

## 論文内容の要旨

論文題目 匂い刺激による嗅覚受容体の活性化および

脱感作に関する生化学的解析

氏名 加藤 綾

### [序論]

我々の周りには常に匂いが存在する。その匂い環境は決して一定ではなく、匂いを構成する分子の種類も濃度も刻一刻と変化する。周囲の匂い環境の変化を察知するセンサーとして働くのが、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) ファミリーに属する嗅覚受容体である。GPCR は、リガンドの結合に伴い構造を変化させて G タンパク質を活性化し、その後すぐに脱感作することが知られている。嗅覚系においても、生物が常に変化する匂い環境に対応するために、匂い受容機構の最初のステップである嗅覚受容体が素早く活性化し、また素早く不活性型に戻り、次の匂い受容に備えることが重要であると考えられる。しかし、嗅覚受容体-匂い分子間の相互作用や構造活性相関が明らかになる一方で、嗅覚受容体-G タンパク質間の相互作用や、嗅覚受容体の脱感作 (不活性化) の分子メカニズムについては未解明なままである。そこで本研究は、嗅覚受容体が G タンパク質を活性化する際の分子機構、および嗅覚受容体の脱感作機構の解明を目的とした。

### [結果]

#### 1. 嗅覚受容体における G タンパク質活性化機構の解明

##### 1) 嗅覚受容体と G タンパク質の共役に関与するアミノ酸の同定

嗅覚受容体は、嗅神経細胞において Gs タイプの G タンパク質である G $\alpha$ olf と共役する。そこで本研究ではまず、HEK293 細胞を用いて mOR-EG と G $\alpha$ s の共役に関わるアミノ酸の同定を試みた。mOR-EG を HEK293 細胞に発現させアゴニストであるオイゲノール (EG) で刺激を行う

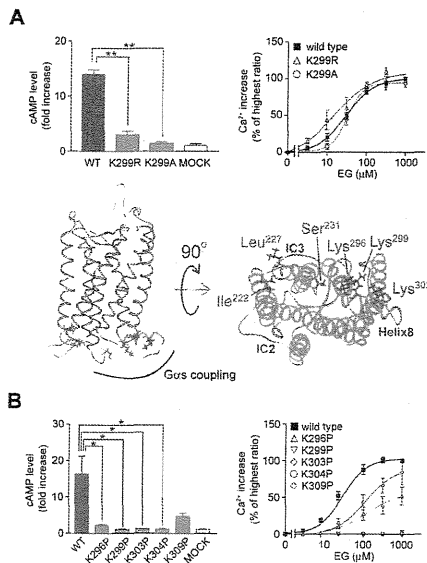


図 1. G タンパク質との共役に関与するアミノ酸の変異体解析  
(A) Lys299 変異体の匂い応答解析 (上, n=3-5, \*\*p<0.01), 本実験より明らかになった Gαs との共役に関わるアミノ酸残基 (下), (B) 8 番目のヘリックスにおける Pro 変異体の匂い応答解析. n=3-5, \*p<0.05

上昇は野生型と同様であるが、Gαs を介した cAMP 産生が顕著に低下するという表現型が認められた[図 1A]。Ca<sup>2+</sup>上昇が野生型と変わらないという結果は、mOR-EG と EG との結合が正常であることを示している。このことから、これらのアミノ酸が Gαs との共役に関与することが示唆される。興味深いことに、C 末端に存在する 8 番目のヘリックス構造内のアミノ酸の Pro への変異体では、どちらのアッセイ法においても匂い応答が完全に消失した[図 1B]。Pro はヘリックス構造を壊すアミノ酸として知られているため、8 番目のヘリックス構造が嗅覚受容体と G タンパク質の相互作用に必須の機能を担うことが示唆される。

## 2) リガンド結合に伴う嗅覚受容体の構造変化に関する解析

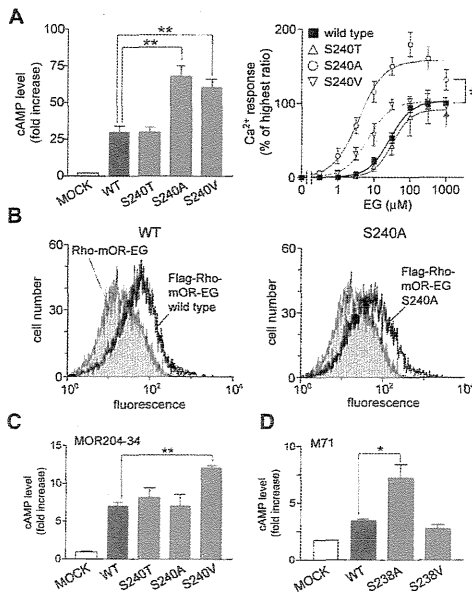


図 2. KAFSTC モチーフ内の Ser 変異体の匂い応答解析

(A,B) mOR-EG の Ser240 変異体での匂い応答解析 (A, n=3-5, \*p<0.05, \*\*p<0.01), およびフローサイトメトリー(B), (C,D) MOR204-34 (C)および M71 (D) の Ser240 変異体での cAMP 応答. n=3-4, \*p<0.05, \*\*p<0.01

と、mOR-EG は細胞内在性の Gαs と共役し、細胞内 cAMP 量が増加する。一方、様々な GPCR と共役する Gα15 と mOR-EG を共発現させ EG 刺激を行うと、mOR-EG は Gα15 と共役し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇が引き起こされる。そこで、G タンパク質と相互作用すると予想される細胞内領域に存在するアミノ酸の部位特異的変異体を作製し、共役する G タンパク質が異なる cAMP アッセイ法および Ca<sup>2+</sup>イメージング法によって匂い応答解析を行った。

その結果、細胞内第 3 ループおよびカルボキシル末端 (C 末端) に位置する複数の変異体において、Gα15 を介した Ca<sup>2+</sup>

上昇は野生型と同様であるが、Gαs を介した cAMP 産生が顕著に低下するという表現型が認められた[図 1A]。Ca<sup>2+</sup>上昇が野生型と変わらないという結果は、mOR-EG と EG との結合が正常であることを示している。このことから、これらのアミノ酸が Gαs との共役に関与することが示唆される。興味深いことに、C 末端に存在する 8 番目のヘリックス

嗅覚受容体が属する GPCR は、アゴニストの結合に伴い構造を変化させ、その構造変化により G タンパク質を活性化することが知られている。その際、3,6 番目の膜貫通部位 (TM3,6) の動きが G タンパク質の活性化に重要であることが、ロドプシンなどでの実験より明らかとなっている。嗅覚受容体においては、TM6 に位置する Phe252 の Leu 変異体でアンタゴニストによる阻害活性が消失することが示されている。この結果から、Phe252 がアンタゴニストと安定な結合をとり、受容体構造を不活性型に維持するものと考えられる。そこで、TM6 内アミノ酸の部位特異的変異体を解析し、嗅覚受容体の構造変化にお

ける TM6 の役割を検証した。

その結果、TM6 の細胞質近傍に位置する Ser240 の変異体で、匂い応答が野生型に比べ顕著に上昇するという結果が得られた[図 2A]。これらの変異体の細胞膜における発現量は野生型と変わらないため[図 2B]、変異導入により mOR-EG による G タンパク質活性化効率が上昇したと考えられる。次に、この表現型が嗅覚受容体ファミリー全般に共通するものかを検証したところ、他の嗅覚受容体においても同部位への変異導入により匂い応答性の上昇が認められた[図 2C,D]。この Ser は嗅覚受容体ファミリーに高く保存された KAFSTC モチーフの中に位置しており、KAFSTC 内 Ser が受容体の活性調節に重要な役割を果たすことが示唆される。

## 2. 嗅覚受容体の脱感作機構の解明

アゴニストによって活性化した GPCR は、活性型の GPCR を特異的にリン酸化する GRK (G-protein coupled receptor kinase) などのキナーゼによってリン酸化され、脱感作することが知られている。しかし、個体レベルでの匂いの順応現象はよく知られている一方で、嗅覚受容体そのものに焦点を当てた脱感作機構の解析はほとんどされていない。そこで、mOR-EG を用いて嗅覚受容体の脱感作機構の解明を試みた。

まず、アゴニスト刺激によって mOR-EG のシグナル伝達活性が低下するかを検証するために、野生型 mOR-EG を発現する

HEK293 細胞を低濃度の EG で前処理し、その後の EG 刺激に対する cAMP 産生量を測定したところ、コントロールに比べ有意に EG 応答が低下することを見出した[図 3A]。この EG 応答の抑制は、mOR-EG のリガンドでない匂い分子 (AA) や、mOR-EG と同様に  $G_{\alpha s}$  と共役する  $\beta_2$  アドレナリン受容体のアゴニスト (Iso) で前処理を行った場合には認められない。このことから、細胞内情報伝達に参与する分子ではなく、mOR-EG 自体のシグナル伝達機能がアゴニスト刺激によって減弱したことが示唆される。

次に、この mOR-EG のシグナル伝達機能の低下がどのようなメカニズムによって引き起こされるかを解析した。まず、EG 刺激による mOR-EG のシグナル伝達機能の低下が、mOR-EG の細胞内移行によるものかを検証するために、EG 刺激を行った後に細胞膜上受容体数の定量を行った。その結果、これまでに細胞内移行することが示されているムスカリン性アセチルコリン受容体などとは異なり、mOR-EG を発現する細胞では EG 刺激による細胞膜上受容体数の低下が認められなかった[図 3B]。このことから、mOR-EG は脱感作の過程で細胞内移行しないことが示唆さ

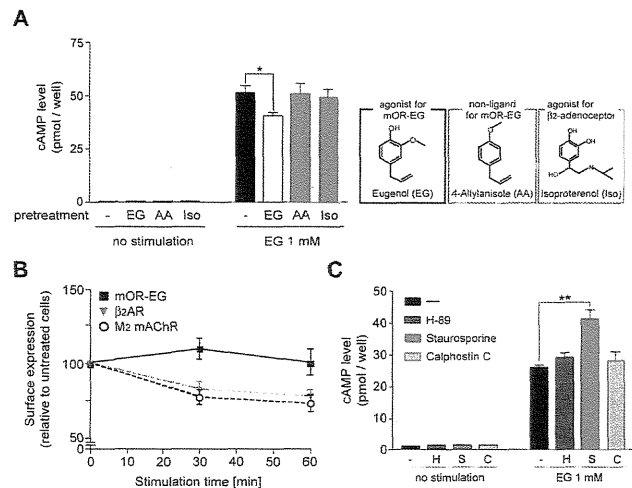


図3. HEK293 細胞における mOR-EG の脱感作機構の検証

(A) HEK293 細胞での mOR-EG の前処理実験。n=4, \*p<0.05, (B) 各アゴニストで刺激した細胞での膜上に発現する受容体数の定量。n=3-7, (C) キナーゼインヒビターで処理した細胞での cAMP アッセイ n=3, \*\*p<0.01

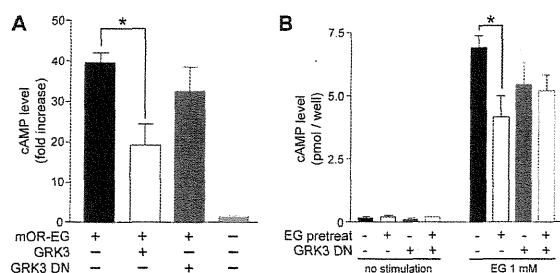


図4. mOR-EGの脱感作へのGRK3の影響

(A) GRK3もしくはGRK3のdominant negative(DN)体とmOR-EGを共発現させたHEK293細胞でのcAMPアッセイ。n=4, \*p<0.05, (B) GRK3のdominant negative体とmOR-EGを共発現させたHEK293細胞での前処理実験。n=4, \*p<0.05

れる。次に、セカンドメッセンジャー依存的に活性化されるキナーゼであるPKAやPKCの特異的な阻害剤(H-89, Calphostin C)や、幅広いキナーゼを阻害するStaurosporineで前処理した細胞を用いて匂い応答解析を行った。その結果、mOR-EGを発現するHEK293細胞は、StaurosporineによりcAMP産生が上昇したが、H-89およびCalphostin Cの影響を受けなかったことが明らかとなり、mOR-EGの脱感作にはStaurosporineによって阻害されるキナーゼが関与することが示唆された[図3C]。

嗅覚受容体が発現する嗅上皮には、GRKファミリーの1つであるGRK3が多く発現することが知られている。また、GRK3はHEK293細胞に内在的に発現することが報告されており、Staurosporineによる阻害を受けると考えられる。そこで、嗅覚受容体の脱感作へのGRK3の関与を検証した。まずGRK3をmOR-EGと共発現させたところ、コントロールと比べ有意にEG応答が抑制された[図4A]。このEG応答の抑制は、GRK3のdominant negative体存在下では認められなかった[図4A]。また、図3Aのようなアゴニスト前処理によるEG応答の低下は、GRK3のdominant negative体では引き起こされなかった[図4B]。これらの結果から、mOR-EGの脱感作にGRK3によるリン酸化が関わる可能性が示唆される。そこで、mOR-EGのリン酸化を直接検出することを試みた。HEK293細胞にFlag-mOR-EGおよびGRK3を過剰発現させ、EG刺激を行った後に抗Flag抗体で免疫沈降し、抗リン酸化Ser抗体でイムノプロットを行ったところ、EG刺激によりリン酸化mOR-EGのシグナルが検出された。この結果は、GRK3存在下においてEG刺激によりmOR-EGのSer残基がリン酸化されることを直接示すものである。

### [結論]

本研究では、匂い分子との結合により、嗅覚受容体が活性型へと構造を変化させGタンパク質を活性化し、その後リン酸化され脱感作するまでの一連の動態変化を分子レベルで明らかにすることを目的とした。まず、嗅覚受容体によるGタンパク質活性化における2つのステップ、すなわち嗅覚受容体の活性型への構造変化と、Gタンパク質共役に関与するアミノ酸を同定した。また活性型への構造変化や活性調節にはTM6のダイナミクスが重要であることを示した。また、アゴニスト刺激によって嗅覚受容体は脱感作し、その脱感作機構にGRK3によるリン酸化が関わることを明らかにした。

### [原著論文]

Kato A, Katada S and Touhara K (2008) "Amino acids involved in conformational dynamics and G protein coupling of an odorant receptor: targeting gain-of-function mutation" *Journal of Neurochemistry*, **107**, 1261-1270 (2008)