

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25年5月30日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24656253

研究課題名（和文） 嗅覚受容体を用いた匂いの記録再生システムの萌芽研究

研究課題名（英文） Challenging Exploratory Study of Odor Recorder Using Olfactory Receptors

研究代表者

中本 高道 (Nakamoto Takamichi)

東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20198261

研究成果の概要（和文）：本研究では昆虫の嗅覚受容体を用いた匂いセンシングに用いて、香りを記録する基礎的な研究を行った。その中で匂いのセンシングに用いるセンサ素子はシステムの性能を左右し重要である。本研究では哺乳類に比べて仕組みが簡素な昆虫の嗅覚受容体を用いた。キイロショウジョウバエの触角で機能する嗅覚受容体遺伝子を、カルシウム感受性蛍光タンパク質遺伝子とともに Sf21 細胞に遺伝子導入し、抗生物質でスクリーニングすることで、5種類の嗅覚受容体を安定に発現する細胞系統（安定発現系統）を樹立した。光学イメージングによりこれら細胞系統はそれぞれ異なる匂い物質を異なる蛍光強度変化量で検出できることを示した。また、各濃度の匂い物質に対する細胞系統の蛍光応答を測定し、匂い物質の濃度情報を蛍光強度変化量として検出できることを示した。これにより、樹立した細胞系統が一般臭の種類及び濃度情報を蛍光強度の変化量として検出可能な匂いセンサ素子として利用できることを示した。

また、蛍光強度の簡便な測定システムを検討した。測定セルを製作しパワーLED から励起光を細胞に照射し、光学フィルタを介してフォトディテクタで蛍光を検出する実験系を作成し、蛍光ビーズや細胞で実験を行った。その結果、パワーLED では十分な光量を確保できなかったが、レーザを用い照射方法を工夫すれば励起光から分離されて大きな蛍光強度が得られることがわかった。また、ショウジョウバエの匂い応答のデータベースを用いて少数の要素臭を調合することにより嗅覚受容体のセンサアレイの応答パターンを近似できるかをシミュレーションにより検討した。

研究成果の概要（英文）：The fundamental study of an odor recorder using olfactory receptors of an insect was performed. Especially, sensor devices are important since they influence the performance of the odor recorder very much. We used the olfactory receptors of the insect since their mechanism is much simpler than that of a vertebrate. In this study, we established the cell systems with the stable expressions of five olfactory receptors by transferring drosophila olfactory-receptor gene into Sf21 cell together with the gene of fluorescent protein sensitive to calcium, followed by the antibiotic screening. The optical imaging reveals that the odor concentration can be measured using fluorescent response of each cell system to odorant. Thus, it was found that the established cell system can be used as a sensor component.

Then, we studied the simple fluorescent measurement system. We fabricated the measurement cell, where a power LED illuminated the cells and their fluorescence was detected by a photo detector via an optical filter. Although we performed the experiments on fluorescent beads and the cells, it was found that the light intensity from the power LED was insufficient. However, the large fluorescent intensity was obtained when we used a laser and improved the illumination method. Moreover, we investigated the feasibility of odor approximation by blending several odor components by simulation when we used the responses of multiple olfactory receptors to odorants accumulated in the database.

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	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：センシングデバイス

1. 研究開始当初の背景

匂いの記録再生システムは匂いセンサを用いて匂いをセンシングして記録し、嗅覚ディスプレイにより記録した匂いを再現するシステムである。匂いセンサは特性の異なる複数のセンサで構成され、対象臭に対する応答パターンがいくつかの要素臭を調合した調合臭に対するパターンと等しくなるように調合臭の構成比を決める。いったん構成比を決めれば、それに基づいて多成分嗅覚ディスプレイにより香りを再現することができる。

分析機器で成分分析を行うのではなく、応答パターンをもとに迅速にレシピ決定を行い香りを再現する。ビデオカメラで映像を撮影して記録しすぐに再生できるのと同じように香りについても自由に記録再生を行えるようにするシステムを世の中に送り出したい。匂いの記録再生システムを汎用的に使用できるようにするには、匂いセンサ部分の性能向上が必須である。そこで、本研究では匂いの記録再生システムの性能向上のために、生物の嗅覚受容体を用いた匂いセンサを導入する。

