

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02531

研究課題名(和文)細胞外物質による化学感覚機能機構の解明と、高機能性センサー開発への展開

研究課題名(英文)Elucidation of regulation of chemosensory mechanisms by extracellular substances and their application to the development of biomimetic chemical sensors

研究代表者

佐藤 幸治 (Sato, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：嗅覚器は超高感度な匂いセンサーであり、それに関わるほとんどの遺伝子の機能が明らかにされている。しかしこれらの遺伝子を細胞に機能的に発現させても嗅覚の超感受性は再現されず、嗅覚をベースとする匂いセンサーの開発の大きな支障となっている。本研究では、超高感度センサーを実現するための基盤技術開発を目的として、細胞外物質による嗅覚感度調節に着目しその分子機構解明やデバイス開発を実施した。その結果、匂い応答の指標であるcAMPのリアルタイム計測など、様々な嗅覚と関連した測定技術の開発に成功し、嗅覚には超感受性だけでなく高速応答性が独自に備わっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の成果は、脊椎動物で匂い応答の直接指標となるcAMPの高速イメージングに成功し、嗅覚には超感受性だけでなく、動物が素早く匂いを検出するための高速応答性が備わっていることを明らかにしたことである。これまで生物模倣型の匂いセンサー素子として、電気信号を直接発する昆虫の嗅覚受容体が主に利用されていたが本技術により、イヌも含めた脊椎動物の嗅覚受容体をセンサーに利用できるようになった。また嗅覚器を模倣するための人工粘液の作製や匂い物質の無細胞計測など、匂いセンサー開発に関連する様々な基盤技術を発展させることができた。

研究成果の概要(英文)：The olfactory organ is an ultra-sensitive odor sensor, and almost all genes involved in this signal transduction cascade have been identified. However, functional expression systems do not reproduce the performance of olfaction, indicating that the elucidation of the ultra-sensitivity mechanism is required for developing biomimetic odor sensors. In this study, with the aim to develop foundational technologies for biomimetic odor sensors, we examined the role of extracellular substances in the regulation of olfactory sensitivity, and the techniques for stimulating cells in an aqueous solution with vapor odorants. As a result, we successfully developed various measurement techniques related to the detection of response of cells expressing odorant receptors to vapor odorants, using real-time measurement of cAMP, a direct indicator of odor response. We demonstrated that the olfactory organ is not only ultra-sensitive but also possesses a unique rapid response capability to 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 嗅粘液 味覚

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。例えばイヌの鼻が極めて高感度に匂いを認識できることは広く知られており、オスのカイコガでも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。現在ではこれらの遺伝子を培養細胞で再構成することでそのセンシング能を再現することができるが、感覚器に備わった優れた機能性は再現できていない。その大きな原因としてこれまでは、イヌの嗅覚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、といった細胞の量的原因が主に考えられてきた。しかしラージスケールでの培養細胞の匂い応答を計測しても感度は改善されず、嗅覚の超感受性を実現する分子機構は未解明と言ってよい。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影響する細胞外物質の報告により、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。これらの研究は、鼻粘液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。このような背景に加え代表者はこれまでの研究活動により、細胞外物質によって化学感覚受容体の応答が増強または抑制されることを見出し、鼻粘液の分泌異常が匂い知覚に影響することや、細胞表面の液層によって嗅覚受容体のリガンド選択性が変化することを報告している。

以上のように、嗅覚を模した化学センサーの実現には嗅覚の超感受性を実現する分子機構の解明が必須であり、近年、その分子実体として鼻粘液が関わるということが示唆されつつある。したがって代表者が見出した細胞外物質による化学感覚の応答増強が、細胞外物質・匂い物質・受容体のそれぞれのどのような化学的性質を介した相互作用によって生じているのか、その分子基盤を明らかにすることは、嗅覚の謎を解明する大きな手がかりになることが期待できる。またその解明によって、化学感覚受容体を利用した高機能性分子センシング技術の実現につながることを期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、イヌの鼻で広く知られているような、化学感覚器に備わるリガンドに対する超高感受性を実現する分子基盤を解明し、それを人工的に再現することを目指した。そのために代表者が見出した、鼻粘液や食品添加物に含まれる細胞外物質により味覚・嗅覚応答が増強される分子基盤を明らかにし、センシング技術と統合することを最終的な目標とした。そして得られた知見をもとに、遺伝子再構成系や幹細胞分化誘導技術、微細加工技術などの融合で、培養細胞をセンサー素子として利用し、生体の嗅覚器と同様に大気中の匂い物質を検出させることを目指す。これらの研究課題を実現するために必要な基盤技術開発に取り組み、バイオミメティックな高感度化学センサーの開発につなげることを最終目的とした。

