

研究報告2021 目次

【研究開発部】

実用化実証事業

「人工細胞膜システム」グループ

◆ 総括.....	151
◆ イオンチャネル機能評価システムの多様な細胞内イオンチャネルへの適用検討.....	153
◆ 呼気診断のための昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ.....	156
◆ 業績.....	159

人工細胞膜システムグループ

グループリーダー 竹内 昌治

【基本構想】

膜タンパク質は細胞膜中に存在し、細胞の内外への物質輸送・排出、シグナル伝達・変換などにおいて重要な役割を果たしており、1兆ドル余り(2011年)の医薬品の世界市場において、薬剤の標的の半数以上がこれら膜タンパク質や膜表面性物質だと言われている。リガンド同定済みのGタンパク質共役型受容体(GPCR)に関するだけでも約600億ドル(2009年)に上り、リガンド未同定のGPCRをはじめ、イオンチャネルやトランスポーターなどの膜タンパク質の機能や特性を一つ一つ解明することが、基礎研究のみならず創薬・医療分野における重要な課題である。しかし細胞膜中に存在する膜タンパク質は単離が困難なため、機能解析は難しいとされてきた。

創造展開プロジェクト(2009-2012年度)では、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を人工的に再構成した後、精製された膜タンパク質を導入することで、その膜タンパク質の特性を低ノイズで解析する戦略にもとづいて研究を行い、膜タンパク質を再構成するための2つの人工脂質二重膜システムを確立した。(1)電気的計測技術に適する平面膜システムでは、ヒト由来イオンチャネルの並列同時シグナル計測に適する自動化・集積化チップ、小型化チップをそれぞれ研究・開発した。(2)光学的計測技術に適するリポソーム膜システムでは、細胞サイズリポソームの形成手法を確立し、トランスポーターの輸送現象やGPCRの基質結合を蛍光により観測することに成功している。

2013年度に実用化実証事業に移行後は、地域イノベーション戦略支援プログラムの支援も受けながら、創造展開プロジェクトで得られた研究成果を展開し、標的膜タンパク質の生体外での創薬解析支援システムを確立すべく研究開発を行ってきた。具体的には、効率的膜システム要素技術の開発として、人工脂質二重膜の集積化や薬剤スクリーニングに適したデバイスとするためのシステム全体の基盤研究開発を実施し、膜タンパク質の調製・導入法の開発として、イオンチャネルやGPCR、トランスポーターなどを人工脂質二重膜に効率的・体系的に導入できる手法の研究開発を実施している。最終的に、大学・研究機関などで使用できるシステムや製薬企業から薬剤候補化合物の評価を受託できる評価法の開発を目標としている。一方で、NEDO事業(2015-2019年度)および地域イノベーション・エコシステム形成プログラム(2018年度開始)では、膜タンパク質の機能利用による人工細胞膜センサに関わる研究開発を行っている。膜タンパク質である嗅覚受容体に代表されるように、生体のもつセンサは優れた感度・特異性をもつことが知られており、膜タンパク質をセンサ素子として活用するための研究開発を実施している。2020年度には、JSTのCREST事業において、細胞をセンサ素子として用いる研究開発も開始した。周辺技術も含め、小型・高性能な次世代センサの実用化技術の開発を目標としている。

1. 2020年度の研究目的

実用化実証事業8年目となる2020年度は、イオンチャネル機能評価システムの開発については引き続き事業化に向けた研究開発を推進することを目的とした。一方で、人工細胞膜を利用したセンサ開発に関しては、昨年度までに開発した匂いセンサプラットフォーム基盤技術を利用して、実用化にむけた研究開発を開始することを目標とした。

(1) イオンチャネル機能評価システムの開発

従来、膜タンパク質の機能解析は、培養細胞を用いた電気生理学的手法(パッチクランプ法)や蛍光イメージング法によって行なわれるのが一般的である。しかしながらこれらの手法では、培養中の汚染対策や個体差の均一化処理が煩雑であるほか、標的以外の雑多なタンパク質からの影響が避けられず、一つの標的タンパク質に限定して機能を

探ることは難しかった。

我々の目指す人工細胞膜プラットフォームは、細胞膜のモデルとなる脂質二重膜を簡便に再現良く形成し、その膜に再構成する標的膜タンパク質の活性を保持したまま機能解析を可能とするシステムである。実用化実証事業においては、これらの人工脂質二重膜デバイスを膜タンパク質の機能解析や創薬スクリーニングといった場面において実用的なプラットフォームとして拡張していくための要素技術、あるいは量産化に必要な技術の開発を目標として研究開発を行っている。

2020年度は、前年度に試作を行ったイオンチャネル計測チップおよび計測システムについて、その性能評価の結果にもとづいて、事業化のための改良および高機能化を行うことを目標とした。また、イオンチャネルに対する化合物の活性評価を確認する実証試験を引き続き行い、開発システムの実用性評価を行うことも目標とした。

(2) 人工細胞膜センサの開発

膜タンパク質は、匂いや味などの化学量センサとしての役割を生体内で担っており、その感度や特異性は人工的なセンサに比べ非常に高いことが知られている。こうした膜タンパク質の機能を活用することができれば、小型で高性能のバイオセンサを実現できると考えられる。

これまでの研究成果を通じてマイクロチップ上での脂質二重膜の形成が再現良くなるようになり、膜タンパク質機能の解析技術が発展したことで、膜タンパク質機能を利用する研究ができるようになった。「昆虫の嗅覚受容体を利用したヒトの汗の匂いを検知するセンサ」の開発を目標に取り組んだ NEDO 事業（2015-2019 年度）では、膜タンパク質機能を脂質二重膜に組み込んだ人工細胞膜センサの基盤となる技術について研究開発を進めることができた。地域イノベーション・エコシステム形成プログラムでも、この人工細胞膜センサの要素技術の研究を行っている。2020 年度は、低濃度の標的物質を迅速に検出するためのデバイス研究を行うとともに、採択を受けた JST 事業において細胞センサの計測システムの基礎実験を行うことを目標とした。

2. 2020 年度の研究成果

(1) イオンチャネル機能評価システムの開発

JST 大学発新産業創出プログラム（START、2018-2021 年度）において、マイクロチップ上に細胞膜を簡便・再現良く形成するコア技術を利用し、細胞内イオンチャネルに対する薬剤候補物質の評価技術の研究開発を進めている。細胞内イオンチャネルを標的とした製薬企業に向けた高品質なバリデーションサービスの実現によってベンチャーを設立し、新たな創薬市場の創出を目指している。

イオンチャネル計測チップに関しては、引き続き東レエンジニアリング社と共同開発を進めている。前年度、量産型の試作チップを作製し、その性能評価を行った。その結果を受け、2020 年度はチップの各部品について改良のための研究開発を実施した。脂質二重膜を担持する部品（セパレータ部品）に関しては、イオンチャネルから得られる信号の信頼性を向上させるための設計変更や材料検討を行った。また、チップのベースとなるプラスチック部品に関しても、再現性を向上させるための設計変更を行っている。計測システムに関しても、前年度の企業と共同実施した実証試験の結果を受け、計測機能の付加を検討した。計測時の脂質二重膜の性能評価を行うための機能や、計測データの信頼性を担保するための機能について、既存の計測器に試作回路を付加する形で検証を進めた。2021 年度は、これらの検証結果にもとづいて、新たに試作機を製作する予定である。また、イオンチャネル計測システムの実用化における課題を把握するため、前年度に引き続き企業との実証実験を行った。

これらシステム全体の改良を進めることで、イオンチャネル創薬支援の事業化に向けた技術課題を着実に解決できていると考えている。

成果展開として、外部研究期間との共同研究についても継続して実施した。その成果は、Nature Physics 誌や Sensors & Actuators B 誌などに掲載された。また、国際医療福祉大相馬研究室との科研費研究や、東大豊田研究室との共同研究に関しても継続して実施し、論文掲載等の成果が得られている。

(2) 人工細胞膜センサの開発

2019 年度に終了した NEDO 事業では、昆虫の嗅覚受容体を用いた匂いセンサプラットフォームの基盤技術として、標的物質の濃度変化を高感度・高確度・実時間検出するための研究開発を実施した。2020 年度、同成果をとりまとめた論文が Science Advances 誌に掲載された。気中の標的匂い物質を高感度・高確度に検出し、呼吸診断への可能性を示した同成果は、ニュース番組での紹介や新聞・Web など 20 紙以上に掲載されるなど大きな反響が得られた。

また人工細胞膜センサの要素技術については、センサ素子となる人工細胞膜の並列化による検出時間の迅速化について研究を行った。センサ素子の並列化は、計測回路の並列化も伴うためコストやサイズが課題となる。そこで、人工細胞膜と直列に抵抗器を挿入することで、並列化したセンサ素子を 1 つの計測器で計測することを可能にした。本成果については Small 誌に掲載された（当該号の裏表紙絵に採用）。

2020 年度は、昆虫嗅覚受容体を発現したセンサ細胞による匂いセンサについて、東京大学・住友化学との共同研究として JST CREST 事業（情報担体を活用した集積デバイス・システム、2020-2025 年度）の採択を受けた。竹内 G ではセンサ細胞を搭載する計測システムの研究を担当する。今年度は、センサ細胞から生じるシグナルを電氣的に検出するための基礎実験を実施した。

(3) 共同研究による成果

受託研究に関して、2018 年度より東京大学白髭克彦教授の CREST 研究である機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究に参画している。同 CREST では東京大学大杉研究室と共同で、人工細胞核を封入したリボソームを作製するためのデバイスを設計・開発している。

上記のそれぞれの研究成果は、業績一覧に示す通り、国際会議・国内学会での発表、学術論文、記者発表などとして積極的に公開している。

イオンチャネル機能評価システムの 多様な細胞内イオンチャネルへの適用検討

三村 久敏、大崎 寿久、竹内 昌治

1. はじめに

1. 1 創薬ターゲットとしてのイオンチャネル

イオンチャネルは、全ての細胞の細胞膜と細胞小器官の膜に存在する膜タンパク質である。脂質二重膜を貫通することにより、特定の無機イオンだけを通すイオン選択性のある小孔を形成する。生体内においては、膜で隔てられたコンパートメント間のイオンの流出入を制御し、細胞間や細胞内において電気的なシグナルを伝える役割を果たしている。生体機能の維持に必要なだけでなく、神経疾患や心血管疾患、癌といった様々な疾病の創薬ターゲットにもなりうると考えられている[1]。ヒトには少なくとも 400 種以上のイオンチャネルが存在し[2]、創薬に関連したヒト遺伝子の調査結果によると、これらのイオンチャネルはヒト遺伝子ファミリーにおける重要な創薬ターゲットのうち 19%を占める[3]。しかしながら、イオンチャネルの薬剤探索は、思うようには進んでいない。

1. 2 イオンチャネル機能評価システム

イオンチャネルの研究が難しい理由の 1 つとして、その標準的活性測定法であるパッチクランプ法の実験難易度が高い点が挙げられる。この方法では、細胞膜に微小ガラス管を押し当て、開口先端部の微小膜領域に含まれるイオンチャネルのイオン電流を計測する。これに対して、当研究室では、人工平面リン脂質二重膜を利用したイオンチャネル機能評価システムを開発してきた（図 1）[4-5]。このシステムでは、複数のイオン電流の同時計測が可能な人工細胞膜チップとその計測システムを用いることにより、イオンチャネルのイオン電流計測と薬剤スクリーニングを効率的に行うことを目指している。この人工細胞膜チップのフォーマットは、通常の生化学実験で用いられるサイズとボリュームに対応している。パッチクランプ法に比べて実験操作は簡便であり、通常の生化学実験を行う研究室でも容易に導入可能である。イオンチャネルを再構成するために必要となる人工平面リン脂質二重膜は、当研究室で考案された液滴接触法を利用して形成できる[6]。人工細胞膜チップのウェルに、リン脂質を分散した有機溶媒と水滴を滴下することにより、両者の界面にはリン脂質が規則的に

並んだ単分子膜が形成される。このような液滴を 2 個接触させると、それらの界面にはリン脂質二重膜が形成される。これにより、人工平面リン脂質二重膜が再現性よく容易に形成できる。

1. 3 細胞内イオンチャネル

前述のパッチクランプ法により細胞内イオンチャネルを調べる場合は、微小ガラス管を細胞内にある細胞小器官まで到達させねばならないため、これらの膜に局在する細胞内イオンチャネルのイオン電流計測は容易ではない。細胞内イオンチャネルは重要な創薬ターゲットの 1 つであるものの、パッチクランプ法で薬剤スクリーニングを行うことは難しかった。細胞内イオンチャネルの薬剤探索は、細胞膜に局在するイオンチャネルほどは進んでおらず、その探索余地は大きい。本研究では、当研究室で開発されているイオンチャネル機能評価システムの細胞内イオンチャネルへの適用可能性を調査した。

イオン電流の計測対象としては、当研究室で構築を手がけているヒトの細胞内イオンチャネルライブラリから、TRPML1 (transient receptor potential mucolipin 1)、TRIC-A (Trimeric Intracellular Cation Channel Type A)、RyR2 (Ryanodine receptor 2) の 3 種類を選んだ。TRPML1 は細胞内のリソソーム膜と後期エンドソーム膜に局在し、TRIC-A と RyR2 は小胞体に局在する。いずれも陽イオンチャネルとして機能し、ヒトの疾患にも関係する。TRPML1 の遺伝子変異は、指定難病のライソゾーム病の一種であるムコ多糖症 IV 型を引き起こすことが知られており[7]、同じくライソゾーム病であるニーマン・ピック病 C 型のほか[8]、アルツハイマー病への関与も示唆されている[9]。TRIC-A は高血圧への関与が示唆されており[10]、RyR2 は心臓の筋小胞体に局在し、不整脈などの心疾患への関与が示唆されている[11]。これらの細胞内イオンチャネルの分子構造に着目すると、TRPML1 は分子量約 65,000 の単量体が 4 量体を形成し、TRIC-A は分子量約 33,000 の単量体が 3 量体を、RyR2 は分子量約 565,000 の単量体が 4 量体を形成する。機能的な多量体の分子量はそれぞれ、TRPML1 (255 kDa)、TRIC-A (132 kDa)、RyR2 (2,2 MDa) となる（図 2）。本研究では、これらの細胞内イオンチャ

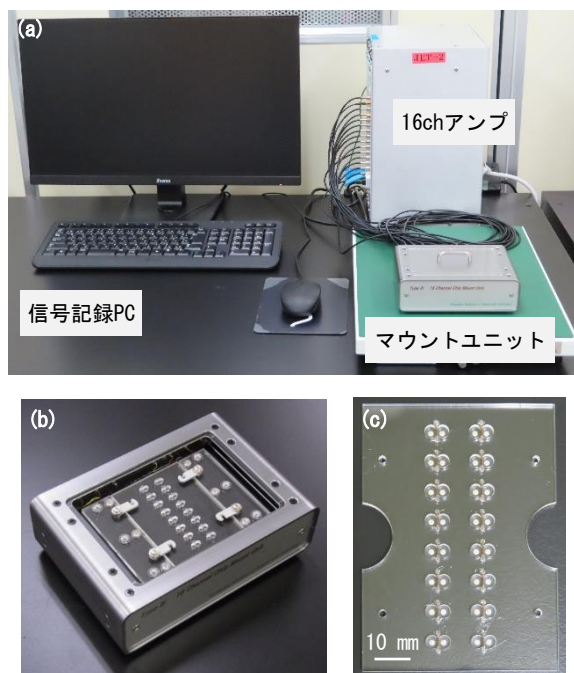


図1 (a) イオンチャネル機能評価システムの概観。人工細胞膜チップのマウントユニット、増幅器（アンプ）、信号記録PCから構成される。(b) 人工細胞膜チップをセットしたマウントユニット。(c) 人工細胞膜チップ。16のダブルウェルがあり、複数のイオン電流の同時計測が可能である。

ネルのイオン電流を計測することにより、分子量の小さなイオンチャネル（TRIC-A）から、中くらいのイオンチャネル（TRPML1）、巨大なイオンチャネル（RyR2）に至るまで、本計測システムの適用可能性を検討した。まず、これらの細胞内イオンチャネルを培養細胞で発現させ、単離・精製を行った。次に、精製したイオンチャネルを人工細胞膜チップ上に形成した平面リン脂質二重膜に導入し、そのイオン電流を計測した。その際、目的のイオンチャネルの活性を確認するため、特徴的なイオン電流の計測に加え、特異的な活性化剤や阻害剤を添加し、その効果を観察した。

2. 実験方法

2. 1 ヒト細胞内イオンチャネルの調製

ヒトの細胞内イオンチャネルの発現には、ヒト浮遊性培養細胞（FreeStyle 293-F）を用いた。哺乳類発現ベクターにはpcDNA3.1を用い、化学合成したヒトの細胞内イオンチャネルの遺伝子を組み込んだ。アフィニティー精製に利用するため、イオンチャネルのN末端にFLAGタグを付加するための配列を加えた。培養細胞は、完成した発現ベクターを用いて一過性トランスフェクションを行い、一定時間培養してTRPML1を発現させた。細胞は回収後、超音波処理または窒素ガス細胞破砕器を用いて粉砕し、低速遠心で末粉砕細胞や細胞核を含む沈殿を除き、細胞膜や細胞小器官の膜を含む膜画分を上清に回収した。膜画分には界面活性剤を加え、細胞内イオンチャネルを含む膜タンパ

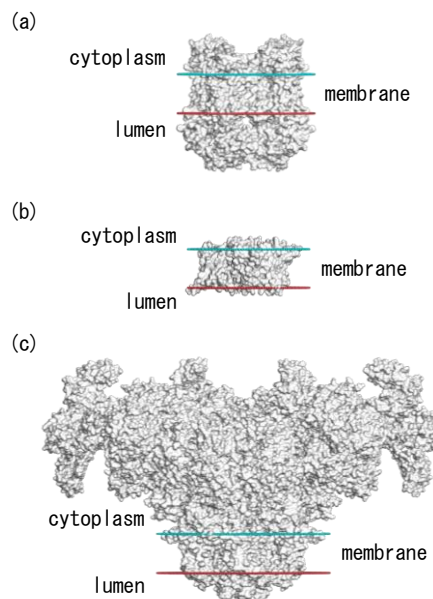


図2 計測を行った細胞内イオンチャネル。(a) TRPML1 (255 kDa)。(b) TRIC-A (132 kDa)。(c) RyR2 (2.2 MDa)。

ク質を可溶化し、超遠心後の上清に回収した。可溶化画分からの細胞内イオンチャネルの精製は、Anti-FLAG M2 アフィニティーゲルを用いて行った。可溶化画分にアフィニティーゲルを加えてインキュベートし、カラムにパックして回収した。バッファーで洗浄後、FLAG ペプチドを含むバッファーで細胞内イオンチャネルを溶出した。細胞内イオンチャネルは、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いてさらに精製し、イオン電流計測のサンプルとした。

2. 2 細胞内イオンチャネルのイオン電流計測

精製した細胞内イオンチャネルのイオン電流は、人工細胞膜チップとその電気計測システムを用いて計測した。人工細胞膜チップをマウンターにセットし、リン脂質（20 mg/ml）を分散したオイル（n-Decane）を8の字型ウェルの両方に滴下した。次に、精製した細胞内イオンチャネルを希釈した水溶液を両方のウェルに滴下した。これにより、2つの液滴間の界面にリン脂質二重膜が形成される。計測開始後、イオンチャネル分子がリン脂質二重膜に再構成されると、イオン電流が観察されるようになる。活性化剤や阻害剤といった化合物の添加は、計測を開始してから一定時間後に、両ウェルの液滴の水溶液中に加えた。

3. 結果と考察

本研究で調製した細胞内イオンチャネルをSDS-PAGE（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動）で分析した結果を図3に示す。最終精製産物に含まれるタンパク質を色素染色により検出している。バンドパターンから、対象とした細胞内イオンチャネルは高純度に精製できたことがわかる。TRPML1では、複数本のバンドが観察された。動物細胞で発現したタンパク質は不均一な糖鎖修飾を受けることが多いため、分子量の異なるバンドが観察される場合

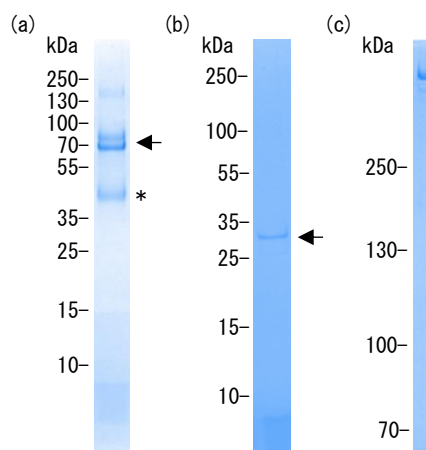


図 3 精製したヒトの細胞内イオンチャネルの SDS-PAGE 分析。電気泳動後、CBB (Coomassie Brilliant Blue) でタンパク質を染色した。(a) TRPML1。(b) TRIC-A。(c) RyR2。矢印は目的のイオンチャネルのバンドを示す。アスタリスク (*) は TRPML1 の分解産物を示す。

があることが知られている。TRPML1 も糖鎖修飾により、分子量が僅かに異なる分子が合成されたと考えられる。50 kDa 付近に見えるバンドは、TRPML1 の分解産物であると考えられる。TRPML1 は細胞内の消化器官であるリソソームに局在するため、精製の過程で分解されたものが一部含まれることが知られている[12]。TRIC-A と RyR2 に関して、目的の大きさのバンドが観察されたことを確認している。

精製した細胞内イオンチャネルのイオン電流を、人工細胞膜チップとその電気計測システムを用いて計測した結果を図 4 に示す。TRPML1 では、特異的活性化剤である ML-SA1 の添加により TRPML1 が活性化されることを確認できた。TRIC-A では、分子構造に由来すると考えられる 3 段階のイオン電流が観察された。TRIC-A は 3 量体構造を形成し、その構成要素である単量体にはイオン透過孔がそれぞれ 1 個ずつ存在することが知られている。RyR2 では、活性化剤である Caffeine と ATP の添加による活性化、遮断薬である Ryanodine による半開き状態のサブコンダクタンス、不活性化剤である Ruthenium red による不活性化が観察された。このことにより、検出されたイオン電流はそれぞれの細胞内イオンチャネルに由来するものであり、創薬スクリーニングで重要となる薬剤添加の効果も確認可能であると考えられる。この結果、本計測システムは、様々な大きさの細胞内イオンチャネルへ適用可能であることが確認されたと考えられる。今後も引き続き、計測対象とする細胞内イオンチャネルの適用範囲を広げることにより、イオンチャネル機能評価システムの実用化並びにこれを用いた事業化の検討を進めていく。

【謝辞】

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 大学発新産業創出プログラム (JPMJST1811) による支援を受けて行われました。ここに記して感謝申し上げます。

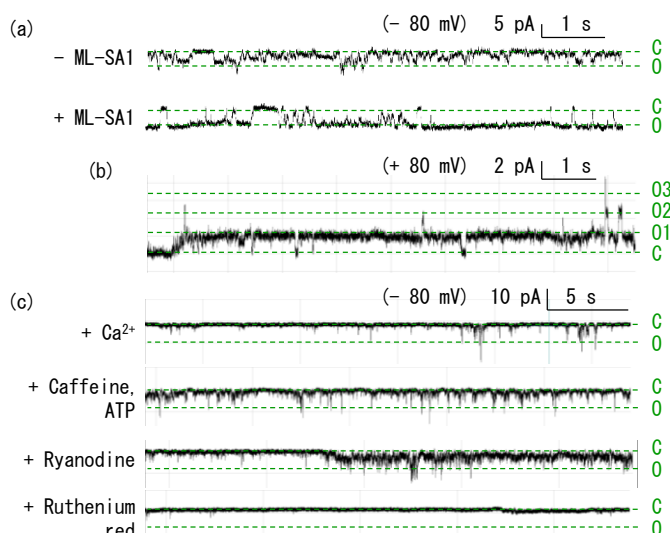


図 4 イオンチャネル機能評価システムを用いて計測したヒト細胞内イオンチャネルの活性。(a) TRPML1 のイオン電流。特異的活性化剤である ML-SA1 の添加前後の様子を示す。10 μ M ML-SA1 の添加により、イオンチャネルが開いていることを示す電気信号 (0) の割合が、閉じていることを示す電気信号 (C) の割合に比べて増加していることがわかる。(b) Tric-A のイオン電流。イオンチャネルが開いていることを示す電気信号が 3 段階 (01 から 03) で計測されていることがわかる。Tric-A 分子内の 3 つのイオン透過孔に対応するイオン電流と考えられる。(c) RyR2 のイオン電流。20 μ M Ca^{2+} のみに比べ、活性化剤である 5 mM Caffeine と 5 mM ATP の添加により、イオンチャネルが開いていることを示す電気信号の割合が増加していることがわかる。さらに、10 μ M Ryanodine の添加により、サブコンダクタンス（ここでは半開き状態を示す）が観察され、不活性化剤である 30 μ M Ruthenium red の添加により、イオンチャネル活性が阻害されていることがわかる。

【参考文献】

- [1] Wulff H, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2019, 18, 339-357.
- [2] Hutchings C J, et al., *mAbs* 2019, 11, 265-296.
- [3] Santos R, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16, 19-34.
- [4] Kawano R, et al., *Sci Rep* 2013, 3, 1995.
- [5] Kamiya K, et al., *Sci Rep* 2018, 8, 17498.
- [6] Funakoshi K, et al., *Anal Chem* 2006, 78, 8169-8174.
- [7] Bargal R, et al., *Nature genetics* 2000, 26, 118-123.
- [8] Shen D, et al., *Nat Commun* 2012, 3, 731.
- [9] Zhang L, et al., *Cell Physiol Biochem* 2017, 43, 2446-2456.
- [10] Yamazaki D, et al., *Cell Metabolism* 2011, 14, 231-241
- [11] Blayney LM, et al., *Pharmacol Ther* 2009, 123, 151-177
- [12] Schmiede P, et al., *Nature* 2017, 550, 366-370

呼吸診断のための昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ

大崎 寿久、山田 哲也、杉浦 広峻、三村 久敏、神谷 厚輝、竹内 昌治

1. はじめに

1. 1 昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサ

生物の嗅覚は、空気中のわずかな匂いを認識できる優れた感度と選択性をもつ。この匂い認識の分子機構は、細胞の膜上に存在する嗅覚受容体が、標的の匂い分子と結合するところから始まる。その後のシグナル伝達は哺乳類と昆虫では異なるが、昆虫の場合、嗅覚受容体がリガンド依存型イオンチャネルを形成しており、匂い分子（基質）の結合によってイオンチャネルが開いて陽イオンの細胞内への流入が生じる仕組みになっているとされる[1]。

近年、この昆虫の嗅覚受容体の機能は、優れたセンサの素子として注目されている。匂い分子に対する①高い選択性と、1分子の結合を毎秒1千万個のイオン電流に変換することで得られる②1分子レベルの感度とを、1タンパク質の中に併せ持つという特長により、次世代の匂いセンサとして研究が盛んに行われている[2]。

1. 2 液滴接触法

昆虫嗅覚受容体のような膜タンパク質の機能を生体外で利用するためには、細胞膜（脂質二重膜）を人工的に作製する技術が必要となる。古典的には、高分子薄膜に微小な孔を設け、そこに脂質を分散した有機溶媒を塗布して薄膜化させることで脂質二重膜を得る刷毛塗り法や、気液界面に展開した脂質単分子膜を貼り合わせることで脂質二重膜を得る Montal-Mueller 法などがある。2000 年代以降になると、マイクロ流体デバイスを用いる方法が報告されるようになった[3]。

液滴接触法は、脂質を分散した油中において、水滴表面に自発的に脂質単分子膜が形成される原理を利用する。脂質単分子膜が表面に形成された油中水滴 2 つを接触させることで、その界面に脂質二重膜構造が形成される[4]。この方法は液滴サイズと液滴間距離を規定すれば滴下操作のみで迅速に再現良く脂質二重膜を形成できる点が優れる。我々は、本法を用いて膜タンパク質の機能評価システム[5]や細胞膜センサ[6]の研究を行ってきた。

1. 3 嗅覚受容体を用いた匂いセンサの課題

人工細胞膜上に嗅覚受容体を搭載した匂いセンサは、上述の通り、分子間の特異的相互作用を利用するため、選択性に優れる。また、受容体の信号変換・増幅効率を利用すれば、電気的計測技術によって標的の匂い分子 1 分子を検出することも理論的には可能である。先行研究において、

液滴接触法で作製した人工細胞膜に昆虫嗅覚受容体を組み込み、こうした選択性や感度について報告した[6]。分子レベルの大きさに高い選択性と感度を内封するこのセンサは、呼吸診断や環境計測など、従来の人工物センサでは対応が困難だった分野への活用が期待される。

しかしながら、匂い分子を空気中から直接検知することには課題も残されている。匂い分子は、分子量 100 から 300 Da 程度までの揮発性有機化合物であり、一般的に脂溶性である。すなわち、空気中の匂い分子は水には難溶であるため、人工細胞膜や嗅覚受容体が活性を維持するために必要な水溶液に対する溶解度は小さい。受動的な方法では匂い分子が水溶液中に十分溶け込むまでには長い時間を要することが推測される。また、液滴接触法のように油中に水滴がある場合、気相と接する油（有機溶媒）に匂い分子が溶解し、水滴中へは匂い分子は分配されない[6]。そこで本研究では、空気中の匂い分子を効率的に水溶液中に分配・溶解するためのガス導入機構を考案し、その概念実証として、開発したデバイスを用いて呼吸に混入させた疾患マーカーの検出を行った。

2. 実験方法

2. 1 昆虫嗅覚受容体を用いた匂いセンサの作製

匂いセンサの基盤となる脂質二重膜の作製には前述の液滴接触法を用いた。実際のデバイスでは、8 字状に 2 つの円筒ウェルが接したダブルウェルを設け、その境界に直径 100 ミクロン程度の微小孔をもつセパレータフィルムを配置している。ウェルは液滴の位置・接触圧力を制御しており、液滴は微小孔において接触し、面積が制御された安定な膜が形成される。センサ素子となる昆虫嗅覚受容体は、無細胞タンパク質合成系を利用して作製した。本研究では、蚊の嗅覚受容体 OR8 の配列をコードする DNA を細胞抽出液や翻訳因子から再構成したシステムに添加することで作製した。作製の際にリポソーム（脂質二重膜小胞）を混合することで、嗅覚受容体が再構成したプロテオリポソームを得ることができる。プロテオリポソームは、脂質二重膜と自発的に融合するため、嗅覚受容体を脂質二重膜に組み込むことができる。本研究では、このダブルウェルを 16 個並列化したデバイスを用いた（図 1）。

空気中の匂い分子を効率的に水溶液中に分配・溶解するため、上記の液滴接触法デバイスにガス導入機構を組み込んだ。デバイスの片側の円筒ウェル底面に微細なスリット状のマイクロ流路を作製した。また、流路表面は撥水・撥

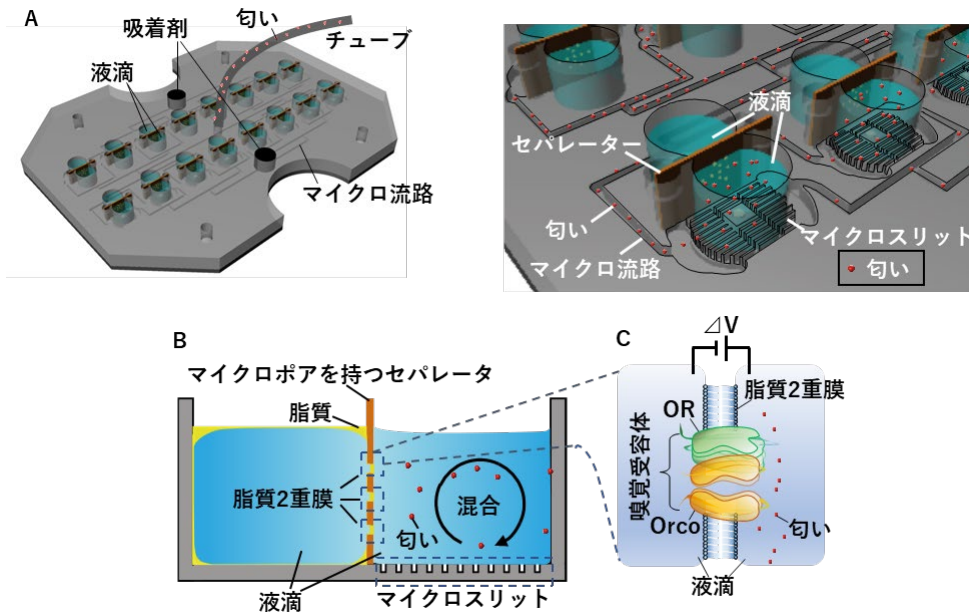


図1 (A) 16チャンネル匂いセンサデバイスの模式図。(B) マイクロスリットを使った匂い分子導入機構の模式図。(C) 嗅覚受容体を人工細胞膜に再構成させた模式図。(文献7より改変)

油コートをした(図1B)。マイクロスリットのあるウェルには水溶液のみを滴下し、もう片方の円筒ウェルに脂質分散油と水滴を滴下することで脂質二重膜を作製した。スリットを撥水処理したことにより、ウェルに滴下した水溶液はスリット内部に侵入しない。マイクロスリットは、上面を水溶液に接したマイクロ流路を形成する(図1C)。このマイクロ流路に匂い分子を含む気体を流すことで、匂い分子を液滴中に導入する機構を考案した[7]。マイクロ流路に導入された気体は気液界面にせん断力を生み、その力によって液滴内部が攪拌される。この攪拌が起こることにより、匂い分子が液滴に効率よく溶解すると考えた。

2. 2 呼吸サンプルの計測方法

呼吸サンプルは、市販のガス採取バックに採取した。本研究では、標的匂い分子として、肝臓ガンのバイオマーカーとの報告があるオクテノール(1-octen-3-ol)を使用した[8,9]。健康者の呼吸をガス採取バックに採取し、そこにオクテノールを添加したものを呼吸サンプルとして使用した。ガス採取バックはポンプに接続し、呼吸サンプルは流量調整器を介して前述の匂いセンサデバイスに導入した(図2A)。デバイスには中央部分にガス導入口があり、そこから16個のダブルウェル底面のマイクロスリットにガスを導入した(図1A)。ダブルウェル底面に配置した銀/塩化銀電極により、人工細胞膜を流れるイオン電流を計測した。昆虫嗅覚受容体はリガンド依存型イオンチャネルであるため、標的となる匂い分子の結合に伴って、膜電位に応じたイオン電流を生じる。このイオン電流を計測することで、オクテノールが試料中に存在するかを検知することができる。

3. 結果と考察

まず、ガス導入機構を使用した場合の匂い分子オクテノールの気相から液相への溶解について観測した。マイクロスリットに導入するガスの流速が増加するにつれて、液滴内部の攪拌速度が大きくなることがマイクロビーズを用いた観測から分かった。また、オクテノールガス(濃度5 ppm)を導入し、10分後に液滴内に取り込まれたオクテノール濃度をガスクロマトグラフィにより定量したところ、従来のガス導入機構を持たないデバイスと比較して、約4倍の濃度まで溶解させることができた。

このガス導入機構を用いて、呼吸サンプル中の標的に負い分子の観測を行った。ヒトの体内で産生される代謝物は体の状態を反映しているとされ、この代謝物を分析することはガンや糖尿病などの疾患の早期診断に繋がると考えられている。呼吸診断は、代謝物を非侵襲的に調べるための方法として近年注目されている。一方で、ヒトの呼吸中には約3000種の代謝物が含まれており[9,10]、その中から疾患のバイオマーカーとなる特定の分子を正確に検出するには、生物の持つ嗅覚のような優れた選択性が必要となる。本研究では、蚊の嗅覚受容体を人工細胞膜に組み込んだ匂いセンサを用いて、呼吸サンプル中のオクテノール(肝臓ガンマーカー)の検出を試みた(図2A)。被験者の呼吸にオクテノールを混合しなかった場合、図2Bに示すように電流シグナルは観測されなかった。一方で、被験者の呼吸とオクテノールをそれぞれ0.5 ppb、5 ppbを混合した呼吸サンプルの場合、嗅覚受容体由来の矩形波状の電流シグナルが観測された(図2C,D)。また、電流シグナルにおける開状態の頻度(開確率)はオクテノール濃度とともに増加することも分かった(図2E)。この結果は、本研究の嗅覚受容体を用いた匂いセンサが、呼吸サンプルに含ま

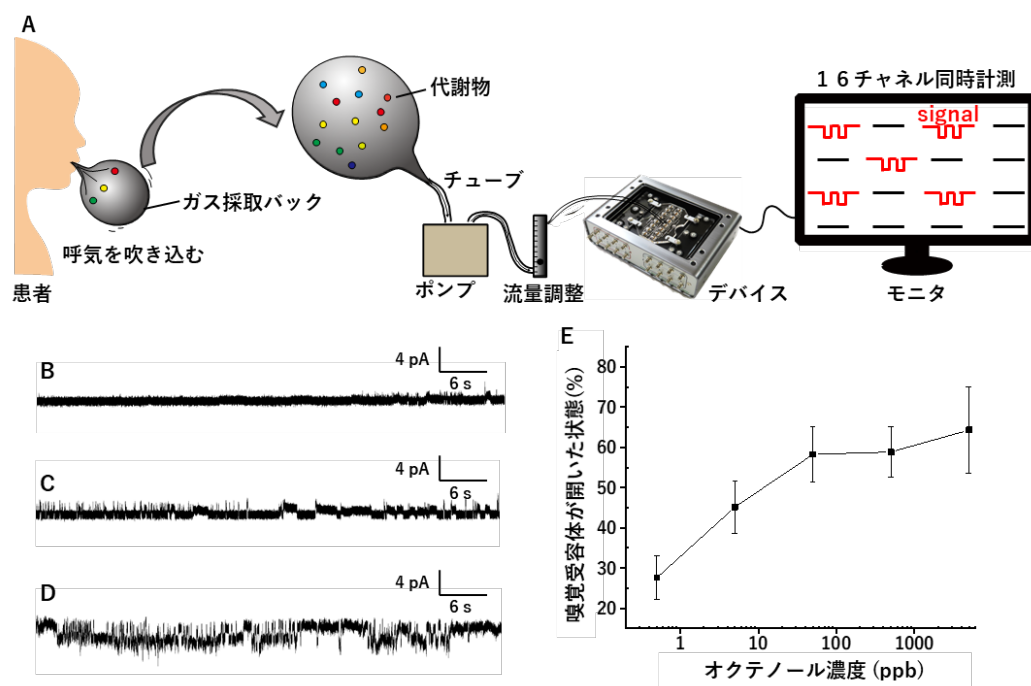


図2 (A) 呼吸サンプル測定の大略図。(B-D) 呼吸に混合したオクテノール計測結果。混合したオクテノール濃度: (B) 0 ppb、(C) 0.5 ppb、(D) 5 ppb。(E) オクテノール濃度と嗅覚受容体の開確率の関係。(文献7より改変)

れる ppb レベルのオクテノールを、雑多な匂い分子の混合物である呼吸中から検出できたことを示している。

本研究では、空気中の匂い分子を水溶液中に取り込むためのガス導入機構を、昆虫嗅覚受容体を用いる匂いセンサに搭載し、呼吸サンプル中の標的匂い分子の検出の概念実証を行った。この成果は、今後、こうした匂いセンサの呼吸診断への応用に繋がるものと考えている。

