | α | K^+ チャネルの活性化、 Ca^{2+} チャネルの不活性化 |
| | α 及び $\beta\gamma$ | ホスホリパーゼ $C-\beta$ の活性化 |
| G_t | α | 脊椎動物桿体光受容器(ロドプシン)の環状 GMP ホスホジエステラーゼの活性化 |
| G_q | α | ホスホリパーゼ $C-\beta$ の活性化 |

1-3-5 G タンパク質 α サブユニット

三量体 G タンパク質のうち直接 GPCR と相互作用するのは、そのうち α サブユニットである。嗅覚神経細胞に存在している嗅覚受容体と相互作用している G タンパク質 α サブユニットは $G\alpha_{olf}$ のみと言われている。また GPCR class A ファミリーの中でも最大のファミリーを形成している嗅覚受容体と相互作用する G_{olf} のタンパク質的な解明が進めば、嗅覚受容体との相互作用様式だけでなく、GPCR 全体の GPCR - G タンパク質間の相互作用解明につながると考えられている。

そのため、 $G\alpha$ サブユニットを単離精製するという試みがこれまでに数種報告されている。

その中にはタグを付加した $G\beta$ 、 $G\gamma$ 複合体から $G\alpha$ を釣ることで GTP を使って剥がすといった手法【72, 73】であったが、収量がわずかしき取れず機能解析には至っていなかった。しかしながら最近この G タンパク質 α サブユニットの単離精製が報告された。この手法は GPCR ではないが、 $G\alpha$ と結合できる、 $G\alpha$ シグナル伝達調整タンパク質の Ric-8A というタンパク質を用いたものである。この Ric-8A と $G\alpha$ を結合させ、GTP のミミックとなる

Mg-GDP- AlF_4 を用いて結合した $G\alpha$ のみを遊離させた。この手法を用いることで、 G_{olf} を含む多くの $G\alpha$ の単離精製が可能となった。【74】

GPCR だけでなく、G タンパク質も膜タンパクであることで、タンパク質レベルでの機能解析があまり行われていない。しかし、G タンパク質 α サブユニットの研究がすすむことにより、GPCR との詳細な共役機構やシグナル伝達システムの解明にもつながると期待されている。

1-3-6 嗅覚受容体の基本構造

2000年に嗅覚受容体と同じ 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 (Fig. 1-10) 【21】、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。他にも 2007 年に、class A に属するアドレナリン β 2 (β 2-AR) 受容体の結晶構造が明らかにされた【22】。

嗅覚受容体をはじめとする GPCR は、大部分が疎水性アミノ酸で構成された α ヘリックス構造をとり、脂質二重膜を貫通する 7 つの膜貫通 (Transmembrane: TM) ドメインを有している。TM ヘリックス上の連続したアミノ酸残基は理論的に 100° ずつ離れており、 α ヘリックス一回転につき 3.6 残基のアミノ酸が充てられている (Fig 1-11.) 【23, 24】。この区域は、親水性のループ構造と相互接続し交互に現れる。7 つの TM ドメインのうち、3 番目と 4 番目と 5 番目の TM ドメイン (TM3, TM4, TM5) の配列は、この遺伝子ファミリーの間でかなり高い可変性を示すことから、これらの部分がリガンドの結合部位の主要な部位と考えられている【7, 23, 24】。7 つの TM ドメイン α ヘリックスは、細胞外、すなわち鼻の粘液層にリガンド結合部位が配置されるように、互いに充填しあって束構造を形成する。

TM4 と TM5 間のループは HFFCD コンセンサスモチーフを有しており、このモチーフ部分で金属イオンが配位していると考えられている【25】。その一方で、このモチーフのシステイン (C) が、他のシステイン残基とジスルフィド結合を形成していると推測する説もある【23, 25】。また、細胞質側の G タンパク質との相互作用部位は 3 つのドメインで作りに上げられている。

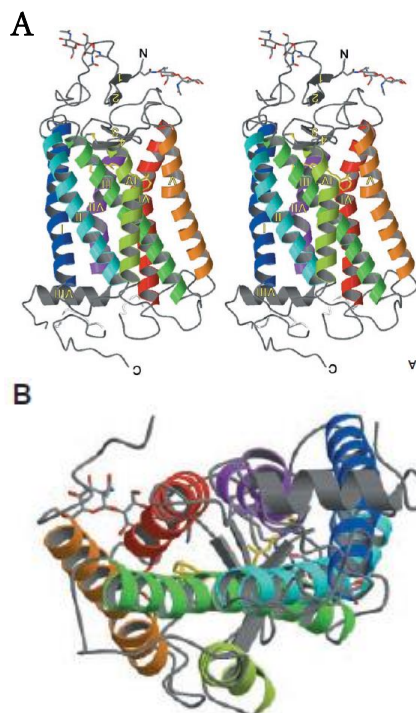


Fig. 1-10 ロドプシンの立体構造

ロドプシンは N 末端部分を紙面の下に描くのが慣習になっているが、ここでは他の GPCR と同様紙面の上に描いてある。A は横から見たステレオ図, B は細胞内 (C 末端側) から, C は細胞外から見た図 文献【21】から引用

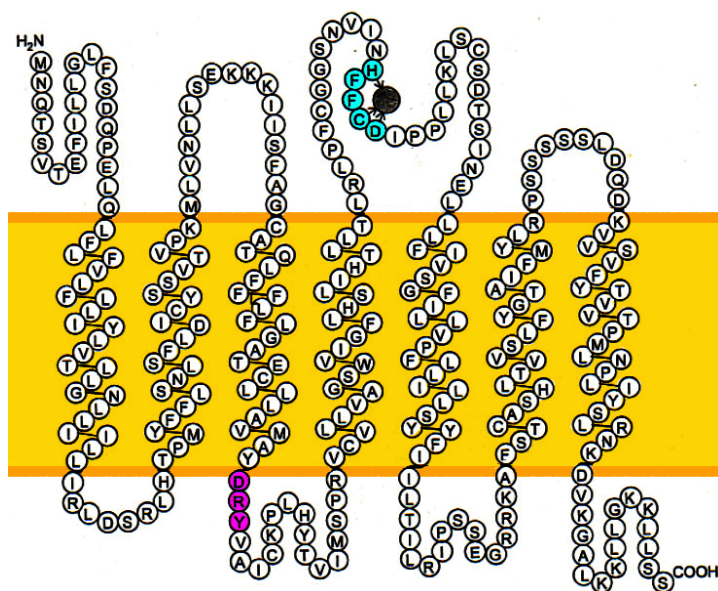


Fig. 1-11 classII 嗅覚受容体のコンセンサスなアミノ酸配列と予測される膜貫通領域
 橙色の領域は脂質二重膜を表している。膜の上側が細胞外、下側が細胞質内である。TM4 と TM5 の間の HFFCD コンセンサスモチーフ部分(水色)で金属イオンと配位していると推測されている。金属イオンは黒丸で表している。

1-3-7 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、若干の相違点があることも明らかになってきた。ロドプシンや $\beta 2$ -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 μ M 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【26】。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【27】。例えば、可動性の長鎖を有する脂肪族分子は様々な構造をとることが可能で、そのため脂肪族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【28】。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. 1-12) 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【26】。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【26】。また、mOR-EG のリガンドとして、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わかった【26】。

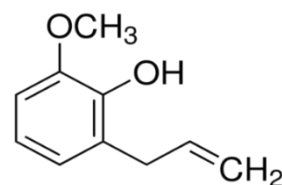


Fig. 1-12 Eugenol の化学構

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. 1-13a)【28, 29】。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. 1-13b)【28, 30, 31】。

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【32】。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

【33】。

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レ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. 1-14)。

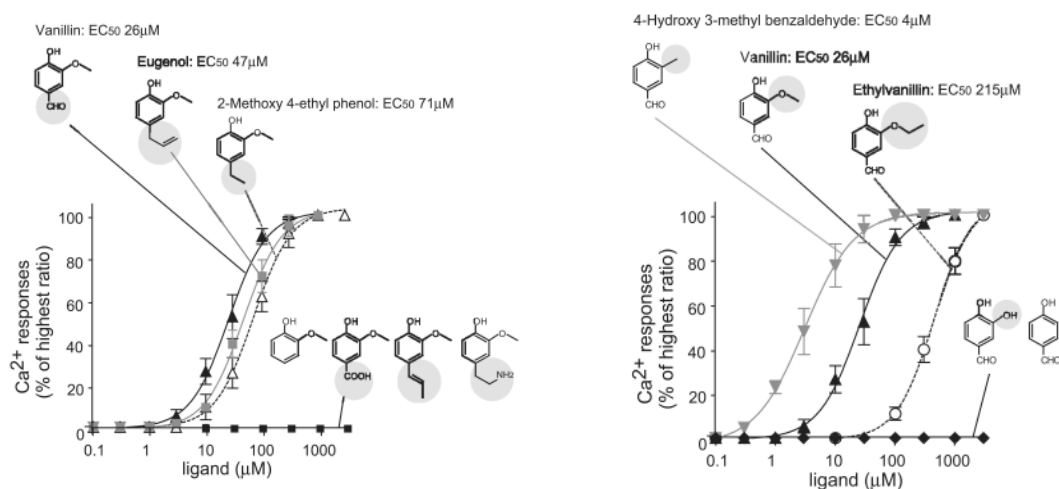


Fig.1-13 300 μM Eugenol を加えたときの濃度依存曲線を相対比で表したもの。 Ca^{2+} イメージングで測定している。

- 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

文献【26】より引用

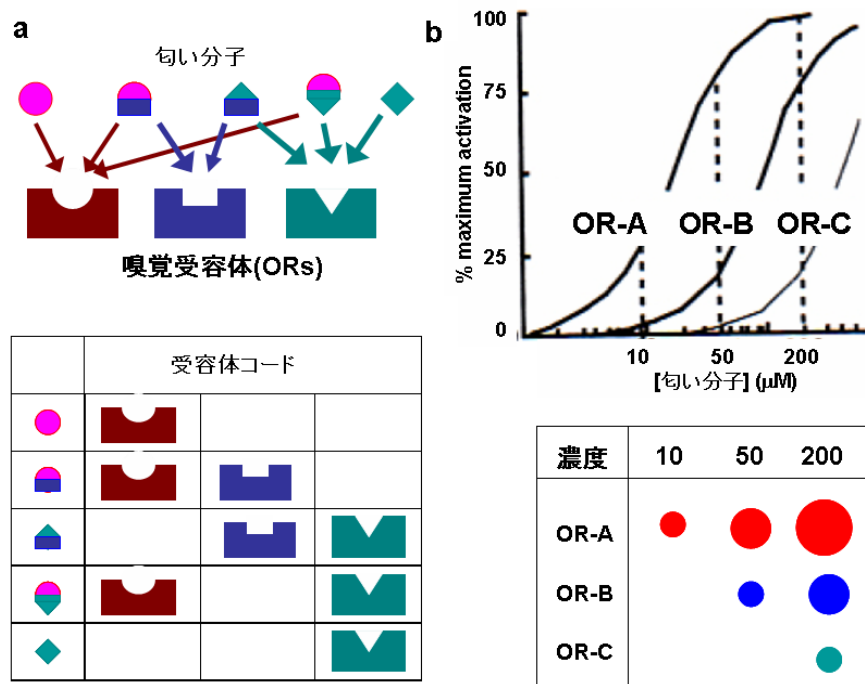


Fig.1-14 匂いの受容体コード形成のモデル

- 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。

文献【26】より引用

1-3-8 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 α 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【34】。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-EG が知られているので今回はそれを紹介する。

mOR-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【21】を鋳型に、mOR-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(Table1-2)。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 1-2)。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. 1-15)。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【26, 35】。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て MOR42-3 のリガンド結合様式が決定された【36】。

Table 1-2. 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

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

(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。)

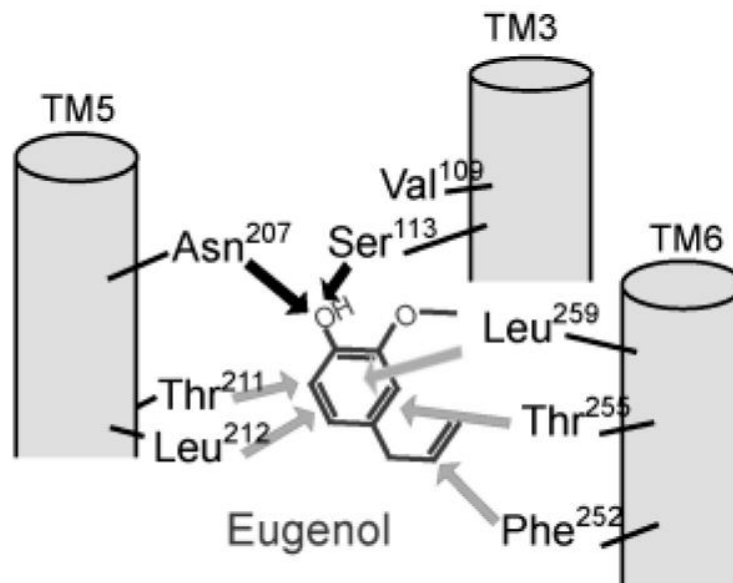


Fig. 1-15 変異導入試験とコンピューターモデル構築に基づいた mOR-EG とオイゲノールの結合様式概略(水素結合を黒の矢印で、疎水性結合を灰色の矢印で示してある)

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。参考文献【26】より引用

1-3-9 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【37】、 β 2-アドレナリン受容体【38】、セロトニン受容体【39】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【34】。

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【40】。類似のメカニズムが mOR-EG でも提唱されている【35】。

1-3-10 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1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1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, 41, 42】。また、外界からの匂い分子と接触しない神経軸索終末においても嗅覚受容体が発現していることや【43, 44】、同種類の嗅覚受容体を発現する嗅神経細胞の軸索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【45, 46, 47】、嗅覚受容体の軸索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【48】。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り【49, 50】、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ところである。

1-4 生化学的実験手法構築の紆余曲折

嗅覚に関与している巨大な遺伝子群は異なる動物の間で多用さを極めるため、日常的に新規受容体遺伝子がゲノムシーケンスプロジェクトにより同定され続けている【8】。反して、その構造や匂い分子との対応付けといった生化学的特性に関する研究は立ち遅れている。嗅覚受容体が正しく機能するためには、嗅覚受容体が細胞の原形質膜表面に正しく局在化することが必須である。しかし、嗅覚受容体を異種細胞で発現させた場合、原形質膜への正しい輸送が行われずに小胞体やゴルジ体で蓄積してしまい【51】、機能解析試験ができない。この難題を解決すべく、多くの手法が提唱され試験されてきた。ロドプシンのN末端のアミノ酸残基もしくは外来性のシグナルペプチドを嗅覚受容体のN末端に付加する手法もそのひとつである。この手法は線虫の化学感受性受容体 ODR-4(Odorant response abnormal protein 4)で試験されたが、あるラットの嗅覚受容体に対しては若干の膜局在改善が見られたものの、別の嗅覚受容体では効果は無かった【52】。また、嗅覚受容体のC末端側の配列をある程度削ることで膜表面への正しい局在化を促せる場合もあるようだが、その場合、リガンドとの結合や受容体自身の活性化に影響が及ぶ【53】。異種細胞でなく嗅覚神経細胞をそのまま発現宿主として用いる実験系の構築も進められ【52, 53, 54, 55,】、脂肪族アルコールと脂肪酸分子数種類に応答する受容体 13 種が同定されたものの【28】、リガンド特性試験への応用には遠く、リガンドが同定されたのはラットの嗅覚受容体 I7 くらいであった【56】。

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【57】。このロドプシン N 末端 20 アミノ酸のタグを Rho-tag という。

1-5-2 嗅覚受容体と相互作用する受容体

数少ない異種細胞での嗅覚受容体の研究報告であるが、他の GPCR が嗅覚受容体の細胞膜への局在量や、シグナルを調節しているのではないかという機構も報告されてきていることから、嗅覚受容体の機能的発現にはアクセサリタンパク質だけでなく、他の受容体の存在が重要な要因である可能性がある。HEK293 細胞(Human embryonic kidney 293 cell)で β 2 アドレナリン受容体(β 2-AR)とマウス嗅覚受容体の M71 を共発現させたところ、M71 単独発現時よりも細胞膜に局在している受容体量が増加し、それに伴い匂い分子応答によるセカンドメッセンジャー生産量も向上した【67】。同様にプリン受容体の一つである P2Y1 受容体もまたマウス M71 受容体の細胞膜局在量を増加させることが明らかとなった【68】。しかし、他の嗅覚受容体ではこのような現象は確認されなかったことから、相互作用する受容体も嗅覚受容体によって特異性があることが示唆された。

2011 年に Matsunami らは、HEK293T 細胞に、嗅覚受容体と type 3 アセチルコリン受容体(M3-R)、さらに嗅覚受容体のアクセサリ因子であり細胞膜の局在を補助する RTP1S(Receptor transport protein 1S)を共発現させたところ、M3-R が一部の嗅覚受容体と結合し、シグナル伝達を増長していることを発見した。嗅覚受容体、M3-R、RTP1S が共発現している HEK293T 細胞に、M3-R の選択的アゴニストを添加すると、嗅覚受容体のシグナル伝達によって誘引される cAMP 産生や Ca^{2+} イオンの取り込み量が増加した。また、この M3-R の作用は RTP1S 非存在下では生じない変化であった。一方で、嗅覚受容体のアゴニストが添加されると M3-R のシグナル伝達によって生じる Ca^{2+} イ

オンの細胞外放出量も増加したことから、両者の相互作用はクロストークする調節機構であることも同時に明らかとなった。

これまでに、 $\beta 2$ アドレナリン受容体などがある嗅覚受容体と特異的に相互作用し、細胞膜への局在を増加させることで機能向上をさせている例は報告されていたが、M3-R の作用機構は、自身は嗅覚受容体の細胞膜への局在量には作用せず、RTP1S と協調して嗅覚受容体のシグナル伝達を調節するという、新しい調整機構である【69】。

1-5-3 嗅覚受容体の膜局在をアシストするアクセサリータンパク質

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【58】。

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ータンパク質が必要であることが知られていた【59】。ショウジョウバエのロドプシンに対する NinaA タンパク質【60】、錐体光受容体オプシンに作用する RanBP2 タンパク質【61】、カルシトニン受容体様受容体を助ける RAMPs タンパク質【62】、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【63】に続き、線虫の嗅覚受容体のアクセサリータンパク質として ODR-4 が同定されていた【64】。興味深いことに、NinaA と RanBP を除いてこれらの間に配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【65】。

Matsunami らはそれぞれ膜貫通領域を持つ 2 種類のタンパク質ファミリーを発見し、それぞれ Receptor Transporting Protein (RTP) ファミリーと Receptor Expression Enhancing Protein (REEP) ファミリーと命名した。RTP1、RTP2 および REEP1 が嗅覚受容体の輸送を促進することが報告されている【58】。

さらに主に成熟した OSN に発現し、Golf のグアニンヌクレオチド交換因子として働くことが予想される Ric-8B を共発現させると、OR の Golf とのカップリングを促進することにより異種細胞に嗅覚受容体のより効果的に発現することが可能であることが報告されている【70, 71】。

1 - 6 Receptor transporting protein (RTP)

1 - 6 - 1 RTP の発見

Matsunami らは、哺乳類の嗅覚受容体の発現にもアクセサリ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【58】。

膜局在改善能を示した 2 種類のタンパク質はそれぞれ Receptor Transporting Protein1(RTP1)と Receptor Expression Enhancing Protein1 (REEP1)と命名された【58】。続いて RTP2 が同定された。RTP1 と RTP2 はアミノ酸レベルで 73%の相同性を示した。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、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【58】。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【66】。アクセサリ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。

また興味深いことに、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)【58, 66】。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【66】。

また RTP1 については、ほかの RTP ファミリーとアミノ酸配列を比較し、N 末端から 36 アミノ酸短いタンパク質が改めて同定された。嗅上皮組織にお

いて RTP1 より主要に存在し、より高い OR 輸送能を有することが分かった。これを RTP1S と命名し以降の嗅覚研究に用いられることとなった[79]。

1-6-2 RTP の機能

前に述べたように RTP は 1 つの膜貫通ドメインを有する膜貫通タンパク質であり、N 末端側が細胞内、C 末端側を細胞外に突出していると推測されている。

またアクセサリ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【58】。

1. アクセサリタンパク質は、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。

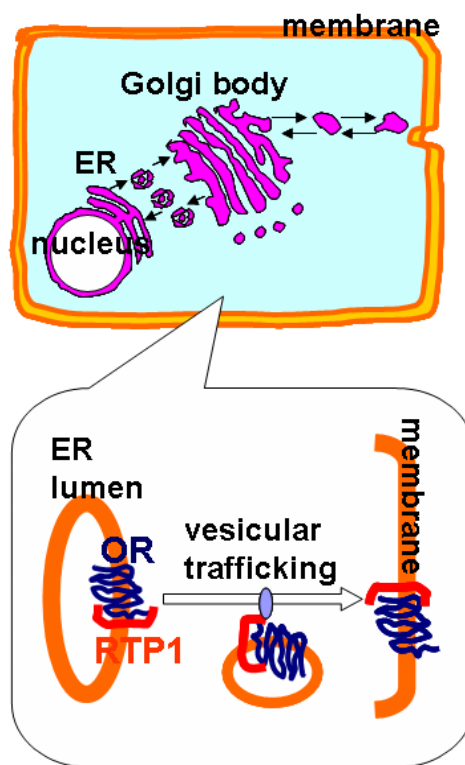


Fig. 1-16 アクセサリタンパク質による嗅覚受容体の膜輸送アシストモデル

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. 1-16) 【58, 65】。

RTP1S の機能と構造の関係については異種細胞を用いた実験から解明が進んでおり、松波らは RTP1S の末端欠損体、変異体、RTP4 との置換体を作製、HEK293T 細胞に OR と共発現させたときの RTP1S および OR の発現の様子を調べた (Fig. 1-17)。その結果 RTP1S の N 末端付近の領域は OR の小胞体か

らゴルジ体への輸送に、また中心付近の配列はゴルジ体から細胞膜表面への輸送に重要であることが分かった。さらに RTP1S の膜貫通ドメイン欠損体は OR 膜輸送の機能を保持することから、膜貫通ドメインは OR 膜輸送に必ずしも必要ではないことが報告された (Fig. 1-17)。

RTP ファミリーの保存されたアミノ酸配列のなかで特徴的な配列があり、CXXC というモチーフが 3 つ存在する。RTP1S を対象とした実験ではこの CXXC モチーフが RTP の機能に重要であることが示されている。さらに保存されたアミノ酸配列のうち、トリプトファンが OR の膜輸送機能に重要である。

シヨ糖密度勾配遠心法からは RTP1S の脂質ラフトへの局在化が OR との相互作用に重要であることが報告され、また相互作用解析から RTP1S の C 末端付近が OR と直接相互作用することが予想されている [75]。

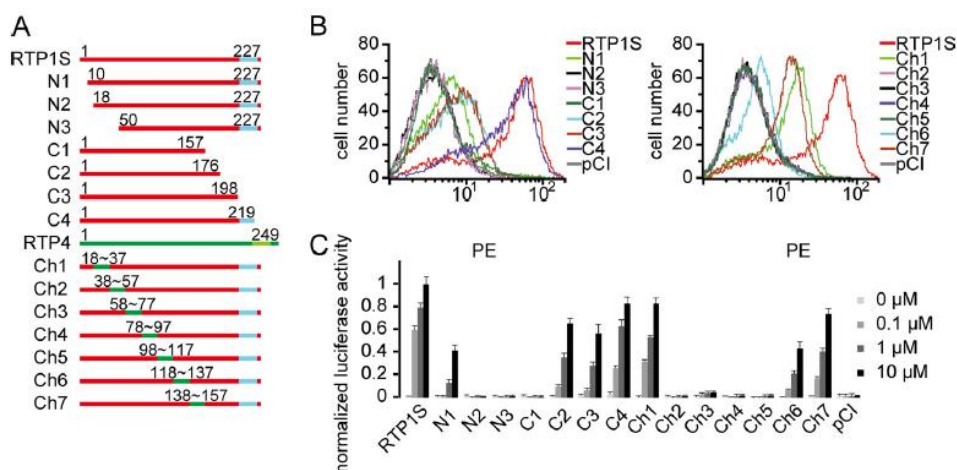


Fig. 1-17

A. RTP1S の欠損体と置換変異体

B. フローサイトメトリーによる OR の発現解析

C. ルシフェラーゼアッセイによる OR の匂い物質に対する応答測定

1-6-3 RTP による OSN 成熟

RTP1 および 2 ダブルノックアウトマウスの OE の mRNA 量を測定すると、野生型マウスと比べて成熟 OSN のマーカー遺伝子が減少していることが判明している。また、成熟 OSN マーカー遺伝子 *omp*、*adcy3* と未成熟 OSN マーカー遺伝子 *gap43* を標的とした RNA in situ hybridization から、RTP1, 2DKO マウスでは *gap43* ポジティブな OSN 数が増加しており、逆に *omp* 及び *adcy3* ポジティブな OSN が減少することが判明しており、RTP1, 2DKO マウスでは成熟 OSN が減少していた [76, 77]。この成熟 OSN の減少はどのように起こるのだろうか。多くの種類の OR は RTP1、2 がないと異種細胞で膜発現することができない。加えて、OSN は OR が機能的に発現することで成熟化が進むとされている。RTP1, 2DKO マウスでは OR が OSN 内で効率的に発現することができず、成熟化が野生型と比べて遅くなっていると考えられる。

また、RTP1, 2 DKO マウスの OE では野生型と比べ mRNA 量が減少する OR(uORs)と増加する OR(oORs)が存在し、RNA *in situ* hybridization により、oOR を発現する OSN が増加し uOR を発現する OSN が減少することが明らかにになっている。先述したように OSN が成熟するには 1 種の OR が細胞内で機能的発現することが重要であるが、このとき選ばれた OR が機能しないと、その OR の発現が抑制され、次の OR が選択される。この選択が繰り返される中で、RTP ノックアウト下では多くの uOR が発現しないため、結果として RTP がなくても発現する oOR を有する OSN の割合が増加すると考えられる。

1-6-4 OR の構造不安定性を RTP1S が補助する

RTP がなくても発現する OR と RTP がないと発現しない OR、この差は何により生じるのだろうか。アミノ酸の 90% が相同でありながら oOR である Olfr539 と uOR である Olfr541 をモデルに、キメラ OR やアミノ酸置換体の膜発現量を測定することで膜発現に重要なアミノ酸として G154(4.53) と V209(5.47) が特定された [76]。Olfr539 以外の複数の oOR においても G154 への変異が細胞膜発現量の低下をもたらすことが明らかにになっている。

Olfr539 のモデリングから G154 と V209 は 4 番目と 5 番目の膜貫通ドメインの中央部分にそれぞれ位置しており、タンパク質間相互作用よりも分子内相

相互作用に関与していると考えられた。そこで MD シミュレーションにより脂質二重膜中の OR の安定性を解析したところ、G154 と V209 に変異を加えると立体構造のばらつきが大きくなることが判明し、これらの残基が OR の立体構造安定性を高めていることが示唆された。また、シミュレーションから判明した各変異体における立体構造のばらつきと実際の膜発現量の相関を調べると、ばらつきが小さい OR ほど膜発現量が多くなっており、G154 と V209 がもたらす OR の立体構造安定性が細胞膜発現を向上させることが示唆されている。

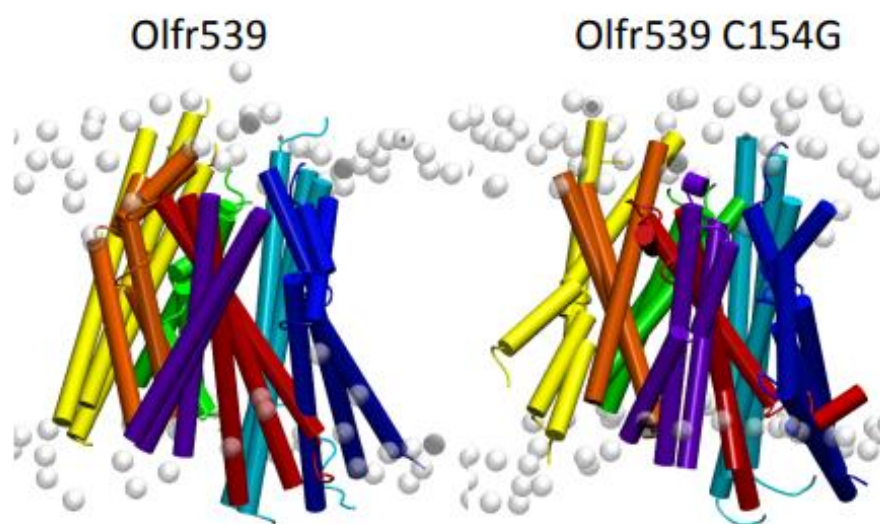


Fig. 1-18 脂質二重膜中の OR 立体構造の MD シミュレーション.

