

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年10月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14915

研究課題名(和文) 匂い結合タンパク質を利用した高効率な気中匂い物質の可溶化技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of high efficient solubilization technique for gaseous odorants using odorant binding proteins

研究代表者

神崎 亮平 (Kanzaki, Ryohei)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：40221907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の嗅覚受容体を発現する培養細胞(センサ細胞)を利用した匂いバイオセンサに気体検出を付与する技術の確立を目的として、気液界面を制御することによる気体状の匂い物質の溶解技術の確立を行った。高濃度のウルトラファインバブルを含有する液体ミストを噴霧する手法を構築し、気体状の匂い物質を高効率に蒸留水中に溶解する手法を確立した。本手法により、センサ細胞が応答する濃度まで気体の匂い物質を溶解することに成功した。有機溶媒で溶解した場合と比較して、気体の匂い物質を溶解したサンプルは、同等のセンサ細胞の蛍光強度変化を引き起こすことが分かり、本手法がセンサ細胞による気体の検出技術に利用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した気体状匂い物質を短時間かつ高効率に液中へ溶解する技術は、センサ細胞と組み合わせることにより、昆虫や他の生物と同様に気体状の匂い検知の機能を付与したバイオセンサの開発につながる。これにより、環境中のさまざまな匂い検知に利用できることから、社会的に意義が大きい。また、気体状の匂い物質と嗅覚受容体の相互関係といった昆虫の嗅覚系で不明であったメカニズム解明の一助にもなると期待できることから、学術的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：In order to integrate technology of gas detection into an odorant biosensor system based on culture cells expressing insect odorant receptors (ORs), we attempt to establish a technique for solubilizing gaseous odorants by controlling gas-liquid interface. We developed a volatile odorant molecule dissolution method based on high concentration ultrafine bubbles generated by an ultrasonic spray nozzle. This new technique successfully dissolved gaseous odorants in liquid, and the cells with insect ORs could show odorant responses. Fluorescence intensity changes of the cells using odorant samples by the solubilization technique were equivalent to those by an organic solvent. These results suggest that the technique is applicable for the gas detection system using OR-based odorant sensor elements.

研究分野：神経行動学

キーワード：匂いセンサ 昆虫 嗅覚受容体 匂い結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生活の質の向上や安全・危機管理の観点から、大気中に存在する匂い物質を高感度かつ選択的に検出する匂いセンサに対するニーズが高まっている。現在、金属酸化物半導体や水晶振動子など工学技術に基づき、気中の匂いを検出できる匂いセンサが実用化されている。しかし、検出感度、識別能、検出速度の点で課題が多い。近年これら課題を解決する革新的な検出技術として、自然界の多様な匂い物質を ppb レベルもの感度で検出できる生物の嗅覚系が注目されている。

生物の中でも昆虫は特に優れた嗅覚系をもつ。昆虫は触角に多数存在する嗅感覚子で気中の匂い物質を受容する。嗅感覚子の内部は感覚子リンパと呼ばれる液で満たされており、その液中に生体の匂いセンサの実体である嗅覚受容体を発現する嗅覚受容細胞が存在する。昆虫の嗅覚系のメカニズムは大きく2つのステップに分けられる。気液界面を介して気中の匂い物質を感覚子リンパ液中に可溶化し、嗅覚受容細胞膜へ輸送するステップと、可溶化された匂い物質が細胞膜上の嗅覚受容体と相互作用し細胞内へ電流を発生させるステップである。後者に関しては、代表者のグループで、昆虫の嗅覚受容体を培養細胞で発現させることで、高感度かつ選択的に蛍光応答を示す匂いセンサ素子(センサ細胞)を開発することに成功した^(1, 2)。一方、前者の気中の匂い物質の可溶化に関してはほとんど研究がおこなわれておらず、センサ細胞の応答は、液状の匂い物質を有機溶媒(ジメチルスルホキシド: DMSO)に溶解しバッファーで希釈したものを刺激液として計測している状況である。

このような背景のもと、代表者らのグループは、昆虫の感覚子リンパで可溶化の役割を果たす匂い結合タンパク質(odorant binding protein: OBP)を機能的な状態で大量に精製する手法を確立してきた。しかし、気中の難水溶性の匂い物質を高効率に溶解する技術の確立には至っていない。昆虫触角では、嗅感覚子の嗅孔に、嗅孔細管と呼ばれる構造が感覚子リンパに枝を伸ばしており、気液界面における匂い物質の効率的な可溶化に関わると考えられている。一方、工学的アプローチとして、気液界面を制御して可溶性の匂い物質(アンモニア、酸素等)の効率的な可溶化技術(マイクロバブル(ファインバブル)⁽³⁾、気液交換チップ、ガス透過膜)が開発されている。そこで、OBP や気液界面を制御した可溶化技術を活用することで、センサ細胞に供給できる濃度で難水溶性の匂い物質を高効率に溶解できる技術を開発できるとの着想に至った。

