

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05671

研究課題名(和文) 昆虫嗅覚系の補助タンパク質を活用した受容体利用型匂いセンサの高感度化技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of receptor-based odor sensing technology with high sensitivity using accessory proteins of insect olfaction

研究代表者

光野 秀文(Mitsuno, Hidefumi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：60511855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫の嗅覚受容体による匂いの高感度受容に寄与する生体分子を探索し、嗅覚受容体-共受容体を再構築した匂い検出素子である“センサ細胞”に遺伝子導入することで、対象の匂いを高感度に検知する人工嗅覚細胞の開発基盤の確立を目指した。まず、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて、昆虫の触角で機能する膜タンパク質が嗅覚受容体-共受容体の電流応答値を増大させることを見出した。次に、対象となる生体分子の遺伝子をセンサ細胞に追加導入する技術を確立した。最終的に、本技術に従って、嗅覚受容体-共受容体とともに対象の生体分子を共発現させることで、人工嗅覚細胞を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵母細胞を用いた発現系により、昆虫の触角で機能する膜タンパク質が嗅覚受容体-共受容体の匂い物質に対する応答感度を増大させることを見出し、昆虫が備える高感度な匂い受容に関する重要な知見が得られたことから学術的に意義がある。

また、特定した膜タンパク質の遺伝子をセンサ細胞に導入することで、匂いの検出素子となる人工嗅覚細胞を開発する基盤を確立し実用的なバイオセンサの開発につながる成果が得られたことから社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify biomolecules that contribute to the high sensitivity of odorant reception in insect olfaction. Then, we aimed to establish the basis for the development of "artificial olfactory cells" that can detect target odorants with high sensitivity by co-expressing the biomolecules along with olfactory receptor/co-receptor in cultured cells. First, using *Xenopus* oocytes as an expression system, we found that a membrane protein that functions in insect antennae increases the current response value of olfactory receptor/co-receptor. Next, we established a technology for introducing additional genes of target biomolecules into available sensor cells. Finally, by co-expressing a target biomolecule along with the olfactory receptor/co-receptor according to this technology, we achieved to develop an enhanced artificial olfactory cell.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：匂いバイオセンサ 昆虫 嗅覚受容体 補助タンパク質

1. 研究開始当初の背景

現在、生活の質の向上や安全・危機管理の観点から、環境中のごく微量の匂い物質を高感度に検出する技術が求められている。このような幅広いニーズに応えるために、検出感度、匂い選択性など、匂いセンサに求められる課題は多い。近年、これらの課題を解決する革新的な計測技術として、自然界の様々な匂いを高感度で検出する生物の嗅覚が注目されつつある。

生物の中でも昆虫は、多くの生命活動に匂い情報を利用しているため、環境中の様々な匂い物質を高感度、かつ選択的に検出する機構を備えている。この匂いの検出は、分子認識機構を備えた昆虫に特異な嗅覚受容体によるものである。G タンパク質共役型受容体である哺乳類の嗅覚受容体とは異なり、昆虫の嗅覚受容体は共受容体 (olfactory receptor co-receptor; Orco) とともにイオンチャネルとして機能する^[1]。そのため、機構が単純であり、培養細胞で比較的容易に再構築できる。これまでに昆虫の嗅覚受容体と Orco を Sf21 細胞で機能発現させることで、匂い物質の検出素子として利用できる“センサ細胞”を作出してきた^[2]。このセンサ細胞は ppb (parts per billion) オーダの感度で選択的に匂い物質を検出する一方、昆虫生体が本来備える感度には未だ達していない。例えば、オスカイコガはたった 170 分子の性フェロモン分子で配偶行動を解発すると報告され^[3]、ミツバチは ppt (parts per trillion) もの高感度で爆発物を検出すると報告されている^[4]。近年、昆虫では、嗅覚受容体に加えて、Sensory Neuron Membrane Protein (SNMP) などの膜タンパク質^[5]、嗅覚子内の感覚子リンパに存在する匂い結合タンパク質が高感度な匂い検出に参与していると示唆されている^[6]。また、哺乳類では、嗅覚受容体の膜移行に参与するタンパク質も報告されている。これらの生体分子の機能を評価し、嗅覚受容体と融合した匂いバイオセンサが開発できれば、生物のように高感度に対象臭を検出できるセンシング技術の開発が可能であると考えられるが、これらの生体分子が適用された例はない状況である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、昆虫の嗅覚機能を人工的に再現する技術を確立することで、対象の匂い物質 (対象臭) をより高感度に検出できる実用的な匂いバイオセンサを開発することである。具体的には、昆虫の嗅覚受容体と共受容体 (Orco) を発現させた細胞を用いて、嗅覚受容系で機能するその他の膜タンパク質や補助タンパク質といった生体分子が嗅覚受容体の応答に及ぼす影響を調査することで、対象成分の高感度受容に機能する生体分子を明らかにする。そして、これら生体分子を利用して、人工的に嗅覚受容細胞を構築し、対象臭に対する検出性能を評価することで、実用的な匂いバイオセンサの開発技術を確立する。

