

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19203

研究課題名（和文）昆虫嗅覚受容体利用型匂いセンサにおける所望の匂い検知のための受容体探索技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of a receptor search technology for desired odor detection in insect odorant receptor-based sensors

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：所望の匂い物質（対象臭）を検出できる匂いバイオセンサの開発を目指し、昆虫の嗅覚受容体の応答特性を簡便に評価する手法を確立し、その応答特性をもとに対象臭検出に適した受容体を探索してセンサ細胞の作出を試みた。共受容体と蛍光タンパク質を発現させた均質なセンサ細胞に、試験対象の嗅覚受容体遺伝子を追加して導入することで、従来手法よりも簡便に嗅覚受容体を発現させて応答特性が解析できる新規技術を確立した。この技術にもとづいて、複数種類の嗅覚受容体の応答特性を解析して選抜することで、最終的にヒトの汗臭成分の一つである2-メチルフェノールを高選択、かつ高感度に検出できるセンサ細胞の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の嗅覚受容体の機能発現には、複合体を形成する共受容体との共発現が必要であることから、さまざまな嗅覚受容体の応答特性を網羅的、かつ簡便に解析する技術の確立が一つの課題であった。本技術により、簡便に嗅覚受容体の機能解析が可能となり、昆虫が備える匂い受容機構の解明の技術基盤として生物学や農学分野への貢献が期待され、学術的に意義がある。また、本技術を活用して嗅覚受容体を選択しセンサ細胞を作出することで、ニーズにあわせて対象臭を検出できる匂いバイオセンサの開発が可能となることから、幅広い分野での産業サイズとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To develop an odor biosensor for detecting desired odor substances (target odorants), we attempted to establish a simple method to evaluate the response characteristics of insect odorant receptors, select receptors suitable for the detection of the target odorants, and produce the sensor cells. By introducing additional target odorant receptor genes into a homogeneous sensor cell, in which co-receptors and fluorescent proteins are functionally expressed, we established a novel technology that enables functional expression of the odorant receptors and analysis of their response characteristics more easily than conventional methods. By analyzing the response characteristics of several insect odorant receptors based on this technology, we finally succeeded in producing a sensor cell that can selectively and sensitively detect 2-methylphenol, one of the components of human sweat odorants.

研究分野：神経行動学

キーワード：嗅覚受容体 昆虫 匂いバイオセンサ 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

環境中にごく微量で存在する多様な匂い物質を高感度、かつ選択的に検出する技術は、われわれの生活の質(QOL)の向上、体調管理を含む疾病検査、そして安全危機管理といった幅広い分野で求められている。これまでに、金属酸化物半導体などの工学技術にもとづくセンサ技術が開発され、実用化されている。しかし、現在、既存技術を超える感度で多種多様な匂い物質を検出することが求められていることから、生物の嗅覚などの生体分子を利用したセンシング技術に注目が集まってきている。

生物の中でも昆虫は、触角で機能する嗅覚受容体を使って、多種多様な匂い物質を高感度に検出している。このような昆虫の嗅覚受容体の機能を再構築して活用することができれば、既存技術を超えて、多種多様な匂い物質を高感度に検出する技術を開発できる可能性が高い。このような考えのもと、研究代表者らは、昆虫の嗅覚受容体、共受容体(Orco)、およびカルシウム感受性蛍光タンパク質(GCaMP)をSf21細胞で機能発現させることにより、高感度性と高選択性を兼ね備え、蛍光強度変化として匂い物質を検出できる細胞系統、すなわちセンサ細胞の作出技術を確立してきた⁽¹⁾。この技術を発展させて、現在までに、さまざまな一般的な匂い物質(一般臭)の嗅覚受容体を用いた検出技術の開発を進めている。例えば、キイロシヨウジョウバエの一般臭嗅覚受容体を用いて、水道水で問題となっているカビ臭成分を高感度に検出する技術を開発し、実用的な検出技術として、現在、実証試験を進めている。また、さまざまな嗅覚受容体を用いて異なる匂い物質に蛍光応答を示すセンサ細胞を作出しガラス基板上にアレイ化することで、単一臭や複合臭を蛍光パターンとして識別できることも実証してきた⁽²⁾。これらの研究から、対象となる匂い物質(対象臭)を検出する嗅覚受容体を導入しさえすれば、対象臭を高感度で検出するセンサ細胞の開発が可能であることを示してきた。