脂質二重膜中での OR の立体構造の動きを 500 ナノ秒間シミュレーションし、3 回のシミュレーション後の立体構造を重ね合わせた。同じ色の円柱は同じ番号の膜貫通ドメインを示す。

さらに、構造安定性の低下した Olfr539 G154C と Olfr539 V209G の細胞膜発現量が RTP1S により回復するか調査したところ、共発現下で細胞膜発現量の増加が確認された。これは、RTP1S が OR の立体構造を安定させることで、膜発現を促進することを示唆している。

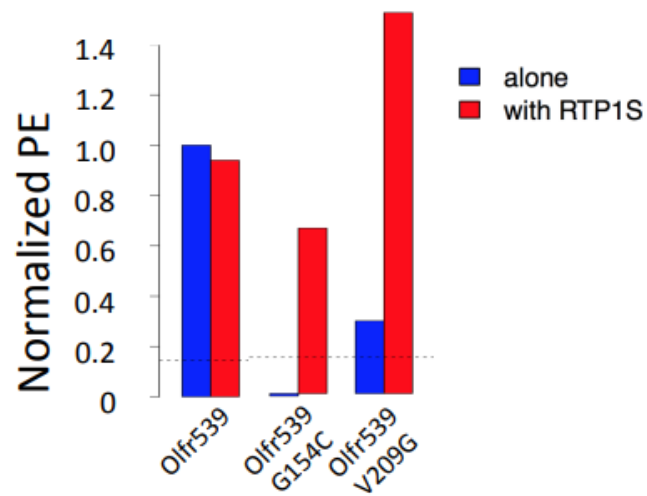


Fig. 1-19 RTP1S による Olfr539 変異体の細胞膜発現回復

HEK293T 細胞に Olfr539 または G154C 変異体, V209G 変異体を単独あるいは RTP1S 共発現で導入したときの各細胞膜発現量.

1-7 本研究の目的

上記のように RTP ファミリーの中で RTP1S と RTP2 は嗅覚受容体のフォールディングや細胞膜表面への輸送、脂質ラフトでの局在化の役割を担っていると考えられる。しかし、RTP ファミリーの中で立体構造が決定されたものではなく、さらに OR との相互作用機構についても詳細は分かっていない。また、RTP1S を共発現させても機能的発現が改善しない OR や、単独でも機能的発現を示す OR も存在しており、OR の発現機構に別の未知シャペロンタンパク質も介在している可能性も考えられる。OR のより正確な機能解析にはそれらを含むシャペロンタンパク質の機能解析と OR 発現機構への関与の解明が必要不可欠である。

そこで本研究では、OR の機能的発現機構の解明を目指し、既知シャペロンタンパク質である RTP1S の重要アミノ酸の特定および変異体機能解析と、未知シャペロンタンパク質の探索および新規シャペロンタンパク質 STAU2 と HSPA6 の ORs 発現促進機能解析を行った。

2 章 実験方法

2-1 培地および試薬の組成

2-1-1 大腸菌の培養

2-1-1-1 大腸菌の菌株

プラスミド調製には DH5 α または XL10GOLD を用いた。タンパク質発現には BL21(DE3) を用いた。

Escherichia coli DH5 α 株

F⁻, ϕ 80 *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*) U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

Escherichia coli XL10GOLD 株

Tet^r, Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1 supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, Hte, [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r]

Escherichia coli BL21(DE3) 株

F⁻, *ompT*, *hsdSB* (rB⁻ mB⁻), *gal* (λ cI 857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7gene1*), *dcm*(DE3) (B 株由来)

2-1-1-2 2xYT 培地

| | |
|-------------------------------|------|
| Bacto-tryptone (A1401 HA) | 16 g |
| Bact-yeast extract (A1202 HA) | 10 g |
| NaCl | 5 g |

1L になるまで蒸留水を添加。

適宜抗生物質を添加。

2-1-1-3 LB 培地

| | |
|--------------------|------|
| Bact-tryptone | 10 g |
| Bact-yeast extract | 5 g |
| NaCl | 5 g |

1 L の蒸留水を添加。

オートクレーブ 20 分。

4 °C 保存。

適宜抗生物質を添加。

2-1-1-4 LB プレート

| | |
|--------------------|------|
| Bacto-tryptone | 10 g |
| Bact-yeast extract | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Agar (A1296-500G) | 15 g |

1 L の蒸留水を添加。

オートクレーブ 20 分。

55 °C 程度になったら適宜抗生物質を添加。

プレートに流し込んで、固まったら 4 °C 保存。

2-1-2 RTP1S の精製

2-1-2-1 懸濁用バッファー

| | |
|--|-------|
| リン酸緩衝液 (pH 8.0) | 20 mM |
| NaCl | 0.1 M |
| cComplete EDTA free (Roche, 11836170001) | |

2-1-2-2 StrepTactin アフィニティークロマトグラフィー用バッファー

平衡バッファー

| | |
|-----------------|-------|
| リン酸緩衝液 (pH 8.0) | 20 mM |
| NaCl | 0.1 M |

溶出バッファー

| | |
|------------------------------|--------|
| リン酸緩衝液 (pH 8.0) | 20 mM |
| NaCl | 0.1 M |
| D-デスチオビオチン (IBA, 2-1000-005) | 2.5 mM |

2-1-2-3 イオン交換クロマトグラフィー用バッファー

バッファーA

| | |
|-----------------|-------|
| リン酸緩衝液 (pH 8.0) | 20 mM |
| NaCl | 0.1 M |

バッファーB

| | |
|-----------------|-------|
| リン酸緩衝液 (pH 8.0) | 20 mM |
| NaCl | 1 M |

2-1-3 哺乳類細胞の培養

2-1-3-1 細胞株

培養細胞にはヒト腎性胚細胞 HEK293T を使用した。

2-1-3-2 細胞の継代手順

細胞が 100 mm ディッシュ (100 mm cell culture dish、日本ジェネティクス) にコンフルエントになったところで継代を行った。ディッシュ上の培地を除去し、8 ml の PBS を用いてウォッシュした。PBS 除去後、3 ml の TrypLE Express Stable Trypsin Replacement Enzyme without Phenol Red (TrypLE ; Life

Technologies)を加え、37 ° Cで5 min 静置した。細胞がディッシュからはがれたことを確認し、5 ml の M10 を加えてよく懸濁した。懸濁液を遠心分離 (1,000 rpm、5 min)し、上清を除去した。M10PSF を加えて懸濁し、新しい 100 mm ディッシュに移し、37 °C, 5 % CO₂ で培養した。

2-1-3-3 M10 培地

| | |
|---|--------|
| D-MEM (low Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (FUJIFILM, 041-29775) | 500 ml |
| Fetal Bovine Serum | 5 ml |

2-1-3-4 M10PSF 培地

| | |
|--|--------|
| M10 培地 | 50 ml |
| ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液(x 100) (FUJIFILM, 161-23181) | 500 µl |

2-1-3-5 リガンド応答測定用培地

| | |
|--------------|-----|
| CD293 Medium | |
| Glutamine | 2mM |

2-1-3-6 FACS 用 PBS

| | |
|-----------------------------|--------|
| D-PBS (FUJIFILM, 049-29793) | 500 ml |
| FBS | 10 ml |
| 1.5 M NaN ₃ | 200 µl |

2-1-3-7 StreptAvidin ビーズ精製用バッファー

Lysis バッファー

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 7.5) | 50 mM |
| Urea | 8 M |
| DTT | 1 mM |
| Protein inhibitor | |

Wash バッファー

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 7.5) | 50 mM |
| Urea | 2 M |

2-1-4 SDS-PAGE およびウェスタンブロット

2-1-4-1 サンプルバッファー

| | |
|-------------------------|------|
| 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) | 5 ml |
| 10 % SDS | 8 ml |
| Glycerol | 4 g |
| 2-mercaptethanol | 2 ml |
| Saturated BPB solution | 適量 |

蒸留水で 20 ml にメスアップ。

2-1-4-2 Running バッファー

10 x Running バッファー

| | |
|-----------|---------|
| Tris base | 30.3 g |
| Glycine | 143.1 g |
| SDS | 10 g |

蒸留水で 1 L にメスアップ。

2-1-4-3 Transfer バッファー

10 x Transfer バッファー

| | |
|-----------|--------|
| Tris base | 30.3 g |
| Glycine | 144 g |

蒸留水で 1 L にメスアップ。

1 x Transfer バッファー

| | |
|---------------------|--------|
| 10 x Transfer バッファー | 100 ml |
| 100 % Methanol | 200 ml |

蒸留水で 1 L にメスアップ。

2-1-4-4 PBS-T

| | |
|--------------|-------------|
| PBS (pH 8.0) | 1 L |
| Tween20 | 500 μ L |

2-1-4-5 Stripping バッファー

| | |
|---------|-------|
| Glycine | 15 g |
| SDS | 1 g |
| Tween20 | 10 ml |

pH 2.2 まで HCl を添加

蒸留水で 1 L にメスアップ

2-2 DNA およびプラスミドの準備

先行研究より C 末端側膜貫通領域を欠損させた RTP1S 変異体(RTP1S Δ TM)の大腸菌発現プラスミド(pET23b_RTP1S Δ TM-strep)は構築済みである。

2-2-1 *in vitro* 精製用 RTP1S 変異体の作製

マウスの cDNA からクローニングした RTP1S 遺伝子を鋳型に使用した。また、大腸菌組換え発現ベクターとして、前任者により作製された pET-23b (Novagen)の *XhoI* 認識配列下流に strep-tag を付加したベクター pET-23b_strep を使用した。

2-2-1-1 プライマー

>RTP1S Δ 2_NdeI

GGAATTCCATATGAAGAGTGTGACCACAGGTG

2-2-1-2 PCR

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 94 °C | 5 min | } 30 cycle |
|-------------------------|------------------|-------|----------|------------|
| Template | 0.2 μ l | 98 °C | 30 sec | |
| 5 μ M Primer (Fw) | 1 μ l | 55 °C | 30 sec | |
| 5 μ M Promer (Rv) | 0.5 μ l | 68 °C | 30 sec | |
| 2.5 mM dNTPs mix | 2.5 μ l | 68 °C | 7 min | |
| 25 mM MgSO ₄ | 1.5 μ l | 4 °C | ∞ | |
| KOD-Plus-NEO | 0.5 μ l | | | |
| 10x buffer | 2.5 μ l | | | |
| dH ₂ O | Up to 25 μ l | | | |

遺伝子の増幅をアガロースゲル電気泳動で確認した。

2-2-1-3 PCR産物の精製

PCR産物から非特異的な増幅配列、プライマー、dNTP等の残存物を除去するため、Monarch PCR& DNA Cleanup Kit (Biolabs, T1030L)を用いて増幅遺伝子の粗精製を行った。

2-2-1-4 制限酵素処理

粗精製後のPCR産物および発現ベクターpET-23b_strepに対し、制限酵素を加え37℃で16時間以上インキュベートした。

制限酵素処理反応溶液

| 試薬 | 添加量 |
|-------------------|-------------|
| PCR産物粗精製物 or ベクター | 9 µl |
| NEBuffer 3.1 | 2 µl |
| <i>Nde</i> I | 0.5 µl |
| <i>Xho</i> I | 0.5 µl |
| dH ₂ O | Up to 20 µl |

2-2-1-5 ゲル精製

制限酵素処理産物から余分な残存物を除去するため、アガロースゲル電気泳動後に目的配列の切り出しと精製を行った。精製にはMonarch PCR& DNA Cleanup Kitを使用した。

2-2-1-6 ライゲーション

ゲル精製後のPCR産物および発現ベクターをライゲーションした。DNAリガーゼにはDNA Ligation Kit (TaKaRa)を用いた。

ライゲーション反応溶液

| 試薬 | 添加量 |
|------------------|-------------|
| 目的配列 | 2 μ l |
| ベクター | 0.5 μ l |
| DNA Ligation Mix | 2.5 μ l |

2-2-1-7 形質転換

作製したプラスミド 2 μ l をコンピテントセル DH5 α に加え、氷上で 30 min 静置した。42 °C で 30 sec 熱処理し、2 min 氷冷した。アンピシリンを終濃度 100 mg/ml で含む LB 培地プレートに播種し、37 °C で 16 時間以上培養した。

2-2-1-8 コロニーPCR

目的遺伝子が挿入されたプラスミドを持った大腸菌を選択するため、プレートに生えたコロニーを 20 μ l の滅菌水に懸濁し、この懸濁液を用いて PCR を行った。PCR 酵素には Taq DNA Polymerase (NEB) を、プライマーには pET-23b 特異的にアニーリングするプライマー (T7 promotor および T7 terminator) を用いた。

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 95 °C | 15 min | } 30 cycle |
|--------------------------|------------------|-------|----------|------------|
| コロニー懸濁液 | 2 μ l | 94 °C | 30 sec | |
| 10 μ M T7 prpmoter | 0.5 μ l | 55 °C | 30 sec | |
| 10 μ M T7 terminator | 0.5 μ l | 68 °C | 2 min | |
| 10 x Thermopol buffer | 1 μ l | 68 °C | 7 min | |
| 2.5 mM dNTPs mix | 0.8 μ l | 4 °C | ∞ | |
| Taq Polymerase | 0.05 μ l | | | |
| dH ₂ O | Up to 10 μ l | | | |

遺伝子の増幅はアガロース電気泳動により確認した。

2-2-1-9 プラスミド抽出

目的の配列長が確認されたコロニー懸濁液をアンピシリンが終濃度 100 µg/ml で含まれる 4 ml の LB 培地に植菌した。植菌した試験管を 37 ° C で 16 時間培養し集菌した。NucleoSpin Plasmid Transfection-grade(MACHEREY-NAGAL, U0490C)を用いて菌体からプラスミドを抽出した。

2-2-2 NanoBiT アッセイ用 RTP1S および OR の作製

NanoBiT アッセイ用ベクターとして pBiT1.1-C[TK/LgBiT]、pBiT2.1-C[TK/SmBiT]、pBiT1.1-N[TK/LgBiT]、pBiT2.1-N[TK/SmBiT] (Promega) を使用した。鋳型には pCI 挿入済みの RTP1S または Rh-tag 付き Olfr544 (pCI_RTP1S または pCI_Rho-Olfr544)を使用した。RTP1S-NanoBiT の構築において、PCR からプラスミド抽出までの手法は前述と同様である。Olfr544 の構築には InFusion HD Cloning Kit (Promega)を用いた。

2-2-2-1 プライマー

```
>RTP1S_pBiT-N_5'
CCGCTCGAGCGGTTGTAAGAGTGTGACCAC
>RTP1S_pBiT-N_3'
AAAGCTAGCTTAGACAGAAGTACGGAAGG
>RTP1S_pBiT-C_5'
AAAGCTAGCATGTGTAAGAGTGTGACCAC
>RTP1S_pBiT-C_3'
CCGCTCGAGCCGACAGAAGTACGGAAGG
>Rho_Fw_pBiT-N
AGGTGGAGGCTCGAGcggtATGACTGAACTTCTCAAGTTGCTCCT
>544_Rv_pBiT-N
AGAAGATCTGCTAGCTTATCCAGGAAGCTCTCTATTCGAGGG
>Rho_Fw_pBiT-C
ACCAGATCTGCTAGCcaccATGTCAGGGTGGAGCAATGGC
>544_Rv_pBiT-C
CCACCACCGCTCGAGccTCCAGGAAGCTCTCTATTCGAGGG
>pBiT-N_Fw
```

GCTAGCAGATCTTCTAGAGTCGGG

>pBiT-N_Rv

CTCGAGCCTCCACCTCCG

>pBiT-C_Fw

CTCGAGCGGTGGTGGC

>pBiT-C_Rv

GCTAGCAGATCTGGTGGCTTT

2-2-2-2 PCR

鋳型に pCI_Rho-Olfr544 および各 NanoBiT ベクターを使用し、目的遺伝子と線状化ベクターを増幅した。

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 98 °C | 5 min | } 30 cycle |
|----------------------|-------------|-------|-----------|------------|
| PrimeSTAR MAX Premix | 12.5 µl | 98 °C | 10 sec | |
| 10 µM Primer (Fw) | 1 µl | 55 °C | 5 sec | |
| 10 µM Primer (Rv) | 1 µl | 72 °C | 5 sec./kb | |
| Template (1 ng/µl) | 200 pg | 72 °C | 7 min | |
| dH ₂ O | Up to 25 µl | 4 °C | ∞ | |

2-2-2-3 InFusion 反応

PCR 産物を同様にゲル精製した後、得られた目的遺伝子と線状化ベクターに対して 50 ° C、15 min インキュベートし InFusion 反応を行った。

反応溶液組成

| 試薬 | 添加量 |
|-------------------------------|-----------|
| 目的遺伝子 | 2 μ l |
| 線状化ベクター | 2 μ l |
| 5x In-Fusion HD Enzyme Premix | 1 μ l |
| dH ₂ O | 5 μ l |

この後は 2-2-1 と同様に形質転換からプラスミド抽出までを行った。

2-2-3 *In vivo* 発現用 RTP1S N 末端変異体の作製

HEK293T 細胞で RTP1S N 末端変異体を発現させるためのプラスミド構築を行った。発現ベクターには哺乳動物細胞発現用ベクター pCI を使用した。PCR からの手法は 2-2-1 と同様である。

2-2-3-1 プライマー

```

>RTP1S_D1_MluI
CGAACGCGTATGAAGAGTGTGACCACAGGTG
>RTP1S_D2_MluI
CGAACGCGTATGAGTGTGACCACAGGTGAG
>RTP1S_D3_MluI
CGAACGCGTATGGTGACCACAGGTGAGTGG
>RTP1S_D4_MluI
CGAACGCGTATGACCACAGGTGAGTGGAAG
>RTP1S_D5_MluI
CGAACGCGTATGACAGGTGAGTGGAAGAAGG
>RTP1S_D6_MluI
CGAACGCGTATGGGTGAGTGGAAGAAGGTCTTC
>RTP1S_D7_MluI
CGAACGCGTATGGAGTGGAAGAAGGTCTTCTACG
>RTP1S_C2A_MluI
CGAACGCGTATGGCTAAGAGTGTGACCACAGGTG
>RTP1S_K3A_MluI

```

```
CGACGCGTATGTGTGCTAGTGTGACCACAGGTGAGTGG
>RTP1S_S4A_MluI
CGACGCGTATGTGTAAGGCTGTGACCACAGGTGAGTGG
>pCI_Rv
CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC
```

2-2-4 *In vivo* 発現用 RTP1S シス테인変異体の作製

HEK293T 細胞で RTP1S CS 変異体を発現させるためのプラスミド構築を Chimeric PCR により行った。発現ベクターには哺乳動物細胞発現用ベクター pCI を使用した。鋳型には pCI に挿入済みの、RTP1S の C 末端に HA-tag が付与されている RTP1S-HA (pCI_RTP1S-HA) を使用した。なお、RTP1S C2S も新たに HA-tag 付きで作製した。プライマーは 2-2-3 の RTP1S_C2A_MluI である。

2-2-4-1 プライマー

```
>pCI_Fw
CTCTCCACAGGTGTCCACTCC
>RTP1S_C58S
CAGGTTCCACTCTTCCTGGTGCT
>RTP1S_C58S_c
AGCACCAGGAAGAGTGGAACCTG
>RTP1S_C61S
CTGTTTCCTGGTCCTGGCACACCT
>RTP1S_C61S_c
AGGTGTGCCAGGACCAGGAACAG
>RTP1S_C96S
CAAGCAGCTCTCCTACGAGTGCG
>RTP1S_C96S_c
CGCACTCGTAGGAGAGCTGCTTG
>RTP1S_C99S
CTGCTACGAGTCCGGTACAGCAC
>RTP1S_C99S_c
```


GTGCTGTACCGGACTCGTAGCAG
>RTP1S_C129S
TGCGAGAGCAGTCCTACGGGGAG
>RTP1S_C129S_c
CTCCCCGTAGGACTGCTCTCGCA
>RTP1S_C155S
CGGAGAGTTCTCCGAGGCCTGC
>RTP1S_C155S_c
GCAGGCCTCGGAGAACTCTCCG
>RTP1S_C158S
TGCGAGGCCTCCCAGGAAGGCA
>RTP1S_C158S_c
TGCCTTCCTGGGAGGCCTCGCA
>RTP1S_C198S
GAAACAGGCTCAGGCTCCAACCTTCTGCTCCATTCC
>RTP1S_C198S_c
GGAATGGAGCAGAAGTTGGAGCCTGAGCCTGTTTC
>RTP1S_C201S
CTCAGGCTGCAACTTCTCCTCCATTCCCTGGTG
>RTP1S_C201S_c
CACCAGGGAATGGAGGAGAAGTTGCAGCCTGAG
>RTP1S_C206S
CATTCCTGGTCCTTATTTTGGGC
>RTP1S_C206S_c
GCCCAAATAAGGACCAGGGAATG
>RTP1S_1SXXS
CAGGTTCCACTCCTCCTGGTCCTGGCACACCT
>RTP1S_1SXXS_c
AGGTGTGCCAGGACCAGGAGGTGGAACCTG
>RTP1S_2SXXS
CAAGCAGCTCTCCTACGAGTCCGGTACAGCAC

```

>RTP1S_2SXXS_c
GTGCTGTACCGGACTCGTAGGAGAGCTGCTTG
>RTP1S_3SXXS
CGGAGAGTTCTCCGAGGCCTCCCAGGAAGGCA
>RTP1S_3SXXS_c
TGCCTTCCTGGGAGGCCTCGGAGAACTCTCCG
>RTP1S_4SXXS
GGCTCAGGCTCCAACTTCTCCTCCATTCCCT
>RTP1S_4SXXS_c
AGGGAATGGAGGAGAAGTTGGAGCCTGAGCC
>pCI_Rv
CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC

```

2-2-4-2 1st PCR

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 98 °C | 1 min | } 30 cycle |
|----------------------|-------------|-------|-----------|------------|
| PrimeSTAR MAX Premix | 12.5 µl | 98 °C | 10 sec | |
| 10 µM Primer (Fw) | 1 µl | 55 °C | 5 sec | |
| 10 µM Primer (Rv) | 1 µl | 72 °C | 5 sec./kb | |
| Template (1 ng/µl) | 200 pg | 72 °C | 5 min | |
| dH ₂ O | Up to 25 µl | 4 °C | ∞ | |

2-2-4-3 2nd PCR

1st PCR 産物を 1/10 に希釈し、2nd PCR の Template に使用した。

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 98 °C | 1 min | } 30 cycle |
|----------------------|------------------|-------|-----------|------------|
| PrimeSTAR MAX Premix | 7.5 μ l | 98 °C | 10 sec | |
| 10 μ M pCI_Fw | 0.45 μ l | 55 °C | 5 sec | |
| 10 μ M pCI_Rv | 0.45 μ l | 72 °C | 5 sec./kb | |
| Template 1 | 0.3 μ l | 72 °C | 5 min | |
| Template 2 | 0.3 μ l | 4 °C | ∞ | |
| dH ₂ O | Up to 15 μ l | | | |

この後は 2-2-1 と同様に粗精製からプラスミド抽出までを行った。

2-2-5 BioID 用融合タンパク質の作製

HEK293T 細胞でビオチンリガーゼ融合タンパク質を発現させるためのプラスミド構築を Chimeric PCR により行った。発現ベクターには哺乳動物細胞発現用ベクター pCI を使用した。各ビオチンリガーゼの鋳型には MCS-13xHALinker-BioID2-HA-pCDNA3.1、3xHA-TurboID-NLS-pCDNA3、3xHA-miniTurbo-NLS-pCDNA3 (Addgene)、pET30a-His-TEV-AirID(愛媛大学澤崎研究室)を、IgK シグナルと PDGFRTM 配列の鋳型には pDisplay™ Mammalian Expression Vector (Invitrogen)を使用した。

2-2-5-1 プライマー

>BioID2-HA-1S_Fw

AAACGCGTCACCatgttcaagaacctgatctggctg

>BioID2-HA-1S_mdRv

CACCTGTGGTCACACTCTTACAAtgcgtaatccggtacatcgtaag

>BioID2-HA-1S_mdFw

cttacgatgtaccgattacgcaTGTAAGAGTGTGACCACAGGTG

>BioID2-HA-1S_Rv

aagcggccgcTTAGACAGAAGTACGGAAGGAGAATTG

>1S-BioID2-HA_Fw

AAACGCGTCACCATGTGTAAGAGTGTGACCACAG

>1S-BioID2-HA_mdRv

CAGCCAGATCAGGTTCTTGAAGACAGAAGTACGGAAGGAGAATTG
 >1S-BioID2-HA_mdIFw
 CAATTCTCCTTCCGTACTTCTGTCTTCAAGAACCTGATCTGGCTG
 >1S-BioID2-HA_Rv
 aagcgccgcctatgcgtaatccggtacatcgtaag
 >HA-TurboID-1S_Fw
 aaacgcgtCACCatgtaccctatgacgtcccag
 >HA-TurboID-1S_mdIRv
 CACCTGTGGTCACACTCTTACActtttcggcagaccgcag
 >HA-TurboID-1S_mdIFw
 ctgcggtctgccgaaaagTGTAAGAGTGTGACCACAGGTG
 >1S-HA-TurboID_mdIRv
 ctgggacgtcataggggtaGACAGAAGTACGGAAGGAGAATTG
 >1S-HA-TurboID_mdIFw
 CAATTCTCCTTCCGTACTTCTGTCTaccctatgacgtcccag
 >1S-HA-TurboID_Rv
 ttgcggccgcttacttttcggcagaccgcag
 >HA-miniTurbo-1S_mdIRv
 CACCTGTGGTCACACTCTTACActtttcggcagaccgcag
 >HA-miniTurbo-1S_mdIFw
 ctgcggtctgccgaaaagTGTAAGAGTGTGACCACAGGTG
 >1S-HA-miniTurbo_mdIRv
 ctgggacgtcataggggtaGACAGAAGTACGGAAGGAGAATTG
 >1S-HA-miniTurbo_mdIFw
 CAATTCTCCTTCCGTACTTCTGTCTaccctatgacgtcccag
 >Olfr499-HA-Turbo_mdIRv
 gtctgggacgtcataggggtagtcagatcgatgacctggc
 >Olfr499-HA-Turbo_mdIFw
 gccaggtcatccgatctgactaccctatgacgtcccagac
 >Olfr539-HA-Turbo_mdIRv
 gtctgggacgtcataggggtaATGTGAGAAAGAAGCCAATATTCTGC

>Olf539-HA-Turbo_md1Fw
 GCAGAATATTGGCTTCTTTCTCACATtaccctatgacgtcccagac
 >Olf544-HA-Turbo_md1Rv
 gtctgggacgtcataggggtaTCCAGGAAGCTCTCTATTTCGAGG
 > Olf544-HA-Turbo_md1Fw
 CCTCGAATAGAGAGCTTCCTGGAAtaccctatgacgtcccagac
 >pDisplay-IgK_MluI-Fw
 aaacgcgtcaccATGGAGACAGACACACTCCTGC
 >IgK-Turbo_md1Rv
 gtagtctgggacgtcataggggtaAGCATAATCTGGAACATCATATGGATAGTC
 >IgK-Turbo_md1Fw
 GACTATCCATATGATGTTCCAGATTATGCTtaccctatgacgtcccagactac
 >Turbo-PDGFRTM_md1Rv
 CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCcttttcggcagaccgcagac
 >Turbo-PDGFRTM_md1Fw
 gtctgcggtctgccgaaaagGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
 >PDGFRTM_NotI-Rv
 ttgcggccgcCTAACGTGGCTTCTTCTGCCAAAG
 >IgK-PDGFRTM_md1Rv
 CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCAGCATAATCTGGAACATC
 ATATGGATAGTC
 >IgK-PDGFRTM_md1Fw
 GACTATCCATATGATGTTCCAGATTATGCTGAACAAAAACTCATCTCA
 GAAGAGGATCTG
 >PDGFRTM-Turbo_md1Rv
 gtagtctgggacgtcataggggtaACGTGGCTTCTTCTGCCAAAG
 >PDGFRTM-Turbo_md1Fw
 CTTTGGCAGAAGAAGCCACGTtaccctatgacgtcccagactac

