

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2014～2014

課題番号：26390036

研究課題名(和文)リガンド活性型イオンチャネル集積化による、新規センサーシステムの開発

研究課題名(英文)Development of a biosensor using the assembly of ligand-gated ion channel expressing mammalian cells

研究代表者

佐藤 幸治 (Sato, Koji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号：20444101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の匂い受容体は、様々な揮発性有機化合物で活性化されるイオンチャネルを構成し、化学物質のシグナルを膜電流に変換する機能を持つ。本研究では、このイオンチャネルを利用した簡便なセンサーを開発し、新規の生体分子計測技術としての可能性を探索した。

フォトリソグラフィーで作製したマイクロチェンバーで、匂い受容体を発現した細胞スフェロイドを作製し、ハイドロゲルマイクロチェンバーに設置した。膜電流を細胞外電位変化を指標に計測したところ、匂い依存的な電位変化が記録できた。また、その認識する化学物質の種類は気液界面の影響を受ける事が明らかになった。

以上の成果はドイツ化学会誌国際版で報告した。

研究成果の概要(英文)：Insect olfactory receptors compose heteromeric ion channels activated by volatile organic compounds. Thus, these ion channels transduce the chemical signals into the electrical cell membrane activity. The purpose of this study is development of a new integrative biosensor by using ligand-gated ion channels.

Ion channels were reconstituted by using heterologous gene expression systems. Then, ion channel expressing cell spheroids were cultured in PDMS microchamber. To measure their olfactory response, spheroids were transferred into the hydrogel chamber. Activation of ion channels by odorants was successfully recorded by using extracellular field potential recording technique. The study also suggested the effect of extracellular components in olfactory mucus or lymph on odor recognition. The research results were published from Angewandte Chemie International Edition.

研究分野：細胞計測工学

キーワード：バイオセンサー 嗅覚 イオンチャネル マイクロデバイス 嗅粘液 MEMS

### 1. 研究開始当初の背景

リガンド活性型イオンチャネルは、特定の化学物質と結合すると細胞膜電流を発生する機能を持った膜タンパク質である。昆虫の触角には、様々な揮発性有機化合物で活性化される匂い活性型イオンチャネルが発現しており、匂い認識に関わる嗅覚受容体として機能している<sup>1)</sup>。また匂いだけでなく、糖で活性化されるイオンチャネルも昆虫の化学感覚器から見つかった<sup>2)</sup>。このようにリガンド活性型イオンチャネルは、昆虫の化学認識における重要な分子基盤である。一方、我々人間を含めたその他の動物の匂い受容体は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)に属している。GPCRにはイオンチャネルのように化学物質のシグナルを膜電流へ直接変換する機能はなく、細胞内のGタンパク質シグナル伝達経路の反応過程を経てイオンチャネルを活性化することで、膜電流を発生させている。この反応カスケードには多様なタンパク質が関与することが明らかにされている。つまりGPCRと比較して昆虫の嗅覚受容体は、より単純な分子基盤でシグナル伝達を実現している。したがって膜タンパク質を利用したバイオセンサーとして応用展開する上で、最も多くの可能性を秘めた分子であると言える。

一方でリガンド活性型イオンチャネルは、一分子あたり pS レベルというわずかなコンダクタンスしか示さない<sup>1)</sup>。したがってその電流測定には、蛍光顕微鏡やパッチクランプ法など、高価な実験機材と熟練した研究者の高度な技術が必要であり、そのままではセンサー素子としての利用は困難である。また、これらの分子は水中に維持された脂質二重膜上でなければ機能できない。そのためこれまでに、機能的な嗅覚受容体やイオンチャネルを得るために様々な細胞の遺伝子再構成系が用いられてきたが、実際の嗅覚器が行っている様な気体状分子のセンシングが実現できていなかった。また、再構成されたタンパク質が、その感度と基質選択性において、生体の機能を再現できていない、と言う問題も報告されていた<sup>3)</sup>。

イヌの鼻で知られるように、嗅覚器は最も優れた化学センサーであり、そのセンサー素子である嗅覚受容体を利用したセンサー開発が盛んとなっている。しかし上記のように、再構成系による気相物質のセンシングは、バイオセンシングだけでなく感覚生理学の分野でも大きな課題となっていた。

### 2. 研究の目的

動物の嗅覚器は、複雑な立体構造を持った細胞組織と、その表面を覆う嗅粘液によって構成されている。一方、遺伝子再構成系では細胞は緩衝液に浸されている。したがって、再構成系における大きな課題である気相物質のセンシングを実現するためには、細胞の保湿性を維持しかつ、マイクロメータスケ

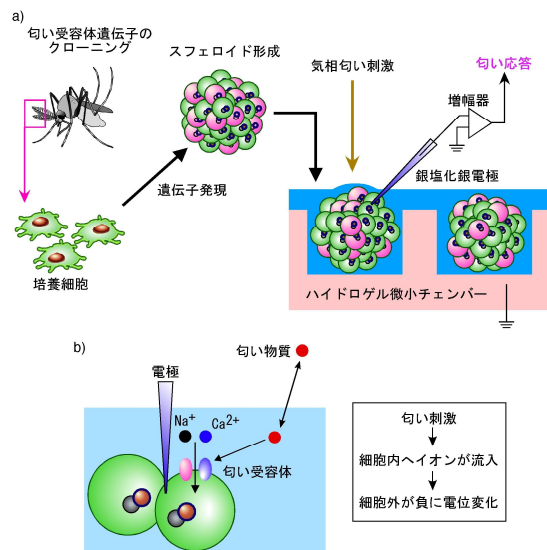


図1. 本研究の概念図。a) 昆虫匂い受容体遺伝子のクローニングと、培養細胞への遺伝子導入。遺伝子導入した細胞は PDMS で作製した微小チェンバーで培養することで、スフェロイドを作製する。作製したスフェロイドはハイドロゲルで作製した微小チェンバーに設置する。その結果、保湿性が保たれると同時に、表面に薄い緩衝液の層が形成され、動物の鼻と似た構造の再現が期待できる。さらにスフェロイドの内部に電位測定のためのガラス電極を設置する。b) 気体状匂い分子が活性化するリガンド活性型イオンチャネルによる、電氣的匂い応答。気体状匂い分子は表面の水層に溶け込み、匂い受容体と結合する。その結果、受容体複合体が構成するイオンチャネルが活性化され、細胞内にプラスの電荷を持ったイオンが流入する。細胞膜を介した電流の発生により、細胞表面で陰性の電位変化が起きると考えられる。

ールで気液界面を制御しなければならない。また、昆虫の嗅覚受容体を利用したバイオセンサーの実用性の点からは、受容体活性化で生じる微小な膜電流を増幅し、簡便な計測装置でその活性を検出できる事が必要である。

そこで本研究では、細胞三次元構築によるイオンチャネル集積を利用して、気相分子の検出を可能とするリガンド活性型イオンチャネルの動作プラットフォームを開発する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では分子生物学、細胞生理学、MEMS (微小電気機械システム) 技術を組み合わせた統合的手法により、液体中の培養細胞に発現した匂い受容体に気体状分子を感知させることを試みるとともに、センサーとしての汎用性を高めるために、イオンチャネル電流応答を測定の容易な細胞外電位変化として測定することを目指した。

図1に本研究の概念図を示した。イオンチャネルとして機能する昆虫の嗅覚受容体を

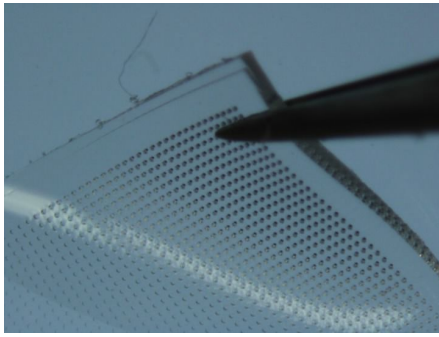


図2 . 哺乳類培養細胞スフェロイド作成のための、PDMS マイクロチェンバー。

発現した培養細胞を、PDMS マイクロチェンバー内で培養し立体構築することで、取り扱いの容易なスフェロイドを作製した。スフェロイドは気体状匂い分子を適用した際の乾燥から保護するため、アガロースで作製したハイドロゲルチェンバーへ設置した。このとき、細胞表面に表面張力を介して気液界面が形成されるため、このスフェロイド表面の液相を介して気体状分子が受容体に輸送されることが期待できる。匂い分子により受容体が活性化されると、細胞内へのイオンの流入に伴う内向き電流が発生するため、細胞外電位が負に変化し、匂い応答として測定できると考えられた。

まず MEMS 技術により、細胞を三次元構築するための PDMS マイクロチェンバーを作製した。フォトリソグラフィーでチェンバーを作製するために、シリコンウェハー上に感光性のレジストをスピコートによって塗布した。次にマスクアライナーによってレジストを感光し、マイクロチェンバーを作製するための鋳型を作製した。そして鋳型に PDMS を流し込み、硬化させることで PDMS マイクロチェンバーを作製した (図2)。マイクロチェンバーにはその表面に直径、深さともに 100  $\mu\text{m}$  の培養用チェンバーをアレイ状に配置した。

次に同様に、シリコンウェハーをモールドとして、ハイドロゲルマイクロチェンバーを作製するための PDMS モールドを作製した。これを用いて、アガロースゲルで測定用マイクロチェンバーを作製した (図3)。チェンバーの大きさは直径、深さともにおよそ 100  $\mu\text{m}$  程度であり、アガロースのゲル化の収縮率により変化した。チェンバー内に細胞を乾燥から保護するための水分が保持されていることは、レーザーラマン顕微鏡を用いたラマン散乱光スペクトルで確認した。

これらのデバイスを用いて、分子生物学的手法により、三次元構築した細胞にリガンド活性型イオンチャンネルを発現させる遺伝子導入法について検討した。遺伝子導入は汎用性を向上させるために、簡便なりポフェクション法を用い、遺伝子導入とスフェロイド形

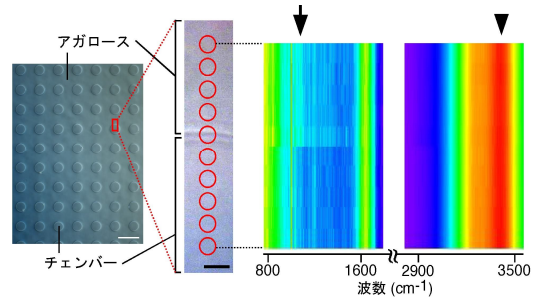


図3 . ハイドロゲルマイクロチェンバーと、レーザーラマン顕微鏡による表面測定。アレイ状にマイクロチェンバーを配置したアガロースゲル (左) とチェンバー内部での水分の保持を計測した (右)。チェンバーとゲルの境界を境にアガロース由来 (矢印) のスペクトルが現れるが、水のスペクトル (鏝) はゲル、チェンバー双方に均等に分布していた。白棒は 200  $\mu\text{m}$ 、黒棒は 10  $\mu\text{m}$ 。

成のタイミングを検討した。さらに細胞生理学的手法により、三次元構築した細胞の電気的特性を測定した。電位測定には、銀塩化銀電極を介してガラス微小電極に接続した直流差動増幅器を用い、ノイズ除去のため 30 Hz の低域通過フィルター処理を施した。

最後に、三次元構築した匂い活性型イオンチャンネル発現細胞に対して気相匂い刺激を行い、本手法の妥当性を評価した。気相匂い刺激には、一定濃度の匂い物質溶液を密閉容器にいれ、溶液上部で形成される蒸気圧平衡状態のヘッドスペース匂い物質を用いた。

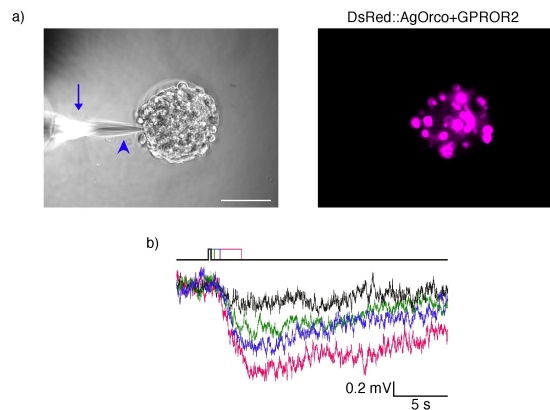


図4 . 昆虫匂い活性型イオンチャンネル発現スフェロイドの気体状匂い刺激に対する電位応答。a) ハイドロゲルチェンバーに設置した昆虫匂い受容体発現スフェロイド。鏝は測定記録用ガラス電極を、矢印は緩衝液と気体の境目を示す。b) ハマダラカの 2-メチルフェノール受容体 (GPROR2) を発現したスフェロイドの、2-メチルフェノールに対する電気応答。上部のトレースは匂い刺激のタイミングを、下のトレースはスフェロイドの細胞外電位を示す。

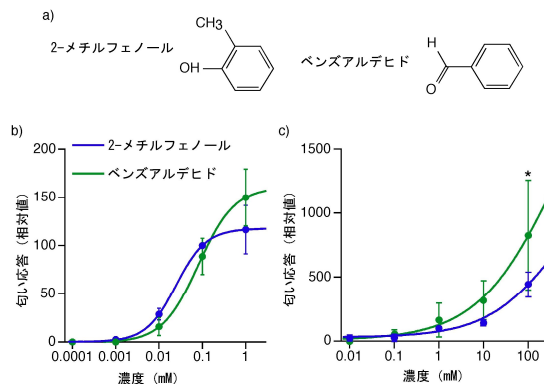


図5 . GPROR2 の 2-メチルフェノールとベンズアルデヒドに対する濃度応答性。a) 2-メチルフェノールとベンズアルデヒドの構造式。b) 液相匂い刺激に対する GPROR2 の濃度応答曲線。c) 気体状匂い刺激に対する GPROR2 の濃度依存性。

#### 4 . 研究成果

本研究の実施により、図1に示した再構成匂い受容体による気相物質検出法を確立できた。この手法を用いて、マラリアを媒介するハマダラカやショウジョウバエの、気相匂い物質に対する嗅覚受容体の反応を測定する事に成功した(図4)。ハマダラカは汗や体臭、呼吸の二酸化炭素などの匂いのシグナルを頼りに吸血し、マラリアを媒介する蚊である。汗に含まれる匂い物質である2-メチルフェノールに対するハマダラカの匂い受容体(GPROR2)と<sup>4)</sup>GPROR2と複合体を構成する受容体であるAgOrcoを共発現したHEK293T細胞のスフェロイドを作製した。このスフェロイドに2-メチルフェノールの気体状分子で刺激を行うと、負の細胞外電位変化が観察された。この電位変化は刺激時間に依存的であり、2-メチルフェノールを含まないキャリアガスには反応を示さなかった。同様の電位変化はペンチルアセテートに対するショウジョウバエの匂い受容体であるOr47aと、DmOrcoを共発現したスフェロイドからも測定できた。この匂い応答は、およそ30分あたり測定することができた。

次に気相匂い刺激法と生体の匂い応答性との違いについて検討するため、GPROR2の気相匂い応答を定量的に測定した(図5)。GPROR2は生体を用いた研究で2-メチルフェノールに対する受容体として報告されたが、受容体再構成系による液相刺激では、ベンズアルデヒドにも応答した(図5b)。一方、本手法を用いた気相匂い刺激では2-メチルフェノールよりもベンズアルデヒドにより強く応答し、生体とは異なる反応を示した(図5c)。この結果は、培養細胞で再構成した匂い受容体が生体と同様に機能するためには、受容体表面を覆う嗅粘液やリンパ液などに

含まれる細胞外構成成分が必要であることを示している。

以上の研究実施により、再構成嗅覚受容体が気体状匂い物質に対するセンサーとして利用できる事が初めて確認された。またGPCRでなく昆虫の匂い受容体を匂い物質のセンサー素子として用いることで、高価な測定器具を必要とせずに、細胞外電位変化として安価な計測機器を用いて匂い応答を測定できることが実証された。したがって、昆虫の嗅覚受容体がバイオセンサーとして応用展開する上での有用性が証明された。さらに、これまでほとんど注目されていなかった鼻粘液の構成成分が、匂い認識に関わる事を明らかにした。以上のことから、本研究で開発した計測技術はバイオセンサー開発だけでなく、感覚生理学や公衆衛生の分野でも重要な知見を与える物であると期待できる。

#### <引用文献>

- 1) Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., and Touhara, K. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* **452**, 2008, 1002-1006.
- 2) Sato, K., Tanaka, K. and Touhara, K. Sugar-regulated cation channel formed by an insect gustatory receptor. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Proceedings of National Academy of Science* **108**, 2011, 11680-11685.
- 3) Oka, Y., Katada, S., Omura, M., Suwa, M., Yoshihara, Y. and Touhara, K. Odorant receptor map in the mouse olfactory bulb: in vivo sensitivity and specificity of receptor-defined glomeruli. *Neuron* **52**, 2006, 857-869.
- 4) Hallem, E.A., Nicole Fox, A., Zwiebel, L.J. and Carlson, J.R. Olfaction: mosquito receptor for human-sweat odorant. *Nature* **427**, 2004, 212-213.

#### 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 3 件)

- 1) Koji Sato, Shoji Takeuchi, The olfactory receptors for the volatile compound sensing technology, 査読無、*Journal of Japan Association on Odor Environment*, 印刷中
- 2) 佐藤 幸治, 竹内 昌治, 遺伝子情報から構築する「人工鼻」の実現を目指して、査読無、*Aroma Research*, **61**, 2015, pp.36-37
- 3) Koji Sato, Shoji Takeuchi, Chemical vapor detection using a reconstituted

insect olfactory receptor complex、査読有、*Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 2014, pp.11798-11802 doi:10.1002/anie.201404720.

Selected as the Hot Paper and Inside Back Cover of the issue.

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 佐藤 幸治、匂い受容体による気体状分子の検出-その仕組みと応用、酵素工学研究会第74回講演会(招待講演) 2015年10月16日、東京大学山上会館(東京都・文京区)
- 2) 佐藤 幸治、匂い受容体再構成系への気相匂い刺激、日本味と匂学会第48回大会、2014年10月2日~4日、静岡市清水文化会館マリナート(静岡県・静岡市)

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140729/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 幸治 (Sato, Koji)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構

(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特任准教授

研究者番号：20444101