

令和 4 年 4 月 6 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K05912  
 研究課題名(和文) 哺乳動物鼻腔内における脂肪ノ蠟香調を持つ食品有香成分の捕捉・認識機序の解明  
  
 研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms on the capture and recognition of food odorants that have fatty and waxy notes in the nasal cavity of mammals  
  
 研究代表者  
 都築 巧 (TSUZUKI, SATOSHI)  
  
 京都大学・農学研究科・助教  
  
 研究者番号：50283651  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はクラスBスカベンジャー受容体の構成員CD36とSR-B1が哺乳動物鼻腔内にて食品有香成分の一範疇「脂肪族アルデヒド」を捕捉・認識するという証拠を提出してきている。本研究にて、我々は蛍光色素で標識した合成ペプチドを用いた CD36とそのリガンドの直接的相互作用の評価系(蛍光増強試験)を考案し(i)同受容体がある種の脂肪族アルデヒド類を含めた既知リガンドと特異的に結合すること、(ii)ある種の脂肪族アセテートがCD36のリガンドとなり得ること、を明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりクラスBスカベンジャー受容体のうちCD36が食品中の重要香気成分である脂肪族アルデヒドと特異的に結合することが明らかになったが、このことにより同受容体が哺乳動物鼻腔内にて、ある種の揮発性化合物の捕捉・認識に関わることが支持された。我々は簡便かつ迅速にCD36とリガンドの直接的相互作用を評価するシステムの構築に成功したが、本法は受容体-リガンド相互作用研究の有用なツールのひとつになるものである。また、脂肪ノ蠟香調をもつ揮発性化合物とCD36-リガンド活性の相関が明らかとなった。本研究がよい香りのする食品の開発等に应用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have provided evidence that CD36 and SR-B1, both of which belong to class B scavenger receptors, have an ability to capture and recognize a class of food odorants “fatty aldehyde” in the nasal cavity of mammals. In this study, by developing and employing a system to evaluate direct interactions between CD36 and its ligands using synthetic peptides labeled with a fluorescence dye, we found that (i) the receptor is capable of binding specifically to its ligands, including distinct fatty aldehydes and (ii) some of the fatty acetates also serve as ligands of CD36.

研究分野：栄養化学

キーワード：CD36 SR-B1 食品有香成分 脂肪族アルデヒド 模擬受容体ペプチド 特異的結合 GST融合タンパク質 三次元構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

我々人間を含めた陸上哺乳動物が食物を摂取する際、その「匂い」を知覚・記憶していることは重要である。様々な食物には特定の揮発性化合物が含まれており、それらが固有の香気を構成する。現在、我々人間が日常的に摂取する食品に含まれる匂い成分(食品有香成分)は約1万種類あると推定されている<sup>1)</sup>。これらは哺乳動物では主要嗅上皮表面に密集する嗅毛(嗅神経細胞由来)に分布するG蛋白質共役7回膜貫通型嗅覚受容体群の連携により感知・識別されると考えられている。現在、リナロール等比較的サイズの小さい150種類程度の食品有香成分に関して、その識別を担う嗅覚受容体(群)が確定している<sup>1)</sup>。他方、多数の食品有香物質ではその責任嗅覚受容体の特定を含め、嗅官感知・識別機構の解明が待たれている。

Cluster of differentiation 36 (CD36)と scavenger receptor class B member 1 (SR-B1)は脊椎動物がもつ2回膜貫通型受容体蛋白質である(図1)。哺乳動物において両者が(i)体内に広く分布していること、(ii)臓器・組織に傷害を与える酸化型低密度リポ蛋白質(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)等の変性リポ蛋白質や終末糖化産物を認識・捕捉すること、が知られている。その構造・分布・機能特性により両受容体はB型生体浄化受容体(class B scavenger receptor)として分類されている(図1)。これまでに、我々はマウスを用いてCD36, SR-B1が主要嗅上皮の表面に存在していることを明らかにした<sup>2,3)</sup>さらにoxLDLと両受容体の結合の阻害作用を指標に、トリデカノール等、総炭素数9以上の特定の脂肪酸アルデヒドがCD36, SR-B1と相互作用するという証拠を提出した<sup>3,4)</sup>(図1)。申請者が両受容体のリガンド候補として見いだした脂肪酸アルデヒドは我々人間が摂取する食品にも含まれているものであり、それらはラード等の食餌脂肪を想起させる脂肪の匂い、あるいは和蝋燭等を連想させる蝋の匂いがする(以後“匂い”は“香調(note)”とも表現する)。すなわち我々は、脂肪香調または蝋香調を持つ脂肪酸アルデヒドは哺乳動物の鼻腔内でCD36, SR-B1によって捕捉・認識されると着意した(これらの受容体は捕捉した物質を嗅覚受容体(群)に提示する役割を担っていることが推察されている<sup>5)</sup>)。なお、アルデヒド基不含の食品有香成分の中にも脂肪/蝋の匂いがするものは多数知られている。我々は、上記香調の揮発性化合物は一律にCD36, SR-B1によって認識されるのではないかと仮定した。同種の香調ということは、それらが鼻腔内において共通の機構で認識されている可能性が高いからである。また、我々が見出したリガンド候補が両受容体に特異的に結合しているかを調べることは、その相互作用を確定的とするために重要である。

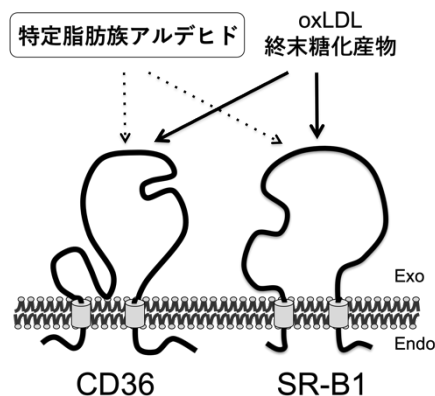


図1 CD36, SR-B1の構造模式図とリガンド特異性

## 2. 研究の目的

(1) CD36のアミノ酸領域149-168(以後CD36<sub>149-168</sub>), SR-B1のアミノ酸領域187-206(以後SR-B1<sub>187-206</sub>)はoxLDLの結合部位であることが知られている<sup>3,4)</sup>(図2)。我々は当該領域を化学的に合成、それらを人工模擬受容体として、また蛍光標識化oxLDLを基準リガンドとするCD36, SR-B1リガンド結合評価系を構築してきている(図3)。本アッセイ系では試験物質が模擬受容体、蛍光標識oxLDLの結合を阻害するとき、それらにリガンド活性があると判定する。一方、本法ではリガンド候補が直接的に模擬受容体に結合しているかを知ることができないという欠点があった。本研究では脂肪酸アルデヒド等のリガンド候補物質がCD36<sub>149-168</sub>およびSR-B1<sub>187-206</sub>へ結合することを支持する、より直接的な証拠を示すための試験系を構築すること、また結合様式についての知見を得ること、を目的のひとつとした。

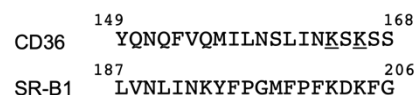


図2 CD36, SR-B1のoxLDL結合部位のアミノ酸配列

(2) 模擬受容体を利用した評価系を利用し、アルデヒド基不含でかつ脂肪/蠟の匂いのする揮発性化合物がクラス B スカベンジャー受容体と相互作用するかを検証し（新規リガンドの探索）、上記香調と両受容体リガンド活性の相関を見極めることも目的とした。

