

## 鼻以外で発現する嗅覚受容体の機能の解明

東京大学大学院農学生命科学研究科  
応用生命化学専攻生物化学研究室

東原 和成

### 1. はじめに (背景、目的)

嗅覚受容体はGタンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) ファミリーに属する7回膜貫通型受容体である。GPCRファミリーの中で最大の遺伝子群を形成しており、鼻腔内嗅上皮において多様な匂い分子のセンサータンパク質として機能している。興味深いことに、嗅覚受容体遺伝子は、脳、精巣、脾臓、舌上皮、発生初期の心臓、筋肉など、鼻以外の組織でも発現していることが明らかにされている。なかでも、精巣と筋肉では嗅覚受容体が機能的に発現しており、それぞれ精子の走化性および筋細胞の凝集に関わっていることが示唆されている。すなわち、嗅覚受容体は化学センサーとして、鼻以外の組織細胞においても体内の情報化学物質を認識し、特定の生体メカニズムを制御している可能性がある。しかしながら、これまでに鼻以外の組織で嗅覚受容体が認識している内在性リガンドの存在を明らかにした例はない。そこで本研究では内在性のリガンドを同定し、「鼻でのにおいセンサー」以外の嗅覚受容体の生理機能を明らかにすることを目的とする。ここでは、我々が最近見出している卵子で発現する嗅覚受容体 MOR-O1 についての成果報告をする。

### 2. 方法

#### (1) アフリカツメカエル卵母細胞での嗅覚受容体の発現および電気応答測定

嗅覚受容体およびCFTR (cAMP応答チャネル) をアフリカツメカエル卵母細胞で共発現させると、リガンドの結合によって引き起こされた嗅覚受容体シグナルはCFTRを開口させ、細胞外にCl<sup>-</sup>を透過させる。これにより生じる膜電流値を二電極膜電位固定法により測定する。実際には、嗅覚受容体、CFTR、膜移行促進シャペロン (RTP1)、G $\alpha$ olf (Gタンパク質)、それぞれをコードするcRNAを合成し、卵母細胞に注入した。4日後、卵母細胞を測定用のチェンバーにセットし、二本のガラス電極を刺入した。片方の電極により膜電位を-80 mVに固定し、もう一方の電極で膜電流の変化を測定した。チェンバー内をアッセイ用の緩衝液で常に還流させている状況で刺激サンプル溶液を投与した。

#### (2) 組織抽出物の作製とリガンド精製

組織はC57BL/6系統のマウス (8-12週令) から摘出した。組織に10倍量の冷メタノールを加え、ガラスホモジナイザーを用いて組織を破碎し抽出を行った。この抽出液は、遠心濃縮システム speed vac (Savant) を用いて濃縮し、嗅覚受容体アッセイ用の緩衝液に溶解させた。一度の活性検定に、100 mg相当量の組織抽出物を100  $\mu$ lの緩衝液に溶解させたものを使用した。活性が認められた抽出サンプルは、分子量フィルターおよびSep-Pakカートリッジカラムを用いて簡易精製を行った。その後、オクタデシルシリル(ODS)基を固定相とするHPLCカラムに供して精製を行った。フォトダイオードアレイを用いて吸収スペクトルを測定することで化合物の分離を確認した。

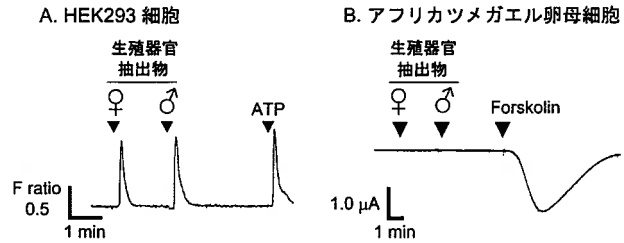
#### (3) リガンドの構造決定

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) は、GC-MS-QP2010 (Shimadzu) を用いた。キャピラリーカラムには中極性のStabilwaxカラムを選択し、ヘリウムガスを移動相として化合物の分離を行った。電子衝突イオン化法により得られたマススペクトルを検出した。ジメチルジスルフィド(DMDS)誘導体化反応は、活性画分を濃縮しヘキサン溶液50  $\mu$ lとしたものに、等量のジメチルジスルフィドと5  $\mu$ lのヨウ素溶液 (60 mgのヨウ素を 1 mlのジエチルエーテルに溶解させたもの) を加えて40°Cで15時間反応させた。反応液に含まれるヨウ素を5 %Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>O<sub>3</sub>水溶液で除き、有機層をGC-MS分析に供した。オゾン分解は、活性画分をジクロロメタン溶液としてオゾンを懸濁し、その後ジメチルジスルフィドで還元したサンプルをGC-MS分析に供した。

