

香料に関する定量的解析

— 香りの強さ, 香りの質, 構造活性相関, “なれ”, 香料センサーに関する研究 —

北海道大学薬学部

栗原 堅三

1. We measured the turtle olfactory bulbar responses to six pairs of highly pure optical isomers. With all odorants tested, there was no difference in odor threshold and intensity in the whole concentration range examined between the optical isomers. The difference in odor quality between optical isomers greatly varied with species of odorants.
2. The ability of the olfactory receptors to discriminate odorants having similar structures was abolished by increasing temperature up to 40°C, whereas discrimination of odorants having quite different structures was much less affected. The results suggested that the structures of the receptor sites for odorants are greatly affected by a fluidity change of the lipid layer of the receptor membranes. The results also suggested that desensitization (adaptation) occurs not at a cell level but at a receptor site level.
3. The membrane potential changes of liposome, which is a model for odor sensor, in response to odorants were measured with a voltage-sensitive fluorescence dye. The magnitudes of the responses to odorants greatly depended on membrane composition of liposomes. It was suggested that various odorants can be identified by the response patterns of liposomes having different compositions.

1. 嗅覚器の光学異性体識別能¹⁾

嗅覚器が光学異性体間のおいさをどの程度識別するかに関しては、昔からヒトの官能試験の結果をもとに議論されてきたが、明確な結論は得られていない。本研究においては、カメ嗅覚器を用いて各種の光学異性体のおい強度および質の間に差があるかどうかを定量的に調べた。一般に、おいの強度に関しては、電気生理的方法により定量的評価がなされてきたが、おいの質を定量的に評価する方法がなかった。本研究において、我々は定量的な交差順応法を開発し、おいの質の差異を定量的に評価する方法を確立した。この

方法をカメ嗅覚器に適用し、光学異性体間のおいさの質の差異を定量化した。

(1) 光学異性体間のおい強度の差

光学異性体の中では、l-カルボンとd-カルボンが最も大きな差異があるとされてきた。l-カルボンの閾値とd-カルボンの閾値が本当に異なっているかどうかを調べるために、カメ嗅覚器のl-およびd-カルボンの応答を測定した。図1は、各濃度のl-カルボンおよびd-カルボンを与えたときのカメ嗅覚器の応答パターンを示す。l-カルボンを与えると、濃度の増加に伴って応答は増大し、d-カルボンを与えたときにもl-カルボ

Quantitative analysis on perfume; Studies on intensity and quality of perfume, structure-activity relationship, adaptation, and perfume sensor

