

平成21年 6月23日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380046
 研究課題名（和文） 新しい電気応答計測手法を用いた昆虫刺激受容系解析システムの構築
 研究課題名（英文） Development of insect olfaction analysis system
 using a novel bioelectronic device
 研究代表者
 玉田 靖（TAMADA YASUSHI）
 独立行政法人 農業生物資源研究所 絹タンパク素材開発ユニット ユニット長
 研究者番号：70370666

研究成果の概要：

本研究ではフェロモンに対して非常に敏感に反応するカイコガの匂い受容系をモデルにして、フェロモン刺激を電気信号の変化として捉えられるシステムの構築を目指した。このシステムは昆虫の機能解明だけでなく高感度なバイオセンサとしての利用も期待された。その実現のためカイコガの触角中の生体組織と似た構造を人工的に作り、生体膜表面で起こる反応を電気信号として検出するシステムを作成した。またシステムの高感度化に向け、フェロモンを感じる物質（レセプタ）を培養細胞で大量に生産することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：フェロモン、カイコガ、バイオセンサ、レセプタ、リン脂質二重膜、FET

1. 研究開始当初の背景

生体膜の反応をトランジスタによって検出するという研究は、1991年に最初に発表されている(Science, 252:1290-1293, 1991)。これは神経細胞を電界効果トランジスタ(FET)のゲート電極上に固定し、細胞を電気刺激した際に生じる膜の電位変化をFETによって捉えるというものであった。その後、遺伝子組換えによりカリウムチャンネルを大量発現させた細胞をFET上に固定し、細胞

膜上のイオンチャンネルの働きをトランジスタで計測するというシステムが発表された(Nature Biotechnology, 19:121-124, 2001)。

また甲虫の頭から切り取った触角とFETを組み合わせて触角内の神経電位をFETで計測する「BioFET」というシステムが発表されていた(Sensors and Actuators B 47:235-238, 1998)。

これらの知見から、生体膜上のイオンチャンネルの挙動のような微小な反応もFETに代表される半導体デバイスで検出でき、生体の

反応と電子回路を組み合わせた、新しいシステムが出来そうだということがわかってきた。

さらに 2004 年のノーベル医学生理学賞が「匂い受容体遺伝子の発見と嗅覚メカニズムの解明」という業績に対して贈られ、分子レベルで匂い受容機構を解明しようという研究に光が当てられることとなった。

同時に 2004 年にはカイコガのフェロモンレセプタの遺伝子配列が決定され(PNAS, 101:16653-16658, 2004)、カイコガのフェロモン受容系をモデルにした分子生物学的な実験が行える環境が整った。

これらの科学的、社会的背景を元に、研究代表者らはカイコガの匂い受容系をモデルにしてレセプタタンパク質を工学的に利用するシステムの構築を起案した。これは、人工生体膜（リン脂質二重膜）上にレセプタタンパク質等の信号伝達に関わる生体分子群を再構成してカイコガの触角内部を擬似的に再現し、膜の電気的な応答を FET などの半導体デバイスで検出する、というものである。リン脂質二重膜と FET を組み合わせたデバイスは当時（現在も）発表されていなかったため非常に新規性が高く、実現できれば昆虫の刺激受容系を解析するシステムとして利用できるだけでなく、1 分子検出可能な高感度なバイオセンサとして基礎科学分野から農業、環境、食品など幅広い応用が期待されるものであった。

2. 研究の目的

カイコガやスズメガなどの鱗翅目昆虫はメスの出す性フェロモンに対してオスが非常に敏感に反応することが知られている。特にカイコガは匂い受容系に関する研究が進んでおり、2004 年にフェロモンレセプタの遺伝子配列が決定された。しかしレセプタと G タンパク質、イオンチャネルなどの詳細な関係に関しては、研究応募当時から現在に至るまでいくつかの仮説はあるものの(Nature, 452:1002-1006, 1007-1011, 2008 など)、未だに不明な点が多い。

そこで本研究では、カイコガのフェロモン受容系のメカニズムを解析できる新しいシステムの構築を目指した。具体的には、フェロモン受容に関わるレセプタを始めとした生体分子群をリン脂質二重膜上に再構成し、刺激受容によって生じる膜の電気的な応答を FET によって検出する、というものである。

