

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H05359・20K20370

研究課題名（和文）全ての匂い分子の定量化を目指したヒト嗅覚受容体発現細胞アレイの開発

研究課題名（英文）Development of human olfactory receptor-expressing cell arrays for the quantification of all odour molecules

研究代表者

黒田 俊一（KURODA, SHUN'ICHI）

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：60263406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：嗅覚情報はヒトが感知可能な匂い分子全て（数十万種類）を表現する基本臭が存在しないため、「正確な表現と再現」が困難であった。一方、食品、飲料、醸造品、化粧品等のヒトが直接触れる製品開発において、味覚と嗅覚に基づく官能試験は非常に重要であるが、試験官の資質に大きく依存するため、再現性やハイスループット性が極めて低く、何よりも官能試験結果の正確な共有が困難であった。我々は嗅覚情報の「正確な表現と再現」を実現するためには、まずはヒトが感じることをできる匂い分子全てを正確に測定するための「センサー」と「新しい表現方法」を開発する必要があると考えた。そこで、「ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイ」を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト嗅覚受容体全て（約400種類）を機能を保ったまま、培養細胞上で発現させることはできなかったが、本研究により、それが可能になった。その結果、ヒト嗅覚を完全に再現した「ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイ」が「人工鼻」として可能になり、匂い分子に反応した時に生じる嗅覚受容体活性化パターンは、ヒトが感じることで出来る全ての匂いを定量的に表現し、さらにデジタルデータ化できる可能性を秘めている。これは、ヒト5感のうち、最後まで残された感覚情報を表現する世界初の手法となる。

研究成果の概要（英文）：Olfactory information alone is difficult to accurately represent and reproduce, as there is no basic odour that represents all the hundreds of thousands of odour molecules that humans can detect. On the other hand, sensory testing based on taste and smell is very important in the development of products that come into direct contact with humans, such as foods, beverages, brewed products and cosmetics, but it is highly dependent on the qualifications of the testers, which makes reproducibility and high-throughput testing extremely difficult, and above all, accurate sharing of sensory test results difficult. In order to achieve an 'accurate representation and reproduction' of olfactory information, it is necessary to develop a 'sensor' and a 'new representation method' to accurately measure all the odour molecules that humans can perceive. In order to do this, they have developed a 'human olfactory receptor expression cell array'.

研究分野：応用細胞工学

キーワード：ヒト嗅覚受容体 バイオセンサー

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

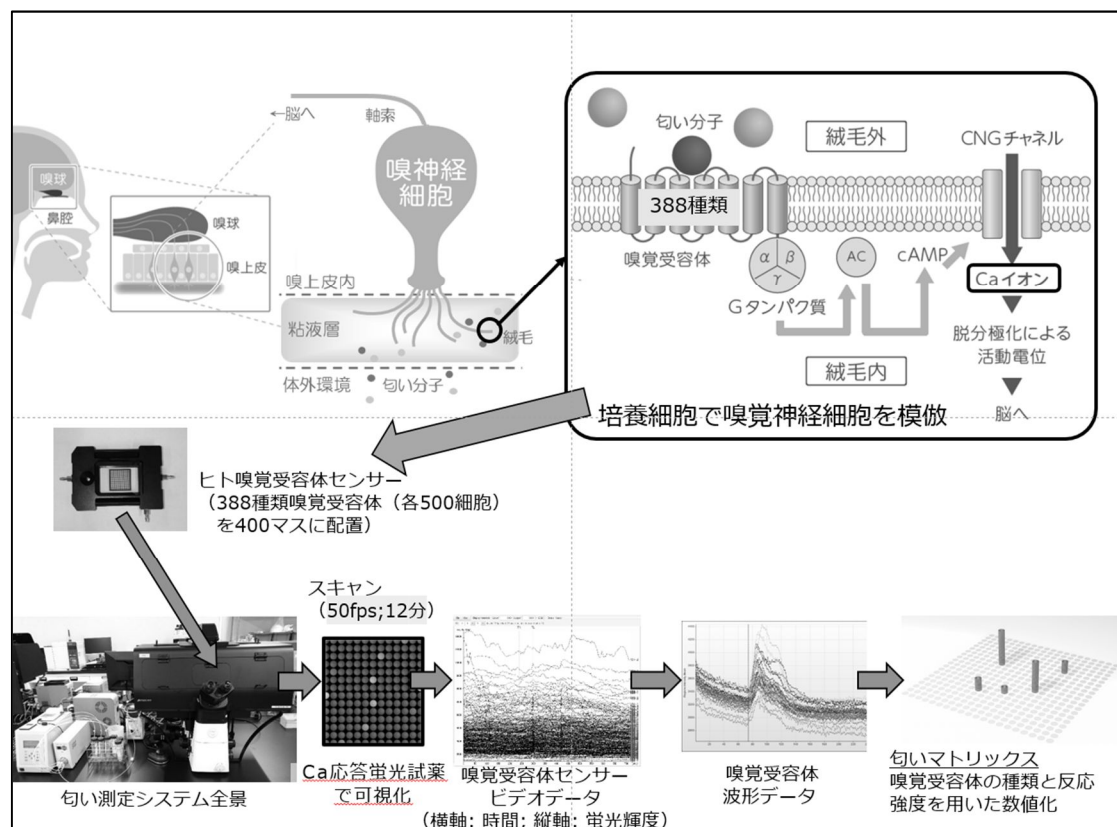
ヒトの五感の中で、唯一嗅覚情報は定量的な表現、つまりデジタルデータ化することが困難であった。具体的には、従来の GC-MS などで行われる匂い分子の成分構成だけでは、本当にヒトが感じる事が出来る匂い分子と感じない匂い分子が混在してデータが複雑化し、また匂いの香調の中心を担う匂い分子は必ずしも含有量の高いものとは限らず、さらに匂い分子同士が相互作用して全く違う香調になる可能性があり、「ヒト嗅覚による匂いの認識」をデジタルデータ化する方策はなかった。また、味覚は基本味(甘、塩、酸、辛、旨など)があり、その基準物質が定義されており、それにカリブレーションすることによりデジタルデータ化が出来ているが、ヒトが感知可能な匂い分子全て(数十万種類)を表現する基本臭は存在しないのが現状であり、「正確な表現と再現」は不可能であった。一方、食品、飲料、醸造品、化粧品等のヒトが直接触れる製品開発において、味覚と嗅覚に基づく官能試験は非常に重要であるが、試験官の資質に大きく依存するため、再現性やハイスループット性が極めて低く、何よりも官能試験結果の正確な共有が困難であった。

## 2. 研究の目的

我々は嗅覚情報の「正確な表現と再現」を実現するためには、まずはヒトが感じる事ができる匂い分子全てを正確に測定するための「センサー」と「新しい表現方法」を開発する事が必要と考えた。まず、これまでに数多くの電氣的匂いセンサー(金属、半導体、有機ポリマー)が開発されているが、本当にヒトが感じる匂い分子全てを認識しているという証拠がなかった。そこで、我々は、ヒト嗅覚の中心的な役割を担っている「ヒト嗅覚受容体」に注目した。具体的には、ヒトは約 400 種類の嗅覚受容体を有し、各受容体がファジーな匂い分子に対する認識を行うため、特定の匂い分子に対し複数種の受容体異なる強度で活性化する現象を活用して、全てのヒト嗅覚受容体の活性化パターン(約 400 次元)を不変の嗅覚デジタルデータとして使用することを考案した。本研究では、その実用化に向けた基礎技術の開発を行った。

## 3. 研究の方法

スライドガラス上に、20x20 のグリッド(計 400 マス)を形成し、ヒト嗅覚受容体発現ベクター(約 400 種類)を遺伝子導入試薬とともに、それぞれのマスに印刷した。その後、ヒト嗅覚受容体のシグナルを受けて、最終的に Ca チャネルを開ける分子群と細胞内 Ca 濃度に従って蛍光を発するタンパク質を安定的に発現する細胞を播種した。その結果、各マスに 1 種類のヒト嗅覚受容体を発現する細胞が出現し、全体として約 400 種類のヒト嗅覚受容体発現細胞アレイとなった(下図 左中)。



ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイを顕微鏡下に設置した灌流用チャンバーにセットし、匂い分

子が溶解したリンゲル液を灌流すると、匂い分子に応答する嗅覚受容体を発現する細胞が、そのアフィニティに従った強度の蛍光を発した。次に、CCD カメラにより経時的蛍光強度変化を記録し、1細胞単位で蛍光強度変化を抽出し、機械学習したプログラムにより有意な蛍光強度変化を示す嗅覚受容体発現細胞を同定した。得られた1細胞毎の蛍光強度変化データを、各嗅覚受容体毎に平均化して、ヒト嗅覚情報の基本となる「匂いマトリックス(約400次元)」とした(上図右下)。

#### 4. 研究成果

- (1) 全ヒト嗅覚受容体(約400種類)の発現ベクターの改良: ヒト嗅覚受容体は7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体であるので、動物細胞発現においてエンドソーム膜に対する正しいトポロジーを保つ必要がある。先行研究では、ウシロドプシン由来シグナル配列(約20アミノ酸残基)を使用していたが、全ての嗅覚受容体を発現してはいなかった。そこで、切断型シグナル配列 Lucy タグ(約10アミノ酸残基)をN末端側に融合したところ、ほぼ全ての嗅覚受容体を正しいトポロジーで発現することに成功した。しかし、100%ではないので、今後もシグナル配列を最適化する必要がある。
- (2) 嗅覚受容体発現用細胞の改良: 嗅覚受容体の発現を促すシャペロン群(RTP1S, Ric8等) 嗅覚受容体専用Gタンパク質(G $\alpha$ /olf)、嗅覚受容体が駆動するcAMP依存性Caイオンチャネル(CNG)、リアルタイム測定のためCaイオン依存性蛍光タンパク質を安定発現するHEK293細胞を作製した。また、その他の細胞でも同様な安定発現株を作製した。
- (3) ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイ作成法の改良: 一般的なスライドガラス上に0.5mm四方のマスを20列20行を撥水性インクで作成し、各マスに各ヒト嗅覚受容体と遺伝子導入試薬の混合液を印刷した。この時、約20種類の市販遺伝子導入試薬を検討し、(2)で作成した細胞を播種して、嗅覚受容体発現効率が最善なものを選択した。
- (4) ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイ測定系の改良: スライドガラス上に形成した400マスに含まれる細胞群を1細胞判別可能な解像度で毎秒10フレーム程度ビデオ撮影できるCMOSカメラと光学系を構築した。
- (5) 匂い分子捕集法の改良: ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイは匂い分子を水系で接触させるので、極性匂い分子(液体)は容易に接触できるが、非極性匂い分子(液体・固体)の水系への移行は難しい。本研究では、少量の有機溶媒で溶解して水系に移行させる方法、エマルジョンを使用する方法などを開発した。また、沸点の低い匂い分子は水系に移行させても速やかに蒸発するので、匂い分子アプライ直後に測定するシステムとした。さらに、匂い分子(気体)については、多孔性樹脂に一旦吸着させて、測定直前に熱または有機溶媒で溶出する方法で測定可能にした。
- (6) 1細胞単位の細胞内Caイオン変化データの抽出法の改良: ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイの1マスには約500細胞が埋め込まれており、400マス全体では約20万細胞が存在する。本測定系では、1細胞レベルで蛍光強度の経時変化を格納するので、1回の測定で膨大な波形データが生み出され、さらに多くの波形データにはノイズが多量に含まれている。そこで、機械学習により自動的に、正しい嗅覚受容体波形データを選抜するプログラムを完成させ、手動時1測定1週間かかっていた作業を1測定15分までに短縮することに成功した。
- (7) 匂いマトリックスの作成: 選抜した波形データから特徴量を抽出し、AI解析することにより、嗅覚受容体別の活性化度合いを数値化し、匂いマトリックスを自動生成させた。
- (8) ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイセンサーの現状: 様々な匂い分子を測定することが可能になり、イソ吉草酸の測定では、ヒト嗅覚を超える感度(pptオーダー)を発揮することが判明した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 0件）

1. 著者名 佐藤翔、山崎智子、立松健司、黒田俊一	4. 巻 20
2. 論文標題 ヒト嗅覚受容体センサーを駆使したAI調香師創生プロジェクトについて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AROMA RESEARCH	6. 最初と最後の頁 326-327
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 黒田俊一	4. 巻 14
2. 論文標題 嗅覚の可視化は人類に何をもたらすのか？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 研究支援	6. 最初と最後の頁 10-11
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 黒田俊一	4. 巻 19
2. 論文標題 匂いマトリックス技術による匂い・香り業界のパラダイムシフトを目指して	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AROMA RESEARCH	6. 最初と最後の頁 10-12
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 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 久保賢治、黒田俊一	4. 巻 24
2. 論文標題 ヒト嗅覚受容体センサーによる嗅覚情報のデジタルデータ化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 中国総研	6. 最初と最後の頁 25-33
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 佐藤翔、山崎智子、立松健司、黒田俊一	4. 巻 72
2. 論文標題 AIを活用したヒト嗅覚受容体応答の網羅的解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 78-80
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 立松健司、黒田俊一	4. 巻 96
2. 論文標題 匂いの感じ方の個人差	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 655
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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 行武拓哉、山崎智子、佐藤翔、立松健司、黒田俊一
2. 発表標題 匂いに対するヒト嗅覚受容体群の網羅的解析技術の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田俊一
2. 発表標題 ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイによる網羅的匂い分析法の開発と応用
3. 学会等名 第44回日本化粧品学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立松健司
2. 発表標題 ヒト嗅覚受容体発現細胞アレイによる網羅的匂い分析法の開発と応用
3. 学会等名 情報計算法学生物学会2019年大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Yukutake, Tomoko Yamazaki, Sho Sato, Kenji Tatematsu, Shun'ichi Kuroda
2. 発表標題 Development of comprehensive analysis method of olfactory receptor repertory
3. 学会等名 The 23rd SANKEN International Symposium, The 18th SANKEN Nanotechnology International Symposium（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 立松健司、黒田俊一	4. 発行年 2020年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 187～194
3. 書名 匂いのセンシング技術	

〔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	立松 健司  (TATEMATSU KENJI)  (00322743)	大阪大学・産業科学研究所・助教    (14401)	

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