Kenzo Kurihara

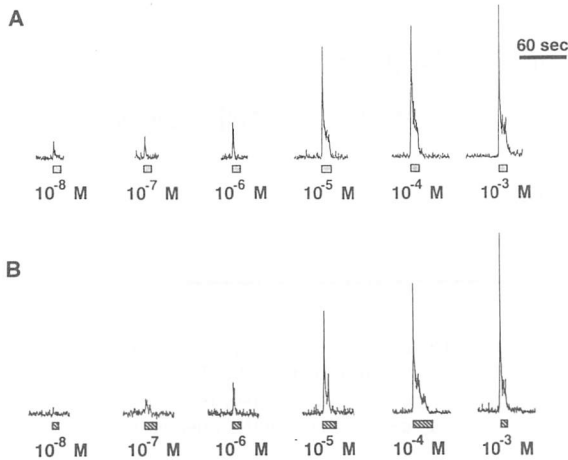


図1 各濃度のl-カルボン(A)及びd-カルボン(B)に対するカメ嗅覚応答。

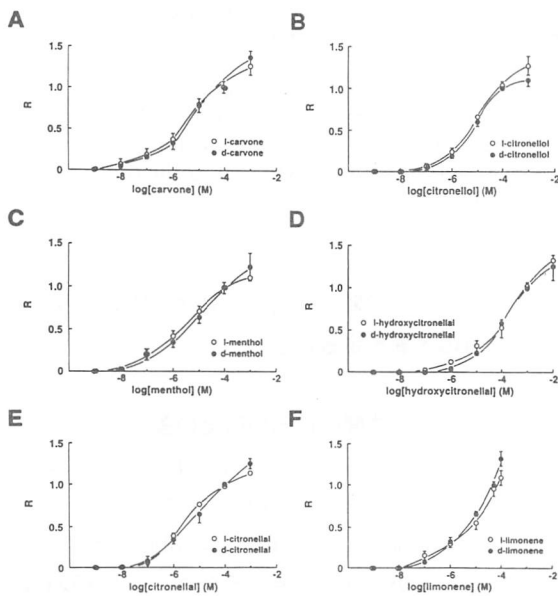


図2 各種光学異性体に対するカメ嗅覚器の濃度-応答曲線。

ンと同様の応答が生じた。

図2は、各種のd-体およびl-体をカメ嗅上皮に与えたときの濃度-応答曲線を示す。横軸は刺激に用いたd-体およびl-体の濃度を、縦軸はその時の応答の相対応答強度を表す。いずれの場合も、おのの強度および閾値濃度は、d-体とl-体間

で差がないことを示している。

(2) 光学異性体間のおのの質の差

d-体とl-体のおのの質の差は、以下のような方法で解析した。l-リモネンを与えると応答が現れるが、すぐに順応し、応答が消失する。この状態でd-リモネンを与えても、小さな応答しか現れない。このことは、d-リモネンとl-リモネンは同じ受容サイトに結合して応答を引き起こすため、カメは両者のおのを識別できないことを示唆する。一方、l-リモネンを与えた後に、l-リモネンとは全く異なるおのを有するn-アミルアセテートを与えた場合には、n-アミルアセテートを単独で与えたときと同じ大きさの応答がみられた。このことから、カメ嗅覚器におけるl-リモネンとn-アミルアセテートの受容サイトは全く独立であり、カメは2つのおのを完全に識別することが推測される。ただし、このような実験方法では、最初に与えるおの物質の濃度が2番目の応答に大きく影響する。したがって、より定量的な解析を行うために、最初に与えるおの物質の濃度を系統的に変化させ、2番目の応答に対する影響を調べた。

図3Aは、各種濃度のl-リモネンで順応させた後の 5×10^{-5} M d-リモネンに対する応答を示す。 5×10^{-5} M d-リモネンを単独で与えたときには、図中の左端のパターンのような応答が生じる。最初に与えるl-リモネンの濃度を高くするにつれ、l-リモネンに対する応答は増大し、2番目に与えるd-リモネンに対する応答は減少した。最初に与えるおの物質、すなわちl-リモネンに対する応答強度を横軸に“ R_1 ”としてプロットし、2番目に与えたおの物質、すなわちd-リモネンに対する応答強度を縦軸に“ R_2 ”としてプロットすると、図3Bのグラフが得られる。縦軸、横軸ともに、d-リモネンを単独で与えたときの応答強度を“1”としている。リモネンの場合では、最初に与えるl-リモネンの応答を増大させると、2番目に与える 5×10^{-5} M d-リモネンに対する応

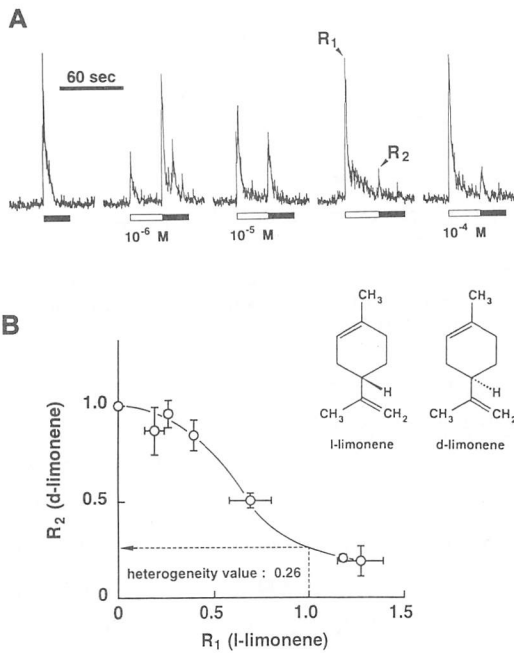


図3 各濃度のl-リモネンを与えたのちの 5×10^{-5} M d-リモネンの応答パターン(A)。R₂(d-リモネンに対する応答)をR₁(l-リモネンに対する応答)に対してプロットした(B)。

答の顕著な減少が見られた。この結果は、カメ嗅覚器におけるl-リモネンとd-リモネンの受容サイトはほぼ同一であることを示唆した。

リモネンの場合と同様の実験を、他のにおい物質についても行った(図4)。カルボンの場合、最初に与えるl-カルボンに対する応答を増大させても、2番目に与えるd-カルボンに対する応答はあまり減少しなかった。したがって、カメ嗅覚器におけるd-カルボンとl-カルボンの受容サイトは互いに異なっており、カメはd-カルボンとl-カルボンを識別していると考えられる。他におい物質についても同様の実験を行った。R₁が1のときの応答の大きさは、カルボン>シトロネロール>メントール>ヒドロキシシトロネロール>シトロネロール>リモネンであった。本実験の結果から、カメ嗅覚器はある種の光学異性体のおい物質を識別していることが示唆された。ただし、識別の程度は、カルボンのように明確に識別

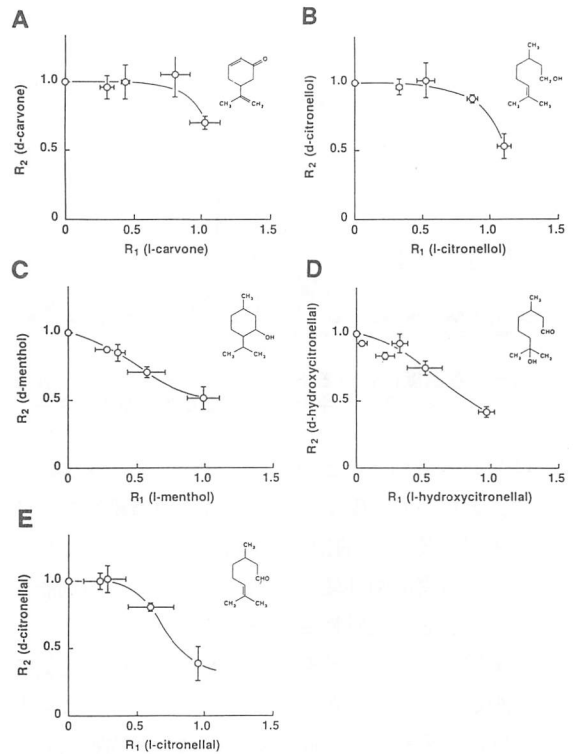


図4 各種光学異性体に関するR₂とR₁の関係。

されるものから、リモネンのようにほとんど識別されないものまでさまざまであった。

2. におい受容サイトに対する膜流動性変化の影響

—温度上昇に伴うにおい識別能の低下—

一般におい分子の受容・識別は、嗅細胞膜上の受容蛋白質を介して行われていると考えられている²⁾。一方におい分子は一般的に疎水性であり、におい受容には受容膜の脂質層とにおい分子との相互作用も無視できない³⁾。もしにおい受容に脂質が重要な役割を果たしているとする、嗅上皮の温度を変えて膜流動性を変化させると、におい受容に影響を及ぼすことが期待される。

そこで本研究では、5℃から40℃の温度範囲でにおい応答がどのように変化するか、また異なる

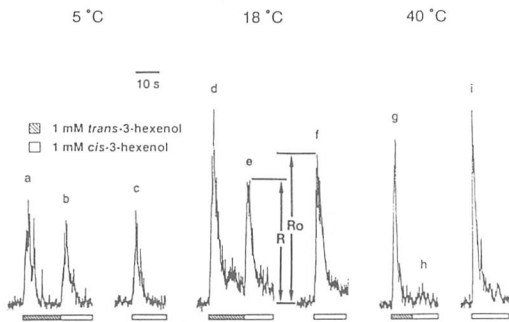


図5 各温度におけるトランス-3-ヘキセノールとシス-3-ヘキセノール間の交差順応パターン。

においの識別能がどのように変化するかを検討した。また、カメ嗅上皮に含まれる遊離細胞およびカメ嗅上皮より抽出した脂質より作製したリポソームの膜流動性変化を測定し、におい識別能変化と脂質層の流動性変化を比較した。

実験にはクサガメを用い、嗅球からの誘起脳波を測定した。あらかじめ各温度のリンガー液を嗅上皮に与えたのち、同じ温度のにおい物質溶液を与えた。膜流動性変化は、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン(DPH)の蛍光偏光解消法により測定した。

図5は、5°C、18°C、40°Cにおいてトランス-3-ヘキセノールとシス-3-ヘキセノールに交差順応法を適用したときの応答パターンを示している。このとき、両者を単独で与えたときの応答の高さがほぼ同じになるような濃度におい物質溶液を用いた。5°Cにおいて、まず、トランス体(a)を与え、順応後すぐにシス体(b)を与えた。(c)はシス体を単独で与えたときの応答である。5°Cでシス体は本来(c)の応答を与えるが、トランス体(a)の後に与えても応答はほとんど抑制されることなく現れている。18°Cでも、トランス体(d)の後にシス体(e)を与えた。(f)は18°Cでのシス体単独の応答である。トランス体(d)の後にシス体(e)を与えると、部分的に抑制されるだけで大きな応答を与えた。40°Cでは、シス体(i)単独では大きな応答が現れるが、トランス体(g)の後にシス体(h)を与えると応答はほとんど現れなかった。

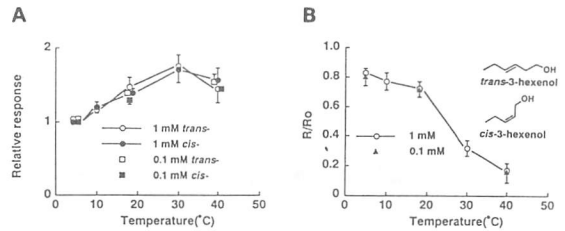


図6 トランス-3-ヘキセノールとシス-3-ヘキセノールの応答の温度依存性(A)と識別能の温度依存性(B)。

図6Bでは、シス-3-ヘキセノールを単独で与えたときの応答(R_o)に対する2番目に与えたシス-3-ヘキセノールの応答(R)の相対値(R/R_o)を温度に対しプロットしている。5°Cで約8割あった識別能が、40°Cでは約2割程度にまで減少した。1mMおよび0.1mM濃度のヘキセノールを用いたときに、同様な結果が得られた。図6Aは、それぞれにおい物質を単独で与えたときの応答の温度依存性を示している。横軸は温度、縦軸は5°Cのときの応答を1としたときの相対値を表している。応答は30°Cくらいまで増大し、その後少し減少する傾向にあった。0.1mM濃度のヘキセノールを用いたときにも、同様な結果が得られた。

図7は、今回用いた8組のにおいについて、5°Cにおける交差順応の比に対する40°Cにおける交差順応の比を求めた結果を示している。においが似ている組み合わせでは、40°Cで識別能が低下したが、においが異なっている組み合わせではあまり大きな低下はみられなかった。