レセプタの機能に関する研究では、哺乳類の培養細胞やアフリカツメガエルの卵母細胞などを用いた実験系が知られているが、昆虫のレセプタ機能を解析する際に、哺乳類や

両生類といった異種の細胞を用いることは必ずしも適しているとは言えない。本研究で提案しているシステムは、完全に人工のデバイスであり、このデバイスにレセプタを組み込んで活性を調べることで、信号伝達系に関わるタンパク質群の定性的な考察が可能になるだけでなく、定量的な解析も可能になると期待された。

3. 研究の方法

本研究は大きな 2 本の柱から成る。一つはリン脂質膜-FET デバイス系を構築し、膜の電気的な応答を FET で検出すること、もう一つは、上記デバイスに組み込むためのフェロモンレセプタを遺伝子組換え技術を用いて大量発現させる系を構築すること、である。以下それぞれについて述べる。

(1) リン脂質-FET デバイス系の構築

レセプタを固定するためのリン脂質二重膜を形成するマイクロチャンバと、膜の電気的な応答を検出できる FET を製作する。またそれらを組み合わせたデバイスを、 μ TAS の技術を利用して製作し、デバイスの基本特性を調べる。さらにレセプタのモデルとして膜タンパク質 (α ヘモリシン) を導入して、膜の電気的な応答を、製作したデバイスを用いて調べる。

(2) フェロモンレセプタの大量発現系の構築

カイコガのフェロモンレセプタと G タンパク質等のシグナル伝達系関連遺伝子をクローニングし、培養細胞等を用いて大量発現する。対象はフェロモン応答性レセプタ BmOR1 と BmOR3、信号の増幅に寄与するとされている膜タンパク質 BmOR2、フェロモン受容特異的な G タンパク質の 1 種である BmGqa の 4 種類である。カイコガ(w1-pnd) の雄触角から RT-PCR 法によって cDNA を得る。これらを用いて、各タンパク質の一部を大腸菌で発現させ、得られたペプチドを抗体作成用の抗原として用いる。この抗体は後にレセプタ等の発現確認用に用いる。最終的にはフェロモンレセプタと緑色蛍光タンパク質 EGFP 等のマーカーを融合したタンパク質を昆虫細胞で発現させるベクターを構築し、昆虫培養細胞で発現させる。発現の確認はマーカー遺伝子の発現による観察と抗体反応によって行う。

4. 研究成果

(1) リン脂質-FET デバイス系の構築

リン脂質二重膜を形成するために、直径

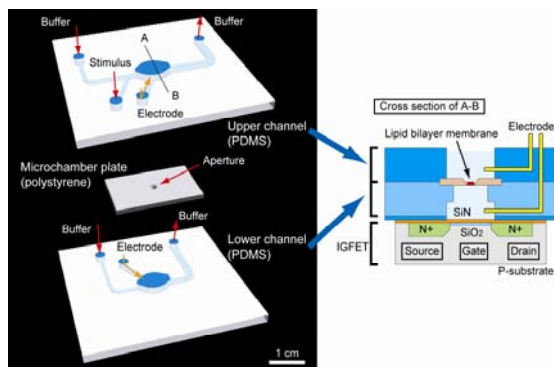


図 1: リン脂質膜-FET デバイス
200 μm の小孔を有するポリスチレン製のマ

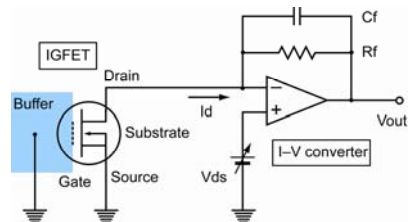


図 2: 信号計測回路

イクロチャンバを利用した。用いたリン脂質溶液は、Diphytanoylphosphatidylcholine (Avanti Polar Lipid, Inc.) を 20 mg/ml の濃度でデカンに溶かしたものである。これをバッファー溶液(10mM Tris HCl + 100mM NaCl, pH7.5)中で、小筆で小孔にこすり付けるようにして二重膜を形成した。二重膜の確認は、顕微鏡による目視確認、膜容量計測 ($0.28\text{mF}/\text{cm}^2$ という値が文献値 $0.3\sim 0.4\text{mF}/\text{cm}^2$ と一致)、グラミシジンによるイオンチャンネル電流計測により行った。

