

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のもとについて研究を行い、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、生体のもの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. 2024年度の研究目的

実用化実証事業12年目となる2024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、タンパク質作製技術の改良を目標とした。一方で、センサ開発に関しては、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について、東大・住友化学と共同でセンサアレイを開発し、複数の疾患マーカーに対する応答性評価を目標とした。

(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な技術の実現を目標として研究開発を行ってきた。

2024 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。特にイオンチャネル機能評価システムの計測効率の向上に関して、イオンチャネル材料調製技術の改良を目標とした。

(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ラレーションとして、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。

2024 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と、その計測装置の開発を目標とした。

2. 2024 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。2024 年度は、MAQsys 社が事業開始に向けて行う研究開発に関して、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、イオンチャネル材料の発現・調製技術および脂質二重膜への導入技術の改良を進めている。薬剤標的となるイオンチャネルごとに、複数の発現・調製方法および条件を検討した。また、イオンチャネルを担持するための脂質媒体についても、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

を行っている。これらの研究は、企業および大学・研究機関との連携により行っている。

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、前年度より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ている。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なりつつある。

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。2024 年度は、原始的細胞膜組成における膜の物理化学的性質を明らかにした米国 Iona 大学との共同研究成果が Langmuir 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；2020-2025 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。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・開発することを目指している。

2024 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の開発とその計測装置の試作を行った。

まずセンサ細胞のアレイ化技術について、異種センサ細胞を簡便・迅速にアレイ化する研究を前年度に引き続き行った。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、細胞アレイを作製できる。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する応答性を観測することに成功した。

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についても研究を行った。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、撮影画像から機械学習により自動で形状判別を行い、センサ細胞を特定することに成功した。本技術により乱雑な状態のセンサ細胞の応答性を評価できる。

こうした細胞センサを搭載し蛍光計測が可能な小型計測装置についても東大と共同で開発した（HardwareX 誌掲載）。さらにこの小型装置をベースとして高感度化した計測器についても試作を行っている。

(3) 共同研究による成果

JST-CREST 事業（ゲノム合成：2018-2023 年度、東大白髭教授代表、機能的人工染色体の設計と利用のための革新的研究）の成果発表を行った。同研究では、カエル卵

抽出液中で細胞核様構造が形成される機能を利用し、細胞核封入リボソームを再現性良く作製する技術を構築した。核様構造において機能的な核膜が形成されていること、核膜孔複合体構造が存在することを実験的に確認した（東大大杉研・理研と共同研究成果、**Small** 誌掲載）。また、人工細胞研究のためのリボソーム作製技術として、遠心機に取り付けてリボソームを作製するデバイスの研究を前年度から継続して実施した。

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。

プロトセルモデル膜の電気生理学的性質

人工細胞膜システムグループ

大崎寿久、Caroline Scott、Riley Porteus、Sunghee Lee、竹内昌治

1. はじめに

生命が非生物的な前駆体から地球上に出現するに至った過程、すなわち生命の起源においては、自己と非自己を区別する隔壁となる構造（コンパートメント）の発達が重要であったと考えられている[1]。こうした原始細胞（プロトセル）がどのようなものであったかを探求する人工細胞研究では、閉じた小胞状の構造体（ベシクル）がプロトセルモデルとして広く用いられている[2]。このプロトセルモデルの隔壁（膜）を構成する分子としては、進化した細胞生命における膜構成成分にも類似しながら、前生物的地球の地殻にも存在可能なさまざまな分子が提案されている。中でも、リン脂質をはじめとした両親媒性分子が用いられることが多い。

一方、原始の細胞においても、成長や分裂に加え、膜を通じた栄養素の取り込みと老廃物の排出は不可欠な要素であったと考えられている。タンパク質が進化する以前の時代では、プロトセル内外への栄養素や老廃物などの必須分子の輸送は、膜を通じた受動的な拡散によってなされていたと提唱されている[3,4]。しかしながら、原始的な生命活動を可能にするには、熱力学的に不利な非平衡状態を形成する必要がある。すなわち、膜を介した必須分子の濃度勾配を維持できるよう、透過性の制御が膜には求められることになる[5]。このような膜透過性を調節することができるプロトセル膜の構成分子の候補として、長鎖アルキルカルボン酸が上げられている[6]。その中で、脂肪酸（FA）は狭い pH 範囲において二重膜様に自己集合し、ベシクルを形成することが知られている[7]。また、脂肪酸は比較的単純な構造をもち、リン脂質との類似性も高いことから、プロトセルモデルの膜構成分子の候補として研究が行われている。近年では、脂肪酸と混合することでベシクルの安定性を高める成分、例えばアルコールやアミンなどの研究についても進められている[8,9]。特に、モノグリセリド（MG、グリセロールのモノアシル脂肪酸エステル）の添加はカチオンに対する安定性を向上させ、ベシクル形成の可能性を高めることが分かってきており、脂肪酸とともにプロトセル膜成分の候補として研究が行われてきている[10,11]。

しかしながら、脂肪酸とモノグリセリドを混合して構成される二重膜に対して、その電気生理学的性質に関する理解は十分とはいえない。そこでわれわれは、脂肪酸（FA）とモノグリセリド（MG）の一種であるモノオレインを混

合して形成される二重膜の電気生理学的特性に及ぼすその組成の影響を明らかにするための研究を米国 Iona 大学と共同で行った。本稿では、この成果について誌上発表を行ったのでその内容を報告する[12]。

2. 実験方法

モノオレインと脂肪酸からなる二重膜の電気生理学的性質を評価するため、液滴接触法により形成した平面二重膜（Droplet Interface Bilayer: DIB）を用いた[13]。液滴接触法は簡便・再現良く二重膜を形成することが可能であり、イオンチャネルタンパク質や二重膜自身の電気生理学的評価で用いられている。

本研究では、脂肪酸（FA）の鎖長および含有比率がモノオレイン-脂肪酸混合二重膜の電気的特性に与える影響を明らかにすることを目的とした。FA の比率を段階的に増加させることで、膜のイオン透過性に与える影響を観測した。

2. 1 液滴接触法デバイスの作製

図 1 に液滴接触法デバイスの模式図を示す。デバイスはアクリル製のベース部品、微小孔をもつセパレータ、銀/塩化銀電極とコネクタからなる。ベース部品は、コンピュータ制御加工装置を用いて厚さ 4 mm のアクリル板を加工することで作製した。一対のウェルとウェル底面に電極を包埋するための貫通孔を設けている。ウェル間に、微小孔をもつセパレータ（厚さ 75 μm ）を挿入して接着剤で固定している。孔径は、600 μm または 400 μm とした。電極表面は、銀/塩化銀ペーストを塗布している。ウェル側面部分は二重膜を顕微鏡観察するために研磨処理を施した。

2. 2 二重膜の電気生理学的評価方法

評価システムの概要を図 1b に示す。液滴接触法デバイスは、パッチクランプアンプに接続して電気生理学的計測を行った。計測時には電磁ノイズを低減するため、チップ全体をアルミホイル製のカップで覆い、ファラデーケージとして機能させた。アンプおよびファラデーケージは接地して使用した。二重膜形成を観察するため、デジタルマクロスコープを水平に設置している。形成された二重膜領域は、透過光を用いると観察・撮影できる。撮影画像から二重膜とその周縁部（annulus）との境界である Plateau-Gibbs 境界を明瞭化し、二重膜の面積を算出した。

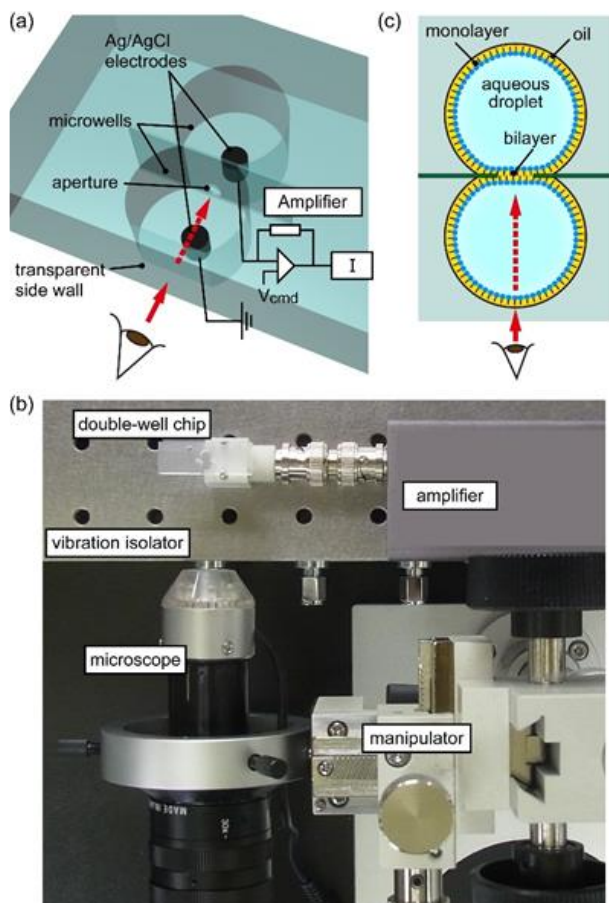


図1 (a) 液滴接触法デバイスの模式図。(b) 膜評価システムの概要。(c) 液滴接触法における二重膜形成の模式図。Reproduced from ref. [12].

