

# ヒト嗅覚受容体センサーによる匂いのデジタル化を応用した香水設計手法の確立

大阪大学産業科学研究所

立松 健司

Smell sensory testing is very important in the development of a wide range of odor-related products such as cosmetics, foods, and air fresheners. However, the accuracy of the sensory test is limited to human ability, and both of reproducibility and throughput are low. In addition, it was difficult to share odor information across time and space. Since a perfumer needs to memorize many odors, the training period is at least 5 years, usually 10 years, which is very costly to grow. On the other hand, chemical odor sensors and gas chromatography are detection methods based on the structure of compounds, and it is impossible to directly link these measurement data with the sensory test results. Our group created an olfactory receptor sensor using cultured cells expressing all 388 subtypes of human olfactory receptors, and which was able to quantify all the odors that humans can perceive. In this study, the odor of commercially available perfume was measured and quantified by the olfactory receptor, and the odor of perfume was quantified. In the future, this technology will be able to transform fragrance blending that relies on experiences and intuitions into evidence-based blending.

## 1. 緒言

近年の生活水準向上に伴い、香り関連製品は、アロマや化粧品、芳香剤や消臭剤、食品香料などだけではなく匂い環境関連製品を含めて大きな市場を形成している。様々な製品の香り付けにおいて、適切な香調を作り出す際には、これまで官能試験が中心的な役割を果たしてきた。官能試験においては、「ウッディー」や「スモーキー」といった匂い質を言語化して、これらの匂いの特徴を持つ“基準臭”を調合により設定し、各基準臭と検査対象物を嗅ぎ比べて、多くの場合6段階の匂い強度で匂い質を評価、記録している。このような言語表現を介在させた記録は検査者のそのときの体調や個人差による影響を排除できず、正確な嗅覚情報の数値化、記録は困難であり、時間、空間を超えた香りの伝達は不可能であった。また、多種多様な匂いを嗅ぎ分けて適切な言語表現に置き換えることができる熟練した調香師の育成には、10年以上の教育期間がかかり、それにとりまうコストも問題となる。以上のような官能試験の問題点を解決するために、機器分析により客観データとして香りを記録することを目指して、多数の電気センサー素子をアレイ化したもの(例:鳥津製作所、におい識別装置 FF-2020)やガスクロマトグラフィー(例:アルファ・モス、フラッシュ GCノーズ Heracles NEO)を用いたものが開発、市販されている。しかしながら、これらは化合物の構造に基づく検出方法であり、原理的にヒトが嗅ぐことがで

きないような分子を匂い分子と区別して解析対象から除外することが不可能である。そのため従前の香り解析装置は、たとえばコーヒーの香調といったようなごく限られた範囲内での応用にとどまり、ヒト嗅覚の主観と結びつけることが困難であった。一方で視覚については、ヒトの赤・緑・青・白の光を検出する4種類の光受容タンパク質の応答強度とその位置情報に由来する情報から構成されており、視覚情報をヒトの光受容タンパク質と関連するわずかな数値(RGB+明度+座標)で表現可能であり、すでに視覚は時空間を超えた情報伝達に成功している。映像に係る産業の規模は、香り関係の産業に比して巨大である。嗅覚における匂い分子の識別は、嗅覚受容体の立体構造に依存しており、匂い分子をヒトの嗅覚と同様に検出するためにはヒトの嗅覚受容体を用いることが最も正確である。そこで、いくつかの研究グループでは、ヒトの嗅覚受容体そのものをセンサー素子として、匂いを数値化することを目指しており、先行している米国デューク大学の松波らを含む多くのグループは、嗅神経の細胞内シグナル伝達経路(図1)を培養細胞において模倣している<sup>1)</sup>。