### 3. 結果 (研究成果)

#### (1) バックグランド応答のない効率の良い嗅覚受容体のアッセイ系の確立

リガンドをクルードなサンプルから精製・同定するにあたっての一番の問題点は、多くの培養細胞では外来導入する受容体がある無しに関わらず、クルードなサンプル刺激によってカルシウムやcAMPの上昇などの細胞応答が引き起こされることである。実際に、生殖腺由来の抽出物を、HEK293細胞などの培養細胞に投与すると、細胞内カルシウムイオンの上昇やcAMPの上昇が見られる(右図A)。



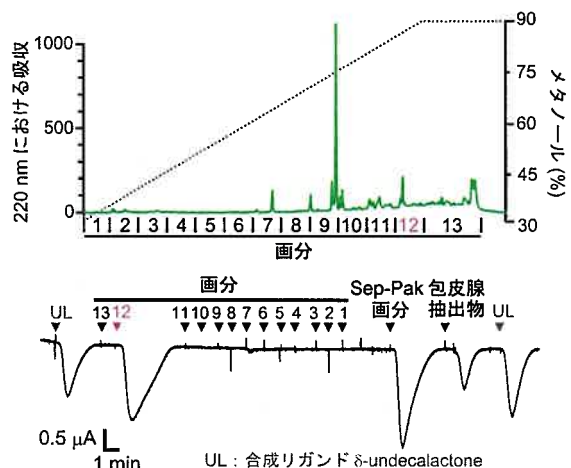
つまり、本研究を成功させるためには、抽出物でバックグランド応答がない嗅覚受容体発現系を構築することが必要である。そこで、アフリカツメカエル卵母細胞に着目したところ、抽出物に対するバックグランド電気応答がないことを見出した(右図B)。これは卵母細胞の場合、コラゲナーゼ処理をするために、内在性の膜受容体が切断され応答性が落ちたためだと考えられる。この結果をもとに、アフリカツメカエル卵母細胞で効率よく嗅覚受容体の匂い応答がとれる系を確立した。具体的には、既に合成香料リガンドがわかっている嗅覚受容体をポジティブコントロールとして、膜移行促進シャペロン (RTP1)、Gαolf (Gタンパク質)、CFTRを導入した卵母細胞で応答効率のよい条件を見出すことに成功した。

#### (2) 組織抽出液に対する嗅覚受容体の応答測定

卵子は成長、受精および発生の過程において、それぞれ卵巣、卵管、子宮に存在する。そこで、これら雌生殖器官内に卵子MOR-O1のリガンドが存在しているかどうかを調べた。雌マウス生殖器官のメタノール抽出物を作製し、MOR-O1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に投与した。その結果、抽出物は応答を引き起こし、雌生殖器官内にリガンドが存在していることが示唆された。しかし、この応答を検出するには、一度に4匹分と多数の生殖器官が必要であった。そこで、リガンドが多量に存在している他の組織を検討することにした。脳、肺、心臓、肝臓、胃、腎臓、筋肉、雄の副生殖腺、精巣、卵巣、および血液と幅広い組織を検討した。その結果、雄の副生殖腺抽出物が強い応答を引き起こし、リガンドが多量に存在していることが示唆された。さらに、この抽出物は雄マウスがもつ4つの副生殖腺の混合物として用いたが、このうちリガンドは包皮腺に存在していることが判明した。そこで、包皮腺よりMOR-O1のリガンドを同定することを目指した。

#### (3) MOR-O1のリガンド(活性物質)のカラム精製および構造決定

包皮腺抽出物を分子量フィルターに供したところ、分子量3000以下の画分に活性を見出した。さらに、溶媒分画において、有機層に抽出されることが明らかになった。これらの結果より、リガンドは疎水性の高い低分子有機化合物であることが推察された。そこで、疎水性相互作用により化合物を分離するODS ODSカラムを用いてリガンドを精製し、GC-MSを用いて構造解析を行うアプローチをとった。応答を引き起こした抽出物画分を、Sep-Pakカートリッジカラムによる簡易精製を経てHPLCに供した。右図に示すように、活性を測定しながらリガンド画分を絞り込んだところ、最終的にGC-MS分析において単一のピークを与える精製画分を得た。



このピークがどのような化合物に由来するのかを調べるためにマスペクトルを測定したところ、二重結合を一つ有する炭素数14の一級アルコールtetradecen-1-olが予測された(次ページ図A, B)。しかし、一般的にマスペクトルから二重結合の位置を推定することは困難である。そこで、活性画分について二重結合を開裂させるオゾン分解反応、および二重結合をもつ炭素にメ

チルチオ基を付加するDMDS誘導体化反応を行い、それぞれの生成物の化学構造を解析した。その結果、どちらの生成物も原料であるtetradecen-1-olが5位に二重結合をもつことを示すものであった。そこで(Z)-5-tetradecen-1-olを委託合成し、活性画分に含まれるtetradecen-1-olと同一のものであるかどうかを調べた。その結果、同一のマスペクトルを示すこと(右図BとC)、GC分析において同じ時点で溶出されること(右図D)が示された。最後に、この(Z)-5-tetradecen-1-olがMOR-O1のリガンドとなるかを検証したところ、MOR-O1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に応答を引き起こすことが明らかになった(右図E)。以上の結果より、卵子で発現する嗅覚受容体MOR-O1のリガンドとして、包皮腺より(Z)-5-tetradecen-1-olを同定した。

#### 4. 考察(まとめ)

アフリカツメガエル卵母細胞を用いて、様々な組織抽出液に対してバックグランド応答を示さない嗅覚受容体のアッセイ系を確立した。そして、卵子で発現する嗅覚受容体MOR-O1に着目し、応答を引き起こすマウス生体因子の精製・同定を目指した。その結果、逆相カラム精製および構造解析によって、(Z)-5-tetradecen-1-olを得た。鼻以外で発現する嗅覚受容体と、生体組織で作られるリガンド物質とを対応付けた初めての報告である。興味深いことに、(Z)-5-tetradecen-1-olは哺乳類では新規の化合物である。現在、雌生殖器官内にも(Z)-5-tetradecen-1-olが存在しているか、そしてMOR-O1を介してどのような生理機能を制御しているかについて解析中である。

創薬の主要なターゲットとされるGPCRファミリーの中で、嗅覚受容体は約半数を占めている。しかし、嗅覚受容体は創薬のターゲットから外される。それは、嗅覚受容体は感覚受容体であり、体内の生理機能に関与しないと考えられていたためである。嗅上皮以外の組織における嗅覚受容体の機能を明らかにすることは、創薬のフィールドを広げる面からも意義深いし、嗅覚受容体による生体内分子のセンシングという、新たな生命機能の維持戦略が見えてくることが期待される。

#### 5. 学会発表

1) Keiichi Yoshikawa, Hiroyuki Nakagawa, Naoki, Mori, Hidenori Watanabe and Kazushige Touhara "Z)-5-tetradecen-1-ol produced in the male preputial gland as a natural ligand for an odorant receptor in mice." The 34th Association for chemoreception science, California, U.S.A 2011年4月13-17日

2) Keiichi Yoshikawa, Hiroyuki Nakagawa, Naoki, Mori, Hidenori Watanabe and Kazushige Touhara "Exocrine gland secretion-based deorphanization of an odorant receptor: A strategy for searching a physiological ligand." 日本味と匂学会第45回大会、金沢(2011年10月5-7日)

3) Keiichi Yoshikawa, Hiroyuki Nakagawa, Naoki, Mori, Hidenori Watanabe and Kazushige Touhara "Searching a physiological ligand for an olfactory receptor" The 9th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, Kyushu Univ. 2011年11月4-6日

