

博士論文(要約)

嗅覚受容体発現細胞を用いた
匂いセンサアレイ

平田 優介

目次

第1章 序論

1.1	本研究の目的と意義	4
1.2	研究の背景と従来研究	5
1.2.1	生体における匂いの検出	5
1.2.2	生体材料を使った匂いセンサの種類	6
1.2.3	細胞のシグナル検出方法	9
1.2.4	生物学的シグナル増強	11
1.2.5	細胞を用いた匂いセンサアレイ	12
1.3	本研究の提案手法	15
1.3.1	ゲル積層による匂いセンサアレイ	15
1.3.2	匂いセンサの研究開発における本研究の位置づけ	19
1.4	本論文の構成	19

第2章 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイの作製

2.1	緒言	20
2.2	嗅覚受容体データベース分析	20
2.2.1	探索的データ分析	20
2.2.2	匂い物質の選定	24
2.3	匂いセンサの設計論	25
2.3.1	ゲルの要求仕様	25
2.3.2	ゲル内の匂い物質拡散モデル	28
2.4	細胞培養	31
2.4.1	哺乳動物細胞	31
2.4.2	昆虫細胞	32
2.4.3	遺伝子調製	32
2.5	遺伝子発現確認	34
2.5.1	免疫染色	34
2.5.2	カルシウムイメージング	34
2.6	評価用ゲルの作製	34
2.6.1	カラーゲンを用いた評価ゲルの作製	34
2.6.2	GelMAによる評価用ゲルの作製	37
2.7	ゲル積層による匂いセンサアレイの作製	40
2.7.1	細胞入りゲルの調製	40
2.7.2	滴下法による匂いセンサアレイの作製	40
2.7.3	挟み込み法による匂いセンサアレイの作製	42
2.8	観察デバイスの作製	44
2.8.1	携帯型観察デバイス	44
2.8.2	スマートフォン型観察デバイス	44
2.9	積層ゲルアレイの匂い応答評価	51
2.9.1	濃度に対する応答評価	51
2.9.2	再利用性の評価	51

2.9.3	気相匂い物質に対する応答	52
2.9.4	匂いセンサアレイによる3種類の匂い物質検出	53
2.10	結言	54
第3章 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイの評価		
3.1	緒言	56
3.2	遺伝子導入細胞の評価	56
3.2.1	嗅覚受容体発現哺乳動物細胞の匂い物質に対する応答確認	56
3.2.2	昆虫細胞の免疫染色による嗅覚受容体発現確認	59
3.2.3	カルシウムイメージングによる昆虫細胞の匂い物質応答評価	61
3.3	ゲルの作製方法評価	64
3.3.1	評価用ゲルの外形計測	64
3.3.2	評価用ゲルの高さとう光輝度変化	66
3.3.3	スマートフォン型センサによる観察	67
3.3.4	移動時のノイズ評価	70
3.3.5	GelMA硬化時間の最適化	74
3.3.6	GelMA円柱アレイ	76
3.3.7	アガロースゲル濃度による細胞の生存率	77
3.3.8	生体用ボンドが与える細胞への影響	77
3.3.9	積層ゲルの形態	78
3.3.10	積層ゲルの寿命評価	81
3.4	ゲルの応答評価	85
3.4.1	評価用ゲルの匂い物質応答	85
3.4.2	携帯型センサによる評価用ゲルの匂い物質応答	85
3.4.3	匂い物質の濃度に対する応答の変化	85
3.4.4	選択性の評価	88
3.4.5	スマートフォン型センサによる評価用ゲルの匂い物質応答	89
3.4.6	GelMA評価用ゲルの匂い物質応答	89
3.4.7	異なる濃度に対する積層ゲルアレイの反応	89
3.4.8	積層ゲルを用いた匂いセンサの再利用性	91
3.4.9	積層ゲルアレイを用いた気相検出	91
3.4.10	積層ゲルを用いた匂いセンサアレイの匂い物質応答	95
3.5	結言	97
第4章 結論		
4.1	結論	100
4.2	今後の展望	101
参考文献		103
付録A 薬品、培地		110
付録B 円柱検出のためのプログラム		112
付録C ブラスミドの配列		114
付録D 業績一覧		117
謝辞		120

第 1 章

序 論

1.1 本研究の目的と意義

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。

従来手法では、検出する匂い物質の数が受容体の数にとどまっていたが、細胞をアレイ化し、反応を組み合わせることで、受容体の数を超える匂い物質の検出を実現する。将来、この技術の発展により、環境中に存在する無数の匂い物質を分類できるようになると期待できる。

匂いは揮発性有機化合物であり、低分子で揮発しやすく気体として環境中に存在している。例えばバラはその香気からガスクロマトグラフィーによって数十種類もの匂い物質を検出される。このように一つの匂いは複数の匂い物質によって構成されており、数万種類の匂い物質が存在するとされている。しかしながら、動物は数百から千種類ほどの受容体しか持っていない。そこで匂い物質と受容体を一対一で対応させるのではなく、複数の匂い物質が複数の受容体を励起することで、パターンとして認識することができる。このメカニズムによって人はおよそ 500 種類ほどの嗅覚受容体でも、数万種類の匂いが識別できると推定されている。このような生体の機能に着目し、

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統合して処理するようなものはなかった。そこで、現在わかっている嗅覚受容体のデータベースより、組み合わせて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。

1.2 研究の背景と従来研究

1.2.1 生体における匂いの検出

哺乳動物が匂いを吸い込むと、匂い物質は空気と一緒に鼻腔に吸い込まれ、鼻甲介に到達する。鼻甲介に存在する粘膜に匂い物質が溶け込み、嗅覚神経細胞に匂い物質が結合すると発火する。この神経細胞は一つの細胞には一種類の匂い受容体しか発現しないため、興奮した細胞によってどの匂い物質に反応しているか区別することができる。また、同じ種類の匂い受容体位を発現する細胞は、脳に存在する嗅球に接続されている。この嗅球は基本的に嗅覚受容体一種に対して脳の左右に1つずつ存在し、同じ種類の嗅覚受容体からの信号が集約される。動物はこの嗅球の信号の組み合わせにより匂いを識別していると考えられている。昆虫も似た仕組みを持っており、昆虫の嗅覚受容体細胞が発火すると、触角葉とよばれる部分にそれぞれの細胞からのシグナルが集積され、より高次の脳へと伝達される (Su, Menuz and Carlson, 2009)(Fig. 1.1)。この高感度、高選択である生物の匂い検出の仕組みを取り出して活かそうと試みられている。

1.2.2 生体材料を使った匂いセンサの種類

生体材料を使ったセンサは生物そのものを使用するセンサから、細胞やタンパク質といったパーツを精製して使用するセンサまで様々である。その精製の度合いに応じ

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする。

Fig. 1.1 生物による匂いの検出 (Su, Menuz and Carlson, 2009) ©Elsevier 2009 哺乳動物は嗅球に、昆虫は触角葉に信号が集約されより高次の脳でパターン認識されている

てセンサを分類し比較する (Table 1.1)。

生物センサ

古くから試みられているのは、動物そのものを訓練して匂いを発見する方法である。日本では 1979 年に麻薬探知犬がアメリカより導入された (日本税関 :<https://www.customs.go.jp/mizugiwa/maken/maken.htm>)。その他にも爆発物探知犬や銃器探知犬が空港や郵便局で活躍している。近年では、ガンの検査を目的としたガン探知犬など病気の診断に注目が集まっている (Willis et al., 2004)。また、訓練に用いられるのは犬だけではなく、アフリカでは地雷探知を目的として、ラットの訓練が行われている (Edwards et al., 2015)。これは、優れたラットの嗅覚と、地雷を踏んでも爆発しない体重の軽さに目をつけたものである。この他にも、蛾のフェロモンを感知する受容体のプロモーター下流に他の嗅覚受容体を配置することで、その嗅覚受容体に蛾が誘引される生物センサも提案されている (Sakurai et al., 2011)。しかしながら、生物を使うためには、訓練の期間やコスト、定量性の問題がある。

組織を使ったセンサ

生体組織を取り出し、センサにするという試みは匂いセンサの初期から行われてきた。マウスの嗅上皮や昆虫のアンテナを取り出してきて、電極につないだり (Park et al., 2002)(Liu, Ye, Xiao, et al., 2010)(Liu et al., 2012)(Corcelli et al., 2010)(Xu, Lu and Pang, 2019)、LAPS で計測するという方法 (Liu, Ye, Yu, et al., 2010)(Liu, Ye, Hu, et al., 2010) である。これは、生体が発する信号をそのまま検出できるため、複雑なインプットを受けられることができるが、アウトプットがシグナルの強弱でしかわからず、また生物の個体差が生じるという問題があった。さらに、センサ数を増やすには、その分動物が必要となるため、センサ数を増やすのが難しかった。

細胞を使ったセンサ

組織から細胞単位にばらして、センサの素子にする方法 (Corcelli et al., 2010)(Ling et al., 2010)(Wu et al., 2009)(Datta-Chaudhuri et al., 2016)(Du et al., 2015)(Figuroa et al., 2010)(Xu, Lu and Pang, 2019)(Du et al., 2013)(Tanada et al., 2012)(Suzuki et al., 2016)(Corcelli et al., 2010) や、遺伝子導入をして、匂いに応答する細胞を作る方法が提案されており、哺乳動物細胞 (Sato and Takeuchi, 2014)(Lee et al., 2009)(Lee, Ko and Park, 2009)(Du et al., 2013)(Hirata et al., 2019)(Suzuki et al., 2016)(Lee, Oh and Park, 2015)(Oh et al., 2014)

Table 1.1 生体材料を用いた匂いセンサの例

組織	アンテナ	電位	Park <i>et al.</i> , 2002	
	嗅上皮	電位	Liu, Ye, Xiao, <i>et al.</i> , 2010	
			Liu <i>et al.</i> , 2012	
	嗅上皮	LAPS	Corcelli <i>et al.</i> , 2010	
Xu, Lu and Pang, 2019				
嗅上皮	LAPS	Liu, Ye, Yu, <i>et al.</i> , 2010		
		Liu, Ye, Hu, <i>et al.</i> , 2010		
細胞	プライマリー	電位	Corcelli <i>et al.</i> , 2010	
			Ling <i>et al.</i> , 2010	
			Wu <i>et al.</i> , 2009	
			Datta-Chaudhuri <i>et al.</i> , 2016	
			Du <i>et al.</i> , 2015	
			Figuerola <i>et al.</i> , 2010	
			Xu, Lu and Pang, 2019	
	プライマリー	LAPS	Du <i>et al.</i> , 2013	
	プライマリー	カルシウムイメージング	Tanada <i>et al.</i> , 2012	
	プライマリー	カルシウムイメージング	Suzuki <i>et al.</i> , 2016	
	プライマリー	cAMP	Corcelli <i>et al.</i> , 2010	
	HEK	電位	Sato and Takeuchi, 2014	
			Lee <i>et al.</i> , 2009	
			Lee, Ko and Park, 2009	
		HEK	LAPS	Du <i>et al.</i> , 2013
		HEK	カルシウムイメージング	Hirata <i>et al.</i> , 2019
		HEK	カルシウムイメージング	Suzuki <i>et al.</i> , 2016
		HEK	カルシウムイメージング	Lee, Oh and Park, 2015
	HEK	CRE-GFP	Oh <i>et al.</i> , 2014	
	HEK	CRE-LUC	Suzuki <i>et al.</i> , 2016	
HEK	FLIPR	Oh <i>et al.</i> , 2015		
sf21	カルシウムイメージング	Terutsuki <i>et al.</i> , 2018		
		Termtanasombat <i>et al.</i> , 2016		
		Sukekawa <i>et al.</i> , 2019		
yeast	電位	Mitsuno <i>et al.</i> , 2015		
		Marrakchi <i>et al.</i> , 2007		
		Radhika <i>et al.</i> , 2007		
		Fukutani <i>et al.</i> , 2015		
		Dacres <i>et al.</i> , 2011		
カエル卵母細胞	電位	Soleja <i>et al.</i> , 2019		
		Misawa <i>et al.</i> , 2010		
		Gao <i>et al.</i> , 2019		
		Wu <i>et al.</i> , 2011		
SH-SY5Y	電位	Suska <i>et al.</i> , 2009		
MCF-7	SAW			
カエルメラノサイト	黒色率			

LAPS: Light Adressable Potentiometric Sensor CRE: cAMP-responsive element LUC:luciferase GFP: Green Fluorescent Protein BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer SAW: surface acoustic wave

(Suzuki et al., 2016)(Oh et al., 2015)(Gao et al., 2019)(Wu et al., 2011) や昆虫細胞 (Mitsuno et al., 2015)(Termtanasombat et al., 2016)(Sukekawa et al., 2019)(Terutsuki et al., 2018) を用いて行われている。また、酵母 (Marrakchi et al., 2007)(Radhika et al., 2007)(Fukutani et al., 2015)(Dacres et al., 2011)(Soleja et al., 2019) やカエル (Misawa et al., 2010)(Suska et al., 2009) といった生物種の細胞で嗅覚受容体を発現している例も存在する。嗅覚受容体が細胞膜に存在することから、適切な立体構造を形成することができるため、安定性が高い一方で、生体を維持するために培地や温度などを一定に保つ必要がある。

タンパク質を使ったセンサ

さらに細胞から嗅覚受容体タンパク質のみを精製し、センサとして用いる方法がある。主に培養細胞や大腸菌を用いて嗅覚受容体を発現させ、抽出される。その後、タンパク質を検出器の検出部位へと修飾する。検出器には、電気抵抗で検出するための導電体 (Mulla et al., 2015)(Zhang et al., 2015)(Lee et al., 2015)(Goldsmith et al., 2011) や周波数の変化で検出する水晶振動子センサ (Du, Wu, Peng, Zou, et al., 2013)(Panigrahi et al., 2012)(Wu, 1999)、金属表面に当たった光の反射の減弱部分の位置が変わる表面プラズモン共鳴センサ (Oh, Sang Hun Lee, et al., 2014) 等がある。生体を使わないため、生体活動がノイズとならず、いずれも高感度に匂い物質を検出できる。しかしながら、これらの方法はタンパク質とターゲットの結合しか検出できず、生体内で行われているようなアゴニストとアンタゴニストの間にある、炭素鎖の長さの違いや置換基の位置の違いなどのわずかな差を見分けることができなかつた。

本論文では、積層した細胞をアレイ化することにより複数種類に匂い物質を分類するという観点から、単一の嗅覚受容体発現細胞が大量に調製でき、選択性が高い、培養細胞に遺伝子導入を行い嗅覚受容体を発現する方法を使用する。

1.2.3 細胞のシグナル検出方法

細胞の匂い物質に対する反応を観察しやすいように、様々な遺伝子改変及び観察方法が提案されてきた (Fig. 1.2)。ここでは、シグナルの検出方法について、使用する経路に分けて先行研究を紹介する。

