

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04226

研究課題名(和文) 嗅覚器の細胞外構成成分を利用した、高感度生物模倣型匂いセンサーの基盤技術創出

研究課題名(英文) Development of core manufacturing technology for the ultra-sensitive biomimetic odorant sensor using extracellular components in the olfactory organ

研究代表者

佐藤 幸治 (Sato, Koji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・特任准教授)

研究者番号：20444101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：最も優れた化学センサーである嗅覚器の超感受性を実現する分子機構を解明し、その再構成によって超高感度な匂いセンサーを実現するために、嗅覚受容体の感度に関わる細胞外物質の探索、遺伝子再構成系を利用した気体状匂い物質検出装置の開発、および電気化学的な揮発性有機化合物の測定法開発を行った。その結果、匂い物質に対する感度を増大させるが、匂いとしては受容されない不揮発性物質の応答は増強しない物質を見出した。この物質を機能解析するために、一細胞レベルで気相匂い刺激に対する応答を測定する装置開発に成功した。また電気化学的手法で、溶液中の匂い物質を高速に検出する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、イヌなどの様々な動物の嗅覚を用いた病気診断や環境測定の社会的ニーズが急速に増大している。しかし現場では生きて動物が必要となり、普及の足かせになっている。嗅覚の優れたしくみを解析し、それを人工的に再現することは、このような社会的ニーズに応える重要研究目標である。本研究により嗅覚に関わる分子機構の一端が明らかにされたとともに、人工的なセンサー開発に向けた重要基盤要素である、人工的な細胞に気体状匂い刺激を検知させる装置開発が加速することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although dogs have remarkable olfactory acuity, their molecular mechanism, which realize the ultra-sensitivity to odorants, have been still unknown. We investigated the extracellular components, which affect on the olfactory sensitivity in the olfactory organ, and developed the vapor odorant detection system using the heterologous gene expression system and the method for electrochemical measurements of aqueous odorants. Functional olfactory receptor gene expression revealed the extracellular component, which sensitize the olfactory response, but not the response to non-volatile molecules. To analyze the molecular mechanism of this sensitization, we developed the vapor odorant stimulation and the response recording system at the single-cell level. We also developed the electrochemical method for the rapid detection of aqueous odorants.

研究分野：感覚生理学

キーワード：匂いセンサー 嗅覚 生体機能利用 電気化学 嗅覚受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外界の化学物質を認識する嗅覚器の識別能力は、化学センサーの中でもっとも優れていると言われている。例えばイヌの鼻の感度は人間のおよそ 100 万倍であり、オスのカイコガではメスの放出するわずかな数十分子のフェロモン分子を検出できるという。嗅覚に関わる遺伝子は既にそのほとんどが明らかにされており、その主要な分子機構も解明されている。近年、微小な機械装置に生命機能を再現する organ on the chip 技術が注目を集めており、嗅覚器の分子機構を利用した高感度センサーの開発も盛んに行われるようになった。しかし、現在の分子生物学的手法と計測技術を駆使しても、嗅覚に関わる分子機構を再構成して、超高感度な匂い検出系を構築することができていない。その大きな原因としてこれまでは、イヌの高感受性は人間のおよそ 1000 倍の数にもなる嗅神経細胞を持つことで実現されている、といった量的原因が主に考えられてきた。しかしそれでは、小さな昆虫ではたらく仕組みが説明できない。一方でここ数年、鼻粘膜組織のプロテオーム解析や匂い選択性に関する報告により、これまで未解明であった、匂い認識における鼻粘液の役割が注目されるようになった。これらのことは、鼻粘液(いわゆる鼻水)に匂いの感受性や選択性に関与する機構が存在することを示唆している。ヒトにおいても疾病により鼻粘液の分泌が変化すると、匂いの認識が変化することが経験的に知られている。

嗅覚器では、鼻粘液に覆われた嗅神経細胞に発現する匂い受容体に匂い物質が結合することによって、匂いが知覚される。研究代表者は先行研究により、遺伝子から再構成した匂い受容体の、気体状匂い物質に対する反応測定に成功し、鼻の表面を覆う鼻粘液が匂い認識に関わることを証明した。この研究から、嗅覚器表面の匂い受容体を取り巻く、マイクロスケールで構成される気液界面での物質輸送の統合的な理解とその機能的な再現が、嗅覚器の高機能性を実現する分子基盤の解明に必須であることが示された。つまり、匂い受容体周囲の細胞外物質の機能を明らかにすることが、バイオメトリックな匂いセンシングに関する基礎研究および応用展開へ向けた新たな課題として浮かび上がった。

2. 研究の目的

本研究ではまず、気体状匂い分子に対する新規な匂い応答測定法を開発し、それを利用することで、匂い認識における鼻粘液構成成分の役割を明らかにすることを目的とした。そして得られた知見をもとに、遺伝子再構成系と MEMS・マイクロ流体技術の技術融合で鼻粘液の機能を再構成し、バイオメトリックな高感度匂いセンサーを開発することを目指した。

3. 研究の方法

本研究は、遺伝子再構成実験、分析化学的手法、MEMS 技術を組み合わせた統合的アプローチにより、気液界面を介した物質移動と匂い応答を計測し、センサー開発へ応用展開することを目指した。

まず匂い応答へ影響を与える細胞外構成成分のスクリーニングとその効果の検証、および気相匂い物質を検出するためのセンサー素子として、一過的に昆虫嗅覚受容体を発現した哺乳類培養細胞を作製した。この細胞の匂い物質に対する応答特性を明らかにするために、リガンドスクリーニングや動態解析を行ない、センサー素子としての有用性を検討した。鼻粘液構成成分の匂い応答への作用機序として、気体状匂い物質の粘液層への移動の調節が提唱されていたが、これまでに生化学レベルでも生体レベルでも全く実証されていなかった。そこでまず、匂い受容体発現細胞を各細胞外物質で処理し、処理前後で匂い応答を比較して、鼻粘液構成成分の匂い応答への効果を検討した。また緩衝液中でなければ生存できない培養細胞への生体と同様な気相匂い刺激を実現するために、マイクロスケールでの細胞表面液層の制御を試みた。具体的にはゲル化した緩衝液のブロックを培養細胞表面に配置し、乾燥から細胞を保護するとともに、シリンジポンプで表面液層の液体量を制御した。匂い刺激は密閉溶液中で蒸散し、気液平衡に達した匂い溶液のヘッドスペースを、窒素ガスをキャリアとして細胞表面の液層に提示した。匂い応答は匂い刺激で生じる細胞内カルシウム濃度変化を、カルシウムイメージング法により測定した。

上記の細胞を用いたバイオメトリックな気相から液相への匂い物質移動計測に加え、電気化学計測により、無細胞的な計測法の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) カルシウムイメージング法を用いた、一細胞レベルでの気相匂い応答測定装置の開発

昆虫嗅覚受容体を発現した培養細胞表面に、保湿性を維持するためのゲル化した緩衝液を配置することで、細胞表面の緩衝液をマイクロメーターレベルまで減少させることに成功した。その結果、細胞へ生体の嗅覚器と同様な気相匂い刺激が可能となり、カルシウムイメージング法により一細胞レベルで匂い応答が測定可能となった(図 1)。

本装置では細胞内カルシウム濃度を蛍光顕微鏡で計測しながら、細胞表面に密閉容器中で蒸散した気体状匂い物質を提示し、その際に生じる細胞内カルシウム濃度上昇を匂い応答の指標とした。本装置を用い、最長 1 時間にわたり、気相匂い応答が測定可能であった。またガラス電極で気液界面を走査することで、匂い応答とともに、細胞表面の液層厚を計測した。様々な液厚下での匂い応答を波形解析したところ、液厚が 20 μm 増加するごとに応答の大きさがおよそ半分減少し、マイクロスケールの液厚の変化が匂いのセンシングに著しく影響することが明らかとなった。

