

令和3年6月1日発行(毎月1回1日発行) 通巻841号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

JUNE
2021
Vol. 76

6

研究物語 • Research story

アジサイの 花色の謎を解く

解説 • Research article

受けた力を色と蛍光で
表現する高分子材料

紹介 • Topics

大豆と納豆菌のせめぎ合い



呼気に含まれる匂い分子を ppb レベルで検出！

——蚊の嗅覚受容体を組み込んだ
高感度匂いセンサーの開発

山田哲也¹・大崎寿久²・竹内昌治^{2,3}

¹東京工業大学科学技術創成研究院未来産業技術研究所・²神奈川県立産業技術総合研究所・³東京大学大学院情報理工学系研究科/同大学生産技術研究所/同大学国際高等研究所ニューロインテリジェンス国際研究機構

優れた感度と選択性をもつ生物の嗅覚と、定量性、安定性で優位な工学センサーを組み合わせたバイオハイブリッドセンサーが開発された。難水溶性である気体中の匂い分子の検出も可能で、呼気から極微量のがんマーカーを識別するセンサーとして期待されている。

生物がもつ優れた匂いセンシング能力

生物の嗅覚は、空気中に漂うわずかな匂いやフェロモンを認識することができるほどに優れた感度と選択性を兼ね備えている^{1,2)}。生物がもつ嗅覚機能を分子レベルで見ると、嗅覚細胞の細胞膜に発現した嗅覚受容体が匂い分子を認識していることがわかる。嗅覚受容体と匂い分子が結合したあと、どのようなメカニズムで脳へとシグナルが送られているかは哺乳類と昆虫で異なるとされる(図1)。哺乳類の場合、主要なメカニズムとして、匂い分子が嗅覚受容体に結合するとGタンパク質^{*1}が活性化され、アデニル酸シクラーゼを動かしてATPを環状AMP(cAMP)に変換する。その後、

^{*1} グアニンヌクレオチド結合タンパク質の略。GTPとGDPの結合・乖離により情報伝達系を担う。

cAMPがイオンチャネルに作用してチャネルが開き、イオン電流としてイオンが細胞質に流入し脱分極が起こる。この過程で生じる電気シグナルが、神経を通じて脳に送られるしくみになっているとされている(図1a)。一方、昆虫の嗅覚受容機構は、匂い分子と結合する嗅覚受容体とイオンチャネルが複合体を形成しており³⁾、匂い分子が嗅覚受容体と結合するとイオンチャネルが開くしくみになっているとされる(図1b)。それぞれの生物は複数種類の嗅覚受容体をもっており、蚊は約100種類、ヒトは約400種類、イヌは800種類、線虫は1200種類もつとされている。それぞれの嗅覚受容体には、匂い分子に対する選択性が非常に高いものや、比較的幅広い匂い分子に対して結合するものがあり、こうした受容体群の応答パターンが、複数の匂い分子が混合している「匂い」の識別につながっていると考えられている。

生物がもつこうした優れた匂いセンシング能力は、行方不明者の捜索や麻薬・爆発物の探査、食品の品質管理、環境評価など、私たちの身近なところで利用されている^{4,5)}。たとえば訓練された探知犬は、空港でその優れた嗅覚を使って巧妙に隠された麻薬や爆発物を探索したり、検疫検査が必要とされる肉製品や果物などを見つけたりするのに役立っている。また調香師や臭気鑑定士は、自身の嗅覚を使って香りの調査

