嗅覚受容体の応答特性と受容体制御による匂いの感じ方の変化

Suppression of Odors by Odorant Receptor Antagonists

難波 綾

花王株式会社 感性科学研究所
〒131-8501
東京都墨田区文花 2-1-3

Aya KATO-NAMBA
Kao Corporation, Kansei Science
Research

2-1-3, Bunka, Sumida-ku, Tokyo,
131-8501, Japan

齋藤 菜穂子

花王株式会社 感性科学研究所
〒131-8501
東京都墨田区文花 2-1-3

Naoko SAITO
Kao Corporation, Kansei Science
Research

2-1-3, Bunka, Sumida-ku, Tokyo,
131-8501, Japan

中村 純二

花王株式会社 感性科学研究所
〒131-8501
東京都墨田区文花 2-1-3

Junji NAKAMURA
Kao Corporation, Kansei Science
Research

2-1-3, Bunka, Sumida-ku, Tokyo,
131-8501, Japan

論文要旨：我々の周りには常に匂いが存在する。匂い環境は決して一定ではなく、匂いを構成する分子の種類も、その濃度も、刻一刻と変化する。匂いを察知するセンサーとして働くのが嗅覚受容体である。嗅覚受容体は、Gタンパク質共役型受容体に属し、ヒトでは400種ほどが機能していると考えられる。さて、匂い分子と嗅覚受容体は複数対複数の組み合わせで対応付けられており、ある嗅覚受容体を活性化する匂い分子が、他の嗅覚受容体に対してはアンタゴニストとして働き、嗅覚受容体の活性化を競合的に阻害することが報告されている。本研究では、受容体の応答強度と官能との関連を明らかにするために、ヘキサノ酸を対象にヒト嗅覚受容体ならびに受容体の応答を抑制するアンタゴニストの探索を行った。その結果、複数のヒト嗅覚受容体がヘキサノ酸に反応することが見出され、またヘキサノ酸受容体のアンタゴニストが複数同定された。さらに、ヘキサノ酸の受容体アンタゴニストにより、官能評価においてもヘキサノ酸臭が低減することが示された。以上の結果は、末梢レベルで引き起こされる受容体応答と認知レベルで起こる匂いの感じ方が関連していることを示すものである。

Abstract: The vertebrate olfactory system recognizes and discriminates between thousands of structurally diverse odorants. Detection of odorants in mammals is mediated by odorant receptors, which comprise the largest superfamily of G-protein coupled receptors (GPCRs). As with other GPCRs, OR ligands are able to serve as both agonists and antagonists. To understand the correlation of the function of odorant receptors and human olfaction, we examined effects of antagonists of human odorant receptors for odor intensity in sensory evaluation. Screening of odorant receptors for Hexanoic acid revealed that five ORs -OR2W1, OR10A6, OR51E1, OR51I2 and OR51L1- responded to Hexanoic acid dose-dependently, and also some antagonists that inhibited the response of Hexanoic acid-receptors were identified. Next, sensory evaluation was performed to examine whether antagonists of Hexanoic acid-receptors could decreased the Hexanoic acid-odor. As a result, it was found that antagonists weakened Hexanoic acid-odor, suggesting the link between the function of ORs at peripheral level and human olfaction at cognition level.

Key words: olfaction, odorant receptor, antagonist, agonist, hexanoic acid

連絡者：難波 綾
E-mail : katou.aya2@kao.co.jp

1 はじめに

みずみずしい果物の香りや顔をしかめたくなるような悪臭など、我々の周りには実にさまざまな匂いが存在する。多種多様な匂いを識別する匂いセンサーとして機能しているのが、嗅覚受容体 (odorant receptor) である。嗅覚受容体は、鼻腔に位置する嗅神経細胞 (olfactory sensory neuron) の繊毛 (olfactory cilia) 上に発現し、匂いの情報を細胞内に伝達する役割を果たす (Fig. 1A)。嗅覚受容体はGタンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor, GPCR) に属する膜タンパク質であり、ヒトでは396種類、マウスでは1,035種類存在する¹⁾。この数は、ヒトの全遺伝子の約2%を占め、非常に巨大なタンパク質ファミリーとなっている。

多くの場合、匂いは複数の匂い分子から構成される。一般的に匂い分子は、分子量30~300の低分子揮発性化合物であり、世の中には数十万種もの匂い分子が存在すると言われている。一方、先述の通り、ヒトの鼻に存在する嗅覚受容体は396種である。数十万種の匂い分子を400種ほどの嗅覚受容体で識別するために、匂い分子の認識には「受容体コード」が用いられる。すなわち、個々の嗅覚受容体は構造の類似した複数の匂い分子を異なる

親和性で認識し、一方で個々の匂い分子は複数の嗅覚受容体にそれぞれ異なる親和性で認識される²⁻⁴⁾ (Fig. 1B)。このように、匂い分子と嗅覚受容体は複数対複数の組み合わせで対応付けられており、それぞれの匂い分子をバーコードのように嗅覚受容体の組み合わせで認識することで、生物は膨大な匂い情報を処理していると考えられる。

さて、他のGPCRと同様に、嗅覚受容体のリガンドには受容体を活性化する「アゴニスト」と、受容体に結合するが活性化しない「アンタゴニスト」が存在する (Fig. 2A)。アゴニストとアンタゴニストを混ぜた状態で嗅覚受容体を刺激すると、アゴニストとアンタゴニストが嗅覚受容体の結合ポケットを取り合うため、アゴニストによって引き起こされる嗅覚受容体の応答が抑制されることが報告されている^{5, 6)}。例えば、メチルイソオイゲノールという匂い分子は、マウス嗅覚受容体MOR204-34に対しては受容体を活性化し応答を引き起こすアゴニストとして作用するが、別の嗅覚受容体であるmOR-EGに対してはアンタゴニストとして働き、ア

Fig. 1 Odorant recognition.

(A) Odorant recognition in human. Odorant molecules are recognized by odorant receptors, which are expressed in the olfactory cilia of olfactory sensory neuron. Olfactory sensory neurons project their axons to defined glomeruli within the olfactory bulb, and transmit odorant information to secondary neurons.

(B) Odorant receptor and olfactory coding. Each odorant molecule activates various odorant receptors, and each odorant receptor is activated by various odorant molecules.

Fig. 2 Agonist and antagonist.

(A) Agonist and antagonist. An agonist binds to and activates a receptor. On the other hand, an antagonist binds to, but does not activate a receptor.

(B) The aim of this study.

ゴニストであるオイゲノールの応答を抑制する^{6, 7)}。それでは、嗅覚受容体のアゴニストとアンタゴニストが共に存在した場合、官能評価においてヒトの匂いの感じ方はどのように変わるのだろうか？ある匂い分子aが存在し、それにより匂いAが感じられるとする。ここに、匂い分子aを認識する嗅覚受容体のアンタゴニストである匂い分子bを混合し受容体応答が抑制されると、官能レベルでも匂いが抑制されるのだろうか？(Fig. 2B)。

アンタゴニストによる匂いの感じ方の変化を明らかにするために、ここではヘキサ酸を対象とし、ヘキサ酸を認識する嗅覚受容体を特定するとともにヘキサ酸受容体のアンタゴニストを同定し、官能評価によりアンタゴニストのヘキサ酸臭への影響を解析した。

2 ヘキサ酸に応答する嗅覚受容体の応答特性⁸⁾

まずヘキサ酸に応答する嗅覚受容体を明らかにするために、全てのヒト嗅覚受容体を対象にヘキサ酸応答を測定した。測定手順を以下に説明する。まず、ヒト嗅覚受容体 396 種をクローニングし、それぞれの嗅覚受容体をヒト胎児腎臓由来の培養細胞である HEK293 細胞に発現させた。HEK293 細胞において、匂い分子により嗅覚受容体が活性化すると、嗅覚受容体は HEK293 細胞に内在的に発現している G タンパク質と共役し、アデニル酸シクラーゼが活性化され細胞内 cAMP 量が増加する。この cAMP 量の増加、すなわち嗅覚受容体の活性化を発光強度として検出するルシフェラーゼアッセイ法により、匂い応答を測定した (Fig. 3)。

最初に嗅覚受容体のヘキサ酸応答を測定した結果、OR2W1, OR10A6, OR51E1, OR51I2, OR51L1 という 5 種類の嗅覚受容体が、ヘキサ酸に対し濃度依存的な応答を示すことが明らかとなった (Fig. 4A)。すなわち、ヒトがヘキサ酸の匂いを感知する際に、これらの 5 種類の嗅覚受容体が関与することが明らかとなった。

