

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02140

研究課題名（和文）悪臭が香りの引き立て役となる仕組みの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which foul odors enhance the perception of smells

研究代表者

稲垣 成矩 (Inagaki, Shigenori)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30827952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,000,000円

研究成果の概要（和文）：アロステリック効果とは、リガンド結合部位とは異なる別の部分に分子が結合することにより、受容体の活性が変化する現象を指す。本研究では、マウスにおける嗅神経細胞の匂い応答を調べることで、嗅覚受容体で匂い分子によるアロステリック効果が生じることを見出した。さらにin vitro再構成系アッセイによって、嗅覚受容体レベルで、実際にアロステリック効果が生じることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる匂いを足し合わせると、元の匂いからは想像できない匂いになることがある。しかし、そのメカニズムについてはよく分かっていなかった。本研究結果により、匂いの足し合わせの法則性の一端が、嗅神経細胞・嗅覚受容体レベルで明らかになった。従って、匂いの足し合わせに関する情報処理の理解が今後一層進むと考えられる。また将来的には、調香師の知識や経験に基づかない匂いの設計にも繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The allosteric effect is the phenomenon whereby the binding of a molecule to a site other than the ligand binding site causes a change in receptor activity. In this study, we examined odor responses of olfactory sensory neurons and found that odorant receptors exhibit allosteric effects. In addition, we demonstrated that the allosteric effect actually occurs at the level of the odorant receptor with in vitro reconstitution assays.

研究分野：嗅覚情報処理

キーワード：嗅神経細胞 嗅覚受容体 アロステリック効果

1. 研究開始当初の背景

“悪臭”と形容される匂いを足すと、それまでの香りよりも遥かに良い香りになることがある。例えば、蒸れた靴下の匂いと形容されるイソ吉草酸は、バニラの匂いであるバニリンと混合することで、チョコレートの匂いを生じることが知られている。またジアセチルは生ゴミ臭と形容される悪臭分子であるが、発酵食品の匂いを複雑で芳醇なものに変化させることが知られている。このように、悪臭が香りのエンハンサーとして機能する例がいくつもあるが、その具体的なメカニズムは明らかとなっていない。

従来、嗅覚分野の研究は、1種類の匂い分子(純物質)に着目して進められてきた。鼻腔に取り込まれた匂い分子は、嗅上皮に存在する嗅神経細胞によって認識される(図1)。個々の嗅神経細胞は、ヒトの場合約400種類、マウスの場合約1000種類の中から、ただ1種類の嗅覚受容体を発現する。これまでのマウス個体における研究や、培養細胞において再構成した受容体アッセイ(再構成系アッセイ)によって、嗅神経細胞の応答は、嗅覚受容体によってのみ決定されることが分かっている。そして、現在では、多くの嗅覚受容体において、アゴニストとなる匂い分子が同定されている。

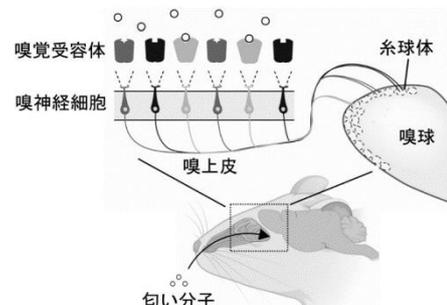


図1.匂い分子は嗅神経細胞に発現する嗅覚受容体によって認識される。

一方で、匂いの混合物(混合臭)に関しては、あまり研究が進んでいなかった。通常、自然界の匂いは、数10種類以上の匂い分子から構成される混合臭である。先行研究において、マウスに混合臭を嗅がせたところ、嗅神経細胞の混合臭に対する応答が、その構成分子に対する応答の足し合わせになると報告があった(*Neuron*. 2006, 50(6); 937-49.)。このことから、一般的には、純物質に対する嗅覚受容体の応答が分かれば、混合臭に対する応答は予測できると考えられてきた。

しかし、我々が、高感度な計測が可能である2光子蛍光カルシウムイメージング法を用いて、混合臭に対する嗅神経細胞の応答を調べたところ、神経細胞の応答が相乗的に増強される場合や(相乗効果)、拮抗的に阻害される場合(拮抗作用)があることを発見した(*Inagaki et al, Cell Rep.* 2020, 31(13):107814.)。このことから、混合臭に対する嗅神経細胞の応答は、必ずしも構成分子に対する応答の足し合わせにならないことが明らかになった。嗅上皮には、局所的な回路や、脳からの遠心性入力が存在しないことから、この相乗効果や拮抗作用は嗅覚受容体レベルで生じていると考えられた。

2. 研究の目的

これまで、嗅神経細胞における拮抗作用の報告は全く無かった訳ではない。特定の嗅覚受容体においては、構造の近い匂い分子間における競合阻害の結果、匂い応答が抑制されることが知られていた。しかし、我々の研究のように、多くの種類の匂い分子や嗅覚受容体において拮抗作用が生じるとは考えられてこなかった。このことから、嗅覚受容体における競合阻害以外のメカニズムによっても拮抗作用が生じている可能性がある。さらに相乗効果に関しては、全く未知の現象であり、悪臭が香りのエンハンサーとして機能する上で重要であると考えられた。そこで本研究では、主に相乗効果に着目して、下記の二点について研究を進めた。

- 1) 相乗効果の法則性の解明
- 2) 相乗効果が生じるメカニズムの解明

3. 研究の方法

主に二つの手法を用いて、研究を行った。

1) 麻酔下マウスにおける2光子カルシウムイメージング

嗅神経細胞特異的に蛍光カルシウムセンサーを発現する遺伝子組み換えマウスを用いて実験を行った。麻酔下のマウスにおいて、嗅上皮の上に位置する頭蓋骨を薄くなるまで削った。その後、匂い刺激装置を設置した2光子顕微鏡を用いて、嗅神経細胞の細胞体におけるカルシウム応答を計測した(図2A)。

2) 培養細胞における再構成系アッセイ

マウス嗅上皮の cDNA ライブラリーからクローニングした嗅覚受容体、シャペロン分子である RTP1s、生物発光 cAMP センサーである GloSensor を HEK293T 細胞に発現させた。そして、匂い刺激に伴う発光強度の変化をプレートリーダーによって計測した。

4. 研究成果

1) 相乗効果の法則性の解明

濃度の異なる割合で配合した二種類の匂い分子を、麻酔下マウスに嗅がせた。そして、片方の匂い分子だけでは匂い応答を示さない嗅神経細胞に着目して、それぞれの細胞に対して濃度応答曲線を作製した (図 2C)。その結果、約 20.3% の細胞において相乗効果が生じることが分かった。またノンアゴニストとなる匂い分子の存在下では、濃度応答曲線が低濃度側に平衡移動することや、応答強度自体が増強されることが確認された。この特徴的な濃度応答曲線の変化から、相乗効果は、嗅覚受容体における匂い分子のアロステリック効果によって生じることが示唆された。

また、ノンアゴニストである炭素鎖長が異なるアルデヒドが、嗅神経細胞の酢酸アミルに対する応答に与える影響を調べた。その結果、アルデヒドの炭素鎖長によって、アロステリック効果が生じる程度が異なることが分かった。このことから、嗅覚受容体のアロステリック部位には、リガンド特異性があることが示唆された。

2) 相乗効果が生じるメカニズムの解明

嗅覚受容体において、匂い分子によるアロステリック効果が実際に生じていることを確かめるため、再構成系アッセイによる実験を行った。バニリンに反応することが知られている嗅覚受容体を対象に、アロステリック効果を生じる匂い分子のスクリーニングを行った。その結果、嗅覚受容体が、精油等に含まれる特定のノンアゴニストによって正のアロステリック効果を生じることを発見した。

AlphaFold2 によって予測した嗅覚受容体の構造において、分子ドッキングソフト CB-Dock2 によるドッキングシミュレーションを行った (図 3)。その結果、予測した基質結合部位とアロステリック部位に、それぞれの匂い分子が結合することが分かった。アゴニストは、膜貫通部位 (TM) 3、TM5、TM6 のアミノ酸残基と相互作用しており、特に His110、Cys117、Tyr256 と水素結合を形成していた。アロステリックエンハンサーは、アゴニストよりも細胞外側に結合しており、TM3、TM5、TM6 だけではなく、細胞外ドメイン (ECM) 2、ECM3 とも相互作用していた。アゴニスト結合部位では、水素結合によってアゴニストが強く相互作用していたのに対し、アロステリック部位では、疎水性結合によってノンアゴニストが弱く相互作用していた。また結合エネルギーから、ノンアゴニストの結合により、アゴニストの結合がより安定化することが示唆された。

