

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21068

研究課題名(和文) 全自動1細胞解析単離装置による大規模嗅覚受容体レパトア解析

研究課題名(英文) High-throughput analysis of olfactory receptor repertoire by using the automated single-cell analysis and isolation system

研究代表者

良元 伸男 (Yoshimoto, Nobuo)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：80467612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞整列化を可能にするマイクロチャンバーアレイチップを用いて20万細胞からなる嗅上皮細胞群の細胞アレイを形成させた。この細胞アレイチップを我々の開発する灌流系搭載型の全自動1細胞解析単離装置に設置し、特定の匂い分子の刺激に対して一過的に反応する嗅覚細胞を大規模かつ経時的に解析して特定し、目的とする嗅覚細胞を1細胞ずつ単離した。単離した個々の1細胞を遺伝子解析に供し、匂い分子特異的に結合する嗅覚受容体群の組み合わせを同定した。

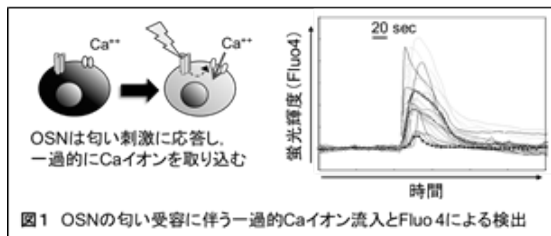
研究成果の概要(英文)：A cell array consisting of 200,000 olfactory epithelial cells was formed on a microchamber array chip enabling cell alignment. After installing this cell array chip in the automated single-cell analysis and isolation system equipped with a perfusion system, the cells were subjected to time-lapse cytometry. Olfactory cells which transiently responded to stimulation of specific odor molecules were identified, and then the desired olfactory cells were isolated at single cell level. Each isolated single cell was subjected to genetic analysis to identify a combination of olfactory receptor groups that bind odor molecules specifically.

研究分野：生物学

キーワード：1細胞解析 嗅覚細胞 嗅覚受容体 匂い分子 嗅覚受容体レパトア バイオセンサー 全自動1細胞解析単離装置

1. 研究開始当初の背景

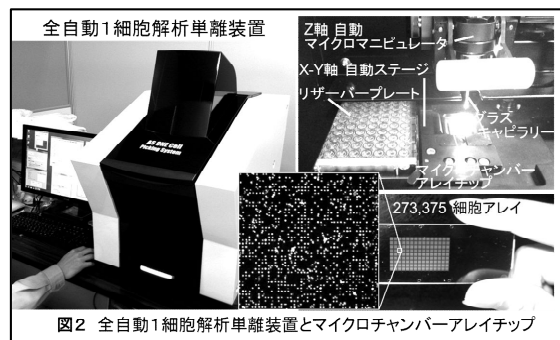
哺乳動物の嗅上皮組織には嗅細胞（嗅覚神経細胞； olfactory sensory neuron, OSN）が存在し、個々の OSN はそれぞれ1種類の七回膜貫通型受容体（G protein-coupled receptor, GPCR）である嗅覚受容体（olfactory receptor, OR）により40万種以上の匂いを知覚できる。一方、OR 遺伝子ファミリーは哺乳動物ゲノムに広く見られ、ヒトで400種類程、マウスで1,000種類程のORが存在するが（Niimura & Nei, PNAS 100, 12235-40 (2003); Nei et al., Nat. Rev. Genet. 9, 951-63 (2008)）、匂いの種類に比べてその数は圧倒的に少なく、近年まで匂いの識別機構の詳細は不明であった。1999年、Malnicらによって、特定の匂いに対して強い親和性をもつORが存在する一方、その匂いに弱く親和性を示すOR群と協調的に働いてレパトア形成し、膨大な匂いの識別を可能にすると報告され（Malnic et al., Cell 96, 713-23 (1999)）、匂い感受の研究は特定の匂いに対する包括的なOR受容体のスクリーニングとレパトア解析へと移行している。最近では、特定の匂いに対するレパトア解析では大きく2つの方法がとられる。1つは、マウス等からOSNを単離し、poly-L-lysine等の細胞接着因子で培養皿をコートして細胞を基板へ固着させる。顕微鏡観察下、灌流系を設置することにより、匂いの受容に伴って生じるOSNのCa²⁺イオン取り込み量をFluo4等の蛍光カルシウムインジケータにより継続的に定量化し（図1）、目的細胞を手動で



