

論文の内容の要旨

論文題目: 神経細胞の分散培養系に嗅覚受容体を発現させた匂いセンサーの開発

氏名: 棚田法男

指導教員 高橋宏知 講師

Norio TANADA

(Professor, Hirokazu TAKAHASHI)

Keywords: Biosensor, Odorant receptor, Dissociated culture, Pheromone, Calcium imaging

1. はじめに

近年、匂いバイオセンサーの開発が注目されている。その背景として、匂いの品質管理や評価は、人の感覚による官能評価によるため、嗅覚疲労や低い再現性に問題点を有する。現在までに実用化されている代表的な匂いセンサーには、金属酸化膜半導体、導電性高分子、水晶振動子などが利用されている。しかし、これらの性能は、生体の嗅覚系と比べると、感度、識別できる匂いの種類、及び応答時間の点で大きく劣る。

このような問題点を克服するために、生体材料を感材料として利用した匂いセンサーの開発が試みられている。これらの生体材料を用いた匂いセンサーは、従来の匂いセンサーと比べ、感度・応答時間で優れているが、センサー寿命が数時間～数日程度と非常に短いことに欠点を有する。この主な原因は、生体材料である細胞や組織の寿命が短いことにある。

2.

神経細胞の分散培養系に嗅覚受容体を発現させた匂いセンサーの提案

本研究では、生体材料を利用した長寿命のセンサーを実現するために、昆虫の嗅覚受容体をラットの培養神経細胞へ発現させることを提案する。

昆虫の嗅覚受容体を用いる利点は、容易に機能発現を実現できる可能性が高いことにある。これは、昆虫の嗅覚受容体がイオンチャネルと一体型であるという最近の知見による。一方、哺乳類の嗅覚受容体は G タンパク質結合型で、匂い物質の受容部とイオンチャネル部が分離している。そのため、イオンチャネルを開くためには、複雑な細胞内カス

ケードを経なくてはならない。

本研究は昆虫の嗅覚受容体として、カイコガ *Bombyx mori* のフェロモン受容体に注目した。同受容体の機能は、アフリカツメガエル卵母細胞で詳細に調べられている。カイコガのフェロモン受容体は BmOR1 と BmOR3 の 2 種類で、それぞれ、フェロモン物質のボンピコールとボンピカールに対して高い選択性を示す。なお、これらの受容体は、共受容体の BmOR2 と複合体を形成し、非選択的陽イオンチャネルとして働く。

また、本研究は、嗅覚受容体を導入する培養細胞として、神経細胞の分散培養系を用いる。その利点として、第一に、神経細胞の寿命は通常の細胞より長いため、センサーの寿命を長期化できる可能性がある。神経細胞の多くは、一個体の一生を通して置き換わらないため、個体と同程度の寿命を有する。実際に、ラット培養神経細胞は 1 年以上の寿命を保持できることがわかっている。一方、通常の細胞は、一個体の一生を通して何度も置き換わるため、数日から数週間と比較的短い寿命しかもたない。第二の利点として、神経細胞は、嗅覚受容体が発生した微弱なイオン電流から、容易に計測できる活動電位へと、匂い信号を増幅するプリアンプとして利用できる。これまでも、神経系の細胞の分散培養系をプリアンプとして利用したバイオセンサーはいくつか提案されている。しかし、嗅覚受容体を遺伝子工学的に発現させ、通常では反応しない物質に対して、反応特性を持たせた試みはない。

本研究では、昆虫の嗅覚受容体をラットの培養神経細胞へ発現させた匂いバイオセンサーを提案し、その実現可能性を示す。具体的には、まず初めに、嗅覚受容体が細胞膜上で発現していることを確認するために、共焦点

顕微鏡(LSM510, Zeiss)による蛍光観察を行った。次に、免疫化学染色を用いた蛍光観察によってトランスフェクション効率を見積もった。さらに、RT-PCR 反応により m-RNA レベルでの嗅覚受容体の発現を確認した。最後に、Ca イメージングにより、発現した嗅覚受容体が機能的であるかを調べた。

3. 方法

〈3・1〉トランスフェクション

トランスフェクションにはリポフェクション法を試みた。プラスミド DNA と lipofectamine 2000 (Invitrogen(株)) をそれぞれ低血清培地 Opti-MEM (Invitrogen(株)) に溶解し、室温で 5 分インキュベートした。その後、それらを混合し、さらに 15 分インキュベートした。培養 7 日目の神経細胞から 6 割の培地を取り除き、そこへ DNA と Lipofectamine2000 の混合液を滴下し、攪拌した。DNA ベクター、pEF-EGFP-BmOR1 と pEF-DsRED-BmorOrco は同時にトランスフェクションした。