G タンパク質経路

嗅覚受容体は GPCR であるため、G タンパク質と共役しており、細胞内にシグナルを伝達している。シグナル経路を活用することで、分子数が増幅され、シグナル強度

が高くなるというメリットがある一方で、細胞内シグナルは細胞の損傷など嗅覚受容体以外からの入力にも反応するデメリットがある。

・ cAMP パスウェイ

通常哺乳動物の生体内では、嗅覚神経細胞が匂い物質を検出すると、Gタンパク質の α サブユニットが活性化され、アデニル酸シクラーゼが cAMP を産生する。この cAMP が細胞膜上に存在する cAMP 駆動形のイオンチャネルを開放し、発火することで、神経に情報を伝達する。この嗅覚神経細胞を直接使用する場合は、イオンの流入を FET で測定することや、蛍光指示薬を用いて可視化することができる。また、HEK293 細胞のように、細胞膜上に嗅覚受容体に呼応するチャネルがない場合でも、チャネルを遺伝子導入して発現することで同様の測定方法が使える。時間分解能は劣るが、よりシグナルノイズ比が高い方法としてレポーターアッセイが提案されている。これは、cAMP が産生されると cAMP responsive element binding protein (CREB) が活性化されることを活かし、遺伝子導入により CRE 配列下流に GFP や Luciferase を配置し、タンパクの産生を定量する方法である。タンパク質が生産されるまで数時間から 1 日のラグがあるものの、高い S/N 比を有している。

・ IP3 パスウェイ

cAMP パスウェイは嗅覚受容体からのシグナルが $G\alpha_s$ 型のシグナル経路を活用したものであるが、嗅覚受容体と $G\alpha_q$ 型の遺伝子を共に発現させることによって、IP3 パスウェイを使用することもできる。これは、 $G\alpha$ が活性化されると、ホスホリパーゼ C を活性化し、細胞膜上の PIP2 を IP3 に変換し、小胞体上の IP3 駆動形のイオンチャネルを開放することで、細胞内のイオン濃度を上昇させる。生体でも一部の嗅覚受容体でこの経路が用いられているのではないかと考えられており (Elsaesser et al., 2005)、IP3 パスウェイと cAMP パスウェイを比べたところ、同じ嗅覚受容体を遺伝子導入しても、反応する匂い物質が異なることが実験により確かめられている (Benbernou et al., 2011)。

立体構造変化

嗅覚受容体そのものの立体構造の変化をとらえる試みがある。嗅覚受容体の配列なかほどに GFP を融合し、C 末端側に Luciferase を融合する。匂い物質が結合する前にはそれぞれ個別に蛍光と発光を行うが、匂い物質が結合して嗅覚受容体の立体構造が変化し、GFP と Luciferase の位置が近づくと、Luciferase の発光エネルギーが GFP の

本図は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

Fig. 1.2 細胞を用いたセンサに含まれる要素 (a) シグナル検出方法 (b) 生物学的シグナル増強 (c) シグナル検出デバイス

蛍光エネルギーへと転移され、蛍光を検出できる Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) 法や、嗅覚受容体ではないものの、匂い物質と結合すると考えられている Odorant binding protein (OBP) の両末端にそれぞれ、ECFP と Venus という蛍光タンパク質を融合したものでは、匂い物質結合前は紫色の励起光を照射すると ECFP が青色の蛍光を発するのに対して、匂い物質が結合して OBP の立体構造が変化し、ECFP と Venus の距離が近づくと、ECFP のエネルギーが Venus に転移され、黄色の蛍光を発する Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 法が提案されている。

昆虫は哺乳動物と異なるシグナル伝達様式をとっている。嗅覚受容体と結合するイオンチャネルを有しており、シグナル分子を介さずに直接イオンチャネルの開閉を制御することで、細胞内のイオン濃度を上昇させている。また、この様式と似たものとして嗅覚受容体にカリウムチャネルを共役させ、匂い物質が結合すると流入するカリウムイオンを可視化することで匂いを検出する方法が提案されている (Oh et al., 2015)。

1.2.4 生物学的シグナル増強

生体では匂い物質を検出すると、まず細胞内にシグナルを伝達することで匂い分子 1 分子から、複数の分子にシグナルを増幅していく (1.2.3 参照)。こうして細胞内で増幅されたシグナルを複数の細胞から嗅球で集約することで高いシグナルノイズ比を得ることができる。

遺伝子導入細胞を使った匂いセンサでは、細胞膜上に嗅覚受容体を効率よく発現させることで、匂いセンサの感度をあげる試みが報告されており、一つは嗅覚受容体の遺伝子を修飾する方法で、N 末端にロドプシンタグ (Krautwurst et al., 1998) やロイシンリッチな配列 (Shepard et al., 2013) を付加すると小胞体から細胞膜への輸送が効率的に行われることが知られている。もう一つは、タンパク質の共発現を利用して嗅覚受容体の機能的な発現を促進する方法である。嗅覚神経細胞に特異的に発現する受容体輸送タンパク質 RTP は、受容体の膜表面への輸送を促進 (Saito et al., 2004)(Hal-

deLeon et al., 2016) すると考えられている。また、RIC タンパク質はグアニンヌクレオチド交換因子として働くことが知られており遺伝子導入の系では嗅覚受容体の機能を高めることが知られている (Von Dannecker, Mercadante and Malnic, 2006)(Yoshikawa and Touhara, 2008)。この他にも細胞の接着性を改善することで、電気的な信号を電極に伝えやすくする研究 (Terutsuki et al., 2018) や、1.2.3 で論じたシグナル経路を変更することで、シグナルを改善する方法が考えられている。これらはいずれも 1 細胞あたりのシグナルを増強するアプローチであった。生体における嗅球や触角葉のように一つの細胞のシグナルを集約することができればより大きくロバストなシグナルが得られると考えられる。

1.2.5 細胞を用いた匂いセンサアレイ

生体由来の嗅覚受容体

生体から取り出した組織や細胞集団は、複数の嗅覚受容体が含まれており、天然のアレイである (Fig. 1.3)。ハエやガなど 5 種類の昆虫から取り出したアンテナにそれぞれ電極を接続すると、21 種類の匂い物質に反応することが示された研究 (Park et al., 2002) や、ラットの嗅上皮を使用することで、爆発物や地雷の外装に関する 10 種類の物質に反応することが示された研究 (Corcelli et al., 2010) がある。これら組織は含有する嗅覚受容体の種類の多さから、多数のインプットに対応している一方で、アウトプットの方法が一種類の強弱しかなく、匂い物質を分類することができない。組織による匂い物質の分類を行うため、ラット嗅上皮の反応を LAPS で計測し、その amplitude、duration、rising time、decreasing time、シグナルのピーク数を主成分分析することによって分ける例 (Liu, Ye, Hu, et al., 2010) もあるが、どの受容体による反応かわからない以上、分類は限定的である。一方で、組織から神経細胞を取り出すと、一つの細胞には一種類の受容体しか存在していないため、一度匂い物質を流してその反応を記録することで、次に匂い物質が来た際に同じ細胞が光れば匂い物質を分類する方法がある。マウスやラット、イモリから嗅神経細胞を取り出してきて、微小電極アレイの上に播種することで、電極の上に乗った細胞が、匂い物質に反応すれば、電極の位置で匂い物質を分類することができる。また、同様の方法として、ランダムに播種したマウス嗅神経細胞にカルシウム蛍光指示薬を添加し、蛍光観察下で匂い物質を添加することで、匂い物質に反応した細胞の位置を記録しておき、同じ細胞が光れば同じ嗅覚受容体に反応する匂い物質に分類することができる (Figuroa et al., 2010)。しかしながら、電極上に所望の嗅覚受容体を発現した細胞が乗るか、蛍光観察の画角

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする。

Fig. 1.3 プライマリー細胞により複数の匂い物質を分類した先行研究 (a) 4種類の虫からアンテナを取り出し電極につないだセンサ (Park et al., 2002) (b) ラットから嗅上皮を取り出して LAPS により計測するセンサ (Liu, Ye, Hu, et al., 2010) (c) イモリの嗅神経細胞を微小電極アレイで計測するセンサ (Datta-Chaudhuri et al., 2016) (d) ラット嗅神経細胞をアレイ化してカルシウムイメージングを行うチャンバー (Figueroa et al., 2010) ©Oxford University Press 2002 ©Elsevier 2010, 2016 ©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2010

におさまるかは実験前にわからず、またその細胞がどの嗅覚受容体を発現しているかは不明なままである。

これらのことから、嗅覚受容体発現細胞を生物から採取したものに関しては、複数種類の匂い受容体が含まれており、生体と同様にそのコンビネーションで匂い物質を同定することができるため、複数の匂い物質に対応することができる。その一方で、匂い物質に対して反応する組織の部位や細胞がどの受容体を発現しているかわからないため、匂い物質の存在を検出できても、その匂い物質の分類を行うことが難しかった。

遺伝子導入による嗅覚受容体

生体から取り出した細胞による匂い物質の分類の難しさを克服するために、遺伝工学的に単一の受容体を発現した細胞を作製し、パターンニングすることで同一デバイス上で複数の匂い物質の検出が試みられてきた (Fig. 1.4)。

カエルの卵母細胞に昆虫の受容体を発現させ、マイクロ流路内で電極にトラップする方法では、蛾の嗅覚受容体である BmOR1 と BmOR3 を発現した卵母細胞をおよそ 1 mm の流路内で電極にトラップして並べることに成功した。また、この流路に蛾のフェロモンである Bombykal と Bombykol をそれぞれ添加すると、BmOR3 は Bombykal のみに、BmOR1 は Bombykol のみに反応する様子が確認され、フェロモンの判別を行うことができた (Misawa et al., 2010)。

ガラス上に 2.5 mm 四方の穴の空いた PDMS シートのフレームを 4 つ配置し、それぞれのウェルに Or13a、Or56a、BmOR3、BmOR1 を遺伝子導入した細胞を培養した。ガラス上には細胞が接着するための BAM 修飾が施されており、接着後はフレー

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする。

Fig. 1.4 遺伝子導入細胞をアレイ化して匂いを検出した先行研究 (a) PDMS シートによる昆虫細胞のパターニング (Termtanasant et al., 2016) (b) PEG マイクロウェルと DNA パターニングを用いた嗅覚受容体発現細胞アレイ (Oh et al., 2014) ©Springer Nature 2016 ©Elsevier 2014

ムを取り外しても細胞がその場に留まる。Or13a は 1-Octen-3-ol に、Or56a は Geosmin に、BmOR3 は Bombykal に、BmOR1 は Bombykol にそれぞれ反応した。また、これら匂い物質の混合物を添加したところ、すべての細胞が反応する様子も確認された (Termtanasant et al., 2016)。

遺伝子導入した細胞を回収、アレイ化するのではなく、ウェルにプラスミドをアレイ化しておき、細胞播種後に遺伝子導入アレイ化方法が提案されている。PEGDA でマイクロウェルのアレイを作った後、その中にそれぞれのプラスミド及び遺伝子導入試薬が含まれるゼラチン溶液を添加した。その後、溶液を乾燥し、細胞を播種し 48 時間インキュベーションを行った。受容体は hOR3A1、hOR1A1、hOR1D2、hOR1G1 を用い、それぞれのウェル内で Helional、 β -Citronellol、Bougeonal、Geraniol に対して反応する様子が確認された (Oh et al., 2014)。

これらの方法はいずれも任意の受容体を発現した細胞の場所を規定することができるため、センサが反応した時、どの匂い物質を検出しているかがわかる一方で、それぞれの素子として使用される匂い受容体は、匂い物質と一対一の対応付けしかされておらず、受容体の種類の数がそのセンサで検出できる匂い物質の種類の上限度であった (Table 1.2)。このパターニングした細胞のシグナルを生体のように組み合わせることで匂いの分類を行うことができれば、分類できる匂い物質の数は指数関数的に増加することが期待される。

1.3 本研究の提案手法

1.3.1 ゲル積層による匂いセンサアレイ

本研究では、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

Table 1.2 細胞センサを用いて検出された複数種類の匂い

匂い物質(input)	受容体	検出素子	検出方法(output)	匂い物質の分類方法	設置方法	論文
Vanillin Ethyl butyrate Benzyl acetate Geraniol acetic acid octanal cineole hexanal 2-heptatone		マウス嗅神経細胞 ラット嗅神経細胞	カルシウムイメージング MEA	細胞の位置 電極の位置	ランダム ランダム	Figuroa <i>et al.</i> , 2010 Du <i>et al.</i> , 2015
cis-11-hexadecenal (Z11-16:Ald), cis-3-hexenol (Z3-6:OH), hexanoic acid, benzyl acetate, 2-methyl-5-nitroaniline, cyclohexanone, α -pinene, cis-nerolidol, trans-nerolidol, β -caryophyllene, β -ocimene, (R)-(+)-limonene, methyl jasmonate, 2-disopropylamino-ethanol, indole, 2,2-thiodiethanol, 1-heptanol, 1-octanol, 1-nonanol, 1-decanol		(アンテナ) Helicoverpa zea Heliothis virescens Ostrinia nubilalis Microplitis croceipes Drosophila melanogaster	EAG	電極の位置	パターン	Park <i>et al.</i> , 2002
Butanedione Acetic acid		ラット嗅上皮	LAPS	(主成分分析) amplitude duration rising time decreasing time the peak number of signals	ランダム	Liu, Ye, Hu, <i>et al.</i> , 2010
RDX TNT benzene, naphthalene, hexachloroethane, styrene, diphenylamine, benzothiazole, toluene, chlorobenzene(地雷の外装に使われる素材)		ラット嗅上皮	EOG	-	ランダム	Corcelli <i>et al.</i> , 2010
Limonene Isoamyle acetate		ラット嗅神経細胞	MEA	電極の位置	ランダム	Ling <i>et al.</i> , 2010
mix1: α -pinene, geraniol, amyl acetat mix2: eucalyptol, acetophenone, isopentyl acetate mix3: 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine, linalool, l-carvone		イモリ嗅神経細胞	MEA	電極の位置	ランダム	Datta-Chaudhuri <i>et al.</i> , 2016
Helional Citronellol Bourgeonal Geraniol	hOR3A1 hOR1A1 hOR1D2 hOR1G1	HEK293	蛍光観察	細胞の位置	パターン	Oh <i>et al.</i> , 2014
Bombykol Bombykal hexadecenal heptanone	BmOR1 BmOR3 PxOR1 DOr85b	カエル卵母細胞	細胞内電位	電極の位置	パターン	Misawa <i>et al.</i> , 2010
Geosmine Octenol 1-octen-3-ol	OR13a OR56a Or13a	SF21	カルシウムイメージング	画像処理	ランダム	Sukekawa <i>et al.</i> , 2019
geosmin bombykal bombykol	Or56a BmOR1 BmOR3	SF21	カルシウムイメージング	細胞の位置	パターン	Termtanasombat <i>et al.</i> , 2016

本図は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、非公開とする

Fig. 1.5 積層ゲル匂いセンサアレイのコンセプト図 (a) 細胞 A のレイヤーが匂い物質 A に反応している様子 (b) 細胞 B のレイヤーが匂い物質 B に反応している様子 (c) 細胞 A 及び細胞 B のレイヤーが匂い物質 C に反応している様子

物質を検出する。

まず、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、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を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。これは、1細胞のシグナルを高めるという方法から、複数細胞からのシグナルを集めることで、シグナルの増強を行う方法である。この方法は、細胞一つのシグナルを増強する従来研究と同時に使用できる方法であり、蛍光観察全般に使用できると考えられる。また、本研究の蛍光輝度増強の結果として、イメージセンサとして感度の劣る Web カメラで匂い物質の検出を試み、平面培養した細胞では得られないシグナルを得ることができる。また、異なる種類の細胞をアレイ化するために、GelMA を用いる。

さらに、細胞をアガロースゲルに包埋し、各ゲルを積層したのち、垂直にスライスした断面を用いることで、各細胞が縞状にアレイ化する。本方法ではスライスによって一度に複数の同一アレイを得ることができ、また、積層回数を変えることで、アレイ化する細胞の種類を増減することも可能になる。本方法によって、高さ方向に厚みを持ちつつ異なる種類の細胞をアレイ化するという利点を残しながらも、作製にフォトリソグラフィによるマスクの作製など、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、それぞれどちらか一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 (Fig. 1.5)。

1.3.2 匂いセンサの研究開発における本研究の位置づけ

すでに Table1.2 に示したように、アレイとして複数の細胞を用いて受容体と一対一で複数の匂いを検出する方法が構築されてきた。これらアレイでは非常に特異性の高

本図は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

Fig. 1.6 ジェネラリスト嗅覚受容体を用いたアレイの例 行には匂い物質が、列には嗅覚受容体
が書かれており、1は反応する組み合わせ、空欄は反応しない組み合わせをそれぞれ表して
いる。食べ物の匂いに含まれる匂い物質が着色されており、この色のついたところに1が含ま
れる嗅覚受容体はその匂い物質に反応する。そのため、複数の嗅覚受容体の反応の組み合わせ
から食品が同定できる。

い「スペシャリスト細胞」が使用されている一方で、自然に存在する匂いは複数の匂い
物質から構成されること、またその数が数万種類に及ぶことがわかっている。例えば
匂いによって麻薬を検出するのであれば、他の匂い物質に匂いの検出を邪魔される
ことなく単一の化学物質を検出できる、特異性が高いスペシャリスト細胞を使うこと
が有効である。一方、検疫で食品を見つけるというシーンでは、複数の種類の匂い物
質に対応する必要がある。複数の匂い物質に対応するためには、選択性に幅があり、
複数の匂い物質に反応するような「ジェネラリスト細胞」を使用する必要がある。こ
のジェネラリスト細胞の反応を組み合わせることで、Fig. 1.6に示されるような、複数
の匂い物質から構成される匂いを用いて多種の食品を同定することが可能になると考
えられる。本研究では、この嗅覚受容体のパターンで匂いを識別できるセンサを作製
することが目標である。

1.4 本論文の構成

本論文は全4章から構成される。

第1章 序論

本研究の目的と意義、本研究の背景、及び従来研究について記述した。また、本研
究の提案手法及び応用展開について説明した。

第2章 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイの作製

本研究で提案する匂いセンサアレイの設計、及び作製方法について記載する。また、
シミュレーションによる匂いの拡散についても示す。

第3章 嗅覚受容体発現細胞を用いた匂いセンサアレイの評価

構築した匂いセンサアレイについて評価を行い、本研究によって作製されたセンサ
が要素の組み合わせによって匂いを識別できることを示す。

第4章 結論

本研究の結論を述べ、今後の展望について記載する。

第 2 章

嗅覚受容体発現細胞を用いた 匂いセンサアレイの作製

2.1 緒言

本章では、まず匂いセンサで使用する匂い受容体についてデータベースを用いた探索的データ分析を行う。次に、センサで検出する匂い物質の選定方法を記載し、選定した嗅覚受容体において、どの匂い物質を特異的に反応するかを考察した。センサアレイに関しては、選定した受容体を細胞に発現する方法や、細胞をアレイ化する方法についての説明を交えながら、本センサの作製方法及び、評価方法について詳述する。

2.2 嗅覚受容体データベース分析

2.2.1 探索的データ分析

本研究のコンセプトである、パターンによる匂いの検出が可能であるかどうか、データベースを用いて分析を行った。ハエの受容体と匂い物質の応答をまとめた DOOR2.0(Münch and Galizia, 2016) を用いてデータ探索を行った。このデータベースは 78 種類の嗅覚受容体と 693 種類の匂い物質に対しての応答を先行研究等から収集し、応答強度を 0 から 1 にリスケーリングした上で登録を行っている。現在登録済みの応答は 7381 種類であり、全 54054 種類のうち 13.7% が埋まっている。複数の論文からデー

タをとってきていることから、データベース上に登録された嗅覚受容体の匂い物質の応答記録は、まったく記録のない0のものから、496種類の匂い物質に対する応答が明らかになっている Or19a まで様々である (Fig. 2.1)。この 7381 データを応答の強さに関しては、0 から 1 まで均等に分布しているわけではなく、反応の小さいものが多く、反応の大きいものが少ないことがプロットにより明らかになった (Fig. 2.2)。これは嗅覚受容体の選択性の高さを反映したものだと考えられる。また、この応答強度全体の平均値は 0.13918、中央値は 0.08426 であった。

ここで、本研究のアプローチと同様に閾値を定めて、シグナルの有無といった2値に分類することを考える。シグナルの閾値は細胞の応答強度とセンサの感度によって決定されるものの、ここでは仮に 0.3 を閾値として定めた。反応しないと考えられる嗅覚受容体の数は 20 であり、たった一つの匂い物質に反応するものは 7 つ存在した (Fig. 2.3)。ただし、反応強度の登録のないものは反応強度を 0 として代入した。ここで従来のように受容体それぞれが単独で反応するかどうかを考えると、反応をとることができる受容体が 78 種類中 58 種類であることから、匂い物質を 58 種類識別することが可能である。一方で、本研究で提案するようにパターンによる識別を用いると、データベース上 160 種類の匂い物質を識別することができ、識別できる匂い物質の数

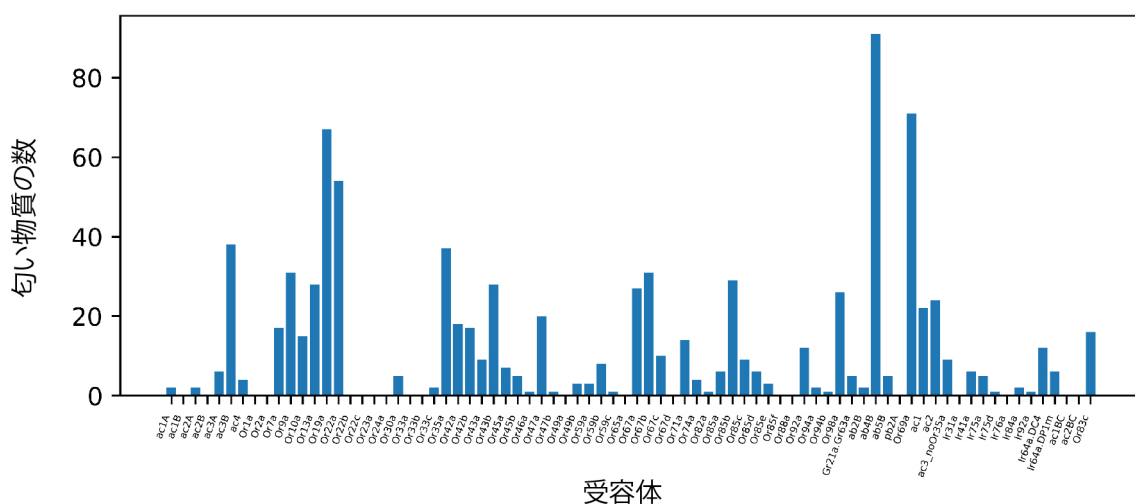


Fig. 2.3 閾値を 0.3 に定めた時に反応する匂い物質の数 (DOOR2.0 を基に作成)

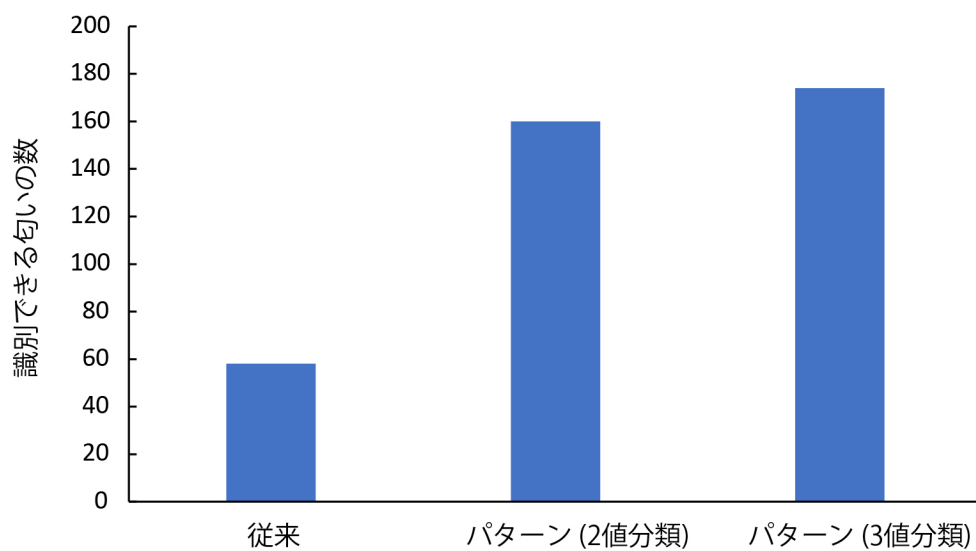


Fig. 2.4 閾値を 0.3 に定めた場合に識別できる匂い物質の数。左から従来法、2 値で分類したパターンによる方法、3 値で分類したパターンによる方法 (DOOR2.0 を基に作成)

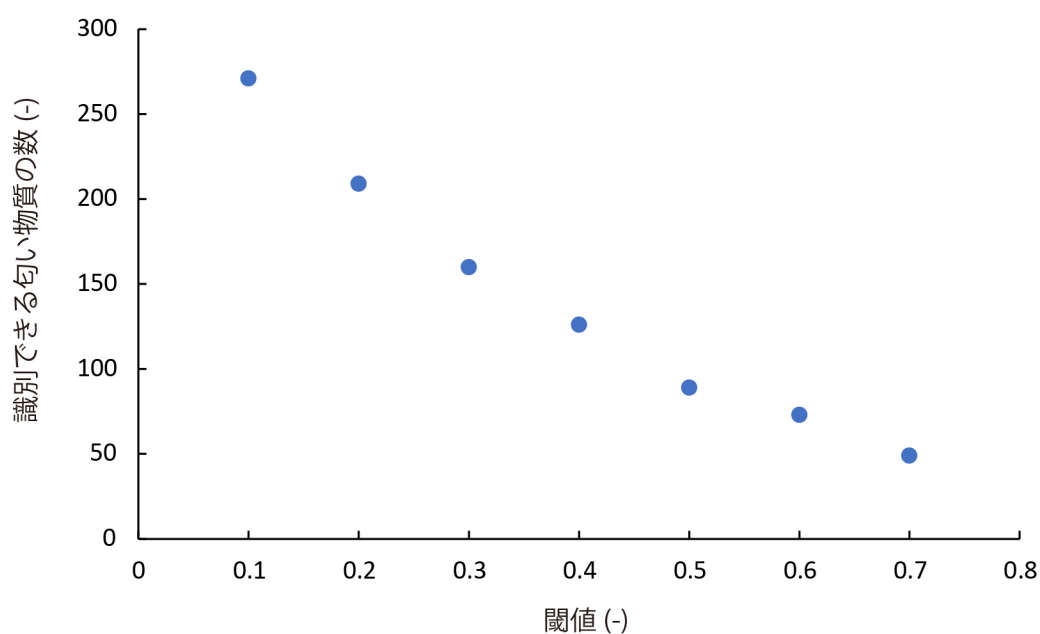


Fig. 2.5 閾値を変化させた時に識別できる匂い物質の数の変化 (DOOR2.0 を基に作成)

が 2.8 倍になることが示された。また、センサがシグナルを無、弱、強の 3 値にわけられると仮定し、閾値を 0.3 以下をシグナル無し、0.3 から 0.5 以下をシグナル弱、0.5 より大きな反応強度をシグナル強として閾値を定めて識別できる匂いの種類を計算すると、174 種類になり識別できる匂いの種類数が 2 値で分類した時よりも増加することが確認された (Fig. 2.4)。一方で、2 値分類では理論的には 2^{58} 種類の匂い物質を 3 値分類では 3^{58} 識別することができるはずであるが、これは匂い物質が無限にある場合であり、限られた匂い物質のみ登録されているデータベースでは、上記の識別数の増加にとどまった。今後、より多くの匂い物質と受容体の関係が明らかになるにしたがって、識別できる匂い物質の数も理論値に近づいていくと考えられる。

またセンサ感度が上昇する、もしくは細胞の発するシグナルが増強されると閾値を低下することにつながる。そこで閾値を 0.1 から 0.7 まで変化させた時に識別できる匂い物質の数を数えたところ、閾値 0.1 では 271 種類識別可能であったのに対して、閾値 0.7 では 49 種類しか識別できなかった (Fig. 2.5)。この結果から、シグナルを増強することが識別数の増加においても重要であることが示唆される結果となった。そのため、本研究の複数の細胞を積み重ねることによってシグナルを増強する方法が、アレイの識別数の増加に役立つと考えられる。

2.2.2 匂い物質の選定

センサの素子として使用が考えられる Or10a、Or22a、Or67a、Or98a を使用して、目的の嗅覚受容体の組み合わせに対して特異度の高い匂い物質の選定方法について検討を行った。それぞれの組み合わせに対して、反応してほしい匂い物質の反応強度の集合を target、残りの反応強度の集合を noise とすると、target の最小値と noise の最大値の差が最大となるような匂い物質が最も特異度が高く目的の組み合わせに反応していると考えられる。そこで、DOOR2.0 より、4 種類の受容体すべてに反応が記録されているものを抽出し、特異度を計算した。

それぞれの受容体の組み合わせについて、特異度の高い順に 10 個抽出した (Fig. 2.6)。棒グラフのラベルに関しては、化学物質を一意に示すことができる International Chemical Identifier key (InChIKey) を表示した。グラフのタイトルにあるものがターゲットである。これらのグラフを見ると、Or10a のように Or10a のみが強い反応を示し、他の受容体は反応を示さないような target と noise がよく分離されているものがある一方で、Or10a_Or22a のように target と noise の分離が難しいと考えられるものもある。ただし、DOOR2.0 に示される反応度は生体からの反応も含まれており、必ずしも遺伝

