

<平成26年度助成>

## 食の香りを評価するための嗅覚センサ酵母の創出

浴 俊 彦

(豊橋技術科学大学大学院工学研究科環境・生命工学専攻)

### 1. 研究の背景と目的

食の香りや風味は、食品由来の化学物質群が、ヒトや動物の嗅覚器官(鼻)によって検知され、認識・判別されている。香りや匂いの原因となる化学成分は複雑、かつ各成分濃度もばらばらである。匂いの検知については、1991年のBuckとAxelによる嗅覚受容体遺伝子の発見に端を発して研究が進み、生物の持つ嗅覚(化学物質の検知)の分子機構が以下のように明らかにされている。すなわち、ヒトなど高等動物の鼻の嗅上皮には、匂い検知に関与する神経細胞(嗅細胞)が多数存在し、各嗅細胞には、化学物質(リガンド)と結合するGタンパク質共役受容体(嗅覚受容体)が1種類発現している。嗅覚受容体が香り成分の化学物質と結合すると、三量体Gタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内サイクリックAMP(cAMP)濃度が上昇する結果、cAMP応答性イオンチャネルが開口することで膜の脱分極による興奮性シグナルが生じ、それが軸索を経由して脳へ伝わる。脳では、検出特性を異にする多数の嗅細胞から送られた興奮性シグナルのパターンを特定の「香り」や「匂い」として認知する。嗅覚受容体の数は、ヒトで約400個、ラットなどの齧歯類では約1000種類存在しており、食品の風味などの複雑な化学成分は、多数の嗅覚受容体によって検知され、微妙な香りとして分別・認識されている<sup>1)</sup>。

以上の背景より、ラットの嗅覚受容システムを異種の細胞で再構成できれば、その細胞は、導入

されたラット嗅覚受容体が結合する化学物質を認識できると期待される。たとえば、約1000種類のラット嗅覚受容体をそれぞれ導入した1000種類の細胞群を作製し、それぞれのリガンドに対する応答性を定量的に分析できれば、それは一種の「鼻」としての機能を持つと考えられる。我々は、取り扱いや遺伝子操作が容易な単細胞真核生物である出芽酵母(イースト、*Saccharomyces cerevisiae*)に着目し、将来的に多数の嗅覚受容体を持った組換え酵母群を利用した「匂い」判別システムの開発を目指している。本研究では、Radhikaらの報告<sup>2)</sup>も参考に、酵母に嗅覚受容体を含めた5種類のラット嗅覚受容遺伝子と、リガンド刺激によって上昇したcAMP濃度を検出するためのレポーターシステムを導入することで、化学物質検出用の組換えレポーター酵母を作製し、その応答特性を評価することを目的とした。

### 2. 研究材料と方法

**酵母株**：実験には、一倍体酵母YPH499株(*MATa ura3-52 lys2-801\_amber ade2-101\_ochre trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*) (Stratagene社)を主に用いた。ほかにW303-1A株、二倍体株YPH501(YPH499の二倍体株)とCEN-PK2株を用いた。

**酵母の培養と形質転換**：栄養培地としてYPD培地、プラスミドを導入した組換え酵母の選択培養には、栄養マーカーに対応したSD選択培地(Formedium社)を用いた。液体培養は振盪し、寒天培地は静置にて、30度インキュベーター内で行った。*GAL*プロモーターの発現には、通常の

2%グルコースを含むSD培地の代わりに2%ガラクトースを含むSG培地を用いた。酵母の形質転換は、酢酸リチウム法により行い、栄養選択用の寒天培地に播いて、形質転換コロニーを形成させた。

**cDNAの調製とクローニング:**酵母の発現ベクターとして、ガラクトース添加による導入遺伝子の発現誘導が可能な4種類のpESCプラスミドDNA (Stratagene社)を用いた。cDNAは、鋳型DNAから高正確PCRによって増幅、アガロースゲル電気泳動で分画・精製し、ベクターへの挿入はIn Fusionクローニング法によって行った。自動シーケンサーABI3130を用いたジデオキシ法により、作製したコンストラクトの塩基配列を解析した。

**光学測定:**酵母の増殖度を評価するための菌液の光学密度( $OD_{600}$ )は、分光光度計Biowave II (biochrom)により測定した。蛍光強度測定は、バックラウンド蛍光成分を除去するため、滅菌水にて懸濁・遠心を2回繰り返して酵母を洗浄し、滅菌水で $OD_{600}$ を1.0に調整した菌液200 $\mu$ Lを用いて、GFP蛍光測定用モジュール(Fluorescent Module Blue)を取り付けたGloMax 20/20 ルミノメーター(Promega社)によって行った。蛍光スペクトル分析は、蛍光光度計(日本分光FP8300)を用い、390 nmの光で励起し、400~700 nmの波長帯を走査して行った。

**蛍光顕微鏡観察:**滅菌水で洗浄した酵母をスライドグラスに載せ、蛍光倒立顕微鏡(オリンパスIX71)により位相差像とGFP蛍光像の観察と画像データ取得を行った(倍率400倍、励起波長460~495 nm、蛍光波長510 nmあるいは510~550 nm)。

**RT-PCR法によるmRNAの検出:**酵母をガラスビーズで振盪破碎し、TRIzol試薬を加え、核酸沈殿を回収、DNaseによるDNA分解とフェノール・クロロホルム抽出を経て、エタノール沈殿により全RNAを回収した。ReverTra Aceキット(東

洋紡)により合成したcDNAを鋳型に、KOD FX Neo(東洋紡)を用いて、熱変性後、98度10秒、62度1分、68度45秒のサイクルを25回繰り返した。PCR産物は2%アガロースゲル電気泳動法により分析した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 レポーターコンストラクトの作製

本研究では、ラットの嗅覚受容系を構成する5つの遺伝子(嗅覚受容体I7、三量体Gタンパク質Golf,  $G\beta_2$ ,  $G\gamma_5$ 、III型アデニル酸シクラーゼACIII)、およびリガンド刺激で増加する細胞内cAMP濃度を検知するための2遺伝子(ヒトCREB、クラゲGFPuv)の合計7遺伝子を酵母内に導入する必要がある。本系を組み込んだ組換え酵母では、I7のリガンドであるオクタナールを暴露することによってACIIIが活性化され、細胞内cAMP濃度が上昇する。その結果、活性化された内在性のプロテインキナーゼA(PKA)によりcAMP応答配列結合タンパク質(CREB)がリン酸化され、GFPレポーターのCREプロモーターが活性化されることでGFPが発現すると考えられる(図1)。図1に示した組換え酵母の作製に必要な以下の4種類のコンストラクト(図2)を作製した。(1)cAMP応答性レポーターコンストラクトpESC-HIS $\Delta$ GAL1-CREB-CRE-GFPの作製は、pESC-HIS DNAよりGAL1プロモーターを制限酵素処理と自己環化により除去後、4コピーのCREB(cAMP response element binding protein)認識配列(CRE)断片と連結したGFPuv遺伝子を挿入した。さらにGAL10プロモーター下流にヒトCREB cDNA(1064 bp)を挿入した。本コンストラクトを導入した酵母は、ガラクトース添加により、CREBを発現し、リガンド刺激による細胞内cAMP濃度の上昇によって、GFPを発現すると考えられる。(2) $G\beta$ ,  $G\gamma$ サブユニット共発現プラスミドpESC-LEU- $G\beta_2$ - $G\gamma_5$ の作製は、pESC-LEUプラスミド