【参考文献】

(1) Mitsuno *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 65, 287 (2015). (2) Termtanasombat *et al.*, *J. Chem. Ecol.* 42, 716 (2016). (3) Mase *et al.*, *Chem. Commun.* 47, 2086 (2011).

2. 研究の目的

昆虫の匂い結合タンパク質(OBP)や気液界面を制御した可溶化技術を利用して、気中の匂い物質を高効率で液中に溶解する技術の確立を目指す。代表者らは、昆虫の嗅覚受容体を発現させた昆虫由来の培養細胞(センサ細胞)が既存のセンサを上回る高感度性かつ選択性をもつ匂い検出素子として利用できることを示してきた。しかし、揮発性が高く難水溶性の気体状の匂い物質をセンサ細胞が反応する濃度まで高効率で溶液中に可溶化する技術の確立には至っていない。本研究では、気液界面の制御や OBP の活用を通して、気中の匂い物質を液中に高効率で溶解する技術を確立し、センサ細胞と統合した、気中の匂い物質を検出できる匂いバイオセンサ構築の基礎技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) 気体状の匂い物質の溶解

本研究では、気体状の匂い物質の溶解技術として、超音波スプレーノズル(アトマイザー)により、直径 1 μm 以下の微小バブルであるウルトラファインバブル(UFB)を含有する液体ミストを、気体状の匂い物質を含む空間内に噴霧する方法を採用した(図1)。対象臭として、難水溶性の有機化合物である 1-オクテン-3-オール(Sigma-Aldrich, Assay: >98%)を用いた。液体の 1-オクテン-3-オールを気化させ、気体の 1-オクテン-3-オールを実験装置の容器内に発生させた。ガスクロマトグラフ分析(GC)により、容器内の気体濃度を分析後、アトマイザーを稼働させることで気体の 1-オクテン-3-オールを液中に溶解させた。一定時間後、溶液を回収し、GC 分析により、液体中の濃度を分析した。溶解したサンプルはセンサ細胞での応答測定に使用した。

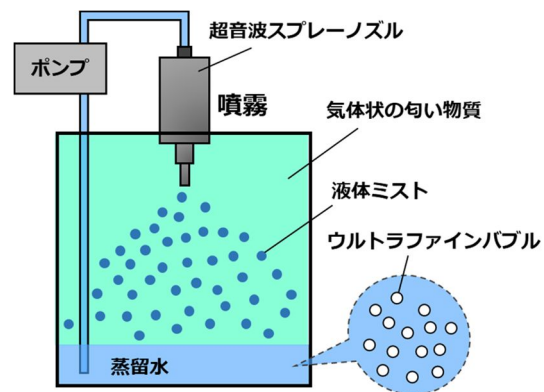


図1 実験装置模式図

(2) 溶解サンプルに対するセンサ細胞の応答測定

1-オクテン-3-オールを溶解したサンプルを調製し、センサ細胞の匂い応答検出を実施した。センサ細胞は、1-オクテン-3-オールに強く応答するキイロショウジョウバエ嗅

覚受容体である Or13a を発現させた細胞系統 (Or13a 発現細胞) を用いた。蛍光顕微鏡 (BX51WI、オリンパス社製) 下で溶解した匂い物質に対する蛍光強度変化量を測定した。細胞の蛍光は EM-CCD カメラ (DU-897E、Andor 社製) により取得し、蛍光強度変化量は $F/F_0 \times 100\%$ で定義し算出した。刺激液は、溶解サンプルをアッセイバッファで提示濃度まで希釈して調製し、センサ細胞の濃度依存的な蛍光強度変化を取得した。