【謝辞】

本研究内容の一部は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラム、日本学術振興会科研費基盤研究 S 16H06329 の助成、および国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 次世代人工知能・ロボット中核技術開発委託事業により行われました。ここに感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] K. Sato, M. Pellegrino, T. Nakagawa, T. Nakagawa, L. B. Vosshall, and K. Touhara, "Insect Olfactory Receptors Are Heteromeric Ligand-Gated Ion Channels," *Nature*, vol. 452, pp. 1002-1006, 2008.
- [2] N. Misawa, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Membrane Protein-based Biosensors," *J. R. Soc. Interface*, vol. 15, 20170952, 2018.
- [3] T. Osaki and S. Takeuchi, "Artificial Cell Membrane Systems for Biosensing Applications," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 1, pp. 216-231, 2017.
- [4] K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 24, pp. 8169-8174, 2006.
- [5] K. Kamiya, T. Osaki, K. Nakao, R. Kawano, S. Fujii, N. Misawa, M. Hayakawa, and S. Takeuchi, "Electrophysiological Measurement of Ion Channels on Plasma/Organelle Membranes Using an On-Chip Lipid Bilayer System," *Sci. Rep.* vol. 8, 17498, 2018.
- [6] N. Misawa, S. Fujii, K. Kamiya, T. Osaki, T. Takaku, Y. Takahashi, and S. Takeuchi, "Construction of a Biohybrid Odorant Sensor Using Biological Olfactory Receptors Embedded into Bilayer Lipid Membrane on a Chip," *ACS Sens.* vol. 4, no. 3, pp. 711-716, 2019.
- [7] T. Yamada, H. Sugiura, H. Mimura, K. Kamiya, T. Osaki, and S. Takeuchi, "Highly sensitive VOC detectors using insect olfactory receptors reconstituted into lipid bilayers," *Sci. Adv.*, vol. 7, eabd2013, 2021.
- [8] R. Xue, L. Dong, S. Zhang, C. Deng, T. Liu, J. Wang, and X. Shen, "Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, pp. 1181-1186, 2008.
- [9] H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, and A. Amann, "Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, pp. 1423-1449, 2014.
- [10] Y. Y. Broza, X. Zhou, M. Yuan, D. Qu, Y. Zheng, R. Vishinkin, M. Khatib, W. Wu, H. Haick, "Disease detection with molecular biomarkers: from chemistry of body fluids to nature-inspired chemical sensors," *Chem. Rev.*, vol. 119, pp. 11761-11817, 2019.

業 績

【原著論文】

1. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Taro Toyota
Perfusion Chamber for Observing a Liposome-Based Cell Model Prepared by a Water-in-Oil Emulsion Transfer Method
ACS Omega, Vol.5, pp.19429-19436 (2020).
2. Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi
Formation of Nano-Sized Lipid Vesicles with Asymmetric Lipid Components Using a Pulsed-Jet Flow Method
Sensors and Actuators: B. Chemical, Vol.327, 128917 (2021).
3. Yoshihisa Ito, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Tetsuya Yamada, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Rapid and Resilient Detection of Toxin Pore Formation Using a Lipid Bilayer Array
Small, Vol.16, 2005550 (2020).
4. Yoshihisa Ito, Yusuke Izawa, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Hisatoshi Mimura, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
A Lipid-Bilayer-On-A-Cup Device for Pumpless Sample Exchange
Micromachines, Vol.11, 1123 (2020).
5. Nobuo Misawa, Satoshi Fujii, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Efficient Lipid Bilayer Formation by Dipping Lipid-Loaded Microperforated Sheet in Aqueous Solution
Micromachines, Vol.12, 53 (2021).
6. Tetsuya Yamada, Hirotaka Sugiura, Hisatoshi Mimura, Koki Kamiya, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Highly Sensitive VOC Detectors Using Insect Olfactory Receptors Reconstituted into Lipid Bilayers
Science Advances, Vol.7, eabd2013 (2021).
7. Taishi Tonooka, Toshihisa Osaki, Koji Sato, Ryuji Kawano, and Shoji Takeuchi
Lipid Bilayer on a Microdroplet Integrated with a Patterned Ag/AgCl Microelectrode for Voltage-Clamp Fluorometry of Membrane Transport
Sensors and Actuators: B. Chemical, Vol.334, 129643 (2021).
8. Hiroki Yasuga, Emre Iseri, Xi Wei, Kerem Kaya, Giacomo

Di Dio, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Polyxeni Nikolakopoulou, Sebastian Buchmann, Johan Sundin, Shervin Bagheri, Shoji Takeuchi, Anna Herland, Norihisa Miki, and Wouter van der Wijngaart
Fluid Interfacial Energy Drives the Emergence of Three-Dimensional Periodic Structures in Micropillar Scaffolds
Nature Physics, Vol.17, pp.794-800 (2021).
(doi:10.1038/s41567-021-01204-4)

【総説】

1. 大崎寿久、竹内昌治
MEMS技術との融合により実現する人工細胞膜センサ
センササイト(Web ジャーナル)
株式会社オプトロニクス社 センササイト・プロジェクト、2020年11月

【書籍】

1. 山田哲也、大崎寿久、竹内昌治
人工細胞膜を利用したセンサ開発
膜タンパク質工学ハンドブック
株式会社エヌ・ティー・エス、2020年4月
2. 杉浦広峻、大崎寿久、山田哲也、竹内昌治
人工細胞膜を用いた匂いセンサ
匂いのセンシング技術
株式会社シーエムシー出版、2020年8月
3. 山田哲也、杉浦広峻、大崎寿久、竹内昌治
嗅覚受容体を利用したバイオハイブリッド匂いセンサ
においのセンシング、分析とその可視化、数値化
株式会社技術情報協会、2020年10月

【口頭発表】

1. 杉浦広峻、大崎寿久、三村久敏、山田哲也、竹内昌治
誘電泳動力を用いた平面脂質平面膜に対する高速リソソーム導入
ロボティクス・メカトロニクス講演会 2020
2020年5月、石川 (Online)
2. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Taro Toyota
Abiotic Accumulation of Small Molecules and Ions into Cellular Compartment against a Concentration Gradient
Molecular Origins of Life, Munich 2020
2020年7月、ドイツ (Online)
3. 三村久敏、大崎寿久、杉浦広峻、神谷厚輝、竹内昌治
細胞内イオンチャネルの薬剤スクリーニングのための

平面脂質二重膜アレイ

第93回日本生化学会大会 分野を超えて～守る生化学、攻める生化学～

2020年9月、神奈川 (Online)

4. Hironori Sugiyama, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, Taro Toyota

Automated Direct Observation Unveiled Hydrodynamic Accumulation of Molecules into Cell-Sized Liposomes against a Concentration Gradient

第58回日本生物物理学会年会

2020年9月、群馬 (Online)