3. 研究の方法

1. アフリカツメガエル卵母細胞の発現系による生体分子の機能評価

生体分子の機能評価の一つとして、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系による機能評価を実施した。対象遺伝子は、カイコガ (*Bombyx mori*) またはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の触角 cDNA を鋳型に PCR を行い、全長遺伝子配列を獲得した。獲得した遺伝子を発現ベクターに挿入して cRNA を合成し、嗅覚受容体と Orco の cRNA とともに卵母細胞に微量注入した。微量注入した卵母細胞については、2 電極膜電位固定法により、対象成分に対するイオン電流を計測した。生体分子の有無で卵母細胞の対象成分に対するイオン電流を比較することで、嗅覚受容体-Orco 複合体の匂い応答への生体分子の影響を評価した。

2. センサ細胞への生体分子の遺伝子導入と機能評価

センサ細胞は、昆虫の嗅覚受容体、Orco、およびカルシウム感受性蛍光タンパク質 (GCaMP) を機能発現させた Sf21 細胞である。センサ細胞に対象遺伝子を追加導入するために、抗生物質耐性遺伝子を含むプラスミドベクターに対象遺伝子を挿入して、追加導入用の発現ベクターを構築した。リポフェクション法により構築した発現ベクターをセンサ細胞に遺伝子導入し、カルシウムイメージング法により対象臭に対する蛍光強度変化量を計測することで、追加導入した遺伝子の機能を評価した。

3. 生体分子を活用した人工嗅覚細胞の作出

抗生物質によるスクリーニングにより、生体分子を追加導入したセンサ細胞から人工嗅覚細胞を作出した。前項に従い、対象となる生体分子の遺伝子を挿入した発現ベクターを構築し、センサ細胞へ遺伝子導入した。遺伝子導入したプラスミドベクターに含まれる抗生物質の耐性遺伝子の発現を指標に、生体分子を機能発現するセンサ細胞を選抜した。選抜したセンサ細胞の培養スケールを拡大することにより、長期間にわたって増殖を繰り返す細胞系統を樹立した。このように選抜した細胞系統について、RT-PCR による対象遺伝子の転写を確認することで、人工嗅覚細胞を樹立した。

4. 研究成果

1. アフリカツメガエル卵母細胞の発現系による生体分子の機能評価

複数種類の昆虫種の RNA シーケンスデータの発現量解析の結果、昆虫の触角で機能発現し嗅覚系に寄与する生体分子として SNMP に注目した。カイコガ (*B. mori*)、およびキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) の触角 cDNA から、2 種類の SNMP (SNMP1、SNMP2) 遺伝子を獲得した。まず、カイコガの性フェロモン (ボンピコール) や副産物 (ボンピカル) の受容体である BmOR1 や BmOR3 を用いて SNMP の影響を調査した。その結果、受容体と Orco のみを導入した卵母細胞と比較して、受容体と Orco とともに SNMP を共導入した卵母細胞では、対象成分に対してイオン電流値が増加する傾向が確認された。次に、濃度依存応答値を計測した結果、SNMP の共導入にかかわらず検出限界濃度に変化はなかった一方、低濃度から高濃度にわたる試験したすべての濃度 (30 nM ~ 30 μ M) でイオン電流値が増加する傾向が確認された。以上の結果から、卵母細胞の実験系において、SNMP は BmOR1-Orco、または BmOR3-Orco の対象成分に対するイオン電流値を増加させることが分かった。

2. センサ細胞への生体分子の遺伝子導入と機能評価

昆虫の嗅覚受容体による匂い応答を取得できる検出素子として、昆虫の嗅覚受容体、Orco、およびカルシウム感受性蛍光タンパク質 (GCaMP6s^[7]) の 3 種類の遺伝子を安定に機能発現し、対象臭を蛍光強度変化として検出する Sf21 細胞 (センサ細胞) を樹立してきた。このセンサ細胞を活用して、対象とする生体分子の遺伝子を追加導入し機能評価する技術の確立を試みた。ここでは、生体分子として異なる嗅覚受容体の遺伝子を用いた。センサ細胞に機能発現する嗅覚受容体とは異なる嗅覚受容体を追加導入した結果、センサ細胞が本来備える匂い応答に加えて、追加導入した嗅覚受容体の蛍光応答も取得できることが確認できた (図 1)。以上の結果から、センサ細胞へ新しい遺伝子を追加導入することで、生体分子の再構築が可能であり、さらにその機能の評価が可能であることを明らかにした。

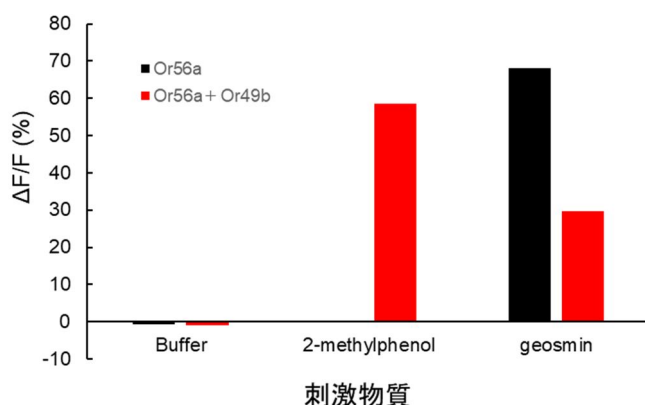


図 1 センサ細胞への生体分子の遺伝子導入とその機能評価

Or56a を発現させたセンサ細胞に、Or49b を追加導入した。Or49b を追加導入することで、2-methylphenol に対する蛍光応答が取得できることが分かる。

3. 生体分子を活用した人工嗅覚細胞の作出

最後に、センサ細胞に生体分子の遺伝子を追加導入することで、人工嗅覚細胞の作出を試みた。ここでは、カイコガ由来の性フェロモン受容体、またはキイロショウジョウバエ由来の一般臭嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞を用いて、SNMP1、SNMP2 の遺伝子を追加導入した。ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ発現ベクターをセンサ細胞に追加導入し抗生物質による選抜を通して、細胞系統を樹立した。樹立した細胞系統について RT-PCR による遺伝子発現解析を行った結果、センサ細胞で発現している受容体、Orco、および GCaMP6s に加えて、SNMP の遺伝子が発現していることが確認できた (図 2)。最終的に、キイロショウジョウバエ由来の一般臭の嗅覚受容体-Orco、またはカイコガ由来の性フェロモン受容体-Orco を発現し、新たな生体分子として SNMP を共発現する人工嗅覚細胞の作出を完了した。

<引用文献>

- [1] Sato et al., Nature, 2008. [2] Mitsuno et al., Biosens.Bioelectron., 2015. [3] Kaissling, Lectures Insect Olfaction, 1987. [4] Bromenshenk et al., Biol. Systems, 2003. [5] Halty-DeLeon et al., J. Neurosci. Methods, 2016. [6] Gross-Wilde et al., Chem. Sens., 2006. [7] Chen et al., Nature, 2013.