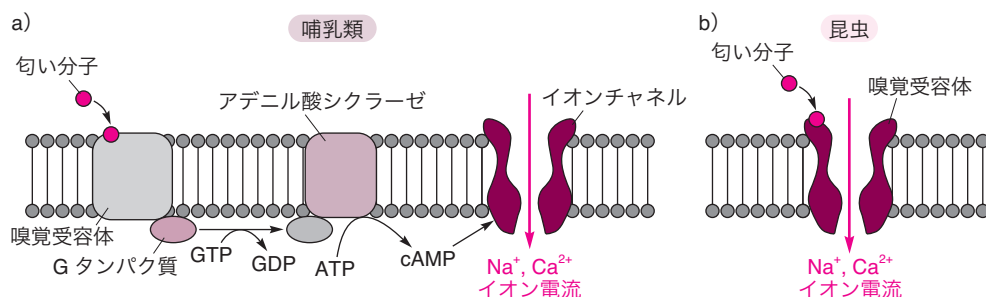


図1 細胞膜における匂い受容のメカニズムの模式図
a) 哺乳類, b) 昆虫。

や環境評価を行っている。さらに近年では、前述した哺乳類ではなく、ミツバチを使って地面に埋められた地雷を探索する例や⁶⁾、線虫を使って尿に含まれる成分を検知し、がんの診断を行う例も報告されている⁷⁾。

これらの生物がもつ高い匂いセンシング能力は、工業的に製作されている酸化半導体型の匂いセンサーと比べても高い感度と選択性を示しており、人工物への代替が難しいというのが現状である。一方で短所としては、データの数値化が難しく、安定性が低いことがあげられる。探知犬に関して述べると、1日のうちに集中して探索できる時間が限られており、またその育成のためには時間と高額な費用が必要となる。同様に、調香師や臭気判定士にも熟練した技能と能力が必要になるという課題がある。