子導入した細胞と同様の反応強度を示すとは限らない。

2.3 匂いセンサの設計論

2.3.1 ゲルの要求仕様

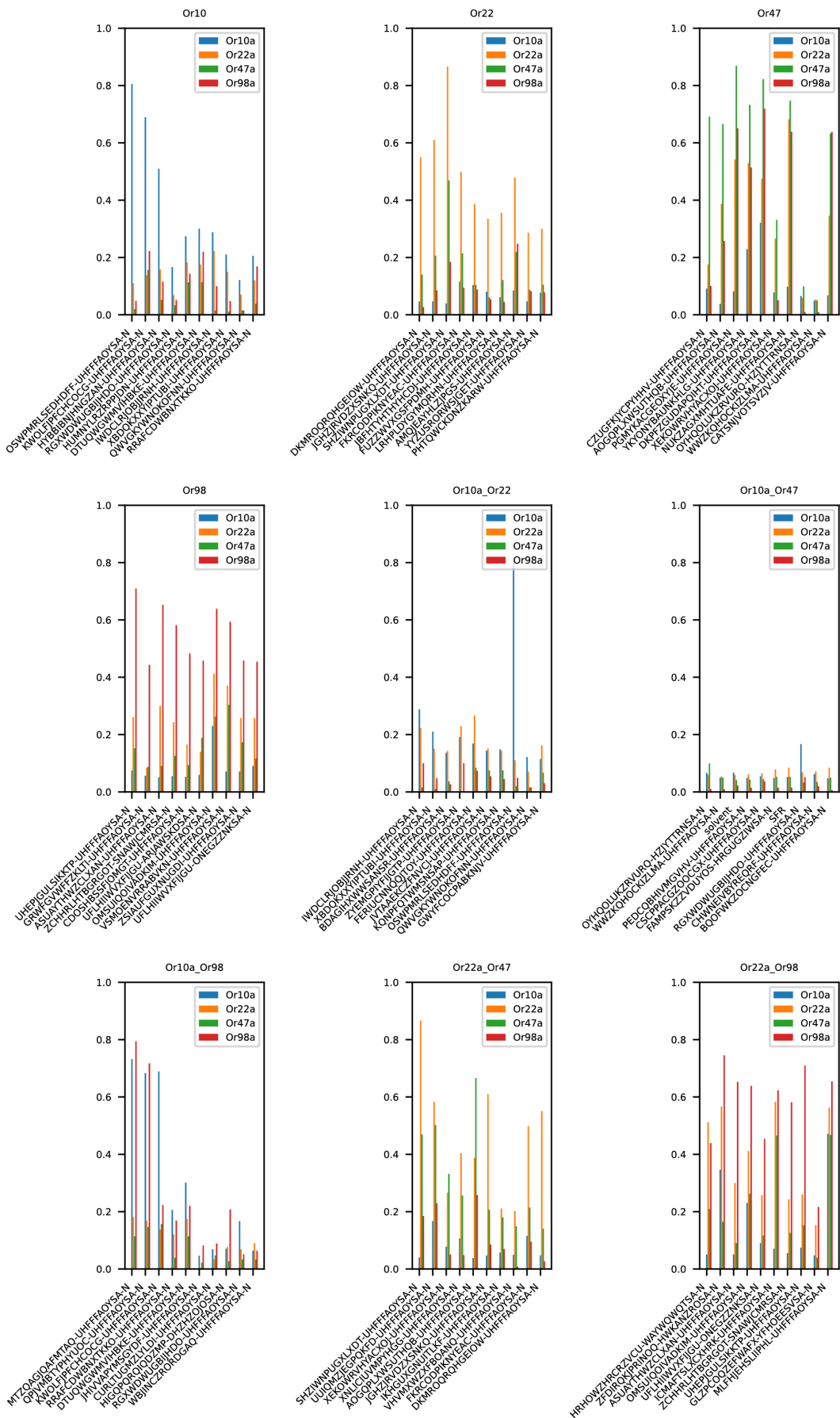
材料の選定

細胞を包埋するゲルの選定にあたって、形状を保てること、細胞にダメージを与えないこと、反応を阻害しないことが求められる。生体適合性のゲルは硬化方法によって大きく温度硬化性、イオン硬化性、光硬化性の3種類に分けられる。温度硬化性には高温で溶解し、低温でゲル化するゼラチンやアガロース、逆に高温で硬化するコラーゲンなどがあげられる。イオン硬化性のゲルは通常負に帯電しており、カリウムやカルシウムなど正の電荷をもつイオンによって架橋しゲル化が行われ、アルギン酸やカラギーナンがあげられる。光硬化性のゲルは主に UV 光を照射することで光重合開始剤からフリーラジカルが発生し、ポリマー骨格の官能基と反応して架橋されていく。官能基にはアクリレートがよく用いられ、PEGDA や GelMA といったゲルが使用される。今回の反応系では、カルシウムイオンの流入を確認することから、イオンを用いて架橋するイオン硬化性のゲルは適していないと考えられる。そのため、実験には温度硬化性または光硬化性のゲルが適していると考えられた。

今回使用する哺乳動物細胞及び、昆虫細胞は至適培養温度がそれぞれ 37°C 及び 27°C 付近である。ゼラチンを使用すると、懸濁時には液状で細胞を懸濁することができ、温度を低下させて硬化することができるが、硬化後に通常の室温に戻してしまうと再溶解温度が 30°C 程度であることから、形状を保てない可能性がある。一方で、コラーゲンは中性化して温度を上げると数十分かけてゆっくりと硬化していくため、モールディング法を用いる評価用ゲルの作製に使用した。また、アレイの作製では、逐次硬化していく必要があることから、硬化時間が早い GelMA 及びアガロースを採用した。

形状の考察

積層ゲルアレイの厚みについては、酸素や栄養が最深部まで到達する必要がある。特に酸素消費については細胞の生存及び機能について重要である。そこで、細胞の比呼吸速度から、先行研究との比較によって細胞が生存できる厚みを決定した。Sf9 細胞の比呼吸速度は 1 細胞あたり、0.033 fmol/s であることが知られている (Wagner,



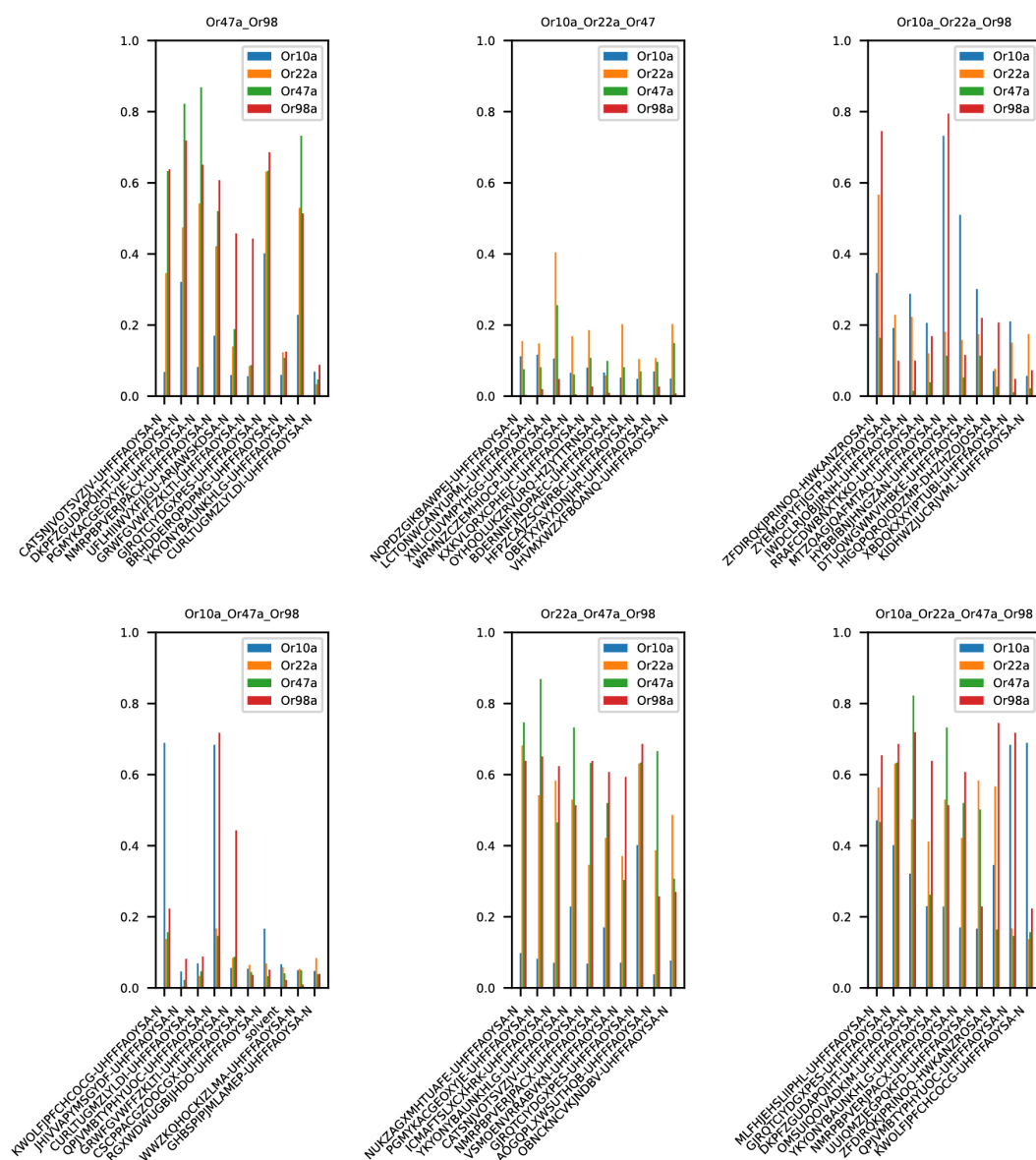


Fig. 2.6 嗅覚受容体の組合せ特異度順に反応の強度を並べたグラフ (DOOR2.0 を基に作成)

Venkataraman and Buettner, 2011)。比呼吸速度の似た細胞として、MCF-7細胞が 0.35 fmol/s であり (Pilatus et al., 2001)、MCF-7 スフェロイドの直径が 600 μm であっても中心部が死んでいないことから (Gong et al., 2015)、Sf9 細胞も最大 300 μm 厚までの層を作製可能であると考えた。

2.3.2 ゲル内の匂い物質拡散モデル

一般的に化学物質の拡散は、高濃度側と低濃度側の濃度勾配に応じて拡散速度が決定される。ゲル外の高濃度領域から中心の低濃度領域に向かって、拡散が行われ、かつゲル内の濃度が上昇していくため、非定常な拡散を想定したフィックの第2法則が適用されると考えられる。そのため、濃度 c の時間変化は (1) 式で表され、拡散係数 D と濃度勾配によって決定される。

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \quad \dots (1)$$

アガロース内の拡散係数は物質の分子量が大きいほどアガロースのネットワークに拡散が阻害され、低下することが知られている。アガロースのポアサイズは濃度が高いほど小さくなり、2%ゲルではおよそ 350 nm ほどを示す。一方で、ペンチルアセテートのような低分子化合物に対してこのポア径は十分に大きいため、ほとんど影響を無視することができる。そこで、純粋な水中を拡散するモデルとしてシミュレーションを行った。ペンチルアセテートの拡散係数は $9.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ であり、初期濃度は $0 \text{ }\mu\text{M}$ の純水に $100 \text{ }\mu\text{M}$ のペンチルアセテートを上部から拡散した (Fig. 2.7(a)-(f))。0 ms から 20 ms で迅速に拡散が進み、80 ms から 100 ms ではほとんど飽和している様子が観察できた。また、拡散源から一番遠い、最低面のペンチルアセテートの濃度を時系列でプロットしたところ、およそ 70 ms で拡散源濃度の 90% である 0.9 mM に達していることが分かった (Fig. 2.7(g))。このシミュレーションから、300 μm の高さのゲルであれば、拡散が 100 ms 以内に完了することが分かり、十分なリアルタイム性が望めると考えられる。次に、気相の匂いを流した時、ゲル内での匂い物質がどれくらいの濃度になるか確認するため、気相から液相にペンチルアセテートが拡散していくモデルでシミュレーションを行った。上半分の四角部分は、気相であり、最初から匂い物質を充満させている。この時の濃度は、ペンチルアセテートの飽和蒸気圧が 3.5 mmHg であることから、気体中での最大濃度はおよそ $0.21 \text{ mol}/\text{m}^3$ となる。また、気相での拡散係数は $6.1 \times 10^2 \text{ cm}^2/\text{s}$ である。さらに、気液の分配係数 K_{aw} を求めることで、気相から液相への匂い物質の入りやすさを表現できる。この K_{aw} はオクタノールから水への分配係数 K_{ow} とオクタノールから空気への分配係数 K_{oa} から求められる。

$$K_{aw} = \frac{K_{oa}}{K_{ow}} \quad \dots (2)$$

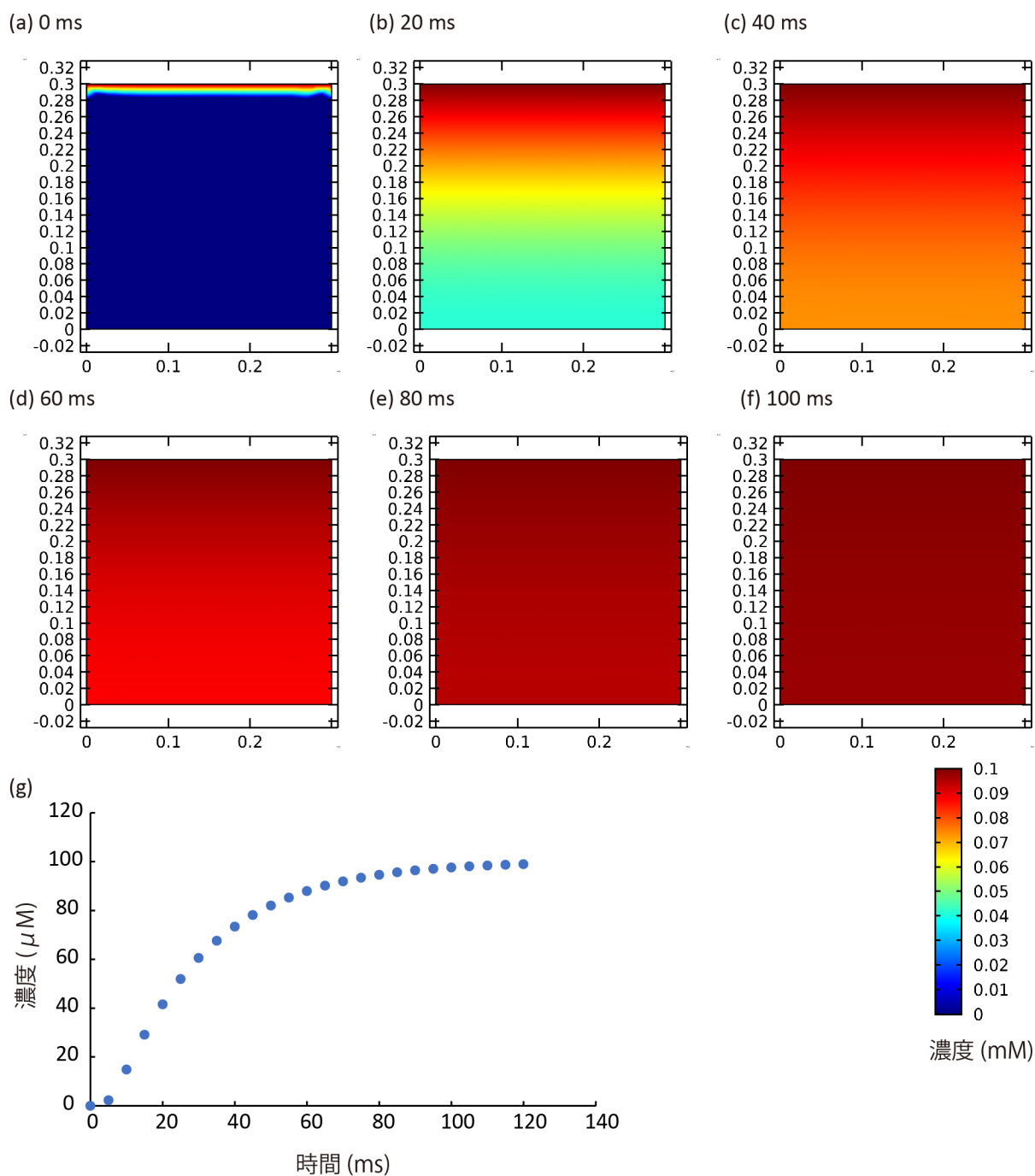


Fig. 2.7 Pentyl acetate の液相拡散シミュレーション (a) 拡散 0 ms (b) 20 ms (c) 40 ms (d) 60 ms (e) 80 ms (f) 100 ms (g) 最低面の Pentylacetate の濃度変化

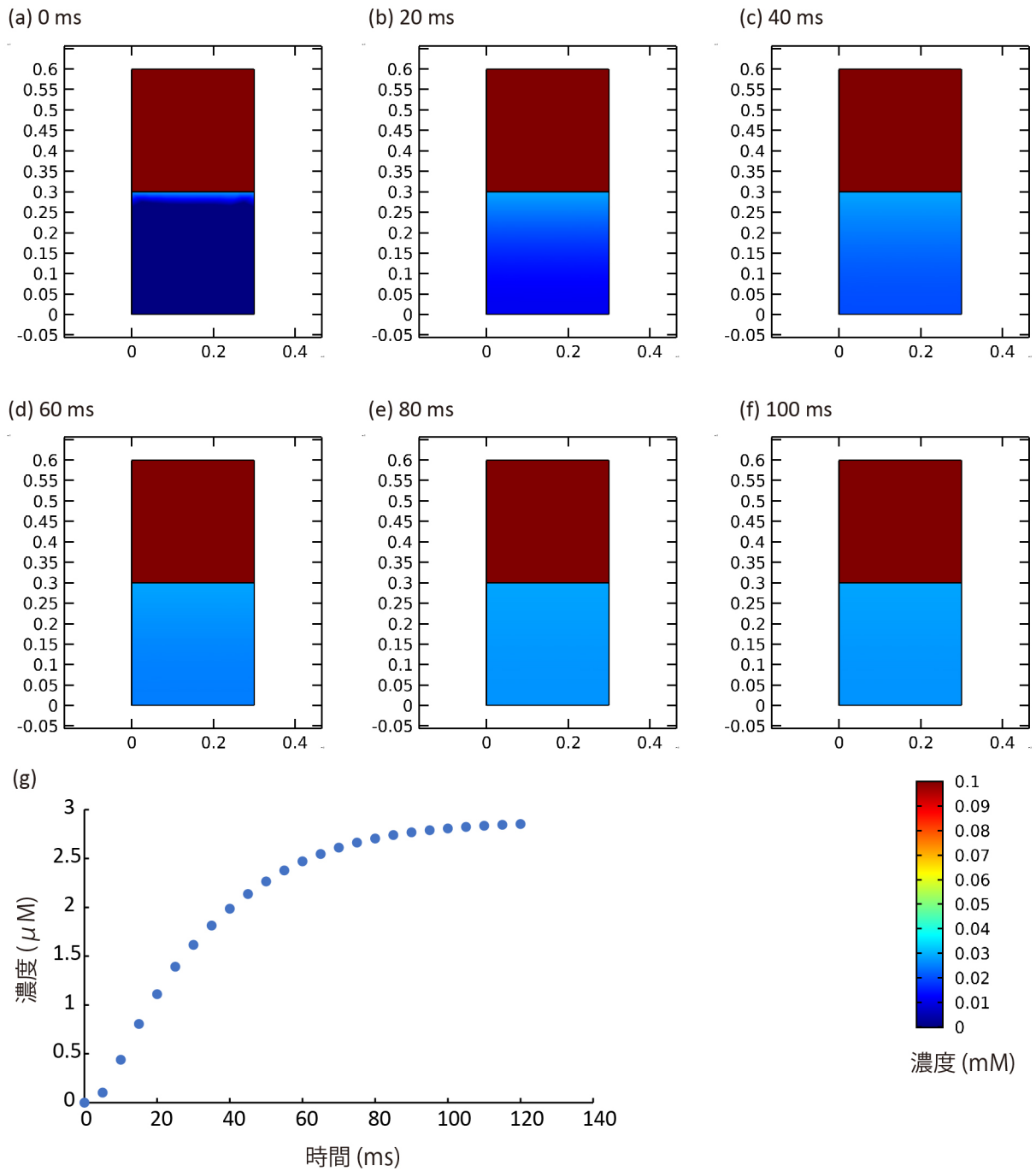


Fig. 2.8 Pentyl acetate の気相から液相への拡散シミュレーション (a) 拡散 0 ms (b) 20 ms (c) 40 ms (d) 60 ms (e) 80 ms (f) 100 ms (g) 液相最低面の Pentylacetate の濃度変化

ここで、 $\log K_{oa} = 4.12$ 、 $\log K_{ow} = 2.29$ が実験的に求まっていることから、(2) 式を変形して

$$\log K_{aw} = \log K_{oa} - \log K_{ow} \quad \dots (3)$$

となるため、 $\log K_{aw} = -1.83$ となり K_{aw} は 0.0148 である。この条件でシミュレーションしたところ、気相部分では拡散係数が大きいため、常に匂い物質が充満していた。一方で、液相では徐々に気相からの拡散を受け、匂い物質が浸透していく様子が確認された (Fig. 2.8(a)-(f))。分配係数から考えると、液相での最大濃度はおよそ $3 \mu\text{M}$ となるが、90% には、80 ms から 100 ms で達していることが確認できた (Fig. 2.8(g))。このことから、細胞が $3 \mu\text{M}$ の匂い物質に反応することができれば、およそ匂い物質が充満して 100 ms 以内に反応を始めることが確認できた。

2.4 細胞培養

2.4.1 哺乳動物細胞

細胞の維持

マウス受容体を細胞に発現させるため、HEK293T(Human embryonic kidney) 細胞を培養した。培養にはダルベッコ変性イーグル培地にウシ胎仔血清 (FBS)10% 及び抗生物質としてペニシリン-ストレプトマイシン 1% を添加した培地を使用した。細胞が 80% コンフルエントに達する前に継代を行った。継代には、リン酸緩衝液 (PBS) を 5 ml 用いて洗浄した後に、トリプシン EDTA を 1 ml 添加した。トリプシンによってディッシュに接着しているタンパクを切断し、EDTA によって細胞間接着に必要なカルシウムイオンをキレートすることができる。その後培地を加えることによって反応を停止し、新しいディッシュに播種した。また、使用する細胞は継代数が 50 を超えないように注意し、50 を超えた際には新しい細胞を凍結ストックより解凍して使用した。

遺伝子導入

遺伝子導入にはディッシュを一度 DMEM で洗浄し、再度 10 ml の DMEM を注ぎ直すことでディッシュに存在する血清を取り除いた。これは、血清によって遺伝子導入効率が低下するためである。嗅覚受容体 mOR-EG 12.5 μg 、G タンパク質 α サブユニット Ga15 7.5 μg 、受容体輸送タンパク質 RTP1 5.0 μg 、シグナル増強を行う RIC-8A 2.5 μg に Lipofectamine3000 を DNA 1 μg に対して 2.5 μl 添加してリポ複合体を形成した後、

培地に滴下した。24 時間培養することで導入した遺伝子を発現させた。使用した遺伝子は、東京大学農学系研究科東原研究室より譲り受けた。

2.4.2 昆虫細胞

細胞の維持

ハエ受容体を細胞に発現させるため、Sf9 細胞を培養した。培養には SFM III 培地にウシ胎仔血清 (FBS)10% を添加した培地を使用した。細胞が 80% コンフルエントに達する前に継代を行った。継代には、新しい昆虫用培地を 5 ml 加えた後に、ピペッティングによって細胞をディッシュから剥離し、新しいディッシュに播種した。また、使用する細胞は継代数が 30 を超えないように注意し、30 を超えた際には新しい細胞を凍結ストックより解凍して使用した。

遺伝子導入

遺伝子導入にはディッシュを SFM III で洗浄し、再度 10ml の SFM III を注ぎ直すことでディッシュに存在する血清を取り除いた。これは、結成によって遺伝子導入効率が低下するためである。嗅覚受容体 OR 2.5 μ g、嗅覚受容体共受容体 Orco 2.5 μ g、カルシウム蛍光指示タンパク GcAMP 5.0 μ g に ransIT を DNA 1 μ g に対して 20 μ l 添加してリポ複合体を形成した後、培地に滴下した。72 時間培養することで導入した遺伝子を発現させた。

2.4.3 遺伝子調製

(i) プラスミドのコンストラクション

昆虫細胞に導入するプラスミドを作製した。使用する受容体の配列は FlyBase(<https://flybase.org/>) より翻訳領域である CDS を抽出し、ThermoFisher の GeneArt を用いて Sf9 細胞用にコドン最適化を行った。昆虫の嗅覚受容体では、N 末端が細胞内、C 末端が細胞外に配置されるように細胞膜を貫通することが分かっており (Smart et al., 2008)、タグの位置によって発現量が変わるため、嗅覚受容体については N 末端に myc タグを、嗅覚受容体共受容体については N 末端に FLAG タグをそれぞれ配置した。また、このインサートはそれぞれ pIB/V5-His 及び pIZ/V5-His ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。具体的には、コドン最適化を行った Or10a、22a、67a、98a の配列を pIB_V5_His_DEST プラスミドの HindIII と SacII の間に挿入した (Fig. S2)。このプラスミドはタンパク質の標識及び精製のため、V5 タグと His タグ

が C 末端につけられるようになっているが、前述の通り C 末端側のタグは反応効率を落としてしまう可能性があるため、挿入配列の最後に終止コドン挿入し、タグを使用しない設計にした。また、Orco として知られる Or83b も同様にコドン最適化を行い、pIZ_V5_His タグに挿入した。挿入位置は KpnI 及び SacII である (Fig. S1)。また、住友化学株式会社よりハエ嗅覚受容体である Or47a が pIEX-4 に挿入されているプラスミド及び蚊とハエの嗅覚受容体共受容体の配列を含んだ AgDmOrco プラスミドを譲り受け実験に使用した。

(ii) プラスミドの増幅

プラスミドを増幅するため、大腸菌の培養及び抽出を行った。Bacto trypton 10 g、yeast extract 2.5 g、NaCl 5 g、5N NaOH 0.2ml に対して、超純水で 1L にメスアップしたものをオートクレーブし、LB 培地として用いた。嗅覚受容体及び共受容体のプラスミドはアンピシリン及びジオシン耐性を有している。そのため、それぞれアンピシリン 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、ジオシン 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるよう LB 培地に添加した。また、この抗生物質入り培地に 1.5% になるよう Agar を添加し、10 cm のディッシュに注ぎ入れ、室温で固めたものを LB プレートとした。大腸菌を LB プレートに植菌し、コロニーを形成したものをピッカーで採取し、プレカルチャーとして抗生物質の入った LB 培地 2 ml に植菌し、1 晩 37°C のシェーカーで培養した後に、三角フラスコにいた 100 ml の LB 培地に移し替え、2 晩 37°C のシェーカーで培養することでメインカルチャーを行った。また、グリセロールストックとして、プレカルチャー液 70%、グリセロール 30% になるように調製し、よく懸濁したものを -80°C に保存し、以降はこのストックをプレカルチャーに供した。

(iii) プラスミドの抽出

メインカルチャーで得た大腸菌を 50 ml チューブに移し替え、4°C、6000 g で 15 分間遠心して集菌し、上清をデカントにより取り除いた。この大腸菌のペレットに大腸菌を溶解するためのバッファーを 4 ml 加え、ボルテックスにより完全に溶菌した。また、バッファーには RNA 分解酵素が含まれているため、大腸菌内の RNA はこの時点で分解される。次に、細胞片やタンパク質、ゲノム DNA 等の不要物を沈殿させるバッファーを 4 ml 添加し、15 分間氷中で静置した後に 20000 g で 30 分間遠心した。次に、上清を別のチューブに移し替え、さらに 20000 g で 15 分間遠心し、完全に沈殿物を除去した。その後、平衡化した陰イオン交換カラムに上清を全量添加した後、自然沈

降によってカラムに DNA を吸着させ、洗浄バッファー 30 ml を 2 回流した。最後に DNA 溶出バッファーを 5 ml 添加し、目的のプラスミドを回収した。このプラスミド溶液にイソプロパノールを 3.5 ml 加え、15000 g で 30 分間遠心して DNA を沈殿させた。その後上清を取り除き、70% エタノールで洗浄し、デシケータで脱気することでエタノールを揮発させた。最後に TE 緩衝液によって DNA を溶解し、微量分光光度計 nanodrop2000 によって DNA 濃度を測定した後、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調製した。

2.5 遺伝子発現確認

2.5.1 免疫染色

遺伝子導入した細胞に 4% パラホルムアルデヒド /PBS を加え、室温で 10 分間静置することで細胞を固定し、パラホルムアルデヒドを洗い流すため、PBS で 3 回洗浄した。次に抗体が細胞内へ浸透できるように、0.1% Triton/PBS を加え 10 分間静置することで透過処理を行い、PBS で 3 回洗浄した。抗体の非特異的吸着を防ぐため、1% BSA/PBS を加えて 1 時間静置することでブロッキングを行った。1 次抗体には、マウスモノクローナル抗体である anti-myc 抗体とラビットポリクローナル抗体である anti-FLAG 抗体を使用し、4°C over night で静置し、PBS で 3 回洗浄した。二次抗体にヤギ由来の anti-mouse-IgG-Alexa 488 と anti-rabbit-IgG-Alexa 568 を使用し、1 時間室温で静置した後、PBS で 3 回洗浄した。その後 Hoechst で染色し、観察に供した。

2.5.2 カルシウムイメージング

遺伝子導入試薬が入った培地をアスピレーターで吸い取り、Imaging solution で一度洗浄した。Imaging buffer solution の組成は (Mitsuno et al., 2015) を参考に、塩化ナトリウム 140 mM、塩化カリウム 5.6 mM、塩化カルシウム 2.0 mM、塩化マグネシウム 2.0 mM、D- グルコース 9.4 mM、HEPES 5 mM になるよう超純水に溶かし、pH メーターを用いて pH 7.4 に調製した。洗浄後、もう一度 Imaging solution を注ぎ入れ、蛍光顕微鏡のもとで動画を撮影しながら、コントロールの物質及び匂い物質を順次滴下した。

2.6 評価用ゲルの作製

2.6.1 コラーゲンを用いた評価ゲルの作製

フォトマスクの作製

クロムとフォトレジストがコートされたガラス板にマスクレス露光機を用いて、直径 $200\ \mu\text{m}$ の微細な穴を中心距離が $400\ \mu\text{m}$ の間隔で配置するように UV 照射を行った。最表面にコートされているフォトレジストは UV 照射によって、現像液で溶かすことができるため、溶解後に露出したクロム面を HY 溶液でエッチングすることで UV 照射したパターンの部分だけ光が透過するフォトマスクを得た。上記の作業はフォトレジストが蛍光灯の光にも感光するため、イエロールーム内で行った。

SU-8 モールドの作製

Polydimethylsiloxane (PDMS) と硬化剤を重量比 10:1 で混ぜあわせた後、自転公転ミキサーにより混合した。混合後、作製した SU-8 モールドに注ぎ入れ、PDMS 内の気

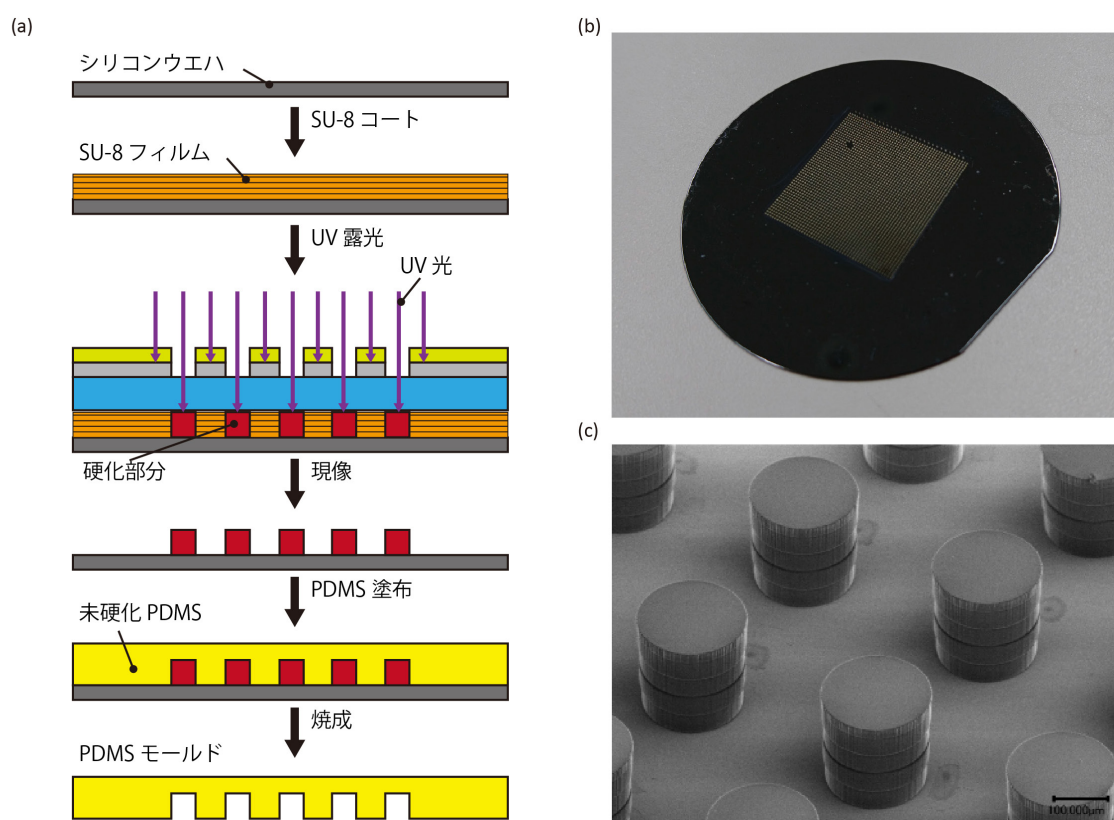


Fig. 2.9 PDMS モールドの作製方法 (a) 作製手順 (b) SU-8 モールドの全体図 (c) SU-8 モールドの電子顕微鏡画像

泡をなくすためにデシケータで15分間脱気した。表面に残った気泡をエアダスターで潰し、75°C 90分で焼成した。焼成後、PDMSをSU-8よりはがし、PDMSモールドを得た (Fig. 2.9)。このモールドは直径200 μm 深さ50-200 μm の穴が中心距離400 μm の間隔をあけて整列している。

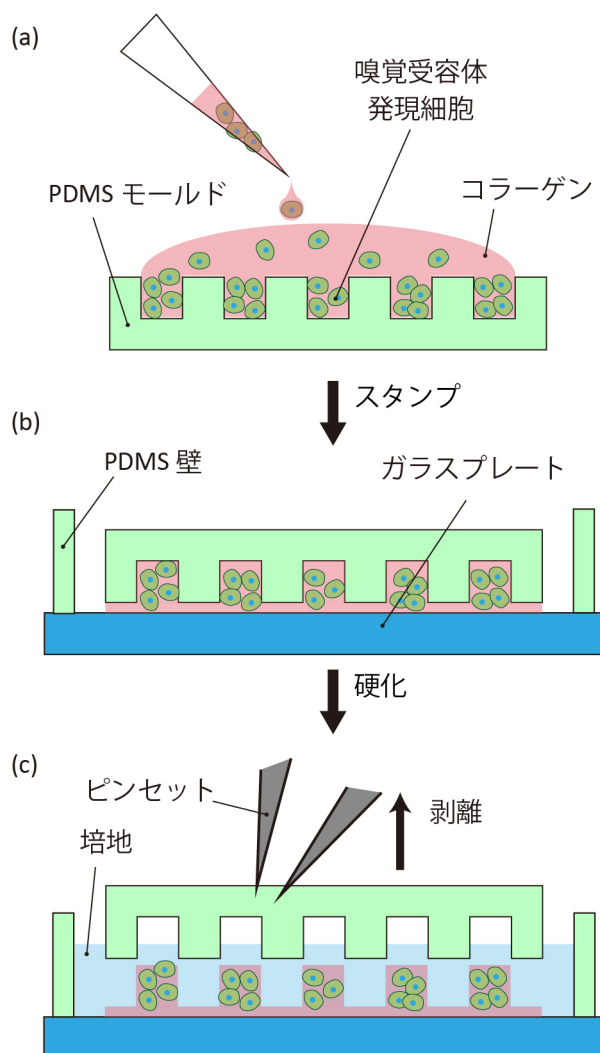


Fig. 2.10 評価用ゲルの作製方法 (a) 細胞コラーゲン懸濁液をPDMSモールドに滴下 (b) ゲル溶液の硬化 (c) モールドの除去

スタンプ法による評価用ゲルの形成

回収した細胞のペレットに中性化したコラーゲンを細胞が 1.0×10^8 cells/ml になるように懸濁した後、1% BSA 溶液でコーティングした PDMS モールドに細胞を懸濁したコラーゲン溶液をつめこみ、コラーゲンを 3000 rpm、30 秒間スピコートしたガラスプレートに貼り付けた。その後、コラーゲンを円柱状にゲル化するため、37°C で 15 分間インキュベートした後、PDMS モールドをピンセットではがすことで、評価用ゲルを得た (Fig. 2.10)。ただし、250 μm 以上の円柱に関しては、作製時に転倒してしまい作製できなかった (Fig. 2.11)。ガラスプレートに直接スタンプするコラーゲンは CellMatrix 社の type I -A 溶液であり、中性化のために 10 \times Hanks 緩衝液、ゲル緩衝溶液の順に 8:1:1 で混合して中性化した。この緩衝液は、50 mM NaOH、260 mM NaHCO₃、200 mM HEPES を混合したものである。また、台座に貼り付けるものに関しては、Koken 社の type I -A 溶液に 10 \times Hanks 緩衝液、HEPES、NaHCO₃、MilliQ を 80:10:1:1:8 で混合して中性化した。

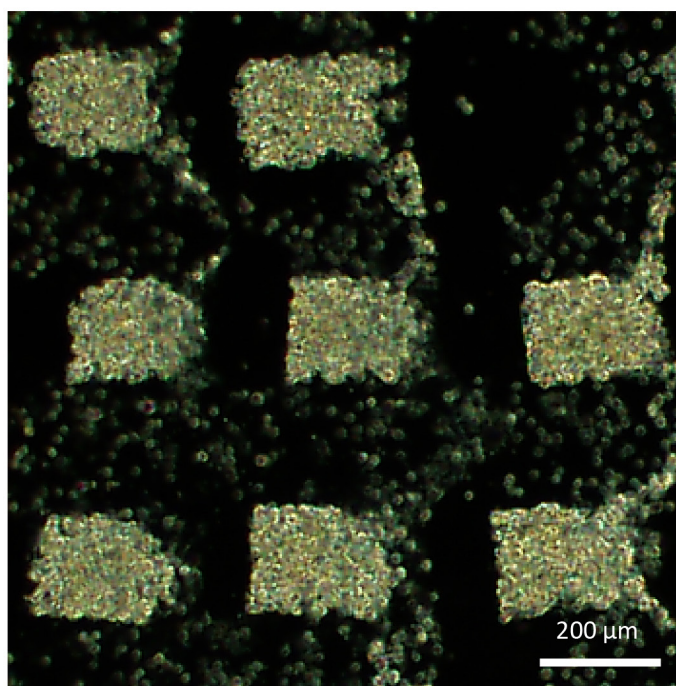


Fig. 2.11 高さ 250 μm の評価用ゲルが倒れている様子

2.6.2 GeIMA による評価用ゲルの作製

フォトマスクの作製

光硬化性のハイドロゲルをパターニングするために、アルミニウムによりフォトマスクを作製した。No.1 ガラスに Al 蒸着気を用いてアルミニウムコーティングを行った。蒸着機内を真空にし、容器内でアルミ片を電熱線で熱することで、アルミが昇華し、ガラス面上で薄膜を形成した。その後、コーティング面に S1818 をスピコートにより塗布し、S1818 がポジティブ型のフォトレジストであるため、光を通したい部分に露光を行った。その後、S1818 現像液により、光を照射した部分を溶解して洗い流し、硝酸、酢酸、リン酸をそれぞれ 2.0%、9.8%、72.3% を含む混酸アルミニウムによりアルミニウムのエッチングを行い、200 μm の微細な穴が空いたマスクを得た。SU-8 の硬化に用いる厚いフォトマスクでは、顕微鏡を用いたゲルの硬化に適さなかったためである。

GeIMA 硬化条件の最適化

GeIMA はゼラチンの末端にメタクリレート基が修飾されており、光重合開始剤を混ぜ合わせて UV 照射を行うと重合開始剤が励起されてラジカルを生じ、メタクリレート基が重合していきゲル化する (Ramón-Azcón et al., 2012)。このゲル溶液に細胞

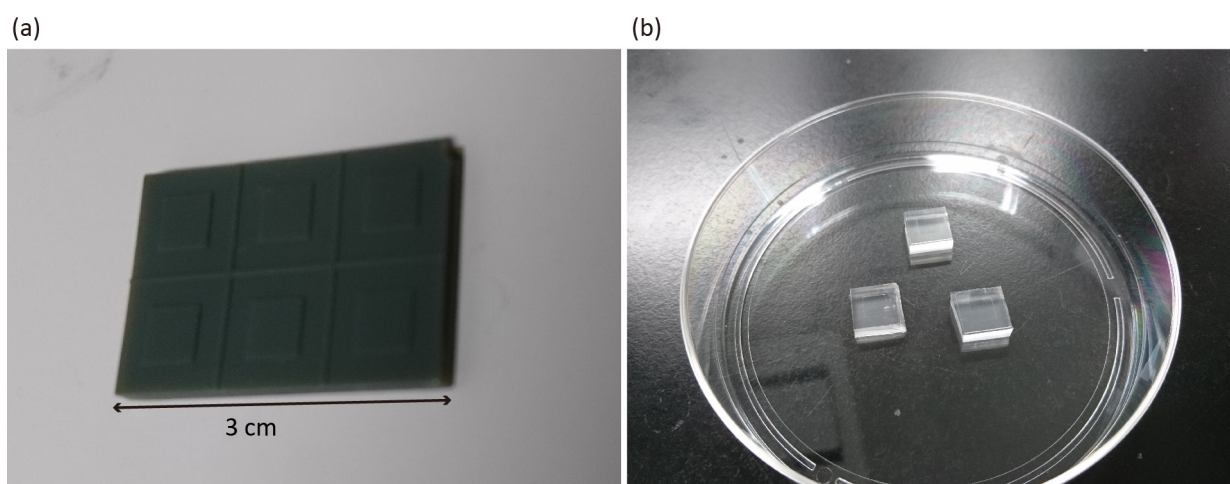


Fig. 2.12 GelMA 円柱アレイ用の PDMS モールド (a) 3D プリンタで作製しパリレンコートした PDMS 用のモールド (b) PDMS を硬化した後切り出した PDMS モールド

を 10^8 cells/ml の濃度で懸濁し、PDMS で作製した深さ $200\ \mu\text{m}$ のモールドに滴下した。このモールドにガラスを貼り付け、顕微鏡に設置してあるフォトマスク上に置いた。GelMA は酸素存在下では硬化しないことが知られており (Habasaki et al., 2015)(Yeh et al., 2006)、酸素を透過する PDMS を用いることで PDMS と接している最表面は硬化せずにモールドの高さに円柱を規定できる。なお、この PDMS のモールドは 3D プリン

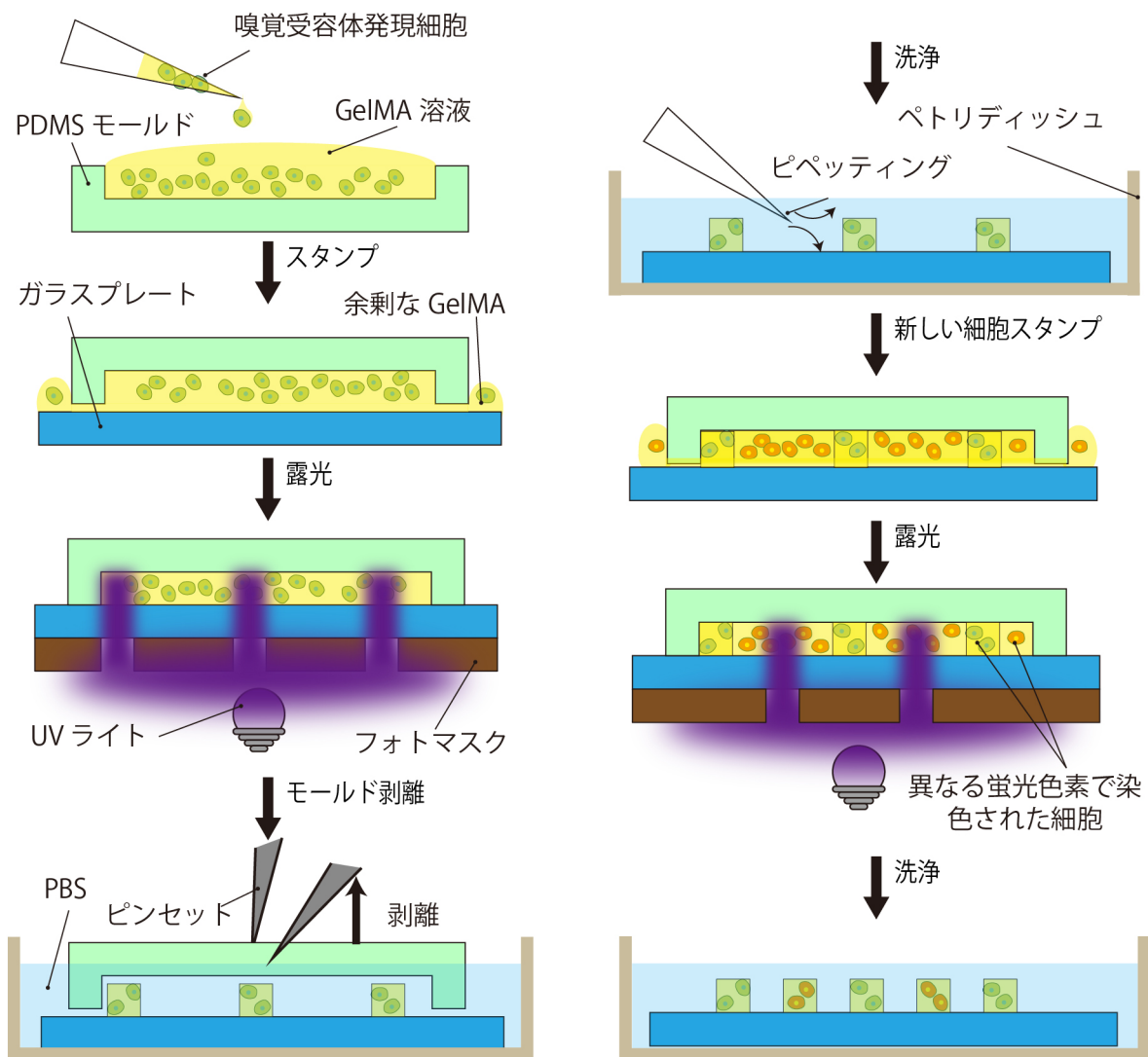


Fig. 2.13 GelMA 円柱アレイの作製方法

タで作製したモールドにパリレンをコートし、PDMSを硬化したものである (Fig. 2.12)。

GelMA の最適な硬化条件を検討するために、GelMA の濃度を 2.5%、5.0%、7.5% にわけて硬化を行った。硬化開始剤に関してはいずれも 0.1% の Irgacure2959 を用い、それぞれ終濃度に対して 2 倍濃い溶液を PBS を用いて作製した。室温では GelMA はゲル状に、硬化開始剤は粉末状で溶けないため、ヒートブロックで 60°C に加熱し、均一に混ざったものを 1:1 で混合することにより、細胞を懸濁するためのプレゲル溶液を作製した。硬化時間に関しても 30 秒から 2 分の間で最適化を行った。なお硬化に際しては顕微鏡を用い、明視野上でガラス上の細胞底面に焦点があったことを確認してから、蛍光のためのフィルタで UV を照射して GelMA 円柱を得た。