2-2-5-2 1st PCR

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 98 °C | 30 sec | } 30 cycle |
|-----------------------------|-------------|-------|-----------|------------|
| Phusion Plus DNA Polymerase | 0.1 µl | 98 °C | 5 sec | |
| | | 55 °C | 15 sec | |
| 5x Phusion Plus Buffer | 2 µl | 72 °C | 1 min./kb | |
| 2 mM dNTPs | 1 µl | 72 °C | 5 min | |
| 5 µM Primer (Fw) | 1 µl | 4 °C | ∞ | |
| 5 µM Primer (Rv) | 1 µl | | | |
| Template (1 ng/µl) | 1 µl | | | |
| dH ₂ O | Up to 10 µl | | | |

2-2-5-3 2nd PCR

1st PCR 産物を 1/10 に希釈し、2nd PCR の Template に使用した。

PCR 反応溶液組成および反応条件

| 試薬 | 添加量 | 98 °C | 30 sec | } 30 cycle |
|-----------------------------|-------------|-------|-----------|------------|
| Phusion Plus DNA Polymerase | 0.25 µl | 98 °C | 5 sec | |
| | | 55 °C | 15 sec | |
| 5x Phusion Plus Buffer | 5 µl | 72 °C | 1 min./kb | |
| 2 mM dNTPs | 2.5 µl | 72 °C | 5 min | |
| 5 µM Primer (Fw) | 2.5 µl | 4 °C | ∞ | |
| 5 µM Primer (Rv) | 2.5 µl | | | |
| Template 1 | 1.25 µl | | | |
| Template 2 | 1.25 µl | | | |
| dH ₂ O | Up to 25 µl | | | |

この後は 2-2-1 と同様に pCR 産物の精製からプラスミド抽出までを行った。

た。

2-2-6 細胞発現用 STAU2 および HSPA6 作製

HEK293T 細胞で STAU2 および HSPA6 を発現させるためのプラスミド構築を行った。発現ベクターには哺乳動物細胞発現用ベクター pCI を使用した。鋳型にはダナフォームから購入した ORF クローン(STAU2; 100006501、HSPA6; 100010117)を使用した。

2-2-6-1 プライマー

>STAU2_MluI

CGacgcgtCACCATGCTTCAAATAAATCAGATGTTCTCAGTGCA

>STAU2_NotI

AAgcggccgcCTAGACGGCCGAGTTTGATTTCTT

>HSPA6_MluI

CGacgcgtCACCATGCAGGCCCCAC

>HSPA6_NotI

ATAGTTTAgcggccgcTTAATCAACCTC

PCR からプラスミド抽出までは 2-2-1 と同様に行った。

2-3 RTP1S 変異体の精製

2-3-1 大量培養・集菌

大腸菌発現用プラスミド pET-23b_RTP1SΔTM-strep を用いて BL21(DE3) を形質転換し、得られたコロニーをアンピシリン含有 LB 培地 1 L に懸濁して 25 °C、100 rpm で 24 時間振盪培養した。培養培地を 500 ml 用遠心管に移し、遠心分離(4 °C、4,200 g、25 min)により菌体を回収した。得られた菌体を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で再懸濁し、50 ml ファルコンチューブに移して再度遠心分離(4 °C、5,000 g、20 min)した。上清を除去後、-80 °C で保存した。

2-3-2 超音波破碎

保存した菌体を氷上で融解し、懸濁用バッファーで再懸濁した。破碎により懸濁液が高温になるのを避けるため、氷上で 2 min 破碎 - 2min 氷冷のサイクルで超音波破碎を行った。超音波破碎後、遠心分離(4 °C、14,000 rpm、30 min)を行い、可溶性画分を回収した。

2-3-3 アフィニティークロマトグラフィー

アフィニティークラムとして StrepTactin Sepharose High Performance (GE) を使用し、可溶性画分を精製した。カラム担体 5 ml をペリスタポンプに接続し、平衡バッファーを流速 3 ml/min で流して平衡化した。上清画分をカラムにアプライし、スルーを回収した。続いて平衡バッファーを 50 ml 流しカラムを洗浄しウォッシュ画分を回収した。最後に溶出バッファーを流し、溶出を回収した。

2-3-4 イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換カラムには ResourceQ(GE)を使用し、精製装置として Duo Flow(Bio-Logic)を用いた。カラムにサンプルをアプライし、カラムの 5 倍量 30 ml のバッファーA を流してスルーを回収した。続いてバッファーA とバッファーB を流速 3 ml/min で塩濃度が高くなっていくようグラジエントをかけて流し、溶出画分を回収した。溶出画分のうち、目的のサンプルを含む部分を回収した。

2-3-5 サイズ排除クロマトグラフィー

サイズ排除カラムには Superdex75(GE)を使用し、精製装置として Duo Flow(Bio-Logic)を用いた。バッファーA でカラムを平衡化した後、サンプル溶液をアプライして流速 1 ml/min のバッファーA で溶出させた。溶出は 2 ml ずつフラクションに回収し、SDS-PAGE(15 %)で確認して目的のサンプルを含むフラクションを回収した。

2-3-6 SEC-MALS による絶対分子量測定

サイズ排除カラム(OHpak SB-804 HQ)をバッファーA で平衡化し、サンプル 100 μ l を HPLC ポンプ(PU-1580i、日本分光)、示差屈折率検出器(RI-71、Shodex)および多角度光散乱検出器(DAWN DSP、Wyatt Technology)を用いて流速 0.5 ml/min で溶出させた。散乱強度と屈折率より絶対分子量を算出した。

2-3-7 SEC-HPLC による相対分子量測定

サイズ排除カラム(OHpak SB-804 HQ)をバッファーA で平衡化し、サンプル 100 μ l を HPLC ポンプを用いて流速 0.5 ml/min で溶出させ、溶出液の 280 nm における吸光度を測定した。あらかじめ分子量が分かっているサンプルをスタンダードとして流し、その溶出体積で検量線を作成し相対的な分子量を計算した。

2-4 NanoBiT assay

基本的な手順は Promega の公開するプロトコルに従った。

2-4-1 NanoBiT assay 用細胞の培養

10 cm ディッシュでコンフルエントに培養した HEK293T 細胞に継代操作を行い、遠心分離後の細胞を M10 で懸濁して Biocoat Poly-D-Lysine Cellware 96 well (CORNING) プレートに播種して 37 °C, 5% CO₂ の条件で培養した。

2-4-2 培養細胞への形質転換

形質転換試薬には Viafect Transfection Reagent (Promega) を使用し、手順は Viafect の Technical Manual に従った。NanoBiT 発現プラスミドは 50 ng/well、pCI_Rho-Olfr544 は 5 ng/well で導入した。また、DNA 量を等しくするため、サンプル DNA を導入しない条件では pCI ベクターを同量になるよう導入した。形質転換後、再び 37 °C, 5% CO₂ の条件で培養した。

2-4-3 発光値測定

測定前に培地を 37 °C に調整した MEM 50 ul に交換した。Nano-Glo LCS Dilution Buffer で Nano-Glo Live Cell Substrate を 20 倍に希釈し、5x NanoBiT nano-Glo Live Cell Reagent を調製した。この Reagent を 10 µl/well で培地に添加し、15 秒攪拌して GloMax-Multi Detection System (Promega) で発光値を測定した。

2-5 FACS

2-5-1 FACS 用細胞の培養

10 cm ディッシュでコンフルエントに培養した HEK293T 細胞に継代操作を行い、遠心分離後の細胞を M10 で懸濁して 6 Well Advanced TC Plate(greiner) に播種して 37 °C, 5% CO₂ の条件で一晩培養した。

2-5-2 培養細胞への形質転換

形質転換試薬には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用し、手順は Lipofectamine 2000 の Technical Manual に従った。各プラスミドの導入量を以下に示す。また、DNA 量を等しくするため、サンプル DNA を導入しない条件では pCI ベクターを同量になるよう導入した。形質転換後、再び 37 °C, 5% CO₂ の条件で培養した。

HEK293T に導入した DNA

| DNA | ng/well |
|----------------|--------------------------|
| GFP | 30 ng |
| Rho-OR | 900 ng |
| RTP1S | 300 ng |
| STAU2 or HSPA6 | 30 ng or 90 ng or 300 ng |

2-5-3 FACS 解析

ディッシュから培地を除去し、1 ml の PBS で洗浄した。PBS 除去後 Cell Stripper (Corning) 900 µl を添加し、穏やかにピペッティングすることで細胞をディッシュから剥離させた。細胞懸濁液を 2 ml チューブに移し、さらに 900 µl の FACS 用 PBS でディッシュを洗浄して残存細胞を同チューブに移した。チューブは氷上に保存した。チューブを遠心分離(4 °C、3,000 rpm, 5 min)し上清を除去後、ペレットを 1/400 anti-Rho 4D2 抗体(Merck)を含む FACS 用 PBS 50 µl で懸濁し、氷上で 30 min 静置した。1.8 ml の FACS 用 PBS を加え、再びチューブを遠心分離(4 °C、3,000 rpm, 5 min)し上清を除去した。ペレットを 1/100 APC Goat anti-mouse IgG(Biolegend)を含む FACS 用 PBS 50 µl で懸濁

し、氷上、遮光下で 30 min 静置した。1.8 ml の FACS 用 PBS を加え再度遠心分離(4 °C、3,000 rpm, 5 min)し、上清除去後のペレットを 7AAD を含む FACS 用 PBS 500 μ l で懸濁した。CytoFLEX (Beckman Coulter)を用いてこの懸濁液に含まれる細胞を生細胞、球状、シングルセル、GFP ポジティブでゲーティングし、該当細胞表面の PE の強度を測定した。

2-6 Dual-Glo Luciferase assay

基本的な手順は Promega の公開するプロトコルに従った。

2-6-1 Dual-Glo Luciferase assay 用細胞の培養

2-4-1 と同様の手法で細胞を培養した。

2-6-2 培養細胞への形質転換

形質転換試薬には Viafect Transfection Reagent を使用し、手順は Viafect の Technical Manual に従った。各プラスミドの導入量を以下に示す。また、DNA 量を等しくするため、サンプル DNA を導入しない条件では pCI ベクターを同量になるよう導入した。形質転換後、再び 37 °C, 5% CO₂ の条件で培養した。

HEK293T に導入した DNA

| DNA | ng/well |
|----------------|---------------------------|
| OR | 5 ng |
| RTP1S | 5 ng |
| STAU2 or HSPA6 | 0.05 ng or 0.5 ng or 5 ng |
| CRE-Luciferase | 10 ng |
| pRL-SV40 | 5 ng |

2-6-3 匂い添加

培養培地を除去し、リガンドを目的の濃度になるように加えたリガンド応答測定用培地を 25 µl/well で各ウェルに添加した。プレートの蓋を外した状態で 37 °C、5% CO₂ の条件で 3 時間培養した。

2-6-4 発光値測定

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。測定には GloMax-Multi Detection System を使用した。発光値の解析については、まず各ウェルについて細胞応答の強度を示すホ

タルルシフェラーゼの化学発光値を、トランスフェクション効率や細胞の生存率を示すコントロールである Renilla ルシフェラーゼの化学発光値で割った数値(CRE/RL)を算出した。ネガティブコントロール条件(non-transfection 細胞あるいは OR 単独発現細胞、かつリガンド濃度 0 μ M)のウェルの数値を CRE/RL_{n.c.}、各ウェルの数値を CRE/RL_Nとし、各ウェルの発光強度を以下のように算出した。

$$\text{Normalized Luminescence}_N = (\text{CRE/RL}_N) / \text{Average}(\text{CRE/RL}_{n.c.})$$

各条件での発光強度をソフトウェア Prism で解析し、グラフを作製した。

2-7 共免疫沈降法

2-7-1 抗体結合ビーズの準備

ビーズには磁気ビーズ(Dynabeads™ Protein G immunoprecipitation Kit, Thermo Fisher Scientific)を用いた。ビーズを懸濁し、120 μ l を 1.5 ml チューブに移して磁気分離により上清を除去した。0.5 ng の抗体を添加した 0.02 % Tween20 を含む PBS (pH7.4) 100 μ l (1 サンプルあたり) でビーズを再懸濁し、室温で 10 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートし、ビーズ-抗体複合体を得た。磁気分離により上清を除去し、100 μ l の Binding バッファーで再懸濁した。

2-7-2 抗原抗体反応

磁気分離により上清を除去したビーズに対しサンプル溶液を 100 μ l 加え、ピペティングにより穏やかに懸濁した後、室温で 10 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。磁気分離により上清を除去し、200 μ l の PBS (pH7.4) を加え穏やかに再懸濁し洗浄した。洗浄をさらに 2 回繰り返したのち、100 μ l の PBS (pH7.4) で再懸濁し、新しい 1.5 ml チューブに懸濁液を移した。

2-7-3 溶出

磁気分離により懸濁液から上清を除去し、30 μ l のサンプルバッファーでビーズを再懸濁して 70 °C で 10 分間熱処理した。磁気分離により上清を分離し、新たな 0.5 ml チューブに回収した。

2-8 BioID

2-8-1 BioID 用細胞の培養

10 cm ディッシュでコンフルエントに培養した HEK293T 細胞に継代操作を行い、遠心分離後の細胞を M10 で懸濁して CELLSTA 100x20mm シャーレ (greiner) に播種して 37 °C、 5% CO₂ の条件で一晩培養した。

2-8-2 培養細胞への形質転換

形質転換試薬および手順は Viafect を使用した。各タンパク質発現プラスミドは 8 µg/10 cm dish で導入し、また、DNA 量を等しくするため、サンプル DNA を導入しない条件では pCI ベクターを同量になるよう導入した。形質転換後、再び 37 °C、 5% CO₂ の条件で培養した。

2-8-3 ビオチン含有培地での培養

ビオチンリガーゼ融合タンパク質の形質転換と同時あるいは 24 時間培養後、ビオチン((+)-ビオチン, 和光純薬)を含む M10 培地を添加した。TurboID 使用時は 500 µM ビオチンで 2 時間、AirID 使用時は 50 µM で 24 時間培養した。

2-8-4 細胞ライセート調整

ディッシュを氷上に移動し、培地を除去した。氷冷した PBS (-) で 3 回 Wash し、Lysis バッファー 1 ml を添加した。セルスクレーパーを用いて細胞をディッシュから剥がし 1.5 ml チューブに回収した後、100 µl の Lysis バッファーで残存物を回収した。終濃度 1 % で Tween20 を添加し、氷上で穏やかに超音波破碎した後、遠心分離 (4 °C, 1,000 rpm, 5 min) してデブリや未破碎細胞を除去しライセートを獲得した。

2-8-5 ビオチン化タンパク質精製

ビオチン化タンパク質の精製には StreptAvidin 磁気ビーズ (Streptavidin Mag Sepharose™, GE) を用いた。

ビーズを 100 µl / 1 sample で分注し、500 µl の TBS (pH7.5) で洗浄した。磁気分離により上清除去後、ビーズをライセート 300 µl と混合し 30 分間室温で

インキュベートした。磁気分離で上清を除去し、500 μ l の Wash バッファーでビーズを攪拌し洗浄した。この洗浄を 3 回繰り返した。最後に 500 μ l の Wash バッファーを加え、protease inhibitor を添加し - 80 °C で保存した。

2-8-6 LC-MS/MS

ビーズ溶液を氷上で解凍後、Wash バッファーを除去し、変性バッファー (10 mM DTT, 2 M Urea, 50 mM Ammonium bicarbonate) 100 μ l を添加して室温で 30 分間インキュベートした。1/20 量のヨードアセトアミドを添加後、遮光下、室温でさらに 30 分間インキュベートし、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C, 和光純薬) を 0.5 ng 添加してさらに室温で 3 時間インキュベートした。Urea が 1M になるようサンプルを希釈し、トリプシン (Trypsin Gold, Promega) を 0.5 ng 添加して 37 °C で一晩インキュベートした。

磁気分離によりビーズを除去し、得られた上清を脱塩カラム (GL-Tip SBD, ジーエルサイエンス) を用いて脱塩した。減圧乾燥にかけて溶液を完全に蒸発させ、0.1 % TFA でペプチドを再溶解させた後、20,000 xg, 4 °C で 5 分間遠心して上清を回収した。この上清を LC-MS/MS 解析にかけ、ペプチドの分析およびタンパク質の同定を行った。

2-9 SDS-PAGE およびウェスタンブロット

2-9-1 ローディングサンプルの調整

泳動するサンプル溶液に対し同量のサンプルバッファーを混合し、100 °C で 5 min 熱処理した。サンプルに OR が含まれる場合は SDS-resistant な凝集体になるのを避けるため、4 °C で一晩静置した。

2-9-2 転写

転写にはトランスブロット Turbo (Bio-Rad)を使用した。SDS-PAGE 泳動後のゲルおよびメタノールで親水化した PVDF メンブレン(Bio-Rad)、ろ紙を 1x Transfer バッファーに 1 分間浸し平衡化した。ゲルとメンブレンを気泡が入らないように密着させ、ろ紙で挟み、陽極側にメンブレン、陰極側にゲルが向くように電極間に配置して、1 A で 30 分泳動することでメンブレンにタンパク質を転写した。

2-9-3 抗体反応

メンブレンへの抗体反応には iBind Flex Western Device (Invitrogen)を用い、手順も付属のプロトコルに従った。

2-9-4 発光検出

抗体反応後のメンブレンに対し、Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate を用いて発光検出を行った。Western BLoT Ultra Sensitive Luminol/Enhancer Solution と Western BLoT Ultra Sensitive Peroxide Reagent を各 2 ml ずつ混合し、メンブレンの転写面をこの反応溶液に浸して 1 分間振盪した。振盪後、余分な反応溶液を除去し、C-DiGit (LI-COR)を用いて発光を観察した。

3 章 RTP1S オリゴマー形成および機能的な重要残基の特定

3-1 緒言

序論で述べたように、RTP1S と RTP2 が嗅覚受容体のフォールディングや細胞膜表面での局在に役割を有していることが明らかになっている。そして、嗅覚受容体との相互作用機構をはじめとした詳細な機能のさらなる解明には RTP の構造情報が不可欠であるが、RTP ファミリーは立体構造が明らかになっていない。また、先行研究から RTP1S の N 末領域が ORs の ER からの脱出に、C 末領域が細胞膜表面での RTP1S の脂質ラフト局在に重要であるなど、RTP1S 各部位の大まかな機能が推定されているが、具体的な重要アミノ酸残基の特定には至っていない。3 章では、まず RTP1S の立体構造解明に向けて、RTP1S 単一精製系の構築と得られた精製 RTP1S の分子量測定を実施した。さらに、RTP1S 変異体を作製しそれらの OR 輸送能およびオリゴマー形成状態を観察することで、機能上あるいは構造上重要となるアミノ酸残基の特定を行った。

3-2 結果

3-2-1 *In vitro* で RTP1S は単量体と二量体を形成する

RTP1S の分子構造を解明するため、*in vitro* での RTP1S 発現・精製系の構築を行った。RTP1S は C 末端側に膜貫通領域(Trans Membrane domain; TMD)を有する一回膜貫通型タンパク質であり、野生型では精製に適していないことが予測された。先行研究から、TMD を欠損させた RTP1S が OR 輸送能を維持していることが確認されていたため、この RTP1S TMD 欠損体に strep-tag を付加した変異体(RTP1S_C2-strep)について pET23b 発現ベクターに導入し、*E.coli* BL21 star(DE3)での発現系を構築した。大腸菌破碎上清を StrepTactin アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーの順に精製することで RTP1S を単一精製した。サイズ排除クロマトグラフィーでは 2 つのピークで溶出し、それぞれ SEC-MALS 法により分子量測定したところ、上流の溶出は分子量 43.3 kDa、下流の溶出は 21.8 kDa であることが確認された。RTP1S_C2-strep の推定分子

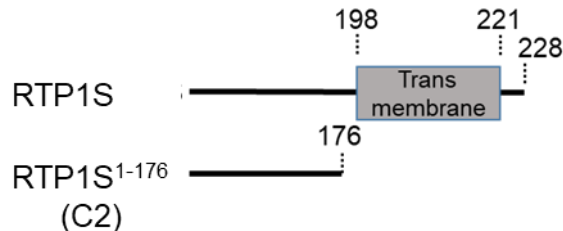


Fig. 3-1 RTP1S と RTP1S_C2 の概略

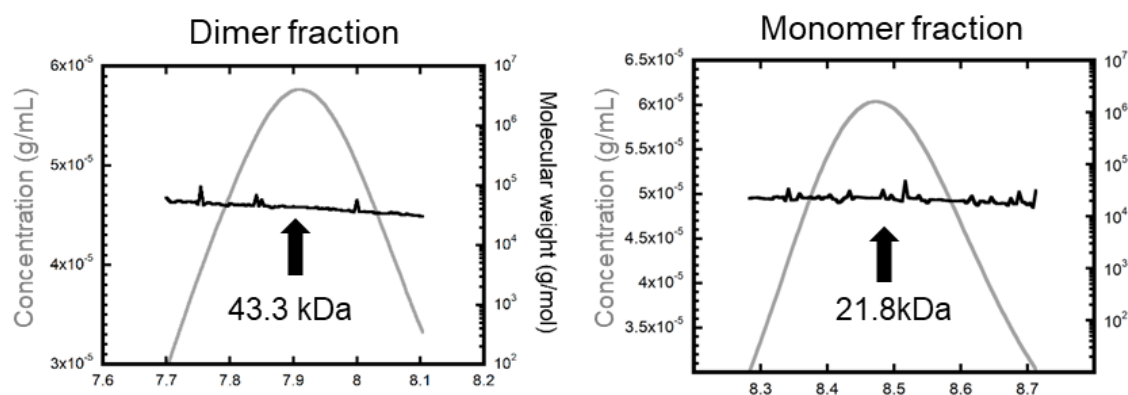


Fig. 3-2 SEC-MALS による精製 RTP1S の分子量測定

量が約 22 kDa であることから、これらはホモ二量体と単量体であることが示唆された。

また、RTP1S ホモ二量体に DTT を添加し HPLC により観察したところ、DTT 添加時間の伸長、DTT 添加濃度の増加に対して二量体の割合が減少するのに応じ、単量体の割合が増加することが確認された。このことから、RTP1S ホモ二量体形成にはジスルフィド結合が関与していることが強く示唆された。

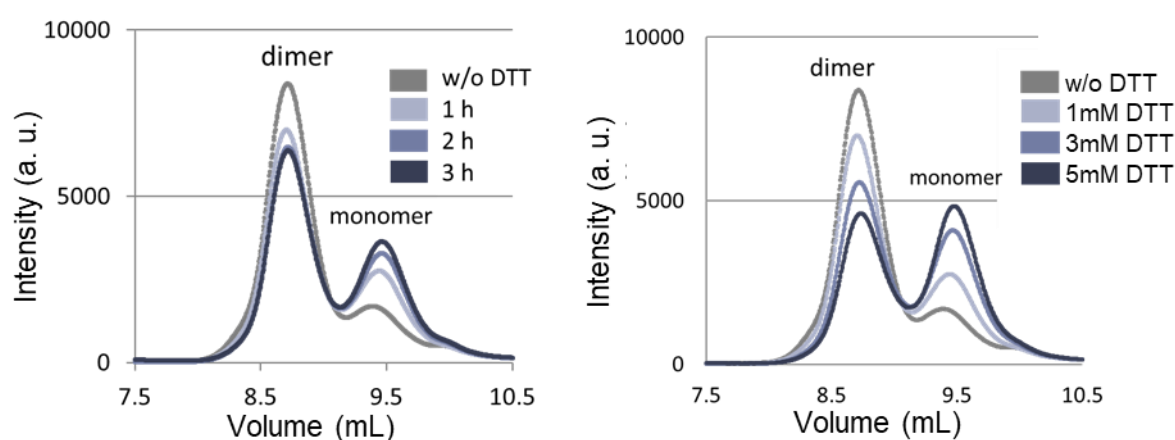


Fig. 3-3 HPLC による DTT 添加時の RTP1S オリゴマー状態観察
(左)添加時間による変化 (右)添加濃度による変化

3-2-2 Cys-2 を欠損させると二量体形成が失われる

先行研究から、RTP1S は N 末端側を欠損させることで OR 輸送能が大きく低下することが明らかとなっており、当該領域に重要な配列を有することが示唆されていた。加えて、N 末端 2 残基目にシステイン残基が配置している。そこでこのシステイン残基を欠損させた変異体(RTP1S_C2ΔN2-strep)を作製し、同様の手法で精製および HPLC による相対分子量測定を行った。RTP1S_C2-で観察された二量体のピーク(Fig.3-5 下矢印)が RTP1S_C2ΔN2 では消失しており、N 末端 2 残基目システインの二量体形成への関与が示唆された。

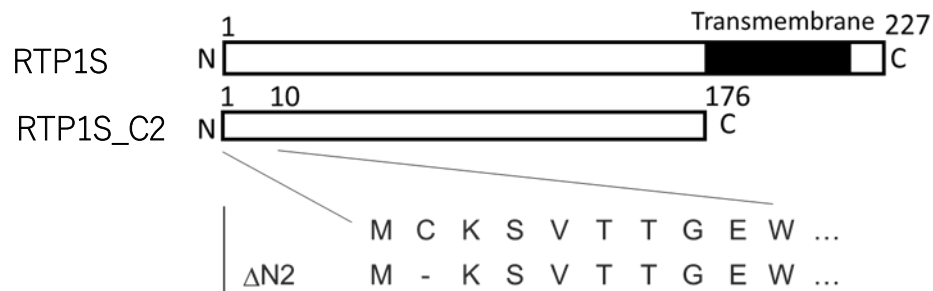


Fig. 3-4 RTP1S, RTP1S_C2 および RTP1S_C2ΔN2 の配列

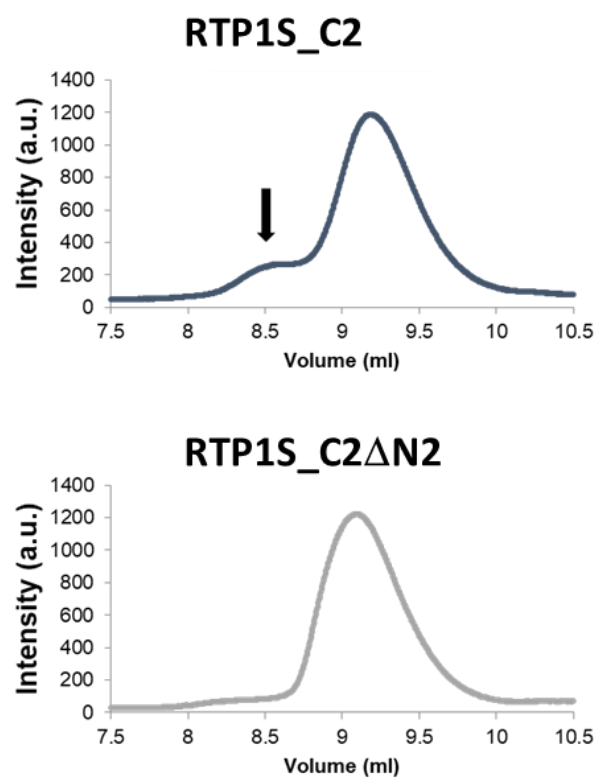


Fig. 3-5 HPLC による RTP1S_C2(上)と RTP1S_C2ΔN2(下)のオリゴマー状態観察. RTP1S_C2 の下矢印(↓)で示したピークが RTP1S_C2ΔN2 では消失した.

