

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K14787

研究課題名(和文) TFTデバイスと昆虫嗅覚受容体を融合した高感度・大面積匂いバイオセンサの開発

研究課題名(英文) Development of a highly sensitive large-area TFT odorant biosensor based on insect odorant receptors

研究代表者

照月 大悟 (Terutsuki, Daigo)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：40821921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫嗅覚受容体を発現したSf21昆虫細胞(センサ細胞)と液晶技術に基づく薄膜トランジスタ(TFT)を融合し、匂い物質のパターン計測の基礎技術の開発を実施した。まず、3Dプリンタを用いて、センサ細胞への匂い刺激時の液面の揺れと、流路内への気泡侵入の抑制を両立する閉鎖型灌流カートリッジを開発し、安定的な刺激系の構築を行った。また、センサ細胞の応答検出を行うTFTデバイスの設計を実施した。加えて、細胞-電界効果トランジスタ型センサの中核となるSf21昆虫細胞の、基板上における接着状態を反射干渉顕微法(IRM)を用いて定量的に可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾病に関わる匂いや飲食物に含まれるカビ臭、麻薬・爆発物などの危険物に関わる匂いなど、種々の匂い物質を高感度・高選択的に検出する技術に対するニーズが高まっている。昆虫の優れた嗅覚系を活用した匂いセンサ素子であるセンサ細胞の匂い応答を、TFTデバイスによって電気計測を行うことは、細胞にダメージを与えず、オペレータの習熟度によらない測定が可能となり、新しいセンサ開発とその応用につながるため、学術的意義や社会的意義のいずれも大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, fundamental technology for pattern measurements of odorants was developed by integrating Sf21 insect cells expressing insect odorant receptors (sensor cells) and thin-film transistors (TFTs) based on liquid crystal display technology. First, a closed perfusion cartridge was developed that could mitigate the fluctuations in the liquid surface during the odor stimulation of sensor cells and prevent air bubbles from entering the flow channel. Second, a prototype TFT device was developed for detecting the responses of the sensor cells to odor. Finally, the adhesion dynamics of Sf21 cells on the substrate, the core of cell-coupled field-effect transistor biosensors, were quantitatively monitored using interference reflection microscopy (IRM).

研究分野：バイオセンサ

キーワード：薄膜トランジスタ 匂いセンサ 嗅覚受容体 昆虫細胞 匂いバイオセンサ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、疾病に関わる匂いや飲食物に含まれるカビ臭など、種々の匂い物質を高感度、高選択、リアルタイムに検出する技術へのニーズが高まっている。この潮流において、昆虫の優れた嗅覚系に着目した匂いセンサ素子の研究が展開されてきた。例えば、昆虫(カイコガ、キイロショウジョウバエなど)の嗅覚受容体を昆虫培養細胞に発現させ、蛍光インジケータであるカルシウム感受性蛍光タンパク質を導入して、匂い応答時に嗅覚受容体を通して流入するカルシウムイオンをカルシウムイメージングで検出する匂いセンサ素子(センサ細胞)が開発されている。このセンサ細胞と電界効果トランジスタ(Field-effect transistor; FET)デバイスを融合して、センサ細胞の匂い応答(陽イオン流入)を電気信号として検出する匂いセンサも構築されており、簡便かつ効率的な匂い検出技術の研究が盛んになっている。

2. 研究の目的

本研究では、液晶技術に基づく薄膜トランジスタ(Thin-film transistor; TFT)を用いることで、匂い物質の高感度測定とパターン計測が可能な細胞 - FET 型匂いバイオセンサの基礎技術の開発を行う。大面積基板が作製可能な TFT デバイスを用いることで、高感度かつ匂い物質のパターン計測が可能な匂いセンシング技術の構築につながり、革新的な匂い計測技術の創出が期待される。

