

論文の内容の要旨

論文題目 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイ

氏名 平田 優介

1. 序論

本研究の目的は、異なる嗅覚受容体を個々に発現した細胞が内包されたゲルのアレイを構築し、匂いに対するアレイの応答をパターンとして認識することで複数種類の匂い物質を検出できることを示すことである。

生体が匂いを高感度、高選択に検出できることから、その機能に着目し、細胞を使った匂いセンサが開発されてきた。なかでも、複数の匂い物質に対応するために嗅覚受容体を発現した細胞をアレイ化するという試みがあり、複数種類の細胞で、単独の匂い物質や混合した匂い物質を検出できることが示されている。しかしながら、検出する匂い物質は嗅覚受容体と一対一で対応したものであり、生体のようにシグナルをパターンとして処理するようなものはなかった。そこで、現在分かっている嗅覚受容体のデータベースより、組み合わせで使用できる嗅覚受容体及び匂い物質を選定し、センサとした。これにより、嗅覚受容体の数以上の匂い物質を識別することが可能となり、匂いセンサの応用性が広がると考えられる。

本研究では、細胞をハイドロゲルにより包埋し、評価用ゲルを作製することで、ゲル内の細胞が匂い物質に応答することを確認する。また、同時に蛍光を厚み方向に蓄積し細胞のシグナル増強を行う。レンズには被写界深度があり、焦点面の前後の光もイメージセンサに伝えることができるためである。従来の平面培養では焦点面一層の細胞からの光をシグナルとしていたものの代わりに積み重なった複数の細胞からの光をシグナルとして得ることで、蛍光輝度を増強することができる。さらに、細胞含有のハイドロゲルを逐次積層することにより、厚みでシグナルを増強するという利点を残しながら

らも、作製にフォトリソグラフィによるマスクの作成など、専門的な道具を必要とせず、かつ細胞にダメージを与えずアレイ化を行う。アレイ化した2つの嗅覚受容体を用いて、それぞれどちらかひとつの受容体が反応するものと、両方の受容体が反応するものの3種類の匂い物質の分類を目指す(図1)。

2. 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイの作製

PDMSで評価用ゲルのためのモールドを作製し(図2)、嗅覚受容体細胞を懸濁したハイドロゲルをこのモールドにつめ、ガラスプレートに貼り付けることで円柱状の評価用ゲルを作製した。この評価用ゲルがシグナルを増強して携帯型のセンサで計測できることを示すために、webカメラをベースにした携帯型センサを作製した(図3)。また、積層ゲルアレイの作製には、ゲルをガラスプレートの上に滴下した後、スペーサーを介して上からガラスプレートで押さえつけ、氷で温度を低下させることでゲルを硬化し、この工程を繰り返した。

3. 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイの評価

評価用のゲルに関して形状を計測したところ、標準偏差を平均値で除した変動係数(CV)が5%以内と均一に作製できており(図4)、評価に適していることが確認された。また、厚みをかえて蛍光のシグナルをとったところ厚みによってシグナルが増強されることが確認された(図5)。このことから、厚みをもたせることで、識別できる匂い物質の数が増加する効果が期待できる。さらに、匂い物質を添加したところゲル内でも細胞が定量性(図6)と選択性(図7)を失わずに応答することが確認された。次に、細胞が積層ゲルアレイに関して形状を評価したところ、層の厚みは均一であり、層間のコンタミネーションが生じていないことが確認された。また作製した8層の積層ゲルアレイを3つ重ね合わせることで最大24層のアレイを作製した。Or98a及びOr47aを使用して作製した積層ゲルアレイ(図8)に、ペンチルアセテート、ヘキシルアセテート、メチルベンゾエートを添加したところ、ペンチルアセテートではOr98a及びOr47aの両方が、ヘキシルアセテートではOr47aが、メチルベンゾエートではOr98aが反応することが確認された。

4. 結論

本研究では細胞をハイドロゲル内に包埋してアレイ化する方法を構築し、この包埋によって立体的に配置された細胞から発せられた蛍光が厚み方向に累積し、増強されることを示した。また、このアレイを用いて、複数種類の細胞の匂いに対する応答をパターンとして認識することで、複数種類の匂い物質が識別できることを示した。これらの結果から、本研究の積層ゲルアレイは匂いセンサの開発に貢献すると期待できる。

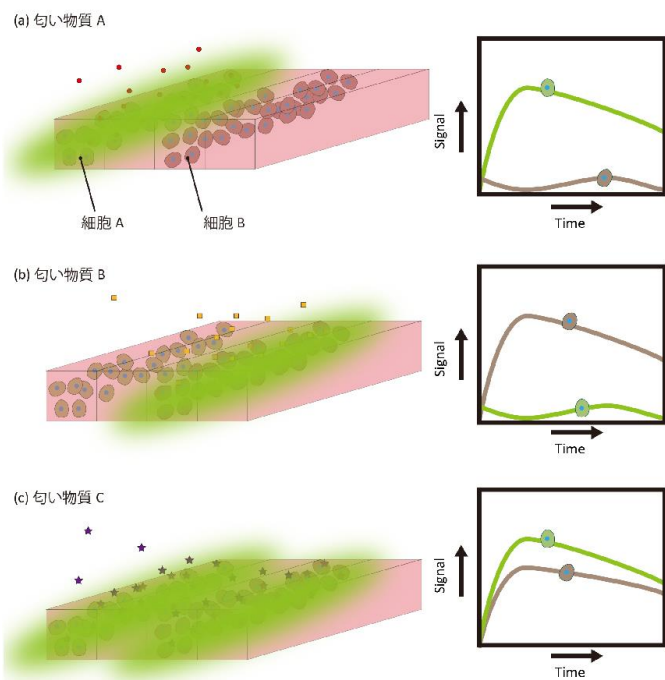


図 1. 本研究のコンセプト

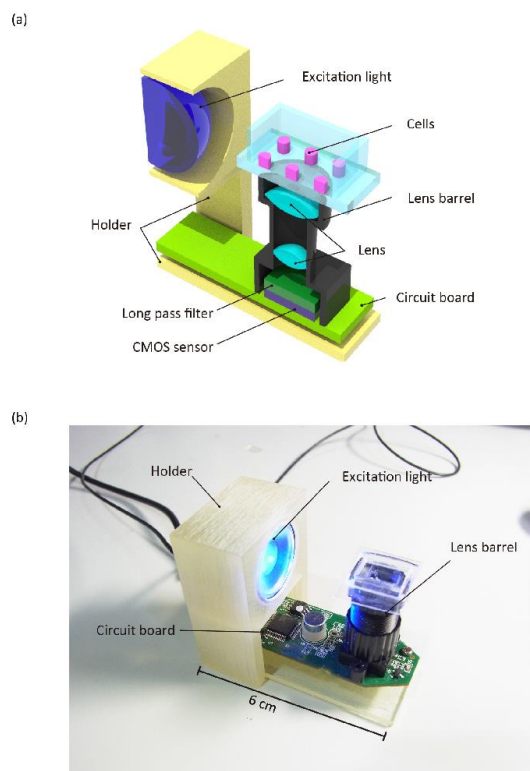


図 3. 携帯型センサの作製

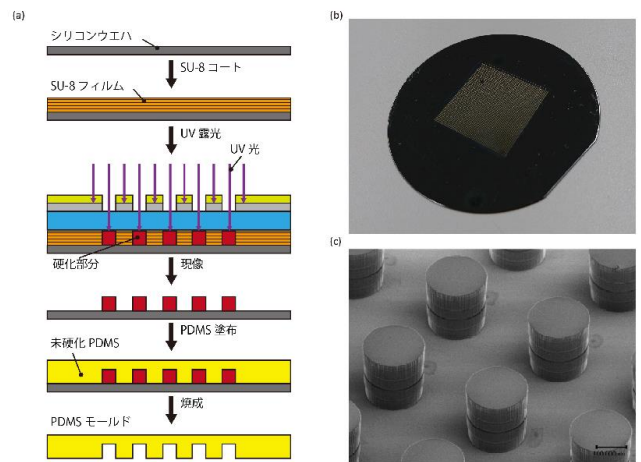


図 2. PDMS モールドの作製方法

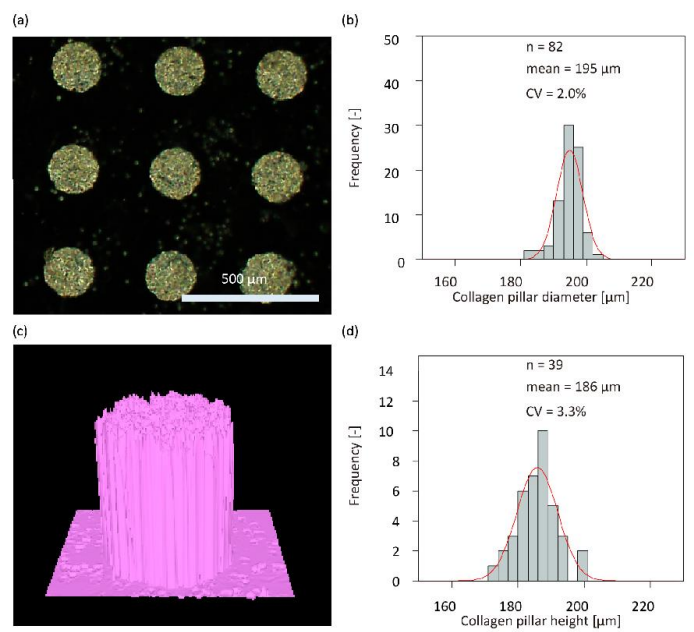


図 4. 評価用ゲルの形状評価

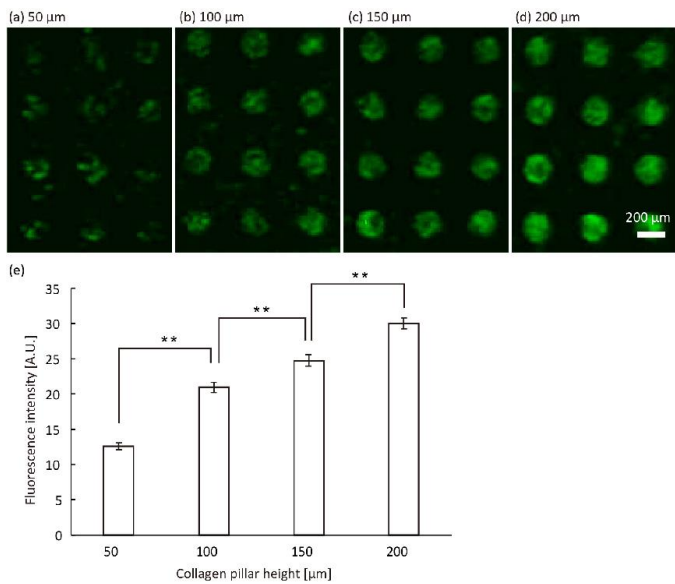


図 5. 厚みによる蛍光シグナルの強度変化

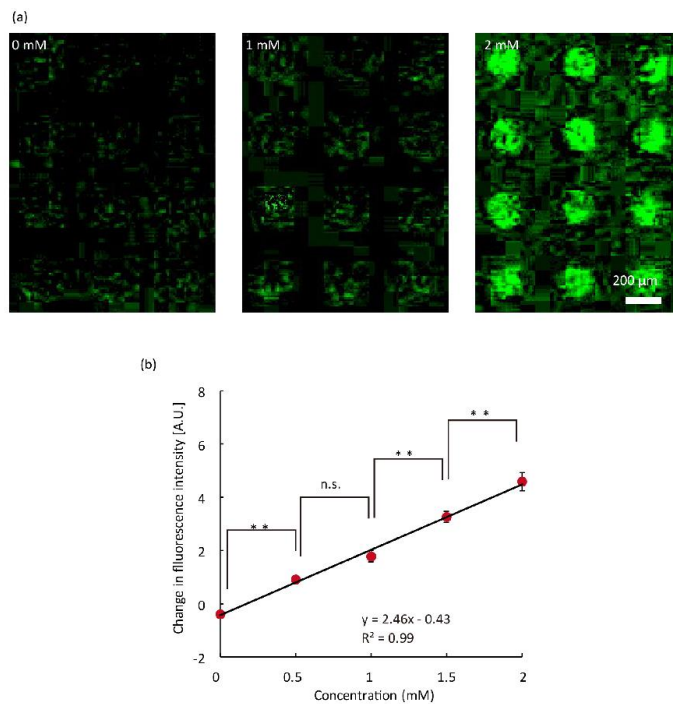


図 6. 匂い物質の濃度に対する評価用ゲルの応答変化

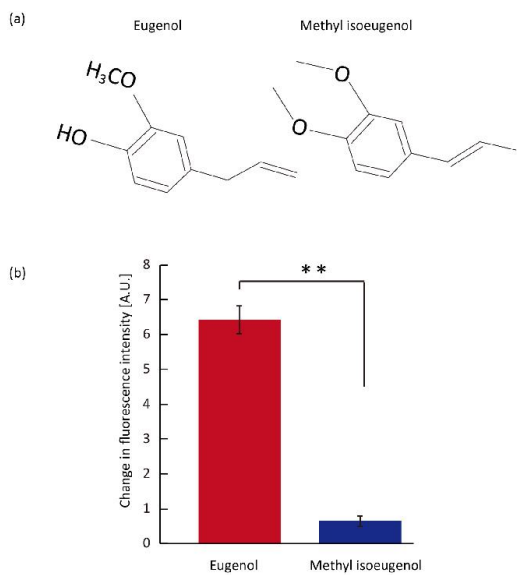


図 7. 評価用ゲルの選択性評価

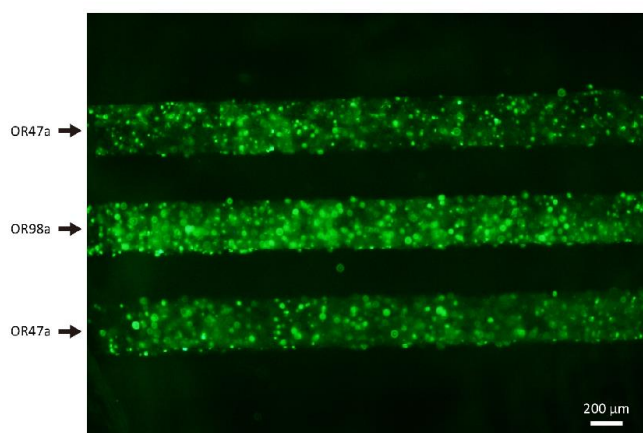


図 8. 積層ゲルアレイ