

ヒト嗅覚受容体応答を指標とする大豆由来
不快臭低減法の開発

静岡県立大学 食品栄養科学部

伊藤 圭祐

世界的な人口増加、新興国の経済発展などに伴い、2030年にはタンパク質供給量の不足（タンパク質危機）が顕在化することが確実視されている（SDGs×食品産業：農林水産省）。対策として、環境負荷が少ない大豆などの植物性タンパク質の利用が期待されている。大豆は加工製品から発酵食品、またタンパク質だけでなく油脂素材など様々な用途に利用できる優れた食品原料であり、先進国での健康志向の高まりにも後押しされ、近年需要が拡大している。しかし大豆は加工プロセスにおいて脂質の酸化によって生成する n-Hexanal や、納豆などの発酵食品で生成する 3-Methylbutanoic acid など、不快臭の原因となる成分が生成することがある。大豆のさらなる利用拡大には、不快臭の制御が重要な課題となる[1]。

ヒトが食品を食べる際、匂いは鼻から直接嗅ぐ鼻先香（オルソネーザルアロマ）としてだけでなく、喉から鼻腔に抜ける口中香（レトロネーザルアロマ）として味とともにフレーバーに大きく寄与するため、おいしさの形成において匂いの果たす役割は非常に大きい[2]。匂いの評価には官能評価と成分分析のアプローチがあるが、近年では、ヒト嗅覚受容体の応答を指標とした分子レベルでのアプローチが注目されている[3]。ヒト嗅覚受容体を標的とした評価法は、おいしさの複合的な評価こそできないものの、客観性、定量性、再現性、また嗅上皮で起きる受容体応答そのものを解析できる直接性に優れた評価法である。ヒトの場合、嗅覚受容体は約 400 種類存在する[4]。各受容体は複数の匂い成分によって活性化され、また 10 万種類以上存在する匂い成分も様々な嗅覚受容体へ作用するため、その対応パターンは膨大な数となる。そのため、匂い成分とヒト嗅覚受容体の対応関係はほとんど明らかとなっていないのが現状である。しかし不快臭成分の感知に関わるヒト嗅覚受容体を特定できれば、マスキング剤の効果的な探索が可能となると期待できる。そこで本研究では、大豆加工製品の不快臭低減法の開発を目指し、大豆由来の不快臭原因成分に応答するヒト嗅覚受容体の特定を試みた。

【実験方法】

・ヒト嗅覚受容体発現細胞の構築

ヒト嗅覚受容体の発現には、アクセサリータンパク質（RTP1S、Gαolf、Ric-8b）と呼ばれる補助因子が必要である[5]。これらのアクセサリータンパク質をヒト嗅覚受容体とともに共発現させるためには、アクセサリータンパク質 3 種類、ヒト嗅覚受容体、また受容体応答検出用ベクターの 5 種類のプラスミドを細胞に導入する必要がある。複数のプラスミドの同時トランスフェクションは遺伝子導入効率の著しい低下を引き起こすことから、研究に先立ち、HEK 細胞を宿主として、アクセサリータンパク質の安定発現細胞を作製した。396 種類報告されているヒト嗅覚受容体のうち[4]、機能的発現を考慮して 389 種類のヒト嗅覚受容体を選別し、人工遺伝子を合成した。pBApo-CMV Neo プラスミド（Takara 社）に受容体遺伝子をクローニングした後、cAMP 濃度変化検出用のパイオセンサープラスミドと共にアクセサリータンパク質発現細胞に導入した。

・レポーターアッセイによるヒト嗅覚受容体応答の検出

ヒト嗅覚受容体の応答により細胞内で増加する cAMP の検出には、転写因子 CREB による遺伝子発現制御を利用した pCRE-DD-ZsGreen I プラスミド (Takara 社) を用いた。cAMP 濃度の増加が protein kinase A (PKA) の活性化を引き起こし、その結果リン酸化された CREB が検出用ベクター中の応答エレメント (CRE) へ結合することで、下流にコードされた GFP が発現する (図 1)。

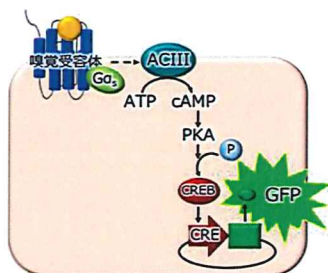


図 1 : レポーターアッセイによるヒト嗅覚受容体応答評価の概要

・セルソーターを用いたヒト嗅覚受容体の網羅的解析法の開発

389 種類のヒト嗅覚受容体発現プラスミドの混合液と pCRE-DD-ZsGreen I プラスミドをアクセサリタンパク質発現細胞に導入した後、匂い成分と Shield1 を細胞に投与し、セルソーターに供することで、GFP 発現細胞を分取した。ヒト嗅覚受容体発現プラスミドを抽出し、アクセサリタンパク質発現細胞に再び導入後、匂い成分を投与し、GFP 発現細胞を分取する操作を 2~3 ラウンド繰り返すことで、応答受容体遺伝子を濃縮した (図 2)。ヒト嗅覚受容体発現プラスミドをシーケンス解析に供することで、濃縮された受容体遺伝子を特定した。