ガラスキャピラリーを用いて1細胞取得し、OR 遺伝子特異的な1細胞 RT-PCR 法により目的遺伝子を取得する方法である。もう1つは、ここ十数年来の研究からOR 遺伝子ライブラリーは既に世に出回っており、これを用いて培養細胞に異所的に発現させ、特定の匂いに対するレポーターアッセイ系を構築する方法である（Krautwurst et al., Cell 95, 917-26 (1998); Touhara et al., PNAS 96, 4040-5, (1999); Wetzal et al., J. Neurosci. 19, 7426-33 (1999)）。前者（OSN 単離法）では、個々の細胞が1種類のORを発現する性質から、細胞そのものが元来ライブラリー化されてはいるが、1試行あたり精々50~100細胞のアッセイに留まること、また灌流中に目的細胞が視野外へ流れてしまったり、さらに目的細胞を1細胞ずつ手動で取得するのに多大な労力を必要とするといった問題がある。一方、後者（培養細胞発現系）では、接着細胞を用いれば細胞を安定的に観察

できるが、遺伝子導入効率の問題、またOR自体が機能的に異所的発現しにくいといった問題があることから、シャペロンタンパク質やOSN由来 G_{olf} タンパク質と培養細胞由来 G タンパク質のキメラタンパク質の共発現が必要となり（Zhuang & Matsunami, J. Biol. Chem. 282, 15284-93 (2007)）、ハイスループットに多種の匂い刺激に対するレパトア解析を簡便に実行するのは現在のところ困難なままであった。

最近、灌流系を搭載した密閉系マイクロウェルアレイを用い、OSNを該ウェルへトラップして視野外への流出を防ぎ、大規模ORレパトア解析を成功させた例が報告された（Figuroa et al., Lab Chip 10, 1120-7 (2010)）。本法は密閉系であったため特定の匂いに対するORスクリーニングに用いることはできなかったが、効果的に匂い刺激に対するシグナル伝達を網羅的に解析した革新的な例であった。一方、我々の研究グループは独自にS/N比を飛躍的に改善する「マイクロチャンバーアレイチップ」（直径10μm, 256,000個；直径30μm, 31,360個, 84,640個, および30μm 基盤目状273,375個）と、最大3種類の蛍光と細胞形態を指標として所望の細胞を1細胞ずつマイルドにキャピラリーで吸引回収する装置とを組み合わせ、目的細胞を高感度・高精度・高速で自動回収する「全自動1細胞解析単離装置」（図2）を世界に先駆けて開発していた（Yoshimoto et al., Sci. Rep. 3, 1191 (2013)）。



本装置は存在比0.001%以下の目的細胞でも感度よく検出でき（Yoshimoto et al., Sci. Rep. 4, 4242 (2014)）、高効率な1細胞高速単離と目的細胞の非侵襲的な培養を達成した（Yoshimoto & Kuroda, J. Biosci. Bioeng. 117, 394-400 (2014)）。本装置のスペックは次ページ図3に示した通り、細胞アレイの蛍光輝度を培養しながら解析し、横軸に輝度、縦軸に細胞数で表したヒストグラムを提示する。候補の選択をヒストグラムを基に行うと（図3）、選択された候補の確認が行える（）。候補細胞は15秒に1細胞の速さでTOPの細胞からリザーバーウェルへ自動で回収され、回収後には細胞アレイの位置・輝度・回収ウェルを全て関連付けたリストが提示され（）、回収細胞の確認も蛍光と

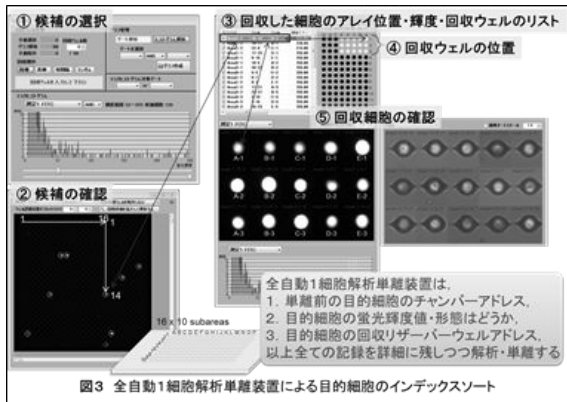


図3 全自動1細胞解析単離装置による目的細胞のインデックスソート

透過光の両方からできる()。このように全自動1細胞解析単離装置は、極めてマイルドな環境下でインデックスソート可能な装置として既に商用機化されている。前述 Figueroa らが報告した灌流系搭載型密閉系マイクロウェルアレイでは、キャピラリーが細胞へアクセスする余地はなかったが、本装置は灌流系さえ搭載すれば、OSNアレイ解析から単離までを全自動で行うことが可能と見た次第である。