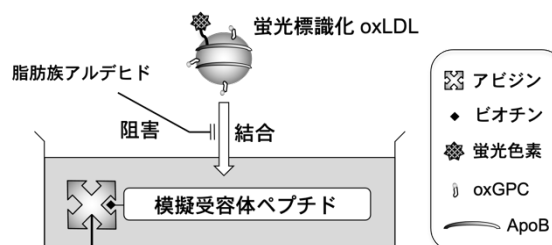


図3 無細胞B型生体浄化受容体リガンド評価システムの概要  
蛍光色素は LDL の蛋白質成分、アポリポ蛋白質 B (ApoB) に付加させている。

### 3. 研究の方法

#### (1) CD36, SR-B1 リガンド候補と受容体シミュレートの特異的結合の検出と結合様式の解明

我々は既知リガンドまたはリガンド候補物質と模擬受容体ペプチドの直接的相互作用を評価するための以下の2つの試験法を考案した。

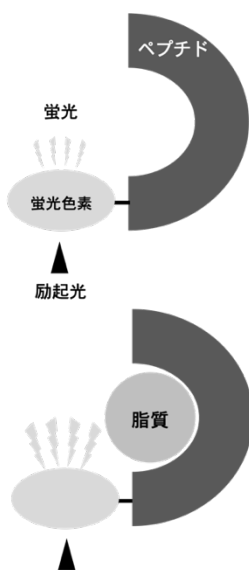


図4 蛍光増強法の原理

(a) 直接法: 模擬受容体ペプチドを固定化したプレート (図3参照) に、酸化型リン脂質の一種である 1-(palmitoyl)-2-(5-keto-6-octene-di-oyl)phosphatidylcholine (K0diA-PC) 等の既知リガンドやリガンド候補物質のみを添加する。両者の結合は、洗浄後、プレートに残存するリガンド候補の量を液体クロマトグラフィー-マスマススペクトロメトリー装置等で測定することによって知る、という手法である。

(b) 蛍光増強法: 図2に示した配列を含むペプチドのN末端に蛍光色素を付加したものを準備する(陽性プローブ)。本法は蛍光色素が周辺の疎水度に応じて放出蛍光が増加するという性質を利用する。K0diA-PC等の既知リガンドやトリデカナル等の揮発性のリガンド候補物質は脂質であり、それらの添加により計測蛍光値が高くなることが期待される(図4)。その場合、両者の結合が示唆される。

上記(a), (b)いずれにおいても、(I)添加したリガンド候補の濃度が高くなるにつれて計測値が漸増し、かつ一定の値に収束するか(データプロットが飽和する)、(II)スクランブル化配列等をもった陰性プローブを準備、それらを用いた場合は(I)が観察されないか、を調査する。(I)(II)が満たされる場合、リガンド候補と模擬受容体は特異的に結合していると判断する。

結合様式解明については図2に示した配列部分を glutathione *S*-transferase (GST) のC末端に融合させた組替え型蛋白質を大腸菌で発現させ、その融合蛋白質を結晶化させた後にトリデカナル等のリガンド候補をソーク、X線構造解析へと進むという方法を採用した。

(2) 脂肪/蠟香調をもつ揮発性化合物(脂肪酸アルデヒド以外)のCD36, SR-B1リガンドの探索  
図3に示した方法および3-(1)に記載した蛍光増強法により脂肪/蠟香調をもつ揮発性化合物(脂肪酸アルデヒド以外)のなかからCD36, SR-B1リガンドの探索を行った。

### 4. 研究成果

(1) 蛍光増強試験にてトリデカナル等の脂肪酸アルデヒドとCD36<sub>149-168</sub>の特異的相互作用が明確に示された。すなわち、同揮発性化合物の濃度依存的に陽性プローブの放出蛍光が漸増飽和、一方、陰性プローブ群(スクランブル化プローブ等)では飽和しなかった(図5)。同試験では(i)プローブペプチドの固体支持体への固定化は不要、(ii)反応液中にリガンド候補とプローブ以外は添加しないため、両者の相互作用を純然に評価可能、(iii)ハイスループットスクリーニングが可能、(iv)高価な装置は不要、などの利点があり、今後脂質-タンパク質相互作用研究での活用が見込まれる。また、SR-B1を含めて連続する比較的短いアミノ酸領域がリガンド認識部位になっているタンパク質において、そのリガンドとの直接的相互作用の検証や新規リガンド探

