

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780329

研究課題名(和文) 昆虫のイオンチャネル型受容体を利用した匂いセンサの開発

研究課題名(英文) Development of odorant sensors based on ionotropic receptors of insects

研究代表者

光野 秀文(Mitsuno, Hidefumi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：60511855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫のイオノトロピック受容体(IR)をSf21細胞で再構築し、匂いセンサの検出素子として利用できることを実証する。IR遺伝子および補助タンパク質(Ir8a)を、カルシウム感受性蛍光タンパク質とともにSf21細胞に遺伝子導入し、IRが応答する一般的な匂い物質(一般臭)に蛍光強度変化を示す細胞系統を作出した。作出した細胞系統は、一般臭を選択的かつ濃度依存的に蛍光強度変化量として検出できることが分かった。以上の結果から、Sf21細胞においてIRを機能発現させることに成功し、IRを発現させたSf21細胞系統が匂い検出素子として利用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to reconstruct ionotropic receptors (IRs) of insects in Sf21 cells to demonstrate that the cell lines are available as detection elements of an odorant sensor. We introduced IR gene and co-receptor (Ir8a) gene along with calcium sensitive fluorescent protein gene into Sf21 cells to establish the cell lines that responded to the general odorant by increasing fluorescent intensity. We found that the established cell lines selectively and dose-dependently detected general odorants as fluorescent intensity change. Taken together, we successfully reconstructed the function of IR in Sf21 cells and demonstrated that the Sf21 cell lines expressing IR are available as the odorant sensor elements.

研究分野：昆虫生理

キーワード：昆虫 生体分子 匂いセンサ イオンチャネル型受容体 流路チップ

1. 研究開始当初の背景

近年、生活の安全・安心の質の向上のため、食品腐敗臭(アミン類など)の検出、有害物質(無水酢酸など)の検知など、微量の化学物質を精確にそして迅速に検出することに対する社会的ニーズが高まっている。これまで、水晶振動子や金属酸化物半導体などを用いた匂いセンサの開発が進められており、それらの一部は実用化されつつある。しかしながら、検出感度、識別能、検出速度、コストなど、匂いセンサの幅広いニーズを考慮すると検討すべき課題は多い。近年、これらの問題点を解決する革新的な計測系として、自然界の様々な匂い物質をサブ ppb レベルの高感度で検出できる生物の嗅覚系が注目されつつある。

生物の中でも昆虫は多くの生命活動に匂い情報を利用しているため、環境中に存在する多様な匂い物質を高感度に検出する機構を備えている。この検出は触角で発現する昆虫に特異な化学感覚受容体によって成し遂げられている。昆虫の化学感覚受容体のうち、匂いの受容に関わる受容体は、嗅覚受容体とイオンチャネル型グルタミン酸受容体(IR)の2種類に分類される。どちらの受容体も、複数のステップを経てイオンチャネルを開く哺乳類の受容体とは異なり、補助タンパク質と複合体を形成しリガンド結合部位とイオンチャネル部位が一体型の受容体として機能するため、匂いの受容から数十 msec もの速さで応答する。近年、これらの受容体は、それぞれ異なるタイプの匂い物質に応答することが明らかになってきた。例えば、嗅覚受容体は植物の香りや餌の匂いなど主にアルコール類やアルデヒド類、エステル類、芳香族等の匂い物質に応答する一方、IRは低分子量のアミン類や有機酸といった匂い物質に応答する。例えばキロショウジョウバエでは、成虫触角で32種類の嗅覚受容体と10種類のIRが発現しており、自然界に存在する幅広い化学構造の匂い物質を受容している。このような化学感覚受容体を人工的に再構成できれば、多様な匂い物質を検出できる匂いセンサが構築できると考えられる。

これまで、代表者らのグループでは、昆虫の嗅覚受容体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞をマイクロ流路上に配置することにより、高感度かつリアルタイムに検出できる匂いセンサを開発した。また、昆虫培養細胞(Sf21細胞)で嗅覚受容体を安定発現する細胞系統を作出し、長期間匂い応答を検出できる匂いセンサ素子の開発にも成功している。これらのセンサは、リアルタイム性と高感度性の点で、既存の匂いセンサの性能を上回る。しかし、検出対象となる匂い物質は嗅覚受容体が受容できる匂い物質に制限されるため、低分子アミンといった食品腐敗臭や無水酢酸といった有害物質等、実用性の高い匂い物質を検出対象とする匂いセンサの開発は難しい。この問題点を克服するため

に、本研究ではIRに着目した。IRは2009年にBentonらのグループで発見された新規の化学感覚受容体であり、低分子量のアミンや無水酢酸などの匂い物質に応答することが報告されている。そこで、昆虫のIRをSf21細胞で再構築する技術を確立することができれば、昆虫の嗅覚受容体と同等のリアルタイム性かつ高感度性を有し、嗅覚受容体では検出できなかったアミン類や酸などの匂い物質を検出できる匂いセンサを構築できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

昆虫のイオンチャネル型グルタミン酸受容体(IR)を人工的に再構築し、匂いセンサの検出素子として利用できることを実証する。具体的には、IRを発現させたSf21細胞系統を樹立し、樹立したSf21細胞系統の匂い応答特性(識別能)濃度情報(検出感度)といった匂い検出性能を調べることで、匂いセンサの検出素子として利用できることを示す。

3. 研究の方法

(1) 匂い検出素子の構築

昆虫のIRは嗅覚受容細胞で広く発現する他のIR(IR8aもしくはIR25a)とともに共発現し、イオンチャネル型の受容体として機能することが報告されている。そこで、本研究では、IR及び共発現するIR8aを、カルシウム感受性蛍光タンパク質(GCaMP3)とともにSf21細胞に共導入し、匂い物質に対して蛍光応答を示す細胞系統の構築を試みた。キロショウジョウバエ成虫触角のcDNAからPCRを実施し、IR遺伝子の翻訳領域を増幅した。各IR遺伝子の増幅産物をpIBベクター(LifeTechnologies社)に別々に挿入し、発現ベクターを構築した。同時にGCaMP3遺伝子の増幅産物を別の発現ベクターであるpIZベクター(LifeTechnologies社)に挿入した。次に、構築した発現ベクターをトランスフェクション法(Cellfectine; LifeTechnologies社)によりSf21細胞に遺伝子導入し、抗生物質(プラスタサイジン、ゼオシン)耐性遺伝子の発現を指標にしたスクリーニングにより、Sf21細胞系統を単離した。構築したSf21細胞系統における導入遺伝子の発現はRT-PCR法により確認した。Sf21細胞系統ごとに抽出したtotalRNAからcDNAを作製し、各遺伝子について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、IR、IR8a、およびGCaMP3を安定に発現するSf21細胞系統を樹立した。

(2) 匂い検出素子の機能評価

樹立したSf21細胞系統の匂い検出性能を評価するため、蛍光顕微鏡を用いて匂い物質に対する蛍光強度変化量を光学イメージングにより測定した。具体的には、樹立したSf21細胞系統を計測チャンバ(WARNER INSTRUMENTS社)上に播種し、リンガー溶液

を 1ml/min の流速で灌流した。試験する匂い物質はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後、リンガー溶液で 1% DMSO 濃度となるよう希釈し調製した。調整した匂い物質は、灌流系をリンガー液から匂いサンプルへ切り替えることで 15 秒間添加した。Sf21 細胞系統の蛍光強度変化量は、蛍光顕微鏡 (オリンパス社) 高感度冷却 CCD カメラ (Andor 社) を用いて取得し、励起光 (488nm) で照射した際の GCaMP3 の蛍光 (515nm) を取得した。取得した蛍光画像は画像解析ソフト (ImageJ, MatLab) を用いて解析し、匂い物質を供給した時の Sf21 細胞系統の蛍光強度変化量 ($F/F \times 100\%$) を算出した。Sf21 細胞系統ごとにアミン等を含む複数の匂い物質に対する応答特性および濃度応答を測定することで匂い検出素子としての検出性能を評価した。