3. 研究の方法

嗅覚受容体を利用した生物模倣型化学センサーを実現するためには機能的な嗅覚受容体の再構成、緩衝液中の受容体へ匂い刺激を行うデバイス開発、応答測定技術など様々な基盤技術開発が必要となる。また匂い応答の感度を調節する分子機構の解明には様々な分子間相互作用の計測や解析対象となる鼻粘液に含まれる細胞外物質の生合成が必要となる。本研究ではこの課題達成に向け、遺伝子再構成実験、分析化学的手法、オルガノイド培養技術などを組み合わせた統合的アプローチを実施する。

まず培養細胞を用いた化学感覚受容体の遺伝子再構成系により、匂い応答に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を行った。匂い応答の計測にはこれまで、細胞内カルシウム濃度の計測が一般的である。代表者もこの手法を用いて、主に昆虫嗅覚受容体による細胞外物質の探索を行ってきた。しかしこの手法では、脊椎動物嗅覚受容体の匂い応答がリアルタイム計測できない問題があった。そこで匂い応答の直接指標となる細胞内 cAMP 濃度の計測技術との技術統合も試みた。鼻粘液の人工作製には幹細胞から粘液分泌細胞を分化させ、培地中へ粘液を分泌させることを試みた。

緩衝液中でしか生存できない培養細胞を大気中の匂い分子を検出するためのセンサー素子として利用するためには、嗅覚器と同様に、細胞表面にマイクロスケールの液層を構築しなければならない。しかし現在の微細加工技術を用いてもこの課題は実現できておらず、匂いセンサー開発の大きな妨げとなっている。本研究ではこの課題に関し、嗅覚器の粘液分泌腺を模したマイクロスリットを備えた測定チェンバーを作製し、気体状匂い刺激に対する培養細胞の応答計測を試みた。

拡散などの分子移動は、匂い応答に影響する物理的な要因の一つと考えられている。拡散の指標となる拡散係数は電気化学的手法で計測可能であるが、ほとんどの匂い物質である揮発性有機溶媒は電気化学計測が困難である。代表者らはその計測手法開発に長年取り組んでおり、本研

究ではこれまで取り組んでいたサイクリックボルタンメトリー法に加え、クロノクーロメトリー法についても計測手法開発に取り組み、匂い物質と細胞外物質との相互作用について検討した。

4. 研究成果

本研究では生物模倣型匂いセンサーの実現のために、匂い応答細胞と嗅粘液層をデバイス上で人工的に再現する試み、匂い応答の新規リアルタイム計測技術開発、電気化学的に匂い物質と粘液構成物質との相互作用を解析する測定技術開発、化学感覚受容体とリガンド物質の相互作用に関するタンパク質立体構造のモデルに関し成果を得た。具体的な成果としては、

1) 培養細胞に気体状の匂い刺激を実現するデバイス開発として、ハイスルーブットに培養細胞に気体状匂い刺激を行うデバイスおよび、マイクロスリットを備えた一細胞匂い応答計測用デバイスを作製した。ハイスルーブットな匂い応答計測にはマイクロプレートリーダーを用いて、cAMP 上昇に伴う発光タンパク質による発光量増加を計測する手法が広く利用されている。この手法では通常、緩衝液に溶解させた匂い物質による液体匂い刺激が行われる。揮発した匂い物質をマイクロプレート内へ拡散させる手法で気体状匂い刺激を行う方法も報告されているが、感度は極めて低い。本手法ではマイクロプレートの上部に設置し、下部のプレートウェルへ括弧して気体状の匂い物質を揮発させる装置を作製した。本装置を用いて様々な嗅覚受容体発現細胞へ気体状匂い刺激を行ったところ、これまでの手法よりも効率的に匂い応答を計測することができた。匂い物質によっては最大で30倍程度の感度改善が認められたが、液相刺激で応答しても気相刺激は応答しない匂い物質も確認された。現在この手法を用いて引き続き、様々な受容体と匂い物質との応答計測を実施している。

気体状の匂い刺激に対する細胞の応答測定では、細胞表面の液層の蒸発が最大の問題となる。これまで主にゲルを用いて課題克服を試みていたが、液層の制御に課題があった。そこで下部に緩衝液をバッファリングするためのマイクロチャンネルを設置した、オープンチャンネル型の測定チャンバーを光造形で作製し、イメージングによる一細胞レベルでの気体状匂い刺激に対する応答を計測した。その結果、オープンチャンネルを介した緩衝液の供給による液層制御が可能となり、ゲルを用いたデバイスと比較してより安定的な匂い応答計測が可能となった。この結果は、国際学会で報告した。

2) 匂い応答で生じる cAMP 濃度変化のリアルタイムイメージング法の開発に成功し、世界で初めて匂い刺激で生じる細胞内での cAMP 濃度上昇を ms レベルでの時間解像度で計測することに成功した。蛍光顕微鏡を用いて細胞内の cAMP 濃度をリアルタイムに計測する手法は以前より報告されているが、匂い応答計測にはこれまで利用されていなかった。具体的にはゲノムに cpGFP をベースとする cAMP 蛍光センサーを組み込んだ安定発現細胞株を作製した。この細胞株に対し嗅覚受容体を高発現するクローンを選別し、匂いセンサー細胞とした。この細胞に様々な嗅覚受容体を発現させ匂い刺激を行ったところ、これまでの計測手法と同様な嗅覚受容体の応答特性を確認できた。生体の匂い応答は ms レベルで応答が発生しピークに到達し、匂い刺激終了後直ちに応答が収束する高速な反応過程である。高速イメージングにより匂いに対する cAMP 応答を高い時間分解能で動態解析したところ、培養細胞では生体同様に匂い刺激後 0.1 秒程度で cAMP 産生が活性化されるが、生体の急速な反応とは異なり緩やかな濃度上昇を示し、匂い刺激終了後も 10 秒以上にわたり cAMP 濃度上昇が持続する反応過程であることがわかった。このような持続的な応答動態は、反応速度論に基づく cAMP 生合成過程のシミュレーションでも再現できた。つまり生体の嗅神経細胞には、培養細胞には備わっていない、cAMP 応答を高速化する独自の分子機構は備わっていることが示唆された。

3) カイコガ果糖受容体の立体構造モデルを構築し、嗅覚と異なって感度が低い味覚のリガンド認識機構について報告した (Morinaga et al., 2022)。カイコガ果糖受容体は嗅覚受容体と構造の類似性があるため、報告されている嗅覚受容体の立体構造を元に果糖受容体の構造モデルを構築した。このモデルと遺伝子再構成系での応答を検討することで、受容体の果糖認識に関わるアミノ酸領域を絞り込んだ。

(4) 細胞外物質と匂い物質との相互作用を詳細に解析するため、これまでに人工環境下で匂い物質を電気化学的に計測する技術を開発した。特に疎水性の匂い分子に対する電気化学応答を精密に取得するために、電極の種類を検討とその使用に関する計測法の最適化に重点を置いた。匂い分子としてバニリンおよびその誘導体を複数種計測した。その結果、細胞外物質の有無により酸化還元電流の増大が観察され、また分子の種類によってその効果の有無も確認できた。

さらに、多様な匂い物質に対する電気化学計測法の確立を継続し、新たに解析していた細胞外物質による酸化電流の増大効果がより顕著に現れる新規化合物を見出した。この電気化学計測法を用いて、10 種類を超える疎水性匂い物質の検討を行い、粘液モデル溶液における応答増強が *in vitro* でも確認された。特に、特定の化学構造を持つ分子に関しては、その効果が高いことを明らかにした。

(5) 哺乳類の生体上皮モデルとして、マウスおよびサルの消化管オルガノイドを導入し、*in vitro* において化学物質の応答取得のためのプラットフォーム構築を行なった。サイトカインと培地成分の条件を変化させることにより、最終分化した内分泌細胞や Tuft 細胞などのセンサー細胞を得ることが可能となった。オルガノイドは3次元であるため、2次元平面培

養に培養系を変更し分化誘導させることに成功した。分化誘導された杯細胞は、カルバコー
ル刺激に対して粘液を分泌することが確認された。哺乳類の上皮細胞が産生する粘液を
入手することが難しかったが、上記システムにより粘液物質を調達する目処がついた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tonooka Taishi, Osaki Toshihisa, Sato Koji, Kawano Ryuji, Takeuchi Shoji	4. 巻 334
2. 論文標題 Lipid bilayer on a microdroplet integrated with a patterned Ag/AgCl microelectrode for voltage-clamp fluorometry of membrane transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 129643 ~ 129643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2021.129643	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 -

1. 著者名 Morinaga Satoshi, Nagata Koji, Ihara Sayoko, Yumita Tomohiro, Niimura Yoshihito, Sato Koji, Touhara Kazushige	4. 巻 298
2. 論文標題 Structural model for ligand binding and channel opening of an insect gustatory receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102573 ~ 102573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102573	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有永 理峰、稲葉 明彦、今井 啓雄、佐藤 幸治、山根 拓実、大石 祐一、岩槻 健
2. 発表標題 サル小腸オルガノイドを用いた内分泌細胞誘導系の確立
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永敏史、永田宏次、伊原さよ子、新村芳人、佐藤幸治、東原和成
2. 発表標題 昆虫味覚受容体のリガンド結合およびチャネル開閉を説明する構造モデルの構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 幸治
2. 発表標題 魚類嗅神経細胞の電気的性質
3. 学会等名 Chemosensation and Behavior Workshop 2020
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Morinaga, Koji Nagata, Sayoko Ihara, Yoshihito Niimura, Koji Sato, Kazushige Touhara
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 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 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 Koji Sato
2. 発表標題 Top-down and bottom-up approaches for studying the molecular mechanism of olfaction
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤 幸治他 77名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 543
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〕

-

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)・教授 (12605)	
研究分担者	岩槻 健 (Iwatsuki Ken) (50332375)	東京農業大学・応用生物科学部・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
---------	---------