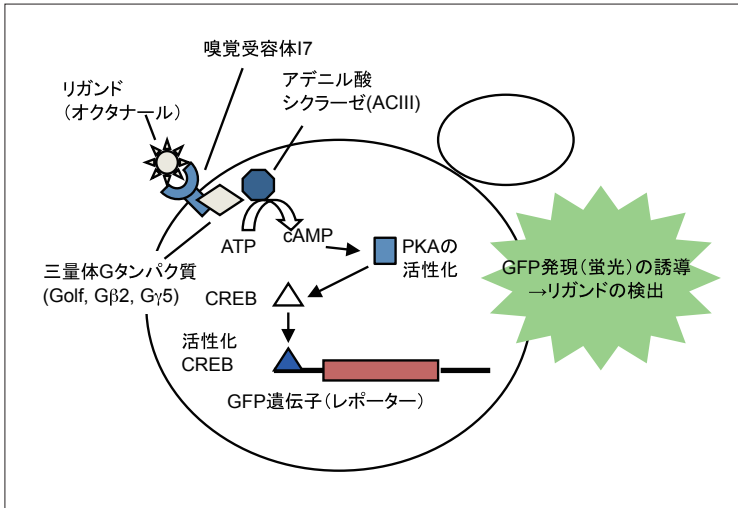


図1 嗅覚系を再構成した組換え酵母の仕組み

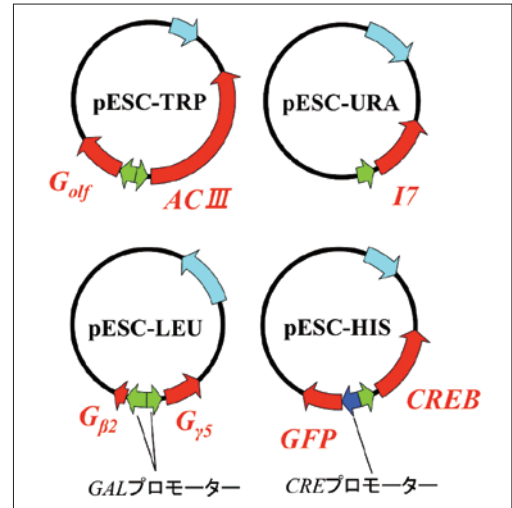


図2 4種類のコストラクト

の *GAL1* および *GAL10* プロモーター下流に、それぞれラット  $G\beta_2$  (市販の cDNA より増幅した DNA 断片, 1100 bp) と  $G\gamma_5$  (人工合成遺伝子断片, 243 bp) の cDNA を In Fusion クローニング法により組み込むことを行った。(3) Golf サブユニットと ACIII 共発現プラスミド pESC-TRP-Golf-ACIII は、pESC-TRP ベクターの *GAL1* および *GAL10* プロモーター下流に、それぞれラット Golf サブユニット cDNA (1352 bp) と ACIII cDNA (3435 bp) を In Fusion クローニング法により組み込んで作製した。Golf と ACIII cDNA は、それぞれのラット cDNA を組み込んだプラスミドより PCR によって増幅して調製した。(4) 嗅覚受容体 I7 発現プラスミド pESC-URA-I7 は、pESC-URA ベクターの *GAL10* プロモーター下流に、ラット I7 cDNA をクローン化したプラスミドより PCR 増幅して調製した DNA (995 bp) を In Fusion クローニング法により組み込んで作製した。

### 3.2 組換え酵母における GFP 蛍光発現の評価

前節で作製したコンストラクト DNA を順次、酵母 YPH499 株へ導入して、4 種類のプラスミドを持つ形質転換酵母を作製した。導入した 6 つの外來性タンパク質 (I7, Golf,  $G\beta_2$ ,  $G\gamma_5$ , ACIII, CREB) を発現させ、オクタナール暴露の効果を検証するため、上記の組換え酵母を用いた蛍光測定実験を行った。組換え酵母を、表 1 に示す 5 通りの実験群に分け、前培養 (24 時間)、本培養 (36 時間) を行い、各処理 (滅菌水、0.7% DMSO、0.5 mM オクタナール / 0.7% DMSO 添加) を施しながら本培養用培地にて 24 時間培養した。各実験群の酵母の GFP 蛍光強度は蛍光測定用モジュール付きルミノメーターで測定した。しかしながら、当研究室で作製した DNA 傷害性検出用酵母<sup>3)</sup>を 50 mM ヒドロキシウレア (複製阻害剤) で発現誘導した正対照群 (表 1 の実験群 5) 以外、非処理群と比較して、いずれの実験群でも明確な蛍光強度の増

表 1 オクタナール添加実験で設定した実験群

実験群	前培養	本培養	処理
1	SD 選択培地	SG 選択培地	非添加
2			滅菌水添加
3			DMSO 添加
4			オクタナール/DMSO 添加
5	DNA 傷害性検出用酵母 (50mM ヒドロキシウレア処理)		

加は観察されなかった (data not shown)。以上の結果を検証するため、0.5 mM オクタナール処理した組換え酵母の蛍光スペクトル分析を行った。その結果、正対照の GFP 発現酵母では GFP に対応した 509 nm の蛍光ピークが検出されたが、オクタナール処理酵母では、非処理群と同じく 509 nm の蛍光は検出されなかった (図 3)。YPH499 株以外の 3 種の酵母株を用いた追試でも同様の結果であった。さらに、蛍光スペクトル分析を行った酵母の蛍光顕微鏡観察を行った。酵母の自家蛍光が観察されない条件で (負対照群の蛍光像を参照)、正対照群の酵母では大半の酵母で強い GFP 発現が観察できたが、オクタナール処理した組換え酵母での GFP 発現は、非添加組換え酵母と同程度の低いものであった (図 4)。本レポーター系では重金属処理による cAMP 濃度上昇により GFP

発現が起こることが報告されているが<sup>4)</sup>、上記組換え酵母では CdCl<sub>2</sub> 処理によっても顕著な GFP 発現は観察されなかった (data not shown)。

### 3.3 RT-PCR 法による遺伝子発現解析

以上の GFP 発現解析実験から、4 種のコンストラクトを導入した組換え酵母において、オクタナール処理によるレポーター遺伝子の発現誘導が起こっていないことが示された。その原因として、導入した異種遺伝子が酵母内で発現していない可能性が考えられた。そこで、ガラクトース添加培養条件での導入遺伝子 mRNA の発現について、RNA 試料に DNA の混入がないことを確認後、RT-PCR 法により解析した (図 5)。解析の対照遺伝子として、恒常的発現遺伝子 *ACT1* とガラクトース誘導性遺伝子 *GALI* を用いた。発現誘導条件下で 6 つの導入遺伝子の転写産物を確認でき

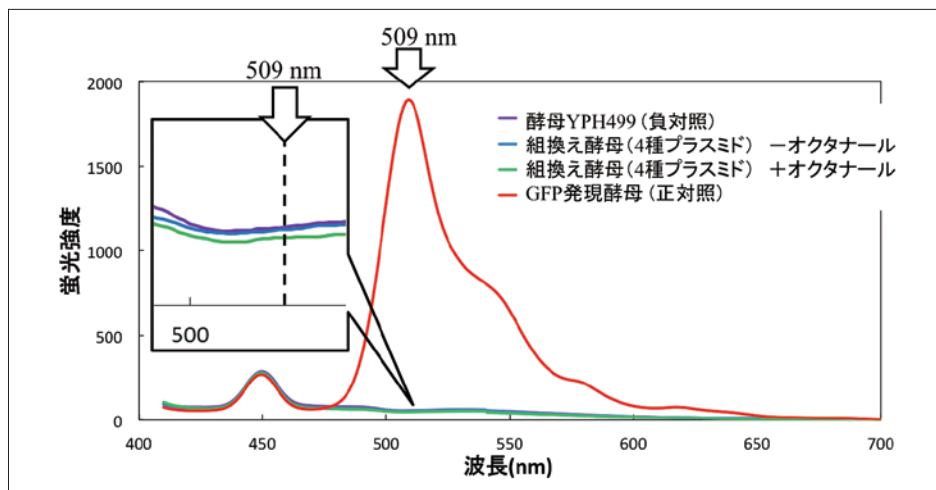


図 3 組換え酵母の蛍光スペクトル分析 (ガラクトース添加条件)

