

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23656174

研究課題名（和文） ラットの培養神経細胞に昆虫の嗅覚受容体を発現させた匂いセンサー

研究課題名（英文） Dissociated neuronal culture of rats expressing insect odorant receptors as an odorant sensor

研究代表者

高橋 宏知 (TAKAHASHI, HIROKAZU)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：90361518

研究成果の概要（和文）：

従来の匂いセンサーは、生体の嗅覚系と比べると、感度、識別できる匂いの種類、及び応答時間の点で大きく劣る。生体の優れた匂い識別は、嗅覚受容体の非常に高感度な分子認識能力と、神経回路による情報処理によって実現すると考えられている。本研究は、このような生体の優れた匂い識別機構に注目し、昆虫の嗅覚受容体をラットの神経細胞へ発現させた匂いセンサーを提案する。このような生体材料を組み合わせることの利点は、容易な機能発現、センサーの寿命の長期化、嗅覚受容体が発生した微弱なイオン電流から容易に計測できる活動電位への匂い信号の増幅機能である。カイコガのフェロモン受容体と共受容体（BmOR1とBmOrco）をリポフェクション法でラットの神経細胞の初代分散培養系へ発現させたところ、発現効率は8%で、受容体は膜表面への局在を示した。カルシウムイメージングでは、匂い物質刺激に対して、嗅覚受容体を発現した細胞と発現していない細胞は、共に濃度依存的なカルシウム応答を示した。これらの結果は提案したセンサーの実現可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：

Artificial odorant sensors generally perform poorer than olfactory systems in living organisms. The excellent performances of living odorant systems are achieved by the molecular recognition abilities of odorant receptors and the neuronal information processing that follows. To take advantages of this, here we propose a novel hybrid odorant biosensor by means of expressing ionotropic odorant receptors of insects into dissociated neuronal cultures of rodents. This combination of materials brings significant advantages such as easy functional expression, prolonged lifetime, and an ability to amplify the weak ionic currents of odorant receptors. In the present work, pheromone receptors and co-receptors of silkworm, i. e., BmOR1 and BmOrco, were expressed in neuronal cultures via liposome transfection. Consequently, BmOR1 and BmOrco were co-expressed in 8% of neuronal cells, and both receptors were co-localized on a cell membrane. In Ca⁺⁺ imaging experiments, synchronous increase of calcium signals at the presentation of BOL was found in both transfected cells and non-transfected cells in a dose-dependent manner. These results provide the proof-of-concept of the proposed hybrid odorant biosensor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロ・ナノメカトロニクス

1. 研究開始当初の背景

生体の高感度で、多様な、かつ優れた匂い識別は、嗅覚受容体の非常に高感度な分子認識能力と、神経回路による情報処理によって実現されると考えられている。本研究は、このような生体の優れた匂い識別機構に注目し、昆虫の嗅覚受容体をラットの神経細胞へ発現させた匂いセンサーを提案する。

昆虫の嗅覚受容体を用いる利点は、容易に機能発現を実現できる可能性が高いことにある。これは、昆虫の嗅覚受容体がイオンチャネルと一体型であるという最近の知見による。一方、哺乳類の嗅覚受容体は G タンパク質結合型で、匂い物質の受容部とイオンチャネル部が分離している。そのため、イオンチャネルを開くためには、複雑な細胞内カスケードを経なくてはならない。

本研究は昆虫の嗅覚受容体として、カイコガ *Bombyx mori* のフェロモン受容体に注目した。同受容体の機能は、アフリカツメガエル卵母細胞で詳細に調べられている。カイコガのフェロモン受容体は **BmOR1** と **BmOR3** の 2 種類で、それぞれ、フェロモン物質のボンビコールとボンビカールに対して高い選択性を示す。なお、これらの受容体は、共受容体の **BmorOrco** と複合体を形成し、非選択的のカチオンチャネルとして働く。また、本研究は、嗅覚受容体を導入する培養細胞として、神経細胞の分散培養系を用いる。その利点として、第一に、神経細胞の寿命は通常の細胞より長いため、センサーの寿命を長期化できる可能性がある。神経細胞の多くは、一個体の一生を通して置き換わらないため、個体と同程度の寿命を有する。一方、通常の細胞は、一個体の一生を通して何度も置き換