〈3・2〉DNA ベクター作成

終始コドンを除いた EGFP は、制限酵素 *EcoRI* と *NotI* を含む特異的プライマーを用いて PCR により増幅した。増幅した部位は *EcoRI* と *NotI* で切り取り、pEF-EGFP の制限酵素切断部位へ導入した。続いて、BmOR1 と BmorOrco をそれぞれの遺伝子配列を含む pBluescript SK から制限酵素 *NotI* と *XbaI* を含む遺伝子特異的プライマーを用いて PCR によって増幅し、pEF-EGFP の制限酵素切断部位へ導入することで、N 末端に EGFP たんぱく質を融合させた BmOR1 と BmorOrco、pEF-EGFP -BmOR1 と pEF-EGFP-BmorOrco をそれぞれ作成した。

終始コドンを除いた DsRED は、制限酵素 *EcoRI* と *NotI* を含む特異的プライマーを用いて pCMV-DsRed-Express Vector (Takara, 6324 16)か PCR により増幅した。増幅した部位は *EcoRI* と *NotI* で切り取り、pEF-EGFP の制限酵素切断部位へ導入した。続いて、BmorOrco を PCR によって増幅し、pEF-DsRED の制限酵素切断部位へ導入することで、N 末端に DsRED たんぱく質を融合させた pEF-DsRED-BmorOrco を作成した。

pEF-BmOR1 と pEF-BmorOrco を作出するために、BmOR1 と BmorOrco のコード領域を制限酵素 *KpnI* と *XbaI* を含む遺伝子特異的プライマーを用いて PCR により増幅した。増幅した断片は制限酵素 *KpnI* と *XbaI* で処理し、pEF-EGFP の制限酵素切断部位へ導入した。

〈3・3〉カルシウムイメージング

培養 10 日目に、BmOR1 と BmorOrco を共発現している細胞がフェロモン物質に対し機能的であるかどうか、確認するため、Ca イメージングを行った。カルシウム感受性色素として、EGFP との蛍光波長の重複が少ない X-Rhod1 AM (Invitrogen(株)、X14120)を用いた。神経細胞を 37°C で 1 時間、4 μ M の X-Rhod1 AM を含む平衡塩溶液 (NaCl 130 mM、グルコース 5.5 mM、KCl 5.4 mM、CaCl₂ 1.8 mM、HEPES 20 mM、pH 7.4) 中でインキュベートした。1 時間後、培地を X-Rhod1 を含まない平衡塩溶液へと交換し、さらに 37°C で 30 分インキュベートした。

カルシウム感受性色素の蛍光は、正立顕微鏡 (オリンパス(株)、BX51WI) に取り付けられた 10 倍レンズ(Olympus, UPlanF1)と冷却 CCD カメラ (浜松ホトニクス(株)、C9100-02) で計測した。計測視野は 400 \times 400 μ m で、同視野を 500 \times 500 pixel で計測した。また、蛍光画像は 2 \times 2 pixel 毎に平均し、14 bit color で測定した。各フレームの露光時間は 1 s とし、90s 測定した。カルシウム感受性色素の蛍光強度変化は、HiPic 8.1.0(浜松ホトニクス(株))と Python で作成したコードを用いて解析した。

フェロモン刺激には、実験直前に、1M の DMSO に溶解したフェロモン溶液を BSS で希釈し適切な濃度に調整した。フェロモン物質は、マイクロピペットの先端から 30s 投与した。

4. 結果

Fig.1(a)(i)と(ii)は pEF-EGFP-BmOR1 と pEF-DsRED-BmorOrco を共導入した神経細胞の蛍光画像を示した。重ね合わせた画像 Fig.4(a)(iii)は EGFP の蛍光パターンと、DsRED の蛍光パターンがほとんど一致していることを示し、BmOR1 と BmorOrco が高確率で共発現していることを示唆する。さらに、

共焦点顕微鏡を用いたトランスフェクションした細胞の蛍光観察 (Fig.1(b)(i-iii)) では、BmOR1 と BmorOrco の共発現が明確に確認できる。また、これらの受容体は細胞膜上へ移行していることが観察され、機能的な発現をしていると考えられる。

Fig.1(b)に各 DNA コンストラクトの導入効率を示す。EGFP-BmOR1+ BmorOrco では 8%、BmOR1+ EGFP- BmorOrco では 12%程度の導入効率になった。

Fig.1(d)には EGFP、 BmOR1 と BmorOrco の特異的プライマーを用いて、RT-PCR 反応を行った結果を示した。

EGFP、 BmOR1 と BmorOrco のバンドはトランスフェクションした細胞には確認され、トランスフェクションしていない細胞には確認されなかった。この結果は、EGFP、 BmOR1 と BmorOrco それぞれの遺伝子がトランスフェクションした細胞で発現していることを示す。