3-2-3 *In vivo*での二量体形成評価

*in vitro*での二量体形成は前項までで示された。続いて、*in vivo*の RTP1S 二量体形成の有無を NanoBiT アッセイ(Promega)で観察した。NanoBiT アッセイは分割ルシフェラーゼの再構築を利用してタンパク質間の相互作用を検出する手法である。NanoLuc ルシフェラーゼをベースに作製された高分子量分割ルシフェラーゼ LgBiT と LgBiT に相補的に結合するペプチド SmBiT をそれぞれ PoI に付加し発現させ、PoI の相互作用の際の空間的近接に伴い LgBiT と SmBiT がルシフェラーゼを再構築することで生じる発光を測定することで、PoI の相互作用を観察する。

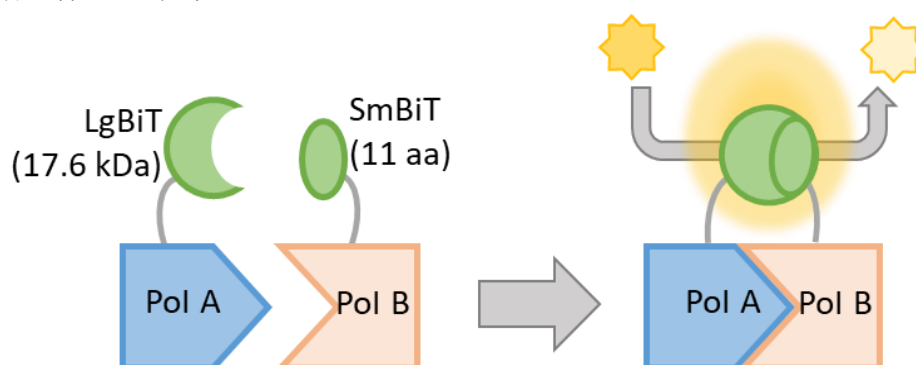
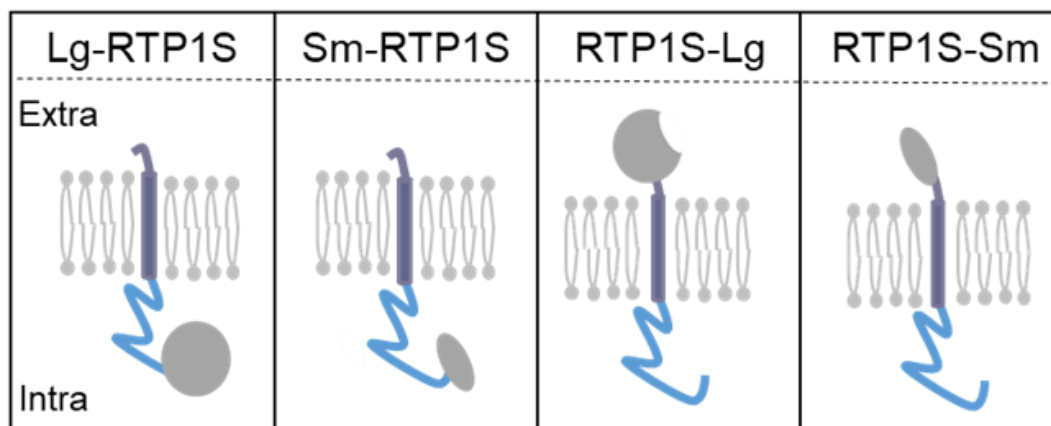


Fig. 3-6 NanoBiT アッセイ概略. 分割ルシフェラーゼ LgBiT と SmBiT が PoI 相互作用により近接すると再構築し、基質発光が生じる。

NanoBiT アッセイ用発現ベクター pBiT に RTP1S を導入し、下図のような RTP1S-NanoBiT 融合タンパク質を作製した。HEK293T 細胞で LgBiT 融合体と SmBiT 融合体を各組合せで共発現させ、分割ルシフェラーゼ再構築により生じるシグナルを測定した。



分割ルシフェラーゼが細胞膜を介して配置する RTP1S-Lg と Sm-RTP1S の共発現では発光値が RTP1S-Lg 単独発現時と差が生じないのに対し、共に細胞膜外に配置する RTP1S-Lg と RTP1S-Sm の共発現では高い発光値が確認された。また、N 末端 2 残基目システインを欠損させた RTP1S (RTP1S Δ N2) の C 末端側に分割ルシフェラーゼを付加した融合体についても同様に発光値を測定したところ、野生型に比べ大きく発光値が減少することが確認された。

このことから、細胞内でも RTP1S が二量体を形成することが判明し、*in vitro* の測定時と同様に N 末端 2 残基目システインを欠損させると二量体形成が消失することが示唆された。

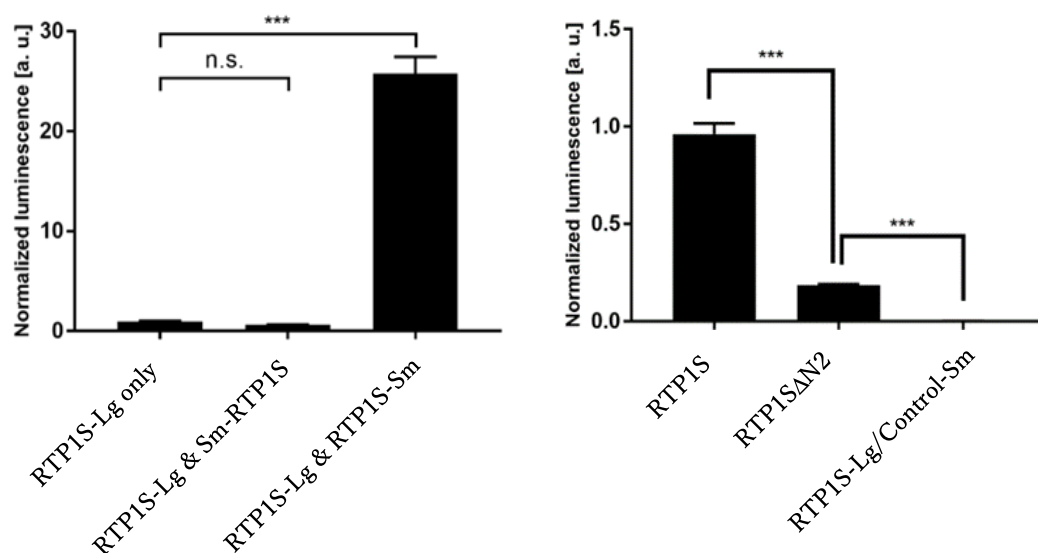


Fig. 3-7 NanoBiT アッセイによる RTP1S および RTP1S Δ N2 の発光値観察
(左)RTP1S 野生型同士の発光値 (右)RTP1S 野生型と RTP1S Δ N2 の発光値

3-2-4 *In vivo*での RTP1S N 末端変異体の OR 機能促進評価

前述したように、RTP1S は N 末端領域を欠損させると OR 輸送能が大きく減衰することが判明しているが、具体的な重要残基の特定には至っていない。この減衰をもたらす N 末端配列中の重要残基の特定のため、RTP1S の N 末端側アミノ酸を欠損あるいはアラニン置換した変異体を作製し、共発現させた時の ORs の細胞膜発現量を FACS により測定した。

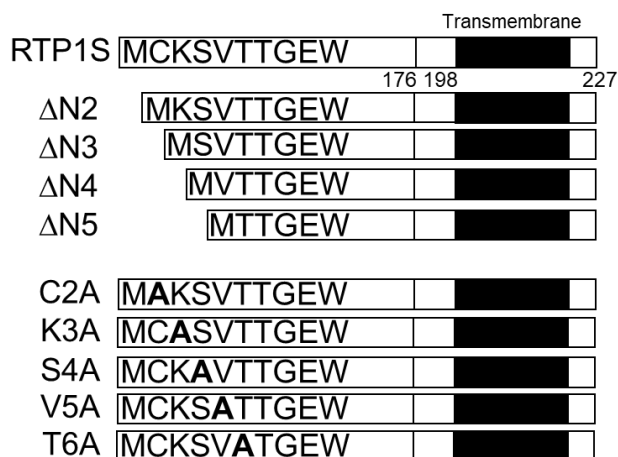


Fig. 3-8 RTP1S N 末端変異体の配列

HEK293T において、N 末端 4 残基目セリンを欠損させた RTP1S 変異体 (RTP1SΔN4) を共発現させると、Olfr1484 の細胞膜発現量は著しく低下した。Olfr599 と Olfr1377 でも RTP1SΔN4 共発現時には細胞膜発現量の減少が確認された。アラニン置換体についても、4 残基目セリンを置換した変異体 (RTP1S S4A) を共発現させたときに同様の膜発現量の低下の傾向が見られ、一方で 5 残基目バリン、6 残基目トレオニンのアラニン置換体では ORs 膜発現量の回復が確認された。また、2 残基目システインについては欠損あるいは置換 (RTP1SΔN2, RTP1S C2A) させてもある程度の膜発現量が維持されており、RTP1S の二量体形成は OR 輸送能に必須ではないことが示唆された。

続いて RTP1S N 末変異体共発現時の ORs リガンド応答を測定した。Olfr599 のリガンドには Octanoic acid を、Olfr1377 と Olfr1484 のリガンドには Acetophenone を用いた。こちらでも RTP1SΔN4、RTP1S S4A で大きなシグナルの減少が確認され、ORs 細胞膜発現量とリガンド応答強度の間に正の相関があることが確認された。

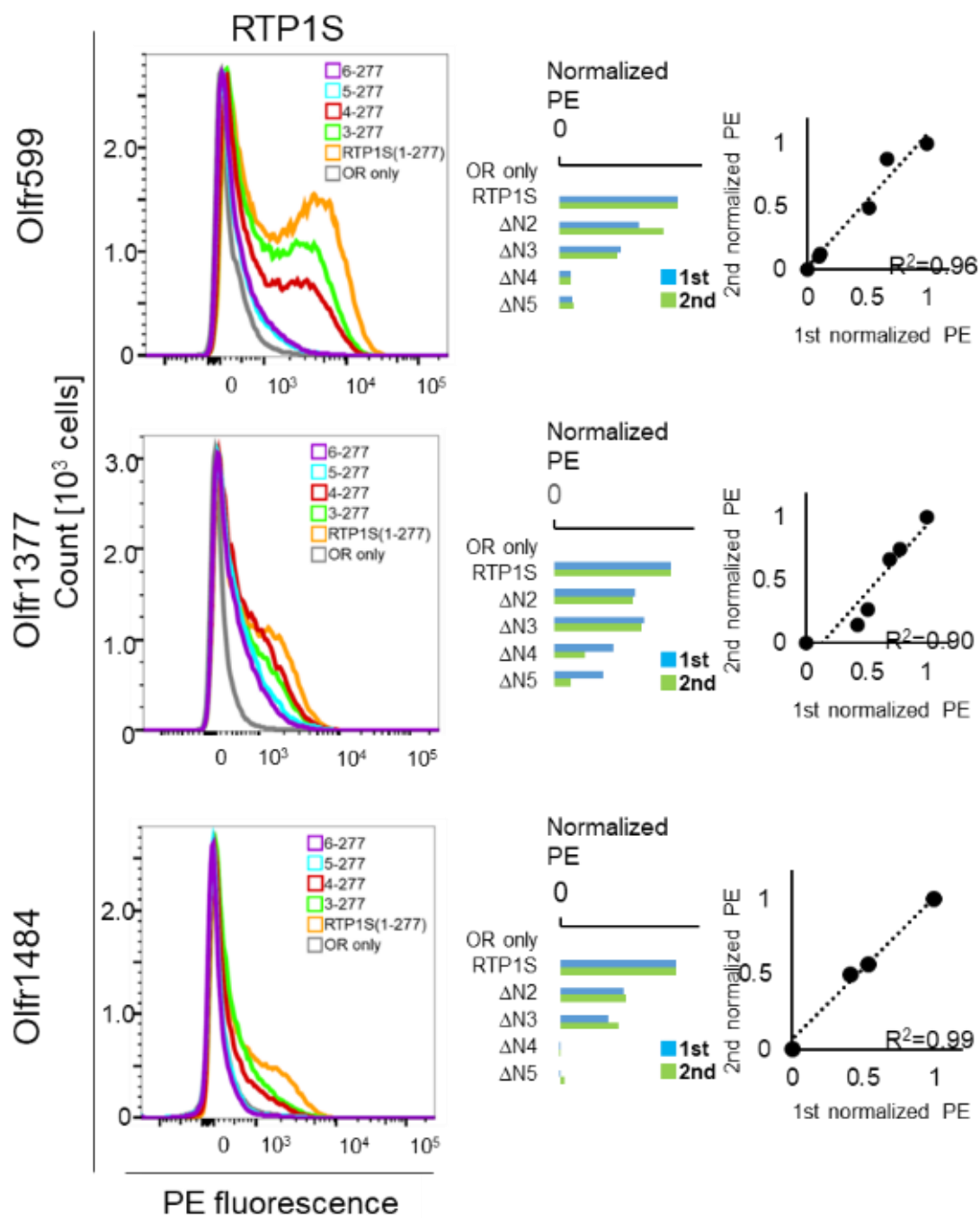


Fig. 3-9 FACS による RTP1S N 末端欠損体共発現時の ORs 細胞膜発現量測定

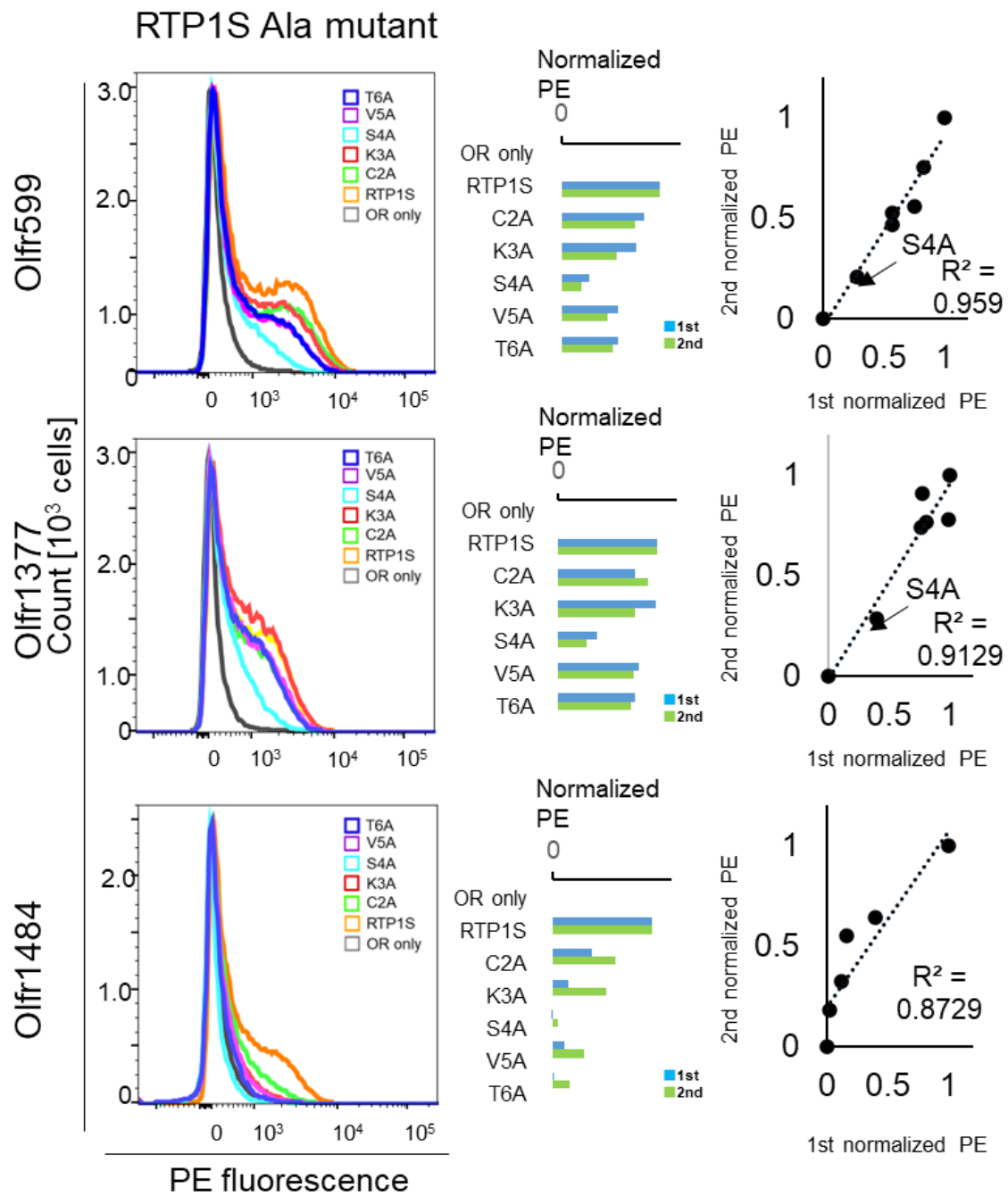
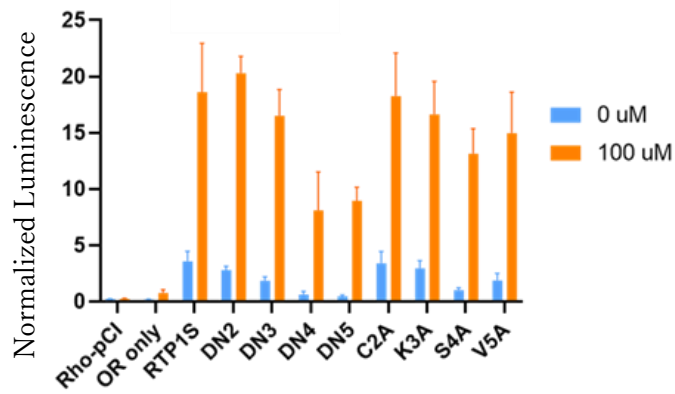
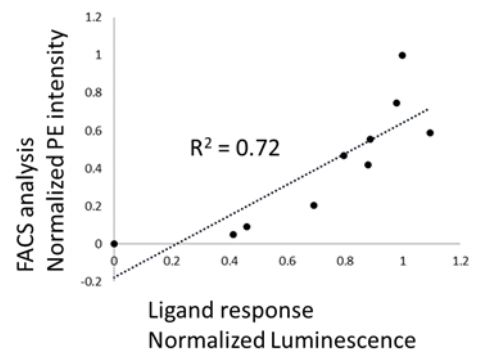


Fig. 3-10 FACS による RTP1S N 末端アラニン置換体共発現時の ORs 細胞膜発現量測定

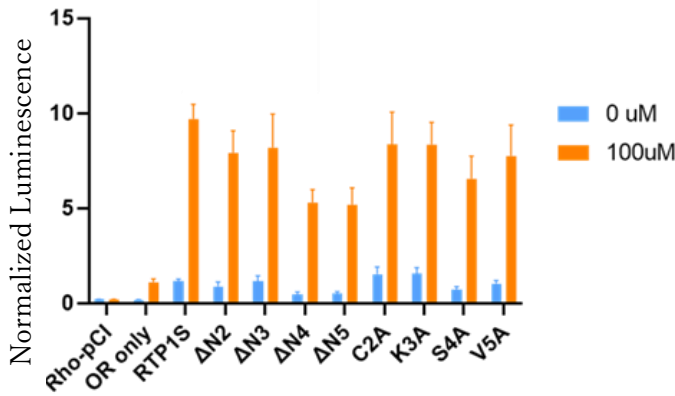
(A)



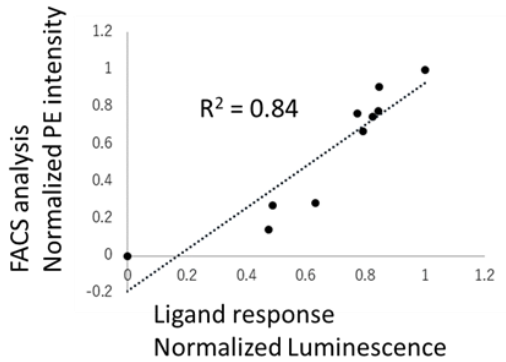
(B)



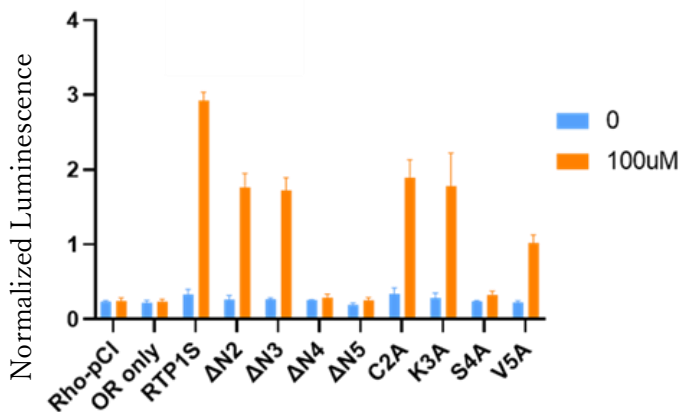
(C)



(D)



(E)



(F)

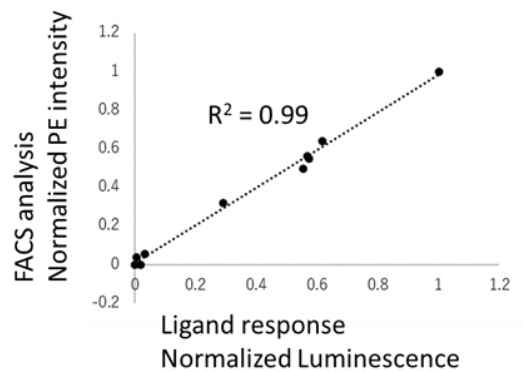


Fig. 3-11 Dual-Glo Luciferase assay による RTP1S N 末端変異体共発現時の OR のリガンド応答と膜発現量との相関 (A, B)Olfr599 (C, D)Olfr1377 (E, F)Olfr1484

3-2-5 OR 輸送機能に重要なシステインの特定

2 残基目システインが二量体形成に重要であったことを受けて、RTP1S 配列中の他のシステインも構造あるいは機能への影響を有しているかを調べるために、配列中に存在するシステイン 11 残基についてセリンへの変異体を作製し、機能測定を行った。システイン単変異の 11 種に加え、CXXC モチーフ(N 末端側から順に 1CXXC、2CXXC、3CXXC、4CXXC とする)を 2 残基変異(CXXC→SXXS)させた 4 種、合わせて 15 変異体について実施した。

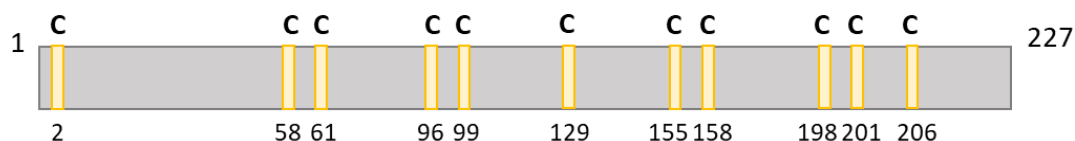


Fig. 3-12 RTP1S 中のシステイン

58、96、99、158 または 206 番目のシステインを単独で置換した変異体共発現時に Olfr599 のリガンド応答が大きく低下することが確認された。また、1CXXC、2CXXC、3CXXC で 2 残基変異させた変異体 (SXXS 変異体)でもリガンド応答は減少した。

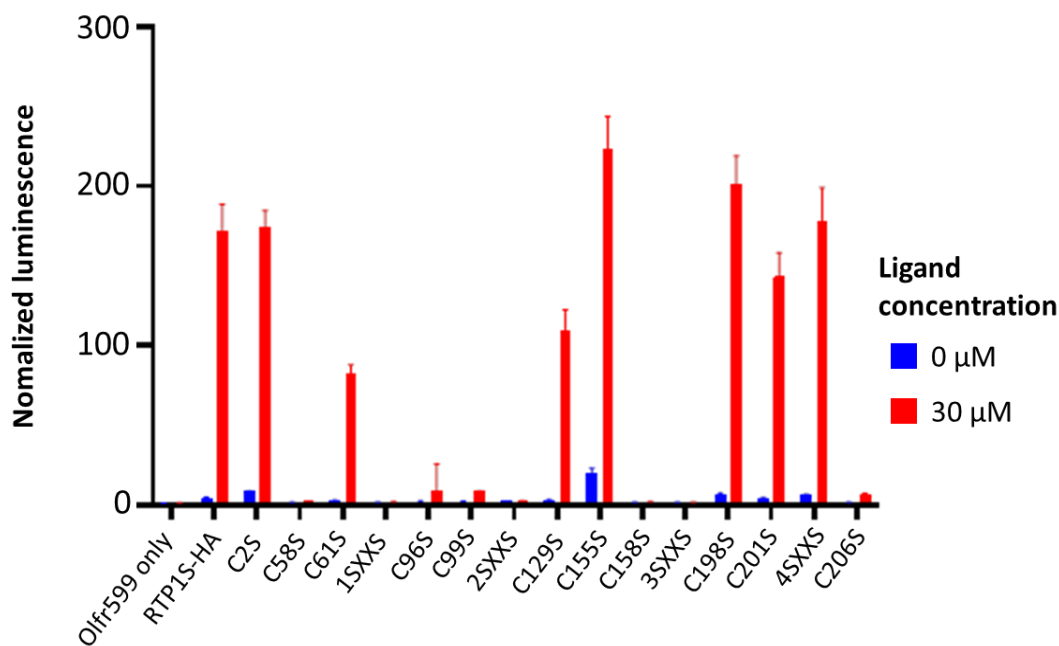


Fig. 3-13 RTP1S CS 変異体共発現時の Olfr599 のリガンド応答

これらの CS 変異体について細胞内発現を細胞ライセートで、OR との相互作用を共免疫沈降法により検出した。免疫沈降用抗体には抗 Rho 抗体(Anti-Rhodopsin, clone 4D2 (mouse monoclonal), Millipore)を用いた。C58S と C206S 変異体は発現が喪失していることが確認され、一方で、他の CS 変異体は発現量に差こそ生じたものの、OR との相互作用は維持していることが確認された。このことから、C58 と C206 が RTP1S 自体の発現あるいは構造維持に重要であること、C96、C99、C158 が OR 輸送機能において重要であることが示唆された。

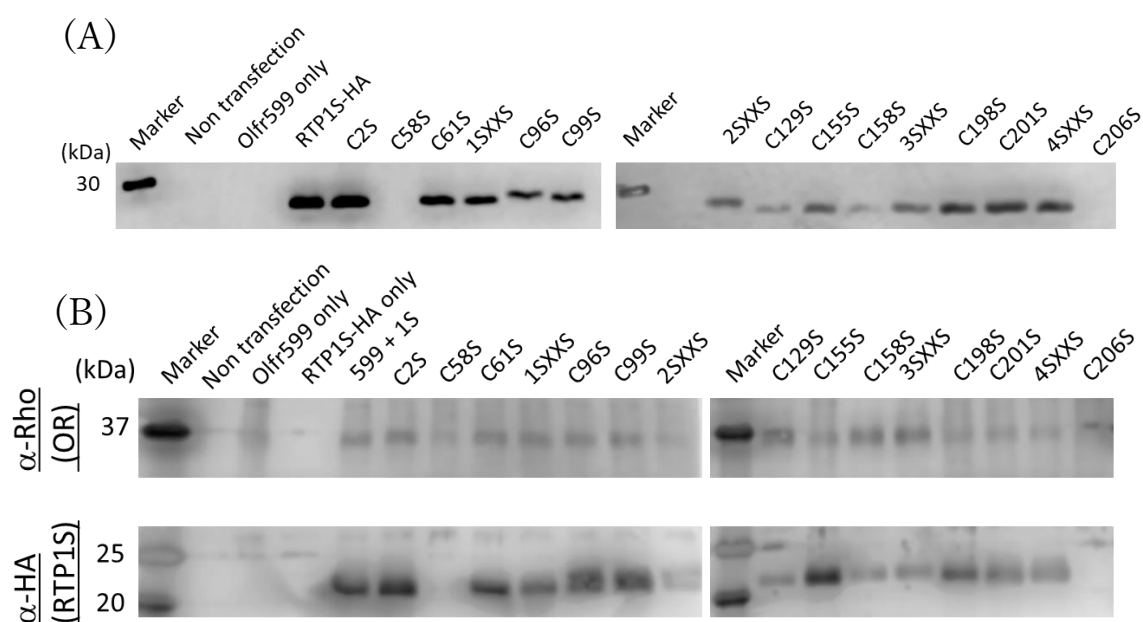


Fig. 3-13 ウェスタンブロット (A) RTP1S CS 変異体を発現させた全細胞ライセートを α -HA antibody で反応させ検出 (B) 全細胞ライセートに対し α -Rho 抗体で免疫沈降を施し、得られた精製物を α -Rho 抗体(上)または α -HA 抗体(下)で反応させ検出

3-2-6 亜鉛結合性モチーフが予測される

ここまでの研究で RTP1S 中のシステインが構造あるいは機能に重要であることが判明した。そこで Pfam によるモチーフ検索を実施したところ、亜鉛結合性モチーフである Zf-3CXXC モチーフが存在することが予測された。加えて、先行研究者の実験においても、精製 RTP1S が亜鉛イオンを含んでいることが示唆されている。

1 MCKSVTTGEWKKVIFYEKMEEVKPADSWDFIIDPNLKHNVL
APGWKQYLELHASGRFHCSCWHTWQSPHVVILFHMVLDK
AQRAGSVRMRVFKQLCYECCGTARLDESSMLEENIESLVDN
LITSLREQCYGERGGHYRIHVASRQDNRRHRGEFCEACQE
GIVHWKPSEKLLLEEATTTYTFSRAPSPKPKQAETGSGCNF
CSIPWCLFWATVLMMLIYLOFSFRTSV* 227

Fig. 3-14 RTP1S のアミノ酸配列. Pfam で Zf-3CXXC モチーフと判定された領域を黄色で示している。

そこで、RTP1S 構造中でシステインがどのような配置になっているか、AlphaFold を用いた立体構造予測から観察した。

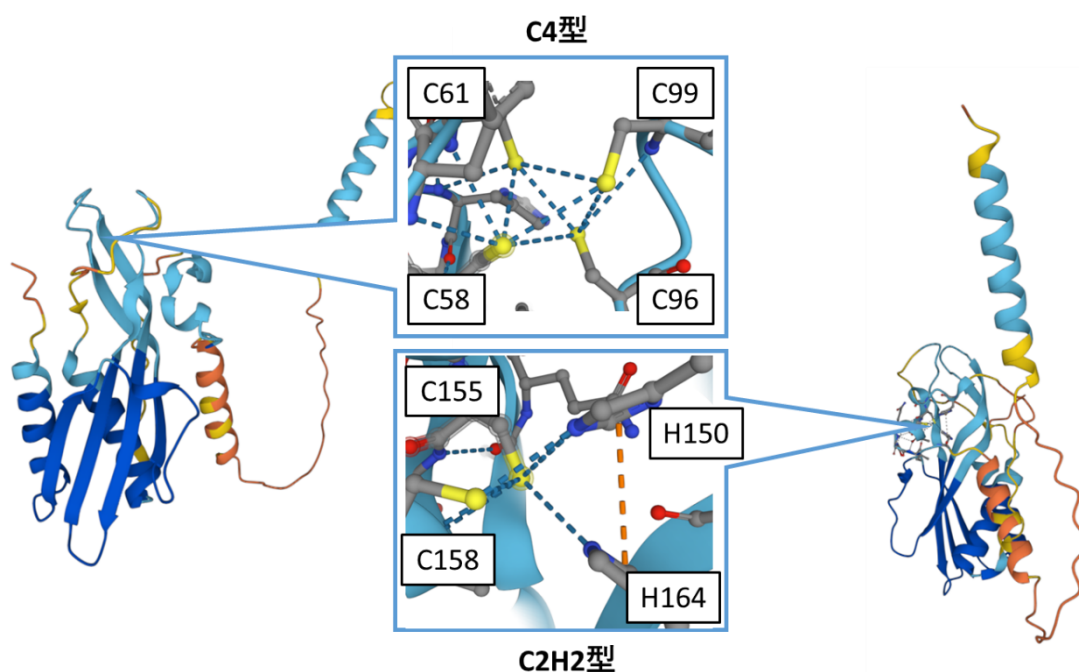


Fig. 3-15 AlphaFold による RTP1S 予測立体構造.

予測立体構造モデルから、2つの領域で亜鉛結合様の構造が確認された。1つは C58、C61、C96、C99 の4つのシステイン(C4型)から構成される領域である。四面体様の配置が予想され、中心への亜鉛イオン配位が考えられる。2つ目は C155、C158 の2つのシステインと H150、H164 の2つのヒスチジン(C2H2型)から構成される四面体配置であり、同様に中心への亜鉛イオン配位が考えられる。これらはジンクフィンガーモチーフで多く見られる構造であり、特に C2H2型は代表的な DNA 結合モチーフとして知られている。

これまでの結果と併せて、ジンクフィンガーが RTP1S の構造維持あるいは OR 輸送機能に関与している可能性が示され、さらに RTP1S の未知機能として核酸結合能を有している可能性が浮上した。

3-3 小括

RTP1S の配列において、N 末端領域に存在するホモダイマー形成あるいは ORs 輸送能に重要な役割を有するアミノ酸残基の特定を試みた。精製 RTP1S 変異体の分子量測定と、NanoBiT による RTP1S 同士の細胞内相互作用測定から、RTP1S の N 末端 2 残基目に存在するシステインが RTP1S ホモダイマー形成に重要な役割を担うことが示された。一方で、FACS による RTP1S N 末端変異体の ORs 輸送能測定の結果から、このシステインが欠損しても ORs 輸送能は消失することではなく、RTP1S のホモダイマー形成はその機能に必ずしも必要ではないことが示唆された。対して、4 残基目のセリンが ORs 輸送にクリティカルに影響することが判明し、同様の傾向がリガンド応答測定においても確認された。

ホモダイマー形成にシステインが重要であったことから、他のシステイン残基も RTP1S の構造あるいは機能に関与している可能性を考えた。配列中各システインの RTP1S 機能への影響を調査するため、システインをセリンに置換した CS 変異体を作製し輸送能をリガンド応答測定で観察したところ、58、96、99、158、206 番目のシステインを変異させたときリガンド応答が大きく失われることが判明した。これらの変異体のうち、C58S、C206S 変異体は RTP1S の発現が失われることがウェスタンブロットで確認されたが、C96S、C99S、C158S 変異体は発現し、OR との相互作用も維持されていることが確認された。このことから、2 残基目システイン以外にも構造機能において重要な役割を担うシステイン残基があることが示された。

Pfam によるモチーフ検索により、RTP1S が亜鉛結合性モチーフである Zf-3CXXC モチーフを有していると予測された。前項でもシステインの重要性が示されていたことから、これらシステインが RTP1S 構造上どこに配置しているかを確認するため、AlphaFold による立体構造予測を実施し各残基の配置を観察した。構造予測の結果、C58、C61、C96、C99 からなる C4 型亜鉛結合性モチーフと C155、C158、H150、H164 からなる C2H2 型亜鉛結合性モチーフが存在することが予測された。これらはジンクフィンガーを構成する領域として知られており、転写因子等に広く見られる核酸結合モチーフである。これまでの結果を鑑み、亜鉛配位による RTP1S 構造あるいは OR 輸送能の調節、さらに核酸結合機能の可能性が示唆された。

4 章 OR 発現機構関連新規シャペロンタンパク質候補の選出

4-1 緒言

RTP1S は多くの OR の機能的発現を促進することが判明している。しかし、RTP1S 共発現下でも発現が改善しない OR があるだけでなく、RTP2 共発現により RTP1S の効果が促進される OR と一方で抑制される OR が存在するなど、現状では RTP が関連する OR 発現機構には未解明な点が多く残されている。膜発現に至るまでの輸送経路においても、翻訳後の OR および RTP1S がどのようにして小胞膜に挿入され、細胞膜表面への輸送経路に認識されるのかは未解明であり、さらに GPCR mRNA の局所輸送・局所翻訳を伴う膜発現機構の存在も示されるなど、既知 OR シャペロンタンパク質以外の機能的発現関連因子の存在も考慮すべき課題である。4 章では、OR-RTP1S 膜発現機構に参与する未知シャペロンタンパク質の特定に向けて、近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法を用いた OR および RTP1S の相互作用タンパク質候補の網羅的スクリーニングを実施した。

4-2 結果

4-2-1 用いるビオチンリガーゼの選定

BioID を行うにあたり、適切なビオチンリガーゼを選ぶ必要がある。いくつかの文献をもとに精査し、BioID2、TurboID、miniTurbo の3つのビオチンリガーゼを候補とした。BioID2 は *A.aeolicus* 由来のビオチンリガーゼ改変体であり、野生型よりもリガーゼ活性を向上させた変異体である[80]。 *E.coli* 由来のビオチンリガーゼ BirA に比べ DNA 結合ドメインが欠損しているため分子量が小さく目的タンパク質(PoI)自身の活性に与える影響が小さい点、より低濃度のビオチン条件下で十分なりガーゼ活性を示す点などの利点がある。TurboID は BirA に複数のアミノ酸変異を加えることでよりリガーゼ効率を向上させた改変体であり、miniTurbo は同様に BirA に複数のアミノ酸変異を加えたうえでさらに N 末端領域を欠損させた改変体である[81]。

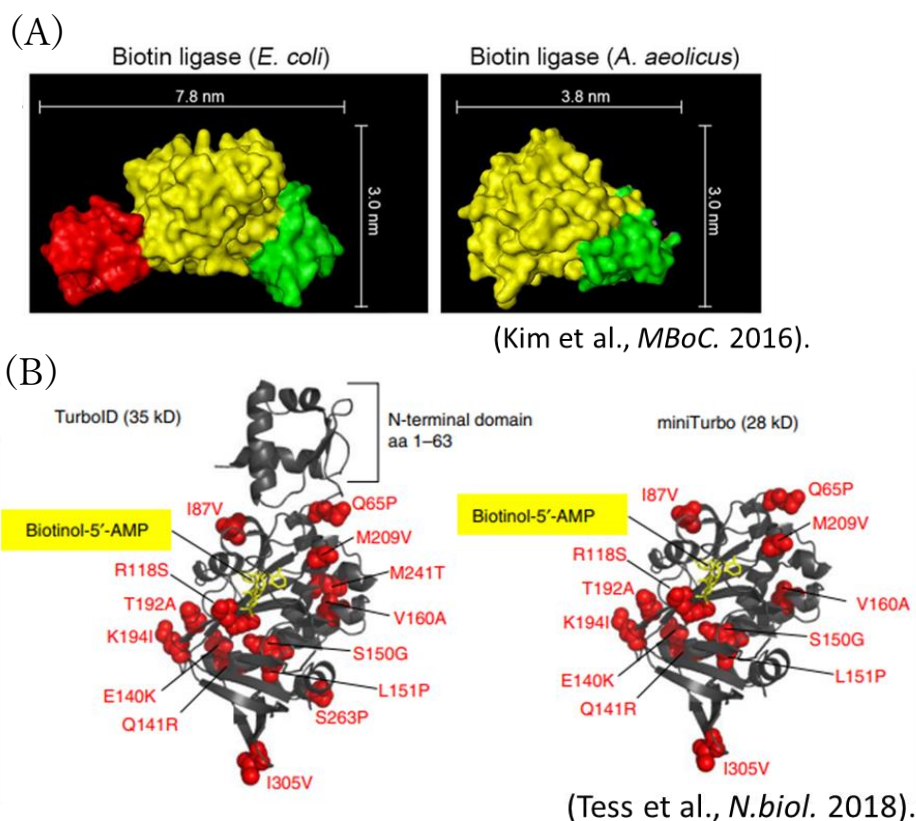


Fig. 4-1 ビオチンリガーゼ (A) *E.coli* 由来ビオチンリガーゼ(左)と *A.aeolicus* 由来ビオチンリガーゼ(右). 赤は DNA 結合ドメイン. 黄は酵素活性部位, 緑は ATP 結合部位である. (B)改良型ビオチンリガーゼ TurboID(左)と miniTurbo(右). 赤字は変異野生型からの変異アミノ酸を表す.

4-2-2 ビオチンリガーゼ融合時の RTP1S の機能観察

3つのビオチンリガーゼの RTP1S 融合体を作製し、RTP1S の OR 輸送能がどのように変化するかを OR のリガンド応答を測定することで観察した。各融合体を以下に示す。

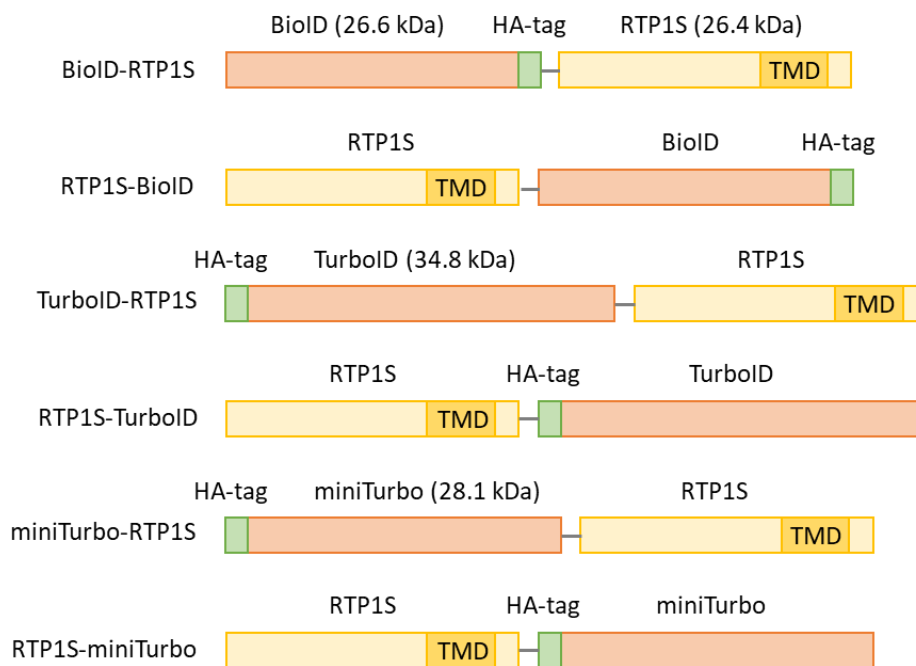


Fig. 4-2 作製したビオチンリガーゼ融合 RTP1S

HEK293T で Olfr544 または Olfr62 を各 RTP1S 融合体と共発現させ、リガンドへの応答を Dual-Glo Luciferase assay で測定した。Olfr544 のリガンドには Azelaic acid を、Olfr62 のリガンドには 2-coumarane を用いた。Olfr544 共発現時では、N 末側にビオチリガーゼを付加した RTP1S 融合体はいずれも OR 輸送能が大きく減少している一方、C 末側融合体は機能の維持が確認された。特に RTP1S-TurboID は低濃度のリガンドに対しても応答を維持していることが判明した。Olfr62 ではすべての融合体で大きく輸送能が減少したが、こちらでも RTP1S-TurboID 発現時に最も高い応答が観察された。この結果から、BioID で用いるビオチンリガーゼには TurboID を用い、RTP1S 融合体には C 末端側に TurboID を付加した RTP1S-TurboID を用いることとした。

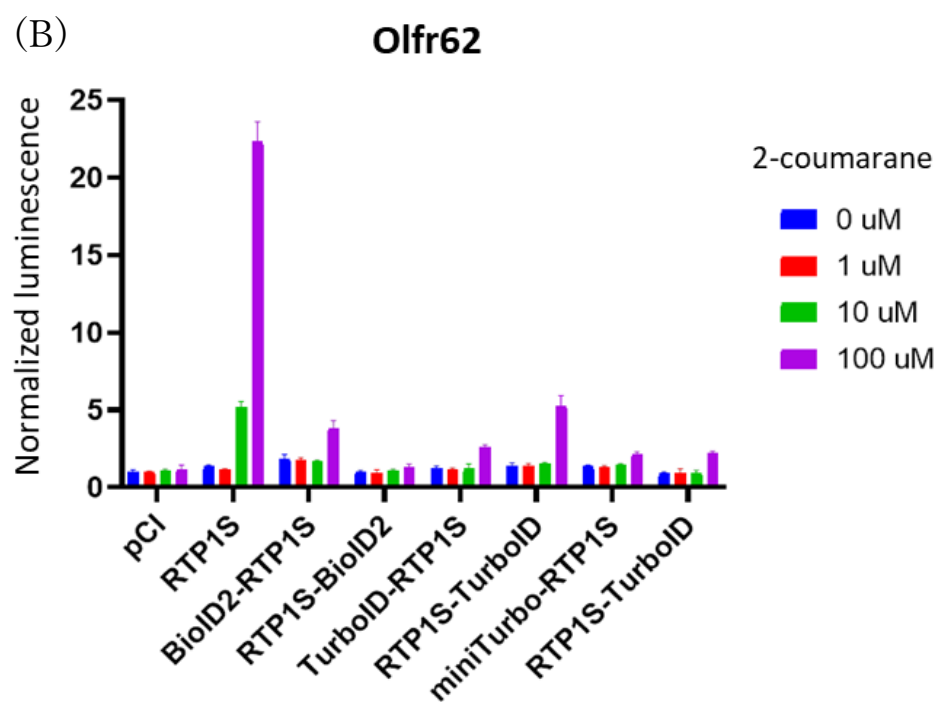
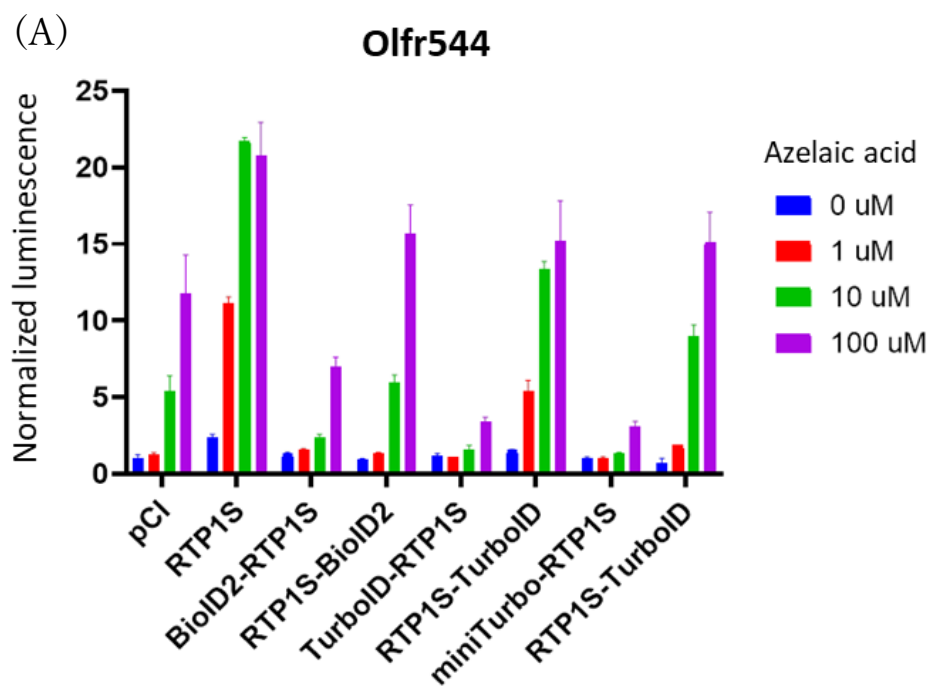


Fig. 4-3 RTP1S-ビオチンリガーゼ融合体共発現時の OR のリガンド応答測定.

(A)Olfr544 (B)Olfr62

4-2-3 TurboID 融合時の OR のリガンド応答測定

続いて、BioID に用いる OR を選定するため、OR に TurboID を付加した融合体を作製し、そのリガンド応答の変化を観察した。OR には Olfr449、Olfr539、Olfr544 を使用した。OR は N 末端をペプチド修飾すると機能が損なわれることが予想されたため、C 末端側へのビオチンリガーゼ融合体のみ作製した。以下に示す。

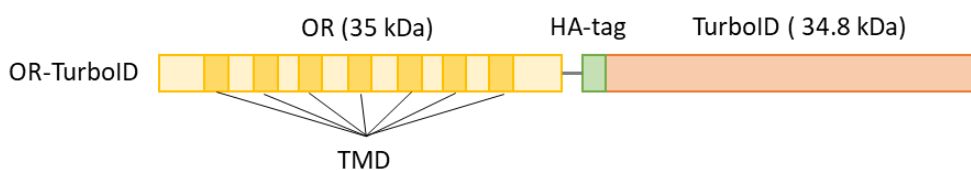
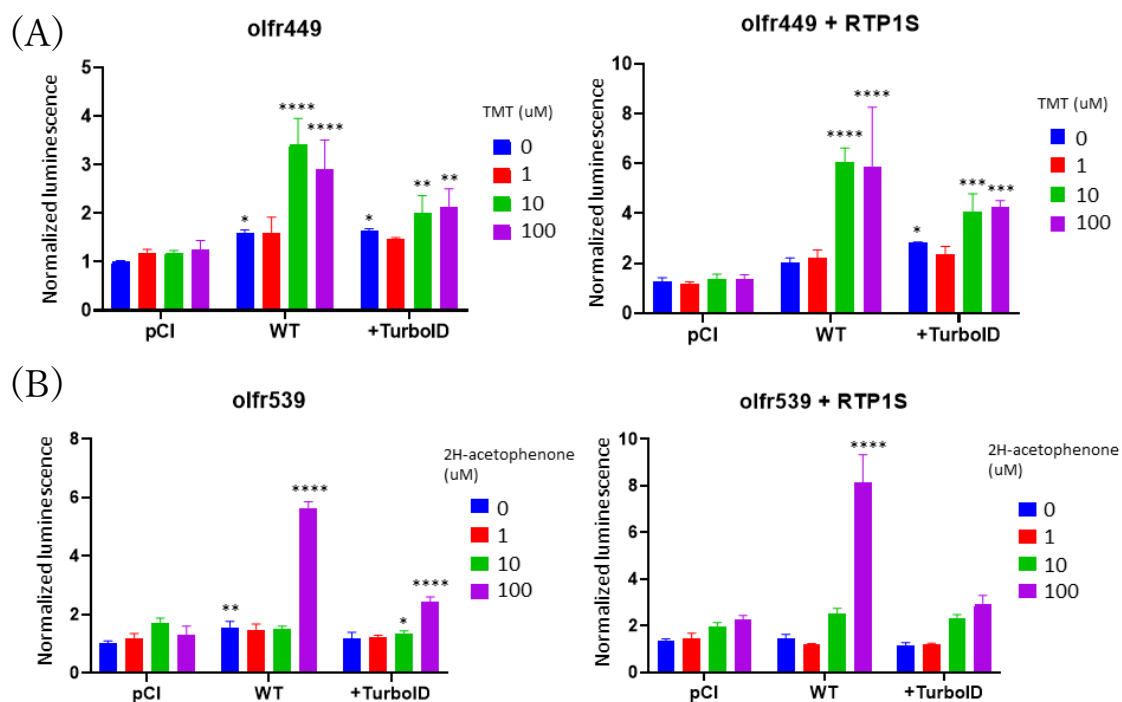


Fig. 4-4 作製したビオチンリガーゼ融合 OR

OR 融合体単独発現時、RTP1S 共発現時でリガンドへの応答を Dual-Glo luciferase assay で測定した。各リガンドは Olfr449 には TMT、olfr539 には 2H-acetophenone、Olfr544 には Azelaic acid を用いた。



(C)

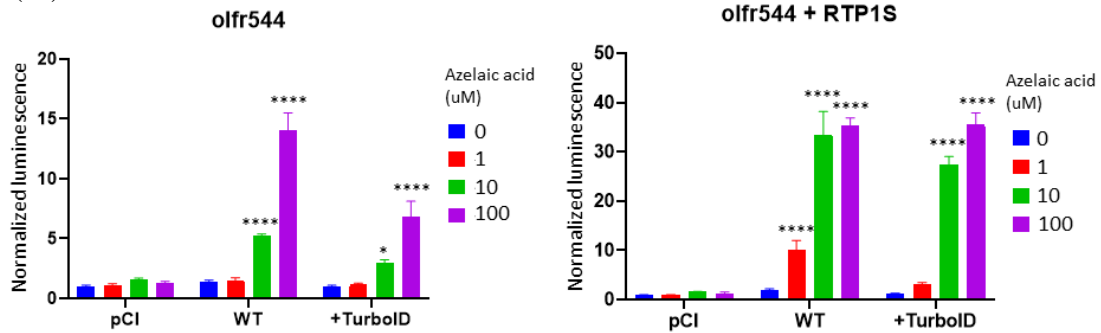


Fig. 4-5 OR-TurboID のリガンド応答測定(A)Olfr449 (B)Olfr539 (C)Olfr544. 左は OR 単独発現時、右は RTP1S 共発現時の測定結果である. 各リガンド濃度において、ネガティブコントロール(pCI)の Normalized luminescence との差を Dunnett 法により検定している (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

単独発現 OR-TurboID はいずれも野生型に比べリガンドへの応答が低下し、RTP1S 共発現条件下においても Olfr449-TurboID、Olfr539-TurboID は応答が低下した。Olfr544-TurboID は 10 μ M までは応答が低下していたが、100 μ M では野生型と同等の応答を示した。応答の強さを鑑み、Olfr544 を BioID に用いる OR とした。

4-2-4 膜内/膜外コントロール融合タンパク質の作製

RTP1S と OR は膜タンパク質であり、作製した TurboID 融合体は以下の図に示すように TurboID を細胞膜外あるいは細胞膜内に露出させることが予測される。

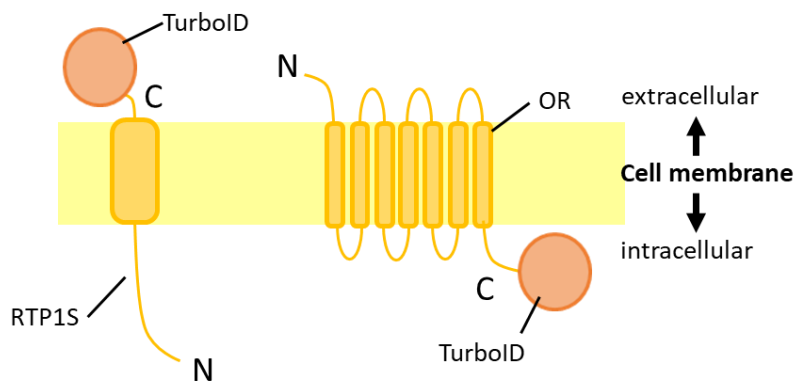


Fig. 4-6 TurboID 融合体の立体配置図. RTP1S-TurboID は細胞外に, Olfr544-TurboID は細胞内に酵素を露出させることが予測される.