従来の研究では、匂い分子と嗅覚受容体の組み合わせについて、アゴニスト結合部位しか考慮されてこなかった。しかし、本研究により、多くの G タンパク質共役型受容体と同様に、それぞれの嗅覚受容体異なる特異性のアロステリック部位を持っていることを示唆している。従って、嗅神経細胞の混合臭に対する応答は、アゴニストだけでなくアロステリックモジュレーターも含めた多様な組み合わせによって表現されると考えられる。本研究成果により、匂いの足し合わせの法則性の一端が、嗅神経細胞・嗅覚受容体レベルで明らかになった。将来的には、調香師の知識や経験に基づかない匂いの設計にも繋がることを期待される。

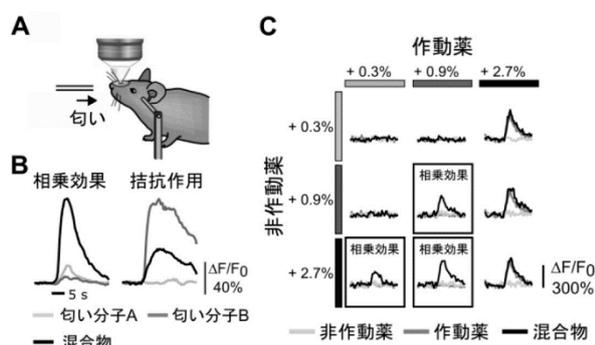


図2. 嗅神経細胞の相乗効果・拮抗作用 (Inagaki et al, *Cell Rep* 2020; Fukata and Inagaki et al.論文投稿準備中)

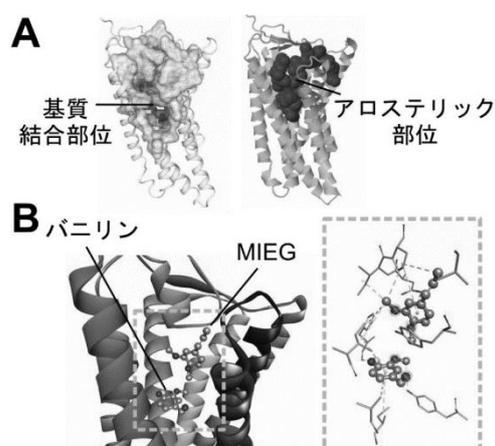


図 3 バニリン応答性嗅覚受容体のリガンド結合部位とアロステリック部位の予測 (Fukata and Inagaki et al.論文投稿準備中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Leiwe Marcus N., Fujimoto Satoshi, Baba Toshikazu, Moriyasu Daichi, Saha Biswanath, Sakaguchi Richi, Inagaki Shigenori, Imai Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Automated neuronal reconstruction with super-multicolour fluorescence imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.10.20.512984	査読の有無 無
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 Shigenori Inagaki, Ryo Iwata, Takeshi Imai	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo Optical Access to Olfactory Sensory Neurons in the Mouse Olfactory Epithelium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bio-protocol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.4055.	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 深田幸平
2. 発表標題 嗅覚受容体のアロステリック制御による多様な匂い応答
3. 学会等名 第6回これからの神経回路研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kohei FUKATA, Shigenori INAGAKI, Biswanath SAHA, Takeshi IMAI
2. 発表標題 Combinatorial allosteric interactions at odorant receptors for odor mixture coding
3. 学会等名 NEUROSCIENCE2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shigenori Inagaki, Kohei Fukata, Biswanath Saha, Takeshi Imai
2. 発表標題 Combinatorial orthosteric and allosteric interactions of an odorant receptor
3. 学会等名 ISMNTOP2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲垣成矩、今井猛
2. 発表標題 非シナプス性相互作用を介した嗅覚順応の多細胞同調機構
3. 学会等名 精神・神経疾患領域/マルチセンシング連携推進ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigenori Inagaki, Takeshi Imai
2. 発表標題 Non-synaptic mechanisms mediate global desensitization of olfactory sensory neurons in vivo
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Fukata, Shigenori Inagaki, and Takeshi Imai
2. 発表標題 Allosteric modulations in odor mixture responses
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣成矩、今井猛
2. 発表標題 非シナプス性相互作用を介した嗅覚順応の多細胞同調機構
3. 学会等名 【臨界期生物学】領域班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigenori Inagaki, Takeshi Imai
2. 発表標題 Chronic calcium imaging of olfactory sensory neurons in mice
3. 学会等名 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigenori Inagaki, Takeshi Imai
2. 発表標題 Global adaptation in the mouse olfactory sensory neurons in vivo
3. 学会等名 Symposium "Circuit Construction in the Mammalian Brain"
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigenori Inagaki, Takeshi Imai
2. 発表標題 Non-synaptic mechanisms mediate global desensitization of olfactory sensory neurons in vivo
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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