索において本法は有効であると考えられる。我々は CD36<sub>149-168</sub>, SR-B1<sub>187-206</sub> ペプチドを用いた直接法にて両受容体と既知リガンドの直接的相互作用について検証したが、それを支持する結果は得られなかった。また、GST 融合タンパク質を用いて結合様式を明らかにする実験にも取り組んだが、調製した融合タンパク質が凝集化してしまい、結晶化には至らなかった（予定していた結晶化融合タンパク質とリガンド候補の結晶構造解析には至らなかった）。すなわちリガンド-受容体の結合様式についての情報は得ることができなかった。

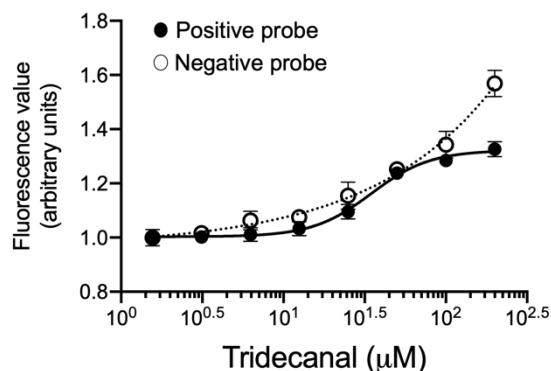


図5 蛍光強度試験による脂肪酸アルドヒドと CD36<sub>149-168</sub>の特異的結合相互作用の検証

(2) 図 3 に示した方法では試験物質のワックス効果により、これらが模擬受容体ペプチドに結合するという証拠は得られなかった。一方、蛍光増強試験によりいくつかの脂肪酸アセテートが CD36 のリガンドになることが明らかになった。今回明らかになったリガンド候補は酢酸ドデシル等がであり、これらは脂肪/蠟香調をもつものであった。すなわち両香調と CD36 リガンド活性の相関（香調-活性相関）が支持された。

#### <引用文献>

- 1) Dunkel A, Steinhaus M, Kotthoff M *et al.* Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 7124-7143, (2014)
- 2) Lee S, Eguchi A, Tsuzuki S *et al.* Expression of CD36 by olfactory receptor cells and its abundance on the epithelial surface in mice. *PLoS One* 10, e0133412 (2015)
- 3) Tsuzuki S, Kimoto Y, Lee S, *et al.* A novel role for scavenger receptor B1 as a contributor to the capture of specific volatile odorants in the nasal cavity. *Biomed. Res.* 39 117-129 (2018)
- 4) Tsuzuki S, Amitsuka T, Okahashi T *et al.* A search for CD36 ligands from flavor volatiles in foods with an aldehyde moiety: identification of saturated aliphatic aldehydes with 9-16 carbon atoms as potential ligands of the receptor. *J. Agric. Food Chem.* 65, 6647-6655 (2017)
- 5) Gomez-Diaz C, Bargeton B, Abuin L *et al.* A CD36 ectodomain mediates insect pheromone detection via a putative tunnelling mechanism. *Nat. Commun.* 7, 11866 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuzuki S, Kimoto Y, Yamasaki M, Sugawara T, Manabe Y, Inoue K, Sasaki T.	4. 巻 162
2. 論文標題 Assessment of direct binding interaction between CD36 and its potential lipid ligands using a peptide mimic of the receptor labeled with a fluorophore	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomed. Res.	6. 最初と最後の頁 181-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.42.181.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tsuzuki S, Kimoto Y, Marui K, Lee S, Inoue K, Sasaki T.	4. 巻 86
2. 論文標題 Application of a novel fluorescence intensity assay: identification of distinct fatty acetates as volatile compounds that bind specifically to amino acid region 149-168 of a transmembrane receptor CD36	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 509-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 都築巧、木本悠作、丸井啓太、佐々木努、井上和生
2. 発表標題 蛍光標識化ペプチドを用いたCD36リガンドアッセイ系の構築と新規リガンド探索
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	真鍋 祐樹  (MANABE YUKI)  (20730104)	京都大学・農学研究科・助教    (14301)	
研究分担者	山崎 正幸  (YAMASAKI MASAYUKI)  (80397562)	龍谷大学・農学部・教授    (34316)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関