そこで、TurboID 融合細胞膜タンパク質のコントロールとして、細胞膜外あるいは細胞膜内に TurboID を露出させる融合体を作製した。

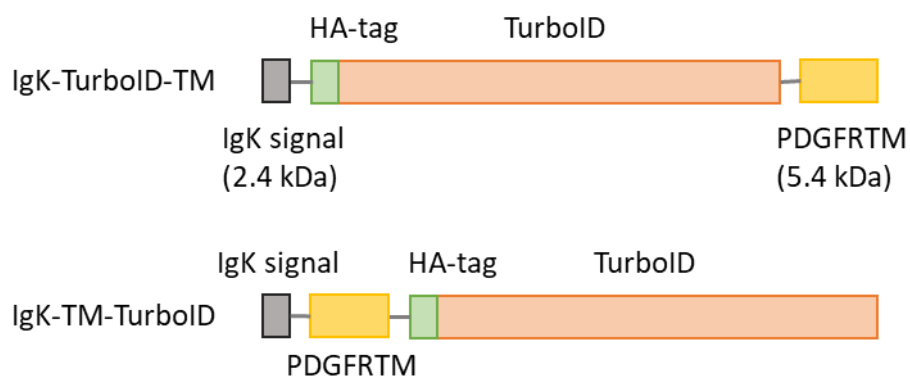


Fig. 4-7 TurboID 融合細胞膜局在コントロール

細胞膜への輸送および膜表面局在のため、pDisplay™ Mammalian Expression Vector (Invitrogen)から IgK 配列と PDGFRTM 配列をクローニングし、TurboID が上図の配置になるよう chimeric PCR でクローニングして pCI に導入した。IgK は分泌シグナルペプチド、PDGFRTM は一回膜貫通タンパク質で

ある血小板由来成長因子受容体(platelet-derived growth factor receptor; PDGFR)の膜貫通領域である。IgK-TurboID-TM は細胞膜外に、IgK-TM-TurboID は細胞内に TurboID を配置する設計となっている。

4-2-5 融合体のビオチン化活性の観察

作製した TurboID 融合体について、ビオチンリガーゼ活性を観察した。HEK293T に TurboID 融合体を形質転換し、50 μM ビオチンを含む培地で 24 時間培養した。RIPA で調製した全細胞ライセート中のビオチン化タンパク質をウェスタンブロットで検出した。なお、3xHA-NLS-TurboID はビオチン化活性ポジティブとして用いたコントロールタンパク質であり、各局在シグナルペプチド(Nuclear localization signal)が付加された TurboID である。

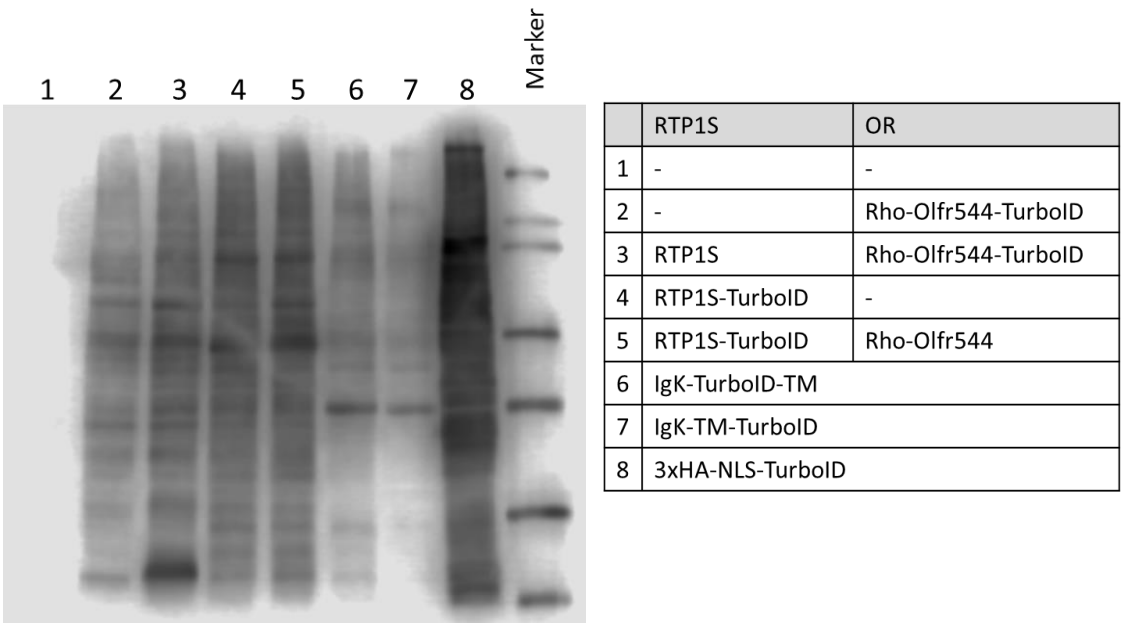


Fig. 4-8 ウェスタンブロットによる全細胞ライセート中のビオチン化タンパク質検出

結果、TurboID 融合タンパク質発現細胞ではビオチン化タンパク質が検出され、融合体 TurboID がビオチン化活性を維持していることが確認された。

4-2-6 TurboID による BioID

PoI-TurboID が PoI としての機能とビオチンリガーゼとしての機能を共に維持していることが確認されたため、続いてこれらを用いて BioID による PoI 周辺タンパク質の同定を行った。HEK293T に PoI-TurboID を導入し、24 時間培養後さらに 500 μ M ビオチンを含む M10 培地で 2 時間培養した。調製した細胞ライセートに対して StreptAvidin ビーズを用いてビオチン化タンパク質を分離し、さらに変性、アルキル化、ペプチド消化および脱塩を通して得られたペプチド断片を LC-MS/MS 解析して、タンパク質の同定ならびにリスト化を行った。解析したサンプルを以下に示す。

| No. | PoI-TurboID | Co-expressed | 検出数 |
|-----|-----------------|--------------|-----|
| S1 | Non expression | | - |
| S2 | Olfr544-TurboID | | 748 |
| S3 | RTP1S-TurboID | | 674 |
| S4 | Olfr544-TurboID | RTP1S | 751 |
| S5 | RTP1S-TurboID | Olfr544 | 679 |
| S6 | NLS-TurboID | | 698 |
| S7 | IgK-TurboID-TM | | 673 |
| S8 | IgK-TM-TurboID | | 743 |

各条件での「検出数」は、得られたリスト (Fig. 4-9) において以下の条件を満たすタンパク質の数である。なお、当時の解析仕様上、Non expression サンプルの検出数は得られていない。

1. Protein FDR Confidence Combined = “High”
2. Master = “IsMasterProtein”
3. Contaminant = “FALSE”
4. Number of Peptides \geq 2
5. Abundance Group $>$ 0

| | C | D | F | H | K | L | M | Y | AG | AH | AI | AK | AL | AN | BG | BI | BJ | BK | BN | BO | BP | BQ | BR |
|-----|---------------------------------------|--------------|---|----------------|--------------------------|----------------------|---------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----|
| | Protein FDR Confidence Combined | Master | Description | Contaminant of | Number of Peptides | Number of PSMs | Number of Unique Peptides | Gene Symbol | Abundan ce s1 | Abundan ce s1 | Abundan ce s1 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | Abundan ce Ratio s1 s7 | |
| 1 | High | IsMasterProt | Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HSPA6 | FALSE | 10 | 244 | 1 | HSPA6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| 10 | High | IsMasterProt | Eukaryotic initiation factor 4A-II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4A2 | FALSE | 8 | 73 | 1 | EIF4A2 | 0.01 | 1.543 | 0.01 | 1.543 | 0.01 | 1.543 | 0.01 | 1.543 | 0.01 | 1.543 | 0.01 | 1.543 | 0.01 | 1.543 | |
| 15 | High | IsMasterProt | DNA replication licensing factor MCM4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCM4 | FALSE | 2 | 3 | 2 | MCM4 | 0.01 | 1.224 | 0.01 | 1.224 | 0.01 | 1.224 | 0.01 | 1.224 | 0.01 | 1.224 | 0.01 | 1.224 | 0.01 | 1.224 | |
| 22 | High | IsMasterProt | Ras-related protein Rap-1A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAP1A | FALSE | 4 | 20 | 1 | RAP1A | 0.01 | 1.093 | 0.01 | 1.093 | 0.01 | 1.093 | 0.01 | 1.093 | 0.01 | 1.093 | 0.01 | 1.093 | 0.01 | 1.093 | |
| 26 | High | IsMasterProt | Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GDID1 | FALSE | 5 | 35 | 1 | GDID1 | 0.01 | 0.895 | 0.01 | 0.895 | 0.01 | 0.895 | 0.01 | 0.895 | 0.01 | 0.895 | 0.01 | 0.895 | 0.01 | 0.895 | |
| 29 | High | IsMasterProt | Purified beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB | FALSE | 5 | 256 | 1 | POTEK1 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| 37 | High | IsMasterProt | NUP2-like protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NUP2 | FALSE | 2 | 4 | 2 | NUP2L1 | 0.281 | 0.987 | 0.281 | 0.987 | 0.281 | 0.987 | 0.281 | 0.987 | 0.281 | 0.987 | 0.281 | 0.987 | 0.281 | 0.987 | |
| 42 | High | IsMasterProt | Tubulin-tyrosine ligase-like protein 12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTLL12 | FALSE | 2 | 2 | 2 | TTLL12 | 1.137 | 1.194 | 1.137 | 1.194 | 1.137 | 1.194 | 1.137 | 1.194 | 1.137 | 1.194 | 1.137 | 1.194 | 1.137 | 1.194 | |
| 44 | High | IsMasterProt | Cyclin-dependent-like kinase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDKL3 | FALSE | 2 | 6 | 1 | CDKL3 | 0.152 | 0.47 | 0.152 | 0.47 | 0.152 | 0.47 | 0.152 | 0.47 | 0.152 | 0.47 | 0.152 | 0.47 | 0.152 | 0.47 | |
| 45 | High | IsMasterProt | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANP32A | FALSE | 2 | 4 | 1 | ANP32A | 0.408 | 1.171 | 0.408 | 1.171 | 0.408 | 1.171 | 0.408 | 1.171 | 0.408 | 1.171 | 0.408 | 1.171 | 0.408 | 1.171 | |
| 48 | High | IsMasterProt | Histone-binding protein RBBP7 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RBBP7 | FALSE | 2 | 14 | 2 | RBBP7 | 0.438 | 1.186 | 0.438 | 1.186 | 0.438 | 1.186 | 0.438 | 1.186 | 0.438 | 1.186 | 0.438 | 1.186 | 0.438 | 1.186 | |
| 49 | High | IsMasterProt | Adenosine diphosphate-ribosyltransferase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADPRT3 | FALSE | 5 | 28 | 1 | ADPRT3 | 0.419 | 1.016 | 0.419 | 1.016 | 0.419 | 1.016 | 0.419 | 1.016 | 0.419 | 1.016 | 0.419 | 1.016 | 0.419 | 1.016 | |
| 56 | High | IsMasterProt | 40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PSL1 | FALSE | 4 | 26 | 4 | PSL1 | 0.558 | 1.552 | 0.558 | 1.552 | 0.558 | 1.552 | 0.558 | 1.552 | 0.558 | 1.552 | 0.558 | 1.552 | 0.558 | 1.552 | |
| 57 | High | IsMasterProt | Elongin-C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ELC | FALSE | 2 | 13 | 2 | ELC | 0.395 | 0.805 | 0.395 | 0.805 | 0.395 | 0.805 | 0.395 | 0.805 | 0.395 | 0.805 | 0.395 | 0.805 | 0.395 | 0.805 | |
| 58 | High | IsMasterProt | Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MDH2 | FALSE | 10 | 79 | 10 | MDH2 | 0.487 | 1.122 | 0.487 | 1.122 | 0.487 | 1.122 | 0.487 | 1.122 | 0.487 | 1.122 | 0.487 | 1.122 | 0.487 | 1.122 | |
| 59 | High | IsMasterProt | Aspartate aminotransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PFKP1 | FALSE | 2 | 7 | 2 | GOT2 | 1.207 | 0.914 | 1.207 | 0.914 | 1.207 | 0.914 | 1.207 | 0.914 | 1.207 | 0.914 | 1.207 | 0.914 | 1.207 | 0.914 | |
| 60 | High | IsMasterProt | Ataxin-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATXN10 | FALSE | 2 | 3 | 2 | ATXN10 | 0.477 | 1.019 | 0.477 | 1.019 | 0.477 | 1.019 | 0.477 | 1.019 | 0.477 | 1.019 | 0.477 | 1.019 | 0.477 | 1.019 | |
| 67 | High | IsMasterProt | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF3 | FALSE | 2 | 26 | 2 | EIF3 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | |
| 69 | High | IsMasterProt | Chloride intracellular channel protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLIC4 | FALSE | 2 | 8 | 2 | CLIC4 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | 0.6 | 1.229 | |
| 71 | High | IsMasterProt | Receptor-transporting protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRP1 | FALSE | 2 | 210 | 5 | TRP1 | 0.319 | 0.696 | 0.319 | 0.696 | 0.319 | 0.696 | 0.319 | 0.696 | 0.319 | 0.696 | 0.319 | 0.696 | 0.319 | 0.696 | |
| 72 | High | IsMasterProt | Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CKB | FALSE | 5 | 23 | 5 | CKB | 0.383 | 0.825 | 0.383 | 0.825 | 0.383 | 0.825 | 0.383 | 0.825 | 0.383 | 0.825 | 0.383 | 0.825 | 0.383 | 0.825 | |
| 81 | High | IsMasterProt | Putative protein FAM104A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FAM104A | FALSE | 10 | 107 | 10 | FAM104A | 0.514 | 0.886 | 0.514 | 0.886 | 0.514 | 0.886 | 0.514 | 0.886 | 0.514 | 0.886 | 0.514 | 0.886 | 0.514 | 0.886 | |
| 86 | High | IsMasterProt | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF5A1 | FALSE | 2 | 4 | 2 | EIF5A1 | 0.787 | 1.523 | 0.787 | 1.523 | 0.787 | 1.523 | 0.787 | 1.523 | 0.787 | 1.523 | 0.787 | 1.523 | 0.787 | 1.523 | |
| 92 | High | IsMasterProt | Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PEP1 | FALSE | 2 | 10 | 2 | PEP1 | 0.679 | 1.11 | 0.679 | 1.11 | 0.679 | 1.11 | 0.679 | 1.11 | 0.679 | 1.11 | 0.679 | 1.11 | 0.679 | 1.11 | |
| 103 | High | IsMasterProt | Phosphoglucomutase-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGM1 | FALSE | 4 | 17 | 4 | PGM1 | 0.604 | 1.166 | 0.604 | 1.166 | 0.604 | 1.166 | 0.604 | 1.166 | 0.604 | 1.166 | 0.604 | 1.166 | 0.604 | 1.166 | |
| 108 | High | IsMasterProt | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAND1 | FALSE | 5 | 16 | 5 | CAND1 | 0.688 | 1.302 | 0.688 | 1.302 | 0.688 | 1.302 | 0.688 | 1.302 | 0.688 | 1.302 | 0.688 | 1.302 | 0.688 | 1.302 | |
| 116 | High | IsMasterProt | NF-kappa-B-activating protein 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NKAP5 | FALSE | 2 | 12 | 2 | USP5 | 0.407 | 0.814 | 0.407 | 0.814 | 0.407 | 0.814 | 0.407 | 0.814 | 0.407 | 0.814 | 0.407 | 0.814 | 0.407 | 0.814 | |
| 121 | High | IsMasterProt | Coatomer subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COG8 | FALSE | 2 | 3 | 2 | ARCN1 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | |
| 130 | High | IsMasterProt | Coatomer subunit delta OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COG8 | FALSE | 2 | 5 | 2 | ARCN1 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | 0.735 | 1.311 | |

Fig. 4-9 得られたタンパク質のリストの形式。

PoI-TurboID 発現条件下で約 700 種のタンパク質が検出された。この検出タンパク質の中で、Olfr544-TurboID と RTP1S 共発現時(S4)に Olfr544-TurboID 単独発現時(S2)と比べ検出量が増加するもの(Abundance Ratio S4/S2 ≥ 2 を閾値とした)は 34 種、RTP1S-TurboID と Olfr544 共発現時(S5)に RTP1S-TurboID 単独発現時(S3)と比べ検出量が増加するもの(Abundance Ratio S5/S3 ≥ 2)は 45 種であった。さらに、AdjustedP-value が $P < 0.05$ のものに絞ると、前者は 23 種、後者は 9 種であった。また、Olfr544-TurboID と RTP1S 共発現時にのみ検出されたタンパク質(Abundance Ratio S4/S1 = 100 かつ Abundance Ratio S4/S2 = 100 かつ Abundance Ratio S4/S8 = 100)に Fermitin family homolog 2 が、RTP1S-TurboID と Olfr544 共発現時にのみ検出されたタンパク質(Abundance Ratio S5/S1 = 100 かつ Abundance Ratio S5/S3 = 100 かつ Abundance Ratio S5/S7 = 100)に Heat shock 70 kDa protein 6 が挙げられた。

4-2-7 新規ビオチンリガーゼ AirID 付加 RTP1S および OR の機能観察

2 度目の BioID を実施するにあたり、近年新しく設計されたビオチンリガーゼ AirID を取り入れた。AirID は祖先型設計法によりデザインされた酵素である[82]。TurboID に比べビオチン化効率は低いものの、自己ビオチン化を含む非特異的なビオチン化が抑えられており、PPI 解析においてはより優れたビオチンリガーゼであると考えられる。TurboID 使用時と同様に、RTP1S および OR の C 末端側への AirID 融合体を作製し、それぞれの機能が維持されているか観察した。RTP1S-AirID は Olfr544 と、Olfr544-AirID は RTP1S と共発現させ、リガンド応答を測定した。AirID 融合体発現時は減衰するものの、リガンドへの応答が確認された。ビオチンリガーゼ活性測定ではビオチン 500 μM 、反応時間 2 時間ではビオチン化タンパク質があまり確認されなかったため、MS/MS 解析用サンプルはビオチン 50 μM 、反応時間 24 時間の条件を採用した。

4-2-8 RTP1S-OR 共発現時に特異的に検出されるタンパク質

AirID 融合タンパク質を以下の組合せで導入した HEK293T 細胞を 24 時間培養後、さらに 50 μM ビオチン含有培地で 24 時間培養し、タンパク質のビオ

チン化を行った。ライセート調整から LC-MS/MS までは TurboID 使用時と同様に行った。発現の組合せと各条件でのタンパク質検出数を以下に示す。

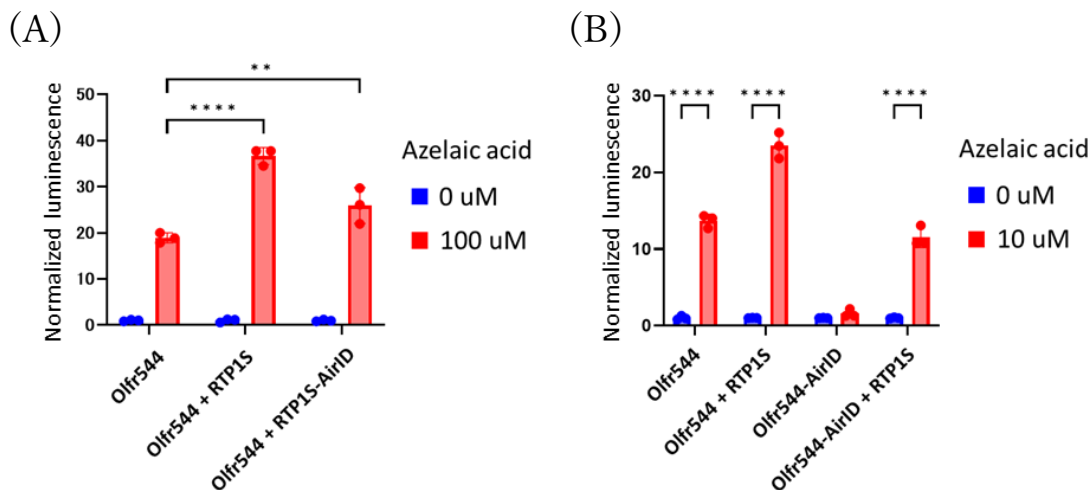


Fig.4-10 Dual-Glo assay による (A)AirID 融合 RTP1S および (B)AirID 融合 Olfr544 の機能測定. Tukey 法による Two-way ANOVA で (A)Azelaic acid 100 μ M における Olfr544 単独発現時との Normalized luminescence の差と (B)Azelaic acid 0 μ M と 10 μ M での Normalized luminescence の差を検定している (** $p < 0.01$. **** $p < 0.0001$).

Olfr544-AirID 単独発現時(S2)と Olfr544-AirID/RTP1S 共発現時(S4)間および RTP1S-AirID 単独発現時(S3)と RTP1S-AirID/Olfr544 共発現時(S5)間における各検出タンパク質の Abundance を Scatter Plot に示す。

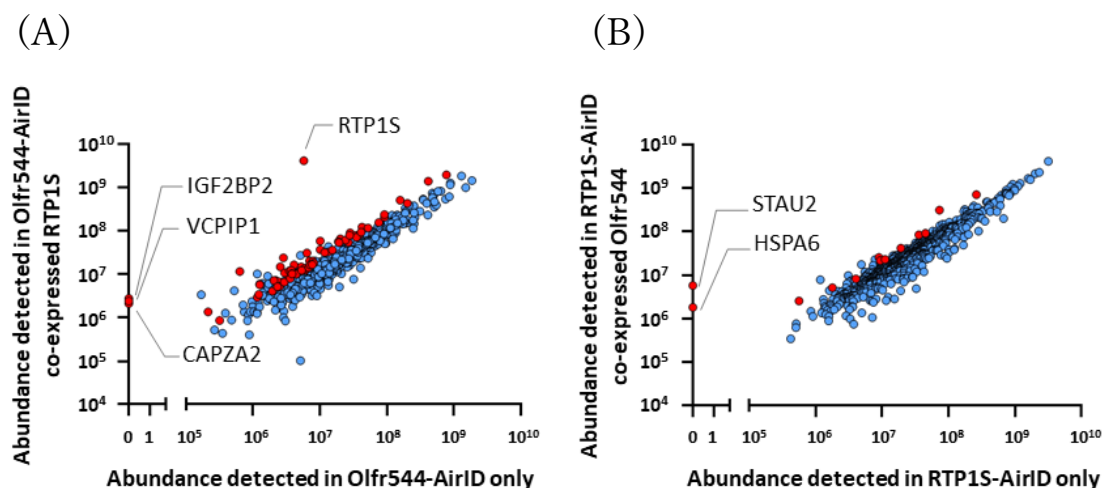


Fig.4-11 AirID 導入 BioID 法による各検出タンパク質の Abundance の Scatter Plot.

(A)S2 と S4 間 (B)S3 と S5 間. 赤丸は OR と RTP1S 共発現時に単独発現時と比べ検出量が増加したタンパク質を示す。

検出タンパク質の中で、Olf544-AirID と RTP1S 共発現時(S4)に Olf544-AirID 単独発現時(S2)と比べ検出量が増加するもの(Abundance Ratio S4/S2 ≥ 2 かつ Adjusted P-value $P < 0.05$)は 67 種、RTP1S-AirID と Olf544 共発現時(S5)に RTP1S-AirID 単独発現時(S3)と比べ検出量が増加するもの(Abundance Ratio S5/S3 ≥ 2 かつ Adjusted P-value $P < 0.05$)は 13 種であった。また、Olf544-AirID と RTP1S 共発現時にのみ検出されたタンパク質(Abundance Ratio S4/S1 = 100 かつ Abundance Ratio S4/S2 = 100)に Deubiquitinating protein VCIP135、 F-actin-capping protein subunit alpha-2、 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 の 3 種が、RTP1S-AirID と Olf544 共発現時にのみ検出されたタンパク質(Abundance Ratio S5/S1 = 100 かつ Abundance Ratio S5/S3 = 100)に Heat shock 70 kDa protein 6 と Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2 が確認された。

4-3 小括

OR 機能的発現機構に関わる新規シャペロンタンパク質を特定するため、BioID 法を用いたスクリーニングを実施した。改変型 BirA の TurboID と、祖先型設計法で作製された AirID をビオチンリガーゼに用いて RTP1S および Olfr544 に付加し、それぞれの条件でビオチン化タンパク質の解析を行った。AirID は TurboID と比べてビオチン化能が低い代わりに特異性が高く設計されているが、本実験において両ビオチンリガーゼとも検出されたタンパク質の数が近いのは、TurboID 使用時と比べ AirID 使用時に培養時間が長かったためであると考えられる。

検出されたタンパク質数は TurboID 使用時、AirID 使用時ともに各サンプルでおおよそ 700 種類前後であった。その中で Olfr544 と RTP1S 共発現時にのみ特異的に検出されたタンパク質として、Olfr544-TurboID と RTP1S 共発現時に Fermitin family homolog 2、RTP1S-TurboID と Olfr544 共発現時に Heat Shock 70 kDa protein 6 (HSPA6)が、Olfr544-AirID と RTP1S 共発現時に Deubiquitinating protein VCIP135、F-actin-capping protein subunit alpha 2、Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein2、RTP1S-AirID と Olfr544 共発現時に HSPA6、Double-stranded RNA-binding protein Staufer homolog 2 (STAU2)が特定された。中でも HSPA6 は RTP1S-TurboID と RTP1S-AirID の両方で特異的検出がなされており、これは HSPA6 が OR と相互作用状態の RTP1S に空間的に近接していることを強く示唆する結果である。

本章の結果から、OR 機能的発現機構において RTP1S と相互作用する新規シャペロンタンパク質の候補として HSPA6 と STAU2 を推定し、機能解析へと進んだ。

5 章 STAU2 と HSPA6 の OR 機能への影響.

5 - 1 緒言

Staufen は当初 *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ) で発見された mRNA 結合性タンパク質であり、胚の発生過程で *bicoid* mRNA や *osker* mRNA の輸送及び局在に関与するタンパク質として同定され[83]、その後に神経節形成にも mRNA の輸送・局在を通して関与することが明らかになった[84, 85]。Staufen ホモログは広範な生物で確認されており、哺乳類では偏在的に発現する Stau1 と脳で豊富に発現する Stau2 が同定されている。哺乳類の Staufen も神経細胞中での RNA 輸送への関与やリボソームへの会合を示すことが明らかになっており[86, 87, 88]、進化の過程で Staufen の機能が保存されていることが示唆されている。

HSPA6 は Heat Shock Protein 70 (HSP70) family に属する分子シャペロンである。HSP70 family は古細菌から哺乳類まで高度に保存された分子シャペロンであり、様々な生理学的ストレスにより発現誘導され、タンパク質のフォールディングを補助する機能を持つ。また、Hsc70 のようにタンパク質輸送系への関与が示されているものもある[89]。中でも Hsc70t はマウスおよびヒトの嗅上皮での発現が確認され、HEK293T 細胞で発現させると OR の発現を促進することが明らかになっている[90]。また、Hsc70 が他の HSP と協調しテイルアンカータンパク質の翻訳後 ER 膜挿入に関与するという知見もあり[91]、HSP70 family の機能は未だ解明されていないものも含めて極めて多岐に渡ると予想される。

4 章から、OR と共発現している RTP1S の空間的近傍に STAU2 と HSPA6 が特異的に存在している可能性が示されたが、実際にこれらが RTP1S-OR 複合体に相互作用し OR の発現機構に関与しているかは定かではない。そこで 5 章では、STAU2 と HSPA6 が OR-RTP1S の細胞膜発現に影響を与えているのか検証し、相互作用の有無についても検討を実施した。

5-2 結果

5-2-1 FACS による ORs の細胞膜発現量への影響評価

STAU2 と HSPA6 はともに human 由来のものを使用した。STAU2 または HSPA6 を OR の 1/3、1/10、1/30 量で HEK293T に導入し、FACS により OR の細胞膜発現量を測定した(Figs. 5-1, 5-2, 5-3)。Olfr544 では、STAU2 と HSPA6 共に共発現時 50 ~ 80 %ほど発現量が増加した。この傾向は、RTP1S 非共発現、共発現時の両方で観察された。一方で、Olfr599、Olfr1484 では発現量に大きな変化は見られなかった。OR 間で見られる膜輸送被促進の差がどのような機序で生じるかは不明だが、①STAU2 および HSPA6 は Olfr544 のみに促進機能を発揮する ②Olfr544 は RTP1S 半依存的、Olfr599 と Olfr1484 は RTP1S 依存的であることから、RTP1S による膜発現促進への依存傾向により STAU2 および HSPA6 の促進機能も変化する ③RTP1S の発現促進機構以外にも OR の膜発現を決定する機構があり、STAU2 と HSPA6 はその機構中で機能している 等いくつかの可能性が考えられる。

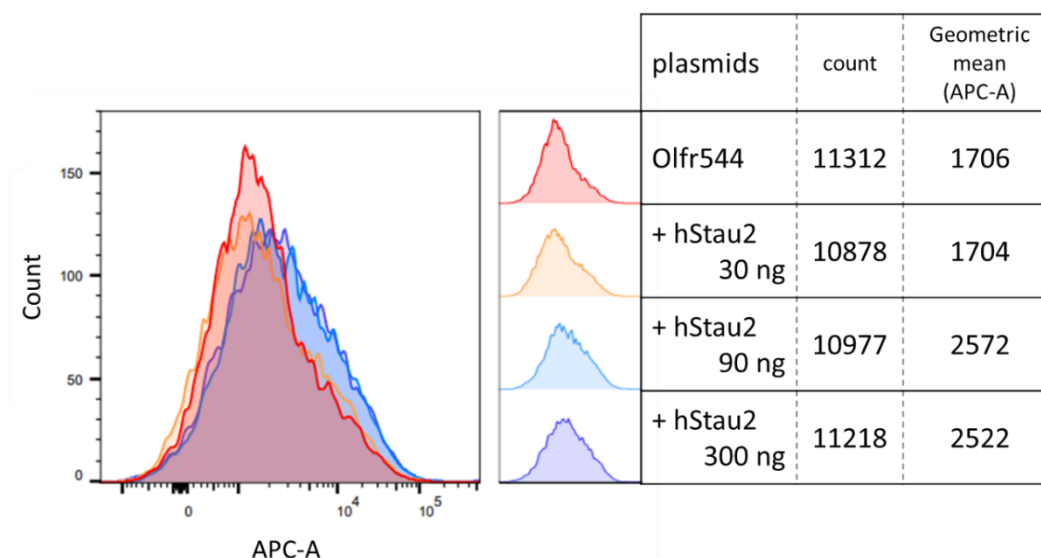


Fig. 5-1 FACS による STAU2 または HSPA6 共発現時の Olfr544 細胞膜発現量測定 (次頁に続く).