一方、センサ細胞の検出性能は、導入する嗅覚受容体の特性に従うため、対象臭の検出には適切な嗅覚受容体を用いる必要がある。しかしながら、昆虫のゲノム解読が進められ、多数の嗅覚受容体が発見されているにもかかわらず、その機能が明らかにされた嗅覚受容体の数は限られている。ゲノム解読がいち早く進められたキイロシヨウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)では嗅覚機能の解析が進展しており、約100種類の匂い物質に対する受容体の応答特性がデータベース(Database of Odorant Responses; DoOR)に登録されている。しかし、現在求められているニーズにあわせてさまざまな対象臭の検出に適用するためには、多種多様な匂い物質に対する多くの嗅覚受容体の応答特性を解析し、対象臭の検出に最適な嗅覚受容体を探索する必要がある。以上の背景を踏まえ、昆虫の嗅覚受容体の応答特性を網羅的に解析する技術を確立し、それに基づきさまざまな昆虫種から対象臭の嗅覚受容体を選択してセンサ細胞が作出できれば、対象臭に特化した高性能な匂いセンサの構築法が確立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).

2. 研究の目的

これまでに、昆虫の嗅覚受容体、Orco、およびGCaMPを導入したセンサ細胞が、受容体の応答特性に従い、対象臭を検出する素子として利用できることを示してきた。しかし、さまざまな嗅覚受容体の応答特性にもとづいて対象臭の検出に最適な嗅覚受容体を探索し、匂いセンサとして活用する技術の確立には至っていない。本研究では、さまざまな昆虫嗅覚受容体の遺伝子を簡便に導入してその応答特性を網羅的に評価する手法を確立し、ニーズに関連する対象臭を検出する嗅覚受容体を探索して匂いバイオセンサとして開発する手法の確立を目的とする。

なお、本研究は、現在、特許出願を検討中の内容を含むため、3. 研究の方法、および4. 研究成果では、特許出願に関連する内容を省いて記載する。

3. 研究の方法

【細胞と匂い物質の準備】

嗅覚受容体、Orco、およびGCaMP6sを発現させたSf21細胞は、抗生物質(プラストサイジン; 10 µg/mL、ゼオシン 100 µg/mL、ゲンタマイシン 10 µg/mL)を添加したGrace's Insect Medium (FBS含有)で27°Cで定期的に継代培養した。匂い物質はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解してストック液を調製し、アッセイバッファ(140 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 4.5 mM CaCl₂, 11.26 mM MgCl₂, 11.32 mM MgSO₄, 9.4 mM D-glucose, 5 mM HEPES, pH 7.2)で記載濃度へと希釈して使用した。

【遺伝子導入用ベクターの構築と遺伝子導入】

対象とする嗅覚受容体の応答特性は、キイロシヨウジョウバエの嗅覚応答データベース(Database of Odorant Responses; DoOR)を用いて、調査した。各嗅覚受容体のResponse Profileにもとづいて、異なる化学構造の匂い物質に応答を示すとされる嗅覚受容体を選択した。対象の嗅覚受容体遺伝子は、キイロシヨウジョウバエ触角のtotal RNAからcDNAを合成したのち、RT-PCR法により、単離した。単離した遺伝子は昆虫細胞発現ベクター(pIB/V5-His Vector; Invitrogen、pIEx4; Novagen)のマルチクローニングサイトに挿入することにより、対象の嗅覚受容体遺伝子が挿入された遺伝子導入用ベクターを構築した。

