

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660288

研究課題名(和文) 嗅覚受容体の応答予測システムの開発と匂いセンサへの応用

研究課題名(英文) Development of a response prediction system of insect odorant receptors and the application for odorant 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の嗅覚受容体を発現させたSf21細胞系統を検出素子として用いて、目的の匂い物質(対象臭)を選択的に検出できる匂いセンサの構築技術を確立する。蛍光プレートリーダーを用いて、昆虫の嗅覚受容体の応答特性を網羅的に取得する技術を確立した。並行して、匂い物質の分子情報から昆虫嗅覚受容体の応答を従来と比較して精度よく予測できるシステムを構築した。その結果、応答特性に基づき選択した嗅覚受容体を対象に、作出した細胞システムをマイクロ流路チップに並列配置することで、匂いを選択的に検出可能な匂いセンサチップが構築できることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, using Sf21 cell lines expressing insect odorant receptors as detection elements, we aim to establish the methodology for developing an odorant sensor that enables us to selectively detect target odorants. We established a technique for cyclopaedically measuring odor-response profiles of insect odorant receptors using fluorescence plate reader. We also constructed a response prediction system of insect odorant receptors with higher accuracy than before. Consequently, by targeting the selected odorant receptors based on the odor-response profiles, it was shown to be able to construct the odorant sensor chip that was able to selectively detect the target odorant by arranging the established cell lines into a micro-channel chip in parallel.

研究分野：神経行動学

キーワード：バイオセンサ 昆虫 嗅覚受容体 応答予測

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活の質の向上や安全・危機管理の観点から、環境中に存在する多様な匂い分子を高感度・高精度にリアルタイムで検出する匂いセンサのニーズが高まっている。これまで水晶振動子や金属酸化物半導体などをセンサ素子とする工学的技術に基づいた匂いセンサが開発され一部実用化されている。しかし、これらの匂いセンサはセンサ素子の素材の制約で検出できる匂い物質が限定される(金属酸化物半導体) S/Nが低い(水晶振動子)といった課題があり、幅広いニーズに対応可能な匂いセンサの創出が望まれている。近年、これらの問題点を解決する革新的な計測系として、自然界の多様な匂い物質をppbレベルの高感度で検出できる生物の嗅覚系が注目されつつある。

生物の中でも昆虫は特に優れた匂い検出系をもっており、その高感度かつリアルタイムな匂い検出は嗅覚受容細胞で発現する嗅覚受容体の機能によることが明らかにされた。昆虫嗅覚受容体は金属酸化物半導体素子と比較してもより広範な構造の匂い物質を検出できる。そのため昆虫嗅覚受容体の機能を人工的に再現したセンサ素子を作ることができれば、既存のセンサの限界を超えた新しいタイプの匂いセンサとして利用できる可能性が高い。この仮定に基づき、代表者は昆虫嗅覚受容体を発現させた培養細胞 Sf21 細胞が高感度(数 10ppb)にリアルタイムで匂い物質を検出するセンサ素子として機能することを示した。また安定発現システムの作出により2か月以上もの間センサ素子として利用できることも示した。

一方で、本センサ素子の検出特性は発現する嗅覚受容体の匂い応答特性に依存するため、センサの実用化には、多数の昆虫の嗅覚受容体の中から対象臭を検出するために最適な応答特性をもつ嗅覚受容体を選択する必要がある。昆虫の嗅覚受容体の応答特性は、ごく少数の物質だけに選択的に反応するものから、様々な構造の物質に幅広く応答するものまで多様なスペクトルをもつことが報告されている。これら受容体を複数組み合わせることで特定の匂い物質を受容体間の活動パターンの組み合わせとして検出できるようになることが想定されるが、最も詳細に解析されているキイロショウジョウバエの嗅覚受容体でも植物や餌の匂い物質約 100 種類に対する応答特性しか明らかにされておらず、匂いセンサの多様なニーズを考慮するとより多様な化学構造の匂い物質に対する応答特性を解析する必要がある。以上の背景を踏まえ、嗅覚受容体の応答特性を高精度かつ網羅的に取得する技術を確立し、それに基づき効率的に対象臭を検出できる受容体を選択し、その嗅覚受容体を発現する細胞をアレイ化した匂いセンサが高精度に対象臭を検出できることを実証することで、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。