膜の電気的な応答を検出する半導体デバイスには、バッファー溶液中で使うために絶縁ゲート型電界効果トランジスタ (Insulated-Gate FET, IGFET) を用いた。20 μm \times 400 μm のゲート電極上に絶縁層としてチツ化シリコン膜をスパッタリングで形成した。この IGFET はバッファー溶液中で安定した性能を示した。

リン脂質二重膜形成用のマイクロチャンバと IGFET を組み合わせて、図 1 に示すシステムを構築した。3次元加工装置 (Modela MDX-15, Roland DG Co.) を用いて製作した型に、シリコーンゴムの一種である PDMS を流し込んで上下 2 つの流路を作った。この間にポリスチレン製マイクロチャンバを挟み込み、さらに一番下に IGFET を置いて、それら各層を PDMS で接着してデバイスとした。上下 2 本の流路は独立してバッファーを流せるようになっており、駆動力には重力を利用しているので、ポンプを使ってバッファー交換するのと違い、電気ノイズや振動等の影響を減らすことが出来るようになって

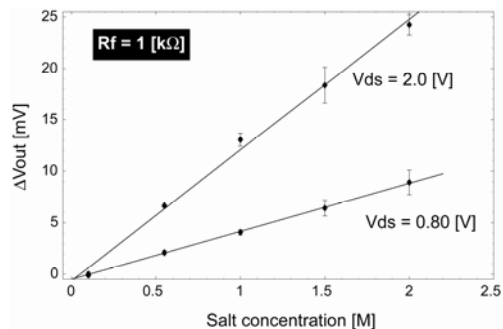


図 3: 塩刺激とデバイス出力の関係

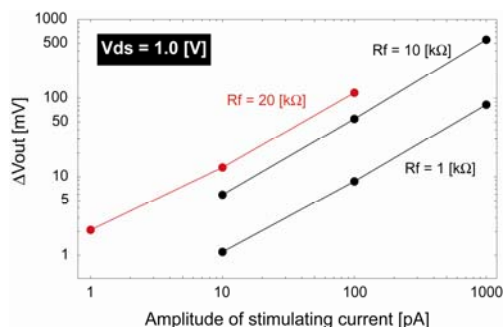


図 4: 電流刺激とデバイス出力の関係

いる。またバッファー交換の際に二重膜が壊れることは無い。

信号計測には図 2 に示す回路を用いた。これは、リン脂質二重膜の電気的な応答に応じて IGFET のソース・ドレイン間を流れる電流値が変化するので、その変化をオペアンプによる電流-電圧変換回路で電圧に変換して計測するものである。

このデバイスの基本特性を図 3 と図 4 に示す。図 3 は二重膜の上側の塩濃度を初期濃度 (100mM) から変化させたときの応答を記録したものである。塩濃度の変化は膜電位の変化に相当するので、このグラフより我々が製作したシステムで、二重膜の膜電位変化に比例した応答が記録できることが示された。

また図 4 には二重膜をパルス電流刺激した際の電流の振幅とそれに対応したデバイス出力を示した。これより、計測回路の抵抗 R_f に 20k Ω を用いると、数 pA の電流変化も記録できることがわかった。イオンチャンネル電流は通常数 pA 程度なので、10 個程度のチャンネルが同時に開けば数 10mV の電圧変化として記録できる可能性が示された。パッチクランプ用のアンプを用いず、FET と簡便な電子回路の組み合わせで数 pA の電流変化を記録できる可能性が示されたことは画期的な成果であると思われる。

レセプタのモデルとして膜タンパク質の 1 種であるヘモリシンを二重膜へ導入した。この膜タンパク質は二重膜中で 7 量体を形成し二重膜に穴を開ける作用があるので、チャネ

ルレセプタのモデルとして好適であると考えた。図5にヘモリシンの導入前後のデバイス出力を示す。これより、ヘモリシンの導入によりデバイス出力の増加が認められた。これはヘモリシンの作用により、膜電流が流れ、それによって膜電位が変化し、この膜電位変化をIGFETデバイスが捉えた、と考えられた。これは二重膜中の膜タンパク質の作用をFETによって捉えた世界初の成果である。ただし予想された出力変化が数10mVであったのに対し、実際には数mVしか出力が変化しなかった。これは、膜に導入されたヘモリシンの量が少なかった、膜にかかるべきバイアス電圧が適当でなかった、計測回路系の感度が十分でなかった、等の理由が考えられ、今後の検討課題として残った。