構築した遺伝子導入用ベクターは、リポフェクション法により細胞へ遺伝子導入した。ここで

は、Or56a、Orco、および GCaMP6s を安定に機能発現する均質な細胞系統を用いた。新しく遺伝子導入した細胞系統は、前述抗生物質に加えて、G-418 を含む Grace's Insect Medium (FBS 含有) で継代培養した。系統作出にあたっては、遺伝子導入した細胞群から単一細胞を抽出して、スケールアップを繰り返すことで、新しく細胞系統を作出した。加えて、上記で得られた細胞系統について、同様に、単一細胞への単離と系統化を繰り返し行うことにより、検出素子として利用可能な、より応答性の高い細胞系統を得た。

【蛍光応答の計測】

遺伝子導入した細胞系統については、カルシウムイメージング法による計測を行い、匂い物質 (刺激液) への応答特性の評価を行なった。細胞への匂い刺激はアッセイバッファを用いて行い、細胞応答の計測を行なった。匂い物質をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、さらにアッセイバッファで希釈することで、目的濃度の匂い刺激液を調製した。このとき、各濃度の刺激液について DMSO 濃度は 0.1% (終濃度) となるように調製した。カルシウムイメージングにあたっては、細胞をスライドガラス (φ12 mm) へ播種して固着させ、クイックチェンジチャンバ (RC-48LP; Warner Instruments) に設置して計測した。灌流のためにペリスタルティックチューブポンプを利用して、チャンバへの流入と排出を制御した。刺激液とアッセイバッファの切り替えは、流入用のチューブを入れ替えることで行なった。刺激液は 15 秒間灌流させた。次の刺激を与えるまでにアッセイバッファを 6 分以上灌流させることで、チャンバから直前の匂い物質を取り除いた。細胞蛍光画像の取得は、蛍光顕微鏡 (BX51WI; Olympus) および EM-CCD カメラ (DU-897E; Andor Technology) を用いて実施し、得られた画像は MATLAB により解析を行なった。

4. 研究成果

【嗅覚受容体遺伝子の新規導入手法の確立】

まず、対象となる嗅覚受容体を簡便に導入して機能発現させる新規受容体導入手法の確立を目指した。対象の嗅覚受容体のみを導入して蛍光応答が計測できる細胞として、あらかじめ共受容体とカルシウム感受性蛍光タンパク質を安定的に発現する細胞系統を準備する必要がある。ここでは、キロショウジョウバエの Or56a に加えて、Orco および GCaMP6s を機能発現する細胞系統 (以下、Or56a センサ細胞と呼ぶ) を遺伝子導入用の細胞系統として用いた (図 1)。Or56a センサ細胞は、Or56a が受容するジェオスミンに蛍光応答を示す一方、その他の匂い物質には全く蛍光応答を示さない。まず、応答特性が明らかな嗅覚受容体として、Or13a を用いて遺伝子導入用ベクターを構築し Or56a センサ細胞へ遺伝子導入した。蛍光計測の結果、Or13a (図 1 中の Or-X に相当) を新たに遺伝子導入した細胞では、ジェオスミンに加えて、Or13a が受容する 1-オクテン-3-オールに強く、1-ヘプテン-3-オールに微弱に蛍光応答を示した。この匂い選択性は Or13a が本来備えている応答特性と一致する。このことから、Or56a センサ細胞へ Or13a を新たに遺伝子導入することで、Or13a の応答性を再構築できることが明らかとなった。以上により、対象となる嗅覚受容体のみを遺伝子導入して、その蛍光計測から簡便に受容体応答を評価する新規手法を確立した。

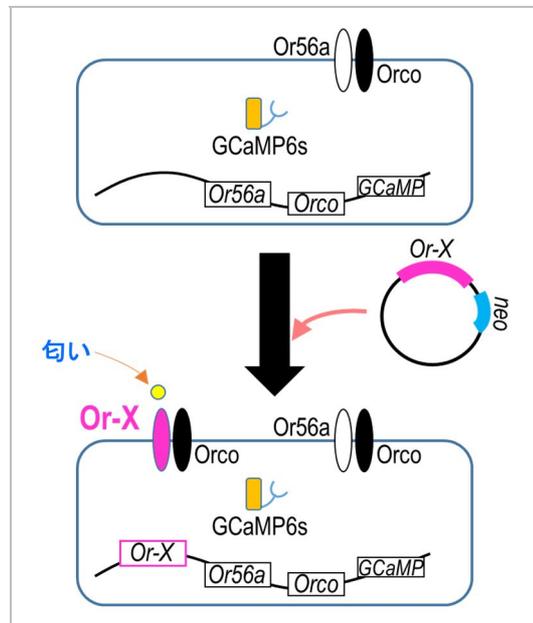


図 1 新規受容体導入手法の模式図

Or56a センサ細胞へ、対象となる嗅覚受容体遺伝子 (Or-X) を導入した。対象の嗅覚受容体遺伝子の発現ベクター中には、抗生物質耐性遺伝子 (neo) が挿入されており、トランスフェクション後にネオマイシンで処理することで遺伝子導入された細胞を選抜できる。

【嗅覚受容体探索とセンサ細胞作出】

対象臭の検出に適した嗅覚受容体の探索とセンサ細胞作出のために、嗅覚応答データベース DoOR から対象とする嗅覚受容体を選定した。ここでは、それぞれ異なる匂い物質に応答する嗅覚受容体として Or49b、Or82a を選定した。新規受容体導入手法に従って、遺伝子導入し蛍光計測した結果、Or49b を導入した細胞群では、2-メチルフェノール (ヒトの汗臭成分) に対して蛍光応答を示す一方、酢酸ゲラニルには蛍光応答を示さなかった。また、Or82a を導入した細胞群では、酢酸ゲラニル (果実臭成分) に対して蛍光応答を示す一方、2-メチルフェノールには蛍光応答を示さなかった。いずれの細胞においても、ジェオスミンに対する蛍光応答は計測され、Or56a の応答に加えて、新規導入した嗅覚受容体の応答が追加されて検出・評価できることが分かった (図 2)。

次に、匂い応答特性 (選択性、濃度応答性) を評価した。その結果、Or49b は 2-メチルフェノール

ールに強く、ベンズアルデヒドに微弱に応答する一方、Or82aは酢酸ゲラニルに強く、ベンズアルデヒドに微弱に応答し、いずれもその他試験した匂い物質にはほとんど応答を示さなかった。強く応答する匂い物質については、いずれの細胞群においても濃度変化に応じた蛍光強度変化を示した。これらの結果をもとに受容体応答性を評価した結果、Or49bは2-メチルフェノールに対して高い選択性で蛍光応答を示す一方、Or82aやOr13aは2-メチルフェノールには全く蛍光応答を示さないことが分かり、試験した嗅覚受容体のうち、Or49bがヒトの汗臭成分である2-メチルフェノールの検出に適した嗅覚受容体として利用できることが分かった。

最後に、遺伝子導入した細胞について、単一細胞への単離と系統化を繰り返すことでセンサ細胞の樹立を行い、樹立されたセンサ細胞は、より感度（各濃度での蛍光強度変化値）が改善することが分かった。以上のことから、複数種類の嗅覚受容体の中から、その応答性を評価することで対象臭の検出に適した受容体を選択する手法を確立し、一例として、ヒトの汗臭成分である2-メチルフェノールを高選択的、かつ高感度に検出できるセンサ細胞の作出を達成した。

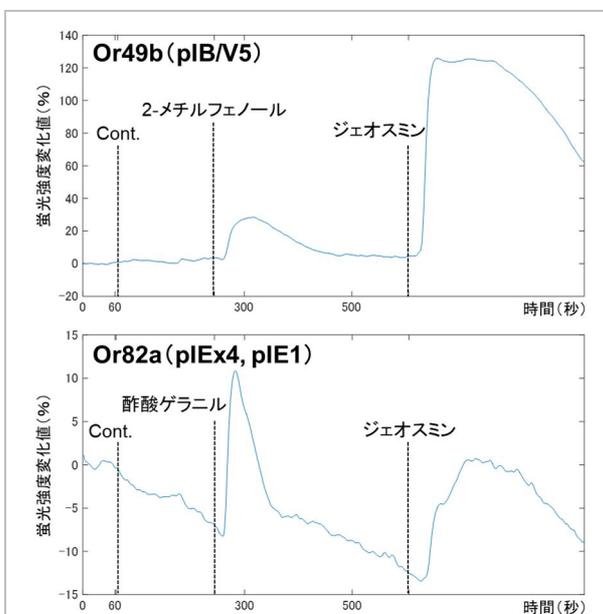


図2 新規嗅覚受容体を導入した細胞群の蛍光応答の経時変化

Or56a センサ細胞に新しく Or49b、または Or82a を遺伝子導入した。括弧内は用いた発現ベクターを示す。それぞれジェオスミン (10 μ M) に加えて、対象臭 (300 μ M) に蛍光応答を示すことが分かる。Or49b の細胞では、0.5% (Cont.)、24.7% (2-メチルフェノール)、121.0% (ジェオスミン)、Or82a の細胞では、-0.8% (Cont.)、16.3% (酢酸ゲラニル)、12.6% (ジェオスミン) の蛍光強度変化値を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚のしくみとバイオセンシング技術への応用
3. 学会等名 第95回化学センサ研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚機能を活用したセンシング技術の実用化への取組み
3. 学会等名 センサ & IoTコンソーシアム公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚に学ぶセンシング技術
3. 学会等名 科学技術者フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚受容体の匂いセンシング技術への活用
3. 学会等名 日本ペプチド学会 第50回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 光野秀文、二木佐和子、黒田枝里、照月大悟、櫻井健志、小熊久美子、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体を発現させたSf21細胞によるダム湖水中のカビ臭検出
3. 学会等名 ケミカルセンサ/バイオ・マイクロシステム合同研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文、照月大悟、櫻井健志、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚機能を活用した匂いセンシング技術の開発と実用化への取組み
3. 学会等名 NPO法人サーキットネットワーク(C-NET)定期公演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文、荒木章吾、二木佐和子、黒田枝里、照月大悟、櫻井健志、山口哲志、小熊久美子、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体を発現するSf21細胞を利用した水道原水中のカビ臭検知
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Mitsuno, S. Niki, E. Kuroda, T. Sakurai, K. Oguma, and R. Kanzaki
2. 発表標題 Geosmin detection in raw water by means of a cell-based odorant sensor element expressing an insect odorant receptor
3. 学会等名 28th Anniversary World Congress on Biosensors(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤林駿佑, 光野秀文, 祐川侑司, Haupt 周一 Stephan, 皆川慶嘉, 野地博行, 神崎亮平
2. 発表標題 スマートフォン顕微鏡を用いた匂いセンサ細胞の蛍光イメージング
3. 学会等名 令和3年電気学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤龍一郎, 祐川侑司, 光野秀文, 並木重宏, 神崎亮平
2. 発表標題 分子記述子を用いた昆虫嗅覚受容体発現細胞の匂い応答強度予測手法の検討
3. 学会等名 令和3年電気学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光野秀文, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 バイオセンシング技術における昆虫の嗅覚機能の活用とガス検知に向けた取組み
3. 学会等名 第1回センサ&IoTセミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光野秀文, 櫻井健志, 祐川侑司, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚からセンシング技術の開発と社会実装に向けた取組み
3. 学会等名 VR学会産学フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020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
研究協力者	光野 秀文 (Mitsuno Hidefumi) (60511855)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授 (12601)	特任准教授
研究協力者	櫻井 健志 (Sakurai Takeshi) (20506761)	東農農業大学・農学部・准教授 (32658)	東京農業大学・教授
研究協力者	並木 重宏 (Namiki Shigehiro) (40567757)	東京大学・先端科学技術研究センター・准教授 (12601)	准教授

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