(3) 匂いセンサチップの構築

IR を発現させた Sf21 細胞系統を検出素子とする匂いセンサチップの開発に向けて、Sf21 細胞系統を導入できるマイクロ流路チップを設計・作製した。マイクロ流路チップの作製には、三澤宣雄博士 (豊橋技術科学大学) にご協力いただき作製した。設計したマイクロ流路チップは、ソフトリソグラフィ技術を用いて作製した。本研究では、マイクロ流路作製で多用されているソフトマテリアルとして、ポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いた。フォトレジスト (SU-8) で流路の鋳型を作製し、PDMS を流し込み、熱硬化させた後、PDMS をはがし、プラズマ処理でスライドガラスと接合させることでマイクロ流路チップを作製した。作製したマイクロ流路チップには、Sf21 細胞系統を導入することで、匂いセンサチップを作製した。匂いセンサチップには、1 ml シリンジ (TERUMO, SS-01T) を接続し、シリンジポンプ (kdScientific, KDS 210) で吸引することで上流の溶液を灌流した。匂い刺激は、上流の溶液を切り替えることで匂い物質を供給した。匂いセンサチップ中の Sf21 細胞系統の蛍光応答は、(2) と同じ手法で蛍光画像を取得・解析した。

4. 研究成果

(1) 匂い検出素子の構築

匂い検出素子として匂い物質を検出し蛍光応答を示す Sf21 細胞系統を樹立するため、IR および GCaMP3 を共発現させた Sf21 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 cDNA から機能発現する 16 種類の IR 遺伝子を単離した。これらのうち、匂い物質に対する応答が明らかにされている 2 種類の IR 遺伝子 (IR84a 遺伝子および IR75a 遺伝子) 補助タンパク質遺伝子 (IR8a 遺伝子) をそれぞれ発現ベクターにサブクローニングし、GCaMP3 遺伝子の発現ベクターとともに Sf21 細胞へ遺伝子導入した。抗生物質を利用したスクリーニングを実施し、IR ごとに複数のコロニーに由来する Sf21 細胞系統を単離した。

単離した細胞系統は、RT-PCR により IR 遺伝子の発現解析、および蛍光観察を実施した。その結果、導入した各 IR 遺伝子の転写が確認できた (図 1)。蛍光顕微鏡下での観察で蛍光が観察できた系統が、IR84a から 1 種類 (IR8a、GCaMP3 を発現する細胞系統) IR75a から 1 種類 (IR75a、IR8a、GCaMP3 を発現する細胞系統) 計 2 種類得られた。これら細胞系統を安定発現系統として (2) 匂い検出性能の評価に用いた。

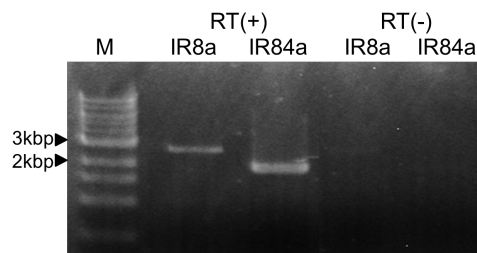


図 1 RT-PCR による Sf21 細胞系統の IR の発現解析

予測される増幅産物のサイズは、IR84a が 1935bp、IR8a が 2811bp である。RT(+) は逆転写有、RT(-) は逆転写無のサンプルを表す。

(2) 匂い検出素子の機能評価

(1) で樹立した 2 種類の Sf21 細胞系統 (IR84a 発現系統、IR75a 発現系統) について、匂い物質に対する蛍光強度変化量をカルシウムイメージング法により測定した。まず、樹立した細胞系統が匂い物質に反応するかどうかを評価するため、IR84a、IR75a のリガンドであるフェニルアセトアルデヒド (PAA)、プロピオン酸を用いて各細胞系統の蛍光応答を観察した。その結果、IR84a 細胞系統は PAA に反応を示し蛍光強度変化が増加した (図 2) が、IR75a 細胞系統はプロピオン酸を含め試験した匂い物質には蛍光強度変化を示さなかった。そこで、以下性能評価には IR84a 細胞系統を用いた。

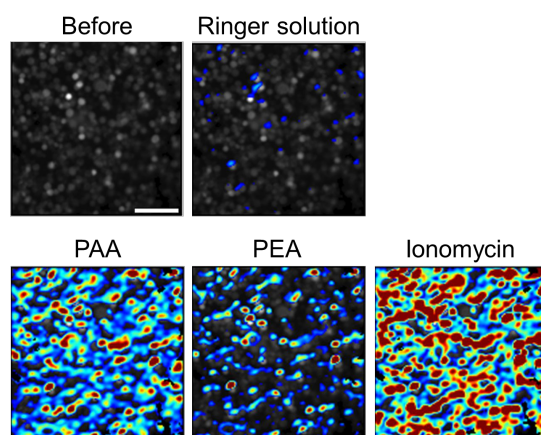


図 2 IR84a-IR8a 細胞系統の匂い物質に対する蛍光応答

PAA ; フェニルアセトアルデヒド、PEA ; フェニルエチルアミン、Ionomycin はポジティブコントロールとして使用した。スケールバー ; 100 μ m

匂い検出素子の性能評価として、ここでは匂い選択性および濃度応答性について評価した。まず、IR84 細胞系統が IR84a の匂い応答特性に従い選択的に蛍光応答を示すかどうかを検証するため、リガンドを含む複数の匂い物質に対する蛍光応答を取得した。その結果、IR84a 細胞系統は、フェニルエチルアミン (PEA) に弱く蛍光応答を示し、PAA に対しては強く蛍光応答を示した (図 2、3)。このことから、IR84a 細胞系統は選択的に匂い物質を検出し、IR84a の応答特性に従って蛍光強度変化を示すことが分かった。現在、他の匂い物質に対する IR84a 細胞系統の応答特性を明らかにするため、蛍光プレートリーダーを用いた網羅的な応答特性解析を進めている。

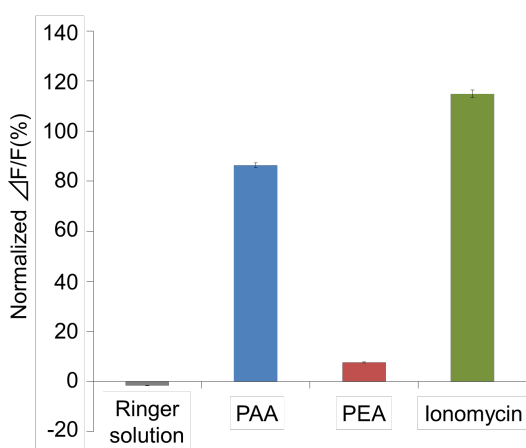


図3 IR84a-IR8a 細胞系統の匂い選択性
エラーバー ; \pm SEM (n=35)

次に、PAA の各濃度 (1 μ M、10 μ M、100 μ M、1mM) に対する蛍光強度変化量を測定し、濃度依存応答を調べた。その結果、IR84a 細胞系統は濃度依存的に蛍光強度を増加し、検出閾値は 1~10 μ M であることが分かった (図 4)。

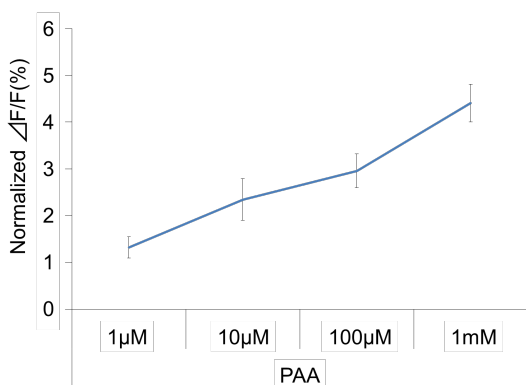


図4 IR84a-IR8a 細胞系統の濃度依存応答
PAA; フェニルアセトアルデヒド、エラーバー ; \pm SEM (n=7)

以上の結果から、Sf21 細胞で IR が機能発

現できることを初めて示し、IR の応答が蛍光強度変化量として取得できる細胞系統の作出に成功した。また、樹立した細胞系統は、選択的に匂い物質を検出でき、濃度依存的に蛍光強度変化を示すことから、作出した細胞系統が匂い物質を蛍光強度変化量として検出できる匂い検出素子として利用できることを示した。

(3) 匂いセンサチップの構築

匂いセンサチップの開発に向けて、Sf21 細胞系統を導入でき、細胞系統の蛍光計測が可能なマイクロ流路チップを設計・作製した。ここでは複数種類の細胞系統を並列配置できるように、2本の異なる微小流路を並行に配置し、Sf21 細胞系統の蛍光計測が可能な、ジメチルポリシロキサンとホウケイ酸ガラス製のマイクロ流路チップを試作した。まず、GCaMP3 を発現する Sf21 細胞系統を用いて、GCaMP3 の蛍光観察およびイオノマイシンに対する蛍光強度変化が測定できることを確認した。次に、2種類の異なる性フェロモン受容体を発現させた Sf21 細胞系統をマイクロ流路チップ上に並列配置した匂いセンサチップを構築したところ、性フェロモン成分に対して各細胞系統の蛍光応答が取得できることが分かった。このことから、作製したマイクロ流路チップを用いて匂いセンサチップを開発できることを示した。しかし、本研究期間内に IR 細胞系統を導入した匂いセンサチップの構築には至らなかった。現在、作出した IR 細胞系統の導入の検討を進めている。

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0件)
該当なし

[学会発表](計12件)

田中亜紀子、光野秀文、櫻井健志、三澤宣雄、中島裕子、神崎亮平、“昆虫の嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞を並列配置した匂いセンサチップの開発”、第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015 年 3 月 26-28 日、山形大学 (山形)。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Takuma Iwamatsu、Yuko Nakajima、Ryohei Kanzaki、“Development of novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors”、2nd Digital Olfaction Society World Congress, 2014 年 12 月 8-9 日、東京工業大学 (神奈川)。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Takuma Iwamatsu、Shigehiro Namikiri、Ryohei Kanzaki、“Development and

performance evaluation of a novel cell-based odorant sensor element based on insect odorant receptors”, The 11th International Congress of Neuroethology (2014 ICN/JSCPB) 2014年7月28日-8月1日、札幌コンベンションセンター(札幌)。

光野秀文、櫻井健志、神崎亮平、“昆虫に学ぶ匂いバイオセンサの開発”、日本学術会議公開シンポジウム、2014年7月26日、東京、招待講演。

光野秀文、櫻井健志、岩松琢磨、田中亜紀子、並木重宏、神崎亮平、“昆虫の嗅覚受容体を利用した細胞利用型匂いセンサの性能評価”、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月30日、明治大学(神奈川) 招待講演。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Shigehiro Namiki、HIROYUKI Mitsuhashi Ryohei Kanzaki、“Development of a novel cell-based odorant sensor based on insect odorant receptors”、International Chemical Ecology Conference2013、2013年8月22日、Melbourne (Australia) 招待講演。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、Shigehiro Namiki Ryohei Kanzaki、“Performance evaluation of Sf21 cell lines expressing insect odorant receptors as odorant sensor elements”、Bio4Apps2013、2013年10月31日、東京医科歯科大学(東京)。

光野秀文、櫻井健志、並木重宏、神崎亮平、“匂いセンサ素子としての昆虫嗅覚受容体を発現させた Sf21 細胞系統の長期匂い検出性能の評価”、日本味と匂学会第47回大会、2013年9月5-7日、仙台市民会館(仙台)。

岩松琢磨、光野秀文、櫻井健志、神崎亮平、“イオノトロピック受容体を発現させた Sf21 細胞の匂いセンサ素子としての性能評価”、日本味と匂学会第47回大会、2013年9月5-7日、仙台市民会館(宮城)。

Hidefumi Mitsuno、Takeshi Sakurai、HIROYUKI Mitsuhashi Ryohei Kanzaki、“Development of an odorant sensor using living cells expressing insect odorant receptors”、CIMTEC2012、2012年6月13日、Tuscany (Italy)。

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”、日本応用動物昆虫学会小集会「界面のエントモミメティクス：嗅覚と接着」(世話人：森、高梨)、2013年3月27-29日、日本大学(神奈川)。

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現 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3-5日、大阪大学(大阪)。

〔図書〕(計5件)

光野秀文、櫻井健志、神崎亮平、“第18章 昆虫に学ぶ匂いバイオセンサ”、昆虫科学読本-虫の目で見た驚きの世界-(日本昆虫科学連合編、東海大学出版部、2015) pp. 259-277 (分担執筆)。

光野秀文、櫻井健志、岩松琢磨、神崎亮平、“第3章 第3節 培養細胞の蛍光計測を応用した匂いセンサ”、感覚デバイス開発(株式会社エヌ・ティー・エス、2014) pp. 174-181 (分担執筆)。

光野秀文、三澤宣雄、神崎亮平、“第2章 匂いバイオセンサへの昆虫嗅覚受容体の応用”、バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発(株式会社技術情報協会、2014)(分担執筆)。

神崎亮平、光野秀文、“昆虫に学ぶ匂いセンサの開発”、応用物理(公益社団法人応用物理学会、2014) 83(1): pp.38-42。

光野秀文、神崎亮平、“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 - ”、ニュースレター“おかいこさま”(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、2012) No. 221: pp.3。

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

光野秀文(MITSUNO、Hidefumi)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：60511855

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし