

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在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マイクロチップ上に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つの人工細胞膜システムを確立した。(1)電氣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、人工細胞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細胞膜に効率的・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た。2021年度、このイオンチャネルの機能評価技術を基盤とするベンチャーの起業に至った。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(2018-2022年度)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。JST-CREST事業(2020年度開始)、科研費研究(2021年度開始)において、細胞をセンサ素子として用いる研究開発も企業と共同で進めている。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. 2025年度の研究目的

実用化実証事業13年目となる2025年度は、イオンチャネル機能評価システムについて、設立したKISTEC発ベンチャーの継続的な研究開発支援として計測精度および計測効率の向上を目標とした。一方で、センサ開発に関しては、東大・住友化学と共同で実施している標的物質に応答する細胞をセンサ素子とするバイオハイブリッドセンサ研究開発について、細胞センサのアレイ化技術を確立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、これらの人工細胞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となる技術の実現を目標として研究開発を行ってきた。

2025 年度はわれわれの技術を元にした KISTEC 発ベンチャーである「株式会社 MAQsys」の研究開発支援を継続した。計測チップやタンパク質調製技術の改良を行うことで、計測精度および計測効率の向上を目標とした。

(2) バイオハイブリッドセンサの開発

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、小型で高性能の化学量センサを実現できると考えられる。

イオンチャネル機能評価システムの開発成果により、マイクロチップ上での脂質二重膜を再現良く形成し、そこに再構成したイオンチャネルの機能を活用できるようになった。NEDO 事業（2015-2019 年度）では、昆虫嗅覚受容体を脂質二重膜に組み込んだ人工細胞膜センサのプラットフォーム技術確立し、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きた。その成果のデモンストレーションとして、ヒトの呼気中に混合したごく微量の疾患マーカーの検出を実証し、新聞・TV 等で取り上げられるなど注目された。2020 年度より、JST-CREST および科研費の支援を受け、生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサの学術基盤および概念実証を目的とする研究を進めている。

2025 年度は、複数種類の標的物質（疾患マーカー）に応答可能な細胞センサを実現するためのアレイ化技術の確立を目標とした。

2. 2025 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）等の公的研究費による支援と、東レエンジニアリング社の技術協力を得て、2021 年 8 月、KISTEC 発ベンチャーとして「株式会社 MAQsys」を設立した。同社は形質膜や細胞内小器官のイオンチャネルを標的とした薬剤候補化合物の評価を通して、新たな創薬市場の創出を目指している。2025 年度は、MAQsys 社が事業開始に向けて行う研究開発に関して、計測チップやイオンチャネル材料調製技術の改良に関する研究支援を行い、計測精度および計測効率の更なる向上に取り組んだ。

イオンチャネル材料調製技術については、GoTech 補助事業の採択を受けて、東京薬科大学と共同で、イオンチャネル材料の発現・調製および脂質二重膜への導入技術の開発を行った。薬剤標的となるイオンチャネルに対して、複数の発現方法・調製・精製方法および条件検討を実施した。イオンチャネルを担持するための脂質媒体について、一般的なプロテオリポソームに加えて、異なる媒体への担持を検討し、脂質二重膜との融合効率の評価などを行った。

計測チップに関しては、イオンチャネルの脂質二重膜への再構成を促進するため、セパレータの孔形状を一般的な円形からさまざまな非円形状へと変更する検討を継続して行った。各孔形状における定量評価を実施し、イオンチャネルが脂質二重膜に効率的に再構成される形状について明らかにした。またセパレータ作製工程についても、より簡便かつ効率的なプロセスの開発を行った。

成果展開として、協力研究員による萌芽研究を実施している。また国内外の研究機関との共同研究も行っている。2025 年度は、米国 Iona 大学との人工細胞膜中の油相の分配に関する共同研究成果が Journal of Physical Chemistry B 誌に掲載された。

(2) バイオハイブリッドセンサの開発

生体機能と機械を融合したバイオハイブリッドセンサに関しては、科研費研究（2021-2025 年度）による学術基盤確立、JST-CREST 事業（情報担体；2020-2026 年度）による実用性実証をそれぞれ目的として、研究および開発を進めている。CREST 事業については 1 年間の追加支援により研究開発を継続することとなった。細胞上に発現させた受容体をセンサ素子とする細胞センサに関して、東京大学、住友化学と共同で実施している。KISTEC では、センサ細胞が標的物質に応答して発する微小シグナルをデバイスで検出するための計測基盤について研究を行い、概念実証のための計測システムを製作・開発することを目標としている。

2025 年度は、複数の標的物質に対する細胞センサの応答特性を評価するための、細胞センサのアレイ化技術を構築し、その細胞センサアレイを用いて臨床検体の評価を開始した。

まずセンサ細胞のアレイ化技術について、多種センサ細胞を簡便・迅速にアレイ化する技術を確立した。鉤爪を配列したデバイスにおいて、鉤爪内に細胞を含む溶液をピペットで滴下してゲル化することで、細胞アレイを作製した。このデバイスおよび手法を用いて多種類のセンサ細胞からなるアレイを作製し、さまざまな標的物質に対してセンサ細胞が特異的に応答することを示した。この細胞センサアレイを用いて臨床検体の評価を開始した。臨床検体の評価に向けて、検体に含まれる夾雑成分や蛍光計測への影響を抑えながら、揮発性成分をセンサへ導入するための技術開発も進めた。これにより、実際の検体を対象としたセンサ評価に必要な周辺技術の整備が進んだ。

一方で、規則性をもって配列することなく異なるセンサ細胞を判別する技術を構築した（Small 誌掲載）。すなわち、特徴的な形状のハイドロゲル内にセンサ細胞を包埋することで、位置情報に頼ることなく、撮影画像中のセンサ細胞を機械学習により自動で形状判別を行い、ハイドロゲルに包埋されたセンサ細胞を特定する。本技術により乱雑な状態のセンサ細胞の配置であっても、センサ細胞の応答パターンを評価できる。

また、気相中の匂い成分をセンサ細胞が応答しやすい液相へ効率よく取り込むための気液変換技術についても検討

を進めた。気液界面を拡大する方法を用いることで、揮発性成分を効率的に液中へ導入するための基盤技術を構築した。

こうした細胞センサアレイを搭載し、蛍光計測が可能な小型蛍光イメージング装置について、試作機の開発を行った。

(3) 共同研究による成果

サウジアラビアの King Saud 大学と実施した共同研究成果が *Biosensors and Bioelectronics* 誌に掲載された(記事掲載)。ヤシ類の害虫として知られるゾウムシの探索を目的として、ゾウムシが分泌する集合フェロモンを気相で検知できるセンサを開発した。ゾウムシのフェロモン受容体をもつセンサ細胞を作製し、センサチップ化することで、フェロモン特異的に蛍光応答するセンサを構築することに成功した。