2. 研究の目的

現在のところ、1) 灌流系の設置(図4)、2) タイムラプス解析ソフトの導入(図5)、2) 1試行あたり約5,500のOSN集団からモデル匂いに対して応答を示すOSNの単離およびOR同定予備実験は既に達成されており、本研究では1回で解析できるOSN集団規模を約50,000細胞を目標に、新たな匂いに対するハイスループットORレパトア解析技術を構築する。

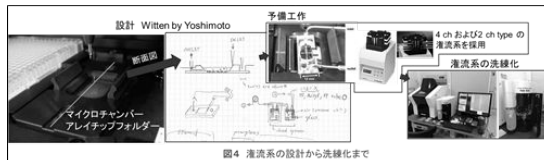


図4 灌流系の設計から洗練化まで

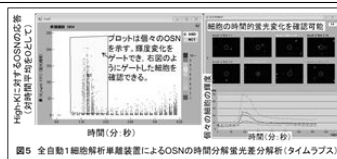


図5 全自動1細胞解析単離装置によるOSNの時間分解蛍光差分解析(タイムラプス)

1細胞解析では世界的に見てFACSが主流であるが、匂い応答は30~100秒間の一過的な反応であり、また短くとも5分間目的細胞を観察し続ける必要があるため、FACSでは本解析は不可能である。我々の開発する全自動1細胞解析単離装置は、既に存在するタイムラプス解析・アレイ・自動マイクロマニピュレータ等の要素技術を合体させ、「レアな細胞の迅速かつ高精度の回収」を目的として、新しい技術を顕在化することができた。生物学的にも、犬が人の尿や呼気からその人の健康状態を判別可能という通説や(肺癌患者の呼気や尿には癌特異的代謝化合物が含まれる)、また空港では麻薬探知犬が活躍していたことから、匂いのセンシング機構解明は

新たなバイオセンサー技術開発のきっかけになるかも知れない。しかし、殆どの匂い分子はオーファンリガンドであり、ORレパトアについては殆ど明らかにされておらず、本研究は、癌の早期発見や薬物高感度検知のための技術開発に繋がる可能性があり、基礎的な分子細胞生物学を踏襲しつつ、社会的にも有用性が極めて高いと考える。

3. 研究の方法

特定の匂い分子に反応するOSNを1細胞単離するにあたり、まずOSNに最適なマイクロチャンバーを選抜した。マウスから嗅上皮細胞群を採取し、リンガー溶液中に粗細胞サンプルを懸濁した後、細胞を直径10μmのマイクロチャンバーアレイチップ上に播種したところ、OSNが効率よく1つのチャンバーに1細胞ずつ導入されていた。次に、本マイクロチャンバーに、予めFluo-4-AM(Ex495/Em518)処理した嗅上皮由来細胞群を導入し、灌流装置により各濃度の匂い分子(2-pentanone, pyridine, 2-butanone)を送液してOSNを刺激し、全自動1細胞解析単離装置によるタイムラプス解析を行った。これらの匂い分子は肺癌患者の尿中に含まれる揮発性の化合物として知られている。匂いに反応したOSNを1細胞単離し、OR遺伝子に共通のDRY motifをコードする第3と第7膜貫通領域特異的遺伝子配列からデザインしたプライマーを用い、1細胞RT-PCRに供してOR遺伝子断片を単離して塩基配列を決定した(図6)。

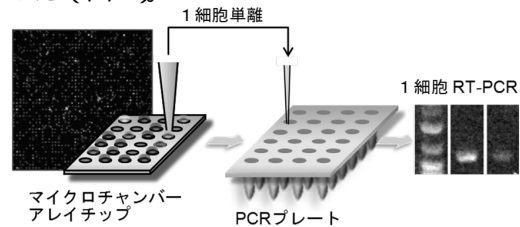


図6 Single-cell RT-PCRによるOR遺伝子の取得

匂い刺激に反応した陽性細胞は自動でPCRプレートに1細胞ずつ吐出され、これを逆転写PCRに供してDNAフラグメントを得た後、シーケンスによりORの遺伝子配列を特定する。

同定されたOR遺伝子は別途クローニングし、ヒト胎児腎臓由来293細胞に異所的に発現させ、ORの再構成実験を行った。冒頭でも述べた通り、ORは異所的に発現させても機能しないことが多いため、同定したORは、Golf, Receptor-transporting protein 1 short(RTP1S; ORの異所発現を促すシャペロンタンパク質)と共発現させた。また、より簡便に同定したORと匂い分子との反応性を評価するためにcAMPにより直接活性化されて発光するレポーター系(cAMP-sensing luciferase-based reporter system¹³)を採用した。

4. 研究成果

以上の結果、各匂い分子において既報と同じORの同定に成功し、異所的発現系でも発

光反応が確認された。さらに nonenal (体臭のもと)においては、弱い反応ながらも新規 OR レパトアの発見に成功し、我々の開発した系は匂い分子と OR 間の弱い反応でも高感度に検出できると考えられた。