2. 研究の目的

匂いセンサの研究は国内外で多く研究されている。パターン認識が用いられている点は生物と同様であるが、センサ素子そのものは半導体ガスセンサなど人工的なセンサが主に用いられている。

申請者のグループは1999年に匂いの記録再生システムの提案を行い、果実臭の記録再生等を報告してきた。また、分担研究者の神崎は遺伝子操作により昆虫の嗅覚受容体を細胞に発現させて匂いバイオセンサを実現することを提案した。嗅覚受容体を使用したセンサの試みは他にもあるが実現性が不十分である。神崎は既に基礎実験に成功しており、この方法が最もセンサへの応用に近い。匂いの記録再生システムには優れたセンサ素子が必要である。一方、嗅覚受容体そのものをセンサとして利用する研究が近年開始されており、嗅覚受容体センサを用いることにより匂いの記録再生システムの性能が飛躍的に向上する可能性がある。

生物と同様の選択性の優れたセンサが利用できれば、匂いの記録再生システムで問題

となる多重共線性の問題を解決し同一のセンサアレイで多様な香りを記録できることが期待される。本研究では期間を1年に絞り、嗅覚受容体を用いた匂いの記録再生の原理検証を行い大規模な実験を行う前の萌芽研究を行った。

匂いの記録再生システムでは、センサアレイに対象臭を導入しその応答パターンを記録する。そして複数の要素臭を調合してその応答パターンと対象臭の応答パターンの類似性を測り、類似性が大きくなるように調合臭の構成比を逐次変更して応答パターンが一致したときの要素臭構成比を香りレシピとする。

ここで、センサ素子に嗅覚受容体を用いたセンサアレイを利用する。脊椎動物と比較して昆虫の嗅覚受容体は受容体とイオンチャネルが一体化しており、受容体はリガンドの認識とイオンフラックスの制御の両方の役割を持つ。そのために仕組みが簡素であり機能を実現しやすい。近年、遺伝子操作技術を用いて昆虫の嗅覚受容体を細胞に発現させることが可能になってきた。フェロモンだけでなく一般臭に関してもレセプタ機能を発現することが可能である。本研究では異なる受容体を別の細胞に発現させてセンサアレイを構成する。

3. 研究の方法

匂いの記録再生のためのセンサ素子として、5種類の異なる昆虫の嗅覚受容体を別々に発現する培養細胞系統（安定発現細胞系統）を樹立し、カルシウムイメージングにより各系統の匂いに対する応答変化が計測できることを確認する。昆虫培養細胞は近年嗅覚受容体の機能解析法として利用されてきており、嗅覚受容体の濃度依存的な応答変化を、細胞内イオン濃度の変化を指標とした蛍光イメージングにより観察できる。将来的には気相中の測定を行うが、本研究では基礎段階のために液相で原理検証を行う。光源から励起光を照射し光学フィルタを通して蛍光強度変化を光センサで検出する。

(1) 昆虫嗅覚受容体の遺伝子導入と安定発現系統の樹立

キイロショウジョウバエ生体触角の嗅覚受容細胞では、嗅覚受容体は補助タンパク質

である Orco (Olfactory receptor co-receptor) とともに発現し、カルシウムイオンを流入するイオンチャネル型受容体として機能する。本研究では、昆虫嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞を匂いセンサ素子として利用するため、昆虫の嗅覚受容体を Orco 及びカルシウム感受性蛍光タンパク質 (GCaMP3) とともに発現させた Sf21 細胞系統を樹立し、匂い物質に対して蛍光応答を示す細胞系統の作出を試みた。まず、キイロシヨウジョウバエ触角 totalRNA から対象とする嗅覚受容体遺伝子及び Orco 遺伝子を単離した。ここでは応答特性が明らかにされている一般臭を検出する嗅覚受容体 Or35a, Or43a, Or67c, Or82a, Or98a を対象とした (表 1)。単離した嗅覚受容体遺伝子及び Orco 遺伝子の翻訳領域は Sf21 細胞の発現ベクターである pIB/V5-His (Invitrogen) にサブクローニングし、2 遺伝子を同時に発現できるデュアル発現ベクターを構築した。同時に GCaMP3 遺伝子の翻訳領域を別の発現ベクターである pIZ/V5-His (Invitrogen) にサブクローニングした。これら 2 種類の発現ベクターを、cellfectin II (Invitrogen) を用いて、Sf21 細胞に遺伝子導入した。