次に、これらの嗅覚受容体が他の脂肪酸にどのような応答を示すのか明らかにするために、炭素数 5 から 11 の脂肪酸に対する濃度依存的な応答を測定した。それぞれの嗅覚受容体の応答閾値を Fig. 4B に示す。OR2W1 は炭素数 6~9, OR10A6 はヘキサ酸および炭素数 8~11, OR51E1 は炭素数 5~11, OR51I2 は炭素数 5~6, OR51L1 は炭素数 5~7 の直鎖脂肪酸に応答したことから、OR2W1 は中程度の鎖長の脂肪酸、OR10A6 は匂い分子の中では比較的鎖長の長い脂肪酸、OR51I2 および OR51L1 は鎖長の短い脂肪酸に選択性が高いことが示唆された。一方、OR51E1 は全ての脂肪酸に応答したことから、脂肪酸認識において重要な役割を果たすことが示唆された。

Fig. 3 Luciferase assay system. When odorant molecules bind to and activate odorant receptors, intracellular cAMP level is increased. Increased cAMP activate cAMP responding element of firefly luciferase-expressing vector, resulting in expression of firefly luciferase. Renilla luciferase-expressing vector is also transfected into HEK293 cells as internal control to correct cell number and efficacy of transfection.

次に、脂肪酸以外の匂い分子も対象にし、各嗅覚受容体の応答特性の解析を行った。アルコールやアルデヒドなど様々な官能基を有し、香調も多様である 149 種類の匂い分子に対する応答を測定したところ、OR2W1 ならびに OR10A6 は構造も香調も多様な非常に多くの匂い分子に応答することが明らかとなった。一方、OR51E1 はどの匂い分子に対しても応答せず、OR51I2 はベンズアルデヒドおよび 2-メチル-2-ペンテン酸にのみ応答を示した。OR51L1 はイソイースーパー (1-(1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-2,3,8,8-tetramethyl-2-naphthyl) ethan-1-one) および図中に示す共通構造を含む 5 種類の化合物に対してのみ応答した (Fig. 5)。以上の結果から、OR2W1 および OR10A6 はリガンド選択性が低く様々な匂い分子に応答する嗅覚受容体、OR51E1, OR51I2, OR51L1 はリガンド選択性が高く限られた匂い分子にのみ応答する嗅覚受容体であることが示唆された。

3 ヘキサ酸受容体のアンタゴニスト探索と官能評価⁸⁾

これまでの実験により、ヘキサ酸に応答する 5 種類の嗅覚受容体と、各受容体の匂い分子に対する応答特性を明らかにした。そこで最後に、ヘキサ酸受容体の応答を抑制するアンタゴニスト探索を行った。HEK293 細胞にヘキサ酸受容体を発現させ、ヘキサ酸と候補分

Fig. 4 Identification of Hexanoic acid-receptors and its response characteristic for fatty acids. (A) Identified Hexanoic acid-receptors. Five odorant receptors- OR2W1, OR10A6, OR51E1, OR51I2, OR51L1- were expressed in HEK293 cells, and responses to Hexanoic acid (3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 μM) were detected. X axis and Y axis were defined as the concentration of Hexanoic acid and intensity of odorant response, respectively. n=4, ±SE. (B) Response characteristics of Hexanoic acid-receptor for fatty acids. Response threshold of each Hexanoic acid-receptor was indicated as circle size.

Fig. 5 Response characteristics of Hexanoic acid-receptors for various odorant molecules. Five Hexanoic acid-receptors were expressed in HEK293 cells, and responses to various odorant molecules were analyzed. X axis and Y axis were defined as each odorant molecule (149 types) and intensity of odorant response, respectively. n=3~5, ±SE.

子の混合物で刺激をし、ヘキサン酸応答を抑制する分子を探索した。結果の一例を Fig. 6A に示す。OR51E1 を発現させた HEK293 細胞に対し、ヘキサン酸とフロルヒドラル (Florhydral) の混合物で刺激を行うと、フロルヒドラルの濃度依存的にヘキサン酸応答が抑制される。その抑制は非常に強く、ヘキサン酸 1 mM に対してフロルヒドラル 300 μM を混合することで、ヘキサン酸 1 mM のみで刺激をした場合に比べ、受容体応答が 24% まで低下する。ヒドロキシシトロネラル (Hydroxy citronellal) は OR51E1 を弱く抑制し、ヘキサン酸 1 mM にヒドロキシシトロネラル 300 μM を混合することで OR51E1 のヘキサン酸応答が 63% まで低下する。一方、トリプラール (Triplal) は OR51E1 のヘキサン酸応答に影響を与えないため、OR51E1 のアンタゴニストではないと判断される。OR51E1 のヘキサン酸応答を非常に強く抑制するフロルヒドラルは、OR51I2 のヘキサン酸応答も非常に強く抑制し、ヘキサン酸 1 mM に対しフロルヒドラル 300 μM を混合することで応答が 4% まで低下する。OR51I2 の応答はリリアル (Lilial) によって弱く抑制され、マジヤントール (Majantol) では抑制されない。このように、受容体