また、人工細胞研究では、細胞膜モデルであるリポソームの内部に核膜機能をもつ構造体を再現できることを示した(*Small* 誌掲載)。この成果は、人工細胞を用いた生命現象の理解や、将来的な新しいバイオ材料開発につながる基盤技術として新聞掲載された。さらに人工細胞研究のためのリポソーム作製技術として、遠心機に取り付けてリポソームを大量作製するデバイス技術を構築した。

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。また、コア技術・要素技術として重要な成果については特許出願も行っている。

人工細胞膜中の油性分子によるナノ空間の制御

人工細胞膜システムグループ

大崎寿久、Caroline Scott、竹内昌治、Sunghye Lee

1. はじめに

私たちの体をつくる細胞は、細胞膜と呼ばれる薄い膜に包まれている。細胞膜は、細胞の内側と外側を区切るだけでなく、必要な物質を取り込んだり、不要な物質を外へ排出したり、情報を細胞の内外へ伝えたりする重要な役割を担っている。この細胞膜の基本構造は、脂質二重膜と呼ばれる構造である。脂質分子が2層に並ぶことで、厚さ数ナノメートル程度の非常に薄い膜を形成している。

脂質二重膜は一見すると、脂質分子がすき間なく詰まった均一な膜のように見える。しかし実際には、膜の内部には分子の動きやすさに関係するわずかな空間、すなわち自由体積が存在している。この自由体積は、膜の柔らかさ、物質の通りやすさ、膜タンパク質の働きやすさなどに影響すると考えられている。たとえば、膜の内部にどれだけすき間があるかによって、小さな分子やイオンが膜を通りやすくなったり、膜に埋め込まれたタンパク質の形が変わりやすくなったりする可能性がある[1]。

平面脂質二重膜（人工細胞膜）は、このような細胞膜の性質を調べるためのモデルとして広く用いられている。平面脂質二重膜を用いると、脂質の種類や溶液条件を制御したうえで、膜そのものの物理化学的な性質を詳しく調べることができる。また、イオンチャンネルなどの膜タンパク質を膜に組み込むことで、創薬研究やセンサ開発にも応用できる[2]。そのため、平面脂質二重膜の構造や安定性を理解することは、基礎研究だけでなく、医療・創薬・バイオセンサ技術にもつながる重要な課題である。

平面脂質二重膜を作製する方法のひとつに、液滴接触法がある。この方法では、油の中に水滴をつくり、水滴の表面に脂質単分子膜を形成させる。2つの水滴を接触させると、それぞれの表面にできた単分子膜が向かい合い、接触面に脂質二重膜が形成される（図 1a）[3]。液滴接触法は、簡便かつ安定的に平面脂質二重膜を作製できるため、イオンチャンネルの電気生理学的機能の計測や人工細胞研究に利用されている。

一方で、液滴接触法をはじめとする多くの平面脂質二重膜作製法では、その過程で脂質を分散する溶媒（油）を用いるため、油を構成する疎水性分子が脂質二重膜の内部に残る可能性がある。これらの分子は、脂質分子のすき間に入り込み、膜の厚さや内部構造、自由体積を変化させると考えられる。しかし、どのような油性分子が膜の内部に残り、どのような分子が膜から排除されるのか、またそれが膜の厚さにどのような影響を及ぼすのかについては、十分には分かっていなかった。

そこで米国の Iona 大学との共同研究により、平面脂質二重膜中に入り込む疎水性分子の性質に着目し、それらが脂質二重膜の厚さに与える影響について調べた。具体的には、液滴接触法で形成した平面脂質二重膜に、性質の異なる複数の炭化水素分子を加え、膜の電気的な性質から膜厚を評価した。本研究により、分子の大きさや結晶化しやすさの違いによって、油性分子が膜に取り込まれる場合と、逆に膜から排除される場合があることが明らかになった[4]。

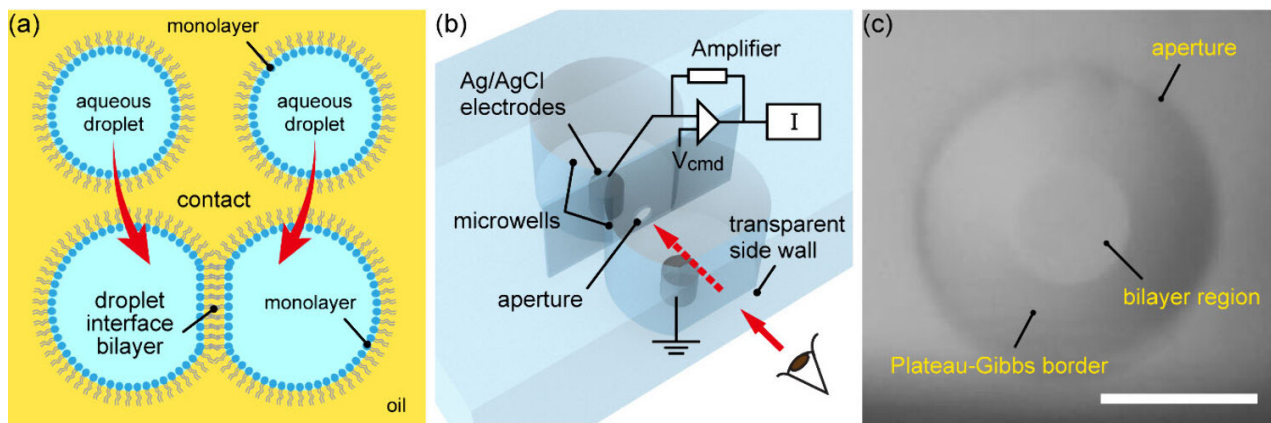


図 1 (a) 液滴接触法による脂質二重膜形成。脂質を分散させた溶媒中で、一対の水滴が接触することにより二重膜が形成される。(b) 本研究で使用した脂質二重膜形成チップの模式図。(c) DOPC 脂質二重膜の顕微鏡画像。スケールバー：300 μm 。油中の二つの水滴が接触することで、微小孔に脂質二重膜が形成される。チップ上で膜を作製して膜静電容量を測定した。Reproduced from ref. [4].