哺乳動物の嗅神経細胞は、それぞれ1種類の嗅覚受容体を発現している。嗅覚受容体は7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体(G protein coupled receptor, GPCR)であり、嗅覚受容体サブタイプの総数は、ヒトで388種<sup>2)</sup>と報告されている。嗅神経において嗅覚受容体が匂い分子により刺激されると嗅覚受容体に特異的なG<sub>olf</sub>がアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内のcAMP濃度が上昇し、CNGチャネル(cyclic nucleotide gated channel)が開き、細胞外カルシウムイオンが流入するという多段階のシグナル増幅を経て最終的には活動電位を発生する。また嗅神経内のカルシウム応答以外のシグナル伝達経路では、PKA(Protein kinase A)はcAMPと結合して活性化され、転写因子CREB(cAMP response element-binding protein)の



Establishment of perfume design method applying odor digitization by human olfactory receptor sensor

Kenji Tatematsu

Department of Biomolecular Science and Reaction, The Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR), Osaka University

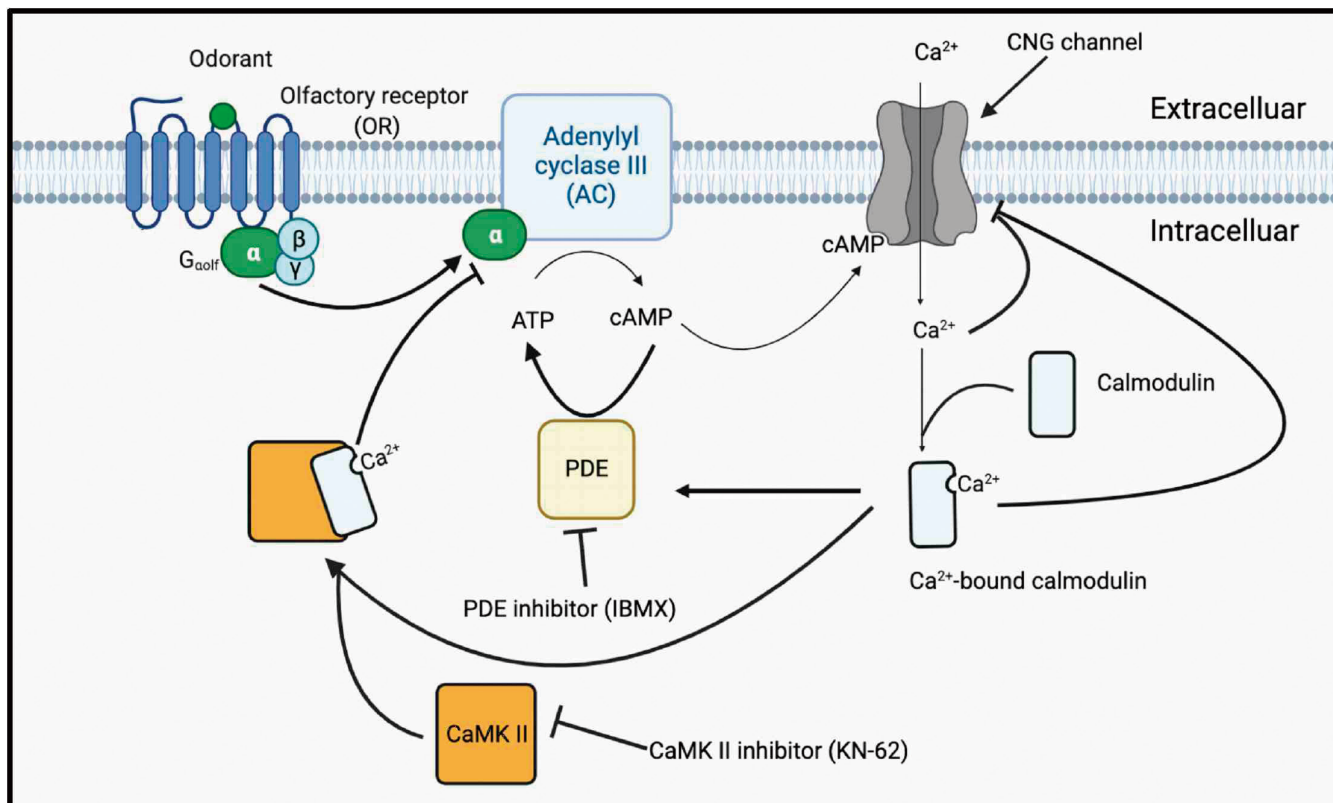


図1 嗅神経の細胞内シグナル伝達経路

リン酸化を触媒し、CREBによる転写が活性化されている。松波らをはじめとして多くの研究グループは、CREB結合配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターを用いて、ヒト嗅覚受容体約400種類すべてを網羅した匂い分子に対する嗅覚受容体レパートリーの解析を行っている<sup>1)</sup>。しかしながらルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、レポーター遺伝子の転写と翻訳の時間が必要であるために様々な問題をとまなう。