3. 研究の方法

【安定的な匂い刺激系の構築】

センサ細胞 - FET 型匂いセンサによる計測では、匂い物質を有機溶媒によってアッセイバッファに溶解したサンプルを用いて細胞を刺激する。センサ細胞への匂い刺激の際、匂い物質がアッセイバッファに拡散することを防ぐため、匂い物質の前後に気泡を挟んで送液を行う。これは流路や観察部へ気泡を混入する可能性がある。また、チャンバー上部は液体の電位を一定にする参照電極を差しこむ必要があり、液面の揺れによるノイズの抑制の観点からも、カートリッジは閉鎖型とすることが望ましい。そこで、流路内への気泡侵入を抑制しながら、液面の揺れを低減してセンサの S/N 比を向上するため、一定の液量で刺激可能な閉鎖型カートリッジを 3D プリントを用いて構築した。本研究では、Autodesk Inventor Professional 2019 (Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA)を使用してカートリッジの 3D CAD モデルを設計した。3D プリントは、ProJet MJP 3600 MAX (3D Systems, Rock Hill, SC, USA)を使用した。プリント用の材料には、生体適合性のある紫外線硬化型アクリル樹脂(Visijet M3 Crystal, 3D Systems)を用いた。

【細胞・匂い物質】

本研究では、Sf21 昆虫細胞にキイロショウジョウバエの嗅覚受容体の 1 つである Or13a と、共受容体の Orco、カルシウム感受性蛍光タンパク質(GCaMP6s)を導入したセンサ細胞を用いた(以下、Or13a 細胞と表記)。Or13a は、1-オクテン-3-オール(カビ臭の一種)に強く応答する嗅覚受容体である。細胞培養は昆虫培地(Invitrogen, CA, USA)を用いて、インキュベータ内(27 °Cに設定)で行った。Or13a 細胞に対する匂い刺激には、1-オクテン-3-オールを 0.1% のジメチルスルホキシド(DMSO; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を含有するアッセイバッファ(140 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 4.5 mM CaCl₂, 11.26 mM MgCl₂, 11.32 mM MgSO₄, 9.4 mM D-glucose, 5 mM HEPES, pH 7.2)に溶解したものをを用いた。

【カルシウムイメージング】

本研究では、カルシウムイメージングによってカートリッジ内の Or13a 細胞の匂いに対する応答を計測した。作製したカートリッジの入口と出口にチューブクランプで固定した金属チューブを接続した。内径 1 mm のシリコンチューブを金属チューブとポンプに接続し、0.1% DMSO 含有アッセイバッファを約 1.5 mL/min で灌流した。Or13a 細胞の蛍光強度変化は CCD カメラ(DU-897E; Andor Technology PLC, Belfast, UK)を備えた蛍光顕微鏡(BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan)によって計測した。

【細胞 - 基板間の接着界面観察手法】

本研究では、z 軸方向に~2 nm という高い分解能を持ち、細胞 - 基板間の距離をラベルフリーに測定可能な反射干渉顕微法(Interference reflection microscopy; IRM)を用いて、基板上に接着した「生きた」昆虫細胞の接着ダイナミクスを定量的に評価した。IRM は、試料 - 液体界面からの反射光と液体 - 基板界面の干渉を利用し、測定対象の物性を変化させる可能性のある蛍光標識が不要な、ラベルフリー手法として注目されている。

4. 研究成果

【閉鎖型カートリッジの気泡除去性能評価】

図 1 に、本研究で開発した閉鎖型カートリッジの CAD モデルと写真を示す。カートリッジ上部の観察領域に円形カバーガラス（直径：22 mm，厚さ：0.13–0.17 mm）を挿入し、O リングで固定した。液漏れを防止するため、観察領域の円形溝と円形カバーガラスとの間に O リングを設置した。カートリッジ下部にある固定部に角型カバーガラス（寸法：18×18 mm²，厚さ：0.13–0.17 mm）を取り付け、カートリッジ上部底面の円形溝に O リングを挿入した。M3 のアクリルネジでカートリッジの上部と下部を結合した。カートリッジの組立てた後、150 μL の懸濁液中の Or13a 細胞をカートリッジ内の角型カバーガラス上に播種して、室温（約 23–25 °C）で約 1 時間培養した。

3D プリント出力による閉鎖型カートリッジの特徴は、カートリッジ内部の広い流路に基づく高い気泡除去機能である。閉鎖型の細胞イメージング用チャンバーはいくつか市販されている。しかし、それらは気泡除去能力を備えず、気泡を防ぐために何らかの前処理、もしくは別途の装置が必要となる。本研究では、折れ曲がった流路構造とフラットな流路を持つカートリッジを開発した。入口側の金属チューブの先端は、カートリッジの入口孔に軽く接触させ、出口側の金属チューブの先端は出口孔に 0.5–1 mm 挿入した状態で匂い刺激と溶液の灌流を行う。

カートリッジの気泡除去メカニズムを以下に説明する。入口側の液面は、灌流中に一定の最大液面と最小液面の高さで変動している（図 2a）。この場合、入口から入る気泡は水平方向のフラットな流路を通過することができず、細胞を播種した観察領域に到達しない。そのため、気泡は縦方向の流路もしくはカートリッジの外部で破裂する（図 2b）。灌流中はこの挙動が繰り返される。出口側の液面は、縦方向の流路に向かって上昇するが、出口側のポンプ流量を入口側より大きい値（2.0–2.5 mL/min）に設定することで、出口側の液面は金属チューブ先端の高さを超えることはなく、灌流が継続される。これにより、観察部の液量を一定に保った灌流と、安定的な細胞への匂い刺激を両立したシステムを構築した。本システムは、蛍光計測や電気計測など、様々なセンサデバイスに組み込むことが可能であり、3D プリント出力による迅速な製造が可能となる点も実用上重要な利点となる。

開発した閉鎖型カートリッジを用いて、Or13a 細胞のカルシウムイメージングを行った。その結果、Or13a 細胞の 1-オクテン-3-オールに対するドーズレスポンスプロファイルは、液面の揺れによるノイズや気泡侵入の影響を受けず、蛍光強度変化が明確に検出されたことから、カートリッジがセンサ細胞の計測に利用できることが示された。今後は、閉鎖型カートリッジと TFT デバイスの統合を実施する。

【Sf21 昆虫細胞 - 基板間の接着界面観察】

IRM による接着ダイナミクス観察の結果、Sf21 昆虫細胞は特徴的なリング状の接着構造を示し、その接着面積は時間経過とともにシグモイド状に急激に増加することが示された（図 3a）。これは哺乳類由来の HEK 細胞と比較して非常に大きく、Sf21 昆虫細胞の接着ダイナミクスが哺乳類細胞と明確に異なることが示された（図 3b）。次に、観察された Sf21 昆虫細胞の接着ダイナミクスの由来を明らかにすることを試みた。昆虫細胞表面のゼータ電位を測定したところ、HEK 細

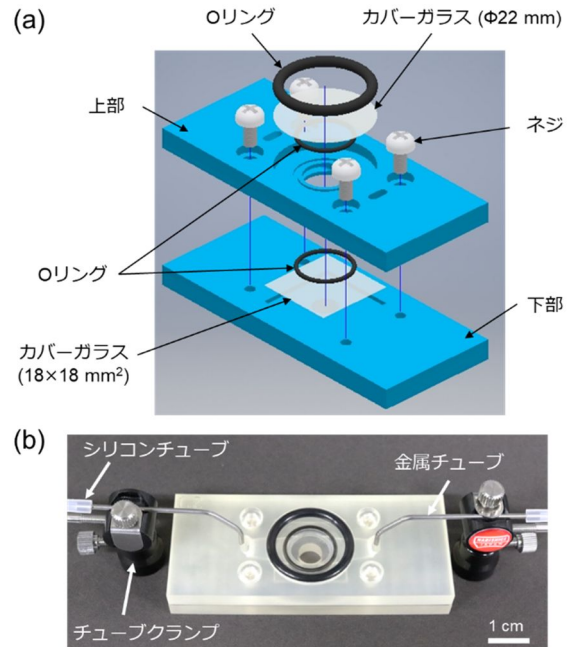


図 1 (a) 閉鎖型カートリッジの CAD モデル。(b) 3D プリント出力した閉鎖型カートリッジの写真（シリコンチューブ、チューブクランプ、金属チューブを含む）。