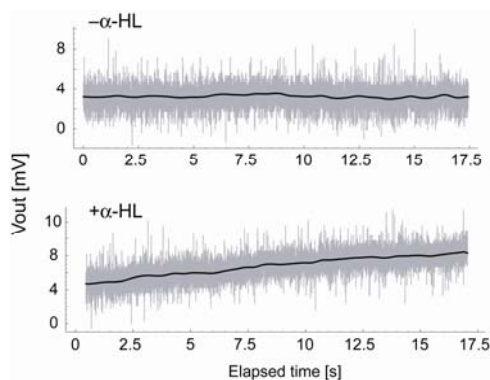


図5: ヘモリシン導入による出力変化

(2) フェロモンレセプタの大量発現系の構築
カイコガ(w1-pnd)の雄触角から、RT-PCR法を用いて3種類のフェロモンレセプタ(BmOR1、BmOR2、BmOR3)とフェロモン受容特異的Gタンパク質の1種(BmGqa)の遺伝子をクローニングした(図6参照)。このうちBmOR3では、NCBIのデータベースにある遺伝子配列と比較し3箇所において変異のある配列が得られたが、アミノ酸配列には変化が無かったので、機能的には問題ないと思われた。

細胞でのタンパク質発現確認用の抗体作成のため、フェロモンレセプタとGタンパク質の部分配列(親水性が高いと予想される細胞外あるいは細胞内ドメイン)を複数作成し、発現ベクターpTrcHis(Invitrogen Co.)に載せ、大腸菌Top10(Invitrogen Co.)で部分ペプチドを発現させた。特に使用頻度と重要度が高いと判断したBmOR1とBmOR2の部分ペプチドについては、大腸菌を大量培養し、Hisタグを利用してNiキレートカラムHisTrapHP(GEヘルスケアバイオサイエンス)でペプチドを精製し、これを抗原として抗体を作成した。

細胞での発現に用いたのは、Sf9とBmN

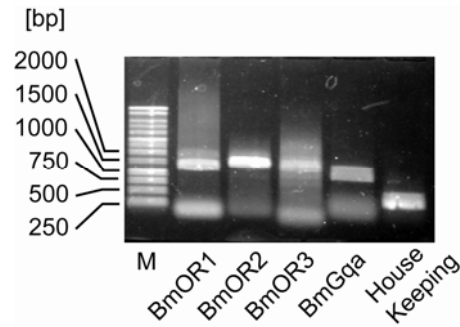


図6: フェロモンレセプタ等のRT-PCR増幅

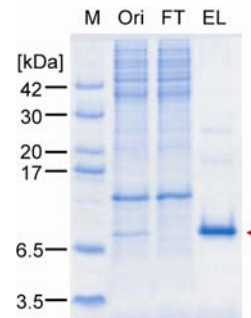


図7: BmOR1の部分ペプチド(赤三角印)の精製結果

(M: マーカー、Ori: 大腸菌抽出液、FT: HisTagカラムのフロースルー液、EL: HisTagカラムから溶出後の溶液)

の2種類の昆虫組織由来の培養細胞である。昆虫細胞は哺乳類の培養細胞と違って、培養時にCO₂インキュベータを必要とせず、培養温度も室温(20~25°C)で済むことから、培養にかかる手間と費用を節約できるという利点がある。

先にクローニングした遺伝子のうち、重要性からBmOR1とBmOR2をまず発現させることにした。マーカーとしてBmOR1には緑色蛍光タンパク質EGFPを、BmOR2には橙色蛍光タンパク質KusabiraOrange(MBL Co. Ltd.)をそれぞれC末端側に融合させた遺伝子を作成し、これらを昆虫細胞用発現ベクター(pBluescriptII SK(+), (Stratagene)を改変したもの)に載せて培養細胞にトランスフェクションし、融合タンパク質を発現させた。トランスフェクション試薬にはLipofectamine2000(Invitrogen Co.)を用いた。トランスフェクション後48時間以上培養を続けた後、蛍光顕微鏡(図8参照)や共焦点レーザー顕微鏡(図9参照)で細胞を観察し、蛍光マーカーを利用してレセプタの発現を確認した。