温度を上げると、受容膜の流動性が増大することが考えられる。図8Aはカメ嗅上皮から遊離し

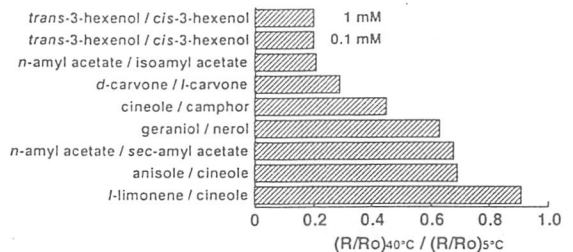


図7 5°Cにおける交差順応の比に対する40°Cにおける交差順応の比

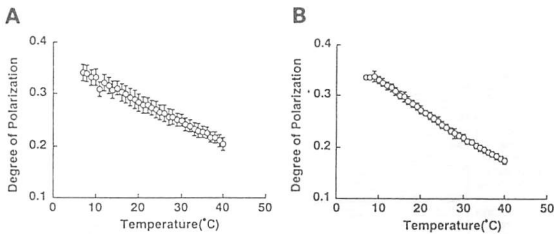


図8 カメ嗅上皮に含まれる遊離細胞の膜流動性変化の温度依存性(A)とカメ嗅上皮から抽出した脂質により作製したリポソームの膜流動性変化の温度依存性(B)。

た細胞の膜流動性変化の温度依存性を、そして図8Bはカメ嗅上皮から抽出した脂質より作製したリポソームの膜流動性変化の温度依存性を示している。どちらの場合も、温度の上昇にともなって膜流動性が増大している。膜流動性が増大する領域は、におい識別能低下の温度領域(図6B)によく対応している。

以上の結果より40°Cにおいてにおいの識別能が低下した機構について、次のような3つの可能性が考えられる。第一の可能性は、受容膜には脂質と蛋白質から構成される受容サイトが存在し、におい物質は通常このサイトに吸着する。5°Cや18°Cでは受容膜がきちとした構造をとっているのので、例えばトランス体とシス体は別々のサイトに結合する。温度を上げると、脂質層の流動性が増し、この結果トランス体とシス体は同一の受容サイトに結合するようになり、両者は識別されなくなるものと考えられる。二つめの可能性としては、温度を上げると受容蛋白質のコンホメーションが変化し、識別能が変化することが考えられる。ただし、一般の蛋白質の場合、リガンドに対する特異性が40°Cくらいで変化する例は知られていない。例えば、L-体アミノ酸に対する結合蛋白質が40°CになるとD-体も結合するようになるとは考えられない。ただし、嗅覚系の受容蛋白質が非常に特別な性質をもっているなら、この可能性は否定できない。最後の可能性としては、温度を上げると脂質の流動性が増大し、その結果受容蛋白質のコンホメーションが変化するため識別能が変化す

ることが考えられる。このような可能性も通常の膜蛋白質の場合には有り得ないと思われるが、嗅覚系の蛋白質が特別な性質をもっているなら、その可能性は否定できない。

また本実験結果は、においの脱感作機構に関しても重要な情報を提供している。脱感作に Ca^{2+} が関与しているという説では、脱感作は嗅線毛膜のイオンチャンネルを介して細胞内に流入した Ca^{2+} がcAMP依存性チャンネルを内側から閉じるために起こると考えられている^{4, 5)}。この説に従うと、 Ca^{2+} は細胞内を拡散するので、脱感作は細胞全体で起こるはずである。したがって、図5に示すように、5°Cや18°Cにおいてトランス体を与えたあとにシス体の応答が現れたことは、それぞれの受容サイトは別々の細胞に存在することを意味している。ただしこのような解釈では、40°Cで2番目に与えたシス体の応答が消失するという実験結果は説明できない。一方、脱感作は細胞全体ではなく、個々の受容サイトレベルで起こるとすると、本実験結果を説明できる。すなわち、トランス体とシス体の受容サイトは同一の細胞にあり、脱感作は各受容サイトレベルで起こると考える。5°Cや18°Cでは、トランス体の受容サイトが脱感作してもシス体のサイトは不活性化されないので応答が現れる。40°Cにすると、膜流動性が増大してトランス体およびシス体とも同一のサイトに結合するようになり、トランス体の後のシス体の応答は現れない。

3. においセンサーとしてのリポソーム

各種の組成を有するリポソームを作製し、膜電位感受性色素により、におい物質を与えたときの膜電位変化を測定した⁶⁾。図9は、フォスファチジルコリン(PC)にフォスファチジルセリン(PS)およびフォスファチジン酸(PA)を添加したときの各種においに対する膜電位変化を示している。脂質組成の違いにより、各種においに対する応答パターンが大きく異なるのがわかる。