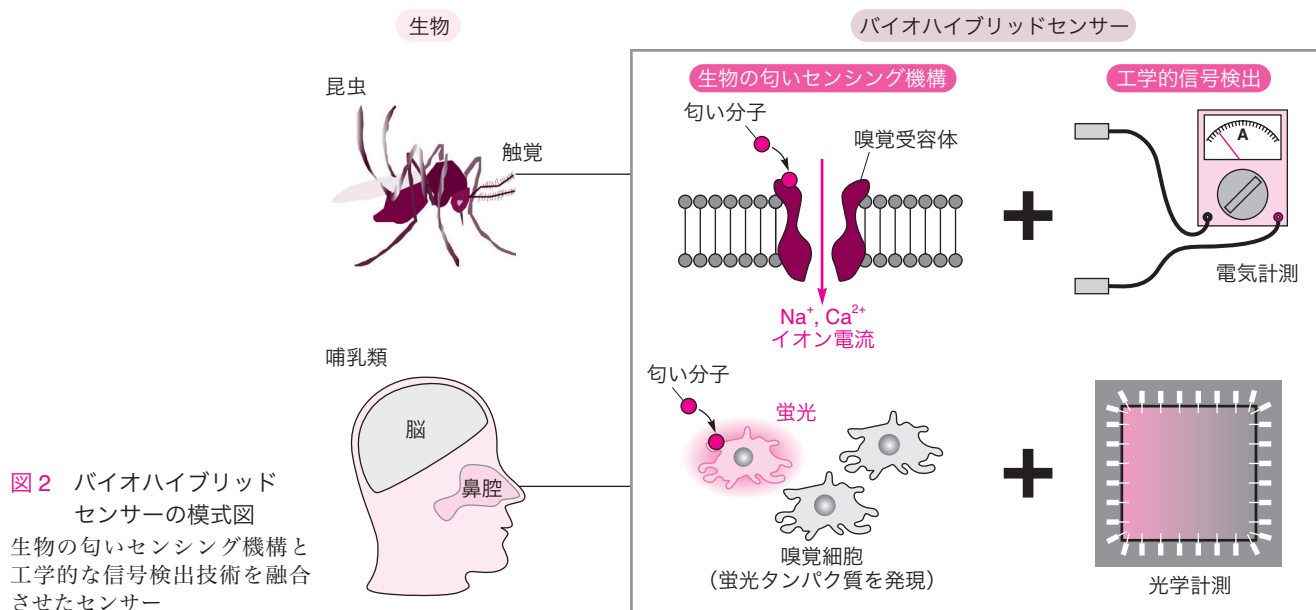
バイオハイブリッドセンサーとは？

上述のように、生物の匂いセンシング能力は、高い感度と選択性を兼ね備えた優れたセンサー素子として機能するものの、ヒトを含め生物をセンサーとして利用することは、人工的につくられたセンサーに比べて定量性・安定性・コスト面で劣ってしまう。そこで、生物の嗅覚受容機構と工学センサーの「いいとこどり」を目指した次世代センサーとして、バイオハイブリッドセンサーが提案されている。すなわち、優れた選択性と感度をもつ嗅覚受容体をセンサー素子として利用する一方で、嗅覚受容体と特定の匂い分子の結合により生じるシグナルを工学的に検出可能な信号に変換することで、生物

の優れた匂いセンシング能力を保持しながら、定量性のある信号を再現よく出力することができるようになる。このバイオハイブリッドセンサーについては、匂い検知に不必要な生化学的な反応や相互作用を排除し、センサーとしての精度と安定性を向上させる研究や、センサー自体の小型化を目指した研究が行われている。

バイオハイブリッドセンサーの具体例を図2に示す。生物から嗅覚受容体や嗅覚細胞などをセンサー素子として取りだし、匂い分子がこのセンサー素子に結合することで生じるイオンの流れを電気化学的または光学的に検出するものがある^{4,8)}。これは図1に示したように、匂い1分子の結合が、多量のイオンの流れ（一般的には1秒間に約1千万個のイオン）として変換・増幅されるメカニズムを利用するものである。このイオンの流れは、電流として計測したり、陽イオンに対する蛍光指示薬を使って蛍光観測したりすることができる。図2の例のほかにも、匂い分子と嗅覚受容体の結合を直接観測する研究も行われており、匂い分子の結合による質量増加を水晶振動子マイクロバランス法により計測したり、電気化学特性の変化をインピーダンス測定や電界効果トランジスタにより検出したりする方法が報告されている^{9,10)}。

こうした従来研究によって、バイオハイブリッドセンサーの概念実証は進められ、生物のもつ高い感度と選択性を継承しながら、匂い分子に対する定量的な検出結果が示されるようになってきている。その一方で、バイオハイブリッドセンサーを用いた気中の匂い分子の検出はあまり行われていない。



その大きな要因としてあげられるのが、匂い分子の多くが難水溶性を示すということである。匂い分子はおもに分子量 300 程度までの有機化合物であるため、親油性が高く水溶性は低い。この匂い分子を、嗅覚受容体が存在する水溶液中にどのようにして溶かし、どのようにして嗅覚受容体に送り届けるかは、実用化に向けた大きな課題の一つとなっていた。

蚊の嗅覚受容体を利用した匂いセンサー開発と呼吸診断への応用

このように、バイオハイブリッド匂いセンサーの開発が現在さかんに行われているなかで、筆者らは蚊の嗅覚受容体に着目して研究を進めている。蚊の嗅覚受容体 (OR8) はヒトの汗に含まれる匂い分子と特異的に結合し、イオン電流が流

れるしくみになっている (前頁図 2)。また、哺乳類の匂いの受容メカニズムでは複数のタンパク質と分子が関与しているのに対し、蚊の匂いの受容メカニズムは単純で、バイオハイブリッドセンサーとして利用しやすい。以下では、筆者らが取り組んでいる蚊の嗅覚受容体を利用した匂いセンサーの開発、とくに難水溶性の匂い分子を嗅覚受容体に効率よく送達する新技術を中心に解説する¹¹⁾。まず、嗅覚受容体をセンサーデバイス中に保持するための人工的な細胞膜作製法について解説し、次に匂い分子を水溶液中に効率よく送達する技術を紹介する。最後に、呼吸診断への応用を目指した模擬実験結果についても述べる。