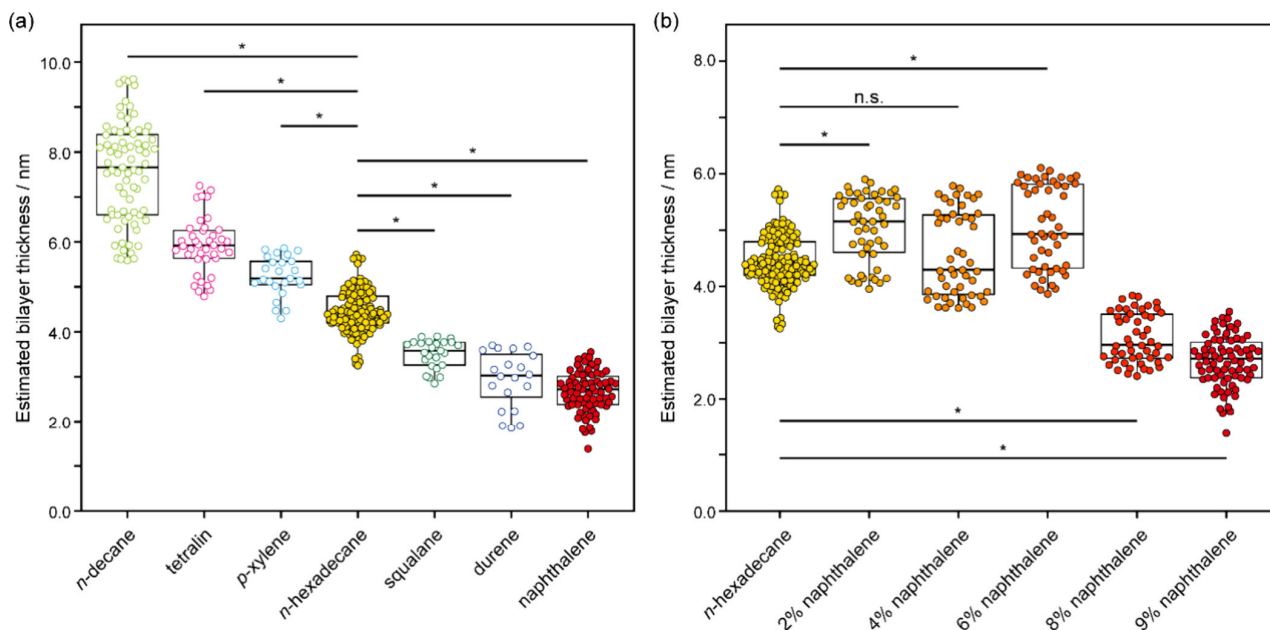


図2 *n*-ヘキサデカンを溶媒として形成した平面脂質二重膜の推定膜厚。炭化水素分子を添加した推定膜厚と、添加していない *n*-ヘキサデカンのみを用いて形成した場合の推定膜厚を比較した。(a) 6 種類の炭化水素分子を溶媒に対して 9 wt% の濃度で添加した結果。(b) ナフタレンを溶媒に対して 0–9 wt% の範囲で濃度を変えて添加した結果。各条件の測定数は 20–130。統計解析には一元配置分散分析を用い、その後 Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。有意差は、 $p > 0.05$ を「n.s.」、 $p \leq 0.01$ を「*」で示した。箱ひげ図は、中央値（中央線）、四分位範囲（箱）、および外れ値を除いた全データ範囲を示す。Reproduced from ref. [4].

2. 実験方法

本研究では、DOPC と呼ばれるリン脂質からなる脂質二重膜を用いた。DOPC は人工細胞膜研究でよく用いられる脂質であり、室温で流動性の高い膜を形成する。膜は、液滴接触法により作製した。具体的には、DOPC を含むヘキサデカン溶液と塩化カリウム水溶液を、微小な 2 つのウェルをもつチップ内に加えた。これにより油中に水滴が形成され、水滴表面に DOPC 単分子膜ができる。2 つの水滴がセパレータの微小孔部分で接触すると、接触面に DOPC 二重膜が形成される。実験に用いたチップは、2 つのウェル、微小孔をもつセパレータ、銀／塩化銀電極、外部機器と接続するためのコネクタから構成される（図 1b）[5]。セパレータの微小孔に平面脂質二重膜が形成され、その膜を通る電流応答を計測することで、膜の電気的性質を評価できる。膜の形成と面積は顕微鏡で観察し、膜領域が形成されていることを確認した（図 1c）。

膜の厚さは、膜静電容量と膜面積から推定した。脂質二重膜は非常に薄い絶縁膜として振る舞うため、電気的にはコンデンサのような性質をもつ。膜が薄いほど静電容量は大きくなり、膜が厚いほど静電容量は小さくなる。この関係を利用すると、膜に電圧をかけたときの電流応答から膜静電容量を求め、そこから膜厚を推定することができる。本研究では、矩形波の電圧刺激を与え、そのときに流れる電流応答（充電電流応答）を測定して、膜静電容量と膜厚を算出した[5]。

本研究で調べたのは、ヘキサデカンに少量加えた 6 種類の炭化水素分子である。これらの分子は、水には溶けにく

く油には溶けやすい疎水性分子であり、脂質二重膜の内部に入り込む可能性がある。具体的には、直鎖状の *n*-デカン、大きな分岐構造をもつスクアラン、芳香族化合物である *p*-キシレン、テトラリン、ナフタレン、デュレンを用いた。これらは、分子の大きさ、形、室温で液体か固体か、結晶化しやすいかどうか異なる。

実験では、これらの炭化水素分子をヘキサデカンに一定濃度で加え、その溶液を用いて DOPC 二重膜を形成した。そして、それぞれの条件で膜厚を測定し、どの分子が膜を厚くするのか、あるいは薄くするのかを比較した。また、ナフタレンについては濃度を段階的に変え、濃度によって膜厚変化の傾向がどのように変わるかも調べた。

3. 結果と考察

3. 1 非結晶性分子の取り込みによる膜厚の増加

ヘキサデカンのみを用いて作製した DOPC 二重膜の厚さを基準として、各種炭化水素分子を質量比で 9% 加えた場合の膜厚を比較した結果を図 2a に示す。

n-デカンはヘキサデカンよりも分子サイズが小さく短い直鎖状炭化水素である。*n*-デカンをヘキサデカンに加えると DOPC 二重膜の厚さが増加した。これは、*n*-デカン分子が脂質分子の疎水性部分、すなわち脂質の炭化水素鎖が集まる膜の内部に入り込み、膜の疎水性領域を広げたためと考えられる。

同様に、*p*-キシレンやテトラリンといった小さな芳香族分子も、膜厚を増加させた。これらの分子は芳香環をもつが、非結晶性で通常は液体状態の小分子である。そのため、