次に長期間安定して匂い応答を示す細胞系統を樹立するため、昆虫嗅覚受容体、Orco 及び GCaMP3 を安定に発現する細胞系統 (安定発現系統) の樹立を試みた。pIB と pIZ にはそれぞれ抗生物質であるブラストサイジンとゼオシンの耐性遺伝子が組み込まれている。そこで、遺伝子導入した Sf21 細胞から抗生物質耐性遺伝子の発現を指標にしたスクリーニングを実施した。これにより抗生物質耐性遺伝子を発現する細胞に由来する細胞群 (コロニー) を単離した。単離したコロニーを徐々に培養スケールを拡大することで細胞系統を樹立した。樹立した細胞系統は -80°C で凍結保存した。

各細胞系統の導入遺伝子の発現は RT-PCR 法により確認した。細胞系統ごとに totalRNA を抽出し、導入遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて PCR を実施することで、導入遺伝子が転写されていることを確認した。これにより嗅覚受容体、Orco 及び GCaMP3 を安定に発現する細胞系統を樹立した。

(2) 嗅覚受容体を発現させた細胞系統の匂い検出性能の評価

匂いセンサ素子としての匂い検出能を調べるため、樹立した細胞系統の匂い物質に対する蛍光応答をカルシウムイメージング法により測定した。定期的に継代した細胞系統を計測チャンバ (WARNER INSTRUMENTS) に導入し、ペリスタポンプを用いて測定用リンガー溶液を 1ml/min の流速で還流させた。匂い物質はあらかじめ dimethyl sulfoxide (DMSO)

に溶解し測定用リンガー溶液に DMSO 濃度が 1% となるよう希釈し、還流系に添加することで細胞に供給した。細胞の蛍光応答は、480nm で励起し 510nm の蛍光画像を蛍光顕微鏡 (オリンパス) 及び高感度冷却 CCD カメラ (Andor) により取得した。取得した蛍光画像は画像解析ソフト (ImageJ; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて解析し、匂い応答時の蛍光強度変化量を算出した。各細胞系統の匂い物質に対する応答性及び濃度応答を測定することで匂いセンサ素子としての検出性能を評価した。

(3) 光センサを用いた光学計測システム

(2) では蛍光顕微鏡画像から蛍光強度変化量を算出するが、光センサにより簡便に測定できる計測システムについて検討した。光源から試料に光を照射し、光学フィルタで励起光をカットし蛍光のみをフォトダイオードに導く測定系を製作した。また、外乱光の影響を除くために、ロックイン計測法を用いた。

(4) 昆虫の嗅覚受容体を用いた匂い近似シミュレーション

シヨウジョウバエについては、受容体と匂い物質に関して系統的に測定されたデータベースが存在する。このデータベースを用いて、対象臭に対する嗅覚受容体センサアレイの応答パターンを少ない種類の要素臭を調合して近似するシミュレーションを NMF (Nonnegative Matrix Factorization) 法により行った。