平面型二重膜は、ヘキサデカン中に分散させたモノオレイン (MO) /脂肪酸 (FA) 混合液 (5 mg/mL) と 0.01 M KCl 水溶液 (pH8.5) を順次ウェルに滴下して形成した (図 1c)。この操作で油中水滴がウェル内に形成され、水-油界面において MO および FA 分子からなる単分子膜が自発的に形成される。セパレータの微小孔において単分子膜同士が接触して二重膜を形成する [13]。

膜静電容量は、矩形電圧刺激に対する電流応答から算出できる。詳細は文献 12 を参照されたい。二重膜の厚さ (膜厚) は、算出した膜静電容量と膜面積、膜の誘電率 (2.1 と仮定した) から求めることができる。一方、膜抵抗は、印加電圧に対するイオン電流値の関係から求めた。

3. 結果と考察

3. 1 モノオレイン-脂肪酸混合二重膜の形成

モノオレイン (MO) と脂肪酸 (FA) のさまざまな組成における二重膜形成を Plateau-Gibbs 境界の顕微鏡観察により確認した。MO は炭素鎖長が 18 であり、一般的なリン脂質と同程度であることから、モノグリセリドの代表として選定した。対となる FA として、炭素鎖長が 18、16、14 であるオレイン酸 (OA)、パルミトリン酸 (PA)、およびミリストリン酸 (MA) の 3 種を選んだ。MO と FA

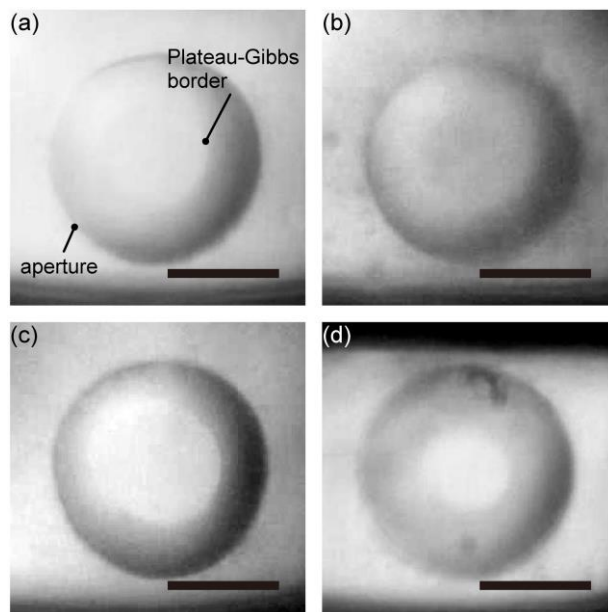


図2 MO-FA 混合二重膜の顕微鏡画像。(a) 100% MO、(b) 15-85 MO-OA、(c) 15-85 MO-PA、(d) 15-85 MO-MA。スケールバー: 300 μm 。Reproduced from ref. [12].

のモル比は、100-0、50-50、30-70、15-85、0-100 を検討した。

MO および MO-FA 混合物から形成された代表的な二重膜の顕微鏡像を図 2 に示す。Plateau-Gibbs 境界が確認でき、MO および MO-FA 混合物がヘキサデカン溶媒中で二重膜を形成できることが示された。一方で、FA 比率の増加に伴い二重膜形成が困難になる傾向があった。特に、MA のみを用いた場合には、本研究の条件下では二重膜が形成できなかった。また、FA 比率の増加に伴い、形成された二重膜は不安定であった。このことから、脂肪酸 (FA) のみの二重膜形成、すなわち FA 単分子膜同士の接触による平面二重膜の構築は困難で、仮に形成された場合でも、二重膜は不安定な状態と考えられる。

3. 2 モノオレイン-脂肪酸混合二重膜の膜容量

MO と FA の混合比率を変化させた各条件において二重膜が形成されていることを検証するため、膜静電容量を計測し、そこから膜厚を算出した。図 3a, 3b に、MO と FA のモル比に対する膜容量および膜厚の変化を示す。膜容量は $0.5 \sim 1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ の範囲にあり、これは先行研究で報告されているリン脂質二重膜やモノグリセリド膜における値と一致している。また、MO のみからなる二重膜の膜厚も、炭素鎖長 18 のリン脂質膜と整合する値を示した。これらの結果と Plateau-Gibbs 境界の観察結果も踏まえると、MO-FA 混合物は平面二重膜を形成し得る。

MO-OA 混合二重膜に関しては、モル比の変化による膜容量および膜厚に有意な変化は見られなかった。一方で、MO-MA 混合二重膜については、MA 比率の増加に伴って膜容量が大きくなり、すなわち膜厚が薄くなる傾向を示した。

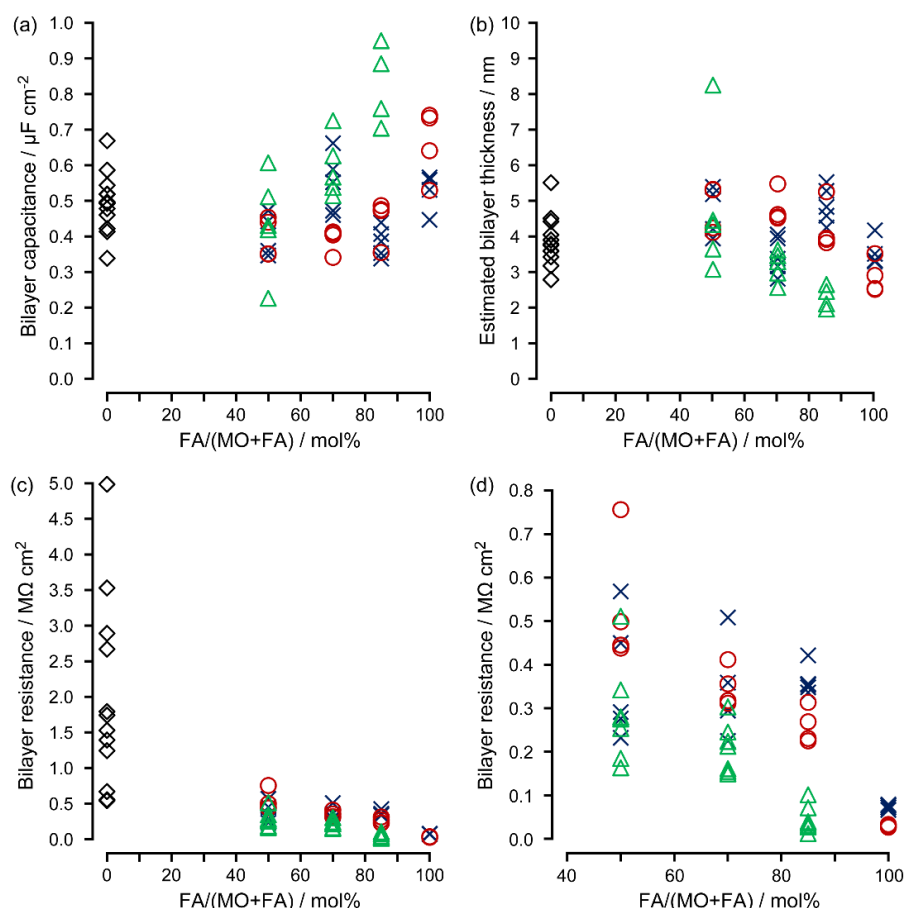


図 3 MO-FA 混合二重膜の電気生理学的性質。(a) 二重膜の膜静電容量。(b) 膜容量から算出した膜厚。(c, d) 膜抵抗とその拡大図。100% MO (◇); MO-OA (×); MO-PA (○); MO-MA (Δ)。N ≥ 4。Reproduced from ref. [12].

3. 3 モノオレイン-脂肪酸混合二重膜の膜抵抗

MO-FA 混合二重膜におけるイオン透過性を評価するため、膜抵抗を測定した (図 3c, 3d)。MO 二重膜の膜抵抗は約 $2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ であり、先行研究と一致している。この値は、一般的なリン脂質二重膜と比較して 1 桁低く、MO 二重膜のイオン透過性が相対的に高いことを示している。さらに、FA 比率が増加するとともに膜抵抗は低下し、OA および PA 二重膜では $0.1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^2$ 未満となった。MO-MA 二重膜ではさらに低い膜抵抗が観測された。MO-FA 二重膜がリン脂質二重膜と比べて高いイオン透過性を示すことが明らかとなった。

MO 二重膜がリン脂質二重膜と比較して 1 桁低い膜抵抗 (すなわち高い透過性) を示す理由は、炭化水素鎖長や膜厚によるものではなく、二重膜のパッキング状態の違いに起因すると考えられる。ホスファチジルコリンなどのリン脂質は、2 本の炭化水素鎖と親水性頭部のバランスにより円筒型構造をとり、曲率の小さい平面二重膜の形成に適する。一方 MO は、炭化水素鎖 9 位のシス型二重結合により立体障害を引き起こしやすい。また、くさび型 (逆円錐形) の分子構造であるため平面二重膜を形成しにくい。二重膜内で炭化水素鎖間の疎水相互作用の低下を引き起こす可能性があるこの構造的特性が、イオンや水分子の透過性を

高めていると考えられる。

上記の傾向は MO-FA 混合二重膜においても同様と考えられる。本研究で用いた FA は、炭化水素鎖長は異なるが全てシス型二重結合をもつ。MO-FA 二重膜内で欠陥が生じると考えられる。MO-OA 膜では、OA 比率の増加と共に膜抵抗が低下している。膜厚には大きな変化がないにもかかわらず透過性が上昇していることから、OA の分子構造が透過性に影響を及ぼしたと考えられる。仮説として、イオン透過に対する FA 分子のフリップ-フロップ運動の寄与が挙げられる。先行研究で、OA 分子のフリップ-フロップが数分程度の時間定数であることが報告されており、リン脂質よりも非常に速い。陽イオンと結合した OA 分子が膜を横断 (フリップ-フロップ) する過程でイオンが輸送される。さらに、MO-MA 膜では、MO-OA および MO-PA 膜に比べて透過性が一層高くなった。これは、MA の炭化水素鎖が短いことによる膜厚の減少による考えられる。

4. まとめ

本研究では、液滴接触法デバイスを用いてモノオレインと脂肪酸からなる二重膜の電気生理学的特性を明らかにした。モノオレイン二重膜のイオン透過性は、同程度の鎖長を有するリン脂質二重膜と比較して高く、分子構造による二重膜内の欠陥が主因と考えられる。混合二重膜において脂肪酸の比率を増加させると、膜厚に明確な変化なくイ

オン透過性が上昇した。この透過性上昇は、脂肪酸の迅速なフリップ-フロップ運動に起因する可能性がある。加えて、モノオレインと脂肪酸との炭化水素鎖長の不一致は、膜構造を不安定化させ、イオン透過性をさらに増加させる可能性が示された。

本研究結果は、プロトセルモデルにおいて膜組成の変化がイオン透過性を調節し得ることを示唆している。初期の原始細胞における膜透過現象は、タンパク質を介さない構造欠陥や一過性の膜孔形成といった物理化学的な機構に依存していたと考えられる。本研究の成果は、一本鎖の両親媒性分子のみで構成された原始的な膜において、フリップ-フロップが直接的または間接的にイオン輸送を担っていた可能性を示している。

【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] Monnard, P. A.; Deamer, D. W. Membrane self-assembly processes: Steps toward the first cellular life. *Anat. Rec.* 2002, 268, 196-207.
- [2] Deamer, D. W.; Dworkin, J. P. Chemistry and Physics of Primitive Membranes. In *Prebiotic Chemistry*, Walde, P., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005, pp 1-27.
- [3] Vlassov, A. How was membrane permeability produced in an RNA world? *Orig. Life Evol. Biosph.* 2005, 35, 135-149.
- [4] Deamer, D. W. The first living systems: a bioenergetic perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, 61, 239-261.
- [5] Piedrafita, G.; Monnard, P.-A.; Mavelli, F.; Ruiz-Mirazo, K. Permeability-driven selection in a semi-empirical protocell model: the roots of prebiotic systems evolution. *Sci. Rep.* 2017, 7, 3141.
- [6] Rushdi, A. I.; Simoneit, B. R. Lipid formation by aqueous Fischer-Tropsch-type synthesis over a temperature range of 100 to 400 C. *Orig. Life Evol. Biosph.* 2001, 31, 103-118.
- [7] Toparlak, O. D.; Mansy, S. S. Progress in synthesizing protocells. *Exp. Biol. Med.* 2019, 244, 304-313.
- [8] Jin, L.; Kamat, N. P.; Jena, S.; Szostak, J. W. Fatty acid/phospholipid blended membranes: a potential intermediate state in protocellular evolution. *Small* 2018, 14, 1704077.
- [9] Chen, I. A.; Salehi-Ashtiani, K.; Szostak, J. W. RNA catalysis in model protocell vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 13213-13219.
- [10] Monnard, P.-A.; Apel, C. L.; Kanavarioti, A.; Deamer, D. W. Influence of ionic inorganic solutes on self-assembly and polymerization processes related to early forms of life: Implications for a prebiotic aqueous medium. *Astrobiology* 2002, 2, 139-152.
- [11] Maurer, S. E.; Deamer, D. W.; Boncella, J. M.; Monnard, P.-A. Chemical evolution of amphiphiles: glycerol monoacyl derivatives stabilize plausible prebiotic membranes. *Astrobiology* 2009, 9, 979-987.
- [12] Scott, C.; Porteus, R.; Takeuchi, S.; Osaki, T.; Lee, S. Electrophysiological characterization of monoolein-fatty acid bilayers. *Langmuir* 2025, 41, 2293-2299.
- [13] Kamiya, K.; Osaki, T.; Nakao, K.; Kawano, R.; Fujii, S.; Misawa, N.; Hayakawa, M.; Takeuchi, S. Electrophysiological measurement of ion channels on plasma/organelle membranes using an on-chip lipid bilayer system. *Sci. Rep.* 2018, 8, 17498.

