

学位論文題名

ANALYSIS OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR SUPERFAMILY
EXPRESSED IN CHEMOSENSORY TISSUES

(化学感覚器における G-蛋白質共役型受容体遺伝子ファミリーの発現解析)

学位論文内容の要旨

【はじめに】

近年の生化学的、分子生物学的手法の発展により、化学感覚の受容機構においても cAMP や IP₃ または cGMP などの細胞内セカンドメッセンジャーの関与が示唆された。一般に細胞内セカンドメッセンジャー系を活性化する経路には G-蛋白質共役型受容体(GCR)が存在する。GCR は、神経伝達物質、ホルモンなどの受容体として多数単離同定されており、いずれも細胞膜を 7 回貫通する受容体である。1991 年になって、Buck と Axel はラット嗅上皮に特異的に発現する GCR を多数クローニングした。この GCR は互いに相同性の高い約 1000 種類の遺伝子から構成されると推定され、嗅覚受容体ファミリーと名付けられた。嗅覚受容体は、においの情報処理に重要な役割を担っていると考えられている。

味覚器においても甘味や苦味物質が細胞内セカンドメッセンジャー系を活性化させることから、本研究では味覚器にも GCR が存在すると予想し、新規 GCR のクローニングを試みた。その結果、ウシ味覚器に嗅覚受容体ファミリーに属する多数の受容体が発現していることが明らかとなった。さらに嗅覚受容体は腎臓にも発現していることを見いだした。このことは、嗅覚受容体が動物組織において普遍的な化学物質の受容体である可能性を示唆している。

次に、従来、嗅細胞由来の株化細胞が存在しないなどの理由で困難であった、嗅覚受容体遺伝子の発現調節機構を解析するために、ゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュは、受精卵に対する外来遺伝子の導入が可能である。そこで、本研究では、ゼブラフィッシュ嗅覚受容体遺伝子およびその 5' 上流領域のクローニングを行った。さらに、受精卵に、受容体 5' 上流領域とレポーター遺伝子を連結したプラスミドを導入してその発現パターンを解析した結果、受容体遺伝子 5' 上流領域に嗅覚器に対する転写活性が存在することを見いだした。

【結果と考察】

1 : ウシ味覚器に発現する G-蛋白質共役型受容体(GCR)

ウシ舌上の味蕾を含む乳頭(有郭乳頭および茸状乳頭)から得た total RNA と種々の GCR の膜貫通領域の保存的なアミノ酸配列に対応する多数の縮重プライマーを用いて RT-PCR を行った。嗅覚受容体ファミリーに対応するプライマーを用いたところ、10 種類以上の独立した、互いに高い相同性(40-90%)を有するクローンが得られた。そこで、これらウシ舌乳頭由来のクローンを TAS ファミリーと呼ぶことにする。また TAS ファミリーと最も高い相同性(31-47%)を示したのは、ラット嗅覚受容体ファミリーであった。

各組織における TAS ファミリーの発現パターンをノーザンプロット法により検討した。その結果、有郭乳頭、茸状乳頭、嗅上皮、腎臓において mRNA の発現が観察された。そこで、嗅上皮および腎臓に発現する GCR を、RT-PCR 法によりクローニングし、TAS ファミリーと比較した。その結果、これらのクローンは互いに 40-98% の相同性を有しており、全て嗅覚受容体ファミリーに属することが明らかとなった。さらに、約 60% の相同性を目安にしてサブグループに

分けたところ、5つのサブグループとそれらに属しない独立したクローンに分かれた。各サブグループを構成するクローンは複数の組織に由来し、特定の組織にのみ発現するサブグループは存在しなかった。

嗅覚受容体の生理的な機能にはまだ不明の点が多いが、嗅覚受容体がIP₃の産生と共役する事が示されている。また、ある種の苦味物質は味組織においてIP₃系を活性化することが報告されている。さらに、におい物質と苦味物質は疎水性という共通点もある。したがって、本研究で単離したTASファミリー受容体もIP₃系と共役する苦味受容体であることが予想される。一方、腎臓にも嗅覚受容体が発現していることを見いだしたが、その役割は不明である。腎臓の生理的な役割を考えれば、薬物の分泌に関与している可能性がある。本研究により、嗅覚受容体ファミリーが、嗅覚器におけるにおい物質の受容体としてだけでなく、味覚器や腎臓などの組織における普遍的な化学物質の受容体として働いている可能性が示唆された。

2：ゼブラフィッシュに発現する嗅覚受容体ファミリー

ゼブラフィッシュ染色体DNAより11種類の嗅覚受容体遺伝子を増幅した、それらは互いに40-98%の相同性を示した。さらに、染色体ライブラリーより、嗅覚受容体遺伝子全長を含むクローンを3つ(ZF2A, 2B, 9A)得た。