GelMA アレイの作製

GelMA が異なる種類の細胞をアレイ化することが可能であることを示すため、セルトラッカーの赤と緑を用いて HEK293T 細胞を染色した。セルトラッカーはそれぞれ終濃度 5 μM に DMEM で調製し、細胞に添加後 30 min 静置した。その後、細胞を回収し、それぞれプレゲル溶液に懸濁した。まず 1 色細胞を顕微鏡で硬化した後に未硬化のゲル溶液を PBS で満たされたディッシュ内でピペッティングより洗い流した。さらに、ディッシュを交換して洗浄することで細胞がコンタミネーションしないように気をつけた。次に、対物顕微鏡下で、作製したパターンとマスクが互い違いになるようにアライメントし、パターンとマスクの位置がずれないようにメンディングテープで固定した。次にもう 1 色の細胞が入った懸濁液を前述の方法で硬化し、洗浄を行うことで GelMA アレイを得た (Fig. 2.13)。

2.7 ゲル積層による匂いセンサアレイの作製

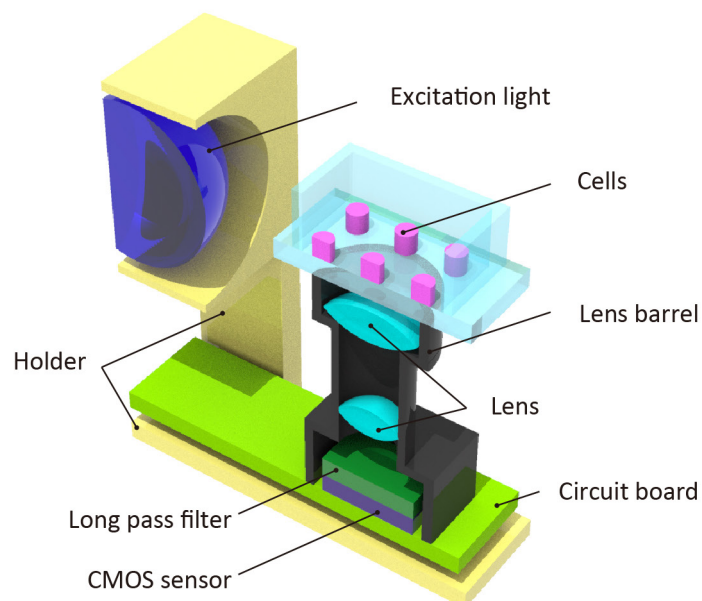
本節は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

2.8 観察デバイスの作製

2.8.1 携帯型観察デバイス

小型で蛍光を観察するためのデバイスがなかったことから、評価用ゲルが小型デバイスに応用可能であることを示すため、ウェブカメラから蛍光検出付きを作製した。まず、ウェブカメラを分解して内部の CMOS イメージセンサを基板ごと取り出した。

(a)



(b)

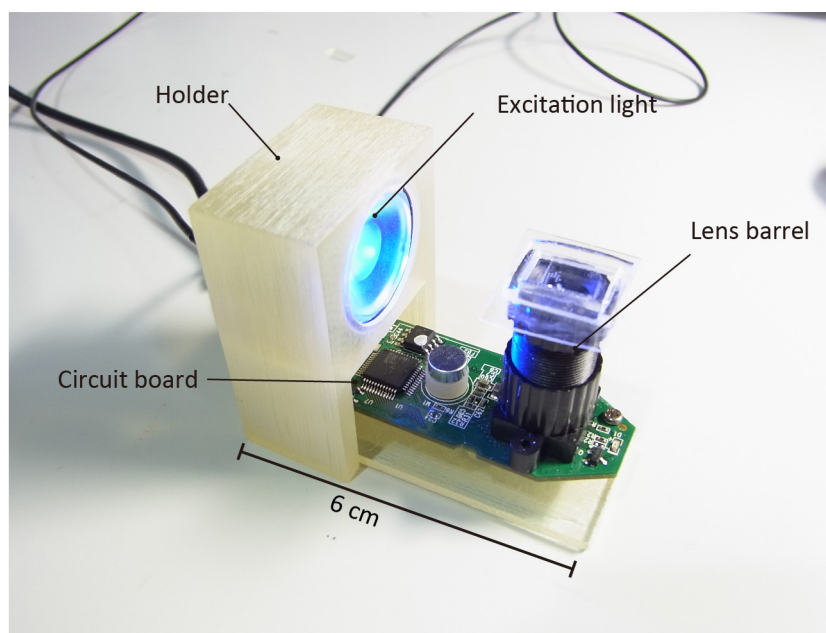


Fig. 2.14 作製した携帯型匂いセンサ (a)概略図 (b)実際に作製した匂いセンサの画像 (Hirata et al., 2019)©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2019 より一部改変

分解は主にドライバーを用いて行い、ドライバーで外せない形になっているところは外装がプラスチックであったため、超音波カッターを用いた。蛍光を検出するためのカルセイン AM と Fluo-8 は共に蛍光波長が 515 nm 付近である。そこで、緑色光のみを透過するバンドパスフィルタ BPB53 を取り出したイメージセンサ上に設置した。その上に焦点が調節可能な他のウェブカメラから取り出したレンズを搭載することで、センサとした。

励起光に関しては、主要波長が 470 nm 付近の青色光を発する LED 電球を使用した。付属の簡易コリメーターをつけ、PC から給電するために USB 給電用の端子にハンダ付けした。センサとライトの位置をきめるために、3D プリンタによって作製したホルダーに取り付けて使用した (Fig. 2.17)。

2.8.2 スマートフォン型観察デバイス

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

2.9 積層ゲルアレイの匂い応答評価

本節は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

2.10 結言

本節は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

第 3 章

嗅覚受容体発現細胞を用いた 匂いセンサアレイの評価

3.1 緒言

本章では、2章で設計及び作製方法を示した匂いセンサについて、作製された形状や匂いに対する反応性の観点から評価する。

3.2 遺伝子導入細胞の評価

3.2.1 嗅覚受容体発現哺乳動物細胞の匂い物質に対する応答確認

mOR-EG を遺伝子導入した HEK293T が匂い物質に応答するか、まず平面で培養した細胞に匂い物質を添加してカルシウムイメージングを行った。また、mOR-EG のリガンドであるオイゲノールは濃度が高すぎると嗅覚受容体に関係なく細胞内の蛍光輝度が高まることが知られているため、非特異的な蛍光輝度の上昇でないことを確かめるために嗅覚受容体を発現していない細胞をコントロールとした。匂い物質添加 0 秒後と 30 秒後を比べると、嗅覚受容体発現細胞では明らかに蛍光輝度が上昇しているのに比べて、コントロール細胞では大きな差が生じなかった (Fig. 3.1(a))。

この差を定量的に評価するため 30 秒後の画面全体の蛍光輝度から 0 秒後の画面全体の蛍光輝度を引くことで、蛍光輝度変化を求めた。この結果、コントロール細胞で

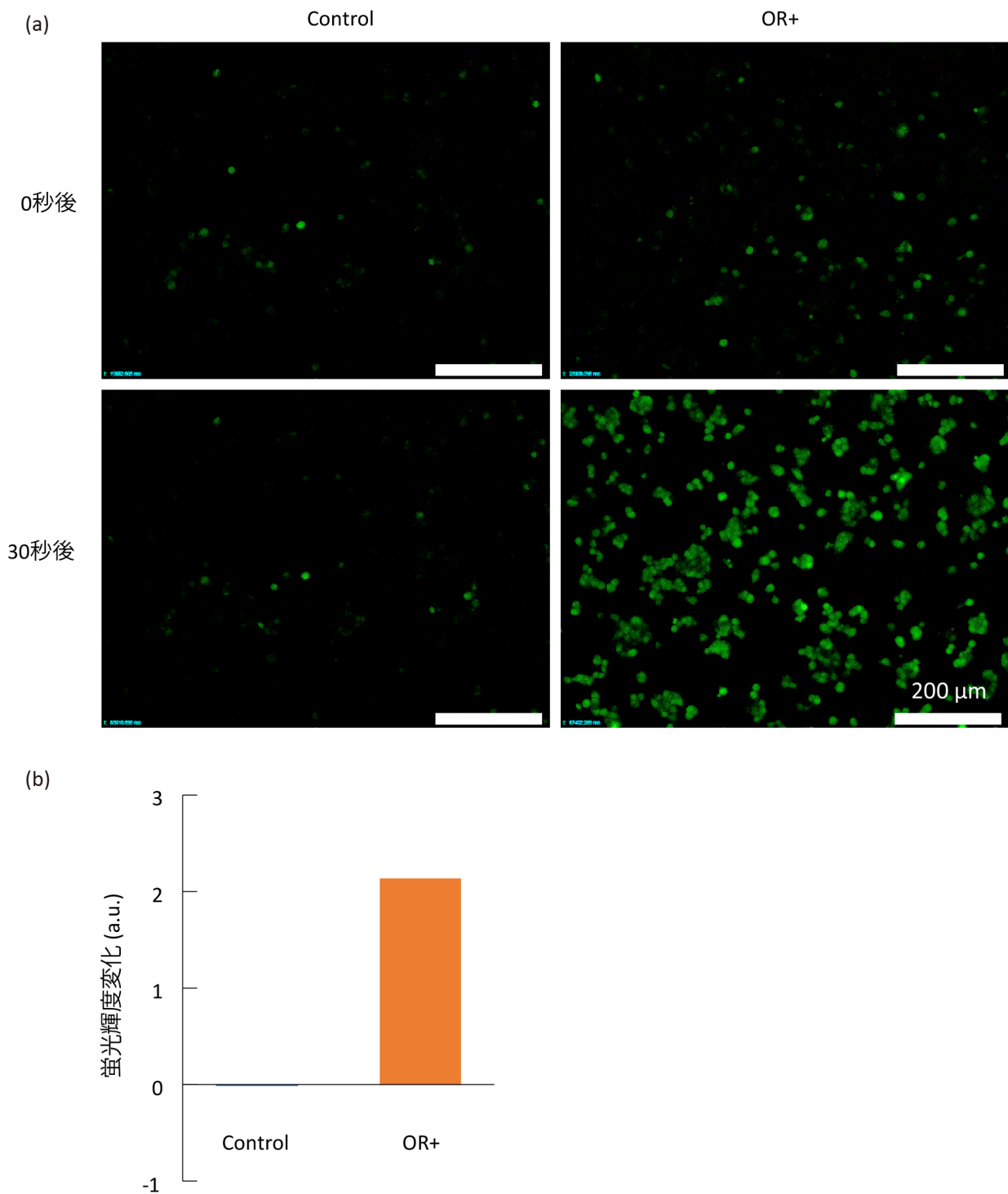


Fig. 3.1 嗅覚受容体発現細胞のカルシウムイメージング (平面培養) (a)(b) Myc タグによる Or10a 染色 (c) FLAG タグによる Orco 染色 (d) 各蛍光像を合成した画像

は蛍光輝度に変化していない一方で、嗅覚受容体発現細胞では大きく上昇していることが数値からも明らかになった (Fig. 3.1(b))。なお、匂い物質添加前に蛍光を発している細胞については、細胞内にそもそもカルシウムイオンが少量存在するためだと考えられる。

3.2.2 昆虫細胞の免疫染色による嗅覚受容体発現確認

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.2.3 カルシウムイメージングによる昆虫細胞の匂い物質応答評価

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.3 ゲルの作製方法評価

3.3.1 評価用ゲルの外形計測

スタンプ法によって作製した評価用ゲルが、精度良く作製できているか計測によって確認した。倒立型の顕微鏡を用いて撮影したところ、評価用ゲルがそれぞれ独立して立っていることが確認できた (Fig. 3.7(a))。直径を測定したところ、平均 195 μm 、変動係数 2.7% であった (Fig. 3.7(b))。

また、三次元レーザー形状計測器によって円柱の高さを測定したところ、円柱形状の外形をとらえることができた (Fig. 3.7(c))。平均 186 μm 、変動係数 3.3% であった (Fig. 3.7(d))。いずれも標準偏差値を平均値で除した変動係数が 5% 以内に収まっていることから、再現性良く円柱が作製できていると考えられる。

3.3.2 評価用ゲルの高さ と 蛍光輝度変化

細胞を搭載したコラーゲンマイクロピラーの高さを最適化するために、高さの異なる細胞を搭載したコラーゲンマイクロピラーをカルセイン AM で染色し、蛍光強度を比較した。その結果、高さが高くなるにつれて蛍光強度が上昇した (Fig. 3.8(a)-(d))。