Screening of OR for grapefruit, Vanillin, pepper, nonenal

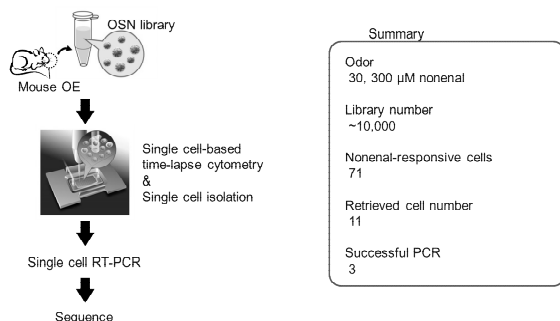


図7 体臭分子の検出、nonenalに反応する嗅覚受容体のスクリーニング概要とスコア

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13件)

Nobuo Yoshimoto, Shun'ichi Kuroda
High-Throughput Analysis of Mammalian Receptor Tyrosine Kinase Activation in Yeast Cells
Methods Mol Biol(査読有)1487(2017)35-52
doi: 10.1007/978-1-4939-6424-6_3

Nobuo Yoshimoto, Yuko Ikeda, Kenji Tatematsu, Masumi Iijima, Tadashi Nakai, Toshihide Okajima, Katsuyuki Tanizawa, Shun'ichi Kuroda
Cytokine-dependent activation of JAK-STAT pathway in *Saccharomyces cerevisiae*
Biotechnology and Bioengineering(査読有)113(8)(2016)1796-804
doi: 10.1002/bit.25948

Msato Suzuki, Nobuo Yoshimoto, Ken Shimono, Shun'ichi
Deciphering the Receptor Repertoire Encoding Specific Odorants by Time-Lapse Single-Cell Array Cytometry
Scientific Reports(査読有)6(2016)19934
doi: 10.1038/srep19934

[学会発表](計7件)

良元 伸男、黒田 俊一、細胞表層 FIA とイムノチャンバーを用いる 1 細胞育種法の開発、第 68 回日本生物工学会大会、2016 年 9 月 28 日～30 日、富山県富山市

Nobuo Yoshimoto, Masato Suzuki, Akiko Kida, Ken Shimono, Shun'ichi Kuroda
Decipherment of olfactory receptor repertoire by using an automated single-cell analysis and isolation system

The 20th ISIR International Symposium
2016 年 12 月 12 日～13 日、大阪府大阪市

Nobuo Yoshimoto

Decipherment of olfactory receptor repertoire by using an automated single-cell analysis and isolation system equipped with real-time calcium imaging device

Pacificchem 2015、2015 年 12 月 15 日～20 日、Honolulu (USA)

良元 伸男、木田 晶子、黒田 俊一、全自動 1 細胞解析単離装置を用いる 1 細胞育種とその応用解析、第 67 回日本生物工学会大会、2015 年 10 月 26 日～28 日、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

良元 伸男、全自動 1 細胞解析単離装置による 1 細胞育種と様々な応用成果、2015 年度三賞受賞者合同発表会 in BioJapan2015(招待講演)、2015 年 10 月 14 日、パシフィック横浜アネックスホール(神奈川県横浜市)

良元 伸男、木田 晶子、黒田 俊一、全自動 1 細胞解析単離装置を用いる優良細胞の 1 細胞育種、第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAACT2015)、2015 年 7 月 9 日～10 日、東北大学片平さくらホール(宮城県仙台市)

木田 晶子、良元 伸男、黒田 俊一、ヒト化抗体高分泌 CHO 細胞の 1 細胞スクリーニング法の開発、第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会 (JAACT2015)、2015 年 7 月 9 日～10 日、東北大学片平さくらホール(宮城県仙台市)

[図書](計3件)

良元 伸男、黒田 俊一、フレグランスジャーナル、AROMA RESEARCH No.67「特定の匂い分子に反応する嗅覚受容体群の網羅的取得法」、2016 年、6 ページ

良元 伸男、黒田 俊一、バイオインダストリー協会、バイオサイエンスとインダストリー「【解説】1 細胞育種を実現する全自動 1 細胞解析単離装置の開発」、2016 年、4 ページ

良元 伸男、黒田 俊一、シーエムシー出版、ファインケミカルシリーズ抗体医薬における細胞構築・培養・ダウンストリームのすべて「第 5 章 1 細胞育種を実現する全自動 1 細胞解析単離装置の開発」、2016 年、11 ページ

[その他]

ホームページ等

www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/index

.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

良元 伸男 (Yoshimoto, Nobuo)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：80467612