嗅覚受容体遺伝子の発現様式を調べるために、全胚固定標本によるin situ ハイブリダイゼーションを行った。受精後26時間の胚では嗅覚受容体の発現は観察できなかったが、受精後48時間以降の胚では、嗅上皮と思われる領域に局限して、発現が観察された。またZF2A、ZF2Bに特異的なプライマーを用いたRT-PCRでも57時間胚で発現が確認できた。

次に、嗅覚組織特異的な転写活性の解析を行った。ZF2A遺伝子の5'上流領域をレポーター遺伝子に結合したプラスミドを作成し、それを1~2細胞期の受精卵に注入し、約60時間後にレポーター遺伝子の発現を指標に検出し、ポジティブコントロールとして用いた組織特異性を示さないと考えられるCMVまたはSV40のプロモーターの発現と比較した。その結果、ZF2Aの5'上流領域は、コントロールプラスミドと比較して、嗅覚器において特異的な転写を引き起こすことが明らかとなった。今回用いたZF2Aの5'上流領域では、嗅覚器以外の組織においても陽性細胞が検出された。しかし、これはコントロールプラスミドを用いた場合に対してはるかに低い頻度である。したがって、コントロールプラスミドと比較して、ZF2A5'上流領域の転写活性は、嗅覚器以外の組織においては抑制されていると考えられる。また、ZF2Aの5'上流領域を反対方向に用いた場合には、陽性細胞はほとんど検出されなかった。

以上の結果より、嗅覚受容体遺伝子の5'上流領域にはin vivoで嗅覚器における転写活性を有するものがあることが明らかとなった。嗅細胞は多数の嗅覚受容体の中から、1種類もしくはごく限られた種類の嗅覚受容体を選択して発現していると考えられている。ZF2A5'上流領域が嗅覚受容体のプロモーターとしての性質を有するとした場合、2つの可能性が考えられる。第1には今回解析したZF2A5'上流領域が、嗅覚受容体ファミリーに共通した組織特異性すなわち嗅細胞特異的な発現を規定している可能性であり、第2としてZF2A受容体を発現する嗅細胞でのみ機能している可能性、すなわち多数の受容体の中から1種類の受容体を選択することに関わる可能性が考えられる。今後、全ての嗅細胞に発現する遺伝子のプロモーター領域の発現頻度と、ZF2A5'上流領域を用いた場合の発現頻度を比較することにより、ZF2A5'上流領域の転写活性は上記のどちらの可能性に起因するものかを明らかにする必要がある。さらに、ZF2A5'上流領域の詳細な解析により、組織特異性または嗅覚受容体の選択的発現に関わる最小単位を同定できると考えられる。

【まとめ】

1. ウシ味覚器より、嗅覚受容体ファミリーに含まれる新規G-蛋白共役型受容体遺伝子を多数クローニングした。
2. ウシ嗅覚受容体ファミリーに属する遺伝子は、嗅上皮のみならず、味覚器や腎臓にも発現しており、これらの組織における役割が推定された。
3. ゼブラフィッシュ嗅覚受容体は、互いに40%以上の相同性を示した。
4. ゼブラフィッシュ嗅覚受容体は、受精後48時間以降の胚で、嗅覚器に局限して発現していた。
5. 受容体遺伝子ZF2Aの5'上流領域(約700 bp)には、嗅覚組織特異的なプロモーター活性が見いだされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚
副 査 助 教 授 澤 田 均

学 位 論 文 題 名

ANALYSIS OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR SUPERFAMILY EXPRESSED IN CHEMOSENSORY TISSUES

(化学感覚器における G-蛋白質共役型受容体遺伝子ファミリーの発現解析)

申請者は長年、化学感覚器における刺激受容機構に関する研究を行ってきたが、このほど上記の題名の論文を博士論文として提出した。この論文に関し、審査委員会では、慎重審議を行った。

近年の生化学的、分子生物学的手法の発展により、化学感覚の受容機構においても cAMP や IP₃ または cGMP などの細胞内セカンドメッセンジャーの関与が示唆された。一般に細胞内セカンドメッセンジャー系を活性化する経路には G-蛋白質共役型受容体(GCR)が存在する。GCR は、神経伝達物質、ホルモンなどの受容体として多数単離同定されており、いずれも細胞膜を 7 回貫通する受容体である。1991 年になって、Buck と Axel はラット嗅上皮に特異的に発現する GCR を多数クローニングした。この GCR は互いに相同性の高い約 1000 種類の遺伝子から構成されると推定され、嗅覚受容体ファミリーと名付けられた。嗅覚受容体は、においの情報処理に重要な役割を担っていると考えられている。

味覚器においても甘味や苦味物質が細胞内セカンドメッセンジャー系を活性化させることから、申請者は味覚器にも GCR が存在すると予想し、新規 GCR のクローニングを試みた。その結果、ウシ味覚器に嗅覚受容体