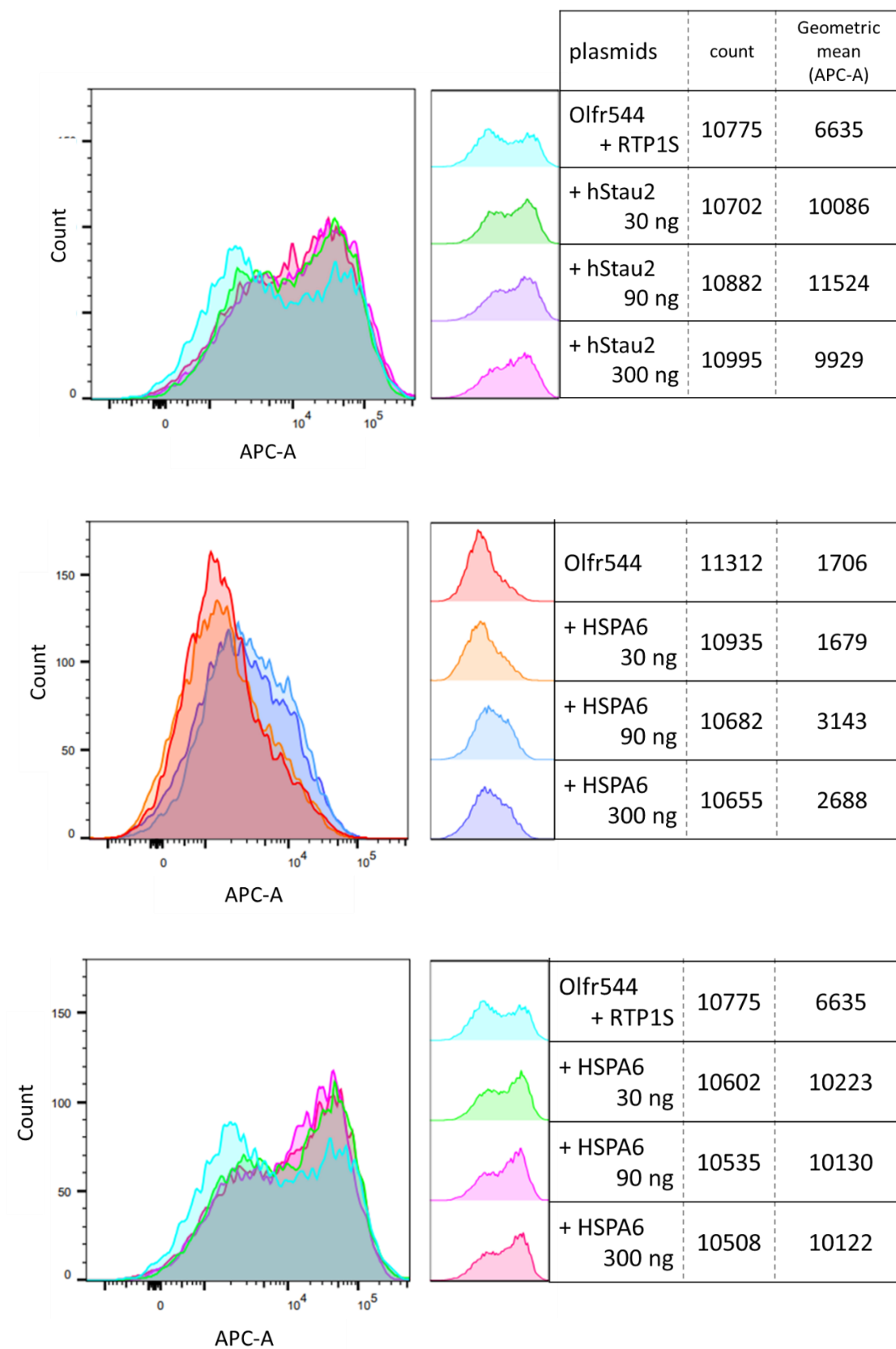


Fig. 5-1 FACS による STAU2 または HSPA6 共発現時の Olfr544 細胞膜発現量測定 (前頁から続く).

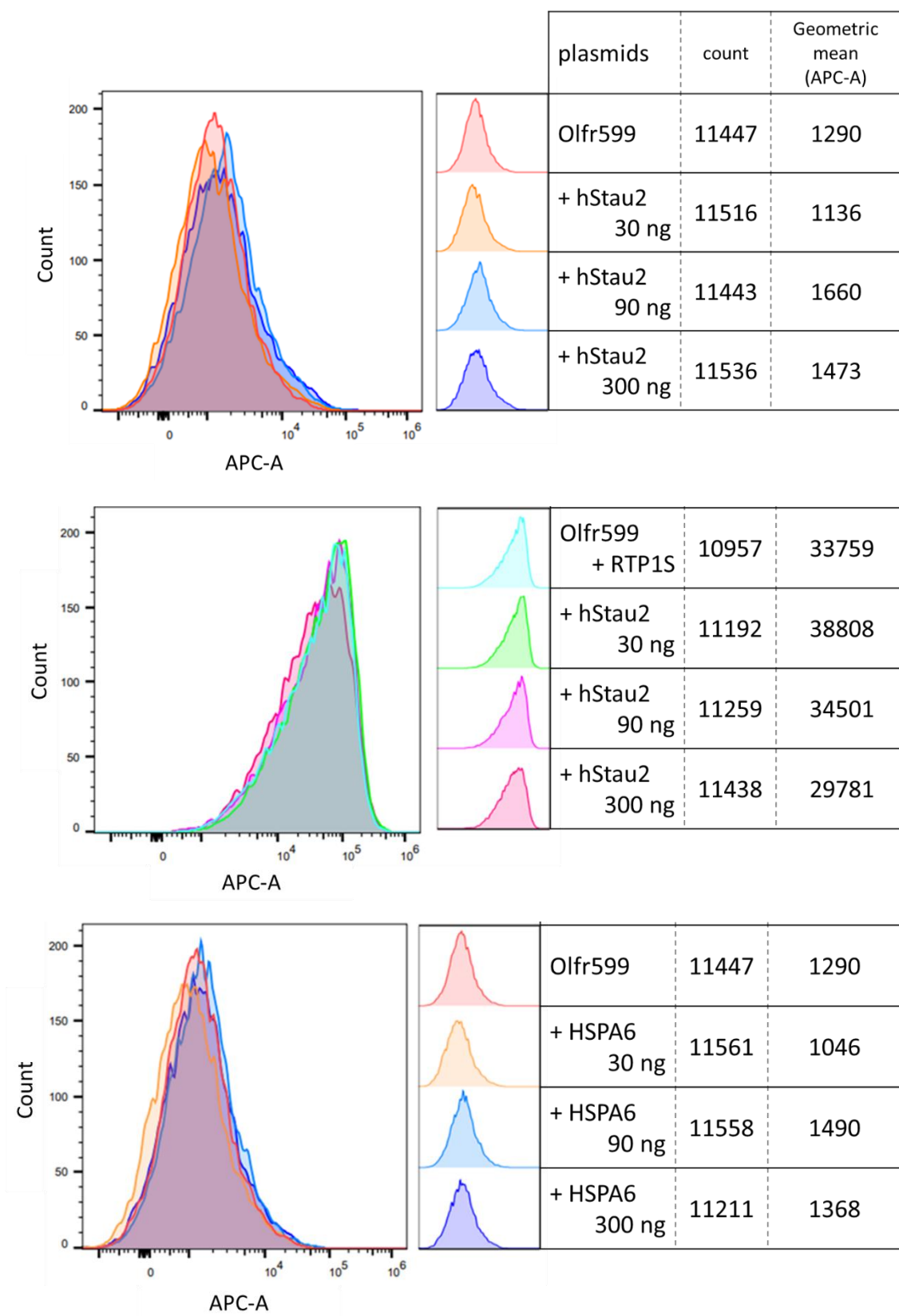


Fig. 5-2 FACS による STAU2 または HSPA6 共発現時の Olfr599 細胞膜発現量測定 (次頁に続く).

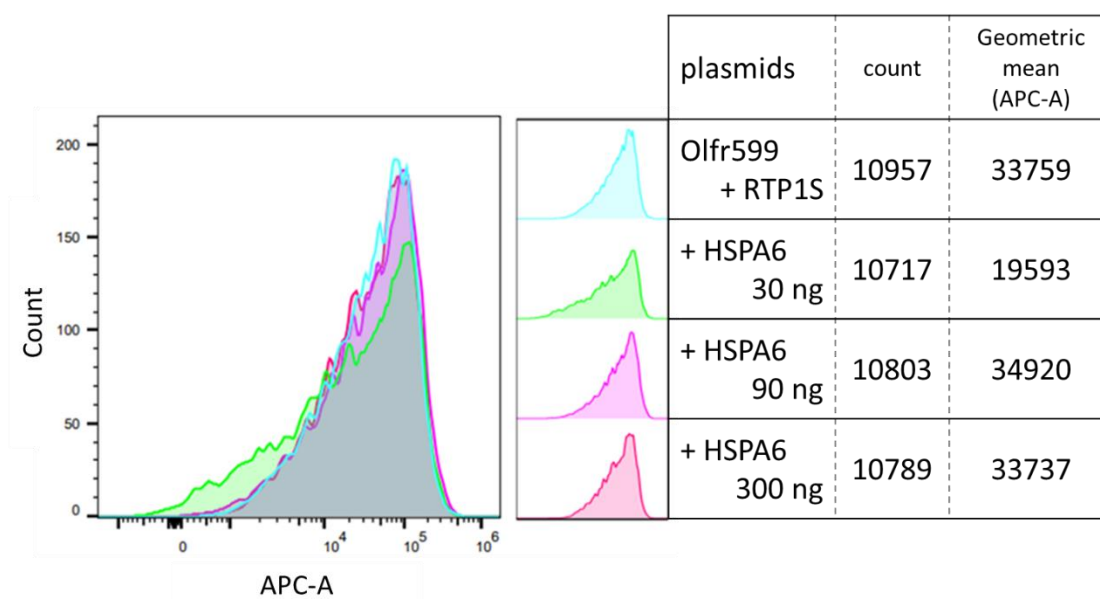


Fig. 5-2 FACS による STAU2 または HSPA6 共発現時の Olfr599 細胞膜発現量測定 (前頁から続く).

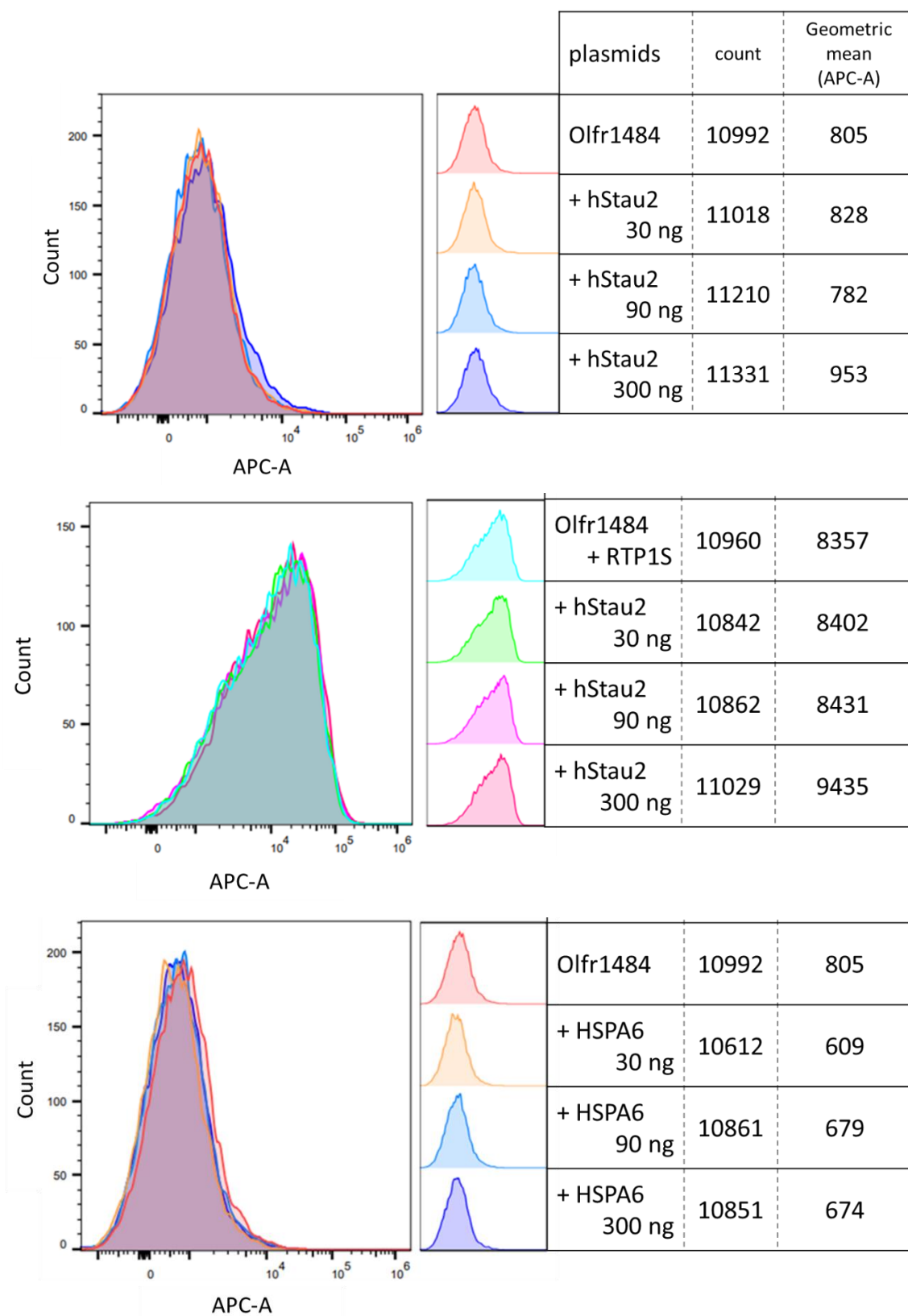


Fig. 5-3 FACS による STAU2 または HSPA6 共発現時の Olfr1484 細胞膜発現量測定 (次頁に続く).

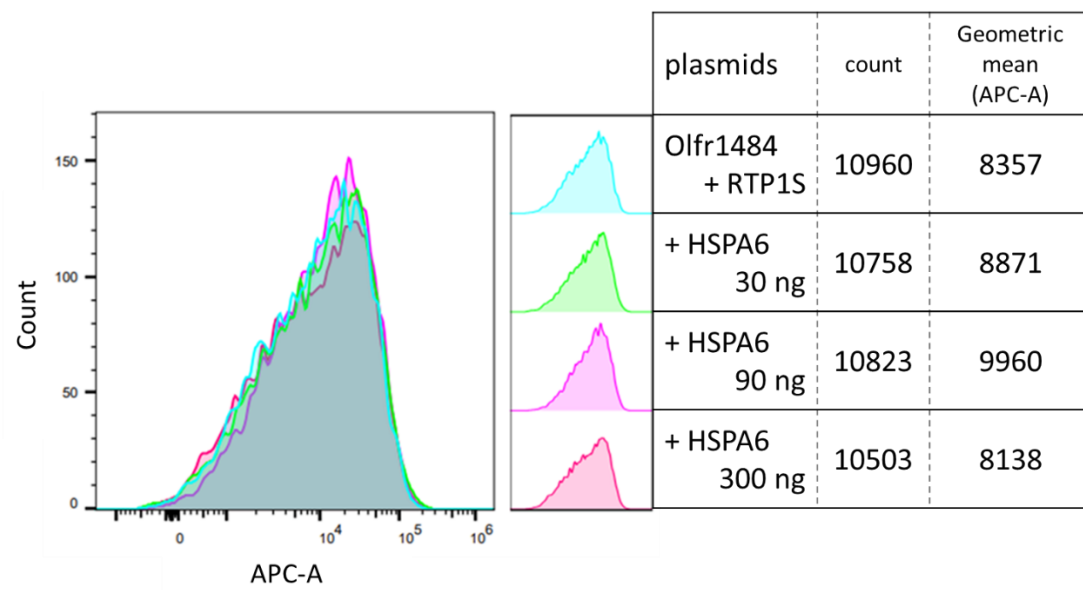
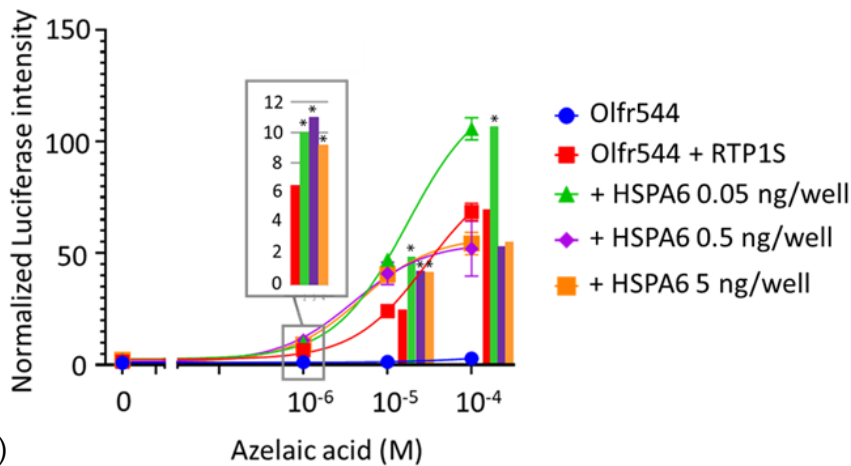


Fig. 5-3 FACS による STAU2 または HSPA6 共発現時の Olfr1484 細胞膜発現量測定 (前頁から続く).

5-2-2 リガンドアッセイによる匂い応答への影響評価

続いて OR のリガンドへの影響を観察するため、Dual-Glo Luciferase assay を用いて共発現時のリガンド応答を測定した。OR には Olfr544 を用い、STAU2 と HSPA6 は OR の 1/1 (5 ng/well)、1/10 (0.5 ng/well)、1/100 (0.05 ng/well) で導入した。結果、STAU2、HSPA6 とともに 0.05 ng/well で発現させたときに最も Olfr544 のリガンド応答が向上することが判明した。また、Azelaic acid 10 μ M まではすべての導入量で非導入時を上回る応答を示した。

(A)



(B)

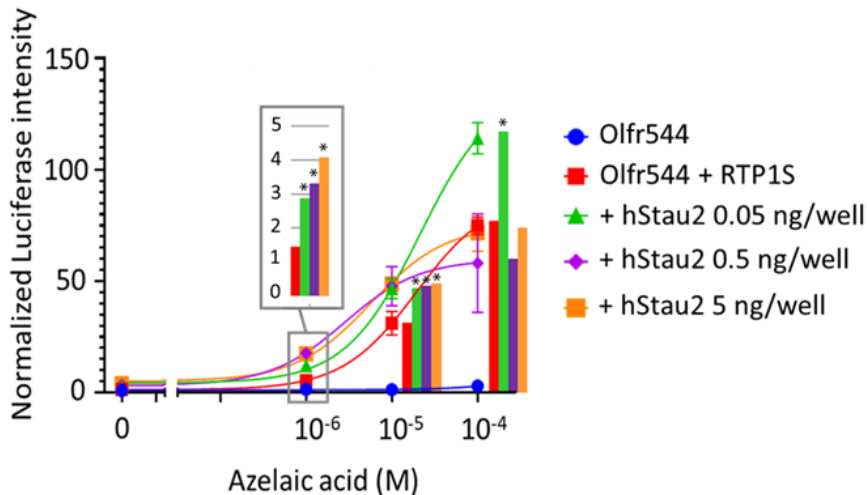


Fig. 5-4 Dual-Glo Luciferase assay による (A)STAU2 または (B)HSPA6 各量導入時の Olfr544 のリガンド応答. また, Azelaic acid 10 μ M における Olfr544+RTP1S 二種共発現と各発現条件間の Normalized Luminescence の差を Dunnett 法による one-way ANOVA で検定した結果を併せて示す(* p <0.05).

5-2-3 NanoBiT アッセイによる RTP1S-OR との複合体形成の評価

近位依存性ラベリングである BioID で検出されるタンパク質は、PoI の空間的近傍に存在することでビオチン化されているはずである。RTP1S-OR 共発現条件に対する BioID で特異的に検出されたタンパク質は RTP1S および OR と近接していると推測される。そこで、実際に STAU2 や HSPA6 が細胞内で RTP1S や OR と近接しているかを観察するため、各タンパク質間で NanoBiT アッセイを実施した。なお、RTP1S と OR は付加する末端により膜を挟んで配置するため、付加時の NanoBiT の膜表面配置を以下に示した。

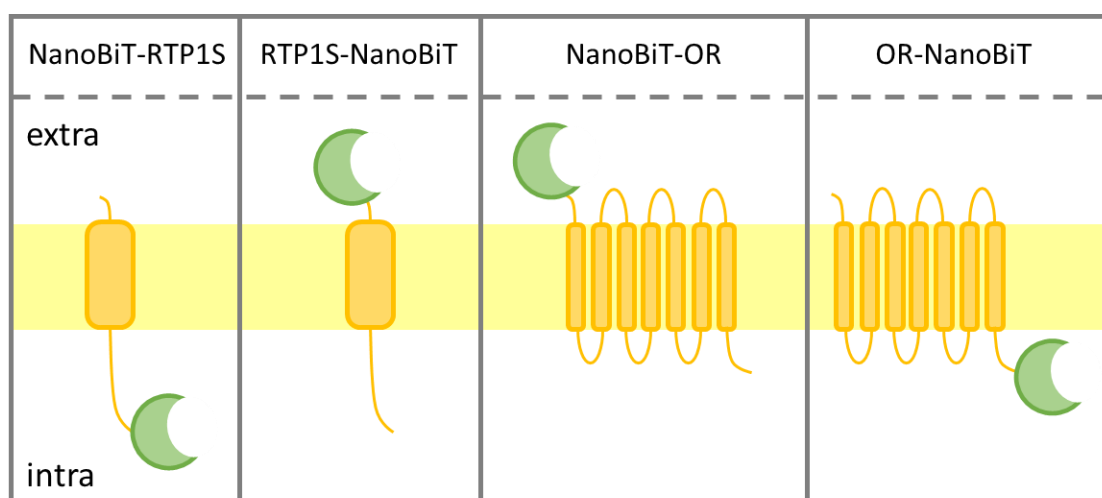
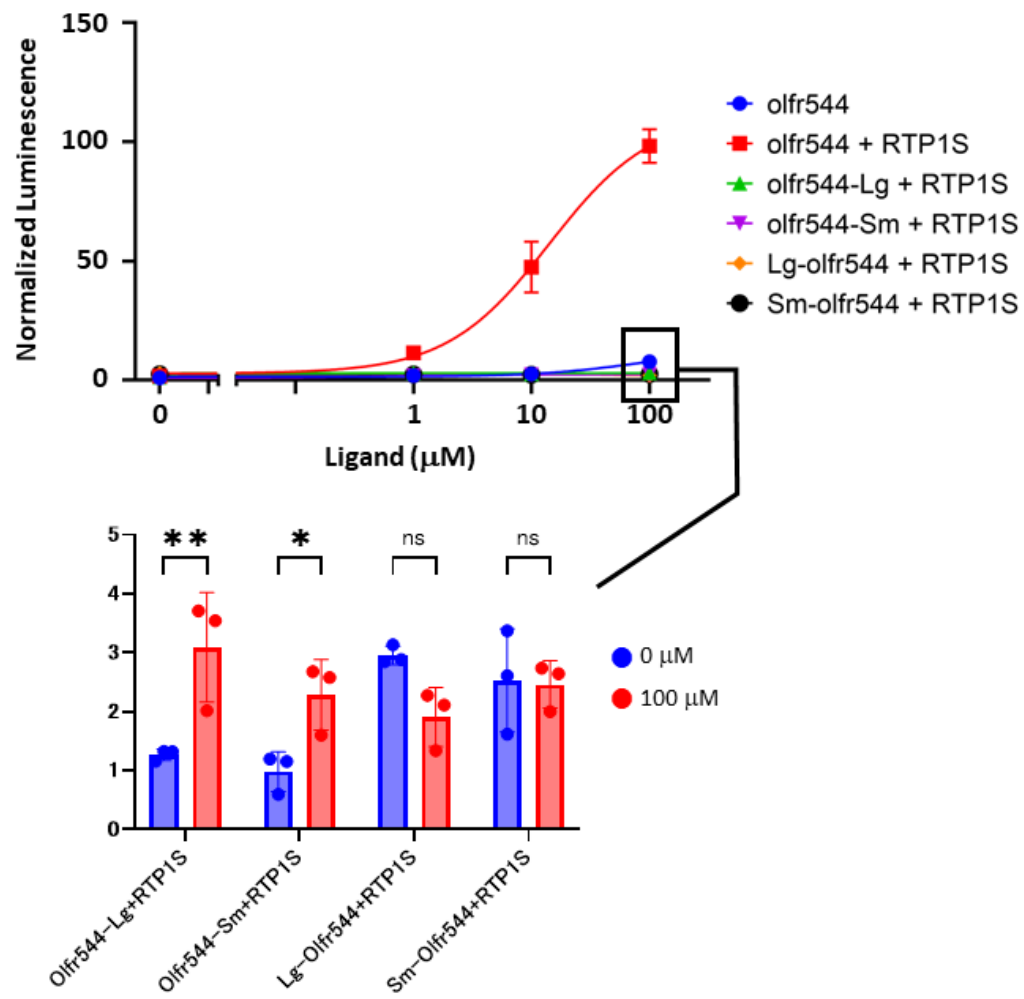


Fig. 5-5 RTP1S-NanoBiT および OR-NanoBiT の空間配置. RTP1S N 末端, OR C 末端に付加すると分割ルシフェラーゼは細胞内に, RTP1S C 末端, OR N 末端に付加すると細胞外に位置すると推定される。

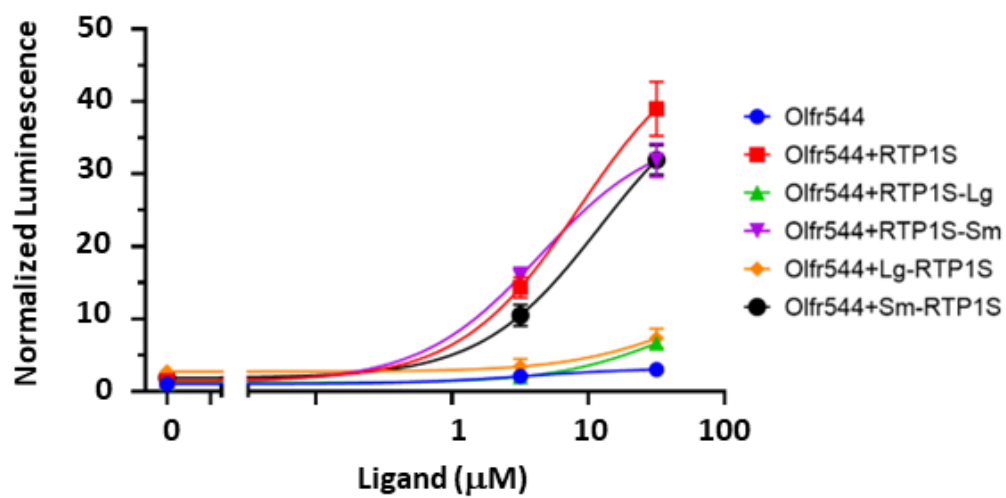
NanoBiT assay を行うにあたり、RTP1S、Olfr544、STAU2 および HSPA6 への分割ルシフェラーゼ付加の機能的影響を確認した。pBiT ベクターに PoI を挿入することで N 末端または C 末端に分割ルシフェラーゼを付加した各 PoI を作製した。Olfr544-NanoBiT は RTP1S と共発現させ、RTP1S-NanoBiT、STAU2-NanoBiT、HSPA6-NanoBiT は Olfr544(および RTP1S)と共発現させ Dual-Glo Luciferase assay で発現細胞のリガンド応答を測定した。

