

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

主題 感覚神経の刺激受容メカニズム

副題 嗅覚受容分子の発現クローニングと機能解析

指導教官 新家 眞教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 関根 寿樹

嗅覚は、例えば線虫にも備わる原始的な感覚神経であり、化学物質を刺激として受容する。哺乳類の嗅覚神経系は数十万とも言われる多様な匂い物質を受容識別することができる。その刺激受容メカニズムに関して近年分子生物学的手法を用いて非常に多くの知見が得られた。嗅覚は視覚と同様に G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) が刺激受容分子となっている。この嗅覚受容体は鼻腔に露出した嗅細胞の繊毛に存在し、げっ歯類で約 1,000 種類の遺伝子ファミリーに属する。また各嗅細胞は一種類の受容体のみを発現していると考えられている。ただし、嗅覚受容体が 1991 年に同定されてから現在までのところ特異的なリガンドが同定された嗅覚受容体はわずかであり、嗅覚受容体の構造とリガンド特異性の相関関係についてはほとんど知られていない。さらに嗅覚刺激は個体にさまざまな心理学的、生理学的な影響を与えるが、これらの嗅覚神経系の高次な生物学的作用の分子メカニズムについても多くの謎が残されている。今回、本研究では嗅覚受容体の詳細で系統的な機能解析と生物学的役割を明らかにするため、8 種類のいわゆる「みどりの香り」物質をリガンドとして選択し、これらの匂い物質に対するマウスの嗅細胞の応答特性の解析と嗅覚受容体遺伝子の単離を試みた。

みどりの香りは植物の葉緑体膜由来の脂肪酸であるリノール酸または α -リノレン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物である8つの化合物からなる。これらは炭素数がいずれも6つの直鎖のアルコールまたはアルデヒドで、8つの化合物のうち二つは飽和、残り6つは不飽和の、いずれも無色の揮発性の液体で、沸点は100~160°Cの範囲にある。これら8種類の匂い物質は異なる香調を持ち、これらの匂い物質が持つ、官能基、二重結合、立体構造などの特徴が嗅覚受容体のリガンド特異性に対して何らかの影響を与えていることが予想される。また、みどりの香りは森林浴で曝露される匂い物質の集合に含まれ、生理反応、心理反応を含めた多様な影響を個体に与える可能性が示されており、匂い刺激の高次な生物学的作用の研究にも役立つと考えられる。

嗅覚受容体の単離には、匂い応答のカルシウムイメージング法と単一細胞RT-PCR法を組合せた方法を採用した。この方法は、嗅細胞では匂いに応答して細胞内カルシウムイオン濃度が上昇するという事実と、嗅細胞はそれぞれ一種類の受容体のみを発現しているという知見に基づいている。この方法は、匂い受容体の heterologous な細胞系での機能解析が難しいということ、匂い物質の数が膨大になると言う嗅覚受容体研究の困難さに対して有利な手法と言える。

まず BALB/c マウスの嗅上皮を培養皿上で個々の嗅細胞に分離した後匂い刺激に応答して引き起こされる細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。カルシウム指示薬 fura-2 AM を用い Argus 50/Ca システムで指示薬の蛍光強度の変化を測定し、細胞内カルシウムイオン濃度変化を算定した。匂い物質の濃度は 300 μ M から 1 mM とした。次に、匂い刺激に対しカルシウム応答を示した細胞を回収し、嗅覚受容体に保存されたアミノ酸配列からデザインしたプライマーを用い、RT-PCR 法によってその細胞に発現されている受容体遺伝子を増幅した。

みどりの香りに応答し細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を示す嗅細胞が 81 個観察され、嗅細胞がこれらの構造的に類似した化合物を細胞固有の応答特性に則り識別している可能性が示唆された。今回観察された嗅細胞の応答特性は 26 種類である。官能基の種類に着目すると大きくアルデヒドだけに応答する細胞、アルコールだけに応答する細胞、両方に応答する細胞の 3 種類に分けられ、

全応答細胞中それぞれ 81.5%、7.4%、11.1%であった。応答特性で最も多く観察された嗅細胞は、*n*-hexanal と *trans*-2-hexenal に応答するもので 31 個 (38.3%)、次に *n*-hexanal に応答するもので 22 個 (27.2%)であった。その他の応答特性を示した嗅細胞の個数は 1~3 個であった。

次に、みどりの香りのうち *n*-hexanal 単独にカルシウム応答を示す一つの嗅細胞を、マイクロキャピラリーで採取した。この嗅細胞より mRNA を抽出し逆転写反応によって cDNA を得た後、単一細胞 RT-PCR を行い、約 390bp の PCR 産物を得た。この配列をプローブにしてマウス嗅上皮 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、ORF の全長を含むマウス嗅覚受容体をコードすると考えられる 1 個の cDNA クローン *mgor1* を単離した。塩基配列を解析したところ、*mgor1* の ORF は 942bp の塩基配列をもち、313 アミノ酸残基からなる新規のタンパク質をコードしていた。その遺伝子産物は、予想通り 7 回膜貫通型受容体の構造を有しており、既知の嗅覚受容体と高い相同性を有していた。もっとも相同性が高かった既知の嗅覚受容体はマウス S18 で、アミノ酸同一性は 58.3%であった。よく知られたラット I7 とのアミノ酸同一性は、28.5%であった。*mGOR1* は、他の嗅覚受容体と第 2、第 3、第 6、第 7 膜貫通ドメインおよび第 2、第 3 細胞内領域で特に高い相同性を示した。*mGOR1* はヒト、マウスおよびラットの嗅覚受容体と同様に G タンパク質共役型受容体に共通した構造がよく保存されていた。さらに、プロテインキナーゼ C によるリン酸化のターゲットと推定されるセリン残基が C 末端領域 (S308) に存在した。

培養細胞発現系での嗅覚受容体の機能解析を目的として、*mGOR1* の培養細胞内での局在を二つの方法で確認した。はじめに、受容体の C 末端に緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) を付加した遺伝子を HEK293 細胞に導入した。共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、GFP の蛍光は細胞質に強く、受容体の細胞膜移行が不良であることが示唆された。次に、受容体タンパク質の N 末にヘマグルチニンの 9 アミノ酸残基からなるエピトプタグ (HA) を標識として付加した遺伝子を同様に HEK293 細胞に導入し、抗 HA 蛍光抗体で染色した後、フローサイトメトリー法によって観察した。蛍光抗体によって

染色された細胞数は受容体を発現させたものと発現させないものとの間で差が認められず、GFP 標識の場合と同様に受容体の細胞膜移行が極めて不良であることが示唆された。

結論として次の三点が上げられる。

1. マウス嗅上皮にみどりの香りにカルシウム応答を示す嗅神経細胞が合計 81 個観察された。みどりの香りに応答する細胞はそれぞれの応答特性に則って匂い物質に応答を示した。応答特性別に見ると *n*-hexanal と *trans*-2-hexanal に応答する細胞が最も多く観察され全応答細胞数の 38.3%であり、次に *n*-hexanal に応答するもので 27.2%であった。応答特性は大きく、アルデヒドに応答するもの、アルコールに応答するもの、その両方に応答するものの三群に分けられ、官能基の種類が嗅細胞の応答特性を決める最大の要因と考えられた。
2. 一つの嗅細胞は複数のみどりの香り物質に応答した。一つのみどりの香り物質は複数の応答特性を持つ嗅細胞によって認識された。ほとんど全ての場合、嗅細胞は一種類の嗅覚受容体を発現していると考えられることから、嗅細胞の応答特性は嗅覚受容体タンパク質のリガンド特異性を間接的に示している。すなわち、みどりの香りによる匂い刺激に於いて、複数の匂い物質にさまざまな強さで親和性を持つ複数の嗅覚受容体が活性化され、それらの組み合わせが匂いの識別に重要であることを強く示唆している。
3. みどりの香りのうち、特に *n*-hexanal に応答する単一の嗅細胞から RT-PCR 法によって新規の嗅覚受容体 (mGOR1) 遺伝子の部分配列を得、その嗅上皮 cDNA ライブラリーをスクリーニングして全長と考えられる cDNA を単離した。この受容体は 7 回細胞膜を貫通する GPCR に保存された構造を有しており、既知の嗅覚受容体と高い相同性を有していた。RT-PCR による臓器別発現解析の結果この受容体は嗅上皮に選択的に強い発現が見られた。嗅球にも非常に弱いながら発現が見られた。されにこの受容体は培養細胞における発現系では効果的に細胞膜に輸送されないことが明らかになった。