

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300066

研究課題名（和文） 嗅覚情報を用いた危険検知用人工の鼻センサシステムに関する研究

 研究課題名（英文） RESEARCH FOR ARTIFICIAL NOSE USING OLFACTORY
INFORMATION FOR RECOGNIZING DANGEROUS STATUSES

研究代表者

佐藤 孝明 (SATO TAKAAKI)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：20344187

研究成果の概要（和文）：本課題では、1000 種の嗅覚受容体から数種選び、培養細胞に機能発現させ細胞センサ化し、匂い要素情報自動強調処理により嗅覚情報を抽出する人工の鼻センサシステムの試作に取り組んだ。この結果、一過性発現法では微小細胞アレイセンサの作製は困難であること、その解決法としてのヒト人工染色体ベクターを用いた嗅覚受容体安定発現細胞の作製が可能であること、匂い応答を示すことが確認できた。また、バラ臭の混合により天敵の匂いの不快度・ストレスが緩和され、それは嗅覚 2 次中枢の feedforward 抑制系の信号減弱を介していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： In this study, an artificial nose with a few types of cell sensors functionally-expressing olfactory receptors is designed and attempted to be created in a manner of cell array for extracting olfactory information by using an automatically-emphasizing system for prominent odor elements. We concluded that transient expression system was inadequate to create microarray of olfactory-receptor functionally-expressing cells, whereas a human artificial chromosome vector enabled HEK293 cells to stably functionally express olfactory receptors with olfactory compatible sensitivity to odors. In addition, in mixture of TMT odor and rose odor, rose odor reduced unpleasantness and stress response of TMT with decrease in inhibitory feedforward signal via the second olfactory center.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・知覚情報処理・知能ロボティクス

キーワード：情報センシング、匂い、生体機能利用、危険物検知、細胞センサ

1. 研究開始当初の背景

嗅覚はサブナノスケールの分子構造識別

能を持ち、一部の構造以外は物理化学的特性が同一な鏡像異性体を 1 秒嗅げば、よく似た

異なる匂いとして識別できる (*Chem. Senses*, 28:87-104(2003))。この優れた嗅覚の匂い情報処理は約 0.2 秒で最高の識別能が達成される高速動作性を有している (*Nat. Neurosci.*, 6:1224-9(2003), Uchida et al.)。また、嗅覚は、異臭や体臭により、火事、腐敗物、毒劇物、危険な個体などの接近を察知し、生命の安全・維持を図るために不可欠な感覚である。その高度な例として、マウスは、乳ガンウイルス感染による体臭変化を腫瘍形成前に検知可能である (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:5612-(2002), Yamazaki et al.)。欧米でも、嗅覚の能力を利用したリスク管理技術に強い関心もたれ、イヌによるガン患者検知やミツバチによる爆発物検知技術の研究開発が進められている。しかしながら、より広く患者の負担の軽減を図れると期待されるマウスの体臭異常による疾病発症前検知能力や汎用性の高い危険臭捜査機能などを工学的に実現するためには、動物に識別させる方法では不十分で、データ統計処理が可能な人工の鼻センサシステムの開発が不可欠と考えられる。例えば、発症前診断を可能とするには、個々人毎に遺伝的に異なっている健康時の体臭をモニタし、個々人の体臭を遺伝的に決まる要素情報と食べ物により変化した要素情報とに分離する際、および、各種危険臭成分の確度付き判定などに、統計処理が不可欠と思われる。また、このような高度な嗅覚の意味情報抽出機能は、1000 種の多様な受容体センサ分子の獲得によって、オーバーラップして応答する受容体の異なる組合せ符号化を利用して初めて可能になったと考えられている。この受容体組合せ符号化説 (*Cell*, 96:713- 23(1999)、バック博士と共著論文)は、バック博士の 2004 年度ノーベル医学・生理学賞受賞理由の一部となっている。

また、東大で開発された背側全受容体欠損マウス (*D* マウス)は、狐が分泌する TMT の臭いに野生型マウスと同様に高感度だが、野生型と違い TMT の臭いを全く恐れない事実が発見された (*Nature*, 450:503- (2007), Kobayakawa et al.)。この結果は、背側受容体の信号が TMT の匂い情報への生物学的意味づけに不可欠であることを示している。一方、現状の人工匂いセンサは、要素センサ数が数種から 20 種程度しかなく、嗅覚より低い刺激識別能であるために、理論上、これらの少数の要素センサ群の利用では、嗅覚と同等な刺激種識別や要素情報への生物学的な意味づけを実現することは困難と考えられ、人工の鼻開発には原子レベルの分子識別能を有

す嗅覚受容体の利用が不可欠と判断される。

また、我々が見出した約 70 種のカルボン鏡像異性応答受容体の 80%以上が重複してこれらのフレッシュなハーブ臭の鏡像異性体に応答する性質は、受容体の組合せ符号化に加えて、この類似した匂いの識別を容易にする仕組みが必要と考えられた。類似の匂い識別を容易にする新たな仕組みとして、高感度受容体の信号経路を介した feedforward 抑制系による特徴的匂い要素の自動強調機構を提案している。この新仮説は、鼻付単離全脳試料での嗅覚二次中枢の匂い応答初期に優位となる抑制信号の発現 (*J. Neurophysiol.*, 97:670-9(2007); *Anat. Int. Sci.*, 83:195-206 (2008))によっても支持されている。この feedforward 抑制系アルゴリズムで嗅覚受容体群の出力信号を処理することにより、生物学的意味づけされた匂い要素信号の抽出を行う嗅覚情報センシングが可能となり、人工の鼻が実現されると期待される。我々は、対象の受容体を 1 種だけ機能発現させた培養細胞を作成し、細胞応答を発生させる信号経路の機能分子相互作用特異性を改良することで、応答迅速性が改善され信号強度も以前の約 2 倍に向上した嗅覚受容体機能発現系を開発した (*J. Neurosci. Meth.*, 185:203-20(2010))。この培養細胞系に細胞群毎に異なる嗅覚受容体を発現させて、測定システムの中に配列して要素センサとし、これらの細胞の匂い応答を光学的に計測することで嗅覚受容体群の匂い応答の検出が可能になる。さらに、この嗅覚受容体培養細胞センサと前述の嗅覚情報処理アルゴリズムを組み合わせることで、多様で高度な識別能を有する人工の鼻センサシステムが実現されると考えられた。

2. 研究の目的

匂いは、ヒトや動物の危険の察知や生活上にも大きな影響を与えており、匂いに生物学的な意味付けが行われる嗅覚情報センシングが可能になれば、危険成分や犯人臭を検知する捜査ロボットや体臭の変化から疾病の発症を予告するホームロボット、食材選別や発酵プロセスなどの自動生産管理ロボットなど多様な嗅覚情報関連機器および計測・制御技術の開発が実現されると期待される。本課題では、1000 種の嗅覚受容体から数種選び、培養細胞に機能発現させて細胞センサ化し、匂い要素情報自動強調処理により嗅覚情報を抽出する人工の鼻センサシステムを試作する。また、嗅覚受容体を改変し、対象の危険物成分を検知するセンサ開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞の人工の鼻センサ化

人工の鼻に求められる同時刺激性を満たす小型センサとして、嗅覚受容体とキメラGタンパク質とシャペロン2種とを共発現させ、嗅覚同等の匂い分子特異性の応答性を持たせたHEK293培養細胞を格子状に配置・培養し細胞アレイ化したマイクロウエルを試作する。このマイクロウエルを用いて、3種の嗅覚受容体を各ウエルに1種ずつ機能発現させ、Caイメージングで匂い応答特性を調べる。

(2) 受容体信号のfeedforward抑制系および要素情報形成への寄与の評価

ΔDマウス3匹を用いて単体臭での匂い検知閾値、匂い識別閾値、複合臭での成分臭の匂い検知閾値を調べる追加実験を行い、得られたデータを以前に他のマウス3匹から得られた既存データと比較し、匂い検知、識別へのfeedforward抑制系の寄与を検討する。

(3) マウス高感度受容体導入メダカ作成（メダカ嗅覚情報評価）と応答性改変設計の基盤としてのリガンド結合アミノ酸残基の探索

遺伝子組換え技術を用いてマウス高感度受容体導入メダカ作製に取り組む。また、希望する応答性を有す受容体の設計法を検討するため、HEK293細胞において変異受容体の応答変化、抗体免疫染色による受容体の発現を確認し、リガンド、受容体、Gタンパク質の相互作用部位を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 培養細胞の人工の鼻センサ化