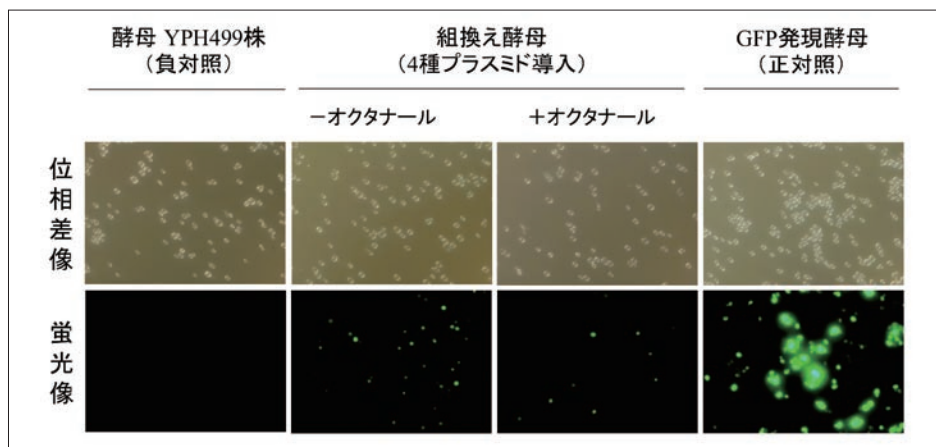


図 4 組換え酵母の蛍光顕微鏡観察 (ガラクトース添加条件)

たが、*GAL10* プロモーターと連結した遺伝子に関しては発現レベルが低いことが判明した(図5の *CREB* など)。この結果は、*GALI* プロモーターが *GAL10* の約4倍強いプロモーター活性を持つという報告とも一致する。導入遺伝子の発現を確認できたので、レポーターに関わる遺伝子(*CREB* と *GFP*) 転写産物についてさらに検証を行った。ガラクトース添加、 $\text{CdCl}_2$  処理やオクタナール処理を行った組換え酵母でのレポーター遺伝子発現応答をRT-PCR実験により検証した結果、ガラクトース非存在下でも弱い *CREB* や *GFP* mRNA の発現が見られ、ガラクトース添加による発現上昇も顕著ではなかった(図6)。重金属やオクタナールの添加による *GFP* 遺伝子発現の上昇は殆ど見られず、*GFP* 発現実験の結果を裏付ける結果となった(図6の lane 10 と lane 14)。

#### 4. ま と め

本研究において、ラットの嗅覚受容システム、および嗅覚受容シグナルを伝達するcAMP依存性GFPレポーターを導入した組換え酵母を作製した。RT-PCR解析から、導入した遺伝子の発現は確認されたが、嗅覚受容体リガンドであるオクタナール添加による有意なGFP発現誘導は観察できなかった。その原因として、(1)ガラクトース添加による *CREB* の発現誘導が不十分であったため、cAMP応答性レポーターがうまく機能しなかった、(2)受容体発現を含めたシグナル伝達システムの上流が機能していないために、十分なシグナル伝達が起こらなかった、2つの可能性が考えられる。前者については、改めて強力な *GALI* プロモーターに *CREB* 遺伝子を連結したプラスミ

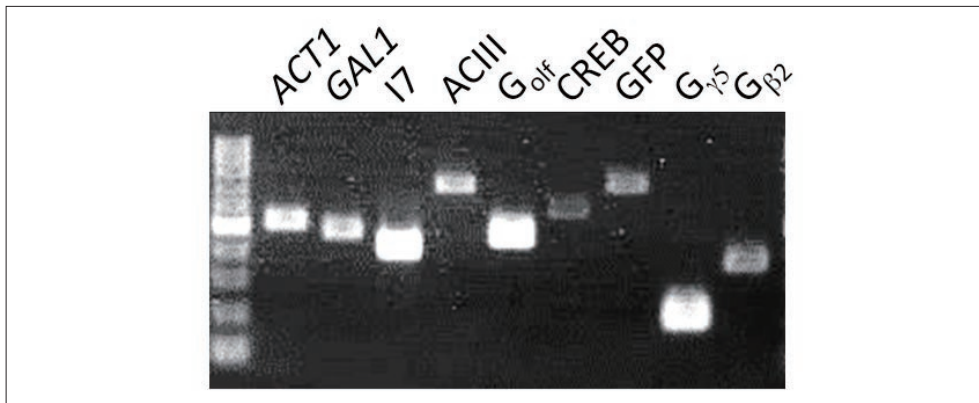


図5 RT-PCR法による導入遺伝子の発現評価  
(ガラクトース添加条件)

	酵母 (プラスミドなし)						組換え酵母 (レポータープラスミド)				組換え酵母 (4種プラスミド)			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ガラクトース添加	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
$\text{CdCl}_2$ 添加	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
オクタナール添加	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>ACT1</i> (恒常的発現)	[Gel image showing consistent ACT1 expression across all lanes]													
<i>GALI</i> (ガラクトース誘導発現)	[Gel image showing GALI expression in lanes 4, 5, 6, 13, 14]													
<i>CREB</i>	[Gel image showing CREB expression in lanes 4, 5, 6, 13, 14]													
<i>GFP</i>	[Gel image showing GFP expression in lanes 4, 5, 6, 13, 14]													

図6 組換え酵母のRT-PCR解析

ドを作製し、再評価を進めている。後者については、嗅覚受容体が正しく細胞膜上に局在しているか、GFP融合I7受容体を用いて検証を進めている。今後、本系の検証と改良を継続することで、酵母におけるラット嗅覚システムの再構成を目指してゆきたい。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者の皆様に心から御礼を申し上げます。

#### 文 献

- 1) Maria, S. D. and Ngai, J. (2010) The cell biology of smell. *J. Cell. Biol.*, **191**, 443-452.
- 2) Radhika, V., Proikas-Cezanne, T., Jayaraman, M., Onesime, D., Ha, J. H., and Dhanasekaran, D. N.: (2007) Chemical sensing of DNT by engineered olfactory yeast strain. *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 325-330.
- 3) 浴 俊彦 (2014) 遺伝子組換え酵母によるDNA損傷センシング、バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発、技術情報協会、pp.121-127.
- 4) Radhika, V., Milkevitch, M., Audige, V., Proikas-Cezanne, T., and Dhanasekaran, D. N. (2005) Engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain BioS-1, for the detection of water-borne toxic metal contaminants. *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 29-35.

## Development and evaluation of the recombinant yeast strain for odor sensing

**Toshihiko Eki**

*Molecular Genetics Laboratory, Department of Environmental and Life Sciences  
Toyohashi University of Technology*

For sensing smells, mammals such as humans have olfactory apparatus (i.e., nose). Molecular mechanism of olfaction is as follows: the ligand binding to the corresponding olfactory receptor causes the increased concentrations of intracellular cAMP via the trimetric G protein-mediated activation of type III adenylate cyclase (ACIII), and then this triggers a depolarization of a neuronal cell and the stimulus is transmitted to the brain to sense “odor”.

In this study, I tried to establish a novel bio-sensing system using the recombinant yeast expressing five rat olfactory proteins (olfactory receptor I7, Golf,  $G\beta_2$ ,  $G\gamma_5$ , and ACIII) for olfactory signal transduction and two proteins (CREB and GFP) for a cAMP-dependent GFP reporter system. First, I have successfully prepared three constructs for expressing rat olfactory proteins and a pESC-HIS construct for expression of CREB and a *CRE*-driven GFP reporter. Since the recombinant yeast cells with 4 recombinant plasmids are assumed to express GFP after the exposure to an I7 ligand (octanal) in a galactose-dependent manner, I have examined GFP expression in the yeasts cultured in the presence of 2% galactose and 0.5 mM octanal by the measurements in fluorometer and fluorescence spectrometer as well as observations under the fluorescence microscope. However, any significant induction of GFP was not detected in the recombinant yeast cells in these experiments. Although RT-PCR analyses showed the expression of all exogenous genes in the yeast, a galactose-dependent induction of *CREB* mRNA synthesis was poorly observed. These data may suggest that limited amount of CREB may cause insufficient expressions of GFP.