図10では、リン脂質にコンカナバリン A (Con A), ロイシルロイシン (Leu-Leu), ポリリシン (Poly-Lys) を添加したりポソームの各種においての応答パターンを示している。においの種類ごとに、応答パターンが異なるのがわかる。以上の結果は、数種の異なる組成の膜を作製し、これに対する応答パターンの違いにより、においの識別が可能であることを示唆した。

文献

- 1) Taniguchi, M., Kashiwayanagi, M. and Kurihara, K., *Am. J. Physiol.*, 262, R99-R104 (1992)
- 2) Buck, L. and Axel, R., *Cell*, 65, 175-187(1991)
- 3) Enomoto, S., Kashiwayanagi, M. and Kurihara, K., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1062(1), 7-12(1991)
- 4) Nakamura, T. and Gold, G. H., *Nature*, 325, 442-444(1987)
- 5) Kurahashi, T. and Shibuya, T., *Brain Res.*,

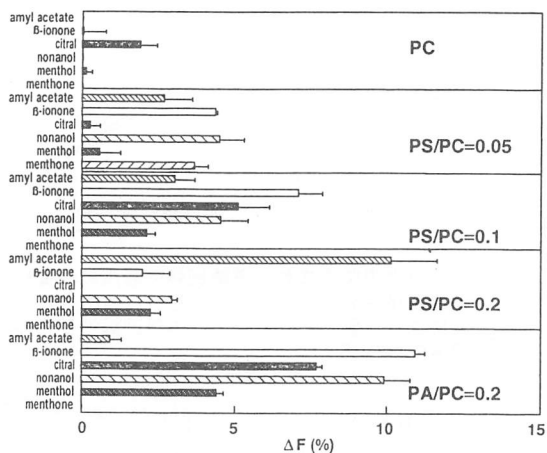


図9 異なる脂質組成を有するリポソームの各種において物質に対する膜電位変化。におい物質の濃度は、いずれも 10^{-6} Mである。

515, 261-268(1990)

- 6) Enomoto, S., Kawashima, S., Yoshimura, A. and Kurihara, K., *Sensors and Materials*, 4, 153-164(1992)

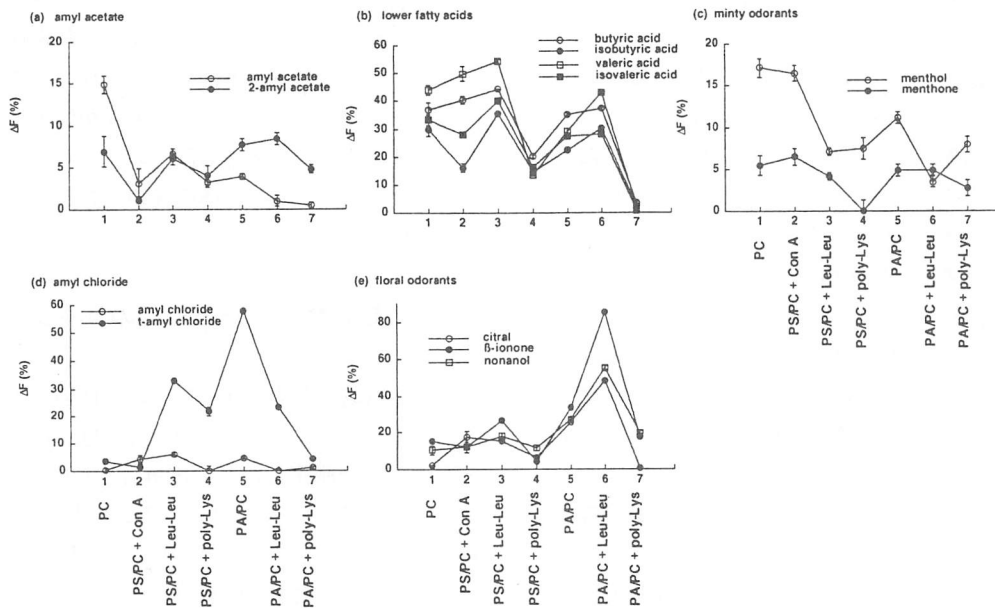


図10 異なる組成を有するリポソームの各種において物質に対する応答パターン。