まず、官能において重要な嗅覚受容体応答の経時変化の情報は得られず匂いに対する嗅覚受容体の応答強度のみの情報しか得られない上に、後述するネガティブフィードバックによる匂いへの馴化も検出できないことが弱点である。極性が小さい匂い分子種は多く、これらの匂い分子はレポーター遺伝子の発現を待つ間に細胞培養液から蒸散してしまう問題もある。またチオールのような反応性の高い匂い分子は、数時間の培養時間でも化学反応により異なる分子種へと転換されて、反応前と異なる嗅覚受容体が応答してしまうこともある。極性が小さく分子量も小さな匂い分子は、細胞膜透過性が高いため嗅覚受容体以外の細胞内シグナル伝達経路に干渉することも考えられる。このルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイは、ウェルプレートで実施されており、各ウェルへの細胞播種とウェルごとに異なる嗅覚受容体サブタイプの発現プラスミドを導入する手順が必要とされるために測定の前準備が非常に煩雑であった。これらルシフェラーゼ

レポーター遺伝子アッセイにおける弱点を解消するために、私たちはまず嗅神経細胞内の匂いシグナル伝達経路を模倣した培養細胞を作製した。この嗅神経模倣細胞は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイに用いられているのと同様の細胞にさらにCNGを発現させたものである。この細胞の培地に匂い分子を添加し、匂い分子が嗅神経模倣細胞の発現する嗅覚受容体に結合したときは、嗅神経と同様に細胞外のカルシウムイオンが流入して細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。細胞内カルシウムイオン濃度は、細胞に事前導入したカルシウムイオン蛍光指示薬で定量できるため、脳に伝わる嗅神経の情報と同義の匂い情報をリアルタイムに蛍光輝度として検出できる。また、この細胞は嗅神経と同様にカルモジュリン (Calmodulin)、ホスホジエステラーゼ (Phosphodiesterase, PDE)、カルモジュリンキナーゼII (Calmodulin kinase II, CaMK II)、カルシウムイオン排出システムを持ち、嗅神経と同様に匂い分子に対する応答後のネガティブフィードバックが観察される。私たちの研究グループでは、この細胞に388種のヒト嗅覚受容体全サブタイプを発現させて、各受容体サブタイプ発現細胞を20×20区画のグリッドに整列化したヒト嗅覚受容体発現細胞アレイを開発し<sup>3)</sup>、ヒト嗅覚受容体センサーと命名した(図2)。