4. 研究成果

(1) 昆虫嗅覚受容体の安定発現系統の樹立
安定して匂い検出が可能な匂いセンサ素子を作成するために、嗅覚受容体、Orco 及び GCaMP3 を安定に発現する細胞系統の樹立を試みた。キイロシヨウジョウバエの一般臭を検出する 5 種類の嗅覚受容体 (Or35a, Or43a, Or67c, Or82a, Or98a) を対象に、触角 totalRNA から各遺伝子を単離し、発現ベクターを構築し、Sf21 細胞に遺伝子導入した。Or35a, Or43a, Or67c, Or82a, Or98a を導入した Sf21 細胞から、抗生物質を利用したスクリーニングにより、それぞれ 8 コロニー、18 コロニー、24 コロニー、24 コロニー、6 コロニーを単離した (表 1)。単離したコロニーは徐々に培養スケールを拡大し、Or35a, Or43a, Or67c, Or82a, Or98a を導入した Sf21 細胞からそれぞれ 8 系統、4 系統、10 系統、10 系統、6 系統の継代可能な細胞系統を得た (表 1)。得られた細胞系統はすべて -80°C で凍結保存した (表 1)。

次に得られた細胞系統について RT-PCR により導入遺伝子の発現解析を実施した。RT-PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した結果、各細胞系統でそれぞれ導入した嗅覚

受容体遺伝子 (Or35a;1158bp, Or43a;1131bp, Or67c;930bp, Or82a;1092bp, Or98a;1164bp)、Orco 遺伝子(1461bp)、GCaMP3 遺伝子(1353bp)のバンドが確認された(図1)。以上の結果から得られた細胞系統は安定して導入遺伝子を発現することが分かり、これら細胞系統を安定発現系統として匂い検出性能の評価に用いた。

表 1. 使用した嗅覚受容体の種類と樹立した細胞系統の数

嗅覚受容体	選抜したコロニー数	継代可能な系統	凍結保存した系統
Or35a	8	8	8
Or43a	18	4	4
Or67c	24	10	10
Or82a	24	10	10
Or98a	6	6	6

(2) 嗅覚受容体を発現させた細胞系統の匂い検出性能の評価

キイロショウジョウバエの一般臭嗅覚受容体は110種類の匂い物質に対する応答特性が明らかにされている。本研究で用いた嗅覚受容体についても匂い応答特性が明らかにされており、Or35a, Or43a, Or67c, Or82a, Or98a はそれぞれ 1-octanol, 1-hexanol, ethyl lactate, geranyl acetate, 1-octen-3-ol に強く応答する。そこで、樹立した細胞系統について、これら匂い物質に対する蛍光強度変化をカルシウムイメージングにより測定した。

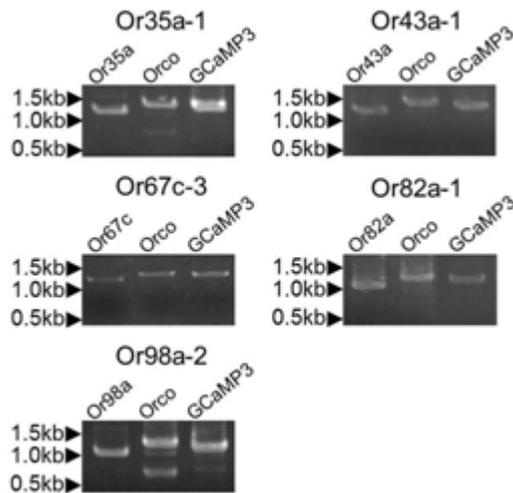


図 1. 各細胞系統における RT-PCR による遺伝子の発現解析。細胞系統の名称は、嗅覚受容体-系統名(例; Or35a-1)で表す。

GCaMP3 の蛍光が観察された細胞系統について、強く応答する匂い物質で刺激し、蛍光

強度変化を蛍光顕微鏡下で観察した(図2)。ここではまず細胞系統が匂い物質に反応するかどうかを確認するため、刺激とする匂い物質をそれぞれ 10mM となるように測定用リンガー溶液に希釈し細胞に添加した。蛍光応答の測定の結果、Or35a, Or43a, Or67c, Or82a, Or98a を導入した細胞系統のうち、Or35a-1 系統、Or43a-1 系統、Or67c-3 系統、Or82a-1 系統、Or98a-2 系統はそれぞれ強く応答する匂い物質に視野内の複数の細胞で 15%以上の蛍光強度変化を示した(図2)。

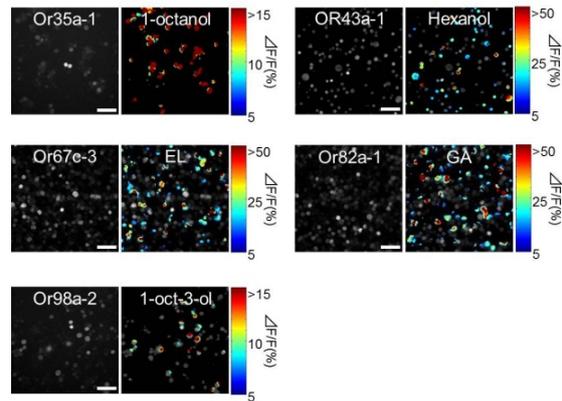


図 2. 匂い物質に対する各細胞系統の蛍光応答。各系統の右側に匂い物質を添加した際の蛍光強度変化を疑似カラーで表示した。カラーバーは蛍光強度変化の割合を表し、 $\Delta F/F$ (蛍光強度変化量)/ F (刺激前の蛍光強度) $\times 100$ (%) の値を表す。スケールバーは 100 μ m を表す。匂い物質の略称は ethyl lactate を EL、geranyl acetate を GA、1-octen-3-ol を 1-oct-3-ol で示す。

次に、一般臭嗅覚受容体を発現させた細胞系統が、受容体の匂い応答特性を再現し蛍光応答を示すかどうかを検証するため、様々な匂い物質に対する細胞系統の蛍光応答を取得・解析し、データベース (DoOR; Drosophila of Odorant Responses, <http://neuro.uni-konstanz.de/DoOR/content/DoOR.php>) で保管されている受容体の匂い応答特性と比較した。ここでは樹立した細胞系統のうち、多くの細胞が応答を示した Or35a 及び Or98a を発現する細胞系統 (Or35a-1, Or98a-2) を対象に様々な匂い物質に対する蛍光応答を測定した(図3)。カルシウムイメージングによる応答測定の結果、Or35a-1, Or98a-2 はそれぞれ 1-octanol, 1-octen-3-ol に強く応答することが分かった。またイメージングで取得した画像解析の結果、Or35a-1 系統は、各匂い物質(1-octanol, benzaldehyde, ethyl lactate, geranyl acetate) にそれぞれ 54.35%, 14.35%, 8.57%, 4.53%の平均蛍光強度変化量 ($\Delta F/F \times 100$ (%), n=10)、Or98a-2 系統は、各匂い物質(1-octen-3-ol, 1-pentanol, 1-butanol、

1-propanol) に 83.87%、8.63%、4.49%、2.42% の平均蛍光強度変化量 (n=7) を示した (図 3 左図)。キイロショウジョウバエ生体を用いた機能解析から算出された Or35a の応答の相対値は、1-octanol; 0.79、benzaldehyde; 0.44、ethyl lactate; 0.02、geranyl acetate; 0.00 (スパイク発火数の相対値) であり、Or98a の応答の相対値は 1-octen-3-ol; 0.63、1-pentanol; 0.24、1-butanol; 0.04、1-propanol; -0.02 であることが報告されている (図 3 右図)。これらの値と本研究で測定した値を比較したところ、作出した細胞系統の蛍光強度変化は、データベースの応答特性と類似することが分かった。このことから、樹立した細胞系統は生体での受容体の応答に従い蛍光強度変化を示していることが分かった。

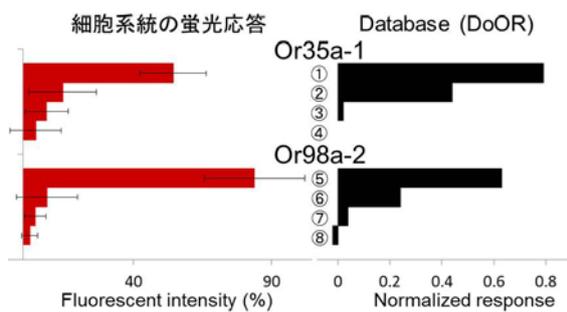


図 3. 細胞系統の匂い応答特性とデータベースの応答の比較。① 1-octanol、② Benzaldehyde、③ ethyl lactate、④ geranyl acetate、⑤ 1-octen-3-ol、⑥ 1-pentanol、⑦ 1-butanol、⑧ 1-propanol を表す。エラーバーは±標準偏差を示す。

次に、各細胞系統の濃度依存応答を測定した。ここでは Or67c 及び Or82a を発現する細胞系統 (Or67c-3、Or82a-1) を対象に各濃度の匂い物質 (1 μ M、10 μ M、100 μ M、1000 μ M) に対する蛍光応答を測定した。測定の結果、Or67c-3 は ethyl lactate に、Or82a-1 は geranyl acetate にそれぞれ 1 μ M から濃度依存的に蛍光強度を増加し応答することが分かった。このことから匂い物質の濃度情報を蛍光強度変化量として検出できることが分かった。

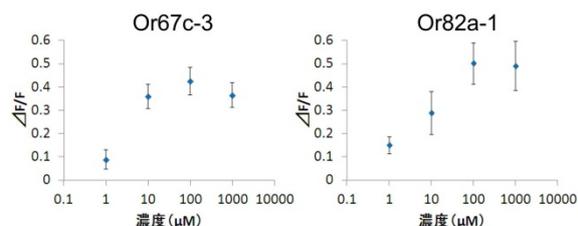


図 4. 細胞系統の濃度依存応答。各点は 10 細胞の平均値を示し、エラーバーは±標準偏差を示す。

以上の結果から、一般臭覚受容体、Orco 及び GCaMP3 を発現させた Sf21 細胞系統は、一般臭の種類及び濃度情報を蛍光強度の変化量として検出できる匂いセンサ素子として利用できることを示した。

(3) 光センサを用いた光学計測システム

蛍光検出実験を蛍光ビーズ及び細胞を用いて行った。励起光から蛍光を分離するのが難しく、光学フィルタを数枚重ねたり光学フィルタの種類を検討したり励起光用にショートパスフィルタを挿入したりしたが、十分な結果は得られなかった。また、励起光の照射方法の検討も行い、光源からの光が直接光学フィルタに当たらないようにした。

さらに、当初 LED 光源で実験を行っていたのをレーザー光源に変更した。そして、レーザーの場合、ビームが細く横から光を入射させた場合、ハウジングの底面にある細胞にうまく光を当てるのが難しかった。しかし、斜めから適切な角度でレーザー光を入射させると強い蛍光を観察することができた。今後、安定な励起光照射方法を検討することが課題である。

(4) 昆虫の嗅覚受容体を用いた匂い近似シミュレーション

キイロショウジョウバエの 24 種類の一般臭覚受容体に関して、110 種類の匂い物質に対する応答特性が明らかにされている。そこで、これらのデータから NMF (Nonnegative Matrix Factorization) 法により基底ベクトルを抽出し、これらの基底ベクトルにより嗅覚受容体応答空間を近似的に構成することを試みた。

簡単のために線形重ね合わせを仮定し、24 種類の受容体応答の興奮性と抑制性の応答を考慮して 48 次元のセンサ応答ベクトルを用意した。ベクトルのすべての要素は非負であり、応答の大きさを表す。基底ベクトル数 (要素臭の数) は 10 とした。その結果、10 種類程度の基底ベクトル数であっても NMF 法により収束することを確認した。そして、基底ベクトルも含めて一般臭に対する嗅覚受容体センサ応答ベクトルを階層的クラスタリングでそれらのデータ構造の解析を行った。距離尺度はユークリッド距離であり、下部に横に並んでいるのは香気成分である。階層的クラスタリングにより得られた dendrogram を図 5 に示す。同図の赤線部分が基底ベクトルであり、基底ベクトルが全体のデータ空間に均等に分散していることがわかった。

今後、距離尺度の検討、基底ベクトル近似の際の距離尺度の検討を重ねて、実際の香り再現実験にまで発展させたい。

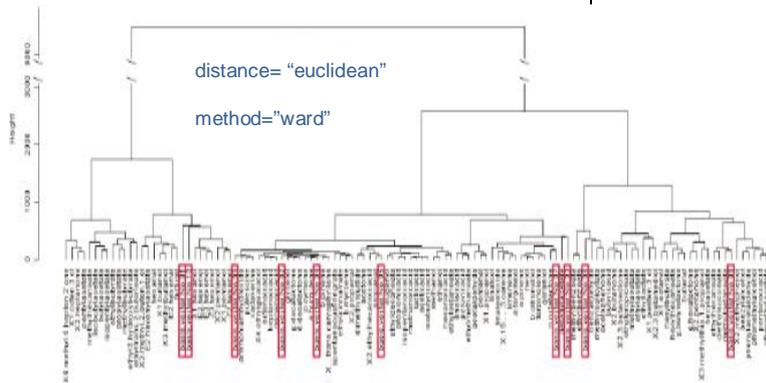


図5. 嗅覚受容体応答とNMF法で得られた基底ベクトルを階層的クラスタリングで解析した結果

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1件)

- ①中本 高道、匂いセンシングと再現に関する研究、日本味と匂学会誌、査読無、19巻、2012、147-156

[学会発表] (計7件)

- ①光野 秀文、櫻井 健志、神崎 亮平、昆虫の嗅覚受容体を利用した匂いバイオセンサの開発、第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月29日、日本大学生物資源科学部、神奈川県
- ②三觜 裕之、櫻井 健志、藤井 毅、光野 秀文、石川 幸男、神崎 亮平、匂い結合タンパク質を利用した匂い物質可溶化技術の開発、第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月29日、日本大学生物資源科学部、神奈川県
- ③原田 祐希、中本 高道、NMF法を用いた昆虫の嗅覚受容細胞の応答の解析と近似臭作成方法の研究、電気学会全国大会、2013年3月21日、名古屋大学、愛知県
- ④中本 高道、匂いの記録再生と遠隔匂い再現システム、電子情報通信学会コミュニケーションオリティ研究会(招待講演)、2013年1月25日、機械振興会館、東京都
- ⑤光野 秀文、櫻井 健志、三觜 裕之、神崎 亮平、ショウジョウバエの嗅覚受容体発見Sf21細胞を用いた匂いセンサ素子の開発、日本味と匂学会第46回大会、2012年10月4日、大阪大学、大阪府
- ⑥三觜 裕之、櫻井 健志、藤井 毅、光野 秀文、石川 幸男、神崎 亮平、ショウジョウ

ウバエ匂い結合タンパク質を利用した気中匂い分子の高効率可溶化技術の開発、日本味と匂学会第46回大会、2012年10月5日、大阪大学、大阪府

⑦H. Mitsuno, T. Sakurai, H. Mitsuhashi and R. Kanzaki, Development of an odorant sensor using living cells expressing insect odorant receptors, CIMTEC2012(招待講演)、2012年6月13日、Montecatini Terme, Italy

[図書] (計4件)

- ①T. Nakamoto, IGI Global, "Fundamentals of odor recorder" in Human Olfactory Displays and Interfaces: Odor Sensing and Presentation, 2012, 28
- ②神崎 亮平、ニュートンプレス、虫の驚異の機能、Newton別冊「生き物の超能力」、2012、28
- ③神崎 亮平、オーム社、小さくても強大な能力・昆虫脳の秘密に迫る! Ohm Bulletin, 2012、2
- ④光野 秀文、神崎 亮平、九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センター、昆虫の嗅覚受容体を再現した高機能な匂いセンサの開発: カイコガ性フェロモン受容体をモデルに、ナショナルバイオリソースプロジェクト「カイコ」情報誌「おかいこさま」、2012、3

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中本 高道 (Nakamoto Takamichi)
東京工業大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 20198261

(2) 研究分担者

神崎 亮平 (Kanzaki Ryohei)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号: 00402219