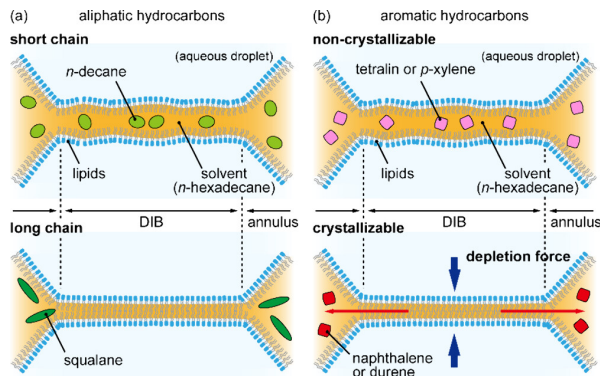


図 3 ヘキサデカン中に各種炭化水素分子を加えて形成した平面脂質二重膜において、分子が膜内に取り込まれる、または膜外へ排除される様子を示した模式図。(a) 脂肪族炭化水素を加えた場合。(b) 芳香族炭化水素を加えた場合。Reproduced from ref. [4].

膜内部のすき間に単独分子として入り込むことができたと考えられる。つまり、分子が小さく、膜内部で凝集せずに存在できる場合には、油性分子は脂質二重膜の中に取り込まれ、膜を厚くする方向に働くことが示された。

この結果は、人工細胞膜を液滴接触法で作製する際、使用する油やそこに含まれる微量成分が膜構造を大きく変える可能性を示している。油は単なる外部溶媒ではなく、膜内部に残って膜の物理的性質を変える要因になり得る。人工細胞膜を用いた計測では、このような油性分子の影響を考慮する必要がある。

3. 2 嵩高い分子・結晶性分子の排除による膜厚の減少

一方で、ヘキサデカンよりも嵩高い分子であるスクアランを加えた場合、膜厚はむしろ減少した。スクアランは膜内部の限られた空間に入り込むにはサイズが大きすぎると考えられる。そのため、膜内部から排除され、結果としてヘキサデカンなどの残留溶媒も膜から押し出されるように働いた可能性がある。

さらに興味深いことに、ナフタレンやデュレンといった芳香族分子を加えた場合にも、膜厚は減少した。ナフタレンやデュレンは、*p*-キシレンやテトラリンと同程度の大きさをもつ分子である。しかし、*p*-キシレンやテトラリンが膜を厚くしたのに対し、ナフタレンやデュレンは膜を薄くした。この違いは、分子サイズだけでは説明できない。ナフタレンやデュレンは、結晶性分子であり、分子同士が集まって凝集しやすい性質をもつ。そのため、膜内部に高濃度で取り込まれようとする、単独分子として安定に存在するのではなく、分子同士が集まって集合体をつくりやすくなると考えられる。脂質二重膜の内部は非常に薄く狭い空間であるため、このような集合体は膜内部に収まりにくい。その結果、ナフタレンやデュレンは膜から排除され、膜内部に残っていたヘキサデカンも一緒に押し出されることで、膜が薄くなったと考えられる。

この結果は、平面脂質二重膜が形成された状態で温度を下げることで溶媒成分が固化し、二重膜から排除される Freeze out 現象と類似しており[6]、等温的な Freeze out 現

象と捉えることができる。すなわち、本研究では温度を下げていないにもかかわらず、結晶化しやすい分子が膜内部で凝集し、膜から排除されるような挙動が観測されたと考えられる。

ナフタレンについては、添加濃度による膜厚の変化についても観測した。図 2b に示すように、低濃度では膜厚に大きな影響を与えない一方で、高濃度では膜厚が減少することが分かった。低濃度では、ナフタレン分子は膜内部に単独分子として入り込み、非結晶性の油性分子と同じように膜を少し厚くする。しかし濃度が高くなると、膜内部やその近傍でナフタレン分子同士が集まりやすくなる。集合体をつくると膜内部には安定に存在しにくくなり、膜から排除される。その結果、膜内部の油性分子全体が減少し、膜が薄くなる。このような力は、枯渇力と呼ばれる物理的な効果として説明できる。分子が膜内部に入りにくくなることで、膜内部と周囲の溶媒との間に分子濃度の差が生じ、二重膜の両側を近づけるような力が働くと考えられる(図 3)。

3. 3 膜厚制御が人工細胞膜研究にもたらす意義

本研究の結果は、人工細胞膜を使った実験を正しく解釈するうえで重要である。液滴接触法などの平面脂質二重膜作製法では、脂質を分散するために溶媒(油)を用いる。これまで、溶媒は膜形成の補助的な材料として扱われてきたが、こうした疎水性分子は、脂質二重膜の中に入り込んだり、逆に排除されたりすることで、膜の厚さや内部構造を大きく変化させることが分かった。

膜の厚さや自由体積は、膜タンパク質の働きにも影響する。たとえば、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は、脂質二重膜の中に埋め込まれて機能する。そのため、膜が厚すぎたり薄すぎたり、内部のすき間が変化したりすると、タンパク質の構造や活性が変わる可能性がある。人工細胞膜を用いて膜タンパク質を評価する場合、脂質の種類だけでなく、膜内部に残る油性分子の影響も考慮する必要がある。

また、本研究は人工細胞膜センサや薬剤評価システムの設計にも関係する。膜を使ったセンサでは、膜の安定性や物質の透過性がセンサ性能に影響する。膜内部の自由体積を制御できれば、膜の柔らかさや透過性を調節し、目的に応じた膜を設計できる可能性がある。たとえば、膜をより安定にしたい場合、あるいは特定の分子を通しやすかったい場合に、油性分子や脂質組成を調整することで膜物性を制御できるかもしれない。

さらに、細胞膜そのものの理解にもつながる。実際の細胞膜にも、脂質以外の疎水性分子や油滴成分が存在し、膜構造や膜タンパク質の機能に影響している可能性がある。人工細胞膜を使ってこれらの影響を調べることで、生体膜の物理化学的な性質をより深く理解できる。

4. まとめ

本研究では、液滴接触法で作製した DOPC 脂質二重膜

を用いて、疎水性の炭化水素分子が人工細胞膜の厚さに与える影響を調べた。膜の電気的性質である静電容量を測定し、そこから膜厚を推定することで、膜内部に分子が取り込まれるか、あるいは排除されるかを評価した。

その結果、非結晶性の疎水性小分子は、脂質二重膜の内部に入り込み、膜を厚くすることが分かった。一方で、嵩高い分子や、結晶性の凝集しやすい小分子は膜内部から排除され、膜を薄くすることが示された。ナフタレンでは、低濃度では膜厚に大きな影響を示さない一方で、高濃度になると凝集・排除によって膜を薄くするという、濃度依存的な効果が観察された。

これらの結果は、人工細胞膜の構造や性質が、脂質分子だけでなく、膜作製時に存在する疎水性分子の種類や濃度によって影響を受けることを示している。人工細胞膜を用いた膜タンパク質計測、センサ開発、薬剤評価、人工細胞研究では、膜内部の自由体積や残留溶媒の影響を考慮することが重要である。

本研究成果は、人工細胞膜の物性をより精密に理解し、目的に応じて膜の厚さや内部空間を制御するための基礎的な知見を提供するものである。今後、膜内部の自由体積を設計・制御する技術が発展すれば、より生体膜に近い人工膜モデルの構築や、膜タンパク質の機能を高精度に評価できる人工細胞膜システムの開発につながると期待される。

【謝辞】

本研究内容の一部は、JSPS 科研費（JP21H05013）および米国 NSF（NSF-CHE-2002900, 2304913）の支援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] Tripathy, M.; Srivastava, A. Lipid packing in biological membranes governs protein localization and membrane permeability. *Biophys. J.* 2023, 122, 2727-2743.
- [2] Osaki, T.; Takeuchi, S. Artificial cell membrane systems for biosensing applications. *Anal. Chem.* 2017, 89, 216-231.
- [3] Funakoshi, K.; Suzuki, H.; Takeuchi, S. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Anal. Chem.* 2006, 78, 8169-8174.
- [4] Scott, C.; Osaki, T.; Takeuchi, S.; Lee, S. Intercalant aggregation promotes nanoscopic depletion in droplet interface bilayers. *J. Phys. Chem. B* 2025, 129, 12179-12185.
- [5] Scott, C.; Porteus, R.; Takeuchi, S.; Osaki, T.; Lee, S. Electrophysiological characterization of monoolein-fatty acid bilayers. *Langmuir* 2025, 41, 2293-2299.
- [6] White, S. H. Temperature-dependent structural changes in planar bilayer membranes: solvent “freeze-out”. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1974, 356, 8-16.

センサ細胞を用いたゾウムシ集合フェロモンの 気相検出法の開発

人工細胞膜システムグループ
三村久敏、大崎寿久、竹内昌治

1. はじめに

1. 1 害虫の早期発見に向けたフェロモン検出技術

農作物や樹木に被害を与える害虫は、食料生産や自然環境に大きな影響を及ぼす。その中でもヤシオオサゾウムシ (*Rhynchophorus ferrugineus*) は、ヤシ類を加害する世界的に重要な害虫として知られている [1]。本種は中東、東南アジア、ヨーロッパなど世界各地へ侵入・定着しており、40 種類以上のヤシ類に被害を与えることが報告されている。ヤシオオサゾウムシによる被害は経済的損失も大きく、世界的な農業・環境問題として認識されている。近年では日本国内でも侵入が確認されている。

ヤシオオサゾウムシの幼虫は樹木の内部に侵入して成長するため、被害の初期段階では外観から異常を確認することが難しい。被害が目視できる段階では、すでに樹木内部が深刻な損傷を受けている場合が多く、効果的な防除のためには早期発見が重要な課題となっている。

このゾウムシは仲間を呼び寄せるために集合フェロモンと呼ばれる匂い物質を放出する。集合フェロモンは複数の個体を同じ場所へ誘引する役割を担っており、被害木への集団的な侵入を促進する。ヤシオオサゾウムシの主要な集合フェロモン成分として、フェルギネオール (ferrugineol) およびフェルギネオン (ferrugineone) が知られている。これらのフェロモンは害虫の存在を示す重要な化学的指標であり、高感度に検出できれば被害拡大前の早期発見やモニタリングへの応用が期待できる。

現在、フェロモンの分析にはガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) などの高性能分析装置が用いられている。しかし、これらの装置は大型かつ高価であり、専門的な操作も必要となるため、現場で簡便に利用することは容易ではない。一方、半導体ガスセンサなどの人工センサは小型化が可能であるものの、構造の似た匂い分子を高い選択性で識別することが難しい。このような背景から、生物が本来有する優れた匂い識別能力を利用したバイオハイブリッドセンサが注目されている [2]。

1. 2 昆虫嗅覚受容体によるフェロモン認識

昆虫は触角に存在する嗅覚受容体を用いて、空気中に存在する様々な匂い物質やフェロモンを認識している。嗅覚受容体は細胞膜上に存在する膜タンパク質であり、特定の化学構造をもつ匂い分子と結合することで神経細胞を活性化する。昆虫はこの仕組みにより、餌、天敵、交尾相手、仲間の存在など、生存に必要な情報を匂いとして取得している。昆虫の嗅覚受容体 (odorant receptor : OR) は、共受容体 (odorant receptor co-receptor : Orco) と呼ばれるタンパク質と複合体を形成して機能する。匂い分子が OR に結合すると、OR/Orco 複合体が陽イオンチャネルとして開口し、ナトリウムイオンやカルシウムイオンなどが細胞内へ流入する。その結果として神経活動が引き起こされ、匂い情報として認識される。

これまでに多くの昆虫種で多数の OR が同定されており、それぞれが異なる匂い物質に対して高い選択性を示すことが明らかとなっている。特にフェロモンを認識する受容体は、特定の化学構造に対して極めて高い特異性を示す場合が多い。この優れた分子認識能力は人工センサでは実現が難しく、生物由来受容体を利用したセンサ開発が活発に進められている。

1. 3 センサ細胞を利用したフェロモンセンサ

近年、昆虫由来の嗅覚受容体を培養細胞に人工的に発現させたセンサ細胞を利用するバイオハイブリッドセンサが注目されている。センサ細胞は、嗅覚受容体による分子認識機能と、培養細胞の扱いやすさを組み合わせたセンサ素子である。

本研究では、ヤシオオサゾウムシのフェロモン受容体 RferOR1 と共受容体 RferOrco、さらにカルシウムイオン濃度変化を蛍光として可視化するタンパク質 GCaMP を培養細胞に発現させた [3]。フェルギネオールが RferOR1 に結合すると、OR/Orco 複合体を介して細胞内へカルシウムイオンが流入し、それに応じて GCaMP の蛍光が増加する。この仕組みにより、フェロモンの存在を蛍光シグナルとして検出することができる。