ヒト嗅覚受容体センサーは、嗅神経細胞と同様に匂い分子添加直後から細胞が応答し、なおかつ応答の開始から収

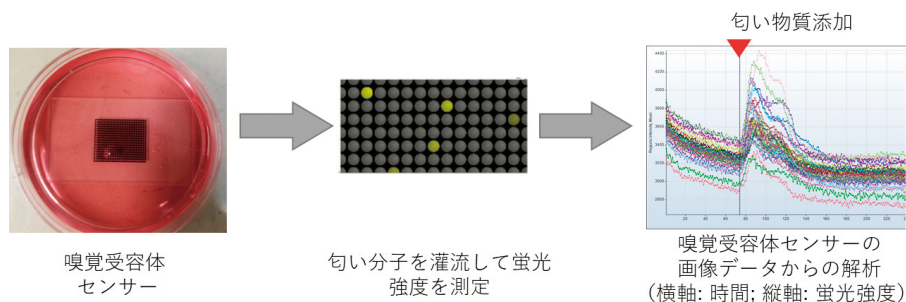


図2 嗅覚受容体センサーと取得されたデータ

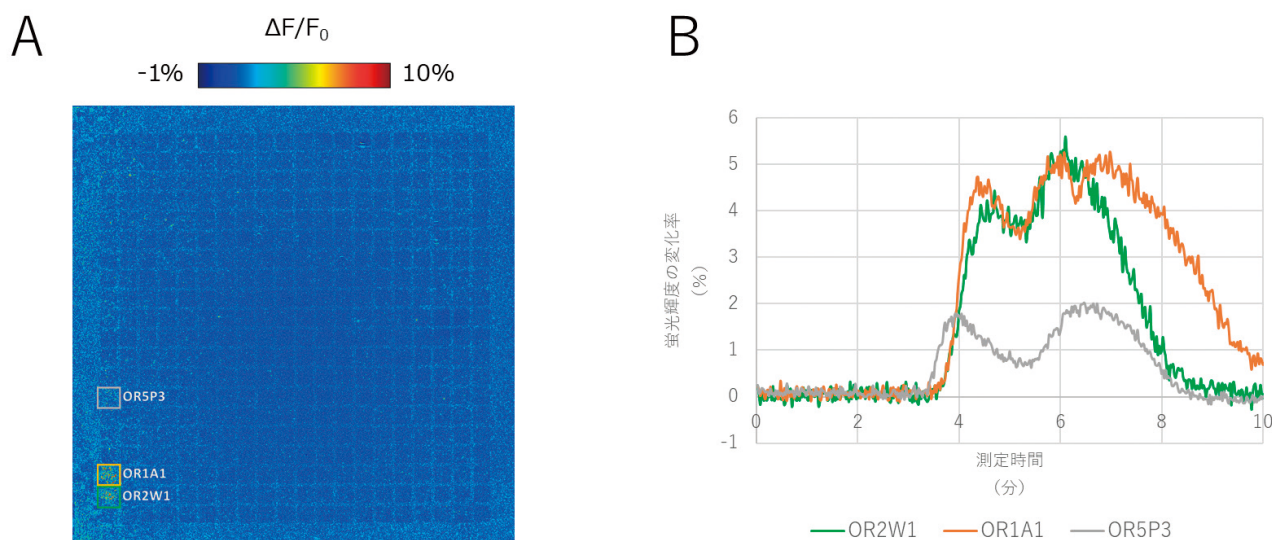


図3 嗅覚受容体センサーによる香水の測定結果

束までは数分間であるため、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイに比べると匂い分子の細胞内への浸透により惹き起こされる偽陽性や偽陰性、匂い分子の蒸発や変性の影響は低減されており、なおかつヒト嗅覚受容体レポーターをハイスループットに解析することを可能としている。また、匂い応答の時間軸の情報が得られるため、匂いの刺激性や余韻といった官能との関連付けにおいて重要なデータが得られることも期待されている。ヒト嗅覚受容体センサーのこれらの特性により、これまでにない切り口で匂い関連製品・サービスを提供できる。そこで本研究では市販香水の匂いをヒト嗅覚受容体センサーにより測定して、香水に応答する嗅覚受容体を明らかにし、香水の調香に資することを目指した。

## 2. 方法

### 2.1. ヒト嗅覚受容体センサーの作製

スライドガラス上に  $20 \times 20$  区画のグリッドを疎水性インクで形成した。次に Lipofectamine (Thermo Fisher Scientific) とヒト嗅覚受容体発現プラスミドからなるリポプレックスをヒト嗅覚受容体の全サブタイプ 388 種類につ