4. 研究成果

(1) 気体状の匂い物質の溶解

まず本手法を適用し、センサ細胞が応答する濃度まで気体の匂い物質が溶解できるかを検証した。アトマイザーから液体ミストを 1 分間噴霧することで、21.5 ppm で揮発した 1-オクテン-3-オールが存在する環境から、44.6 μM の 1-オクテン-3-オールを蒸留水中に溶解できることを GC 分析により確認した (図 2(a))。液体ミストの噴霧を 30 分間継続したところ、417.6 μM まで 1-オクテン-3-オール濃度が上昇した。フラスコ内の気体濃度は、時間経過によって減少することが確認された。(図 2(b)) また、ナノトラッキング法による分析の結果、アトマイザーによる溶解サンプルには、直径 100 nm 程度の微小バブルが $\sim 10^9$ 個オーダーで含有していることが確認された。

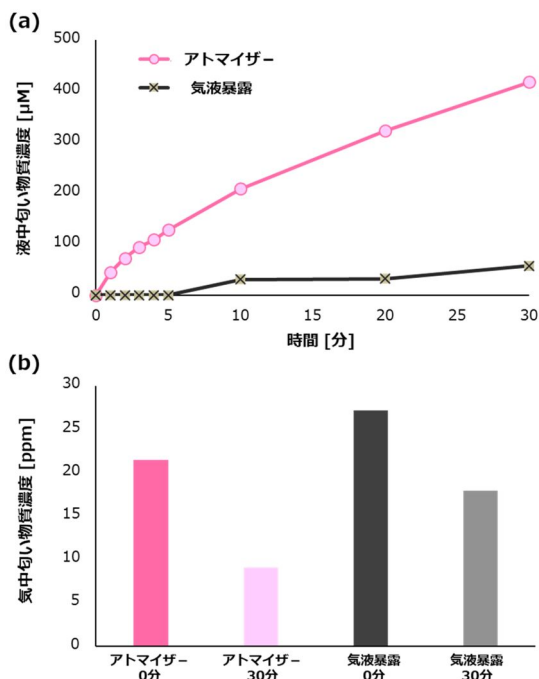


図2 GCによる匂い濃度の分析結果 (a)アトマイザーと気液暴露によって蒸留水中に溶解した 1-オクテン-3-オール濃度。 (b)フラスコ内の揮発した 1-オクテン-3-オール濃度の経時変化。

一方、気液暴露の条件 (アトマイザーとポンプを停止) では、5 分間経過しても GC によって検出可能な濃度まで蒸留水中に 1-オク

テン-3-オールが溶解しないことが確認された。さらに、30 分間経過しても蒸留水中の 1-オクテン-3-オール濃度は 57.0 μM にとどまり、アトマイザーによる溶解と同様の経時変化は確認されなかった (図 2(a))。

(2) 溶解サンプルに対するセンサ細胞の応答測定

気体状の匂い物質を溶解したサンプルに対してセンサ細胞が応答を示すかどうかを検証するため、揮発した 1-オクテン-3-オールを溶解したサンプルに対する Or13a 発現細胞の蛍光強度変化量を測定した。アッセイバッファを用いて段階的に濃度調製し刺激した結果、センサ細胞は蛍光強度変化を示し、濃度依存的に蛍光強度を増加することが分かった (図 3)。有機溶媒 (Dimethyl sulfoxide; DMSO) を用いて液体の 1-オクテン-3-オールを溶解したサンプルと本手法のサンプルを濃度応答性の点で比較したところ、各濃度において DMSO で溶解したサンプルと同等の蛍光変化値を検出した。以上の結果から、気体状の匂い物質を溶解した場合でも、センサ細胞は濃度に合わせて同等の蛍光強度変化を示すことが分かった。

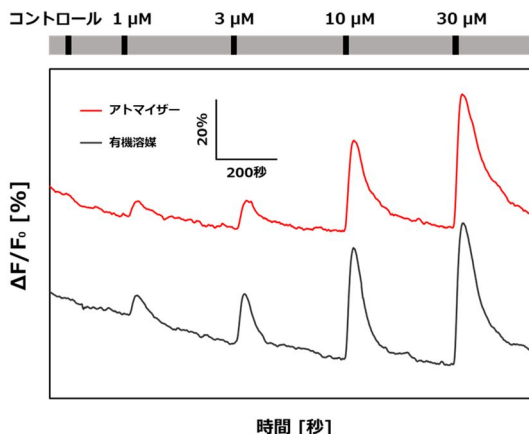


図3 アトマイザーと有機溶媒 (DMSO) によって溶解したサンプルを用いた Or13a 発現細胞のカルシウムイメージング結果。

本研究を通して、UFB を含有する液体ミストを噴霧することで、気体状の匂い物質を短時間でかつ高効率に液中へ溶解できることを示し、溶解したサンプルに対してセンサ細胞の蛍光応答が取得できることを実証した。これにより、本手法が気体状の匂い物質を検出できる匂いバイオセンサの基盤技術となり得ることを示した。今後、本手法によるシステムの最適化や OBP の活用により、より高効率な溶解技術へと発展させる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

〔学会発表〕(計9件)

Terutsuki D., Mitsuno H., Nishina Y., Iio T., Sakurai T., Sato K., Mase N., Kanzaki R. “High-speed volatile odorant molecule dissolving strategy for cell-based odorant sensors” in 18th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN 2019), Fukuoka, pp. 1-3 Japan 26-29 May 2019.