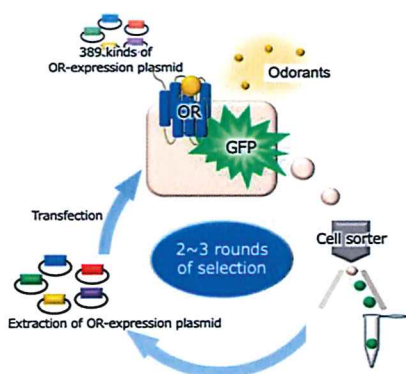


図 2 : 開発したヒト嗅覚受容体の網羅的解析法の概要

【実験結果及び考察】

・ヒト嗅覚受容体の応答評価系の確立

構築したヒト嗅覚受容体、アクセサリタンパク質共発現細胞を用い、代表的なヒト嗅覚受容体の一つである OR1A1 をモデルとして応答評価を検討した。その結果、OR1A1 発現細胞では、既知

アゴニストである(+)-Carvone の投与によって明確な発光量の増加が認められた (図 3)。アゴニスト投与前の発光値に対する増加発光量として算出すると、(+)-Carvone による OR1A1 応答は濃度依存的であり、 EC_{50} は $25 \mu\text{M}$ と算出された (図 4)。以上より、本系によりヒト嗅覚受容体の応答評価が正しく機能することが示された。

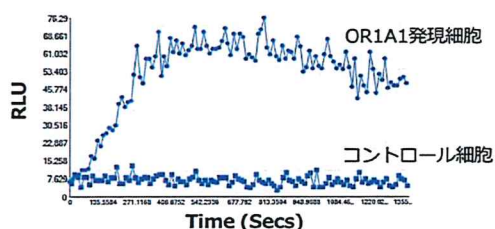


図 3 : OR1A1 応答の測定チャート

OR1A1 発現細胞では、コントロール細胞と比較して $300 \mu\text{M}$ の(+)-Carvone の投与によって明確な発光量の増加が観察された。

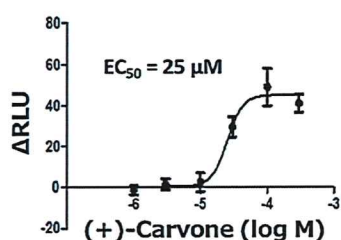


図 4 : (+)-Carvone による OR1A1 応答の濃度依存性

(+)-Carvone の濃度 (横軸) に対する OR1A1 応答 (縦軸) を示す。各点は 3 回の試験における平均値を示し、標準誤差をエラーバーとして示した。

・レポーターアッセイによるヒト嗅覚受容体応答の可視化

GFP 蛍光レポーターアッセイにより、ヒト嗅覚受容体応答による細胞内 cAMP 濃度の上昇を検出できるかどうかを検討するため、OR1A1 をモデルとして受容体応答を解析した。アクセサリタンパク質発現細胞に pCRE-DD-ZsGreen 1 プラスミド、hOR1A1/pBApo-CMV Neo プラスミドを導入し、アゴニストである(+)-Carvone を添加した後に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、GFP 発現細胞の割合はコントロールでは全体の 4%であったのに対し、 1 mM (+)-Carvone を投与した場合には 19%に増加した (図 5)。このことから、本レポーターアッセイにより、ヒト嗅覚受容体応答の可視化が可能であることが示された。

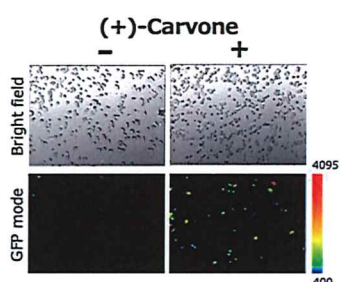


図5：GFP 蛍光レポーターアッセイによる OR1A1 応答の可視化

・ n-Hexanal 受容体の探索と阻害成分によるマスキング効果の検証

構築したレポーターアッセイ系に細胞分取システムを組み合わせることで、任意の匂い成分に応答するヒト嗅覚受容体の特定法を開発した。まず初めに1細胞分取装置であるマイクロラフトアレイを用いた受容体特定法を開発した[6]。しかし本方法は嗅覚受容体の網羅的解析に求められるほどスループットが十分ではなかったことから、本研究では細胞分取装置としてセルソーターを用いることとした。セルソーターでは 10^5 程度の細胞から任意の細胞集団を分取可能である。389 種類のヒト嗅覚受容体発現プラスミドの混合液と CRE-DD-ZsGreen1 プラスミドをアクセサリータンパク質発現細胞に導入後、n-Hexanal を投与し、セルソーターに供した。その結果、GFP 発現細胞の割合は、コントロールでは 10.8%であったのに対し、n-Hexanal 投与細胞では 14.1%であり、n-hexanal の投与によって GFP 発現細胞の増加が観察された (図6)。GFP 発現細胞に含まれるヒト嗅覚受容体発現プラスミドを解析した結果、OR2W1 を含む 10 種類の受容体が検出された。