また膜タンパク質抽出キット(ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit, Calbiochem)を用いて、タンパク質を可溶性画分(細胞質画分)と不溶性

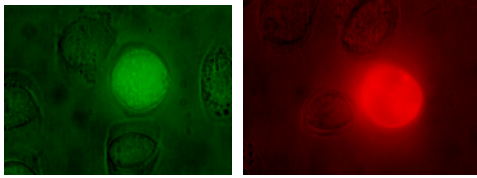


図 8: レセプタを発現させた BmN 細胞の
蛍光顕微鏡観察像
(左: BmOR1-EGFP、
右: BmOR2-KusabiraOrange、
細胞の大きさは直径約 20 μ m)

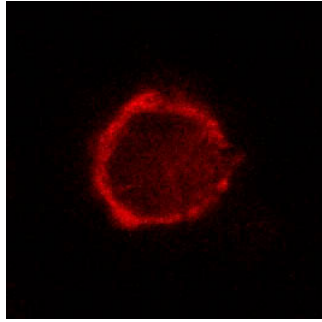


図 9 BmOR2-KusabiraOrange を発現させた
BmN 細胞の共焦点レーザー顕微鏡観察像

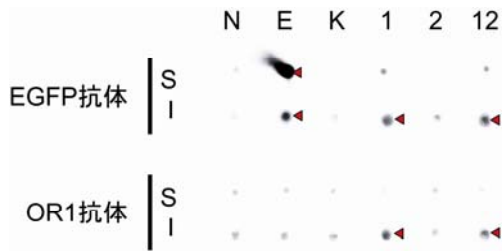


図 10: ドットプロット法による発現確認
(S: 可溶性画分、I: 不溶性画分、
N: プラスミドをトランスフェクションして
いない細胞、
E: EGFP のみ発現させた細胞、
K: KusabiraOrange のみ発現させた細胞、
1: BmOR1-EGFP を発現させた細胞、
2: BmOR2-KusabiraOrange を発現させた
細胞、
12: 1 と 2 を共発現させた細胞)

画分(膜画分)に分けて抽出し、ドットプロット法を用いて抗体処理をしてレセプタの発現を調べた。図 10 に BmOR1-EGFP の結果を示すが、これより EGFP 抗体と BmOR1 抗体の両方でシグナルが検出できるのが、BmOR1-EGFP のみを発現させた細胞の膜画分と、BmOR1-EGFP と BmOR2-KusabiraOrange を共発現させた細胞の膜画分であり、期待通りの結果が得られている。なお、通常用いられるウエスタンブロットティング法を用いなかったのは、様々な

条件で SDS-PAGE を行ったが、BmOR1-EGFP と BmOR2-KusabiraOrange がゲルに入らず、PAGE でうまく分離できなかったためである。

今後に残された課題として、発現させた BmOR1 と BmOR2 が予想される機能を発現しているかどうかを確認する必要がある。そのため、ホールセルクランプ法などの電気生理学的な手法を用いる予定である。その上で、抽出した膜画分をリン脂質膜-FET デバイス系に組み込んでレセプタの作用による二重膜の電気的な応答を FET で捉えることにチャレンジしていく。

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 2 件)

- ① Yoshihiko Kuwana, Katsura Kojima, and Yasushi Tamada, "Design and Fabrication of Biosensor Device by Use of Receptor Proteins," IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, vol.129, no.11, in press (2009), 査読有
- ② 小島桂, 「最大の未利用資源としての昆虫産生物」、Ceramic Data Book, vol.34, pp.197-199(2006), 査読無

[学会発表] (計 17 件)

- ① 桑名芳彦, 小島桂, 玉田靖, 「昆虫レセプタタンパク質を利用するバイオセンサの基本特性」、日本蚕糸学会第 79 回大会、2009 年 3 月 21 日、東京都府中市(東京農工大)
- ② 桑名芳彦, 小島桂, 玉田靖, 「昆虫レセプタタンパク質を利用したバイオセンサ」、つくば医工連携フォーラム 2009、2009 年 1 月 14 日、茨城県つくば市(産業技術総合研究所)
- ③ 桑名芳彦, 小島桂, 玉田靖, 「高感度バイオセンサのための昆虫嗅覚レセプタタンパク質の発現」、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 12 日、兵庫県神戸市(神戸国際会議場)
- ④ 桑名芳彦, 小島桂, 玉田靖, 「高感度バイオセンサのための組換え昆虫匂いレセプタの発現」、生物物理学会第 46 回年会、2008 年 12 月 3 日、福岡県福岡市(福岡国際会議場)
- ⑤ 桑名芳彦, 小島桂, 玉田靖, 「レセプタタンパク質を利用するためのバイオセンサデバイスの設計と製作」、第 25 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シ