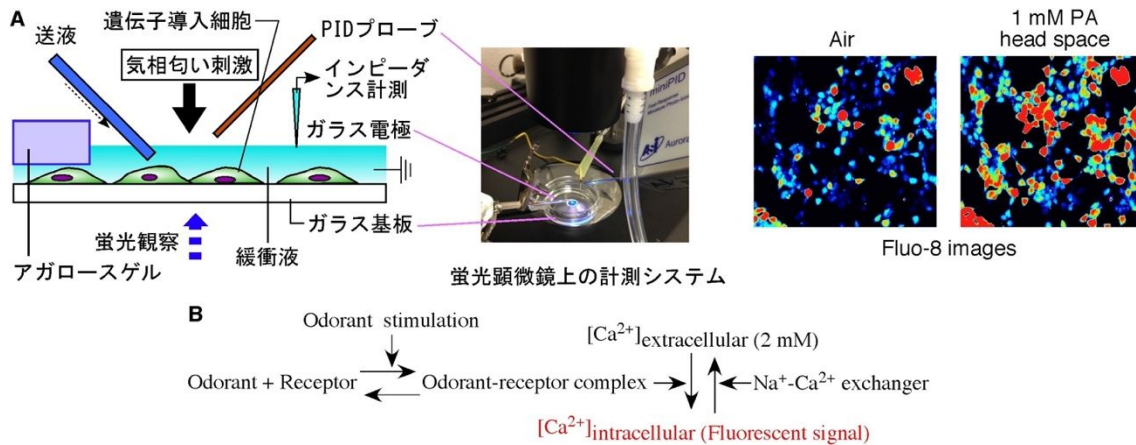


図1 . カルシウムイメージング法による、昆虫嗅覚受容体発現細胞の気相匂い刺激に対する一細胞応答計測。

A: 概念図(左)、計測システム(中央)と、Fluo-8 蛍光シグナルで測定したショウジョウバエ嗅覚受容体 Or47a と Orco を発現した HEK-293T 細胞の、1 mM PA 溶液のヘッドスペース 1 秒間匂い刺激による細胞内カルシウム濃度上昇(赤色)(右)。B: 本システムで用いた、嗅覚受容体による細胞内カルシウム濃度上昇のモデル図。

本装置は嗅覚受容体に限らず、匂い物質との相互作用が報告されている TRP チャンネルにも適用できる。そこで嗅覚器の三叉神経に発現し、植物由来の様々な匂い物質により活性化される TRPV1 チャンネルの応答を測定したところ、このチャンネルは気相匂い刺激により活性化されるだけでなく、抑制も生じることがわかった。

(2) 化学感覚受容体の感度に影響する細胞外物質の探索と機能解析

遺伝子再構成系を用い、化学感覚受容体の応答に影響を与える物質をスクリーニングした。その結果、匂い物質に対する応答を増強させる物質を見出した。図 1 B のモデルを元に、匂い応答のシミュレーションとキネティクス解析を行なったところ、この物質は匂い物質と受容体の結合と解離に影響する可能性が示唆された。また匂い物質には影響しないが、味物質に影響する物質も新たに見出した。

(3) 不揮発性物質を匂いとして受容するキンギョ嗅神経細胞の、匂い物質との対応づけとシグナル伝達解析

金属充填ガラス微小電極を用いて、網羅的な匂い物質に対するキンギョ嗅神経細胞の応答を一細胞レベルで解析したところ、不揮発性の匂いに対する高感受性が一細胞レベルでも認められた。その閾値は遺伝子再構成系で再現される感度よりも低く、水溶性の匂い物質でも陸棲動物と同様な生体と遺伝子再構成系との違いが認められた。またキンギョの嗅神経細胞では匂い刺激はアデニル酸シクラーゼ、またはホスホライペース C の活性化を起こし、その指標としてフォルスコリンまたはイミプラミンが薬理的なマーカーとして利用できることを明らかにした。

(4) 幹細胞から化学感覚器を再構築する試み

嗅覚とともに代表的な化学感覚器である味覚に関し、生体から単離した味覚器の幹細胞を培養・分化させ、生体の味覚器を構成する細胞を立体組織化したオルガノイドを作製した。このオルガノイドにカルシウム感受性色素をロードし、微小流路を用いて様々な味物質で刺激したところ、味物質に対する応答が確認できた。したがって作製したオルガノイドには、生体と同様な機能を持った味覚の感受性細胞が含まれ、このオルガノイド技術によって化学感覚器の生体機能が再構築できる可能性が示された。

(5) 匂い物質の電気化学的計測法の開発

液層内での匂い物質の移動をより詳細に検討するために、電気化学的手法による、拡散係数の評価を行った。複数の匂い分子に関しカーボン電極を含む 3 電極系によりサイクリックボルタンメトリーを試みたが、分子の種類により酸化還元反応後電極への吸着により応答がとれないものがあった。そこで電極材料をカーボン以外の白金電極を用い、ボルタンメトリーではなくクーロメトリーにより酸化還元応答を取得することができた。得られた電流からそれぞれの匂い分子に関し、水溶液中での拡散係数を見積もることができた。また匂い分子の一つであるバニリンに関しては、電気化学的な拡散係数と磁場勾配 NMR で測定した自己拡散係数の比較も合わせて行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 佐藤 幸治 | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 嗅覚の分子基盤とその生体外での再構築 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 アグリバイオ | 6. 最初と最後の頁 62-64 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Sato Koji, Sorensen Peter W | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 The Chemical Sensitivity and Electrical Activity of Individual Olfactory Sensory Neurons to a Range of Sex Pheromones and Food Odors in the Goldfish | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Senses | 6. 最初と最後の頁 249-260 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/chemse/bjy016 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 幸治 |
| 2. 発表標題 気液界面を構成するマイクロスケール液相中での匂い物質移動計測 |
| 3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ken Iwatsuki, Hiroo Imai, Yuzo Ninomiya, Peihua Jiang, Koji Sato, Takumi Yamane, and Yuichi Oishi |
| 2. 発表標題 Generation of a taste organoid from non-human primate |
| 3. 学会等名 XXVIIIth Annual Meeting of the European Chemoreception Research Organization (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Sato |
| 2. 発表標題 Microscale liquid layer on the olfactory receptors affects on the vapor chemical detection |
| 3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 佐藤 幸治、ピーター ソレンセン |
| 2. 発表標題 キンギョにおける2種類のアミノ酸感受性嗅神経細胞 |
| 3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森永 敏史、伊原 さよ子、弓田 智裕、佐藤 幸治、新村 芳人、東原 和成 |
| 2. 発表標題 カイコ味覚受容体BmGr9のチャネル機能の分子基盤の解析 |
| 3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Koji Sato, Peter W. Sorensen |
| 2. 発表標題 Tuning properties of goldfish olfactory receptor neurons to food odors and sex pheromones |
| 3. 学会等名 The 48th NIPS International Symposium - Neural circuitry and plasticity underlying brain function (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 宮澤 直美、佐藤 幸治、川野 竜司 |
| 2. 発表標題 電気化学測定法による匂い物質の検出 |
| 3. 学会等名 第3回サイボウニクス研究会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 幸治 |
| 2. 発表標題 液相を介した気相匂い物質の検出には、マイクロスケールの液厚の変化が影響する |
| 3. 学会等名 第9回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 佐藤 幸治 |
| 2. 発表標題 トップダウンとボトムアップで迫る、嗅覚の分子機構 |
| 3. 学会等名 日本比較生理生化学会第41回東京大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐藤 幸治 |
| 2. 発表標題 液相を介した気相匂い物質の検出には、マイクロスケールの液厚の変化が影響する |
| 3. 学会等名 日本味と匂学会第53回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Morinaga S., Nagata K., Ihara S., Niimura Y., Sato K., and Touhara K |
| 2. 発表標題 A structural model for the channel pore and ligand binding sites of an insect gustatory receptor. |
| 3. 学会等名 European Symposium for Insect Taste and Olfaction, XVI |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中安 亜希、中嶋 佑里、三宅 佐和、中嶋 ちえみ、佐藤 幸治、今井 啓雄、山根 拓実、大石 祐一、岩槻 健 |
| 2. 発表標題 味蕾オルガノイドを用いた味覚センサー構築の試み |
| 3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 佐藤 幸治 | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 技術情報協会 | 5. 総ページ数 - |
| 3. 書名 においのセンシング、分析技術と可視化 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>自然科学研究機構生命創成探究センター 生命システム構築研究グループ http://www.nips.ac.jp/bs/index.html</p> <p>プレスリリース：エサの匂いやフェロモンに応答するキンギョの嗅神経細胞を同定 http://www.nips.ac.jp/release/2018/04/_41.html</p> <p>インタビュー：朝日新聞 「先端人」 http://www.asahi.com/area/aichi/articles/MTW20191023241370001.html</p> |
|---|

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 分 担 者 | 川野 竜司 (Kawano Ryuji) (90401702) | 東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (12605) | |