Olfr544 は C 末端へのサブユニット融合体でごく僅かに応答を示したが、全体としてリガンド応答能を喪失した。一方で RTP1S、STAU2、HSPA6 は pBiT 発現系でも OR 発現促進機能を維持していることが確認された。

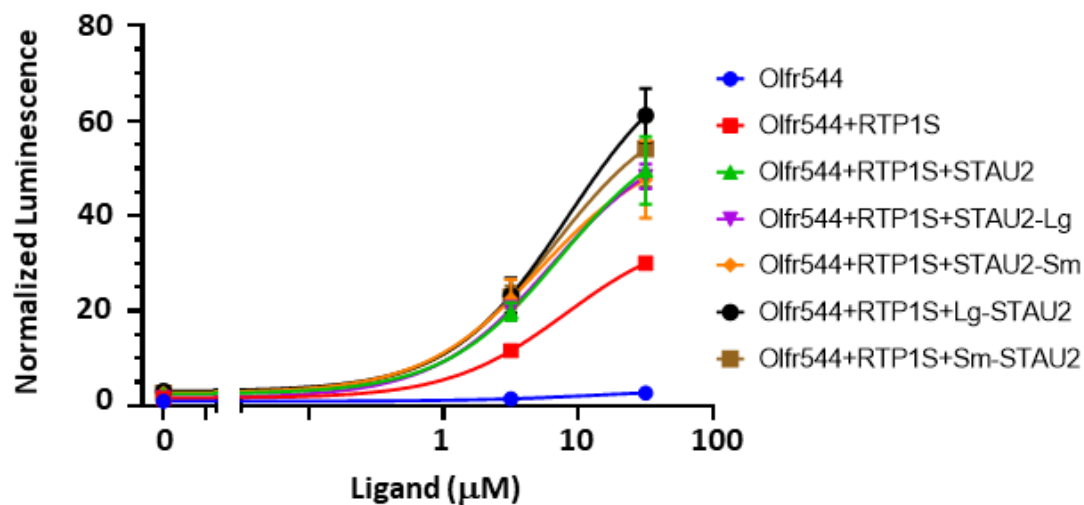
(A)



(B)



(C)



(D)

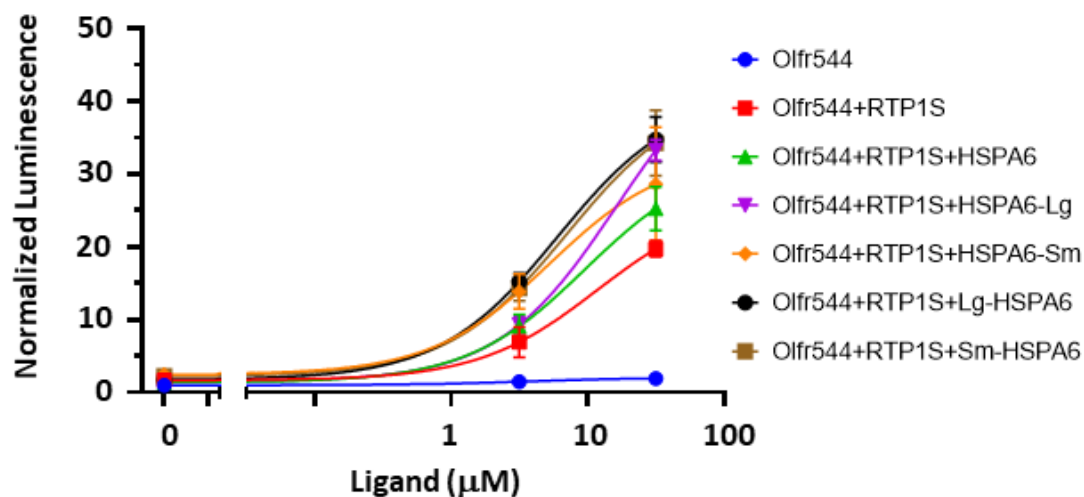


Fig. 5-6 Dual-Glo Luciferase assay による PoI-NanoBiT 融合体の機能解析. (A)olfr544-NanoBiT. Azelaic acid 0 mM と 100 mM 間の Normalized luminescence の差を Sidak 法による two-way ANOVA で検定した(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (B)RTP1S-NanoBiT (C)hStau2-NanoBiT (D)HSPA6-NanoBiT

これら PoI-NanoBiT を用いた NanoBiT アッセイを実施した。PoI の組合せは(A)Olfr544 x RTP1S (B)RTP1S x STAU2 (C)RTP1S x HSPA6 (D)Olfr544 x STAU (E)Olfr544 x HSPA6 (F)STAU2 x HSPA6 である。(B)および(C)は Olfr544 非共発現時、共発現時で測定した。結果を以下に示す。

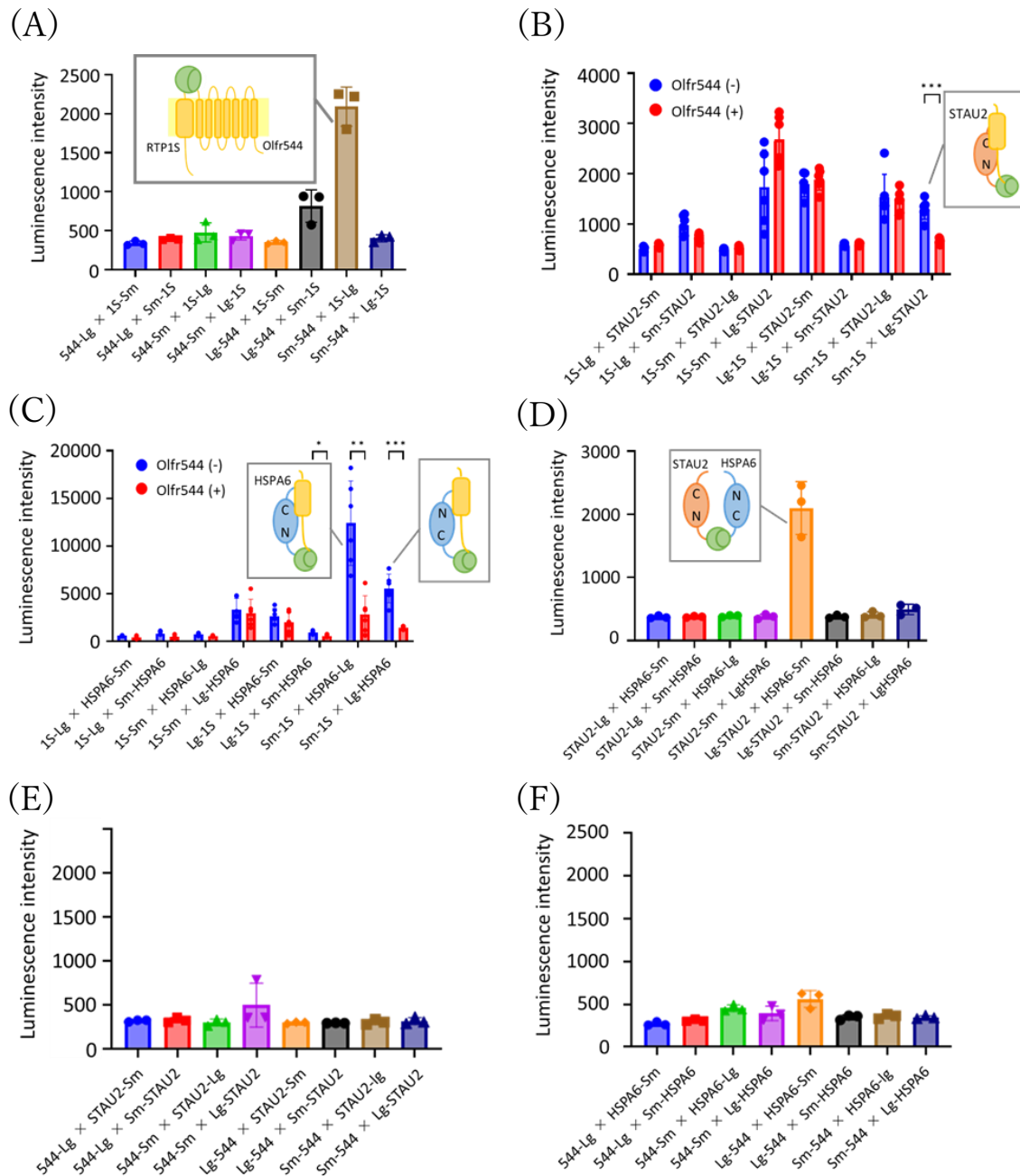


Fig. 5-7 NanoBiT assay によるタンパク質間相互作用の観察. (A)Olfr544 と RTP1S (B)RTP1S と STAU2 (C)RTP1S と HSPA6 (D)STAU2 と HSPA6 (E)Olfr544 と STAU2 (F)Olfr544 と HSPA6. (B)と(C)は Olfr544 非共発現下と共発現下で実施し, 2 条件間の発光値の差を Holm- Šídák 法による多重 t 検定で検定している (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

RTP1S と Olfr544 の NanoBiT において、RTP1S-LgBiT と SmBiT-Olfr544 間で強い発光が確認された。これは先行研究から示唆されているように、RTP1S と OR の複合体形成に一致する。RTP1S と STAU2 または HSPA6 間での NanoBiT では、異なる傾向を示す組合せが確認された。STAU2 においては、Olfr544 非共発現下に比べ共発現下で SmBiT-RTP1S と LgBiT-STAU2 間の発光値が減少した。一方で HSPA6 において、Olfr544 共発現時に SmBiT-RTP1S と HSPA6-LgBiT 間、SmBiT-RTP1S と LgBiT-HSPA6 間の発光値が共に大きく低下することが確認された。これらの変化は、Olfr544 を導入したことにより PoI の構造、あるいはコンポーネントが変化した可能性を含んでいる。Olfr544 は STAU2、HSPA6 共に発光を示さず、また BioID においても 2 種のタンパク質は特異的に検出されていないことから、RTP1S 側で特異的に相互作用していることが示された。また、STAU2 と HSPA6 間の NanoBiT では、LgBiT-STAU2 と HSPA6-SmBiT 間でのみ発光値の上昇が観察され、STAU2 の N 末端側と HSPA6 の C 末端側が細胞内で相互作用している可能性が示唆された。

5-3 小括

BioID で RTP1S の新規相互作用タンパク質として候補となった STAU2 と HSPA6 について、ORs 細胞膜発現への影響を観察した。BioID にも用いた Olfr544 では STAU2、HSPA6 共に膜発現促進を示したが、Olfr599 と Olfr1484 には促進を示さなかった。今後さらに OR の種類を増やしての測定が必要であるが、現段階で敢えて推測するならば、RTP1S への依存度合いが差異を生じさせるのかもしれない。Olfr544 は RTP1S がなくてもある程度機能的発現を示す OR であるのに対し、Olfr599 と Olfr1484 は RTP1S に強く依存する OR であるためである。

NanoBiT アッセイからは、RTP1S と STAU2 あるいは HSPA6 が OR 共発現の有無で異なる相互作用を呈することが示唆された。これは OR と RTP1S が相互作用することでコンポーネントの変化が起こり、相互作用部位の空間的配置が変化するためであると推測される。また、STAU2 と HSPA6 間でシグナルが生じることも確認され、RTP1S-STAU2-HSPA6 の三者間でそれぞれ相互作用が形成される可能性が浮上した。

6 章 総括

嗅覚機構の解明に向け、本研究では嗅覚受容体 OR の機能的発現を補助するアクセサリタンパク質である RTP1S の機能解析と OR-RTP1S 発現機構に関わる新たなシャペロンタンパク質の探索を実施した。

3 章では RTP1S の構造的機能的な重要残基の特定を試みた。RTP1S は単独で多くの OR の機能的発現を促進することが可能である重要な因子であるにも関わらず、その相互作用分子機構や立体構造に関する研究は乏しく、これらを解明することは OR の細胞内発現機構の飛躍的な解明に繋がるはずである。初めに、RTP1S の構造解明に向け *in vitro* での RTP1S 単一精製系を構築した。RTP1S は 1 つの膜貫通領域を有する一回膜貫通型タンパク質であり野生型では精製が困難であるが、膜貫通領域を欠損しても OR 輸送能を有するという性質を利用し、膜貫通領域欠損体での発現精製を行うことで可溶性での獲得に成功した。この精製 RTP1S を分子量測定したところ、ホモ二量体と単量体の 2 状態で存在することが明らかとなり、還元条件下で二量体の割合が減少することからジスルフィド結合による二量体形成であることが示唆された。ここで、先行研究から N 末端領域が OR 輸送能に重要であることと N 末端 2 残基目にシステインが存在することに着目し、このシステインが RTP1S のダイマー形成に重要であるのではないかと考えた。この仮説を検証するため当システインを欠損させた RTP1S Δ N2 変異体を作製し単一精製後分子量測定を行ったところ、二量体形成が消失していることが確認された。また、NanoBiT アッセイから *in vivo* でも RTP1S が二量体を形成し RTP1S Δ N2 では形成が減少することが確認され、N 末 2 残基目システインがジスルフィド結合を形成することで二量体を形成することが示された。

N 末端のシステインが二量体形成に重要であることが示されたことで、やはり RTP1S N 末端側が OR 輸送能に極めて重要であると考えた。システイン以外にも機能上重要な残基が存在するかを確認するため、N 末端残基を 1 残基ずつ欠損あるいはアラニン置換した変異体を作製し、共発現させた時の ORs の細胞膜発現量とリガンド応答を測定した。結果、2 残基目システインが欠損あるいは置換されても ORs の膜発現量やリガンド応答に大きな減少が見られないことが判明し、RTP1S の二量体形成はその機能に必ずしも必要ではないことが示唆された。一方で 4 残基目のセリンが変異を受けると致命的に減少するこ

とが確認された。このことから、RTP1S N 末端領域は二量体形成のみならず、ORs との相互作用か輸送経路へのシグナリングか等は不明だが、さらなる機能を担っていると考えられる。

また、モチーフ検索により RTP1S が Zf-3CXXC という亜鉛結合性モチーフを有していることが示唆された。亜鉛への配位は低分子量のタンパク質が構造を安定させるために取るほか、DNA/RNA 結合性タンパク質にも広く見られる特徴である。RTP1S は 4 つの CXXC 配列を含め 11 のシステイン残基を有している。二量体形成にもシステインが関係していたことから、これらシステイン残基の中に機能上重要なものが存在すると考えた。そこでシステイン残基を 1 つずつ、あるいは CXXC 配列ごとにセリンに置換した CS 変異体を作製し、ORs 輸送能および変異体の発現と OR 間相互作用を観察した。結果、C58S、C206S 変異が RTP1S の発現を消失させるのに対し、C96S、C99S、C158S 変異は発現はそのままに輸送能を減衰させることが明らかとなった。亜鉛への配位にどのシステイン残基が関与しているか、どのように確認するかは今後の大きな課題である。

4 章及び 5 章では、OR 機能的発現機構に関わる新たな未知シャペロンタンパク質をスクリーニングし、その機能を観察した。OR の中には機能的発現に RTP1S を必要としないものや、逆に RTP1S が存在してもほとんど発現しないものも存在する。また、RTP1S と同じファミリーに属する RTP2 により RTP1S の発現促進が相乗的に向上するもの、RTP1S の促進が抑制されてしまうものも存在する。GPCR の膜発現のプロセスに関しても、小胞体を介した発現経路だけでなく、細胞膜近傍まで mRNA が輸送され局所翻訳されることで発現する経路も確認されており、OR にも同様の経路を辿るものがあるかもしれない。このように、OR 周辺の相互作用分子機構には未だに謎が多い。

4 章では RTP1S 以外に OR のシャペロンとして機能するタンパク質を同定するため、近位依存性標識法である BioID を用いて RTP1S と OR の周辺タンパク質のスクリーニングを行った。TurboID と AirID の 2 種のビオチンリガーゼを使用し、結果として OR と共発現した際の RTP1S の周辺から特異的に検出されるタンパク質として STAU2 と HSPA6 の 2 種を特定した。Staufen は RNA 結合性タンパク質であり、広範な生物種で保存されている。キイロショ

ウジョウバエの胚発生において *osker* mRNA や *bicoid* mRNA の輸送および局所的局在、翻訳調整に重要な役割を持つほか、ラットの海馬神経細胞中では細胞体遠位の樹状突起への RNA の輸送に関与することが明らかになっている。HSPA6 は広く保存されている分子シャペロンタンパク質 HSP70 ファミリーに属している。HSP70 はタンパク質のフォールディングを補助することでタンパク質の品質管理に中心的な役割を持っている。しかしフォールディングのみに留まらず、オルガネラ間の小胞輸送や抗原提示による免疫誘起に関わるメンバーも確認されており、特に Hsc70 は OR の発現を促進する機能も有していることが観察されている。

5 章では STAU2 と HSPA6 が実際に ORs の機能的発現へ影響を及ぼすか観察を行った。FACS の結果、両タンパク質ともに Olfr544 の発現を向上させることが確認されたが、一方で Olfr599 と Olfr1484 には影響を及ぼさなかった。この差が何に起因するものなのかは今後さらに多くの OR へ観察を行い条件を明らかにしていく必要がある。また、RTP1S、OR、STAU2 および HSPA6 の 4 者間で NanoBiT アッセイを行いそれぞれの細胞内相互作用を観察した。OR は STAU2、HSPA6 両者に相互作用を示さず、BioID で検出されなかったことと一致する結果となった。一方で RTP1S は両者とも発光を示し、Olfr544 共発現時には発光の傾向が変化することが判明した。このことから、RTP1S-OR 共発現時はコンポーネントの変化により相互作用部位の配置、あるいはタンパク質分子ごと空間的配置が変化するものと考えられる。STAU2 と HSPA6 間でも相互作用が示唆され、RTP1S-STAU2-HSPA6 の 3 種タンパク質から構成される相互作用関係があると推測される。

今後、本研究で特定された新規シャペロンタンパク質 STAU2 と HSPA6 に関して、細胞内のどのオルガネラで発現・機能しているかを観察することが直近の課題である。また、スクリーニングの結果 Olfr544 以外の ORs についても広く発現促進能を発揮するようであれば、これら 2 種を恒常発現する細胞株を構築することで、培養細胞における ORs のより効率的な機能解析が可能となるだろう。

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 1015-1018 (2007)
- [2] Mombaerts, P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science*, 286, 707-711 (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, 711-715 (1999)
- [5] Shipley,M. T., Ennis, M. Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.*, 30, 123-176 (1996)
- [6] Firestein,S. How olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211-218 (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.* 9:951-963. (2008)
- [10] Niimura Y, Nei M., Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 5 124-133(2002)
- [11] Niimura Y, Nei M., Evolutionary changes of the number of olfactory receptor genes in the human and mouse lineages. *Gene*, 346 23-28(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. Allele inactive regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78 823-834 (1994)
- [15] Serizawa, S. et al. Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science* 302 2088-2094 (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 Neuroscience* 18 Suppl 3:S1.
- [17] S. DeMaria and J. Nagai The cell biology of smell, *J. Cell Biol.*, 191 443-452 (2010)
- [18] Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelshon, M., et al. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87 675-686 (1996)
- [19] 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* 26 275-279 (1998)
- [20] Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., Rossler, P. and Breer, H. Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A* 183 635-650 (1998)
- [21] 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*, 289 739-745 (2000)
- [22] 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 β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*, 450 383-388 (2007)
- [23] Liu, A. H., Zhang, X., Stolovitzky, G. A., Califano, A. and Firestein, S.J. Motif-based construction of a functional map for mammalian olfactory receptors. *Genomics* 81 443-456 (2003)

- [24] Pilpel, Y. and Lancet, D. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Science* 8 969-977 (1999)
- [25] Wang, J., Luthey-Schulten, Z.A. and Suslic, K. A. Is the olfactory receptor a metalloprotein? *Proc. Natul Acad. Sci. USA* 100 3035-3039 (2003)
- [26] 匂いの分子基盤：嗅覚受容体の薬理学的研究 堅田明子, 東原和成 日薬理誌 124 201-209 (2004)
- [27] Turin, L. and Yoshii, F. Structure-odor relations : a modern perspective. In *Handbook of Olfaction and Gustation*, (ed. R. L. Doty), 275-294. Marcel Dekker, New York(2003)
- [28] Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. and Buck, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96 713-723 (1999)
- [29] 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* 555.3 734-756 (2004)
- [30] Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H. and Touhara, K. Molecular bases of odor discrimination : Recomstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *Journal of Neuroscience* 21 6018-6025 (2001)
- [31] Ma, M and Shepherd, G. M. Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proc. Natul Acad. Sci. USA* 97 12869-12874 (2000)
- [32] Oka, Y., Omura, M., Kataoka, T. and Touhara, K. Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO jounal* 23 120-126 (2004)
- [33] Zou, Z. and Buck, L. B. Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science* 311 1477-1481 (2006)
- [34] Manuel. Zarzo, The sense of smell : molecular basis of odorant recognition. *Biological reviews* 82455-479(2007)
- [35] 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. *Journal of NeuroScience*. 25 1806-1815 (2005)

- [36] 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. *Journal of Biological Chemistry* 282 1216-1224 (2007)
- [37] 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 11149-11159 (1996)
- [38] Ghanouni, P., Steenhuis, J. J., Farrens, D.L. and Kobilka, B. K. Agonist-induced conformational changes in the G protein- coupling domain of the β_2 adrenergic receptor. *Proc. Natul Acad. Sci. USA* 98 5977-6002 (2001)
- [39] 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. *Journal of Biological Chemistry* 277 11441-11449(2002)
- [40] Vaidehi, N., Floriano, W. B., Trabanino, R., Hall, S. E., Freddolino, P., Choi, E. J., Zamanakos, G. and GoddardIII, W. A. Prediction of structure and function of G protein-coupled receptors. *Natul Acad. Sci. USA* 99 12622-12627 (2002)
- [41] Lewcock, J.W. and Reed, R. R. A feedback mechanism regulates monoallelic odorant receptor expression. *Proc. Natul Acad. Sci. USA* 101 1069-1074 (2004)
- [42] Shykind, B. M. et al. Genes switching and the stability of odorant receptor gene choice. *Cell* 117 801-815 (2004)
- [43] 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)
- [44] Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Vassalli, A. and Mombaerts, P. Axon guidance of mouse olfactory sensory neurons by odorant receptors and the β_2 adrenergic receptor. *Cell* 117 833-846 (2004)
- [45] Wang, F., Nemes, A., Mendelshon, M. and Axel, R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93 47-60 (1998)

- [46] Bozza, T., Feinstein, P., Zheng C. and Mombaerts, P. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *Journal of NeuroScience*. 22 3033-3043 (2002)
- [47] Feinstein, P. and Mombaerts, P. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117 817-831 (2004)
- [48] 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 1462-1466
- [49] 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 2054-2058 (2003)
- [50] 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 5835-5845 (2004)
- [51] Lu, M., Echeverri, F., Moyer, B.D. Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic*, 4 416-433(2003)
- [52] Gimelbrant, A.A., Haley, S.L., McClintock, T.S. Olfactory receptor trafficking involves conserved regulatory steps. *J. Biol. Chem.*, 276 7285-7290(2001)
- [53] Sayako Katada, Motonari Tanaka and Kazushige Touhara., Structural determinants for membrane trafficking and G protein selectivity of a mouse olfactory receptor., *Journal of Neurochemistry*. 90 1453 (2004)
- [54] Murrell, J.R. and Hunter, D.D. An olfactory sensory neuron line, odora, properly targets olfactory proteins and responds to odorants. *Journal of NeuroScience*.. 19 8260-8270 (1999)
- [55] Touhara, K., Sengoku, S., Inaki, K., Tsuboi, A., Hirono, J., Sato, T., Sakano, H. and Haga, T. Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96 4040-4045(1999)

- [56] Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. and Firestein, S. Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* 279 237-242 (1998)
- [57] Krautwurst, D., Yau, K. W. & Reed, R. R. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* 95, 917–926 (1998).
- [58] H. Saito, M. Kubota, R. Roberts, Q. Chi, H. Matsunami., RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors., *Cell*, 119 679-691(2004)
- [59] 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)
- [60] 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 4886–4895 (1994)
- [61] 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* 383 637-640 (1996)
- [62] 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 - 339 (1998)
- [63] 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* 112 607-618 (2003)
- [64] 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* 93 455-466 (1998)
- [65] Matsunami, H. Functional expression of mammalian odorant receptors. *Chemical Sences* 30(suppl 1) i95-i96 (2005)

- [66] 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 20650-20659 (2006)
- [67] Hague C, Uberti MA, Chen Z, Bush CF, Jones SV, Ressler KJ, Hall RA, Minneman KP, Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;101(2004)
- [68] C. F. Bush, S. V. Jones, A. N. Lyle, K. P. Minneman, K. J. Ressler, R. A. Hall, Specificity of olfactory receptor interactions with other G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 19042–19051 (2007).
- [69] Li YR, Matsunami H, Activation state of the m3 muscarinic acetylcholine receptor modulates Mammalian odorant receptor signaling, *Sci Signal.* 4(2011)
- [70] Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F., and Malnic, B. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9310–9314
- [71] Von Dannecker, L. E., Mercadante, A. F., and Malnic, B. (2005) *J. Neurosci.* 25, 3793–3800
- [73] Lyons, David B., et al. "An epigenetic trap stabilizes singular olfactory receptor expression." *Cell* 154.2 (2013): 325-336.
- [74] Dalton, Ryan P., David B. Lyons, and Stavros Lomvardas. "Co-opting the unfolded protein response to elicit olfactory receptor feedback." *Cell* 155.2 (2013): 321-332.
- [75] Wu, Lifang, et al. "Receptor-transporting protein 1 short (RTP1S) mediates translocation and activation of odorant receptors by acting through multiple steps." *Journal of Biological Chemistry* 287.26 (2012): 22287-22294.
- [76] 池上健太郎 博士学位論文：哺乳類嗅覚受容体の機能的な発現と匂い識別 (2020)
- [77] Ruchira S, *et al.* (2017) Olfactory receptor accessory proteins play crucial roles in receptor function and gene choice. *eLife* doi:10.7554/eLife.21895

- [78] Niimura, Yoshihito, Atsushi Matsui, and Kazushige Touhara. "Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals." *Genome research* 24.9 (2014): 1485-1496.
- [79] Zhuang, Hanyi, and Hiroaki Matsunami. Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. *Journal of Biological Chemistry* 282.20 (2007): 15284-15293
- [80] Dae I.K, et al. (2016) An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* 27, 1188-1196
- [81] Tess C. B, *et al*, (2018) Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* 36, 880-887
- [82] Kohki K. *et al.* (2020) AirID, a novel proximity biotinylation enzyme, for analysis of protein-protein interactions. *eLife*
<https://doi.org/10.7554/eLife.54983>
- [83] St Jhonston, D. *et al.* (1991) Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63
- [84] Li, P. *et al.* (1998) Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions, *Cell* 90, 437-447
- [85] Homem, C.C.F. and Knoblich, J. (2012) *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* 139, 4297-4310
- [86] Louise W, *et al.* (1999) Mammalian Staufen Is a Double-Stranded-RNA- and Tublin-Binding Protein Which Localizes to the Rough Endoplasmic Reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2220-2230
- [87] Thomas F, *et al.* (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J. Cell. Sci* 115, 3285-3295
- [88] Shao J.T, *et al.* (2001) A Role for a Rat Homolog of Staufen in the Transport of RNA to Neuronal Dendrites. *Neuron* 32, 463-475

[89] Mads D, Mikkel R and Marja Jaattela. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions.

FEBS Letters 581, 3702-3710

[90] Eva M, *et al.* (2006) A Specific heat Shock Protein Enhances the Expression of Mammalian Olfactory Receptor Proteins. *Chem.Senses* 31, 445-452

[91] Benjamin M.A, *et al.* (2007) Post-translational integration of tail-anchored proteins is facilitated by defined molecular chaperones. *J. Cell. Sci* 120, 1743-1751

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました東京農工大学工学府生命工学専攻 養王田正文教授、野口恵一准教授、篠原恭介准教授、福谷洋介助教、Duke 大学 松波宏明教授、そして関わってくださった研究室の皆様から感謝致します。

MS/MS 解析について、サンプル調整法のご指導から、得られたペプチドデータの解析およびタンパク質の同定まで広くサポートしてくださった東京工業大学科学技術創成研究院細胞制御工学研究センター 丹羽達也助教に深く感謝申し上げます。

AirID を提供してくださった愛媛大学プロテオサイエンスセンター 澤崎達也教授に深く感謝申し上げます。