## 2. 研究の目的

昆虫嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統をセンサ素子として、目的の匂い物質(対象臭)を検出できる匂いセンサの構築の基礎技術を確立する。具体的には、様々な化学構造を持つ数多くの匂い物質に対する受容体の応答特性を実測し、データベース(DB)化する。この応答特性に基づき匂い物質の物理化学的特徴から機械学習により嗅覚受容体の応答を予測し、実測値および予測値を元に対象臭の検出に最適な受容体を選択する。そして、選択した嗅覚受容体を発現させた培養細胞をアレイ化した匂いセンサチップを用いた応答計測を通して、高感度かつ高精度で対象臭を検出できる匂いセンサ構築の基礎技術を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 嗅覚受容体を発現させた細胞系統の作出と匂い応答特性解析

代表者は、これまでキイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体遺伝子を、補助タンパク質(Olfactory receptor co-receptor; Orco) 遺伝子およびカルシウム感受性蛍光タンパク質(GCaMP3) 遺伝子とともに Sf21 細胞に共導入し、匂い物質に対して蛍光強度変化を示す細胞系統を作出してきた。本研究では、同手法に改良を加え、より大きな蛍光強度変化量を示す GCaMP6s を用いて、Sf21 細胞系統を作出した。キイロショウジョウバエ成虫触角 cDNA から単離した嗅覚受容体遺伝子、および Orco 遺伝子の翻訳領域を Sf21 細胞の発現用ベクター pIB/V5-His (LifeTechnologies 社) にサブクローニングし、挿入した2種類の遺伝子を同時に発現できる発現ベクター pIB-Or-Orco を構築した。並行して、GCaMP6s 遺伝子の翻訳領域を別の発現ベクター pIZ/V5-His (LifeTechnologies 社) にサブクローニングし、pIZ-GCaMP6s を構築した。構築した pIB-Or-Orco および pIZ-GCaMP6s は、Cellfectin (LifeTechnologies 社) を用いて、Sf21 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した Sf21 細胞は、抗生物質(プラストサイジン、ゼオシン)耐性遺伝子の発現を指標にしたスクリーニングにより、Sf21 細胞系統を樹立した。樹立した Sf21 細胞系統は、以下匂い物質に対する匂い応答測定解析に使用した。

匂い物質に対する Sf21 細胞系統の応答は、蛍光顕微鏡および蛍光プレートリーダーを用いて取得した。まず、蛍光顕微鏡下による光学イメージングにより、匂い物質に対する Sf21 細胞系統の蛍光強度変化を観察した。次に、蛍光が観察された Sf21 細胞系統について、アルコール、アセテート、アルデヒド、有機酸、テルペン類を含む、多様な化学構造の匂い物質に対する蛍光強度変化量を蛍光プレートリーダーにより取得した。蛍光強度変

化量 ( $F/F \times 100\%$ ) は蛍光プレートリーダ付属のソフトウェアにより数値化し、リンガー液での蛍光応答を用いて正規化することで嗅覚受容体の応答特性データを取得した。取得した応答特性データは応答予測に利用できるような数値情報をサーバにアップした。

## (2) 嗅覚受容体の応答予測システムの開発

匂い物質を含む化学物質の分子記述子の数値情報から、嗅覚受容体の応答を予測する学習・予測器を構築した。数百万種の化合物の物理化学的特性が集約されている PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した各匂い物質に対する分子情報をもとに、Dragon (Talete 社) によって分子情報を計算した。学習・予測器にはニューラルネットワークを用い、計算した分子情報を入力とし、嗅覚受容体の応答特性を出力とする学習を行った。嗅覚受容体の応答特性は、これまでに応答特性が明らかにされている、108種類の匂い物質に対するキイロショウジョウバエの 24 種類の嗅覚受容体の応答特性データを用いた。構築した学習器は、入力分子情報数を選抜した場合の予測精度の変化を調べ、予測精度向上の条件を検討した。

## (3) 嗅覚受容体発現細胞をアレイ化した匂いセンサチップの構築

選択した嗅覚受容体を発現させた細胞系統を複数種類アレイ化できるマイクロ流路チップを微細加工技術により作製した。これまで代表者らはマイクロ流路チップ上で培養した Sf21 細胞系統から匂い応答が検出できることを確認しているため、これを発展させて、2 種類の細胞系統を培養でき、各細胞に同時に匂い刺激できるマイクロ流路チップを設計・作製した。作製したマイクロ流路チップは GFP 発現細胞を導入することで同時に蛍光観察できることを確認した。その後、対象臭の検出に最適な嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統をマイクロ流路チップに導入し、Sf21 細胞系統を並列配置した匂いセンサチップを作製した。作製した匂いセンサチップに対象臭を導入し応答測定を行うことでセンサ性能を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 嗅覚受容体の応答特性解析