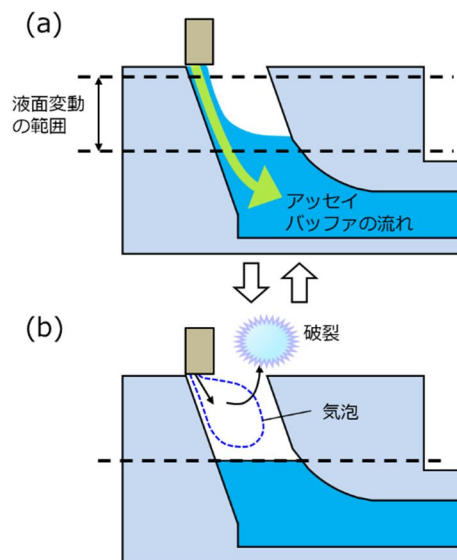


図 2 閉鎖型カートリッジの気泡除去メカニズム。(a) 閉鎖型カートリッジを流れるアッセイバッファ。(b) 入口部における気泡除去の模式図。

胞よりも弱い負電位を示したことから、Sf21 昆虫細胞の表面には、電位の低い糖鎖の集合体が存在することが示唆された。この糖鎖を分解する酵素で細胞表面を処理したところ、リング状の接着構造が消失することが観察された。よって、Sf21 昆虫細胞の接着は、低い表面電位を持つ表面特異的な糖鎖によって制御されていることが示された。

細胞 - FET 型匂いセンサでは、細胞と電極表面の距離が電気信号の伝達効率に重要な役割を果たす。よって、哺乳類細胞を用いた細胞 - FET 型デバイスよりも、安定で強い接着力を持つ昆虫細胞を匂いセンサ素子とする方が、信号検出に有利であることが示唆された。さらに、IRM に基づく「生きた」細胞の接着界面の可視化は、実際の接着界面を考慮した効率的なデバイス開発につながると期待される。

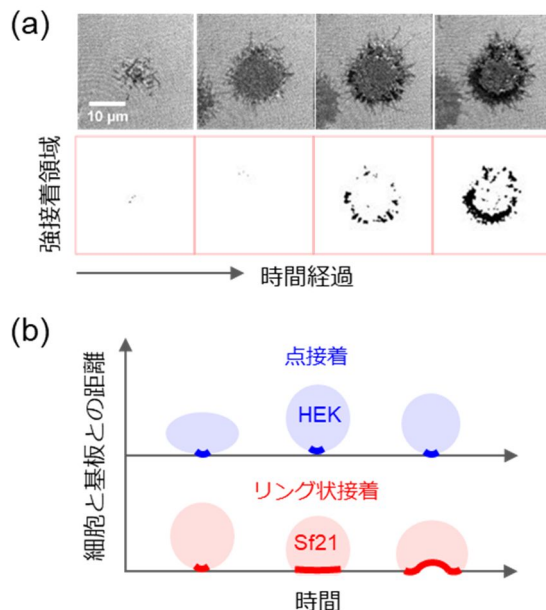


図 3 (a) IRM を用いて観察した Sf21 昆虫細胞と基板の接着状態の経時変化。(b) 哺乳類細胞と昆虫細胞の接着状態の違いの模式図。

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 2件）

1. 著者名 Terutsuki Daigo, Mitsuno Hidefumi, Kanzaki Ryohei	4. 巻 20
2. 論文標題 3D-Printed Bubble-Free Perfusion Cartridge System for Live-Cell Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 5779 ~ 5779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s20205779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Takahisa, Terutsuki Daigo, Sato Shoma, Ikarashi Kohei, Sato Kohei, Mitsuno Hidefumi, Okumura Ryu, Yoshimura Yudai, Usami Shigeyoshi, Mori Yusuke, Fujii Mai, Takemi Shota, Nakabayashi Seiichiro, Yoshikawa Hiroshi Y., Kanzaki Ryohei	4. 巻 13
2. 論文標題 Low Surface Potential with Glycoconjugates Determines Insect Cell Adhesion at Room Temperature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 9494 ~ 9500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c01673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤奨真, 照月大悟, 中林誠一郎, 吉川洋史, 松崎賢寿
2. 発表標題 反射干渉法による昆虫細胞に固有な接着機構の定量解明
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 照月大悟
2. 発表標題 昆虫嗅覚を活用した匂いセンサ・バイオハイブリッドローンの現状と展望
3. 学会等名 電気化学会 電子材料委員会, 第85回半導体・集積回路技術シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤奨真, 照月大悟, 吉川洋史, 松崎賢寿
2. 発表標題 光干渉法昆虫細胞の接着機構の解明～高感度な生きた匂いセンサーへの応用を目指して～
3. 学会等名 応用物理学会関西支部75周年記念講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎賢寿, 照月大悟, 佐藤奨真, 吉川洋史
2. 発表標題 室温における生きた昆虫細胞の接着界面の可視化～バイオハイブリッド匂いセンサーへの応用を目指して～
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023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

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