

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19107

研究課題名（和文）昆虫嗅覚受容体を発現させた細胞による匂いセンシングシートの開発

研究課題名（英文）Development of a cell sheet for odorant detection using insect olfactory receptor-expressing sensor cells

研究代表者

神崎 亮平（Kanzaki, Ryohei）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：40221907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫の嗅覚受容体を発現させた「センサ細胞」を用いて気相対象臭の簡便な検査技術の実現を目指し、センサ細胞を保持した細胞シートを作製して対象臭に蛍光応答を示す匂いセンシングシートの開発を試みた。センサ細胞をガラス基板上に固定し保持することで細胞シートを作製する手法を確立した。作製した細胞シートを小型フルオロメータで計測することで気相対象臭に蛍光応答を示すことを実証した。これにより、センサ細胞による匂いセンシングシートの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の嗅覚受容体を発現させた「センサ細胞」は対象臭成分を検出できる一方、その実用化のためにはセンサ細胞の応答をより簡便に計測する技術の確立が課題であった。本研究により、センサ細胞を活用した匂いセンシングシートの開発技術を確立し、気体を提示するだけで簡便に対象臭を検出できることを実証した。これにより、センサ細胞を活用した対象臭の簡易検査が可能となり、センサ細胞の実用化への一つの道筋ができたことは学術的・社会的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：To achieve a simple technology for testing gas-phase odorants using insect olfactory receptor-expressing sensor cells, we attempted to develop odorant sensing cell sheets that show fluorescent response to target odorants. We established a method to construct cell sheets by immobilizing sensor cells onto a glass substrate. We demonstrated that the constructed cell sheets showed fluorescent responses to target odorants in the gas phase by measuring them with a compact fluorometer. Thus, we succeeded in developing odorant sensing cell sheets using sensor cells.

研究分野：神経行動学

キーワード：匂いバイオセンサ 細胞シート 昆虫 嗅覚受容体

1. 研究開始当初の背景

匂いによる農作物の病虫害検知や疾病検査など安全、安心な生活のために、対象物から発生するごく微量の匂い物質を検知するセンシング技術が求められている。このようなニーズに対応するための匂いセンシング技術の一つとして、生物の嗅覚が注目されている。特に研究代表者らは、高感度かつ選択的に対象の匂い(対象臭)を検出する昆虫の嗅覚に注目してきた。

昆虫は、大気中の多様な匂い物質を検出して生存している。昆虫はその触角に嗅覚受容体を備え、それらの嗅覚受容体を使ってさまざまな匂い物質を検出している。研究代表者らは、昆虫の嗅覚受容体に着目してその機能を再構築したセンサ細胞を匂い検出素子として利用する技術を確立してきた^[1]。センサ細胞は、嗅覚受容体と共受容体(Olfactory receptor co-receptor; Orco)をカルシウム感受性蛍光タンパク質(GCaMP)とともに、共発現させた Sf21 細胞であり、発現させた嗅覚受容体の特性に従って対象臭に蛍光強度変化を示す^[2]。これまでに、センサ細胞を活用した匂いセンシング技術の一つとして、センサ細胞をガラス基板上に固定した細胞固定化カートリッジを小型フルオロメータと統合することで、溶液に含まれる対象臭成分を検査する簡易検査キットを開発してきた^[3]。水道水に混入するカビ臭成分であるジェオスミンを検出するセンサ細胞を用いることで、水道水源の現場でジェオスミン検査が可能であることを明らかにしてきた(図1)。このように、センサ細胞は現場でも十分にその機能を発揮できることから、その活用技術さえ確立すれば、センサ細胞を実用的な匂いの検知に利用できる可能性が高い。しかし、現在のセンサ細胞による検出技術は、細胞を溶液中に保持して計測しなければならないことから細胞の維持や培養に専門的なスキルが必要であり、実用化の観点で障壁がある。

このような状況のなか、予備実験として再生医療や細胞工学で使用されるヒドロゲル中に封入して、細胞内の蛍光タンパク質の観察が可能であることが分かってきた。しかしながら、センサ細胞をヒドロゲル中に封入して匂い応答を計測する技術が開発された例はない。センサ細胞を固定・保持した細胞シートを開発しその応答性を検証することができれば、匂い検出が可能なセンシングシートとして、簡便にセンサ細胞を使って対象臭検知が可能な実用的な検出技術を確立できることが期待される。これにより、対象物から発生する臭気成分の検出を通して、匂いによる農作物カビ病の早期発見や体調管理、疾病検査などの安心、安全な環境や社会の構築に貢献が期待される。

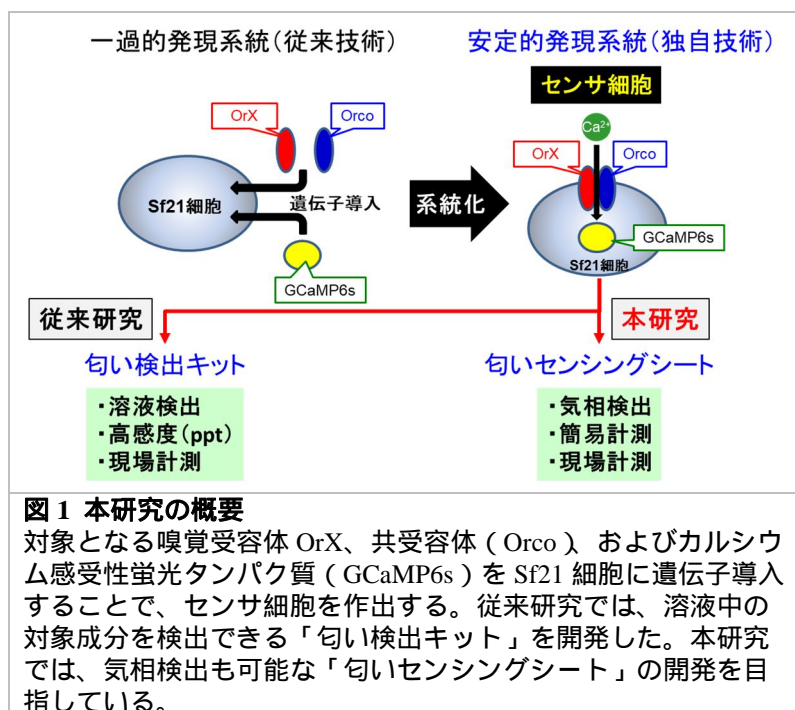
【参考文献】[1] Mitsuno et al., Biosens. Bioelectron., 65, 287 (2015). [2] Termtanasombat et al., J. Chem. Ecol., 42, 716 (2016). [3] 光野ら, PCT/JP2020/033831 (2020).

2. 研究の目的

昆虫の嗅覚受容体と Orco を GCaMP6s とともに機能発現させたセンサ細胞を作り出し、小型フルオロメータと組み合わせた匂い検出キットを開発することで、現場で溶液中に含まれるカビ臭を簡便に計測する手法を確立してきた。一方、センサ細胞の実用化のためには、より簡便にセンサ細胞に刺激を提示してその蛍光応答を取得する技術の確立が必要である。本研究では、対象臭を蛍光変化として可視化するセンサ細胞の実用化技術の一つとして、センサ細胞を固定、保持したシートを開発することにより、誰でも簡便に対象臭検知できるセンシング技術の基盤を確立することを目的とする。そして、実用的な検出例として、農作物のカビ病成分等を蛍光変化として検出できるシートを開発することによりセンサ細胞を活用した次世代センシング技術のシーズを確立する。

なお、本研究は、現在、特許出願を検討している内容を含むため、3. 研究方法、および4. 研究成果において特許出願に関連する内容を省いて記載した。

3. 研究の方法



対象となる嗅覚受容体 Orx、共受容体 (Orco) およびカルシウム感受性蛍光タンパク質 (GCaMP6s) を Sf21 細胞に遺伝子導入することで、センサ細胞を作り出す。従来研究では、溶液中の対象成分を検出できる「匂い検出キット」を開発した。本研究では、気相検出も可能な「匂いセンシングシート」の開発を目指している。

【センサ細胞と応答計測の準備】

昆虫の嗅覚受容体、Orco および GCaMP6s を共発現させたセンサ細胞を凍結保存から起こし、抗生物質(プラストサイジン、ゼオシン)とウシ胎児血清(FBS)を添加した Grace's Insect Medium を用いて 27°C で定期的に継代培養した。センサ細胞の固定化のために、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)を準備した。匂い物質は、ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて、試験濃度になるように溶解した。

【センサ細胞を固定した匂いセンシングシートの作製】

継代培養したセンサ細胞をガラス基板上に固定することで、匂いセンシングシートを作製した。ここでは、細胞固定化剤として、BAM(Biocompatible Anchor for Membrane)を用いた。BAMは Sf21 細胞の固定化に使用できることは確認している。まず、ガラス基板を BAM で処理して、対象となるセンサ細胞を固定した。次に、ヒドロゲルを用いてセンサ細胞を保持することで、匂いセンシングシートを作製した。作製したシートを対象臭に対する応答計測に使用した。センサ細胞は、すでに作出済みの Or13a センサ細胞を用いた。

【匂いセンシングシートの応答計測】

作製した匂いセンシングシートについて、対象臭に対する蛍光応答を取得した。対象成分を提示した際の蛍光強度変化を計測した。コントロールとして対象成分の溶媒として用いた DMSO、対象臭をシートに提示した際の蛍光強度変化をフルオロメータ Quantus で取得した。現在、異なる嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞を活用して、匂いセンシングシートを製作し、対象臭成分に対する応答の計測を進めている。

4. 研究成果

【センサ細胞を固定した匂いセンシングシートの準備】

センサ細胞をガラス基板上に固定・保持することで細胞シートを作製を試みた。まず、アフリカツメガエル卵母細胞や Sf21 細胞を用いた予備実験にもとづいて、センサ細胞を保持させるヒドロゲルとして低融点アガロースを選定した。次に、BAMを用いてガラス基板上にセンサ細胞を固定したのち、選定した低融点アガロースでセンサ細胞を保持することで、細胞シートを作製した。細胞シート内のセンサ細胞を倒立顕微鏡で観察したところ、ガラス基板上にセンサ細胞が固定した状態のまま保持されていることが確認できた。アガロースを使用しない場合、ガラス基板上のセンサ細胞は数分間の短時間で乾燥に至る一方、作製した細胞シートでは、少なくとも観察した 1 時間以上は乾燥することなくガラス基板上に保持できることを確認した。また、卓上型フルオロメータ(Quantus™ Fluorometer; プロメガ社)でセンサ細胞の蛍光強度を取得したところ、蛍光強度を数値として取得できることを確認した。これにより、センサ細胞を用いて作製した細胞シートで蛍光強度を取得できることを明らかにした。このように、センサ細胞を固定した細胞シートを準備した。

【匂いセンシングシートの応答計測】

細胞シートで対象となる匂い物質に対する蛍光強度変化の取得を試みた。ここでは、キイロシヨウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の嗅覚受容体である Or13a を機能発現させたセンサ細胞を用いて、細胞シートを作製した。Or13a センサ細胞は 1-オクテン-3-オールに対して蛍光応答を示す。作製した細胞シートを卓上型フルオロメータに設置して、1-オクテン-3-オールを塗布したる紙由来の揮発成分を導入して蛍光強度変化を取得した。その結果、溶媒である DMSO を塗布したる紙では蛍光強度の上昇が確認できない一方、1-オクテン-3-オールを塗布したる紙では蛍光強度の上昇が確認できた(図 2)。同じ手法に従って作製した複数の細胞シートについても同様に、1-オクテン-3-オールの揮発成分に対して蛍光強度変化を示すことを明らかにし、細胞シートが対象成分に対して蛍光応答を示す匂いセンシングシートとして使用できる可能性を示した。

また、匂いセンシングシートを現場に導入し対象臭の検出に利用できるかどうかを検証した。

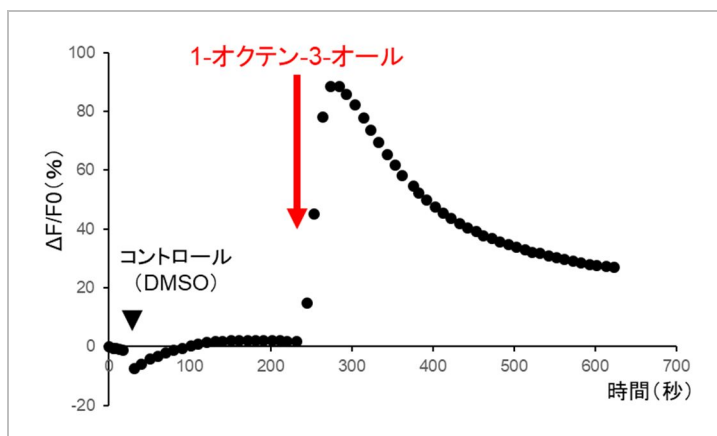


図 2 匂いセンシングシートによる気相計測

Or13a センサ細胞を用いた作製した匂いセンシングシートの計測結果を示す。ネガティブコントロール(DMSO)と比較して、対象成分を含むサンプルに対して蛍光強度が増加していることが分かる。矢印は刺激を添加したタイミングを示す。

ここでは、現場として所属研究室外の実験室において細胞シート作製して対象臭に対する蛍光応答を取得した。その結果、当該実験室でも細胞シートを作製することが可能であり、作製した細胞シートで揮発した対象臭に対する蛍光応答を取得できることを示した。これにより、作製した匂いセンシングシートを現場に導入して対象臭を検出できる明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 光野秀文、祐川侑司、荒木章吾、二木佐和子、黒田枝里、山平真也、山口哲志、櫻井健志、長棟輝行、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体発現センサ細胞による対象成分の簡易検査技術の開発
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 祐川侑司、二木佐和子、黒田枝里、神崎亮平、光野秀文
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体発現センサ細胞を複数種類用いたセンサアレイによる農作物カビ病由来成分の識別手法の検討
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 二木佐和子、祐川侑司、黒田枝里、神崎亮平、光野秀文
2. 発表標題 キイロショウジョウバエ嗅覚受容体遺伝子を導入したSf21細胞の系統化による高応答細胞株の獲得
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Zhou R., Sukekawa Y., Kanzaki R., Namiki S., Mitsuno H.
2. 発表標題 Evaluation of odorants discrimination of Drosophila odorant receptor Or13a-expressing sensor cell by a high-throughput system
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 祐川侑司、中條卓也、神崎亮平、光野秀文
2. 発表標題 昆虫触角電図法に基づく携帯型匂い検出センサ用アンプの基礎検討
3. 学会等名 令和6年電気学会全国大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 光野秀文、祐川侑司、櫻井健志、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞による匂いセンシング技術の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会東京大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 祐川侑司、光野秀文、二木佐和子、黒田枝里、神崎亮平
2. 発表標題 キイロシヨウジョウバエOr98a 発現センサ細胞のカビ由来成分に対する応答性評価
3. 学会等名 第40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 2023年

1. 発表者名 Mitsuno H., Sukekawa Y., Niki S., Kuroda E., Kanzaki R.
2. 発表標題 Simplified geosmin detection system with sensor cells expressing insect olfactory receptor.
3. 学会等名 Bio4Apps2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sukekawa Y., Niki S., Kuroda E., Kanzaki R., Mitsuno H.
2. 発表標題 Development of odorant biosensor using insect olfactory receptors for the detection of mold odorants utilizing an array of sensors.
3. 学会等名 Bio4Apps2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mitsuno H., Sukekawa Y., Niki S., Kuroda E., Sakurai T., Kanzaki R.
2. 発表標題 A method for developing novel odorant-responsive sensor cells using a cell line stably expressing insect olfactory receptor and co-receptor complex.
3. 学会等名 33rd Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sukekawa Y., Mitsuno H., Kuroda E., Kanzaki R.
2. 発表標題 High-throughput screening of insect odorant receptor responses and its application to odorant discrimination technology using a combination of receptors: Proof-of-concept.
3. 学会等名 33rd Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 祐川侑司、光野秀文、二木佐和子、黒田枝里、神崎亮平
2. 発表標題 蛍光プレートリーダーシステムを用いた虫嗅覚受容体センサアレイによるカビ複合臭判定手法の検討
3. 学会等名 ケミカルセンサ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 祐川侑司、光野秀文、二木佐和子、黒田枝里、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体を発現させたセンサ細胞による農作物カビ病に由来する複合臭の検出手法の評価
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会第67回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤健斗、光野秀文、櫻井健志、藤井毅、松山茂、神崎亮平
2. 発表標題 カイコガにおけるボンピコール異性体((E,E)-10,12-hexadecadien-1-ol)の性フェロモン受容体の応答低減効果
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会第67回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 光野秀文、祐川侑司、二木佐和子、中條卓也、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫の嗅覚受容体-共受容体の応答を阻害する薬剤スクリーニング法の開発
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 祐川侑司、光野秀文、黒田枝里、神崎亮平
2. 発表標題 昆虫嗅覚受容体の匂い応答データベース構築に向けた大規模スクリーニング
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 光野秀文, 祐川侑司, 二木佐和子, 中條卓也, 神崎亮平
2. 発表標題 嗅覚の分子機構から探る害虫制御のための新規化合物探索手法の提案
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 光野秀文
2. 発表標題 昆虫の嗅覚からセンサ開発への応用
3. 学会等名 香り・におい・ガスセンサー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

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 スズメカ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

〔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	光野 秀文 (Mitsuno Hidefumi) (60511855)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授 (12601)	

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	祐川 侑司 (Sukekawa Yuji) (60881969)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教 (12601)	

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