まず、一般臭嗅覚受容体の匂い物質に対する応答を蛍光強度変化量として取得できる Sf21 細胞系統の作出を行った。本研究では、キイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体遺伝子、および Orco 遺伝子の発現ベクター (pIB-OrX-Orco) を新たに改良して構築し、pIZ-GCaMP6s とともに Sf21 細胞に遺伝子導入することで、Sf21 細胞系統を樹立した。蛍光顕微鏡下での光学イメージングにより、導入した嗅覚受容体の応答特性に従って蛍光強度変化を示す Sf21 細胞系統を作出した。

次に、Sf21 細胞系統から様々な匂い物質に対する嗅覚受容体の応答を網羅的に取得する技術の確立を試みた。多くの嗅覚受容体の

応答特性データを網羅的に取得するためには、嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統から複数の匂い物質に対する応答特性を網羅的かつ迅速に取得する技術の確立が必要がある。そこで、96 ウェルプレートから同時に細胞の蛍光応答を取得できる蛍光プレートリーダを用いて、本研究で作出した Sf21 細胞系統から匂い物質に対する蛍光応答を取得する条件を検討した。まず、性フェロモン受容体を発現させた Sf21 細胞系統を用いて、各ウェルに定着させる細胞数、コーティング素材、培養日数、および容量・滴下量について、最適条件を決定した (図 1)。

細胞数	1.0 × 10 <sup>5</sup> 個 / ウェル
プレート底面	Corning Cell BIND Surface
培養日数	24時間
Ringer sol.	80μL
匂い物質滴下量	8μL

図 1 蛍光プレートリーダによる細胞系統の応答特性解析の条件設定

次に、決定した最適条件下で、性フェロモン受容体発現 Sf21 細胞系統のフェロモン成分を含む様々な匂い物質に対する応答測定を実施した。その結果、ボンピカール受容体を発現させた Sf21 細胞系統は試験した 8 種類の他の匂い物質には応答せず、ボンピカールに特異的に蛍光応答が取得できることが分かった (図 2a)。取得した応答特性は、これまでに卵母細胞や昆虫生体で取得された応答特性と一致する。このことから、嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統から、蛍光プレートリーダを用いて嗅覚受容体の応答特性が取得できることが分かった。

次に、キイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体を対象に、蛍光プレートリーダを用いた応答特性の取得を行った。ここでは一般臭嗅覚受容体として、キイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体 Or56a を用いた。前述の最適条件下で複数の匂い物質に対する蛍光応答を取得した結果、対象臭である Geosmin に対して蛍光強度変化を示し、その他試験した 6 種類の匂い物質には蛍光応答を示さなかった。キイロショウジョウバエ生体を用いた機能解析から、Or56a は Geosmin に特異的な嗅覚受容体であることが報告されており、本研究の結果と一致する。現在までに、本研究で確立した応答特性の網羅的取得技術を用いて、作出した Sf21 細胞系統を対象に、約 100 種類の匂い物質に対する応答特性を取得した。現在、応答予測に利用可能な応答特性データを集約した DB を構築している。

以上の結果から、一般臭嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統から、一般臭嗅覚受容

体の様々な匂い物質に対する応答特性を、蛍光強度変化量として網羅的に取得する技術を確立した。

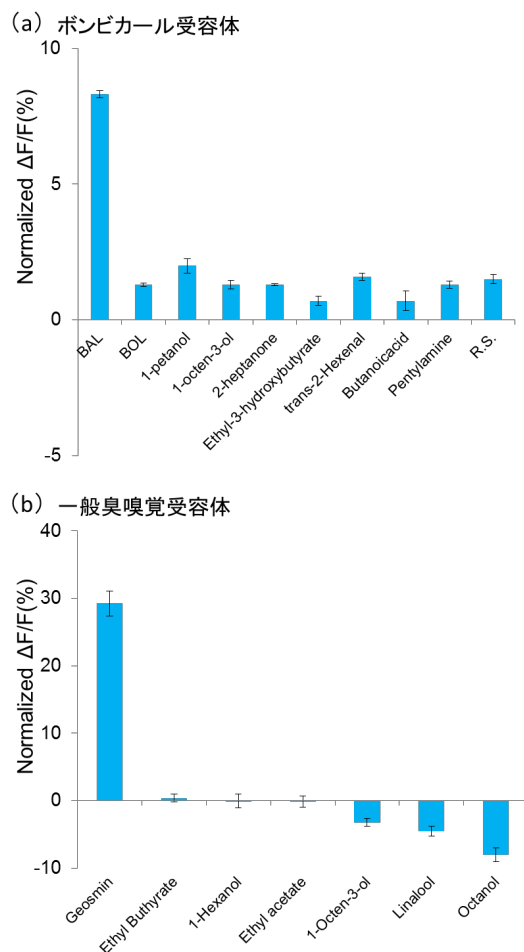


図 2 蛍光プレートリーダーによる嗅覚受容体発現 Sf21 細胞系統の応答特性データ

(a) ボンビカル受容体を発現させた細胞系統の応答特性 BAL ; ボンビカル、BOL ; ボンビコール、R.S. ; リンガー液 (b) 一般臭嗅覚受容体を発現させた細胞系統の応答特性 エラーバー ;  $\pm$  SEM (n=3)

## (2) 嗅覚受容体の応答予測システムの開発

嗅覚受容体をセンサ素子とする匂いセンサを用いて対象臭を検出するためには、背景臭として存在することが想定される環境中の数多くの匂い物質に対する嗅覚受容体の応答を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、昆虫の嗅覚受容体の応答特性データを基に、様々な匂い物質に対する嗅覚受容体の応答を予測できるシステムの構築を試みた。まず、Pubchem に集積されており Dragon で数値情報が取得できる約 5000 種類の分子情報を入力として、キロシヨウジョウバエ嗅覚受容体の応答を出力とする学習・予測器を試作した。試作した学習・予測器を用いて、24 種類の嗅覚受容体の匂い物質に対する応答を予測し実測値との相関係数を算出したところ、受容体によっては最大約 80% の精度

で応答を予測できることが分かった。次に、受容体の応答に強く影響のある分子情報を感度解析に基づき選抜し応答予測を行った結果、24 種類全ての嗅覚受容体の応答について、入力に用いる分子情報を選別した場合に予測精度が向上することが分かった。また、個々の嗅覚受容体について、予測精度を向上させる分子情報の組み合わせが存在することが分かった。対象臭の検出に最適な嗅覚受容体の選択に向けて、現在もなお予測精度の向上の検討および応答予測データの取得を進めている。

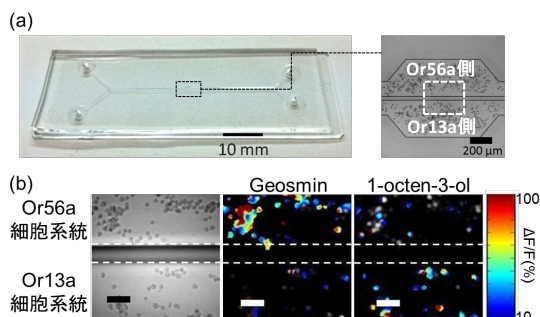
## (3) 嗅覚受容体発現細胞をアレイ化した匂いセンサ

最後に、一般臭を選択的に検出する異なる 2 種類の嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統を並列配置した匂いセンサチップを構築し、匂い物質を蛍光応答のパターンとして選択的に検出できるかどうかを評価した。マイクロ流路チップは、ソフトリソグラフィ技術により、ジメチルポリシロキサン (PDMS) とホウケイ酸ガラスから成り、2 種類の異なる Sf21 細胞系統をそれぞれ独立して並列配置できる流路を設計・試作した (図 3a)。なお、マイクロ流路チップは三澤宣雄博士 (豊橋技術科学大学) にご協力いただき作製した。まず、2 種類の異なる性フェロモン受容体 (ボンビコール受容体、ボンビカル受容体) を発現させた Sf21 細胞系統をマイクロ流路チップ上に並列配置し、受容体が応答するフェロモン成分 (ボンビコール、ボンビカル) で刺激した。その結果、ボンビコール刺激時にはボンビコール受容体発現細胞のみ、ボンビカル刺激時にはボンビカル受容体発現細胞のみから蛍光応答が観察できた。このことから、本匂いセンサチップを用いて Sf21 細胞系統の蛍光応答が取得できることが分かった。

次に、蛍光プレートリーダーによる応答特性の実測値から、特異的に一般臭を検出できる嗅覚受容体として選択した 2 種類の嗅覚受容体をそれぞれ発現させた Sf21 細胞系統を用いて、匂いセンサチップを構築し、一般臭に対する応答を蛍光パターンとして選択的に検出できるかどうかを評価した (図 3b)。ここでは一般臭嗅覚受容体として、Geosmin、1-octen-3-ol を特異的に検出できる Or56a 細胞系統、Or13a 細胞系統を用いた。構築した匂いセンサチップにそれぞれ  $1\mu\text{M}$  の Geosmin と 1-octen-3-ol で刺激した結果、Geosmin 刺激では Or56a 細胞系統のみ、1-octen-3-ol 刺激では Or13a 細胞系統のみの蛍光応答が取得できた。Or56a 細胞と Or13a 細胞はジオスミンに対してそれぞれ  $12.5 \pm 7.8\%$ 、 $-0.5 \pm 2.8\%$ 、1-octen-3-ol に対して  $0.0 \pm 2.6\%$ 、 $28.3 \pm 12.6\%$  の蛍光強度変化を示し、本匂いセンサチップを用いて 2 種類の匂い物質を蛍光パターンとして検出できることが分かった。