わるため、数日から数週間と比較的短い寿命しかもたない。第二の利点として、神経細胞は、嗅覚受容体が発生した微弱なイオン電流から、容易に計測できる活動電位へと、匂い信号を増幅するプリアンプとして利用できる。

2. 研究の目的

本研究は、これらの利点を生かし、昆虫の嗅覚受容体をラットの神経細胞へ発現させた匂いバイオセンサーを提案し、その実現可能性を示す。

3. 研究の方法

まず初めに、嗅覚受容体が細胞膜上で発現していることを確認するために、共焦点顕微鏡による蛍光観察を行った。次に、免疫化学染色を用いた蛍光観察によってトランスフェクション効率を見積もった。さらに、RT-PCR 反応により m-RNA レベルでの嗅覚受容体の発現を確認した。続いて、Ca イメージングにより、発現した嗅覚受容体が機能的であるかを調べた。さらに、Ca イメージングと活動電位の関係を、神経細胞の自発発火から調べることで、嗅覚受容体を導入した細胞が活動電位を生成している可能性を調べた。

4. 研究成果

提案した匂いバイオセンサーの実現可能性を検討するため、リポフェクション法で、ラット神経細胞の分散培養系にカイコガのフェロモン受容体の遺伝子導入を試みた。その結果、フェロモン受容体と共受容体の遺伝子発現効率は 8%程度だった。さらに、フェロモン受容体と共受容体に融合させた蛍光タンパク質を、共焦点顕微鏡で観察したところ、共に細胞膜上へ極在していた。また、フ

フェロモン受容体と共受容体を導入した培養神経細胞に RT-PCR 反応を行ったところ、フェロモン受容体と共受容体の mRNA レベルでの発現が確認された。次に、カルシウム応答を計測した結果、フェロモン受容体を発現した神経細胞はもとより、発現していない神経細胞もフェロモン刺激に対して同期したカルシウム応答を示した。つづいて、フェロモン受容体を発現した神経細胞が、発現していない細胞へカルシウム応答を伝搬することを確認するため、シナプスブロッカー (CNQX、APV、BMI) 存在下と、シナプスブロッカー非存在下でのカルシウム応答を調べた。その結果、シナプスブロッカー非存在下ではフェロモン受容体を発現した神経細胞だけでなく、発現していない細胞も同期したカルシウム応答を示した。一方、シナプスブロッカー存在下ではフェロモン受容体を発現した神経細胞のみがカルシウム応答を示した。

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 Hirokazu Takahashi, Takeshi Sakurai, Hideo Sakai, Douglas J Bakkum, Jun Suzurikawa, Ryohei Kanzaki: “Light-addressed single-neuron stimulation in dissociated neuronal cultures with sparse expression of ChR2.” Biosystems 107 (2): pp. 106-112, 2012, 査読有

② Norio Tanada, Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Douglas J Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi: Dissociated neuronal culture expressing ionotropic odorant receptors as a hybrid odorant biosensor - proof-of-concept study -. Analyst, in press, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① Norio Tanada, Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi: “Feasibility study of odor biosensor using dissociate neuronal culture with gene expression of ionotropic odorant receptors.” Proceedings of the 26th Symposium on Biological and Physiological Engineering (BPES 2011) (第 26 回生体生理工学シンポジウム講演論文集): pp. 123-127, 2011 年 9 月 21 日, 草津

② Norio Tanada, Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi: “Feasibility study of odor biosensor using dissociate neuronal culture with gene expression of ionotropic odorant receptors.” Abstracts of 8th IBRO World Congress of Neuroscience: A084, 14th. jul. 2011, Florence, Italy

③ Norio Tanada, Takeshi Sakurai, Hidefumi Mitsuno, Douglas Bakkum, Ryohei Kanzaki, Hirokazu Takahashi: “The feasibility study of novel odor biosensor using dissociate neuronal culture expressing ion channel built-in odor receptors.” The 34th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第 34 回日本神経科学大会): 2011 年 9 月 14 日、横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.brain.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏知 (TAKAHASHI, HIROKAZU)
東京大学・先端科学技術研究センター・
講師

研究者番号 : 90361518

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :