

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02144

研究課題名（和文）ヒト味覚・嗅覚受容体応答の網羅的解析によるフレーバープロファイリング技術の開発

研究課題名（英文）Development of response evaluation systems for human chemosensory receptors

研究代表者

伊藤 圭祐 (Ito, Keisuke)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：40580460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：食品のフレーバーを理解し、分子設計技術へと発展させるためには、約440種類存在するヒト味覚・嗅覚受容体の応答解析技術の高度化が重要である。そこで本研究では、遺伝子発現から応答検出までの各ステップを検討することで、受容体応答感度の改善を試みた。TAR-Tatシステムの導入により、hORの膜表面発現および応答感度が大幅に向上することを明らかとし、また、hORの細胞表面発現量と応答感度を劇的に向上させるClass A GPCR由来のN末端配列を見出した。さらに、細胞表面発現量を増加させる香料原料を発見した。開発したhOR応答評価系を用いることで、各種食品の応答を明確に測定することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味と香りによって形成されるフレーバーはおいしさを決定づける最も重要な要素であり、食品の開発や評価においてフレーバーの客観的・定量的評価が不可欠である。ヒトにおける食品フレーバーの感知は、約440種類の味覚・嗅覚受容体のうち、どの受容体がどれだけ活性化したのか？によって決定されることから、全受容体を対象とした応答の全体像を明らかにする必要がある。本研究により成されたヒト味覚・嗅覚受容体の応答評価系の高感度化は、食品フレーバーの“デジタル化（数値化）”、“見える化”技術の開発に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To understand food flavors and advance molecular design technologies, it is crucial to enhance the analytical techniques for the responses of the approximately 440 human chemosensory receptors. This study aimed to improve receptor response by examining each step from gene expression to response detection. The introduction of the TAR-Tat system significantly increased the membrane surface expression and response sensitivity of hORs. Additionally, an N-terminal sequence derived from Class A GPCR was found to dramatically enhance both the surface expression and response sensitivity of hORs. Moreover, a fragrance ingredient that increases cell surface expression was discovered. The developed hOR response evaluation system enables clear measurement of responses to various food substances.

研究分野：食品化学

キーワード：フレーバー おいしさ 味覚受容体 嗅覚受容体 応答評価システム 味 匂い

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

味と香りによって形成されるフレーバー（風味）は食品のおいしさを決定づける重要な要素である。1990-2000年にかけてヒトの味覚・嗅覚受容体が特定されたことで、感覚として捉えられてきた「おいしさ」は分子レベルで解析できるようになりつつある。ヒト味覚受容体は約40種類が報告されており、5基本味である甘味、苦味、うま味、塩味、酸味の受容体のほか、広義の味である辛味や清涼感、ココ味物質の受容体も特定されている。一方、ヒト嗅覚受容体（hOR）は約400種類存在し、1つの成分が複数の受容体を活性化させ、その応答パターンによって「バニラ」、「レモン」のような匂いが感知される。そのため、食品のフレーバーを理解し、さらには分子レベルでの設計を可能とするためには、各食品成分による約440種類のヒト味覚・嗅覚受容体応答の全体像を解析する必要がある。しかし、ヒト味覚・嗅覚受容体応答の評価は可能となってきたものの、産業レベルで実用可能なシステムとしては未だ十分には開発されていない。

2. 研究の目的

ヒト味覚・嗅覚受容体は HEK293T 細胞などの培養細胞に発現させることでフレーバー成分への応答評価が可能である。そこで本研究では、受容体応答の検出感度を改善することで、ヒト味覚・嗅覚受容体応答系の基盤技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

hOR の応答は、HEK 細胞を用いた cAMP assay により評価した。受容体活性化後、アデニル酸シクラーゼを介して産生される cAMP を改変型ルシフェラーゼで検出することで、受容体応答を発光量として定量解析した。なお本研究では、hOR の機能的発現を補助するシャペロンの追加など、様々な要素を個別に最適化した。またヒト味覚受容体においても同様の検討を進めた。

4. 研究成果

(1) 転写量増加によるヒト嗅覚受容体の膜表面発現量増加効果の検討

ヒト嗅覚受容体の応答感度改善のカギは、細胞表面への hOR の発現量の改善である。これまでの当該分野の研究は、hOR の膜移行プロセスや細胞内シグナルの効率的な検出に関する研究が主流となっていた。そこで本研究では、hOR 発現用の遺伝子を細胞に導入してから機能的に応答するまでの工程を見直し、OR の転写量に着目した検討を進めた。

OR1A1 をモデルとして、TAR-Tat システムの導入による膜表面発現への影響を解析した結果、TAR-Tat システムを用いることで OR1A1 の膜表面発現量が 100 倍以上顕著に増加することが明らかになった。また、全 389 種類の OR をランダムに発現させた細胞群においても同様に膜表面発現量の増加が観察された。これらの結果から、遺伝子転写量の増加が膜表面発現量の増加につながることを示唆された。

続いて、TAR-Tat システムの導入による膜表面発現量の増加が OR 応答評価系の高感度化につながるかどうかを検討した。その結果、TAR-Tat システムの導入により、各 hOR 応答において、顕著に閾値が低下し、(+)-carvone に対する OR1A1 応答の例では、先行研究と比較して応答感度が 500 倍に向上した。さらに、n-hexanal に対する OR1A1、OR2J3 および OR51M1 の応答は、従来法では検出されず、TAR-Tat システムを導入した場合にのみ検出された。また興味深いことに、

n-hexanal によって OR2M3 が抑制性応答 (受容体の恒常的活性を下げることで、ベースラインよりも応答値が低下する現象) を示すことを発見した。

以上の結果は、TAR-Tat システムの導入により hOR 応答評価系の感度が向上すること、またその効果が特定の hOR あるいは匂い物質に限定されないことを示唆した。

大豆を原料とした代替肉の需要が世界的に高まる中、大豆特有の不快臭をマスキングする技術の開発が求められている。我々は、代表的な不快臭原因物質である n-hexanal について、マスキング技術の開発を進めてきた。本研究によって得られた知見は、代替肉開発における不快臭のマスキング技術としても応用できる可能性がある。

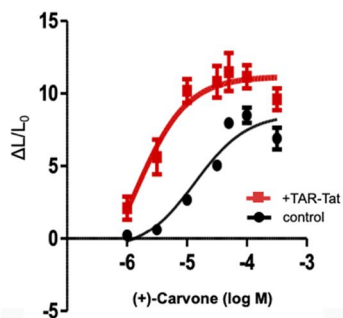


図1 TAR-Tat システムによる hOR の応答感度改善

OR1A1 をモデルとして (+)-Carvone による応答を解析した。

(2) ヒト嗅覚受容体の N 末端配列の最適化

hOR に Rhodopsin の N 末端配列 (Rho タグ) を付加することで、細胞表面発現と応答が改善することが報告されている。そこで本研究では、ヒト Class A GPCR の N 末端配列について、hOR 細胞表面発現改善効果を網羅的に解析した。

OR1A1 をモデルとして Rho タグを付加した結果、過去の報告と同様に、細胞表面発現量の顕著な増加が確認された。そこで続いて、hOR 以外の全ヒト Class A GPCR のアミノ酸配列を TMHMM により網羅的に解析し、10~556 アミノ酸から構成される N 末端細胞外領域のアミノ酸配列を 271 種類取得した。それらの N 末端配列をランダムに付加した OR1A1 の遺伝子ライブラリーを構築し、培養細胞にトランスフェクションした後、OR1A1 の細胞表面発現を解析した。高い細胞表面発現量を示した上位 0.5% の細胞群を分取し、N 末端配列をナノポアシーケンサーにより解析した。続いて出現頻度が高かった 24 種類の N 末端配列を選別し、個別に再解析した。その結果、Rho タグ以上に OR1A1 の細胞表面発現量を増加させる N 末端配列を複数特定することに成功した。最も効果の高い配列は GPCR X の N 末端アミノ酸から構成される配列 (GPCR X タグ) であり、本タグを付加することで OR1A1 の細胞表面発現量は 3.5 倍、アゴニスト応答値は 13.5 倍に大きく増加した。GPCR X タグの有効領域を特定するため、N 末端側あるいは C 末端側からアミノ酸残基を削っていった配列の効果を解析した結果、全長配列が最も高い効果を示し、配列が短くなるほどその効果は均等に減少した。このことから、特定の領域のみが重要なのではなく、配列全体の寄与が示唆された。さらに、見出した GPCR X タグの汎用性を検討した結果、大部分の hOR において、OR1A1 と同様に細胞表面発現を改善できることが示された。

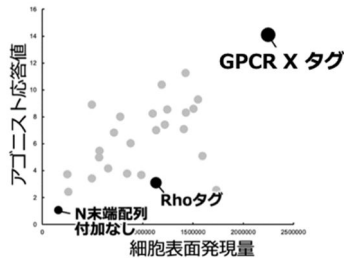


図2 GPCR X タグの付加による細胞表面発現量と応答感度の改善
OR1A1 をモデルとして(+)-Carvone による応答を解析した。

(3) ヒト嗅覚受容体に作用する薬理的シャペロンの探索

本研究では、スプリットルシフェラーゼを応用したハイスループットかつ定量的な hOR 細胞表面発現解析システムを開発し、hOR の細胞表面発現量を増加させる新たな機能物質を探索した。OR1A1 をモデルとして、細胞表面発現を強力に促進する既知アクセサリタンパク質 (RTP1S) の効果を解析した結果、RTP1S の共発現により、OR1A1 の細胞表面発現量は 1.8 倍に増加することが確認された。

新たな機能物質の探索に際して「hOR にリガンドを結合させることで構造を安定化できれば、細胞表面発現を改善できるのではないか」と着想し、1,300 種類以上の香料原料をサンプルとしてスクリーニングを実施した。その結果、OR1A1 の細胞表面発現量を増加させる機能物質として ORPC X などを見出した。その効果は濃度依存的であり、培地への添加により、OR1A1 の細胞表面発現量は RTP1S と同等以上の 2.1 倍に増加した。また、応答感度も顕著に向上した。

GPCR の構造を安定化することで細胞表面発現を改善する物質は“薬理的シャペロン”と呼ばれ、新たな創薬戦略として注目されている。ORPC X は、本研究により初めて発見された、OR に作用する薬理的シャペロンであることが示唆された。

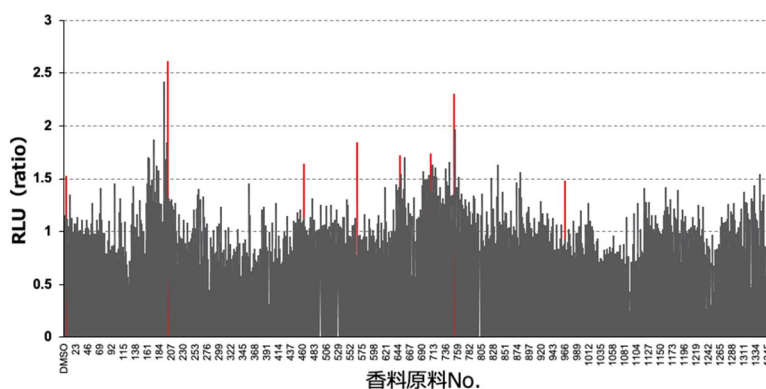


図3 hOR の細胞表面発現量を増加させる香料原料のスクリーニング
OR1A1 をモデルとして解析した。

(4) 食品の匂いのヒト嗅覚受容体解析

代替肉の価値として“肉らしさ”は最も重要であり、特定の動物種の“肉らしさ”を感じられる代替肉製品の需要も高まっている。しかし、“肉らしさ”には明確な基準が無く、各人の主観によっ

て曖昧に評価されているのが現状である。ヒトは主に匂いによって肉の動物種を識別する。そこで本研究では、畜肉の“肉らしさ”を客観的に判別する手法の確立を目的として、ヒト嗅覚受容体の網羅的応答解析を実施した。

加熱調理した牛肉、豚肉、鶏肉をサンプルとして、379 種類のヒト嗅覚受容体を対象とした網羅的応答解析を実施した。その結果、牛肉では豚肉や鶏肉よりも多数の嗅覚受容体の応答が検出されたことから、より多くの香気成分によって複雑な匂いが形成される可能性が示唆された。また、各畜肉に固有の応答受容体が検出されたことから、ヒト嗅覚受容体応答を指標として、“肉らしさ”を判別できる可能性が示唆された。

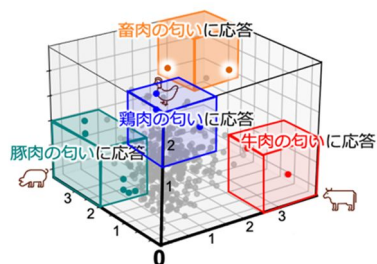


図4 牛肉、鶏肉、豚肉をサンプルとした hOR 応答の比較
各点が個別の hOR を示す。

(5) まとめ

本研究では、ヒト味覚・嗅覚受容体の応答感度向上を目指し、遺伝子発現から細胞膜への移行までの様々なステップを再検討し、特に hOR に関しては応答感度の顕著な改善に成功した。得られた知見は高感度な hOR 応答評価系の基盤技術として、匂いデジタル化技術の開発に大きく貢献するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 M. Masuda, Y. Terada, R. Tsuji, S. Nakano, K. Ito	4. 巻 12
2. 論文標題 Time-series sensory analysis provided important TI parameters for masking the beany flavor of soymilk.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 2752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods12142752	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 Y. Terada, K. Tanaka, M. Matsuyama, M. Fujitani, M. Shibuya, Y. Yamamoto, R. Kato, K. Ito.	4. 巻 12
2. 論文標題 Collection of data variation using a high-throughput image-based assay platform facilitates data-driven understanding of TRPA1 agonist diversity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Applied Sci.	6. 最初と最後の頁 1622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app12031622	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 伊藤圭祐	4. 巻 68
2. 論文標題 ヒト化学感覚受容体の応答評価を指標とする味と香りの分子設計技術	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本食品科学工学会誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/nskkk.69.1	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 -
1. 著者名 伊藤圭祐	4. 巻 41
2. 論文標題 食品素材の風味改善に向けたヒト嗅覚受容体応答評価系の応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 食品加工技術：日本食品機械研究会誌	6. 最初と最後の頁 6-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 伊藤圭祐	4. 巻 9
2. 論文標題 ヒトの匂い知覚メカニズムを応用する牛肉香の“みえる化”	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 畜産の情報	6. 最初と最後の頁 68-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 伊藤圭祐、伊藤豊実、寺田祐子	4. 巻 198
2. 論文標題 ヒト化学感覚受容体の応答評価を指標とする味と匂いの分子設計技術	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ソフトドリンク技術資料	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤圭祐
2. 発表標題 味機能ペプチド解析への合成ライブラリーの活用
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木知依, 寺田祐子, 伊藤圭祐
2. 発表標題 製菓用香料素材に含まれる香り成分によるヒト甘味受容体の活性化
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内村美里, 勝山響, 尾城一恵, 寺田祐子, 伊藤圭祐
2. 発表標題 香りプロファイリングに活用できるヒト嗅覚受容体の網羅的気相応答評価系の開発
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田みゆ, 寺田祐子, 中野祥吾, 伊藤圭祐
2. 発表標題 香料素材の時系列官能プロファイルを活用する新規マスキング技術の開発
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内村美里, 尾城一恵, 寺田祐子, 伊藤圭祐
2. 発表標題 全ヒト嗅覚受容体の気相系解析による牛肉香のプロファイリング
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤圭祐
2. 発表標題 味機能ペプチド解析への合成ライブラリーの活用
3. 学会等名 日本農芸化学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤圭祐
2. 発表標題 ヒト味覚・嗅覚受容体の応答評価による分子レベルでの食品フレーバー解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内村美里、尾城一恵、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 全ヒト嗅覚受容体の気相系解析による牛肉香のプロファイリング
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内村美里、尾城一恵、土屋さくら、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 フレーバー感知に関わるヒト味覚・嗅覚受容体の網羅的解析システムの開発
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾城一恵、勝山響、金子龍成、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 in vitro匂い評価系におけるヒト嗅覚受容体の細胞表面発現を改善するN末端配列の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 金子晏生、松山南、山本紘義、須崎健太、笹原亮、木原明彦、小林英明、伊藤圭祐、寺田祐子
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸の酸化は刺激味受容体TRPA1活性を増強させる
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 金子龍成、尾城一恵、柏木貴裕、寺田育生、星野邦秀、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 ヒト嗅覚受容体応答を改善する新規分子シャペロンの発見
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高田こはる、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 ヒト嗅覚受容体応答を指標とした畜肉の判別解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 勝山響、尾城一恵、平野啓太、寺田祐子、伊藤圭祐
2. 発表標題 大豆n-hexanalの不快臭マスキングに向けた新たなヒト嗅覚受容体ターゲットの発見
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 嗅覚受容体応答評価系の感度向上方法	発明者 伊藤圭祐、長谷川 (寺田)祐子、尾城 一恵、伊藤豊実、内	権利者 静岡県公立大学 法人
産業財産権の種類、番号 特許、2023-039400	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	加藤 竜司 (Kato Ryuji) (50377884)	名古屋大学・創薬科学研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	伊藤 創平 (Ito Sohei) (70372836)	静岡県立大学・食品栄養環境科学研究所・准教授 (23803)	
研究分担者	中野 祥吾 (Nakano Shogo) (80748541)	静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授 (23803)	
研究分担者	寺田 祐子 (Terada Yuko) (80767632)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	

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
---------	---------