以上の結果から、嗅覚受容体を選択することで、一般臭に対し選択的に蛍光応答を示す匂いセンサチップの構築が可能であることを示した。



**図 3 2 種類の異なる嗅覚受容体を発現する Sf21 細胞系統を並列配置した匂いセンサチップの蛍光応答** (a) マイクロ流路チップ (b) Sf21 細胞系統の蛍光応答 スケールバー: 100 $\mu$ m

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

田中亜紀子、光野秀文、櫻井健志、三澤宣雄、中島裕子、神崎亮平、“昆虫の嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞を並列配置した匂いセンサチップの開発”、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015 年 3 月 26-28 日、山形大学(山形)。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Takuma Iwamatsu、Yuko Nakajima、Ryohei Kanzaki、“Development of novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors”、2nd Digital Olfaction Society World Congress, 2014 年 12 月 8-9 日、東京工業大学(神奈川)。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Takuma Iwamatsu、Shigehiro Namiki、Ryohei Kanzaki、“Development and performance evaluation of a novel cell-based odorant sensor element based on insect odorant receptors”、The 11th International Congress of Neuroethology (2014 ICN/JSCPB) 2014 年 7 月 28 日-8 月 1 日、札幌コンベンションセンター(札幌)。

Takuma Iwamatsu、Hidefumi Mitsuno、Tomoki Kazawa、Takeshi Sakurai、Ryohei Kanzaki、“A high-throughput functional assay system of insect odorant receptors expressed in Sf21 cells”、The 11th International Congress of Neuroethology (2014 ICN/JSCPB) 2014 年 7 月 28 日-8 月 1 日、札幌コンベンシ

ョンセンター(札幌)。

光野秀文、櫻井健志、神崎亮平、“昆虫に学ぶ匂いバイオセンサの開発”、日本学会会議公開シンポジウム、2014 年 7 月 26 日、東京、招待講演。

光野秀文、櫻井健志、岩松琢磨、田中亜紀子、並木重宏、神崎亮平、“昆虫の嗅覚受容体を利用した細胞利用型匂いセンサの性能評価”、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 30 日、明治大学(神奈川) 招待講演。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Shigehiro Namiki、Hiroyuki Mitsuhashi、Ryohei Kanzaki、“Development of a novel cell-based odorant sensor based on insect odorant receptors”、International Chemical Ecology Conference 2013、2013 年 8 月 22 日、Melbourne (Australia) 招待講演。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Shigehiro Namiki、Ryohei Kanzaki、“Performance evaluation of Sf21 cell lines expressing insect odorant receptors as odorant sensor elements”、Bio4Apps 2013、2013 年 10 月 31 日、東京医科歯科大学(東京)。

光野秀文、櫻井健志、並木重宏、神崎亮平、“匂いセンサ素子としての昆虫嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統の長期匂い検出性能の評価”、日本味と匂学会第 47 回大会、2013 年 9 月 5-7 日、仙台市市民会館(仙台)。

〔図書〕(計 4 件)

光野秀文、櫻井健志、神崎亮平、“第 18 章 昆虫に学ぶ匂いバイオセンサ”、昆虫科学読本-虫の目で見た驚きの世界-(日本昆虫科学連合編、東海大学出版部、2015) pp. 259-277 (分担執筆)。

光野秀文、櫻井健志、岩松琢磨、神崎亮平、“第 3 章 第 3 節 培養細胞の蛍光計測を応用した匂いセンサ”、感覚デバイス開発(株式会社エヌ・ティー・エス、2014) pp. 174-181 (分担執筆)。

光野秀文、三澤宣雄、神崎亮平、“第 2 章 匂いバイオセンサへの昆虫嗅覚受容体の応用”、バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発(株式会社技術情報協会、2014)。

神崎亮平、光野秀文、“昆虫に学ぶ匂いセンサの開発”、応用物理(公益社団法人応用物理学会、2014) 83(1): pp.38-42。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 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 : 40221907

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

櫻井健志 (SAKURAI、Takeshi )  
東京大学・先端科学技術研究センター・特任  
講師  
研究者番号 : 20506761

光野秀文 (MITSUNO、Hidefumi )  
東京大学・先端科学技術研究センター・特任  
助教  
研究者番号 : 60511855