■ 人工細胞膜を用いたセンサーデバイス

蚊の嗅覚受容体は、細胞膜に存在する膜タンパク質の一種であり、センサーデバイスにおいては、この膜タンパク質を脂質二重膜に再構成することで嗅覚受容体としての機能を発現させることができる。脂質二重膜はリン脂質を含む有機溶媒中に水滴を二つ滴下し、この二つの液滴を接触させるという簡便な方法でつくることができる¹²⁾。また、嗅覚受容体は無細胞タンパク質合成系を用いることで合成することが可能である¹³⁾。無細胞タンパク質合成系とは、大腸菌やコムギ胚芽細胞などの各種細胞内に存在する酵素などを利用して試験管内でタンパク質を合成する方法であり、嗅覚受容体の配列をコードする遺伝子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目的の嗅覚受容体を得ることができる。この得られた嗅覚受容体を脂質二重膜に再構成することで嗅覚受容体の機能を発現させることを目指した (図 3 a)。

再構成した嗅覚受容体の、基質である匂い分子に対する応答の有無を検証した結果を図 3 (b) ~ (d) に示す。蚊の嗅覚受容体 OR8 を脂質二重膜に再構成し、OR8 に応答することが知られている匂い分子 1-octen-3-ol (通称：オクテノール、100 μ M、終濃度 3 μ M) を溶解した有機溶媒を添加した。添加前は電流がほとんど流れず、シグナルは見られないが (図 3 b)，オクテノールを添加するとイオンチャネルが開くことによる矩形波状のシグナルが観測された (図 3 c)。また、嗅覚受容体の活性を阻害することが知られている阻害剤 (IR3535) を加えると、シグナルが

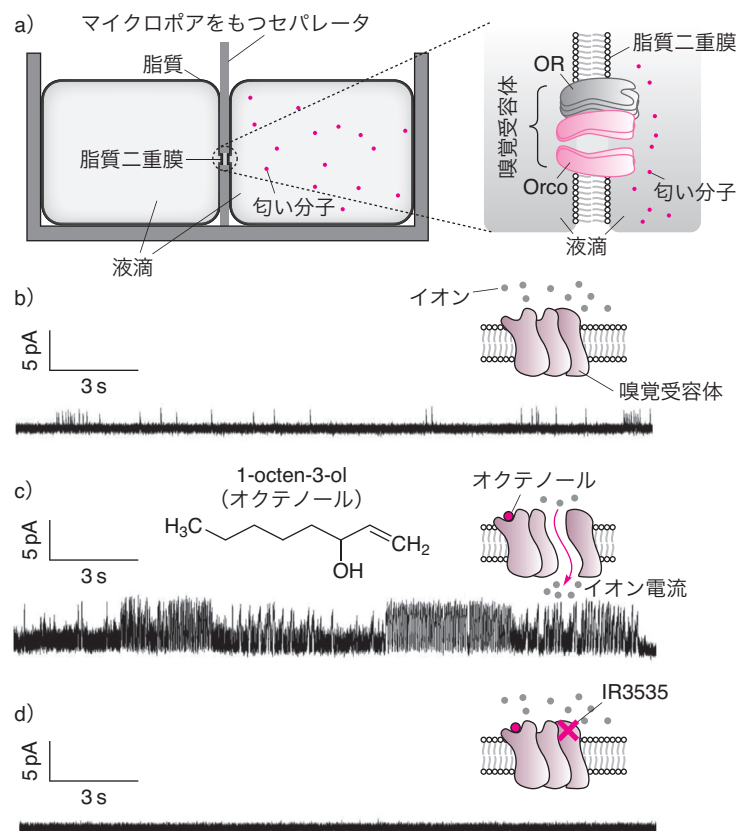
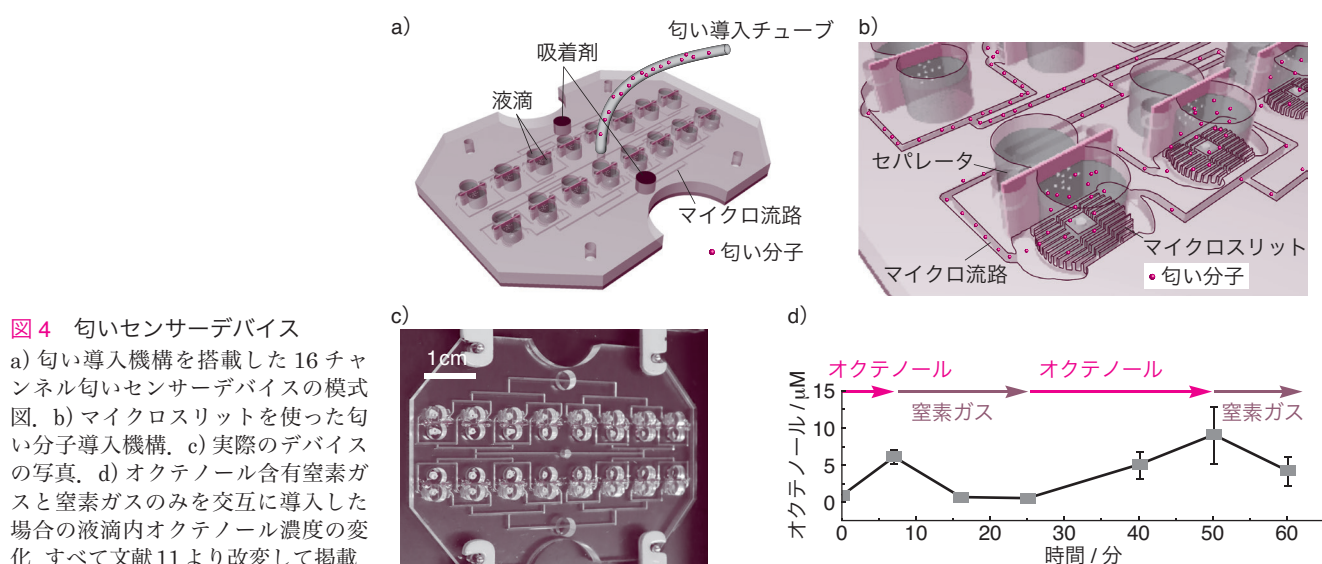


図 3 匂いセンサーの電流応答

a) 嗅覚受容体を脂質二重膜に再構成させたデバイスの模式図。b) オクテノールなしの場合の電流応答。シグナルはほとんど確認できない。c) (b) に 100 μ M のオクテノール溶液を終濃度 3 μ M となるよう添加したのちの電流応答と、オクテノールの構造式。シグナルが観測されたことから、このセンサーの嗅覚受容体がオクテノールを感知し、イオンチャネルが開いたと考えられる。d) (c) に阻害剤 IR3535 を添加したのちの電流応答。(c) で確認されたシグナルが消失していることから、IR3535 が受容体由来の電流応答を阻害したと考えられる。すべて文献 11 より改変して掲載。



消失することがわかった(図 3 d)。これらの結果は、センサーデバイスに組み込んだ嗅覚受容体が、匂い分子を検出するための機能を保持していることを示している。

2 難水溶性匂い分子の効率的溶解機構

嗅覚受容体を脂質二重膜に再構成したセンサーデバイスは、水溶液中に溶解した匂い分子を検出できることを示した。そこで、空気中に漂う難水溶性の匂い分子を気中から直接検出するため、水溶液中の嗅覚受容体に匂い分子を効率的に届ける技術を開発することが実用化に向けた重要課題となった。

筆者らは難水溶性の匂い分子を効率的に嗅覚受容体に送達するため、水溶液に接するマイクロ流路構造を設け、匂い分子を含むガスを導入する機構を提案した。具体的には、図 4 (a) ~ (c)に示すような微細なスリットをセンサーデバイスに組み込んだ。このスリットには、濡れによるスリットの閉塞を防ぐために撥水コートをした。このセンサーデバイスのしくみを説明すると、組み込まれた微細なスリットの上に人工細胞膜を形成する液滴を配置することで、液滴とスリットの隙間に匂い分子を含む気体を流すためのマイクロ流路が形成される¹¹⁾。そこに匂い分子を含むガスを能動的に流すことで、気液界面で生じるせん断力によって液滴内部が攪拌され、匂い分子が効率的に気相から水相へ分配される。また、液滴内部の攪拌は溶解した匂い分子が嗅覚受容体に到達する確率を高めると考えられる。そこで、液滴内にマイクロビーズを添加し、その動きを観察することでガス導入による水滴の攪拌を確認できるようにした。

図 4 (d) は、匂い分子〔オクテノール、濃度 5 ppm (ppm は体積比でガス濃度の 100 万分の 1 を示す単位)〕を含む窒素ガスと、匂い分子を含まない窒素ガスを交互に入れ替えながらセンサーデバイスに導入したときの液滴内に溶け込んだオクテノール濃度を示す。液滴内のオクテノール濃度の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。これを見ると、オクテノールを含む窒素ガスを導入すると液滴内のオクテノール濃度が上昇するが、窒素ガスのみを導入すると液滴内のオクテノール濃度が低下することがわかる。この結果は、筆者らが提案する匂い導入機構を用いることで難水溶性のオクテノールを水溶液中に導入・排出することが可能であることを示唆しており、これまでバイオハイブリッドセンサーでは難しかった匂い濃度の逐次モニタリングの実現が期待される。加えて、本センサーデバイス内に人工細胞膜を 16 個並列化することで、10 分以内に 90% 超の確度でオクテノールを検出できることも示した。

3 呼気診断

続いて、この嗅覚受容体を再構成したバイオハイブリッド匂いセンサーを呼気診断に利用するための実証実験を行った(次頁図 5a)。この呼気検知測定では、ガス採取バックに採取した呼気をデバイス内に導入し、電流シグナルを計測した。採取バックに呼気のみを封入した場合の電流応答では図 3 (b) と同じくほとんどシグナルを示さなかった一方で、呼気採取後にオクテノールを混合した場合の電流応答では図 3 (c) と同様の矩形波状のシグナルを示した。また、オクテノール

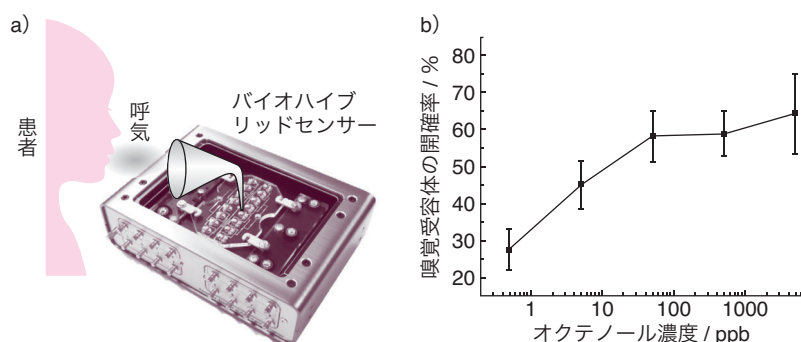


図5 匂いセンサーによる呼気診断

a) 呼気中の匂い分子を観測する実証実験の模式図。
b) オクテノールガス濃度と匂いセンサーの電流応答の関係。ともに文献 11 より改変して掲載。

ル濃度と矩形波状の電流シグナルから導かれるこのデバイスに組み込まれた嗅覚受容体の開確率との関係を電流ヒストグラムから調べたところ、オクテノール濃度に応じて開確率が上昇することがわかった (図 5b)。オクテノールは肝臓がんのマーカーとしても報告されており¹⁴⁾、本結果は、約 3000 種類もの代謝物が含まれるといわれる呼気から、わずか ppb レベル (ppb は体積比でガス濃度の 10 億分の 1 を示す単位) のマーカーを嗅ぎ分けられたことを示している。