いて調製し、前記のスライドガラスのグリッド区画ごとに 1 種類の嗅覚受容体発現プラスミドからなるリポプレックスを印刷した。このスライドガラスに嗅神経模倣細胞を播種し 10% (v/v) ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養し、スライドガラス上のリポプレックスをエンドサイトーシスにより細胞へ導入し、ヒト嗅覚受容体を細胞に発現させてヒト嗅覚受容体センサーとした。

### 2.2. ヒト嗅覚受容体センサーによる香水の測定。

リンゲル液 [140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 50mM HEPES (pH7.2), 1mM ピルビン酸ナトリウム] でスライドガラス上の細胞を洗浄した後、細胞内のカルシウムイオン濃度の変動を測定するためにカルシウムイオンの蛍光指示薬 Calbryte 520 (AAT Bioquest) を溶解したリンゲル液でスライドガラスを 30 分間インキュベーションした。その後リンゲル液を 3 分間、50 分の 1 に希釈した香水ポールスミス エクストリーム メン オードトワレを 2 分間、リンゲル液を 5 分間スライドガラスに灌流し、灌流中のヒト嗅覚受容体センサーの蛍光を蛍光顕微鏡により 1.5 秒間隔で撮影した。



### 3. 結果

香水溶液灌流前の蛍光強度を 100% ( $F_0$ ) としたときの灌流時の最大蛍光強度時の蛍光強度 ( $F$ ) の変化率 ( $\Delta F/F_0$ ) を疑似カラーで示す (図 3A)。香水に反応した嗅覚受容体のサブタイプは、OR2W1、OR1A1、OR5P3 であった。図 3B に反応した嗅覚受容体の蛍光強度変化率をグラフで示した。反応したすべての嗅覚受容体において、香水灌流直後から蛍光輝度の上昇がみられた。また、OR2W1 と OR5P3 は香水を除いた後 4 分以内に香水添加前の蛍光強度に復帰したのに対して、OR1A1 は香水を除いた後も 5 分以上経過しても香水添加前の蛍光強度に復帰せず、嗅覚受容体ごとに細胞内のカルシウムイオン濃度の経時変化が異なる結果となった。

### 4. 考察

OR2W1 と OR1A1 は、1-ヘプタノン、1-オクタノール、 $\beta$ -シトロネロールなど、幅広い官能基を持つ匂い分子に反応し<sup>4)</sup>、匂い分子としては比較的長い炭素鎖の部分で匂い分子を認識しているかもしれない。両嗅覚受容体共に今回測定した香水 (以下、本香水) に含まれるリナロールやシトロネロールに反応した可能性は高い。OR5P3 は、クマリンに反応することが報告されており<sup>4)</sup>、本香水にもクマリンが含まれているためこれを検出した可能性が高い。また OR5P3 は、1-オクタノールのような長い炭素鎖を持つ匂い分子に反応し、嗅覚受容体をその反応する匂い分子の構造をもとにしてクラスタリングすると OR5P3 は、OR2W1 や OR1A1 と相関が高いことが示されており<sup>5)</sup>、これらの嗅覚受容体は共通の匂い分子に反応している可能性がある。

今回の測定では、3 種類の嗅覚受容体の反応が検出されたが、本香水の成分表示では 12 種以上の純品香料が含まれていることが示されており、香調の複雑さからもこの香水を嗅いだときのヒトの嗅覚では、より多くの嗅覚受容体が反応していると思われる。本来反応すべき嗅覚受容体の反応を今回検出できなかった原因としては、まず香水の成分が挙げられる。本香水を 50 分の 1 に希釈してから測定しているものの嗅覚受容体への香水主成分であるアルコールの干渉は否定できない。また、本香水に含まれるゲラニオールは、それ自体が匂いを持つと同時に CNG 阻害能もあわせ持つことが報告されており<sup>6)</sup>、ヒト嗅覚受容体センサーの感度を下げて、その結果として反応の検出に成功できた嗅覚受容体の種類が減少した可能性がある。他の原因としては細胞の構造や神経回路の有無の違いが挙げられる。嗅神経には複数の線毛があり、ここに多数の嗅覚受容体分子が局在しているが、嗅神経模倣細胞は線毛を持たないために表面積は嗅覚受容体に比べて小さい。嗅覚の神経回路