光野秀文, 櫻井健志, 神崎亮平 (2016) 昆虫の嗅覚に学ぶ匂いセンサ, 第33回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 一般公開セッション「山、海、空とセンサと」(10月24-26日、平戸文化センター、長崎)

Mitsuno H., Termtanasombat M., Sakurai T., Nakajima Y., Misawa N., Kanzaki R. (2016) Development of a sensitive and selective cell-based sensor for detecting mold odorants based on insect odorant receptors. 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), (6月5-9, Yokohama, Japan).

Termtanasombat M., Mitsuno H., Misawa N., Yamahira S., Yamaguchi S., Nagamune T., Kanzaki R. (2016) Development of Cell-based Sensor Array for Targeting Multiple Odorants based on Insect Odorant Receptors. 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), (6月5-9, Yokohama, Japan).

Mitsuno H., Termtanasombat M., Misawa N., Nakajima Y., Sakurai T., Kanzaki R. (2016) Development of odorant sensor elements sensitive and selective to mold odorants based on Sf21 cell lines expressing insect odorant receptors. Biosensors 2016, (5月25-27日, Gothenburg, Sweden).

光野秀文, 櫻井健志, Maneerat Termtanasombat, 中島裕子, 神崎亮平 (2015) Development of odorant sensor elements sensitive to mold odorants based on insect odorant receptors. 第40回日本比較内分泌学会・第37回日本比較生理生化学会合同大会,(広島, 12月11-13日)

Termtanasombat M., Mitsuno H., Misawa R., Misawa N., Yamahira S., Yamaguchi S., Okamoto A., Nagamune T., Kanzaki R. (2015) Development of Cell-based Odorant Sensor with Multiple Target Odorants using Cell Patterning Techniques. Bio4Apps2015, (Fukuoka, 12月9-11日)

Mitsuno H., Sakurai T., Nakajima Y., Tanaka A., Misawa N., Kanzaki R.

(2015) Development of a cell-based odorant sensor for mold odors based on insect odorant receptors. 8th Asia-Pacific Association of Chemical Ecologist (APACE) Conference, (California, USA, 9月23-26日)

光野秀文, 三澤宣雄, 櫻井健志, 神崎亮平 (2015) 昆虫の嗅覚受容体を用いた細胞利用型匂いセンサの開発, 生体医工学会,(名古屋、愛知, 5月7日)

〔図書〕(計1件)

光野秀文, 櫻井健志, 神崎亮平 (2016) 昆虫の嗅覚機能を利用した匂いバイオセンサ. 電気化学会・化学センサ研究会誌「化学センサ」, 32(3) 111-121.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

Terutsuki D., Kanzaki R., Mitsuno H., Sakurai T., Mase N., Sato K., DISSOLUTION SYSTEM FOR POORLY WATER-SOLUBLE ORGANIC COMPOUND, METHOD FOR DISSOLVING POORLY WATER-SOLUBLE ORGANIC COMPOUND, AND ODOR DETECTION SYSTEM, PCT/JP2019/4475.

照月大悟, 神崎亮平, 光野秀文, 櫻井健志, 間瀬暢之, 佐藤浩平, “難水溶性有機化合物の溶解システム、難水溶性有機化合物の溶解方法、及び匂い検出システム”, 特願 2018-22267, 出願日 2018年2月9日.

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

神崎 亮平 (KANZAKI, Ryohei)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号: 4 0 2 2 1 9 0 7

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

間瀬 暢之 (MASE, Nobuyuki)

静岡大学・工学部・教授

研究者番号: 4 0 3 1 3 9 3 6

三澤 宣雄 (MISAWA, Nobuo)

神奈川科学技術アカデミー・研究員

研究者番号: 7 0 4 4 2 5 3 0

光野 秀文 (MITSUNO, Hidefumi)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：60511855

(4)研究協力者

照月 大悟 (TERUTSUKI、Daigo)

東京大学・先端科学技術研究センター・大学院生