

(様式 5)

2023 年 6 月 16 日
Year Month Day

学位（博士）論文要旨

(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 (Ph.D. candidate)	工学府博士後期課程 2020 年度入学 (Admission year) 学籍番号 20831002 (student ID No.)	生命工学専攻 (major) 氏名 井上 亮祐 (Name)
主指導教員氏名 (Name of supervisor)	養王田 正文	
論文題目 (Title)	RTP 依存的嗅覚受容体膜輸送機構に関する研究	
論文要旨 (2000 字程度) (Abstract (400 words)) 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 Stau2(hStau2)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 hStau2 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 Stau2 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 hStau2 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 hStau2 と HSPA6 は OR の近傍には配位しておらず、かつ RTP1S-hStau2-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。

(英訳) ※和文要旨の場合(400 words)

Olfactory Receptor (OR) is a super family of GPCR, which plays an important role in detection of odorants and is necessary greatly in survival for organisms. The low surface-expression level in heterologous cells had made it difficult to analysis ORs function in these cells but identifying chaperone proteins including RTP1S enabled functional analysis possible. Currently RTP1S is revealed to facilitate transportation and localization to cell surface of many ORs. However, there are unrevealed issues which should be resolved for a detailed functional analysis, such as the structure of RTP1S and the intermolecular interactions between RTP1S and ORs or other proteins in OR trafficking. In this study, to explore the mechanism of ORs expression, functional analysis of RTP1S and screening of novel chaperone proteins involved in OR functions were conducted.

In chapter 3, the important residues for oligomerization and function of RTP1S were identified. For structural analysis, an expression and purification system of RTP1S mutant was constructed and molecular weight measurement of purified RTP1S was performed. It revealed that RTP1S formed homodimer or monomer in vitro and cysteine at the second N-terminal residue (C2) was important to dimerize. In addition, NanoBiT assay revealed same tendency of RTP1S in cells.

Following oligomerization analysis, functional analysis of each N-terminal residue of RTP1S was performed in cells. It showed that C2 was not necessary for cell surface expression and ligand response of ORs. In contrast, deletion of serine at the fourth N-terminal residue (S4) significantly decreased them. This result implied dimerization of RTP1S is not necessary for its function.

In chapter 4, proteins interacting with OR-RTP1S were identified in screening and in chapter 5, the effect on ORs expression and hetero-oligomerization of the identified proteins were observed. Our group had suspected the presence of unknown chaperones involved in the functional expression of ORs. To search for unknown chaperones in OR expression system, proteins that present in vicinity to OR and/or RTP1S were screened by BioID method and proteins specifically detected in each condition were identified. As a result, hStau2 and HSPA6 were identified as candidate proteins interacting with RTP1S when co-expressed with OR. It was found that these candidates actually facilitated surface expression and ligand response of certain OR and not facilitated other ORs, and NanoBiT assay indicated interactions between RTP1S and these candidates in cells.