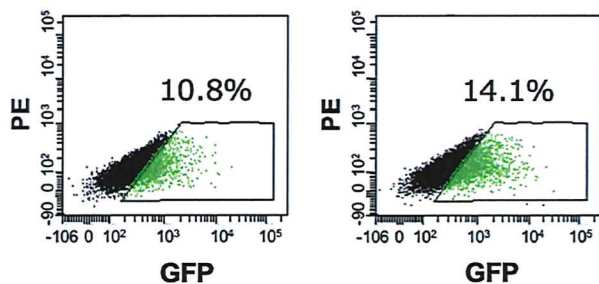


図6：n-Hexanal 受容体の探索

左) コントロール (DMSO 投与) 細胞、右) n-Hexanal 投与細胞

・ n-Hexanal 受容体阻害成分によるマスキング効果の検証

最も遺伝子出現頻度の高かった OR2W1 を標的として、研究室保有の化合物ライブラリーから阻害剤を探索し、見出された阻害成分 (Citral、 α -Pinene、1,2-Hexanediol、1-Hexanol) について、官能評価によって不快臭 (青臭さ) の低減効果を検証した (図7)。その結果、いずれの成分の添加によっても n-Hexanal の“青臭さ”が低減することが示された。官能評価値の平均値では、Citral、 α -Pinene、1,2-Hexanediol、1-Hexanol の順にマスキング効果が高いことが示された。このことから、ヒト嗅覚

受容体応答を指標として見出された阻害成分が、官能評価においてもマスキング効果を示すことが示された。

	平均値	パネル											
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
n-hexanal	5.0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
+ α -pinene	2.5	0.5	1	0	0.5	2	0	2	2.5	2	8.5	5.5	6
+ citral	2.2	1	0	1	1.5	0.5	4	0.5	0	1	7	2.5	7.5
+ 1,2-hexanediol	3.3	1.5	2	3	2.5	2.5	2	3.5	4	4.5	1	8.5	5
+ 1-hexanol	3.5	2.5	3	2.5	3.5	3.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3	4	2.5

図 7 : n-Hexanal 受容体阻害成分による“青臭さ”マスキング効果の検証

VAS 法により、n-Hexanal 単独の“青臭さ”を基準（5 点）として、各マスキング剤候補成分を添加した n-Hexanal サンプルについて、“青臭さ”の強弱を評価した。

・ 3-Methylbutanoic acid 受容体の探索

n-Hexanal 応答受容体の探索と同様に、納豆の匂い成分である 3-Methylbutanoic acid に応答するヒト嗅覚受容体を網羅的に探索した。その結果、OR5K2、OR5K4、OR6J1、OR51E1 が検出された。詳細な解析は必要であるものの、これらは 3-Methylbutanoic acid の受容体の候補であり、今後、マスキング剤の標的として阻害剤探索が望まれる。

【要約】

本研究では大豆の利用拡大の課題となる不快臭の原因成分について、ヒトでの感知に関わる嗅覚受容体を探索した。受容体応答を GFP の発現によって可視化できるレポーターアッセイ系を構築し、セルソーターを用いた細胞分取と合わせることで、389 種類のヒト嗅覚受容体の網羅的解析法を開発した。本法によって見出された n-Hexanal 受容体を標的として探索した阻害成分は、いずれも官能評価においてマスキング効果を示した。本研究では 3-Methylbutanoic acid 受容体の候補も見出されたことから、詳細な解析を進めた後、阻害剤探索が望まれる。ヒト嗅覚受容体を標的としたマスキング法は、大豆の用途拡大のために重要なおいしさの評価・設計に利用が期待できる。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。

【文献】

- [1] Takamura, H., Kitamura, K., et al. Inhibition by lipoxygenase-3 of n-hexanal generation in soybeans. *FEBS Lett.*, 292, 42-44 (1991).
- [2] Bojanowski, V., Hummel, T. Retronasal perception of odors. *Physiol. Behav.*, 107, 484-487 (2012).

- [3] Buck, L., Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175-187 (1991).
- [4] Niimura, Y., Matsui, A., et al. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Res.*, 24, 1485-1496 (2014).
- [5] Zhuang H., Matsunami H. Synergism of accessory factors in functional expression of mammalian odorant receptors. *J. Biol. Chem.*, 282, 15284-15293 (2007).
- [6] Tsuchiya S., Terada Y., et al. A new screening method for identifying chemosensory receptors responding to agonist. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 85, 1521-1525 (2021).