本稿では、生物がもつ優れた匂いセンシング能力を利用したバイオハイブリッドセンサーについて概説し、蚊の嗅覚受容体を利用したバイオハイブリッドセンサーについて紹介した。マイクロ流路を用いたガス導入機構により、従来のセンサーでは困難だった難水溶性の匂い分子を気相から直接検出することに成功し、嗅覚受容体が本来もっている高い感度と選択性により、呼気に混合した微量の肝臓がんマーカーを検出できることを実証できた。将来的には、センサーデバイスに複数種類の嗅覚受容体を組み込み、多数の匂い分子を判別する匂いセンサーへと展開できると筆者らは考えている。このように複数種類の嗅覚受容体を利用することで、複雑な匂いの識別や認識が可能になっていこう。感度や分子識別能力で従来技術を凌ぐ次世代の匂いセンサーが実現できれば、高度な呼気・体臭診断や、環境評価、危険物検知などへの応用につながっていくと考えられる。

参考文献

- 1) P. L. Jones, G. M. Pask, D. C. Rinker, L. J. Zwiebel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8821 (2011). 2) V. Jacquier, M. Prummer, J.-M. Segura, H. Pick, H. Vogel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14325 (2006). 3) J. A. Butterwick, J. del Mármol, K. H. Kim, M. A. Kahlson, J. A. Rogow, T. Walz, V. Ruta, *Nature*, **560**, 447 (2018). 4) N. Misawa, H. Mitsuno, R. Kanzaki, S. Takeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15340 (2010). 5) 渋谷達明, 外池光雄 編著, 『においの受容』, フレグランスジャーナル社 (2002).

- 6) R. N. Gillanders, J. ME. Glackin, Z. Babić, M. Muštra, M. Simić, N. Kezić, G. A. Turnbull, J. Filipi, *Chemosphere*, **273**, 129646 (2021). 7) T. Hirotsu, H. Sonoda, T. Uozumi, Y. Shinden, K. Mimori, Y. Maehara, N. Ueda, M. Hamakawa, *PLoS One*, **10**, e0118699 (2015). 8) Y. Hirata, Y. Morimoto, E. Nam, S. Takeuchi, *Lab on a Chip*, **19**, 1971 (2019). 9) R. Khadka, C. Carraher, C. Hamiaux, J. Travas-Sejdic, A. Kralicek, *Biosens. Bioelectro.*, **153**, 112040 (2020). 10) O. S. Kwon, H. S. Song, T. H. Park, J. Jang, *Chem. Rev.*, **119**, 36 (2019). 11) T. Yamada, H. Sugiura, H. Mimura, K. Kamiya, T. Osaki, S. Takeuchi, *Sci. Adv.*, **7**, eabd2013 (2021). 12) K. Funakoshi, H. Suzuki, S. Takeuchi, *Anal. Chem.*, **78**, 8169 (2006). 13) N. Misawa et al., *ACS Sensors*, **4**, 711 (2019). 14) R. Xue, L. Dong, S. Zhang, C. Deng, T. Liu, J. Wang, X. Shen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 1181 (2008); H. Haick, Y. Y. Broza, P. Mochalski, V. Ruzsanyi, A. Amann, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 1423 (2014).

やまだ・てつや ● 東京工業大学科学技術創成研究院未来産業技術研究所助教, 2018 年東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了, 博士 (工学), <研究テーマ> ナノ粒子, バイオセンサー
おおさき・としひさ ● 神奈川県立産業技術総合研究所人工細胞膜システムグループ サブリーダー, 2002 年東京工業大学大学院総合理工学研究科博士課程修了, 博士 (工学), <研究テーマ> 膜タンパク質機能解析やそのセンサー応用
たけうち・しょうじ ● 東京大学大学院情報理工学系研究科/同大学生産技術研究所教授/同大学国際高等研究所ニューロインテリジェンス国際研究機構主任研究者, 神奈川県立産業技術総合研究所人工細胞膜システムグループ グループリーダー, 2000 年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了, 博士 (工学), <研究テーマ> 三次元組織構築, 体内埋め込み型デバイス, 人工細胞膜, 培養肉など