Fig.2(a)は位相差顕微鏡画像と EGFP の蛍光画像を重ね合わせた画像で、これらの神経回路に対して Ca イメージングを行った。

Fig.2(b)は、マイクロピペットで局所的に 100 μ M の BOL(Bombykol)を EGFP 蛍光ポジティブな細胞；すなわち細胞#1 にたいして投与した場合の匂い応答のカルシウムイメージ画像である。Fig.2(c)(i)は、複数回の BOL の投与に対して、細胞#1 が高い再現性で 50%以上のカルシウム応答を示していることを示している。

一方で、Fig.2(c)(ii)に示したように、通常の BSS を投与した場合、細胞#1 はカルシウム応答を示さなかった。これらの結果は、細胞#1 のカルシウム応答は機械刺激によって誘発されておらず、BOL によって誘発されたことを示す。最後に、50- μ M のグルタミン酸投与後、カルシウム応答が示され、細胞#1 の生存を確認した (Fig.2(c)(iii))。

Fig. 2 (d)には、Fig.2(b)で EGFP 蛍光ポジティブな細胞#1 に加え、EGFP 蛍光ネガティブな細胞；すなわち細胞#2~#10 までのカルシウム応答の経時的な変化を示した。細胞#1 を除き、EGFP 蛍光ネガティブであるにもかか

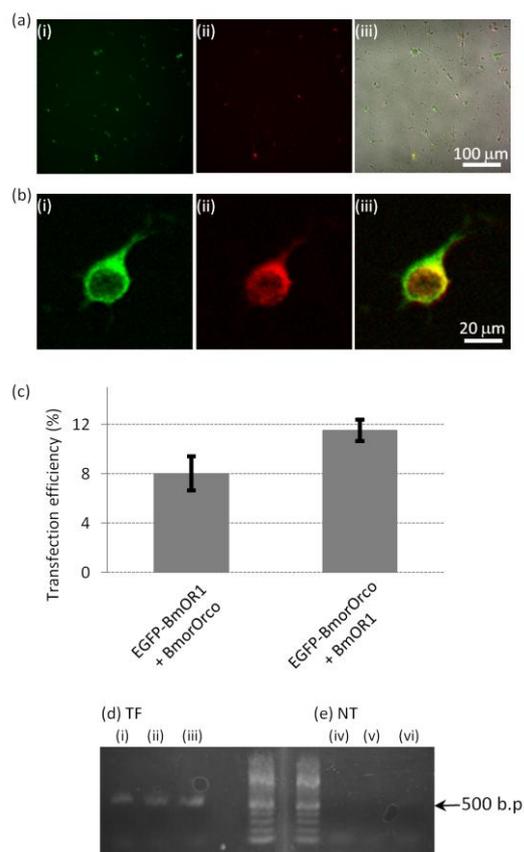


Fig. 1 Transfection of odorant receptors.

(a) Fluorescent microscopic observation of a neuronal culture co-transfected with pEF-EGFP-BmOR1 and pEF-DsRED-BmorOrco constructs: (i) EGFP, (ii) DsRED and (iii) overlaid image. (b) Direct confocal observation of a living transfected neuronal cell with BmOR1 and BmorOrco targeted onto the plasma membrane. (c) Transfection efficiency of odorant receptors RT-PCR.(d) Transfected cells (TC); (e) non-transfected cells (NT): (i), BmOR1; (ii), BmorOrco; (iii), EGFP. The bands at 600 b.p. indicate the presences of mRNA of BmOR1, BmorOrco and EGFP, respectively. Two lanes at the center are size markers.

わらず、これらの細胞は複数回の BOL の投与に対して、同期的なカルシウム応答を示した。それゆえに、嗅覚受容体を導入した神経活動がシナプス結合を介して、導入されていない神経細胞へと活動を伝搬させたと推測できる。