センサ細胞アレイによる尿中匂い物質の 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、高森翔、竹内昌治

1. はじめに

1. 1 匂い物質を利用した疾患の検出

がんや糖尿病などの生活習慣病は、早期発見と予防が重要とされており、そのための新たなバイオマーカーの探索が進められている [1]。近年、尿や呼気に含まれる匂い物質（揮発性有機化合物：VOCs）は、これらの疾患に伴って組成や濃度が変化することが報告されており、非侵襲的に採取可能なバイオマーカーとして注目されている [2]。これらの匂い物質は、従来の血液検査や画像診断に比べて簡便かつ患者の負担が少ない点で優れており、早期診断やスクリーニング手法としての応用が期待され、匂い物質を用いた疾患検出技術に関する研究が活発に進められている。しかし、尿や呼気中に含まれる匂い物質は多種多様かつ微量であり、さらに検体には様々な夾雑成分が含まれているため、これらを高感度かつ高選択的に識別・検出することは容易ではない。この課題を解決するため、生物がもつ嗅覚システムを模倣したセンサ技術、特に嗅覚受容体を利用したバイオハイブリッドセンサの開発が注目されている [3]。

1. 2 昆虫嗅覚受容体による匂い物質の感知

生物は、嗅覚器官の感覚細胞に存在する嗅覚受容体を介して、空気中に存在する匂い物質を認識する。嗅覚受容体は、細胞膜上に存在する膜タンパク質であり、匂い分子の三次元構造を識別して結合することで、細胞内のシグナル伝達を開始する。この受容体とリガンド間の相互作用に基づく匂い識別は、匂い物質の化学構造を鋭敏に識別する能力を備えている。

昆虫における嗅覚受容体 (olfactory receptor: OR) は、共受容体 (olfactory receptor co-receptor: Orco) と複合体を形成し、リガンド依存性の陽イオンチャネルとして機能することが知られている [4]。この OR/Orco 複合体は、匂い分子が結合することで陽イオンチャネルが開き、ナトリウムイオン (Na^+) やカルシウムイオン (Ca^{2+}) などの陽イオンが細胞内に流入する。このイオン流入による脱分極が神経信号を生み出し、最終的に脳で「匂い」として認識される。蚊などの昆虫では 80 種類以上の OR が同定されてお

り、それぞれが異なる匂い物質に高い選択的で応答する [5]。このことから、昆虫の嗅覚系は、匂い分子の識別において高度な多様性と選択性を備えていることがわかる。

この嗅覚機構を人工的に再構成することで、匂い物質を分子レベルで選択的に検出できるセンサが実現可能となる。このようなセンサは、酸化物質半導体型などの人工センサと比較して高い感度と選択性を有し、微量かつ多成分の匂い物質の識別において有効であると考えられている。現在、昆虫由来の OR および Orco を人工的に発現させた培養細胞（センサ細胞）を利用した匂いセンサの開発が進められている。

1. 3 センサ細胞を利用した匂い物質センサ

センサ細胞は、細胞内で嗅覚受容体および Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 (GCaMP) を発現しており、嗅覚受容体を介して匂い物質を認識すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する。それに応じて GCaMP が蛍光を発するため、匂い物質の存在を蛍光シグナルとして可視化することができる。我々はこれまでに、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、簡便なピペッティング操作でアレイ化できるマイクロウェルデバイスを開発し、その有用性を報告してきた。このマイクロウェルデバイスを用いることで、多種類のセンサ細胞を空間的に配置し、異なる匂い物質に対する応答を同時に計測することが可能となる。これにより、疾患特異的な匂いプロファイルを識別するマルチセンサアレイとしての応用が期待される。

一方で、従来の手法では、匂い物質を含む液体検体をセンサ細胞に直接接触させていた。しかし、この方法では、検体中の夾雑成分がセンサ細胞の応答や蛍光測定を阻害する可能性がある。実際、我々の検討では、同じ濃度の匂い物質を添加した場合でも、バッファー中ではセンサ細胞が明瞭な応答を示したのに対し、人工尿中では応答が著しく低下することが確認されており、この影響は無視できない (図 1、後述)。

本研究では、この問題を解決するため、匂い物質を揮発性有機溶媒（ヘキサン）で抽出・分離し、その後センサデバイス内の密閉された微小空間において揮発させる気相検出法を開発した。匂い物質を抽出し、揮発した標的分子

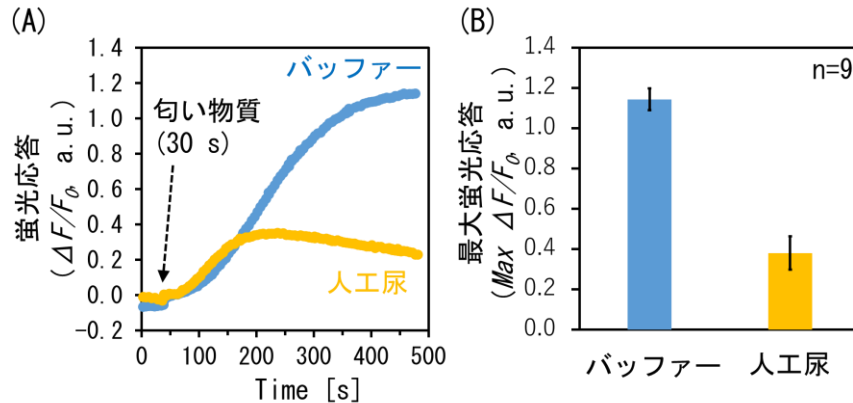


図1 センサ細胞アレイに対して、標的匂い物質 (アセトフェノン、100 μM) を含むバッファ溶液または人工尿を直接添加した際の正規化蛍光応答の比較。(A) 時間変化。(B) 最大値の比較。

を気相でセンサ細胞に曝露することにより、検体中の妨害成分を回避することが可能となる。このアプローチにより、センサ細胞が有する匂い物質への選択的応答性を最大限に活用することができ、より高精度な検出が実現すると考えられる。本手法は、匂い物質の組成が複雑かつ微量である尿などの生体検体に対して有効であり、センサ細胞の選択性と気相曝露の利点を活かした匂いセンシング技術として、疾患診断への応用が期待される。

2. 実験方法

2. 1 デバイスの作製

本研究で用いたデバイスの設計は、CAM ソフトウェア (Alphacam) を用いて行った。デバイスの作製には NC 加工機を利用し、厚さ 4 mm のアクリル板を切削して行った。

2. 2 センサ細胞の培養

センサ細胞には、昆虫嗅覚受容体 (OR)、共受容体 (Orco)、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質 (GCaMP) を発現させた昆虫培養細胞 (ExpiSf9) を用いた。センサ細胞の培養には ExpiSf CD 培地を使用し、三角フラスコを用いて、振とう培養 (27°C、125 rpm) で行った。

2. 3 センサ細胞アレイの作製

センサ細胞アレイは、センサ細胞をハイドロゲルに封入し、ピペッティングでデバイス上に分注することで作製した。まず、培養したセンサ細胞を遠心 (300 $\times g$ 、5 分間) し、得られた沈殿を回収した。回収したセンサ細胞は、ゲル化前のハイドロゲル (TrueGel3D) に懸濁し、ピペッティングによって 1.1 μL ずつデバイス上に分注した。分注後のデバイスは、27°C で 25 分間静置することにより、ハイドロゲルを完全にゲル化させた。その後、アレイ化されたセンサ細胞を含むチャンバーに、保存溶液 (HBSS (ハンクス平衡塩溶液) / 20 mM PIPES, pH 6.2 / 0.1% BSA) を満たし、使用するまで 4°C で保存した。

2. 4 センサ細胞アレイの蛍光応答の測定

センサ細胞アレイの蛍光応答の測定は、8 ビット CMOS カメラ、青色励起光 (485 nm)、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て室温で行った。4°C で保存してあったセンサ細胞アレイは、27°C で 10 分間インキュベート後に測定に用いた。蛍光応答の測定は、タイムラプスイメージングによって行い、約 500 秒間に渡って記録した。標的匂い物質は DMSO に溶解後、目的の濃度となるようにバッファ溶液 (HBSS / 20 mM PIPES, pH 6.2) または人工尿で希釈し、センサ細胞アレイが配置されたチャンバーに添加した。

記録した蛍光応答画像の解析は、画像解析ソフトウェア (ImageJ) を用いて行った。センサ細胞アレイの各マイクロウェルに、円形の関心領域 (ROI) を設定し、各時点における平均蛍光輝度を定量した。数値化した蛍光輝度の変化は、センサ細胞の応答前の蛍光輝度 (F_0) と応答後の蛍光輝度 (F) から、正規化した蛍光輝度変化 ($\Delta F/F_0$) を算出し、グラフを作成した。

2. 5 標的匂い物質のヘキサン抽出

バッファ溶液または人工尿に添加した標的匂い物質の抽出は以下の手順で行った。標的匂い物質は DMSO に溶解したのち、所定の濃度に希釈した。まず、調製した検体試料 1 mL に対し、ヘキサン 0.1 mL を加え、ボルテックスで激しく混合した。続いて、遠心 (21,600 $\times g$ 、5 分間) によって、ヘキサン層 (上層) と水層 (下層) に分離し、上層のヘキサン抽出液を回収した。抽出液は、使用するまで -80°C で保存した。

2. 6 センサ細胞アレイによる気相検出

ヘキサン抽出液に含まれる標的匂い物質の検出は、センサ細胞アレイを用いて以下のように行った。まず、作製済みのセンサ細胞アレイのチャンバーから保存溶液の 90% を除去し、アレイと同サイズの小型容器の上に設置した

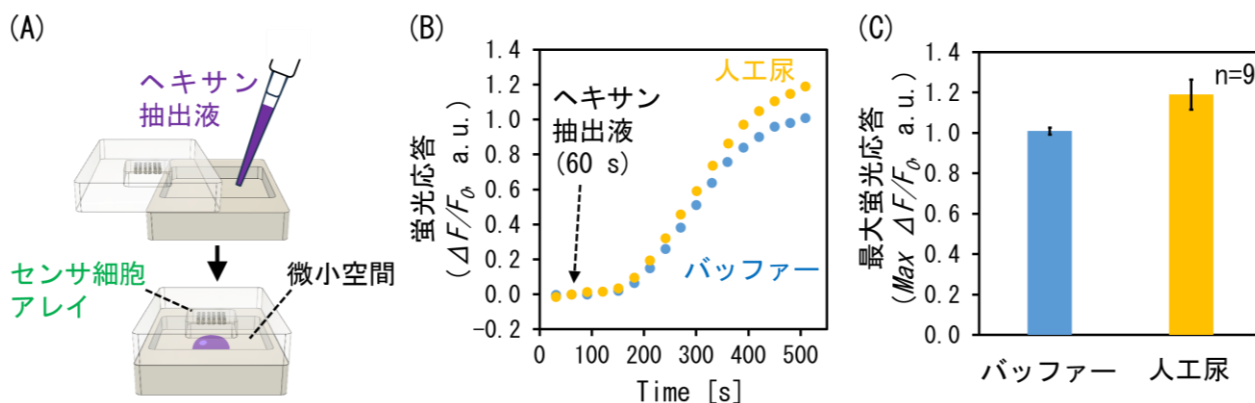


図2 開発した気相曝露法を用いた、標的匂い物質 (アセトフェノン、100 μM) を含むバッファ溶液または人工尿のヘキサン抽出液に対するセンサ細胞アレイの蛍光応答。(A) ヘキサン抽出液中の匂い物質をセンサ細胞アレイに気相曝露する手法の模式図。(B) 正規化蛍光応答の時間変化の比較。(C) 正規化蛍光応答の最大値の比較。

(図2A)。このとき、センサ細胞がアレイ化された面を小型容器のサンプルチャンバーに向くように配置した。また、容器との間にわずかな隙間を設けて、サンプルチャンバー内へピペッティング操作が可能な状態とした。次に、アレイと小型容器を蛍光イメージャー内に設置し、サンプルチャンバーにヘキサン抽出液 3 μL を滴下した。滴下後すぐにアレイと容器の位置を一致させ、チャンバーを密閉した。これにより、気化した標的匂い物質が微小空間内でセンサ細胞に曝露され、応答が誘導される。蛍光応答の測定と解析は、上述の方法に準じて行った。

3. 結果と考察

図1に、標的匂い物質であるアセトフェノンを終濃度 100 μM となるように添加したバッファ溶液および人工尿に対するセンサ細胞アレイの蛍光応答の結果を示す。図1Aでは、両検体における正規化蛍光応答の時間経過を示しており、グラフの曲線は9個のマイクロウェルの平均値を示している。バッファに対しては、その添加から約 450 秒間にわたり、センサ細胞の蛍光応答が持続的に増加した。一方、人工尿では、添加後 150 秒程度まではバッファと同様の応答増加が観察されたが、それ以降は応答が次第に低下した。図1Bには、図1Aにおける蛍光応答の最大値を示しており、棒グラフは9個のマイクロウェルの平均値および標準偏差を示す。これらの結果は、人工尿中に存在する夾雑成分がセンサ細胞の応答を阻害していることを示している。

図2には、人工尿中のアセトフェノンを揮発性有機溶媒であるヘキサンを用いて抽出し、得られた抽出液をデバイス内の微小空間で揮発させ、センサ細胞アレイに気相で曝露させた結果を示す。図2Aは、本研究で開発したセンサ細胞アレイに対する気相曝露法の概略図である。センサ細胞アレイは保存溶液を除去したのち、センサ細胞が配置された面を下向きにしてサンプルチャンバー上に設置し、ヘキサン抽出液の添加後すぐに密封することで、微小空間を

形成し、揮発した標的匂い物質を曝露する構成とした。

図2Bは、アセトフェノンを含むバッファおよび人工尿のヘキサン抽出液に対するセンサ細胞の蛍光応答の時間経過を示している。両検体とも、添加後から約 450 秒間にわたり蛍光応答の増加が観察され、人工尿を直接添加した際に見られた蛍光応答の抑制は確認されなかった。図2Cには、図2Bの蛍光応答の最大値を示す。アセトフェノンを含むバッファおよび人工尿のヘキサン抽出液に対して、センサ細胞アレイはほぼ同等の応答を示しており、ヘキサン抽出によって人工尿中の夾雑成分の影響を効果的に除去できることが示された。

本研究では、尿中の匂い物質をセンサ細胞アレイで検出するにあたり、検体に含まれる夾雑成分による応答阻害を回避する方法として、揮発性有機溶媒による標的匂い物質の抽出と、それに続く気相での検出を組み合わせた手法を開発した。その結果、人工尿中に添加した標的匂い物質を、バッファ中と同等に検出できることが確認された。今後は、本手法を実際のヒト尿検体に適用し、健康者と疾患罹患患者との間で匂い物質の検出パターンに差があるかを検討する予定である。本研究で開発した手法は、センサ細胞アレイを用いた疾患診断技術への応用に向けた有望な基盤技術になると期待される。

【謝辞】

本研究は、JST・CREST・JPMJCR20C4の支援を受けたものです。本研究で使用したセンサ細胞は、住友化学(株)から供与されました。ここに記して感謝申し上げます。

【参考文献】

- [1] Bax C, et al, Cancers 2019, 11, 1244
- [2] Goertzen A, et al., Front Oncol 2024, 14, 1448760
- [3] Hirata Y, et al., Lab Chip 2021, 21, 2643-2657
- [4] Sato K, et al., Nature 2008, 452, 1002-1006
- [5] Carey AF, et al., Nature 2010, 464, 66-71

「形」を用いた細胞匂いセンサ同時分析法の構築

人工細胞膜システムグループ

高森翔、三村久敏、大崎寿久、竹内昌治

1. はじめに

1. 1 細胞匂いセンサ

匂いの検出は、労働環境における安全管理、食品の品質保証、環境モニタリング、さらには医療診断や健康管理に至るまで、さまざまな分野で重要な役割を果たしている。従来の匂い検出手法には、訓練を受けた人間や動物による嗅覚検出 [1,2]、ガスセンサ [3]、およびガスクロマトグラフィー-質量分析(GC-MS) [4] による化学物質の定量分析などがある。これらは高感度な検出が可能である一方で、大型装置を必要とするケースが多く、携帯性や現場での即時運用に制約がある。

こうした課題の克服に向け、近年ではバイオハイブリッド型匂いセンサ [5-9] が有望な代替手段として注目されている。特に、嗅覚受容体(OR)および共受容体(Orco)を発現させた細胞をセンサ素子として用い、カルシウム感受性蛍光インジケータ(例: GCaMP [9-11])と組み合わせることで、選択性と感度に優れ、かつポータブルな匂い検出系の構築が期待されている。実際、先行研究では、単一種のORを発現させたセンサ細胞を用いて、個別の匂い物質を検出するバイオセンサの有効性がすでに示されている [5,8,9,12,13]。

1. 2 匂いの「嗅ぎ分け」に向けた取り組み

匂い検出においては、単一の化学物質だけでなく、匂いを構成する多様な成分を識別する能力(=嗅ぎ分け)が求められる。これを細胞匂いセンサで実現するためには、異なるORを発現させた複数種類のセンサ細胞を同時に用い、それぞれの細胞の応答パターンを解析する必要がある。このためには、複数のセンサ細胞を同一の観察系内で扱い、それぞれの応答性を区別・解析する手法の構築が不可欠である。先行研究ではその一例として、異なるセンサ細胞を基板上に平面的にパターニングし、位置情報に基づいて個々の応答を識別する方法が提案されている[14,15]。しかしながら、この細胞パターニング手法は、取り扱う細胞の種類が増加するにつれて操作の複雑性が増し、自動化技術なしでは実験的な再現性や効率性の確保が難しいという課題がある。

1. 3 センサ細胞を用いた匂い検出の仕組み

匂いセンサ細胞では、細胞膜上に発現したORが匂い分子と結合すると、ORとOrcoが形成するカルシウムイオ

ンチャネルが開口し、細胞外からカルシウムイオンが細胞内へ受動的に流入する。このカルシウム流入により、あらかじめ導入されているカルシウム感受性インジケータが蛍光を発する。この応答は個々の細胞ごとに独立して起こるため、理論的には単一細胞ごとに匂い物質を検出可能である。しかし実際には、細胞の状態や発現量のばらつきなどの影響により、一細胞レベルでの定量的な再現性には限界がある。そのため、複数細胞の応答を集団として平均化することで、より安定かつ再現性の高い検出を目指すアプローチが取られている。この平均化手法には、①基板上にパターニングされた細胞集団によるもの、②多数の細胞を包埋したハイドロゲル粒子単位で応答を平均化する方法が存在する。

1. 4 異なるハイドロゲル粒子の識別方法

センサ細胞をハイドロゲル粒子に包埋する場合、異なる細胞種を含む粒子を確実に識別・区別する技術が必要となる。従来のアプローチとしては、粒子を基板上に整列・固定し、位置情報に基づいて識別する方法が報告されている[5]。一方、より柔軟な応用に向けて、ハイドロゲル粒子そのものに識別可能な情報をエンコードする技術、いわゆる「ハイドロゲル・エンコーディング技術」も数多く開発されている[16,17]。具体的には、粒子の形状、表面への微細な刻印パターン、あるいは種類ごとに異なる蛍光染色を施すなどの方法がある。これらはいずれもセンサ細胞包埋粒子の識別に利用可能であるが、実装の難易度や識別精度、使用環境への適応性など、それぞれに特有の利点と制約があるため、目的に応じた選択が求められる。

1. 5 粒子の「形」によるセンサ識別の新戦略

本研究では、異なる匂いセンサ細胞をそれぞれ異なる形状のハイドロゲル粒子に成形し、それらの形状情報を深層学習を用いて解析・識別することで、多種類のセンサ応答を同時にかつ自動的に判別する新たな方法を提案する。まず、異なるセンサ細胞をそれぞれ別個の形状を持つハイドロゲル粒子に包埋する。次に、それらの粒子画像をもとに畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を訓練し、粒子の形状分類器を構築する。続いて、これらの異なる形状粒子を混合したサンプルに匂い物質を添加し、時間経過に伴う蛍光応答を撮像する。得られた時系列画像データを、前述の形状識別スキームにより解析し、各粒子の形状を特定する。さらに、それぞれの粒子に対する蛍光変化を自動的に

抽出・解析することで、複数の匂いセンサ細胞による同時応答の定量評価を可能とする。

2. 実験方法

2. 1 センサ細胞調製とハイドロゲル粒子の形成

本研究では、ExpISf9 細胞ベースの安定発現株を用い、それぞれ AgOR1、AaOR4、AaOR15 を含む 3 種類のセンサ細胞株を用意した。各株は Orco および GCaMP7 とともに共発現しており、匂い応答時にカルシウム流入に応じた蛍光増加が観察可能である。

細胞を遠心回収後、2%低融点アガロース(または 3%アルギン酸)と混合し、厚さ 0.5 mm のシリコンスペーサー間に展開して平面ゲルを形成した。ゲル化後、生検トレパンを用いて円形・三角形・四角形の 3 種類に打ち抜き、乾燥防止のため HBSS 中に保存した。

2. 2 粒子形状識別スキームの構築と適用

粒子画像は GCaMP 蛍光チャンネルにて取得し、セグメンテーションを行った。粒子面積が 2,000~3,400 ピクセルの範囲内にある粒子を抽出し、ゼロパディングによって 128×128 ピクセルの画像に整形。形状ごとに約 2,600 枚ずつの学習データを用意し、2 層の畳み込み・プーリング、Flatten 層、全結合層、softmax 確率出力からなる CNN を 5 モデル学習させた。

分類時には各モデルの softmax 確率を平均化し、最高値が 0.5 を超えた場合は該当形状(円形(C)、三角形(T)、四角形(S))を、超えない場合は「分類不能(U)」とした。

2. 3 匂い物質添加実験と蛍光応答解析

3 種類のセンサ細胞内包粒子を混合し、フェノール、6-methyl-5-hepten-2-one、アセトフェノン、DMSO(ネガコン)の 4 条件で蛍光タイムラプス撮像(1 fps, 5 分間)を実施。粒子ごとに形状分類を行ったのち、個々の粒子について蛍光強度を時系列で抽出し、 $\Delta F/F_0$ を計算。粒子追跡には重心距離に基づくアルゴリズムを用いた。

3. 結果と考察

3. 1 センサ細胞内包ハイドロゲル粒子の作製と粒子形状識別スキームの構築

図 1A, B にセンサ細胞を内包したハイドロゲル粒子と、それに用いた生検トレパンを示す。トレパンの形状に対応した三種類(円形、三角形、四角形)の粒子が安定して得られている。次に、取得した粒子の蛍光画像を用いて、形状識別用 CNN モデルの訓練およびバリデーションを行った(図 1C)。学習データの組合せを変えて 5 回独立に学習を行い、5 つの分類器を構築した。全ての訓練において損失関数と分類精度はそれぞれエポック 2~6 で急速に収束し(図 1D, F)、トレーニングセットでは 100%、バリデーションセットでも誤分率 0.06%(1/1564)という高精度を達成した(図 1F)。これらの結果は過学習が起きていないことを

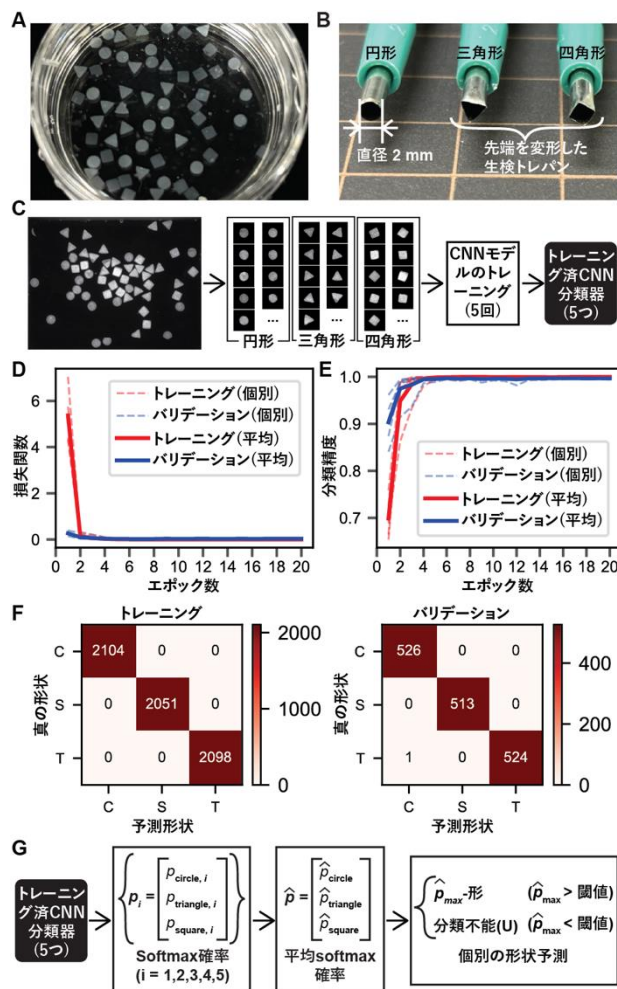


図 1. センサ細胞内包ハイドロゲル粒子の作製、および形状識別スキームの構築. (A)作製したセンサ細胞内包ハイドロゲル粒子. (B)先端を変形した生検トレパン. (C)CNN 形状分類器のトレーニング. (D)損失関数(カテゴリカル・クロスエントロピー). (E)分類精度. (F)トレーニングおよびバリデーションの混同行列. (G)構築した形状識別スキーム.