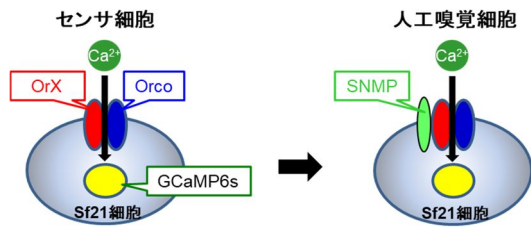
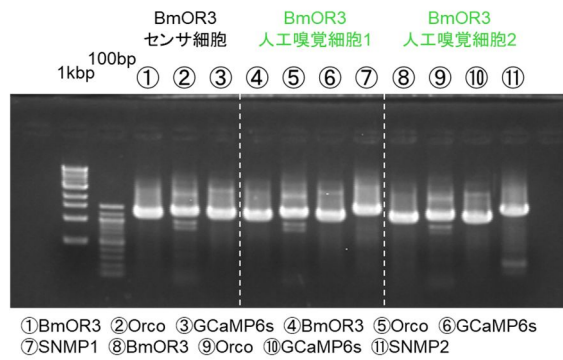


図2 センサ細胞と人工嗅覚細胞

センサ細胞と人工嗅覚細胞の模式図(上図)と RT-PCR による導入遺伝子の発現解析の結果(下図)を示す。人工嗅覚細胞では、嗅覚受容体、Orco、GCaMP6s に加えて、SNMP が発現していることが分かる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤健斗, 光野秀文, 藤井毅, 中秀司, 櫻井健志, 黒田枝里, 黒田裕樹, 神崎亮平
2. 発表標題 スズメガ類の性フェロモン受容体候補の配列解析
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会 第66回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 光野秀文
2. 発表標題 昆虫の嗅覚のしくみと匂いセンシング技術への応用
3. 学会等名 技術情報協会セミナー 「匂いセンサの開発, 定量化・可視化技術と、その応用事例」 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光野秀文, 櫻井健志, 祐川侑司, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚からセンシング技術の開発と社会実装に向けた取組み
3. 学会等名 VR学会産学フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光野秀文, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 バイオセンシング技術における昆虫の嗅覚機能の活用とガス検知に向けた取組み
3. 学会等名 第1回センサ&IoTセミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚のしくみとバイオセンシング技術への応用
3. 学会等名 第95回化学センサ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚機能を活用したセンシング技術の実用化への取組み
3. 学会等名 センサ & IoTコンソーシアム公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚に学ぶセンシング技術
3. 学会等名 科学技術者フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文, 照月大悟, 櫻井健志, 神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚受容体の匂いセンシング技術への活用
3. 学会等名 日本ペプチド学会 第50回若手ペプチド夏の勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuno H., Niki S., Kuroda E., Araki S., Terutsuki D., Sakurai T., Kanzaki R
2. 発表標題 Application of insect odorant receptors for the detection of human-derived odorants
3. 学会等名 18th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文、二木佐和子、黒田枝里、照月大悟、櫻井健志、小熊久美子、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体を発現させたSf21細胞によるダム湖水中のカビ臭検出
3. 学会等名 ケミカルセンサ/バイオ・マイクロシステム合同研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光野秀文、照月大悟、櫻井健志、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚機能を活用した匂いセンシング技術の開発と実用化への取り組み
3. 学会等名 NPO法人サーキットネットワーク(C-NET)定期公演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	二木 佐和子 (Niki Sawako)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	黒田 枝里 (Kuroda Eri)		
連携研究者	櫻井 健志 (Sakurai Takeshi) (20506761)	東京農業大学・農学部・教授 (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関