ファミリーに属する多数の受容体が発現していることを明らかにした。

次に、申請者は、従来、嗅細胞由来の株化細胞が存在しないなどの理由で困難であった嗅覚受容体遺伝子の発現調節機構を解析するために、ゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュは、受精卵に対する外来遺伝子の導入が可能である。そこで、申請者は、ゼブラフィッシュ嗅覚受容体遺伝子およびその 5'上流領域のクローニングを行った。さらに、受精卵に、受容体 5'上流領域とレポーター遺伝子を連結したプラスミドを導入してその発現パターンを解析した結果、受容体遺伝子 5'上流領域に嗅覚器に対する転写活性が存在することを見いだした。

1、ウシ味覚器に発現する G-蛋白質共役型受容体(GCR)

ウシ舌上の味蕾を含む乳頭(有郭乳頭および茸状乳頭)から得た total RNA と種々の GCR の膜貫通領域の保存的なアミノ酸配列に対応する多数の縮重プライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、申請者はラット嗅覚受容体ファミリーと最も高い相同性(31-47%)を示す、10 種類以上の独立した、互いに高い相同性(40-90%)を有するクローン(TAS ファミリー)を得た。

各組織における TAS ファミリーの発現パターンを検討した結果、有郭乳頭、茸状乳頭に加え、嗅上皮、腎臓において mRNA の発現を観察した。そこで、嗅上皮および腎臓に発現する GCR を、RT-PCR 法によりクローニングし、TAS ファミリーと比較した。その結果、これらのクローンは互いに 40-98%の相同性を有しており、全て嗅覚受容体ファミリーに属することを明らかにした。

嗅覚受容体の生理的な機能にはまだ不明の点が多いが、嗅覚受容体が IP_3 の産生と共役することが示されている。また、ある種の苦味物質は味組織において IP_3 系を活性化することが報告されている。さらに、におい物質と苦味物質は疎水性という共通点もある。したがって、申請者が単離した TAS ファミリー受容体も IP_3 系と共役する苦味受容体であることが予想される。一方、腎臓にも嗅覚受容体が発現していることを見いだしたが、

その役割は不明である。腎臓の生理的な役割を考えれば、薬物の分泌に関与している可能性がある。本研究により、嗅覚受容体ファミリーが、嗅覚器におけるにおい物質の受容体としてだけでなく、味覚器や腎臓などの組織における普遍的な化学物質の受容体として働いている可能性が示唆された。

2、ゼブラフィッシュに発現する嗅覚受容体ファミリー

ゼブラフィッシュ染色体DNAより11種類の嗅覚受容体遺伝子を増幅した、それらは互いに40-98%の相同性を示した。さらに、染色体ライブラリーより、嗅覚受容体遺伝子全長を含むクローンを3つ(ZF2A, 2B, 9A)得た。

嗅覚受容体遺伝子の発現様式を調べるために、申請者は、全胚固定標本による *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。受精後26時間の胚では嗅覚受容体の発現は観察できなかったが、受精後48時間以降の胚では、嗅上皮と思われる領域に限局して発現を観察した。またZF2A、ZF2Bに特異的なプライマーを用いたRT-PCRでも57時間胚で発現を確認した。

次に、申請者は嗅覚組織特異的な転写活性の解析を行った。ZF2A 遺伝子の5'上流領域をレポーター遺伝子に結合したプラスミドを作成し、それを1~2細胞期の受精卵に注入し、約60時間後にレポーター遺伝子の発現を指標に検出した。ポジティブコントロールとしては、組織特異性を示さないと考えられるCMVまたはSV40のプロモーターを用いた。その結果、ZF2Aの5'上流領域は、コントロールプラスミドと比較して、嗅覚器において特異的な転写を引き起こすことを明らかにした。

以上の結果より、申請者は嗅覚受容体遺伝子の5'上流領域には *in vivo* で嗅覚器における転写活性を有するものがあることを明らかにした。嗅細胞は多数の嗅覚受容体の中から、1種類もしくはごく限られた種類の嗅覚受容体を選択して発現していると考えられている。ZF2A5'上流領域が嗅覚受容体のプロモーターとしての性質を有するとした場合、2つの可能性が考えられる。第1には、嗅覚受容体ファミリーに共通した組織特異性すな

わち嗅細胞特異的な発現を規定している可能性であり、第2として、多数の受容体の中から1種類の受容体を選択することに関わる可能性が考えられる。今後、ゼブラフィッシュを用いることにより、ZF2A5'上流領域の詳細な解析を行い、組織特異性または嗅覚受容体の選択的発現に関わる最小単位を同定できると考えられる。

以上のように、本論文は化学感覚の受容機構に関する多くの新しい知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を授与するのにふさわしい論文と判定した。