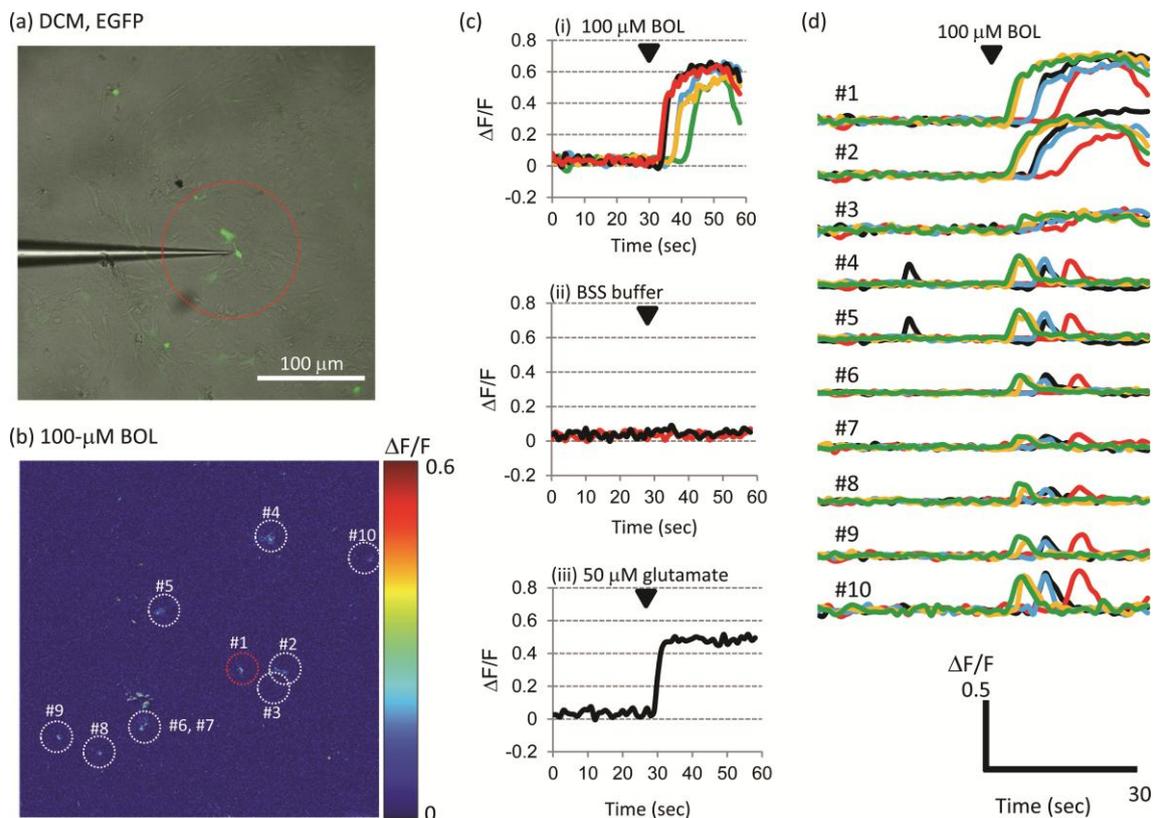


Fig. 2 Ca⁺⁺ imaging in response to odorant stimulation.

(a) Neuronal culture under test. BmOR1, BmorOrco and EGFP were simultaneously co-transfected onto this culture. A differential interference contrast microscopic view (DCM) and EGFP fluorescent view were overlaid. (b) Spatial pattern of Ca⁺⁺ signal in response to 100-μM bombykol (BOL). Odorant responsive cells (#1 – #10) were labeled. BOL was administered to Cell #1 (red circle). Ca⁺⁺ signals were quantified as fractional changes of fluorescence ($\Delta F/F$). (c) Time courses of Ca⁺⁺ signal in cell #1. Triangles indicate the time of administration of test substances: (i), 100-μM bombykol (BOL); (ii), BSS; (iii), 50-mM glutamate. Each trajectory is obtained from different trials. (d) Time courses of Ca⁺⁺ signal in cells #1 – #10. Only cell #1 was GFP-positive, while others cells (#2 – #10), negative.

5. 考察

本研究でトランスフェクションに用いたリポフェクション法は、ウイルスフェクション法に比べ導入効率は劣る。しかしながら、リポフェクション法を用いる利点は、簡便であること、迅速であること、及び細胞へのダメージが低いことである。HEK-293細胞などの、神経細胞以外の細胞を用いたセンサーでは、高導入効率が必要である。一方で、本研究で提案するセンサーでは、8%の導入効率は十分に高いと考える。すなわち、低導入効率でも、嗅覚受容体を導入した細胞の活動がシナプス結合を通じて神経回路の活動パターンに増幅される。

6. おわりに

本研究では、初めに共焦点顕微鏡によって、嗅覚受容体が細胞膜へ移行していることを示した(Fig.1)。第二に、免疫化学染色を用いた蛍光観察によってトランスフェクション効率を8%程度と見積もった(Fig.1)。第三に、RT-PCR反応によりm-RNAレベルでの嗅覚受容体の発現を確認した(Fig.1)。最後に、Caイメージングにより、発現した嗅覚受容体が機能的であることを示した(Fig.2)。これらの結果は提案した匂いセンサーの実現可能性を示す。