

## 研究終了報告書

### 「共有結合修飾を伴う哺乳類嗅覚受容体の新規活性化機構」

研究期間：2020年11月～2023年3月

研究者：福谷 洋介

#### 1. 研究のねらい

環境中には多種多様な分子が存在し、生物はその分子を感じ各々の生命活動を営んでいる。嗅覚で感じる分子(ニオイ分子)の広い定義は「嗅覚受容体と化学結合し、嗅覚神経細胞を活性化する分子」と言える。哺乳類の嗅覚受容体(Olfactory receptors、以下 ORs)は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に属する7回膜貫通タンパク質で、ヒトでは約400種、マウスでは約1100種のORsが機能している。ORsは特定のニオイ分子と結合すると構造が変化し、細胞内で共役するGタンパク質を通じて細胞応答を引き起こす。嗅覚神経細胞は1種類のORsを選択的に発現しており、ORsごとに異なる応答信号が脳に伝達されることで、嗅覚知覚が起きる。それゆえ、ORsの種類が多く、嗅覚神経細胞の数が多いほど、ニオイのパターン認識の分解能が増し、嗅覚の機能性が高くなる。哺乳類のニオイ認識機構解明と嗅覚を模倣したセンシング技術開発に対する期待は大きいものの、未だに嗅覚のニオイの高検出と識別能を発揮する原理は解明されておらず、嗅覚に筆跡する分析能を持つ実用的なニオイセンサーも開発できていない。

ORsと結合し活性化を誘導するアゴニストとして作用するニオイ分子には、低分子化合物からペプチド、タンパク質まで報告されており、ORsには様々な活性化様式があると考えられる。ニオイ分子にはアルデヒドや硫黄化合物など高い反応性を持つ低分子化合物も多い。また、Transient receptor potential(TRP)チャネルとCovalent modification(共有結合修飾)をすることで活性化を誘導するチアゾール化合物も、ORsを活性化することが報告されている(Wang et al., *Nat Commun*, 2018、Jiang et al., *Nat Neurosci* 2014)。これら高い反応性を示すニオイ分子について、ORsとの結合様式のみならず応答するORsすら分かっていないものが多い。ORsと反応性の高いニオイ分子の中にはORsと共有結合修飾を形成し、活性化させる新規メカニズムがその存在する可能性を考えた。これらの背景から、分子間の共有結合修飾によりORsの新たな活性化機構の解明を目的とし本研究を実施した。本研究で目指すORsとニオイ分子間の化学反応機構の追求は、生物が発達させてきた環境検知能力の理解を深める。さらに嗅覚の基本原理解明だけでなく、実用化が期待されている嗅覚を模倣した次世代の疾病診断や香りを利用する様々な産業分野の技術革新にも大きく貢献することが期待される。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、Gタンパク質共役型受容体である哺乳類ORsとリガンドとなるニオイ分子の活性化機構に関する研究を実施した。マウスやヒトで検出閾値が低く、分子自体そのものの反応性が高いニオイ分子とその分子に応答するORに焦点を当てた。チアゾリン化合物がORのシステインと共有結合修飾を形成するか検証した。2-methyl-2-thiazoline(2MT)に応答するマウスOlf1132において、第3膜貫通ドメインのシステインが2MT応答に重要な残基であると同

定した。さらに、Olfr1132 には N 末端と細胞外第 2 ループ(ECL2)間に形成される特徴的な分子内のジスルフィド結合をもち、Olfr1132 の機能発現に必須であることが分かった。合成したアルキル化 2MT を用いて、Olfr1132 と 2MT との共有結合修飾形成の評価を進めているが、Olfr1132 の発現量が少なく、その確認には至っていない。2MT と同様に、トリメチルチアゾリンに応答するマウス OR のうち、システイン残基を重要残基とする OR の同定に成功した。

分子応答性が高いニオイ分子に応答する OR の網羅的スクリーニング基盤を確立した。モデルとしたシナモンとシナムアルデヒドの応答を評価でき、基盤構築に成功した。次に、構築したスクリーニング法により、アセトアルデヒド受容体とアンモニア受容体の同定に成功した。動物種のホモログでも高いリガンド応答性が確認された認識機構が生物種間で保存されていることが示唆された。

機能性 OR の生産法として、リポソームを合成場とするコムギ胚芽無細胞タンパク質合成手法を構築した。高発現性 OR をリポソーム上に合成し、Mini-G タンパク質を利用したアゴニスト応答性を開発し、応答を確認することに成功した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「嗅覚受容体の分子認識における共有結合修飾の実証」

ORs の共有結合修飾に伴う活性化機構の検証におけるモデルとして、2-methyl-2-thiazoline(以下、2MT)ならびに 2,4,5-trimethyl-1,3-thiazoline(以下、TMT)を対象として研究を行った。

#### A-1-1 第 3 膜貫通ドメインに位置する Cys105 が Olfr1132 のリガンド認識部位

まず、2MT に対して強く応答し、還元剤添加条件下で 2MT 応答が無くなるマウス ORs を探索し、その中から条件に合う Olfr1132 を対象とした。Olfr1132 の非保存性システインのうち N 末端 6 番目の Cys6 と第 3 膜貫通ドメインに位置する Cys105 が Olfr1132 の 2MT 応答に重要であることを発見した。Olfr1132 の Cys105 を他のアミノ酸に置換した変異体はいずれも細胞膜局在は変化せず、2MT 応答性が著しく低下した。Olfr1132 と 2MT のドッキングシミュレーションでは、Cys105 周辺のポケットに 2MT が収まった(図 1)。Olfr1132 の

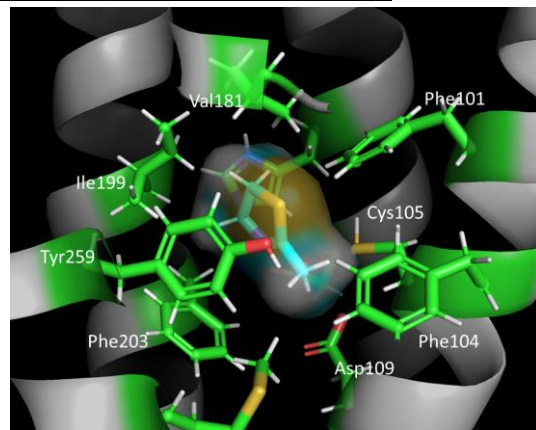


図 1 Olfr1132 の 2MT ドッキングシミュレーション  
Cys105 を含むポケット内に 2MT が配意する。

構造は Alphafold によるものであるものの、Cys105 の 2MT 認識の寄与は確認された。次にアルキル化 2MT を合成し、Olfr1132 が応答することを確認した上で、Olfr1132 が 2MT と共有結合修飾を形成するか試験した。Olfr1132 発現 HEK293T 細胞のライセートに対してアルキル化 2MT を添加後、クリックケミストリー反応によりビオチン化した。ストレプトアビジンビーズでプルダウン後の溶液の ORs の存在をウエスタンブロットにて調べたが、Olfr1132 を確認できなかった。Olfr1132 の細胞での発現量が少ないため、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成を用いて

Olf1132 が埋まったプロテオリポソーム上の合成を確認した。しかし、Olf1132 の 2MT に対する応答活性を確認できなかった。コムギ胚芽無細胞合成反応液中に含まれる高濃度 DTT の影響が考えられた。Olf1132 は下記のように N 末端と ECL2 間の分子内ジスルフィド結合が機能に重要であるため、高濃度の DTT 存在環境での合成によって Olf1132 が正常な構造を取れずに正常な活性をとらない構造でリポソーム上に合成された可能性が考えられた。

#### A-1-2 Olf1132 の N 末端システインの役割-新規の分子内ジスルフィド結合の発見

哺乳類 ORs において、N 末端領域に存在するシステインは保存されていないことから、Olf1132 の N 末端システインの重要性を調べた。N 末端システインの位置が異なる変異体 Olf1132 を構築した。細胞膜局在とリガンド応答性を評価した結果、N 末端にシステインをもつ場合は Olf1132 は機能活性を維持した一方で、システイン欠損体やシステインの位置によって Olf1132 の機能が消失した。AlphaFold2 を利用し、Olf1132 構造モデルを検証したところ、Olf1132 の Cys6 が第 2 細胞外ループ(ECL2)の Cys167 と分子内ジスルフィド結合を形成するモデルが構築された。Olf1132 の C167S 変異が同様に Olf1132 の細胞膜発現を消失させたため、この分子内ジスルフィド結合は Olf1132 の機能発現に必須であることが分かった。このことから ORs の N 末端 Cys と ECL2 間に形成される分子内ジスルフィド結合は、特定のニオイ分子との結合能を発揮する構造形成に重要な役割をすることを初めて発見した。

#### 研究テーマ B「高活性ニオイ分子に反応する嗅覚受容体の探索と応答作用機構の解析」

チアゾール以外の高反応性分子としてアルデヒド、およびアンモニアに対して応答を示す ORs の探索を実施した。アルデヒド類は、タンパク質のアミノ基やリジンのアミノ基とのシッフ塩基の形成がされる可能性がある。アンモニアについては、分子量 17 の最小のニオイ分子であり嗅覚閾値は低い一方で、これまで応答する受容体は同定されていない。

#### B-1 ヒト嗅覚受容体の網羅的スクリーニング基盤の構築

ヒト ORs は約 400 種程度であるため網羅的スクリーニングを実施しやすいことから、ヒト OR の網羅スクリーニングプラットフォームを構築した。その実証試験として、シナモン香の主成分であるシナムアルデヒドに反応するヒト OR を気相刺激法によって網羅探索し、シナムアルデヒドと天然シナモン香に対して反応するヒト OR の探索に成功し、実験手法の実用性を示した。

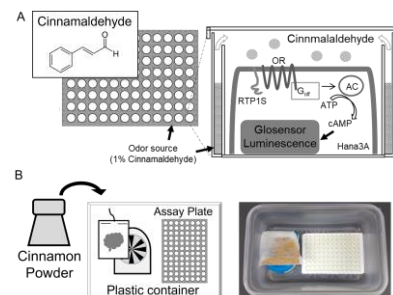


図 3 気相刺激による OR 探索方法  
A: 気相刺激による Glosensor アッセイ  
B: 固形香料に対する刺激方法

#### B-2 アセトアルデヒド反応 ORs の同定と機能解析

ヒトの嗅覚反応閾値が低く、分子の反応性が高いアセトアルデヒドに反応するヒト OR のスクリーニングを行った結果、OR6B1 がアセトアルデヒドに反応する唯一のヒト OR であることを同定した。OR6B1 は哺乳類で広く保存されている 3 つの受容体のうちの 1 つであった。

#### B-3 アンモニア反応する GPCR の同定と反応機構解析

アンモニアは分子量 17 の最小のニオイ分子である、アンモニア応答性受容体のスクリーニングにより、アミン類に応答する微量アミン関連受容体の TAAR5 が唯一アンモニアに応答した。TAAR5 の詳細なアンモニア応答機構の解析を進めたところ、アンモニア水やアンモニウム塩水溶液といった溶液での刺激では TAAR5 が応答性が悪かったことから、その分子認識機構の解明に向けた試験を継続している。

## 研究テーマ C「精製タンパク質を利用した嗅覚受容体の分子認識機構解明」

### C-1 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成と Mini-Golf による機能性 OR の獲得・評価法の開発

ORs とニオイ分子間の結合という最も上流の反応を解明には、精製タンパク質を用いる分析が必要となるが、ORs は不安定であり発現量が少なく精製も困難である。高純度な ORs の獲得と共有結合修飾の明確な評価を行うため、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成による OR 合成法の開発を進めた。Mini-G タンパク質による無細胞合成 OR のリガンド結合評価法を開発した。Mini-G タンパク質は、GPCR とリガンド結合依存的に共役する G タンパク質  $\alpha$  サブユニットの変異体である。ORs と相互作用する  $G_{\alpha olf}$  の mini-Golf を大腸菌組み換え体で発現、精製した。試験モデルとして、安定性が高い hOR52 をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成よりプロテオリポソーム上に合成した。

hOR52 含有リポソームと Mini-Golf-GFP 融合体を混合し、アゴニスト添加による、hOR52 と mini-Golf-GFP の結合を確認した。このことから、mini-Golf を用いた新規 hOR52 タンパク質のリガンド結合解析に成功した。さらに、無細胞合成した hOR52 をグラフェン電解効果トランジスタセンサに搭載し、hOR52 選択的なノナン酸応答の検出を実証した。現在他の OR についても同手法での合成と機能解析を進めている。

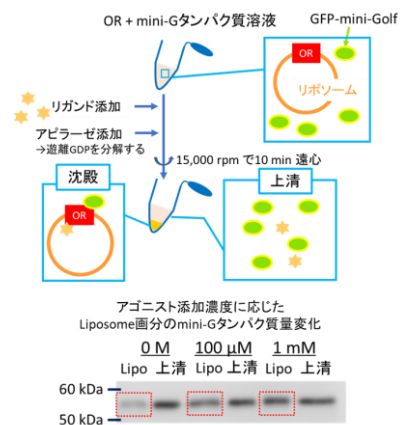


図 5 Mini-G を使った OR リガンド応答評価方法と結果

### 3. 今後の展開

申請課題の主課題であるチアゾールと OR の共有結合修飾に伴う活性化機構の解明には現在までに至っていないが、嗅覚受容体とチアゾールが共有結合をしているかについては分解能が低い状態ではあるが、一定の確認をすることができた。他にも高い反応性をもつニオイ分子は他にもあるため、新たなクリックケミストリーが可能な分子の合成、OR の高発現化と高純度な機能性 OR の生産、OR のリガンド応答解析などを洗練することで、OR のニオイ分子応答機構の解析を進めていくことを検討している。本研究を通じて、これら、様々な OR の機能解析に向けた基盤技術の構築が達成できた。今回対象としたチアゾールに応答する OR も複数種類があるため、OR 毎に異なる活性化機構があるとすれば、生物の嗅覚の複雑なメカニズムの解明がまた一歩進むと考えられる。高い反応性を持つニオイ分子について、ヒトの閾値の低い悪臭分子に応答する受容体を同定した。これら常温で気体の分子は、分子自体の反応性も高く、応答する OR との反応機構の解明は興味深いことから、引き続き研究を進めていき、次年度中には成果として

公表できることを目標とする。嗅覚を模倣した技術は未だに開発が進んでいないことから、今後 OR とニオイ分子の応答関係に関する知見を深め、OR ニオイを制御する新規香料開発技術、ならびにニオイを指標とする疾病診断といったニオイを対象とする様々な技術開発に展開していくことを今後の目標とする。

#### 4. 自己評価

主目的である共有結合修飾による嗅覚受容体の活性化機構の解明には残念ながら至らなかった。アルキル化分子の合成に時間を要した点、受容体が特異的な分子内ジスルフィド結合をもつ受容体であったことで予定していた手法に適さなかった点などが想定外であったが、分子内ジスルフィド結合の重要性等の新規の発見に繋がった点は取り組んだ価値があった。本目的においては、TMT とマウス OR が共有結合修飾をしている可能性は見いだせた。研究の進め方として、対象とするニオイ分子の対象を拡げすぎた点は反省点である。しかし、アンモニア等のヒトが強く応答するニオイ分子に対する嗅覚受容体の同定に成功できたため、その応答機構などについて継続して取り組んでいく。チアゾールはマウスにとって天敵の悪臭であること、ヒトの嗅覚閾値の低い悪臭に対しても生物種間での保存性も高い受容体が応答したことから、やはり特に強く敏感に感じるニオイに対する嗅覚の応答機構は他の香料とは違っている可能性があり、その応答機構の解明は嗅覚の分子機構の全容解明につながると期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 3件

1. * <a href="#">Fukutani Y</a> , Nakamura Y, Muto N, Miyana S, Kanemaki R, Ikegami K, Noguchi K, Ohsawa I, Matsunami H, Yohda M. Hot Spot Mutagenesis Improves the Functional Expression of Unique Mammalian Odorant Receptors. <i>Int J Mol Sci.</i> 2021, 23(1):277, *Corresponding author.
哺乳類 OR は、タンパク質安定性の低さから異種細胞での機能発現性が乏しく、生化学的解析が進んでいない。本論文では、2020 年に発表したシャペロン非依存性 OR の間で特に使用頻度の多いアミノ酸に着目し、発現性の低い嗅覚受容体の機能発現を向上させる重要アミノ酸残基の探索を行い、第 3 膜貫通ドメインに位置する 2 か所のアミノ酸変異が OR の発現を著しく向上させることを示した。本変異導入はヒト OR に対しても適応でき、アゴニスト選択性に変化を与えなかったためオーファン受容体のアゴニスト探索にも活用できる。
2. * <a href="#">Fukutani Y</a> , Koshizawa T, Yohda M., Application of Vapor Phase Stimulation Method for Screening of Human Odorant Receptors Responding to Cinnamaldehyde, <i>Sens. Mater.</i> , 2021, 33(12), 4203-4210. *Corresponding author.
嗅覚機構に倣い、揮発した香気成分に応答するヒト ORs の網羅的探索手法の構築を行った。密閉容器内で固形香料であるシナモンと、シナモン香の主成分であるシンナムアルデヒドに対して応答を示すヒト ORs の評価を行った。結果として、シナモン香に応答する OR はシナモン粉末の気相成分にも応答し、応答が異なる OR も多く存在した。本手法は様々な混合香料に対して応答するヒト ORs の情報が得ることができる、嗅覚のニオイ応答のデータベ

ス化などに活用が期待される。

3. \*Yoshii T, #Takayama I, #Fukutani Y, #Ikuta T, Maehashi K, \*Yohda M. Development of an odorant sensor with a cell-free synthesized olfactory receptor and a graphene field-effect transistor. *Anal Sci*. 2022 Feb;38(2):241-245. #Co-1<sup>st</sup> authors, \*Corresponding author.

ORs とニオイ分子間の結合を高感度に評価するために、OR を搭載したグラフェンセンサ開発に取り組んだ。OR はコムギ胚芽無細胞タンパク質システムを用いて、リポソーム上に合成した。Mini-G タンパク質によるリガンド結合評価法により合成した OR の機能性を確認した上で、OR をグラフェン電解効果トランジスタセンサに搭載したところ、アゴニストの濃度依存的な電気シグナルの検出に成功した。

## (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件(特許公開前のもも含む)

## (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 主要な学会発表

#### 招待講演

演題名: Expectations for ionic liquids in mammalian olfactory receptor research

会議名: Kanazawa University SAKIGAKE International Symposium

開催時期: 2021 年 11 月

演題名: 哺乳類嗅覚受容体発現細胞を利用したニオイ評価技術の現状と課題

会議名: センサ & IoT コンソーシアムセミナー ヒトレベルの匂い・香りの認知・評価・表現に向けて!

開催時期: 2022 年 2 月

#### 一般講演

演題名: 気相刺激法を利用した悪臭応答ヒト嗅覚受容体の同定と実用的な阻害剤探索

会議名: 第 73 回日本生物工学会大会

開催時期: 2021 年 11 月

演題名: アンモニア応答 G タンパク質共役型受容体の阻害による効果的なアンモニア知覚抑制

会議名: 第 74 回日本生物工学会大会

開催時期: 2022 年 10 月

演題名: 悪臭応答ヒト嗅覚受容体の同定法と活性抑制による知覚制御技術

会議名: 第 17 回 GPCR 研究会

開催時期: 2022 年 10 月

著作物、受賞、著作物、プレスリリース等  
2022年10月現在なし