H22~23年度に、1ミリ角内に0.3mmφ9ウエルのアレイ化と1.5ミリ角内に0.5mmφ6ウエルのアレイ化マスクを試作し、HEK293アレイ化細胞で遺伝子導入試薬リポフェクトアミン2000を用いた嗅覚受容体一過性機能発現を試みた。その結果、一過性発現では培養皿で8割の細胞が応答する発現条件でも、マイクロウエルでは、受容体発現が不十分で応答する細胞を得ることが困難であることが明らかとなった。この原因として、微小容量培地中での細胞増殖性の低下、一過性発現試薬の細胞毒性の影響の増大などが推定され、このサイズでは一過性発現法の改善は困難と考えられた。そこで、4種遺伝子を安定発現させたHEK293を作製する方法を検討し、ヒト人工染色体ベクターを利用した作製を試みた。

H23年度の最初の試みでは、約50%の細胞でキメラGタンパク質を介した均一な応答が観察されたが、嗅覚受容体の発現は不十分で、匂い応答も観察されなかった。そこで、コンストラクトを改良し、H24年度に嗅覚受容体機能発現安定細胞株の作製を再度試みた。その結果

、1種の受容体で匂い応答を示す嗅覚受容体安定発現細胞株を得ることができた。嗅覚受容体をヒト人工染色体に挿入するためのエンターベクターおよび嗅覚受容体以外の3種遺伝子安定発現HEK293細胞株の作製に成功した。引き続き、嗅覚受容体の複数種化を進めている。

(2) 受容体信号のfeedforward抑制系および要素情報形成への寄与の評価

ΔDマウス3匹を用いて単体臭での匂い検知閾値、匂い識別閾値、複合臭での成分臭の匂い検知閾値を調べる追加実験を行い、比較に必要なデータを取得した。しかしながら、以前のデータと異なる傾向を示し、新たに、別のΔDマウス3匹で実験データの収集が必要となった。単体臭に関しては、ΔDマウス9匹分のデータ収集を終えた。これらのデータを比較した結果、最近の6匹分のデータは同じ検知閾値・識別閾値を持つ傾向を示し、再現性が確認された。最初の実験では、閾値の確認が不十分だったことが、最近の結果と一致しない理由と考えられる。また、共同研究先で、マウスの嗅覚応答とストレス応答について、TMT単体臭およびTMTとバラの混合臭の比較を行い、2次嗅覚中枢のfeedforward抑制信号の減弱を介して、TMT由来のストレス応答が緩和されることが発見された。これは、複合臭中でもfeedforward抑制系が匂い要素の強調・認識に寄与していることを示す結果と解釈される。さらに、異なる匂いとTMTの混合系では、feedforward抑制系を介さずにストレス応答を緩和させる例も確認され、一部の匂いの認識にはfeedforward抑制系が大きく寄与しない場合の存在も示唆された。

(3) マウス高感度受容体導入メダカ作成（メダカ嗅覚情報評価）と応答性改変設計の基盤としてのリガンド結合アミノ酸残基の探索

まず、遺伝子組換え技術を用いてマウス高感度受容体導入メダカ作製に必要な導入遺伝子をデザインした。このコンストラクトでは、嗅覚受容体遺伝子導入メダカの孵化に至る系統が得られなかった。そこで、神経特異的プロモーター等を利用した限定発現による改善を目指し、候補プロモーターを探索した。その結果、2種の候補が得られ、発現テストまで進んだ。また、リガンド結合部位を構成すると推定されるアミノ酸残基の変異受容体を10種以上作製し、その応答変化を調べたところ、1種で応答の低下が観察され、それ以外の変異体全てで応答が消失し、変異導入部位の重要性が示された。これら全ての変異受容体が膜移行していることも確認さ

れた。さらに、G 蛋白質との相互作用部位検討用の変異体応答データも取得し、現在、解析中である。

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 4 件)

1) 佐藤孝明、匂い・香りのデジタル化は技術革新にどのような変革をもたらすか、Aroma Research、査読無、12 巻、2 号、2011、172-179.

2) Matsukawa M, 他 4 名(Sato T, 5 番目), Rose odor can innately counteract predator odor. Brain Res., 査読有, 1381, 2011, 117-123.

DOI:10.1016/j.brainres.2011.01.053

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 佐藤孝明、浜名 洋、川崎隆史、廣野順三、キメラ Galpha15_olf による HEK293 細胞機能発現系での嗅覚受容体応答動特性とリガンド識別能の改善、第 49 回日本生物物理学会年会、2011.9.18、兵庫県立大姫路書写キャンパス(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 孝明 (SATO TAKAAKI)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・
研究グループ長

研究者番号：20344187

(2) 研究分担者

川崎隆史 (KAWASAKI TAKASHI)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門
主任研究員

研究者番号：60356839

廣野 順三 (HIRONO JUNZO)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・
主任研究員

研究者番号：50357878