では、同じ嗅覚受容体を持つ複数の嗅神経の嗅覚受容体反応の情報は、糸球体により束ねられてから脳に伝達されるが、私たちのヒト嗅覚受容体センサーは、一つ一つの嗅神経模倣細胞の反応を画像として記録はしているが、各細胞の反応を束ねるような数値化は行っていない。今後、画像処理を工夫することにより、画像の中でノイズに埋もれているかもしれない多数の嗅神経模倣細胞の反応を検出することが課題として考えられる。

香水は、速度の異なる多数の香料から構成されており、その香調は蒸発開始から時間の短い順にトップノート、ミドルノート、ラストノートと呼称される。香水は、時間の経過にともない様々な香調を楽しめるように匂い分子種ごとに異なる蒸発速度を考慮に入れて様々な匂い分子を組み合わせて設計されている。今回の本香水の測定では、香水に含まれる全ての匂い分子を同時に測定しているが、香水の分留を行うことによりトップノート、ミドルノート、ラストノートを分けて測定することが可能となるであろう。また分留により香水のアルコール濃度を下げることにより、より希釈率の低い高濃度な香水をヒト嗅覚受容体センサーで測定できるかもしれない。

現在、嗅覚受容体の細胞内シグナル伝達経路に介入して、ネガティブフィードバック経路を抑制することにより、匂い分子に対する感度を上昇することを試みている。これまでのところ PDE 阻害剤の IBMX や CaMK II 阻害剤 KN-62 を用いることにより (図 1)、ヒトの嗅覚検知閾値が、78ppt であるところ<sup>7)</sup>、ヒト嗅覚受容体センサーで 4L 空気中の濃度 10ppt のイソ吉草酸に対する嗅覚受容体反応の検出に成功している<sup>8)</sup>。香水の測定にもこれら阻害剤を用いることにより、より多くの嗅覚受容体反応を検出できるはずである。

### 5. 総括

嗅覚受容体センサーによる香水の測定により、香水設計 (調香) のリバースエンジニアリングや測定データに基づく理論的な香水調香の可能性を示すことができた。

#### (引用文献)

- 1) Mainland J. D., Li Y. R., Zhou T., Liu W. L. L., Matsunami H. Human olfactory receptor responses to odorants. *Sci. Data*, 2, 150002, 2015
- 2) Niimura Y., Nei M. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 12235-40, 2003
- 3) 黒田俊一 匂いの定量方法、それに用いる細胞及びその細胞の製造方法。特願 2019-536790
- 4) Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., Mainland, J. D. Odor Coding by a Mammalian Receptor

Repertoire. *Sci. Signal.* 2, ra9-ra9, 2009

- 5) Audouze K., Tromelin A., Le Bon A. M., Belloir C., Petersen R. K., Kristiansen K., Brunak S., Taboureau O. Identification of odorant-receptor interactions by global mapping of the human odorome. *PLoS One.* e93037. 2014
- 6) Takeuchi H., Ishida H., Hikichi S., Kurahashi. T. Mechanism of olfactory masking in the sensory cilia. *J. Gen. Physiol.* 133, 583-601, 2008
- 7) 永田好男 三転比較式臭袋法による臭気物質の閾値測定結果。日本環境センター所報 17, 77-89, 1990
- 8) Lian Y., Tatematsu K., Sakai H., Sato S., Kuroda S. Improving the sensitivity of odor molecule detection in olfactory receptor-expressing cells. 日本農芸化学会 2021 年度大会