5. 大崎寿久

細胞内イオンチャネル創薬のためのスクリーニングシステムの研究開発

第64回日本薬学会 関東支部大会「令和新時代の薬学アイデンティティを考える」

2020年9月、東京 (Online)

6. 竹内昌治

膜をはり、分子をはかる

生理学研究会 on ZOOM「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム：構造生物学の先にあるもの」

2020年10月、愛知 (Online)

7. 菅原啓亮、大崎寿久、新富美雪、新富圭史、森本雄矢、大杉美穂、竹内昌治

3次元マイクロ流路によるカエル卵抽出液内封液滴の作製

化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会

2020年10月、熊本 (Online)

8. 三村久敏、杉浦広峻、大崎寿久、小田悠加、竹内昌治

細胞センサのための電気生理学的検出技術の開発

化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会

2020年10月、熊本 (Online)

9. 伊藤嘉玖、大崎寿久、三村久敏、三木則尚、竹内昌治

液滴の攪拌を利用したナノポアセンサの検出迅速化

日本機械学会第11回マイクロ・ナノ工学シンポジウム

2020年10月、熊本 (Online)

10. 中根卓馬、三村久敏、大崎寿久、三木則尚、竹内昌治

細胞を用いた匂いセンサのためのガスフロー機構

日本機械学会第11回マイクロ・ナノ工学シンポジウム

2020年10月、熊本 (Online)

11. 杉山博紀、大崎寿久、竹内昌治、豊田太郎

定常流れ場中での細胞サイズのリポソームへの分子濃縮に関する分子論的考察

「細胞を創る」研究会 13.0

2020年11月、東京 (Online)

12. 竹内昌治

次世代健康医療分野を拓くバイオハイブリッドセンシング

センサ&IoT コンソーシアム 公開シンポジウム 2020“バイオメディカル計測と健康医療センシング”

2020年12月、東京 (Online)

13. 竹内昌治

バイオハイブリッドが拓く未来のモノづくり

第5回 BJRF in Japan ボストン日本人研究者交流会 日本支部

2020年12月、東京 (Online)

【記者発表、取材】

2021年1月13日オンライン記者説明会 (東京大学大学院情報理工学研究科、KISTEC 共同発表)

「蚊の嗅覚受容体で呼気診断!?～蚊の嗅覚受容体を用いたセンサにより 0.5ppb レベルの匂いの検出に成功～」

※以下は上記記者説明会に対する報道

1. Shoji Takeuchi

How does your computer smell? Researchers create a highly sensitive biohybrid olfactory sensor

EurekAlert! (Web)、2021年1月13日

2. Shoji Takeuchi

Researchers create a highly sensitive biohybrid olfactory sensor

Tech Xplore (Web)、2021年1月13日

3. 山田哲也 (研究当時)、竹内昌治

東大と KISTEC、蚊の嗅覚受容体を用いたセンサにより 0.5ppb レベルの匂いの検出に成功

日本経済新聞 (Web)、2021年1月14日

4. 竹内昌治

「蚊の嗅覚」で呼気中の肝臓がんバイオマーカーを検出、東大 がんや糖尿病の「呼気診断」への応用を目指す

日経 BP (Web)、1月14日

5. 竹内昌治

蚊の嗅覚、がん診断に利用 小型高精度のセンサー開発—東大など

時事ドットコム (Web)、1月14日

6. 蚊の嗅覚で微量のにおい検出成功 東京大 がんの予兆感知に期待

産経新聞 (Web)、1月14日

7. 蚊の嗅覚用いたがん診断技術—関連企業に住友化
株式新聞 (Web)、1 月 14 日 (会員限定記事)
8. Shoji Takeuchi
The Smell of Progress: Researchers Create Biohybrid
Scents Sensor
TECHNOLOGY NETWORKS (Web)、1 月 14 日
9. 山田哲也 (研究当時)、竹内昌治
0.5ppb レベルの匂いを検出：蚊の嗅覚受容体を用いた
匂いセンサーを高精度化
EE Times Japan (Web)、1 月 15 日
10. Shoji Takeuchi
Highly Sensitive, Biobased Detectors for Volatile Organic
Compounds
Chemistry Views (Web)、1 月 15 日
11. Shoji Takeuchi
Japanese team develops cancer detector using mosquito's
sense of smell
The japan times (Web)、1 月 15 日
12. Shoji Takeuchi
How to give computers a sense of smell
nanowerk (Web)、1 月 15 日
13. Shoji Takeuchi
Wie kann Ihr Computer riechen? Forscher schaffen einen
hochempfindlichen biohybriden Geruchssensor!
CHEMIE.DE (Web)、1 月 15 日
14. Shoji Takeuchi
How does your computer smell? Researchers create a
highly sensitive biohybrid olfactory sensor
CHEM Europe.com (Web)、1 月 15 日
15. Shoji Takeuchi
Japonlardan çığır açan buluş: Sivrisineklerden kanser
dedektörü geliştirildi!
gidahatti (Web)、1 月 16 日
16. 山田哲也 (研究当時)、竹内昌治
東大など、蚊の嗅覚受容体を組み込んだ高感度匂いセ
ンサの開発に成功
マイナビニュース (Web)、1 月 18 日
17. 竹内昌治
“蚊のタンパク質”人工的に作り高感度の臭いセンサー
開発
おはよう日本 (TV)、1 月 18 日
18. 竹内昌治
“蚊のタンパク質”人工的に作り高感度の臭いセンサー
開発
NHK News Web (Web)、1 月 18 日
19. 竹内昌治
肝がん目印 低濃度でも検出 東大、小型においセン
サー
日刊工業新聞 (21 面)、1 月 18 日
20. Shoji Takeuchi
Mosquitos can be an early warning system for cancer,
repoort finds
7News (Web)、1 月 19 日
21. 蚊の嗅覚の仕組みで肝臓がんを感知 東大などのチー
ム、呼気に含まれるにおい物質検出
朝日新聞デジタル (Web)、1 月 21 日(会員限定)
22. 竹内昌治
蚊の嗅覚の仕組みで肝臓がんを感知 東大などのチー
ム 呼気に含まれるにおい物質検出
朝日新聞 (19 面)、1 月 21 日
23. Los mosquitos son capaces de oler los primeros signos de
cáncer humano
La Vanguardia (Web)、1 月 21 日
24. 蚊のしくみで肝臓がん感知 におい感じる感覚を再現
朝日小学生新聞 (3 面)、1 月 23 日
25. 微量の匂い分子を検出する、蚊の嗅覚受容体を利用し
た匂いセンサーを開発
MONOist (Web)、2 月 9 日
26. 竹内昌治
蚊の嗅覚システム利用 がん検知
しんぶん赤旗(12 面)、2 月 22 日

他 Web 転載記事 26 社

【特許】

- (1) 国内特許出願 3 件
- (2) 国外特許出願 3 件