さらに、センサ細胞をハイドロゲルに封入してマイクロウェル上に配置することで、多数のセンサ細胞を安定的に保持したセンサチップを構築できる [4]。このような細胞

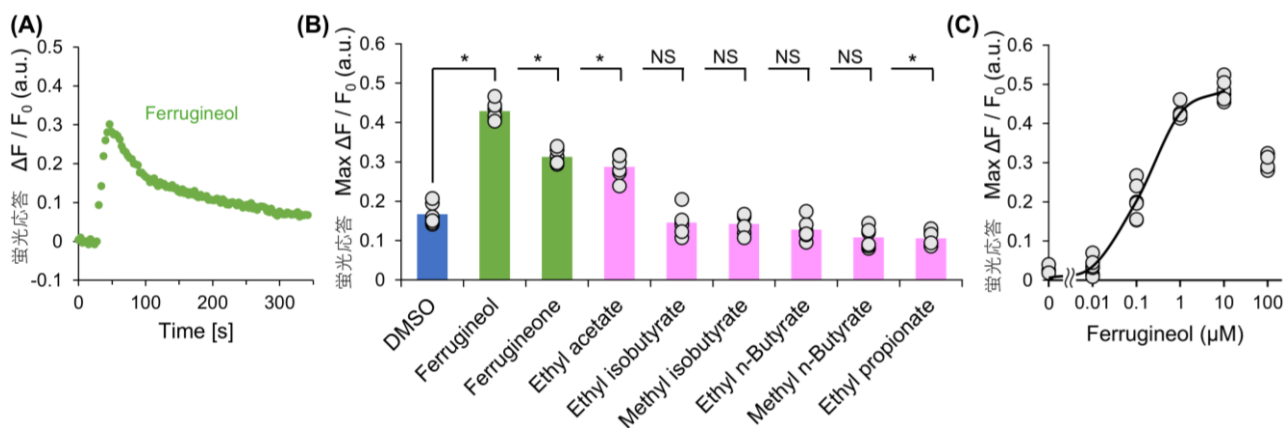


図1 作製したセンサ細胞の評価。(A-C) フェルギネオールに対する時間応答性 (A)、選択性 (B)、濃度依存性 (C)。

ベースのセンサは、生物由来受容体が高選択性と光学的な信号検出を組み合わせた新しい匂いセンシング技術として期待されている。

1. 4 本研究の目的

本研究では、ヤシオオオサゾウムシの主要な集合フェロモン成分であるフェルギネオールを検出するため、昆虫嗅覚受容体を利用したセンサ細胞の開発を行った。まず、作製したセンサ細胞がフェルギネオールに対して選択的かつ濃度依存的に応答することを評価した。次に、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、マイクロウェルアレイ上に配置したセンサチップを作製した。さらに、フェルギネオールを気相中で揮発させ、開発したセンサチップによってガス状フェロモンを検出できるかを検討した。本研究を通じて、生物由来受容体を利用したフェロモン検出技術の可能性を示すとともに、害虫の早期発見や環境モニタリングへの応用を目指す。

2. 実験方法

2. 1 センサ細胞の作製

センサ細胞には、ヒト胎児腎臓由来培養細胞である HEK293 細胞を用いた。HEK293 細胞は、外来遺伝子を効率よく発現できることから、嗅覚受容体の機能評価に広く利用されている。本研究では、ヤシオオオサゾウムシのフェロモン受容体 RferOR1、共受容体 RferOrco、およびカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP をコードするプラスミド DNA を HEK293 細胞へ導入した。これにより、集合フェロモン成分であるフェルギネオールを認識すると蛍光応答を示すセンサ細胞を作製した。

2. 2 センサ細胞の応答評価

作製したセンサ細胞を 96 ウェルプレートに播種し、蛍光プレートリーダーを用いて応答を評価した。測定では、GCaMP を青色光 (485 nm) で励起し、発せられる緑色蛍光 (535 nm) の変化を記録した。フェルギネオールを添加した際の蛍光応答を測定するとともに、関連化合物や溶媒のみを添加した条件についても測定を行い、センサ細胞の選択性を評価した。また、フェルギネオール濃度を変化さ

せ、濃度依存的な応答特性についても調べた。

2. 3 センサチップの作製

フェロモンを気相中で検出するため、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、マイクロウェルアレイ上に固定化したセンサチップを作製した。マイクロウェルアレイはアクリル製で、3×3 配列の計 9 個のマイクロウェルから構成される。培養したセンサ細胞を回収し、ゲル化前のハイドロゲルと混合した後、各マイクロウェルへ分注した。その後、一定時間静置してハイドロゲルをゲル化させることで、センサ細胞をウェル内に固定化した。

ハイドロゲルを用いることで、センサ細胞を高密度かつ三次元的に保持することができる。また、複数のマイクロウェルを利用することで、同時に複数点の蛍光応答を測定できるため、測定の再現性向上にも寄与する。

2. 4 センサチップの応答評価

作製したセンサチップの性能を評価するため、フェルギネオール水溶液を添加し、蛍光応答を測定した。測定には、青色励起光 (485 nm) と緑色蛍光フィルタ (530 nm) を備えた蛍光イメージャーを用いた。フェルギネオール添加前後の蛍光画像をタイムラプス撮影し、各マイクロウェルにおける蛍光強度の変化を記録した。

取得した画像は画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて解析した。各マイクロウェルに関心領域 (ROI) を設定し、平均蛍光輝度を定量した。得られた蛍光強度から正規化蛍光変化量 ($\Delta F / F_0$) を算出し、センサチップの応答特性を評価した。

2. 5 気相フェロモンの検出

気相検出では、センサチップ内の培地を除去した後、チップを反転させて揮発用チャンバー上に設置した。フェルギネオールをヘキサンに溶解し、チャンバー内へ滴下することでフェロモンを揮発させた。揮発したフェルギネオールは微小空間内を拡散し、センサ細胞へ到達する。

フェロモン曝露後の蛍光応答は、タイムラプスイメージングによって記録した。記録した蛍光画像については、液相測定と同様に ImageJ を用いて解析し、各マイクロウェルの蛍光応答を定量した。フェルギネオール濃度を変化さ

