

2013年 12月 12日

## 学位論文の内容の要約

氏名	福谷 洋介
学位の種類	博士（工学）
学府又は研究科・専攻	工学府 生命工学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	匂いセンサー開発を目的とした嗅覚受容体発現酵母の構築

## 【論文の内容の要約】

嗅覚は多くの高等生物が生まれながらにして持つ感覚あり、高感度な化学物質センサーとして機能している。しかし、科学技術の進歩した現代においても、嗅覚の感度と選択性に勝る人工の匂いセンサーは開発されていない。哺乳類動物は嗅覚受容体と呼ばれる Gタンパク質共役受容体(GPCR)を介して、空気中の化学物質を感知している。嗅覚の優れた識別能が嗅覚受容体の多様性にあることから、嗅覚の高識別能を模倣した匂いセンシングシステム応用への期待は高い。しかしながら、嗅覚受容体は他の GPCR と比べて異種細胞での機能的発現が困難な受容体である。そのため、高識別能を持つ嗅覚受容体発現細胞の構築にはまだ多くの改良が必要であるとともに、嗅覚受容体の研究に一般に用いられている哺乳類由来の培養細胞を用いた場合には、細胞の培養などの問題から汎用的で実用的なセンサーの開発は困難であると考えられている。

そこで、真核単細胞生物でありながら耐環境性が高く、哺乳類由来 GPCR の発現性も良い出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に着目した。*S. cerevisiae* に嗅覚受容体を発現させ、標的となる匂いに応答する酵母を構築することで、将来的な匂いセンサーの基礎となる嗅覚細胞として利用できると思われる。また、実用的な嗅覚酵母を構築するためには、嗅覚受容体を機能的に発現させることだけでなく、発現させた嗅覚受容体の機能を簡易かつ定量的に評価することが必要である。その課題に対し、酵母内在のフェロモン受容体シグナル伝達経路を利用し、嗅覚受容体のリガンド結合に応じて酵母内にホタルルシフェラーゼを発現させ、その酵素活性によって生じる発光を計測する一連のシステムを構築することを本研究の目的とした。

まず、出芽酵母を宿主細胞に用いた嗅覚受容体の機能的発現、およびホタルルシフェラーゼを利用した嗅覚受容体ルシフェラーゼアッセイシステムの基盤構築に取り組んだ。モデル嗅覚受容体として、ジニトロトルエン (DNT) を認識すると示唆されるマウス由来 mOR226 に、既に出芽酵母での単独発現が報告されているラット由来 I7 の配列で N 末端および C 末端領域を置換したキメラ mOR226 の N 末端置換部位の最適領域を検討した。構築した各種キメラ mOR226 発現酵母に対し、免疫蛍光染色による mOR226 の細胞膜局

在確認や DNT 応答性をリガンドアッセイで試験した結果、mOR226 の第一膜貫通領域までをラット I7 のアミノ酸配列でキメラ化した受容体が細胞膜局在と DNT 応答に依存するルシフェラーゼ活性が高く、嗅覚受容体の N 末端のキメラ化の効果を示された。さらに、G タンパク質 $\alpha$ サブユニットに嗅覚受容体特異的な G $\alpha$ である Golf を共発現させたところ、発現させたキメラ mOR226 の DNT 反応性が向上したため、G タンパク質の置換が嗅覚受容体を起因とするシグナル伝達効率を改善させることを示した。

続いて、より明確なりガンド応答を検出できる嗅覚酵母を構築するために、ホタルルシフェラーゼを用いた嗅覚受容体リガンドアッセイシステムの条件最適化を行うこととした。本アッセイシステムでは出芽酵母のフェロモンシグナル伝達の下流で転写誘導されるプロモーターを用いている。そこで、レポーター遺伝子発現に一般的に用いられる *Fus1* プロモーターと今回新規に *Fig1* プロモーターに対し、本アッセイシステムのホタルルシフェラーゼの発現に適したプロモーターを比較検討した。評価の指標として、酵母フェロモン受容体 Ste2 受容体とそのリガンドである $\alpha$ -factor を用いた。Ste2 受容体高発現酵母に対したりガンドアッセイの結果、*Fig1* プロモーターを用いた方が Ste2 受容体のリガンド添加時における発光の S/N 比が約 4 倍高かったことから、*Fig1* プロモーターが本リガンドアッセイシステムに適したプロモーターであると結論づけた。さらに、出芽酵母 GPCR シグナル伝達の抑制遺伝子である *sst2* および *far1* 欠損酵母を用いて、野生型酵母と比較することで、最も高い S/N 比で Ste2 受容体リガンド応答を確認できる条件を確認した。以上のことから、現時点で最適な酵母株およびルシフェラーゼアッセイ条件が構築できたと結論付けた。そこで、嗅覚受容体 mOR226 発現酵母に対して、最適化したアッセイ条件で試験したところ、最適化前と比べ約 40%高い DNT 応答を示すことができた。しかしながら、他の哺乳類 GPCR 発現酵母のリガンド応答と比較すると、その応答性が低かったことから、免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、嗅覚受容体の酵母細胞膜での局在数が少なく、また本来 GPCR が機能を発揮する状態であるホモ二量体を形成していないと示唆されたため、嗅覚受容体の細胞膜への局在を改善する必要があると示唆された。

最後に、酵母における嗅覚受容体の機能的発現を向上させるため、嗅覚受容体の膜輸送を補助するアクセサリタンパク質である Receptor Transport protein 1 short (RTP1s) の利用を試みた。RTP1s を共発現させることで、酵母における機能的発現がこれまで乏しかったマウス OR-EG の細胞膜局在とリガンドであるオイゲノールへの OREG 発現酵母の応答性が向上した。他の哺乳類由来嗅覚受容体に対しても試験した結果、ヒト OR7D4 と RTP1s の共発現酵母において、OR7D4 のリガンドであるアンドロステノンに対する応答を示した。さらに、疎水的で水に溶けにくい匂い分子を効率よく培地に溶解させ、嗅覚受容体と効率よく結合させるため、匂い結合タンパク質 (Odorant binding protein; OBP) の添加によって、嗅覚受容体発現酵母のリガンド応答が変化するかどうか試験した。その結果、匂い分子と OBP 間、さらに OBP と嗅覚受容体間の特異性の存在が示唆されるものの、OBP の添加により嗅覚受容体発現酵母の匂い分子応答が向上した。以上の結果から、既知の嗅

覚受容体の機能を促進させるアクセサリタンパク質は、出芽酵母で発現させる場合においても機能を発揮し、嗅覚受容体の匂い分子認識を向上させることができると結論づけた。

今後は、構築した嗅覚酵母をさらに改良し、最終的な嗅覚センサーとしての実用化を目指す。出芽酵母における嗅覚受容体の発現に関しては、膜タンパク質シャペロンなどを導入することで、嗅覚受容体の細胞膜局在に必要な因子を解明し、嗅覚受容体をより多く細胞膜に持つ酵母を構築することが期待される。また、より短時間でのリガンドアッセイが可能なアッセイシステムを構築し、短時間かつ高感度に匂い応答が可能な酵母の構築が期待される。