

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02730

研究課題名(和文) 基本匂い要素の解明と受容体安定発現細胞センサの開発に関する研究

研究課題名(英文) Study of principal elemental odors and cell sensors functionally expressing olfactory receptors

研究代表者

佐藤 孝明 (Takaaki, Sato)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：20344187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：Y迷路マウス行動実験で、全背側受容体欠損により生じる(+)鏡像異性体選択的な感度低下と一方を検知できる広い濃度範囲で鏡像異性体ペアの識別ができない識別パラドックスを発見した。この結果は、応答する一部の受容体のみが識別を可能としており、フィードフォワード抑制系を介した刺激特徴的な基本匂いを強調する階層的要素匂い符号化説が支持された。混合尿試料を用い、尿の要素匂いは、個人特有体臭+食事由来の匂い<膀胱癌の臭い<潜血の臭い<抗生剤代謝産物の匂いの順に強いことを見出し、100万倍以上の希釈率の等潜血条件で、マウスが11名の膀胱癌患者の腫瘍摘除前の尿臭の識別できることを示した。特許出願：匂いの評価方法。

研究成果の概要(英文)：In Y-maze behavioral assays, by genetic ablation of all dorsal olfactory receptors, we found an enantiomer odor discrimination paradox, where mice can detect one or both of enantiomers over a wide concentration range, but are unable to discriminate them. This fact indicates that a subset of activated receptors only enable mice to discriminate the similar odors, as evidence for hierarchical elemental odor coding via feedforward inhibition. Moreover, by using urine mixture samples, we evaluated relative intensities of urinary elemental odors, resulting in individual-dependent and diet-related odors < bladder cancer < occult blood < antibiotic metabolites. In the condition of 10 fold, equal occult blood-diluted urine samples, sniffer mice discriminated 11/11 patients with bladder cancer. This is a proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odors. Patent of method for odor evaluation was filed.

研究分野：感覚生理学

キーワード：情報センシング 匂い 生体機能利用 分子認識 感覚センサシステム

1. 研究開始当初の背景

嗅覚は、ヒトや動物に周囲状況を察知させ、危険回避や食物の状態の把握、ストレス緩和などの重要な機能を担っている。匂いセンシングは、危険物・犯人捜査、家庭での疾病発症予知、発酵食品などの最適加工自動制御技術など多様な判別・制御技術の革新をもたらすと期待される。

マウスは、乳癌ウイルス感染による腫瘍形成前の体臭変化を嗅覚で検知でき(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:5612- (2002),Yamazaki et al.)、肺癌の場合、腫瘍特異的成分ではなく遺伝的に決定される体臭の成分組成比変化を認識すると考えられている(PLoS ONE,5:e8819(2010), Matsumura et al.)。個人毎に異なる体臭に対し疾病初期の僅かな異常を検知するためには、家庭用嗅覚センサで日々の体臭を統計的にチェックする必要がある。

マウス S6 嗅覚受容体発現細胞センサが特定の匂い分子にのみ応答し、僅かな分子構造の相違でも応答が大きく低下する特徴は、気人工のセンサ材料での実現は困難と考えられることから、嗅覚受容体発現細胞センサをアレイ化することで、GC-MS 分析や吸着量検出型センサなど非特異的結合を区別しない測定系とは全く異なる、生物学的意味情報を担う成分に選択的高感度な嗅覚センサの実現が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

嗅覚情報センシング利用により、遠隔的な危険物検知・捜査や対象物の加工・熟成・健康状態の判定、などが可能になる。このセンシングには、色覚の R/G-Y/B 基本色に対応する基本匂いの解明と、匂い情報符号化法および嗅覚センサ開発が不可欠である。本課題では、最初の基本匂いの解明を目指し、マウス行動実験で匂いの検知・識別に寄与する受容体の特徴を解析し、共通・相違要素匂いの寄与度および背側受容体の寄与を検討する。また、マウス受容体導入メダカを用い、導入受容体が匂い認識に与える影響を検討する。さらに、多種細胞センサ応答同時計測用のマクロ蛍光測定系の整備、細胞センサの改良などを目指す。

3. 研究の方法

本課題では、野生型マウスとデルタ D マウスでカルボン鏡像異性体ペア再現臭の検知・識別閾値を行動実験で調べ、取得済みの本物ペアとの相違から、ペア間に共通する匂い要素の変化が匂い認識に与える影響を検討し、これらのペアで識別に大きく寄与する基本匂い要素および背側受容体群の寄与を明らかにする。また、マウス S6 受容体を導入したメダカを作製し、嗅覚応答の変化を調べ、導入受容体の匂い識別への寄与を明らかにする。さらに、ある匂いの検出に必要なといわれる数種のヒト受容体応答データを測定・比較し、匂い要素への寄与を検討する。

4. 研究成果

1) マウス行動実験による基本匂い要素の解析:試作 Y 迷路を用いたマウスの鏡像異性体ペア 2 種の検知・識別閾値濃度の解析から、背側受容体欠損により生じる、(+)異性体選択的な感度低下と極度の識別閾値低下を伴う識別パラドックスを発見した。この広い濃度範囲で識別できない結果は、高感度背側受容体がフィードフォワード抑制系を介した刺激特徴的な基本匂いを強調する階層的要素匂い符号化説を支持している。

また、以前のモルモット鼻付き単離全脳の嗅覚 2 次中枢の振動性応答の類似性を評価する wavelet 相関解析法を開発し、嗅覚経路の 3 次神経細胞で複数種の受容体信号のフィードフォワード抑制系を介した加算処理により、感覚情報の冗長度が変化し、刺激履歴依存性相関から刺激種依存性相関に変化することが分かった。

さらに、試作 Y 迷路を用いてヒト膀胱がん摘除前後の尿臭の要素匂い強度を識別閾値として評価した結果、同条件の混合尿試料中の要素匂いは、個人特有体臭 + 食事由来の匂い < 膀胱癌の臭い < 潜血の臭い < 抗生剤代謝産物の匂いの順に強くなることを見出した。この結果に基づき、個人特有体臭 + 食事由来の匂いを検知できない 100 万倍以上の希釈率でかつ、潜血の臭いを同じにした等潜血条件の希釈尿試料で、複数患者混合尿でトレーニングしたスニファー(匂い嗅ぎ)マウスは、11 名の患者個人の腫瘍摘除前の尿臭も識別できることが分かり、論文発表した。また、前立腺癌の尿臭の識別の可否についてもデータ収集を行った。

2) 特定臭検知ヒト受容体群の応答データおよび細胞アレイ用マクロ蛍光画像測定系の検討:受容体の helix8 の 2 番目がグルタミン酸の時の G 蛋白質の 3 倍迅速活性化を発見し、上記の成果と併せ、ヒトの受容体 375 種中で要素匂い形成を支配する 166 種の受容体を選別し、特許「匂いの評価方法」を申請した。この成果により、市販のマクロズーム顕微鏡の整備を延期し、特許に関するデータ収集を優先させ、ヒトの鍵受容体全 166 種の単離・発現ベクターの構築を行った。

3) マウス S6 受容体導入メダカ作製と応答解析:マウス S6 受容体を嗅上皮特異的に発現させた組換えメダカを作製に取組む予定であったが、上記の特許によって本実験は不要となり、実施を中止した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1) Sato T, Katsuoka Y, Yoneda K, Nonomura M, Uchimoto S, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Mizutani Y. Sniffer

- mice discriminate urine odours of patients with bladder cancer: A proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odours. *Sci. Rep.* 2017; **7**: 14628. doi: 10.1038/s41598-017-15355-z.
- 2) Sato T, Kawasaki T, Mine S, Matsumura H. Functional role of the C-terminal amphipathic helix 8 of olfactory receptors and other G protein-coupled receptors. *Intl. J. Mol. Sci.* 2016; **17**, pii: E1930, doi: 10.3390/ijms17111930.
 - 3) Sato T, Kajiwara R, Takashima I, Iijima T. A novel method for quantifying similarities between oscillatory neural responses in wavelet time-frequency power profiles. *Brain Res.* 2016; **1636**: 107-117.
 - 4) Matsukawa M, Imada M, Aizawa S, Sato T. Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. *Brain Res.* 2016; **1631**: 46-52.
 - 5) Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kawasaki T, Tsuboi A, Matsumura H. Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient interactions between the most-sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins. *Receptor Clin. Invest.* 2016; **3**: e1117. doi: 10.14800/rci.1117.
 - 6) Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kizumi M, Hiroshi H, Tsuboi A, Hirono J. Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: evidence for hierarchical odour coding. *Sci. Rep.* 2015; **5**: 14073. doi: 10.1038/srep14073.
 - 7) Kawasaki T, Saka T, Mine S, Mizohata E, Inoue T, Matsumura H, Sato T. The N-terminal acidic residue of the cytosolic helix 8 of and odorant receptor is responsible for different response dynamics via G-protein. *FEBS Lett.* 2015; **589**: 1136-1142.
- [学会発表](計 8件)
- 1) 佐藤孝明. G蛋白質共役型受容体のC末側 helix 8の1個のアミノ酸残基がターゲット G蛋白質との初期一過性特異的相互作用を支配する. LS-BT合同発表会, 2018年2月6日, 産総研つくばセンター中央講堂(茨城).
 - 2) 佐藤孝明. G蛋白質共役型受容体のC末側 helix 8の2番目のアミノ酸はG蛋白質との特異的一過性相互作用を支配する. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年12月6日, 神戸国際会議場(兵庫).
 - 3) 佐藤孝明. 嗅覚受容体のC末側両親媒性 helix 8の2番目のアミノ酸はG蛋白質との特異的一過性相互作用のためサブタイプ内で保存される. 日本味と匂学会第51回大会, 2017年9月26日, 神戸国際会議場(兵庫).
 - 4) 水谷陽一, 佐藤孝明, 小川朋美, 中尾一輝, 青松透真, 高橋周矢, 芦田彩恵, 西岡香奈里, 前田晃紀, 堀田瑞季, 米田, 内本, 野々村, 中西, 勝岡洋治. Differential diagnosis of bladder cancer by urine odor as a biomarker using new mouse behavioral assays. 第78回日本癌学会, 2017年9月28日, パシフィコ横浜(神奈川).
 - 5) 水谷陽一, 佐藤孝明, 小川朋美, 中尾一輝, 芦田彩恵, 西岡香奈里, 前田晃紀, 堀田瑞季, 米田, 野々村, 勝岡洋治. 尿臭をメルクマールにY迷路を用いたマウス行動実験による膀胱癌の鑑別診断. 第105回日本泌尿器科学会, 2017年4月21日, 城山観光ホテル(鹿児島).
 - 6) Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kizumi M, Hiroshi H, Tsuboi A, Hirono J. Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: evidence for hierarchical odour coding. International Symposium of Olfaction and Taste, 2016年6月8日, パシフィコ横浜(神奈川).
 - 7) Matsukawa M, Imada M, Aizawa S, Sato T. Predator odor induced stress responses can be alleviated by habitat odor. International Symposium of Olfaction and Taste, 2016年6月8日, パシフィコ横浜(神奈川).
 - 8) 佐藤孝明. 匂いセンサとしてのマウス嗅覚系の超高感度・高識別性. 電気化学会第83回大会, 2016年3月30日, 大阪大学(大阪).
- [図書](計 3件)
- 1) Sato T, Kajiwara R, Takashima I, Iijima T. Wavelet correlation analysis for quantifying similarities and real-time estimates of information encoded or decoded in single-trial oscillatory brain waves, In *Wavelet Theory and Its Applications*. InTechOpen (in press).
 - 2) 佐藤孝明, 松川 睦, 古殿雄一, 江村 誠, 廣野順三. 香りと五感: 嗅覚を介するストレス緩和神経路と嗅覚代替センサの基盤技術. フレグランスジャーナル社, 2016年, pp.164-pp.181.
 - 3) 佐藤孝明. 五感インターフェース技術と製品開発 事例集: 嗅覚の匂い情報アルゴリズムに基づく匂い評価法. 技術情報協会, 2016, pp.363-pp.368.

〔産業財産権〕

出願状況（計 2件）

名称：脳波から一過性の脳内情報を評価・読み出す方法
発明者：佐藤孝明
権利者：産総研
種類：特許
番号：特願 2016-129523
出願年月日：2016年6月30日
国内外の別：国内

名称：匂いの評価方法
発明者：佐藤孝明
権利者：産総研
種類：特許
番号：特願 2016-041745
出願年月日：2016年3月4日
国内外の別：国内

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0005439/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤孝明 (SATO, Takaaki)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号：20344187

(2) 研究分担者

()

研究者番号：