示唆する。最終的に、5 つの分類器の softmax 確率を平均し、閾値 0.5 で分類する形状識別スキームを確立した(図 1G)。

3. 2 粒子形状による複数細胞センサの同時解析

構築した形状識別スキームを用いて、異なるセンサ細胞をそれぞれ封入した三形状のハイドロゲル粒子を混合し、各種匂い物質への応答を解析した。フェノール、6-methyl-5-hepten-2-one、アセトフェノンに加え、ネガティブコントロールの条件を加えた計 4 条件で実験を行った。代表例として、アセトフェノンに対する応答画像を図 2B に示す。95 個中 2 個の誤識別のみであり、4 実験を合わせた混同行列(図 2C)でも誤識別率は 1.6%(6/380)に留まり、高精度な識別が達成されている。図 2D はアセトフェノン条件下での各形状粒子における蛍光応答の経時変化を示しており、四角形粒子で強い応答が観察された。一方、円形および三角形粒子でも比較的弱い有意な応答が確認された。これは、それぞれが発現する OR(AgOR1、AaOR4)にもアセトフェノンに対する感受性がある可能性を示唆してい

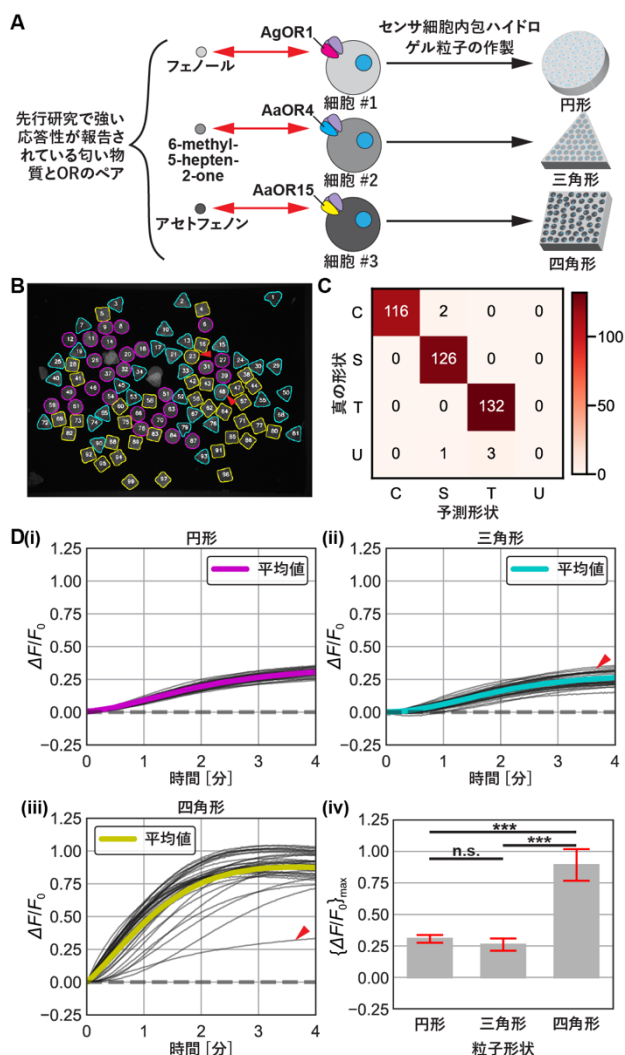


図 2. 異なる OR を発現した 3 種類の匂いセンサ細胞を内包したアガロース粒子を用いた匂い物質添加実験と、形状識別スキームによる応答性解析。(A) 実験に使用した 3 種類のセンサ細胞 (AgOR1, AaOR4, AaOR15) と、それぞれの細胞を内包したハイドロゲル粒子の形状 (円形、三角形、四角形)。(B) アセトフェノン添加実験におけるハイドロゲル粒子の形状識別結果。(C) 4 種類の匂い物質 (フェノール、6-methyl-5-hepten-2-one、アセトフェノン、ネガコン) 添加実験における形状識別の混同行列。(D) 形状識別結果に基づく、アセトフェノン添加時の粒子ごとの蛍光応答 ($\Delta F/F_0$) の解析

る。以上より、形状エンコードと CNN 識別を組み合わせることで、複数種類の匂いセンサ細胞による同時解析が高精度かつ自動的に実施可能であることが実証された。

【謝辞】

本研究で用いたセンサ細胞は住友化学株式会社にご提供いただきました。また、本研究は JSPS 科研費 JP21H05013 の助成を受けたものです。

【参考文献】

- [1] Cleary, A. M., Konkel, K. E., Nomi, J. S., McCabe, D. P., Odor recognition without identification. *Mem. Cogn.* **2010**, 38(4), 452-460.
- [2] Waggoner, P., Lazarowski, L., Hutchings, B., Angle, C., Porritt, F., Effects of learning an increasing number of

odors on olfactory learning, memory and generalization in detection dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2022**, 247, 105568.

- [3] Kohl, D., Function and applications of gas sensors. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2001**, 34(19), R125.
- [4] Högnadóttir, Á., Rouseff, R. L., Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, 998(1-2), 201-211.
- [5] Hirata, Y., Morimoto, Y., Nam, E., Takeuchi, S., Portable biohybrid odorant sensors using cell-laden collagen micropillars. *Lab Chip* **2019**, 19(11), 1971-1976.
- [6] Yamada, T., Sugiura, H., Mimura, H., Kamiya, K., Osaki, T., Takeuchi, S., Highly sensitive VOC detectors using insect olfactory receptors reconstituted into lipid bilayers. *Sci. Adv.* **2021**, 7(3), eabd2013.
- [7] Misawa, N., Fujii, S., Kamiya, K., Osaki, T., Takaku, T., Takahashi, Y., Takeuchi, S., Construction of a biohybrid odorant sensor using biological olfactory receptors embedded into bilayer lipid membrane on a chip. *ACS Sens.* **2019**, 4(3), 711-716.
- [8] Sato, K., Takeuchi, S., Chemical vapor detection using a reconstituted insect olfactory receptor complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53(44), 11798-11802.
- [9] Mitsuno, H., Sakurai, T., Namiki, S., Mitsuhashi, H., Kanzaki, R., Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 65, 287-294.
- [10] Deng, H., Nakamoto, T., Odor biosensors based on cell expressing olfactory receptor: Recent advances. *Anal. Sens.* **2024**, 4(5), e202400006.
- [11] Oh, E. H., Lee, S. H., Lee, S. H., Ko, H. J., Park, T. H., Cell-based high-throughput odorant screening system through visualization on a microwell array. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 53, 18-25.
- [12] Kida, H., Fukutani, Y., Mainland, J. D., de March, C. A., Vihani, A., Li, Y. R., Chi, Q., Toyama, A., Liu, L., Kameda, M., Yohda, M., Matsunami, H. Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors. *Nat. Commun.* **2018**, 9(1), 4556.
- [13] Terutsuki, D., Mitsuno, H., Sakurai, T., Okamoto, Y., Tixier-Mita, A., Toshiyoshi, H., et al., Increasing cell-device adherence using cultured insect cells for receptor-based biosensors. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, 5(3), 172366.
- [14] Termatanasombat, M., Mitsuno, H., Misawa, N., Yamahira, S., Sakurai, T., Yamaguchi, S., et al., Cell-based odorant sensor array for odor discrimination based on insect odorant receptors. *J. Chem. Ecol.* **2016**, 42, 716-724.
- [15] Yamahira, S., Mitsuno, H., Yamaoka, M., Nagamune, T., Okamoto, A., Kanzaki, R., Yamaguchi, S., Odorant-sensing cell micropatterns for odor discrimination. *Biosens. Bioelectron.: X* **2024**, 18, 100473.
- [16] Ghosh, R., Arnheim, A., van Zee, M., Shang, L., Soemardy, C., Tang, R. C., et al., Lab on a particle technologies. *Anal. Chem.* **2024**, 96(20), 7817-7839.
- [17] Cai, L., Bian, F., Chen, H., Guo, J., Wang, Y., Zhao, Y., Anisotropic microparticles from microfluidics. *Chem* **2021**, 7(1), 93-136.

業 績

【原著論文】

1. Michio Kawai, Haruka Oda, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, and Shoji Takeuchi
Open-source and low-Cost Miniature Microscope for On-Site Fluorescence Detection
HardwareX, Vol. 19, e00545 (2024)
2. Takuma Nakane, Toshihisa Osaki, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Effective Dissolution of a Gaseous Odorant in Liquid Using Gas Flow
Advanced Materials Technologies, Vol. 9, 2400494 (2024)
3. Caroline Scott, Riley Porteus, Shoji Takeuchi, Toshihisa Osaki, and Sunghee Lee
Electrophysiological Characterization of Monoolein-Fatty Acid Bilayers
Langmuir, Vol. 41, pp. 2293–2299 (2025)
4. Keisuke Sugahara, Shun Yasunaga, Minghao Nie, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
3D Wiring Microelectrodes in a PMMA Microfluidic Device by Vacuum Filling Method
Advanced Materials Technologies, Vol. 10, 2401622 (2025)
5. Keisuke Ohta, Minghao Nie, Haruka Oda, and Shoji Takeuchi
Skin-Covered Biohybrid Robotic Finger with Bilayered Permeable Subcutaneous Support for Internal Hydration Supplement
Advanced Intelligent Systems, 2400871 (2025) online
6. 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)

【総説・概論】

1. 小田悠加、大崎寿久、竹内昌治
マイクロ流体デバイス技術を利用したバイオハイブリッド匂いセンサ
生体ガス計測の最新動向, シーエムシー出版, pp.134-143 (2024)

【口頭発表】

1. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics: Harnessing Living Materials as Robotic Elements
2024 Korea Biochip Society Spring Conference, 2024 年 5 月, 韓国
2. Toshihisa Osaki, Kenji Nakao, Hisatoshi Mimura, Sho Takamori, and Shoji Takeuchi
Artificial Cell Membrane System for Single-channel Characterization of Ion Channels
ION CHANNEL MODULATION SYMPOSIUM (ICMS2024), 2024 年 5 月, 東京
3. 高森翔、川上泰生、大崎寿久、三村久敏、三木則尚、竹内昌治
複数細胞匂いセンサの実現のための異種形状ゲル自動識別技術の構築
化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 49 回研究会 (CHEMINAS49), 2024 年 6 月, 東京
4. Shoji Takeuchi
Biohybrid Materials and Devices for Highly Sensitive Sensing
Joint Conference of GCIM 2024 & IUMRS-ICYRAM 2024 & MRS-K SPRING MEETING, 2024 年 6 月, 韓国
5. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics
Yonsei University 機械工学部セミナー, 2024 年 6 月, 韓国
6. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics
University of Illinois Urbana-Champaign MiV Seminar, 2024 年 6 月, 米国
7. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics: Integrating Living Materials for Enhanced Robotic Systems
The 11th Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT2024), 2024 年 6 月, シンガポール
8. Shoji Takeuchi
Biohybrid Innovations: Building the Future of Sensing Devices
International Conference on Smart Sensors (ICSS 2024),

2024 年 7 月, 台湾

9. Shoji Takeuchi
Emerging Technology for Biohybrid Robotics
The 6th International Summer School for Medical Robotics (Chinese Government Scholarship International Summer School Programme 2024), 2024 年 7 月, 中国
10. 竹内昌治
三次元組織形成技術の新展開
第 45 回日本炎症・再生医学会, 2024 年 7 月, 福岡
11. 竹内昌治
バイオハイブリッド研究の新展開
佐渡カンファレンス, 2024 年 7 月, 佐渡
12. 大崎寿久, 中尾賢治, 三村久敏, 高森翔, 竹内昌治
Artificial Cell Membrane System for Single-protein Characterization of Ion Channels
第 21 回次世代を担う若手のためのフィジカル・フォーラム (PPF2024), 2024 年 8 月, 葉山
13. 加藤碧, 小田悠加, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治
Strip-type odorant sensor with an array of olfactory receptor-expressing cells
日本味と匂学会第 58 回大会, 2024 年 9 月, 岡山
14. 大崎寿久
細胞サイズものつくりと産学連携
日本分析化学会第 73 年会 ものつくり技術交流会 2024 in 関東・東海, 2024 年 9 月, 名古屋
15. Sho Takamori, Taisei Kawakami, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Norihisa Miki, and Shoji Takeuchi
Shape Classification-based Fluorescence Analysis in Hydrogels Encapsulating Odorant Sensor Cells
The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2024), 2024 年 10 月, カナダ
16. Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Sho Takamori, Haruka Oda, and Shoji Takeuchi
A Micro-well Device Integrates Multiple Sensor Cells with Hydrogel for Odorant Detection
The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2024), 2024 年 10 月, カナダ
17. Haruka Oda, Hisatoshi Mimura, Toshihisa Osaki, Shoji Takeuchi
Reproducible and Repeatable Cellular Microarray Generation Using Multi-Capillary Stamping
The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2024), 2024 年 10 月, カナダ
18. Shoji Takeuchi
The Frontier of Biohybrid Robotics in Biofabrication
The International Conference on Biofabrication 2024 (ISBF2024), 2024 年 11 月, 福岡
19. 竹内昌治
超高感度計測を実現するバイオハイブリッドセンサ
第 3 回 EISESiV・iSyMs コンソーシアム合同シンポジウム, 2024 年 11 月, 東京
20. 竹内昌治
Think Hybrid! ～異分野融合研究で拓く SF の世界～
渋谷教育学園幕張中学校・高等学校進路講演会, 2024 年 11 月, 千葉
21. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics
2024 IEEE International Conference on Cyborg and Bionic Systems (IEEE CBS 2024), 2024 年 11 月, 名古屋
22. 田中葵, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治
細胞匂いセンサに向けたエレクトロスプレーを用いた高効率匂いガス溶解機構
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会 (CHEMINAS 50), 2024 年 11 月, 仙台
23. 江澤伸司, 大崎寿久, 三村久敏, 高森翔, 三木則尚, 竹内昌治
電氣的刺激に対する人工細胞膜の安定性
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会 (CHEMINAS 50), 2024 年 11 月, 仙台
24. 高森翔, 三村久敏, 大崎寿久, 竹内昌治
液滴形成ユニット内蔵 cDICE 型リボソーム形成デバイスの構築
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会 (CHEMINAS 50), 2024 年 11 月, 仙台
25. 三村久敏, 大崎寿久, 高森翔, 小田悠加, 竹内昌治
尿中の匂い物質検出のための細胞センサデバイスの開発
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会 (CHEMINAS 50), 2024 年 11 月, 仙台
26. 大崎寿久, Caroline Scott, Riley Porteus, 竹内昌治, Sunghee Lee

液滴接触法デバイスを用いたモノグリセリド-脂肪酸二重膜の膜物性の評価
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会
(CHEMINAS 50), 2024 年 11 月, 仙台

27. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics
The 10th International Conference on BioSensors,
BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS
& Applications (Bio4Apps2024), 2024 年 12 月, 富山
28. 大崎寿久
生物の細胞膜機能を次世代センサとして活用する分
析技術
令和 6 年度分析イノベーション交流会, 2024 年 12 月,
東京
29. 竹内昌治
バイオハイブリッドなモノづくり
第 43 回整形外科バイオマテリアル研究会, 2025 年 1
月, 松江
30. Shoji Takeuchi
Biohybrid Robotics
Conference on Robots for Science - How Robots Will
Facilitate Scientific Discovery, 2025 年 1 月, 香港
31. Shoji Takeuchi
Biohybrid Technology: Harnessing Biology for
Engineering Innovation
City University of Hong Kong, Seminar 2024/2025, 2025
年 1 月, 香港
32. Shoji Takeuchi
Emerging Technology for the Biohybrid Robotics
The 38th International Conference on Micro Electro
Mechanical Systems (IEEE MEMS 2025), 2025 年 1 月,
台湾
33. 大崎寿久
人工細胞膜を用いた創薬支援技術と次世代センサの
開発
BUTTOBE-NEXT 採択学生主催 第 2 回学内研究発表
会, 2025 年 2 月, 東京

【特許】

国内特許出願 3 件
海外特許出願 1 件