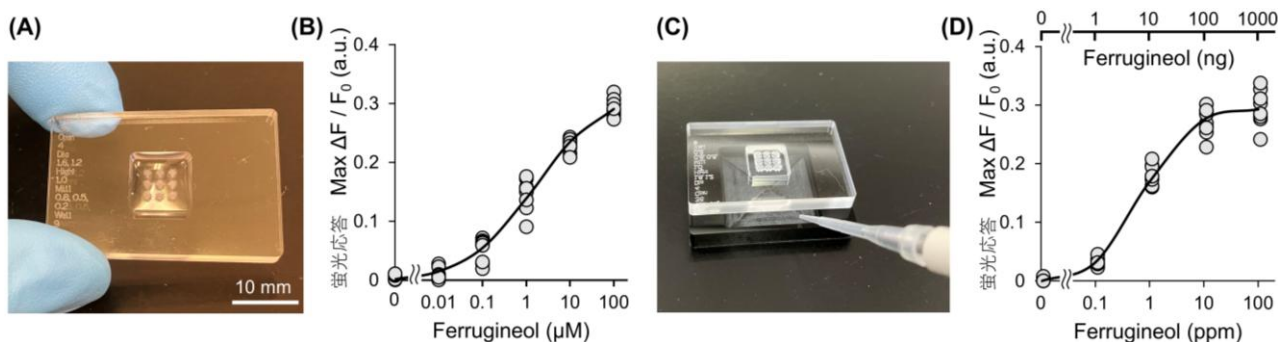


図 2 ハイドロゲル固定化センサチップを用いたフェルギネオール検出。(A) 開発したセンサチップ。(B) 溶液中フェルギネオールに対する濃度依存性。(C) センサチップを用いた気相中フェルギネオールの検出方法。(D) 気相中フェルギネオールに対する濃度依存性。

せることで、気相中におけるフェロモン検出性能を評価した。

3. 結果と考察

3. 1 フェロモンに応答するセンサ細胞の作製

まず、RferOR1、RferOrco、および GCaMP を発現させたセンサ細胞の応答特性を評価した。フェルギネオールを添加すると、センサ細胞は速やかな蛍光応答を示した (図 1A)。フェルギネオール以外の関連化合物に対する応答を比較したところ、センサ細胞はフェルギネオールに対して最も強い応答を示した (図 1B)。一部の関連化合物に対して弱い応答は認められたものの、その応答強度はフェルギネオールよりも低かった。これは、ゾウムシ由来のフェロモン受容体 RferOR1 が標的フェロモンを選択的に認識していることを示している。また、フェルギネオール濃度を変化させたところ、センサ細胞の蛍光応答は濃度に応じて変化した (図 1C)。これらの結果から、作製したセンサ細胞はフェルギネオールを高感度かつ選択的に検出できることが確認された。

3. 2 ハイドロゲル固定化センサチップでの検出

次に、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、マイクロウェルアレイ上に固定化したセンサチップを作製した (図 2A)。作製したセンサチップにフェルギネオール水溶液を添加したところ、蛍光応答はフェルギネオール濃度の増加に伴って大きくなり、濃度依存的な応答が確認された (図 2B)。プレート上で培養したセンサ細胞と比較すると、ハイドロゲルはフェロモン濃度の急激な変化を緩和する働きを持ち、高濃度範囲まで安定した濃度依存応答を示した。この結果は、ハイドロゲルによる細胞固定化がセンサの定量性能向上にも寄与することを示している。

3. 3 気相フェロモンの検出

最後に、開発したセンサチップを反転して小型チャンバー上に設置し、気相中のフェルギネオール検出を試みた (図 2C)。フェルギネオールを含むヘキサン溶液を滴下して揮発させたところ、フェロモン濃度に応じて蛍光応答が増加した (図 2D)。このことから、開発したセンサチップ

が液体中だけでなく、空气中に存在するフェロモンも検出できることが示された。害虫フェロモンは通常、空气中に極めて低濃度で存在するため、その検出は容易ではない。しかし本研究では、生物由来のフェロモン受容体を利用することで、ガス状フェロモンの検出が可能であることを示した。これにより、本手法が害虫の早期発見や発生モニタリングのための新しいセンシング技術として利用できる可能性が示されたと考える。

4. まとめ

本研究では、ヤシオオサゾウムシの集合フェロモンであるフェルギネオールを検出するため、昆虫嗅覚受容体を発現した培養細胞を用いるバイオハイブリッドセンサを開発した。作製したセンサ細胞はフェルギネオールに対して高い選択性を示し、ハイドロゲルに封入してマイクロウェルアレイ上に固定化することで、センサチップとして利用できることを確認した。さらに、開発したセンサチップは気相中のフェルギネオールを濃度依存的に検出できることを示した。

本研究で開発した技術は、害虫が放出するフェロモンを利用した新しい早期検出技術につながる可能性がある。今後はさらなる高感度化や小型化を進めることで、農業現場や環境モニタリングで利用可能な携帯型フェロモン検出システムへの発展が期待される。

【謝辞】

本研究は、JST CREST JPMJCR20C4、JSPS 科研費 (23K06733)、および King Saud University の支援を受けたものです。また、フェルギネオールおよびフェルギネオンは信越化学工業 (株) から供与いただきました。ここに記して感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] Antony B, et al. Mol Ecol. 2021, 30, 2025.
- [2] Hirata Y, et al. Lab Chip. 2021, 21, 2643.
- [3] Mimura H, et al. Biosens Bioelectron. 2026, 302, 118537.
- [4] Mimura H, et al. ACS Sens. 2026, DOI: 10.1021/acssensors.5c04942.

業績

【原著論文】

1. Sho Takamori, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Tomo Kondo, Miyuki Shintomi, Keishi Shintomi, Miho Ohsugi, and Shoji Takeuchi
Nuclear assembly in giant unilamellar vesicles encapsulating *Xenopus* egg extract
Small, Vol. 21, 2412126 (2025)
2. Mai Furuhashi and Shoji Takeuchi
The effects of differentiation and aging on free amino acid profiles in cultured bovine muscle tissue
Food Chemistry, Vol. 488, 144753 (2025)
3. Sho Takamori, Taisei Kawakami, Tomoko Ohnishi, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Shape-encoded hydrogel sensor particles enable multiplex odorant detection through deep-learning classification
Small, Vol. 21, e07903 (2025)
4. Yuya Morimoto, Hirone Yamada, Byeongwook Jo, Minghao Nie, and Shoji Takeuchi
Multipole electrodes for driving biohybrid robots via selective muscle contraction
Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 448, 138924 (2026)
5. Caroline Scott, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi, and Sunghee Lee
Intercalant aggregation promotes nanoscopic depletion in droplet interface bilayers
The Journal of Physical Chemistry B, Vol. 129, pp. 12179-12185 (2025)
6. Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Mohammed Ali AlSaleh, Binu Antony, and Shoji Takeuchi
Cell-based biohybrid sensing of a volatile aggregation pheromone component associated with the invasive red palm weevil
Biosensors and Bioelectronics, Vol.302, 118537 (2026)
7. Byeongwook Jo, Tsuyoshi Koga, Hisatoshi Mimura, Minghao Nie, and Shoji Takeuchi
Miniaturized fiber-coupled microscope with cell-embedded hydrogel for odorant sensing
Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 458, 139855 (2026)
8. Kensei Okada, Byeongwook Jo, Minghao Nie, and Shoji Takeuchi
Bovine plasma alginate gel beads as edible microcarriers for cultivated meat applications
Innovative Food Science & Emerging Technologies, Vol. 111, 104568 (2026)