Fig. 6 Antagonist of Hexanoic acid receptors.
(A) Dose-dependent effects of Hexanoic acid-receptor antagonists. OR51E1 and OR51I2 were expressed in HEK293 cells, and antagonistic activity of each odorant molecule was analyzed. X axis indicated the concentration of odorant molecules, and Y axis was defined as intensity of odorant response, in which 100% meant the activity for 1 mM of Hexanoic acid. $n=3\sim7$, $\pm$ SE, except for the response of OR51I2 to Hexanoic acid mixed with Majantol ($n=1$).
(B) Sensory evaluation of Hexanoic acid-odor. Filled circle '●' indicated the receptor which could respond to Hexanoic acid. Horizontal line '—' meant the receptor which were inhibited by Florhydral, Bourgeonal or Isocyclocitral. The result of sensory evaluation was shown in the graph, in which '5' meant the intensity of odor of Hexanoic acid alone. $n=3$, $\pm$ SD.

の抑制効果は匂い分子によってさまざまであり、複数の嗅覚受容体のヘキサン酸応答を抑制する匂い分子もあれば、ある嗅覚受容体の応答は抑制するが別の嗅覚受容体の応答は抑制しない匂い分子も存在することが分かる。

140種類の候補素材についてヘキサン酸受容体のアンタゴニスト探索を行った結果、フロルヒドラル、ブルゲオナル (Bourgeonal)、イソシクロシトラール (Isocyclocitral) の3種類の香料が、ヘキサン酸受容体を効率よく抑制することが示された (Fig. 6B)。具体的には、フロルヒドラルおよびブルゲオナルでは、OR2W1, OR51E1, OR51I2, OR51L1 のヘキサン酸応答が抑制され、イソシクロシトラールではOR2W1,

OR10A6, OR51E1, OR51L1 のヘキサン酸応答が抑制された。そこで、これらの香料を用い官能評価を行った。ガラス瓶に2つの綿球を入れ、片方にはヘキサン酸、もう片方にフロルヒドラル、ブルゲオナル、イソシクロシトラールのいずれかを浸み込ませた。ガラス瓶の匂いを嗅ぎ、ヘキサン酸の匂いの強さを評価した。その結果、いずれの香料もヘキサン酸の匂いを抑制することが明らかとなった (Fig. 6B)。すなわち、末梢レベルでヘキサン酸受容体の応答を抑制するアンタゴニストは、認知レベルにおいてもヘキサン酸の匂いを抑制することが明らかとなり (Fig. 7)、嗅覚受容体の応答とヒトの官能が関連していることが示唆された。

Fig. 7 The effect of antagonist on human olfaction. Antagonists of Hexanoic acid-receptor (ex: Florhydral) inhibited the response of Hexanoic acid-receptors, and weakened Hexanoic acid-odor.

文 献

- 1) Y. Niimura, *Curr. Genomics*, **13**, 103 (2012).
- 2) B. Malnic, J. Hirono, T. Sato & L.B. Buck, *Cell*, **96**, 713 (1999).
- 3) R.C. Araneda, A.D. Kini & S. Firestein, *Nat. Neurosci.*, **3**, 1248 (2000).
- 4) K. Kajiya, K. Inaki, M. Tanaka, T. Haga, H. Kataoka & K. Touhara, *J. Neurosci.*, **21**, 6018 (2001).
- 5) M. Spehr, G. Gisselmann, A. Poplawski, J.A. Riffell, C.H. Wetzell, R.K. Zimmer & H. Hatt, *Science*, **299**, 2054 (2003).
- 6) Y. Oka, M. Omura, H. Kataoka & K. Touhara, *EMBO J.*, **23**, 120 (2004).
- 7) Y. Oka, S. Katada, M. Omura, M. Suwa, Y. Yoshihara & K. Touhara, *Neuron*, **52**, 857 (2006).
- 8) 難波 (加藤) 綾, 齋藤菜穂子, 近藤秀彦, 中村純二, *AROMA RESEARCH*, **15** (2), 48 (2014).