- ンポジウム、2008年10月24日、沖縄県宜野湾市(沖縄コンベンションセンター)
- ⑥ 玉田靖、桑名芳彦、「昆虫に学ぶ農業センサ」、電気学会第2回農業センサシステム専門委員会、2008年10月10日、茨城県つくば市(農業生物資源研究所)
- ⑦ Yoshihiko Kuwana, Katsura Kojima, and Yasushi Tamada, “A Biosensor that Uses Insect Pheromone Receptors,” The Tenth World Congress on Biosensors, 2008年5月15日、中国・上海(上海国際会議場)
- ⑧ 桑名芳彦、「カイコガフェロモンレセプタを利用したバイオセンサ」、日本蚕糸学会第77回大会、2007年4月3日、茨城県つくば市(農林水産技術会議事務局筑波事務所)
- ⑨ 玉田靖、桑名芳彦、「昆虫生体分子を利用するナノセンサ開発のための生体分子固定化技術の開発」、総合科学技術会議 科学技術連携施策群第一回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会、2006年12月21日、東京都江東区(日本科学未来館)
- ⑩ 桑名芳彦、小島桂、玉田靖、「昆虫匂いレセプタを利用したバイオセンサ開発 - カイコガフェロモンレセプタのクローニングと発現 -」、日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006年12月7日、愛知県名古屋市(名古屋国際会議場)
- ⑪ 桑名芳彦、小島桂、玉田靖、「昆虫の感覚受容分子群を利用したバイオセンサ」、第11回つくばバイオマテリアル研究会、2006年11月24日、茨城県つくば市(物質材料研究機構)
- ⑫ 玉田靖、「農業生物資源における研究の展望」、第11回つくばバイオマテリアル研究会、2006年11月24日、茨城県つくば市(物質材料研究機構)
- ⑬ Yoshihiko Kuwana, Katsura Kojima, and Yasushi Tamada, “Potential Measurement of Lipid Bilayer Membrane by Microfluidic FET Device,” Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006年11月13-14日、沖縄県宜野湾市(沖縄コンベンションセンター)
- ⑭ 桑名芳彦、「APCOT2006参加報告-バイオ関連」、第7回MEMS技術分科会、2006年7月26日、大阪府大阪市(大阪市中央公会堂)
- ⑮ Yoshihiko Kuwana, and Yasushi Tamada, “A novel FET device for membrane potential measurement based on receptor-based biosensor,” The Asia-Pacific Conference of

Transducers and Micro-Nano Technology, 2006年6月28日、シンガポール(Marina Mandarin Hotel)

- ⑯ Yoshihiko Kuwana, and Yasushi Tamada, “Membrane potential measurement by a novel FET device as a receptor-based biosensor,” The Ninth World Congress on Biosensors, 2006年5月11日、カナダ・トロント(Sheraton Centre)
- ⑰ Yasushi Tamada, and Yoshihiko Kuwana, “Immobilization of liposome on photodiode to detect membrane potential change,” The Ninth World Congress on Biosensors, 2006年5月11日、カナダ・トロント(Sheraton Centre)

〔図書〕(計1件)

- ① 玉田靖、シーエムシー出版、「バイオセンサーの先端科学技術と応用 - 昆虫感覚機能利用バイオセンサー -」、pp.46 - 52 (2007)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

無し

○取得状況(計0件)

無し

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 靖 (TAMADA YASUSHI)

独立行政法人農業生物資源研究所・絹タンパク素材開発ユニット・ユニット長

研究者番号：70370666

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

桑名 芳彦 (KUWANA YOSHIHIKO)

独立行政法人農業生物資源研究所・絹タンパク素材開発ユニット・主任研究員

研究者番号：30370654

小島 桂 (KOJIMA KATSURA)

独立行政法人農業生物資源研究所・絹タンパク素材開発ユニット・主任研究員

研究者番号：40370655