【総説】

1. 森田智博、竹内昌治
バイオフィブリケーション応用に向けた 3D プリンティング技術
Nanofiber 第 16 巻 1・2・3・4 合冊号, ナノファイバー学会, 90-95 (2025)
2. 高森翔、竹内昌治
バイオハイブリッドで実現する, 細胞核をもつ人工細胞
現代化学 2025 年 8 月号, 東京化学同人, No.653, p.8 (2025)
3. 小田悠加、竹内昌治
藻類が駆動するマイクロマシンの開発
生物物理 2026 年 2 月, 日本生物物理学会, Vol. 66, No.1, pp. 15-17 (2026)

【書籍】

1. 高森翔、大崎寿久、竹内昌治
バイオハイブリッドセンサによる匂い計測技術
ガス成分の高度なセンシング情報化ーにおい・気相情報のイメージングおよび知覚化ー, シーエムシー出版, pp. 47-58 (2026)

【口頭発表】

1. Shoji Takeuchi
3D Muscle Tissue Engineering
Webinar “Tissue and Organ Bioengineering” 2025, 2025 年 4 月, Online
2. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics
1st IIT Madras-UTokyo IIS Bilateral Symposium on Microfluidics and Its Applications, 2025 年 5 月, Online
3. Shoji Takeuchi
Advancing Biohybrid Robotics with Living Muscle
Cyborg Futures - The Challenge of Implanting and Integrating Artificial Muscle, 2025 年 6 月, Online
4. Shoji Takeuchi
Advancing Biohybrid Robotics with Living Tissues
Biohybrid Robotics Symposium 2025, 2025 年 7 月, Switzerland
5. 千明大悟、森岡和大、守岩友紀子、藤野智史、齊藤直希、井上勝央、大崎寿久、柳田顕郎、東海林敦
エクソソーム膜融合による膜タンパク質配向制御包埋法
令和 7 年度 東日本分析化学若手交流会, 2025 年 7 月, 群馬

6. 竹内昌治
Biohybrid Robotics
KAIWA (HRI 社 社内講演会), 2025 年 7 月, 埼玉
7. 中尾賢治、大崎寿久
イオンチャネル創薬を革新する人工細胞膜技術の挑戦
第 37 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2025 年 8 月, 東京
8. 千明大悟、守岩友紀子、森岡和大、藤野智史、齊藤直希、井上勝央、大崎寿久、柳田顕郎、東海林敦
配向を制御して人工生体膜に包埋した膜タンパク質の機能評価
第 37 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2025 年 8 月, 東京
9. 高森翔、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治
人工組織構築へ向けたリポソーム大量作製法の開発
「細胞を創る」研究会 18.0, 2025 年 9 月, 東京
10. 竹内昌治
Bottom-Up Assembly of Living Systems: From Synthetic Cells to Tissues
「細胞を創る」研究会 18.0, 2025 年 9 月, 東京
11. 竹内昌治
生体界面を活かすバイオハイブリッドセンサ：分子認識から機能創出へ
日本分析化学会第 74 年会, 2025 年 9 月, 北海道
12. Shoji Takeuchi
Multiscale Biohybrid Systems: From Molecular Sensors to Muscle-Powered Robots
Advanced BIO Global Joint Research Center Hub Symposium 2025, 2025 年 11 月, Korea
13. Shoji Takeuchi
Building Living Systems: From Bottom-up Tissue Engineering to Biohybrid Robotics
The 29th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2025), 2025 年 11 月, Australia
14. Shinji Ezawa, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Structural Modulation of a Biological Nanopore in a Surfactant Membrane
The 29th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2025), 2025 年 11 月, Australia
15. Haruka Oda, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Mosquito-Nose-On-A-Chip by Multi-Capillary Stamping
The 29th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2025), 2025 年 11 月, Australia
16. 三村久敏、大崎寿久、中尾賢治、高森翔、竹内昌治
微小孔構造による人工細胞膜の形状制御技術の開発
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 52 回研究会 (CHEMINAS52), 2025 年 11 月, 栃木
17. 高森翔、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治
eDICE 法を用いたリポソームの短時間大量作製
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 52 回研究会 (CHEMINAS52), 2025 年 11 月, 栃木
18. 江澤伸司、大崎寿久、三村久敏、高森翔、三木則尚、竹内昌治
界面活性剤膜中における生体ナノポアの構造変化
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 52 回研究会 (CHEMINAS52), 2025 年 11 月, 栃木
19. 中嶋大貴、大崎寿久、三村久敏、高森翔、三木則尚、竹内昌治
人工細胞膜センサの応答性能に対する対流の影響
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 52 回研究会 (CHEMINAS52), 2025 年 11 月, 栃木
20. Shoji Takeuchi
Biohybrid Systems: Bridging Biological Tissues and Robotics through Microengineering
A virtual seminar series on microfluidics and lab-on-a-chip systems (μ TAStic), 2025 年 11 月, Virtual
21. 千明大悟、山内七海、森岡和大、守岩友紀子、大崎寿久、塩谷壮太、松本志門、柳田顕郎、東海林敦
人工生体膜とエクソソームの融合挙動を捉える計測アプローチ
膜シンポジウム 2025, 2025 年 11 月, 大阪
22. 竹内昌治
筋肉をつくるテクノロジー — バイオハイブリッドロボティクスの最前線
令和 7 年度兵庫県整形外科医会学術講演会 (第 5 回), 2025 年 12 月, 兵庫
23. 山内七海、千明大悟、守岩友紀子、森岡和大、齊藤直希、井上勝央、大崎寿久、柳田顕郎、東海林敦
エクソソーム膜融合を介した人工生体膜上での膜タンパク質再構成と機能評価法
新アミノ酸分析研究会第 15 回学術講演会, 2025 年 12 月, 神奈川
24. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics: Integrating Living Materials into Engineering Systems
Bionics and Biohybrids, 2026 年 2 月, India
25. 竹内昌治
Bottom-Up Assembly of Synthetic Cells/Tissues and beyond: Biohybrid Robotics
機能進化エレクトロニクスの創出「進化トロニクス」公開成果報告会 (兼 第 4 回領域会議), 2026 年 2 月, 東京

【特許】

- (1) 国内特許出願 3 件
- (2) 国際特許出願 1 件