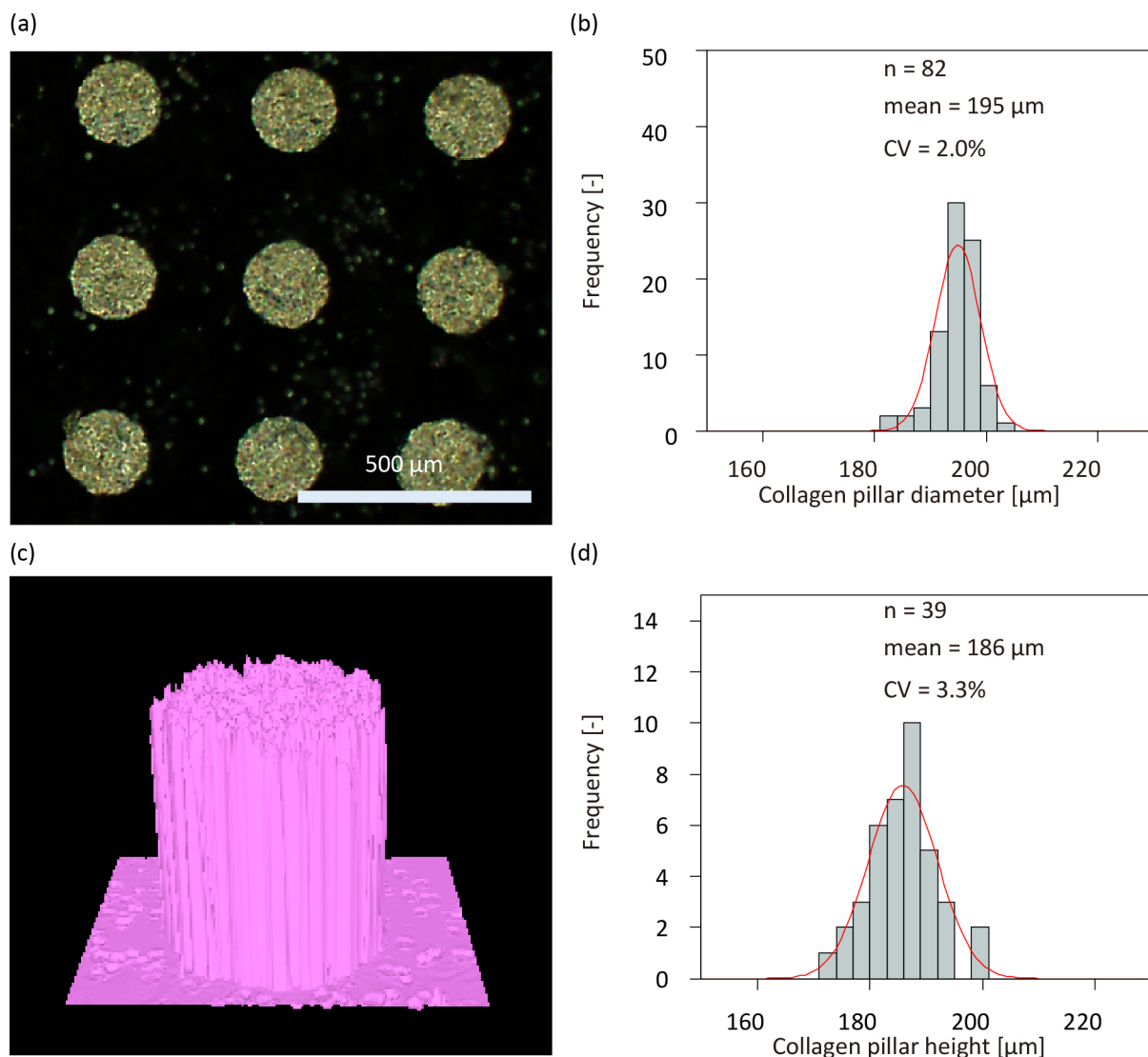


Fig. 3.2 Or98a の平面培養カルシウムイメージング (a) Methyl benzoate 添加後 0 秒 (b) Methyl benzoate 添加後 10 秒 (c) Methyl benzoate 添加後 20 秒 (d) Methyl benzoate 添加後 30 秒 (e) 蛍光輝度の時系列変化 (Hirata et al., 2019)©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2019 より一部改変

高さ 200 μm のマイクロピラーでは、高さ 50 μm のマイクロピラーの約 3 倍の蛍光強度を示した (Fig. 3.8(e))。この結果は、細胞を搭載したコラーゲン円柱が細胞蛍光の垂直蓄積を達成したことを示している。高さを 4 倍にしても蛍光強度は 3 倍にしかならない理由は、ポータブル BOS の CMOS イメージセンサに搭載されたレンズの被写界深度に起因していると考えられ、焦点面が撮像センサに到達した時点での蛍光が最も

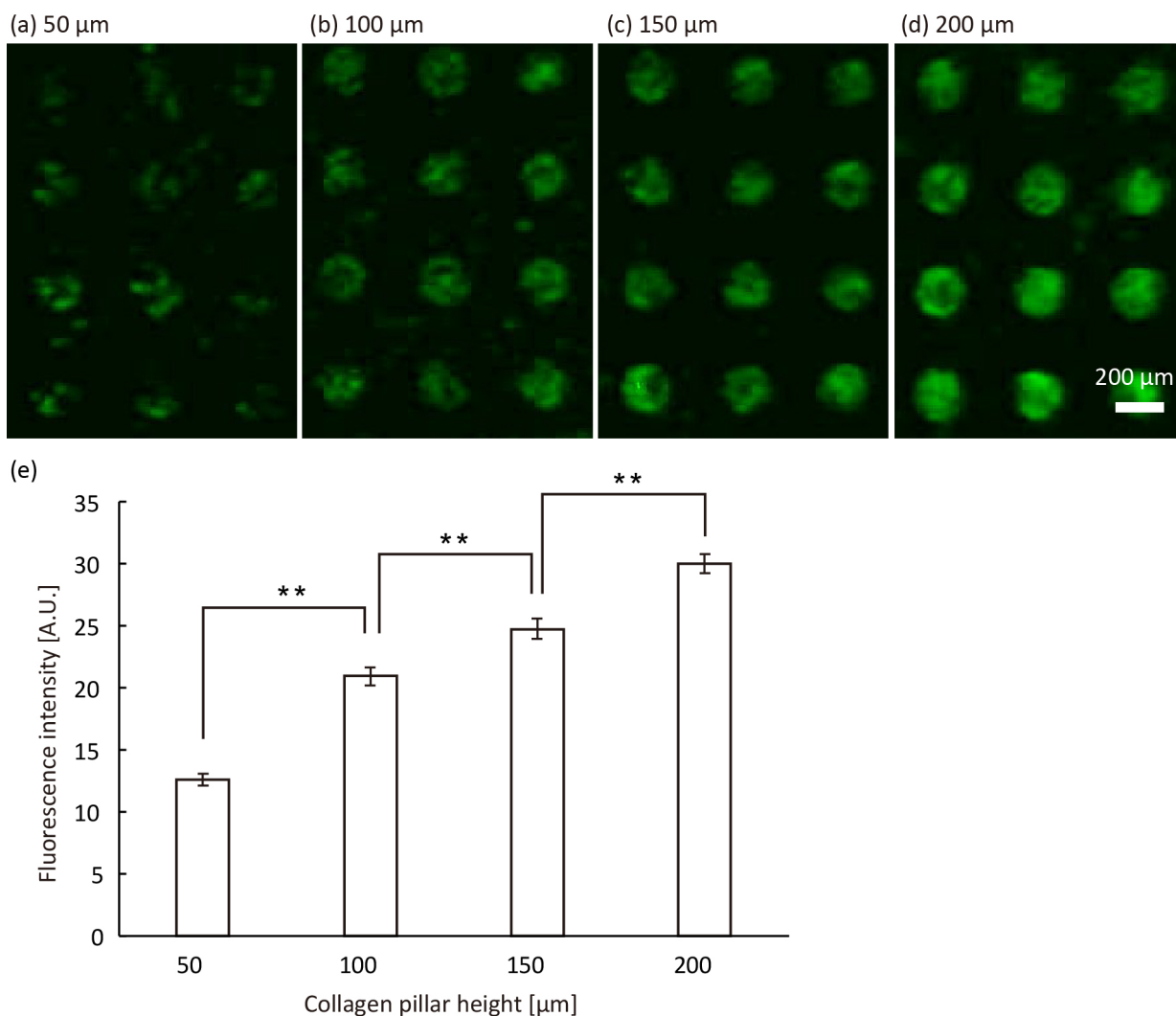


Fig. 3.3 評価用ゲルの高さ と 蛍光輝度 の関係 (a) 円柱の蛍光画像高さ 50 μm (b) 100 μm (c) 150 μm (d) 200 μm (e) 円柱の高さと蛍光輝度のグラフ (Hirata et al., 2019)©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2019 より一部改変

強く、焦点面から遠くなるにつれて蛍光強度が弱くなるからである。

3.3.3 スマートフォン型センサによる観察

本項は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

3.3.4 移動時のノイズ評価

本項は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、非公開とする

3.3.5 GelMA 硬化時間の最適化

GelMA 濃度

GelMA による評価用ゲルの作製に適している濃度を示すため、GelMA の濃度を 2.5% から 7.5% まで、2.5% ずつ変化させて硬化したところ、2.5% では円柱の外形を保つにいたらず、7.5% では円柱の外形がきれいに整形されているように見受けられるが、中心が蛍光試薬であるカルセイン AM で染色されなかった。そのため、外形も円柱状に形成され、細胞の染色もされている 5.0% GelMA を最適な濃度として採用した (Fig. 3.13)。

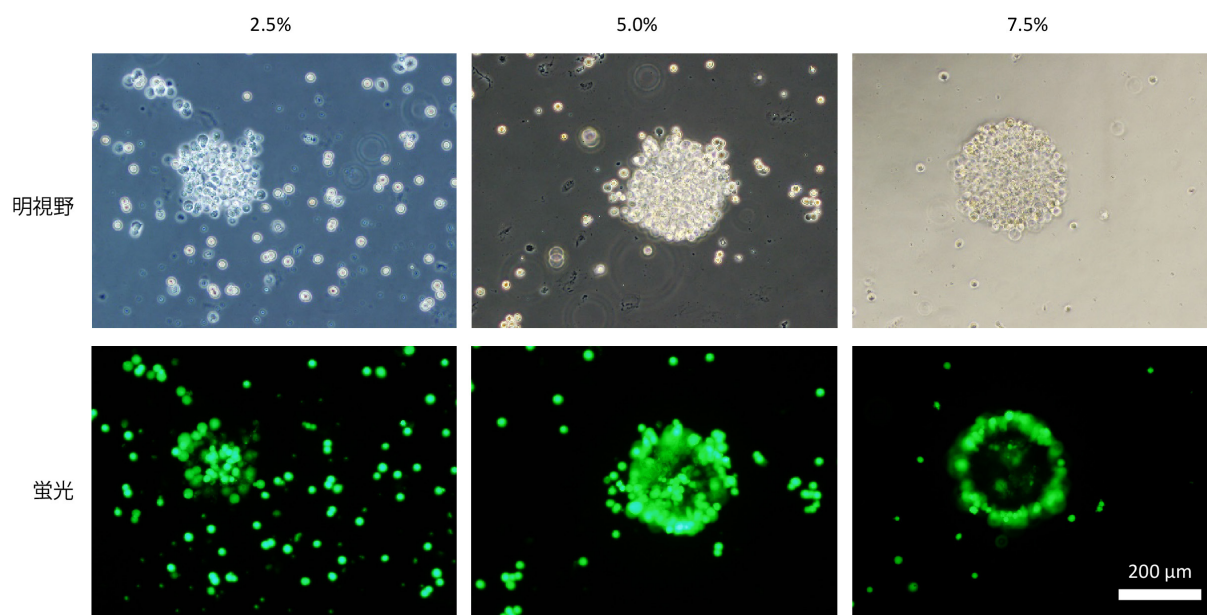


Fig. 3.4 GelMA の濃度による評価用ゲルの外形変化 2.5% では円柱形を維持できず、7.5% では中央の細胞の生存が確認できなかったため、5% 濃度が最適であることが示唆された。

GelMA 硬化時間

GelMA は UV を照射して硬化する時間によっても、硬化具合や細胞へのダメージが変わるため、硬化時間を変化させて live/dead assay を行った。硬化時間 30 秒では、円柱の径が小さくなってしまっているものの、赤色の死細胞として染色されたものは一部であり、多くは生細胞であった。また、1 分硬化すると、円柱の径は大きくなり 200 μm に近づいた。この時 30 秒に比べて死細胞の数が大きく変化した様子は見受けられなかった。一方で、2 分硬化時間をとった GelMA 円柱では外周部の UV 照射が弱い部分の細胞は生きているものの、中心部細胞がほとんど死滅していることが分かっ

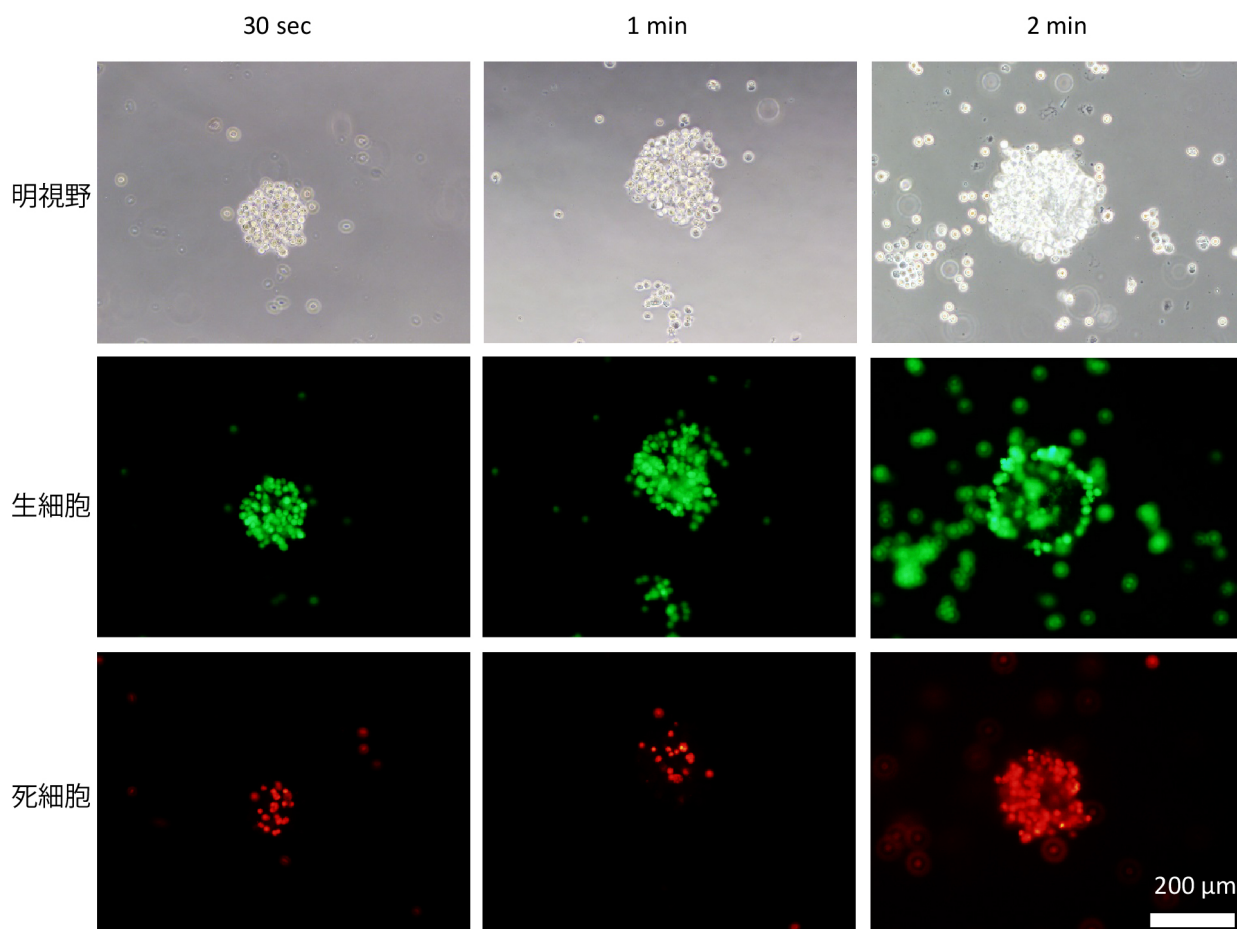


Fig. 3.5 GelMA の硬化時間を変化させたときの live/dead assay 蛍光画像 2min 以上の UV 照射で中心の細胞が死滅することが確認された。

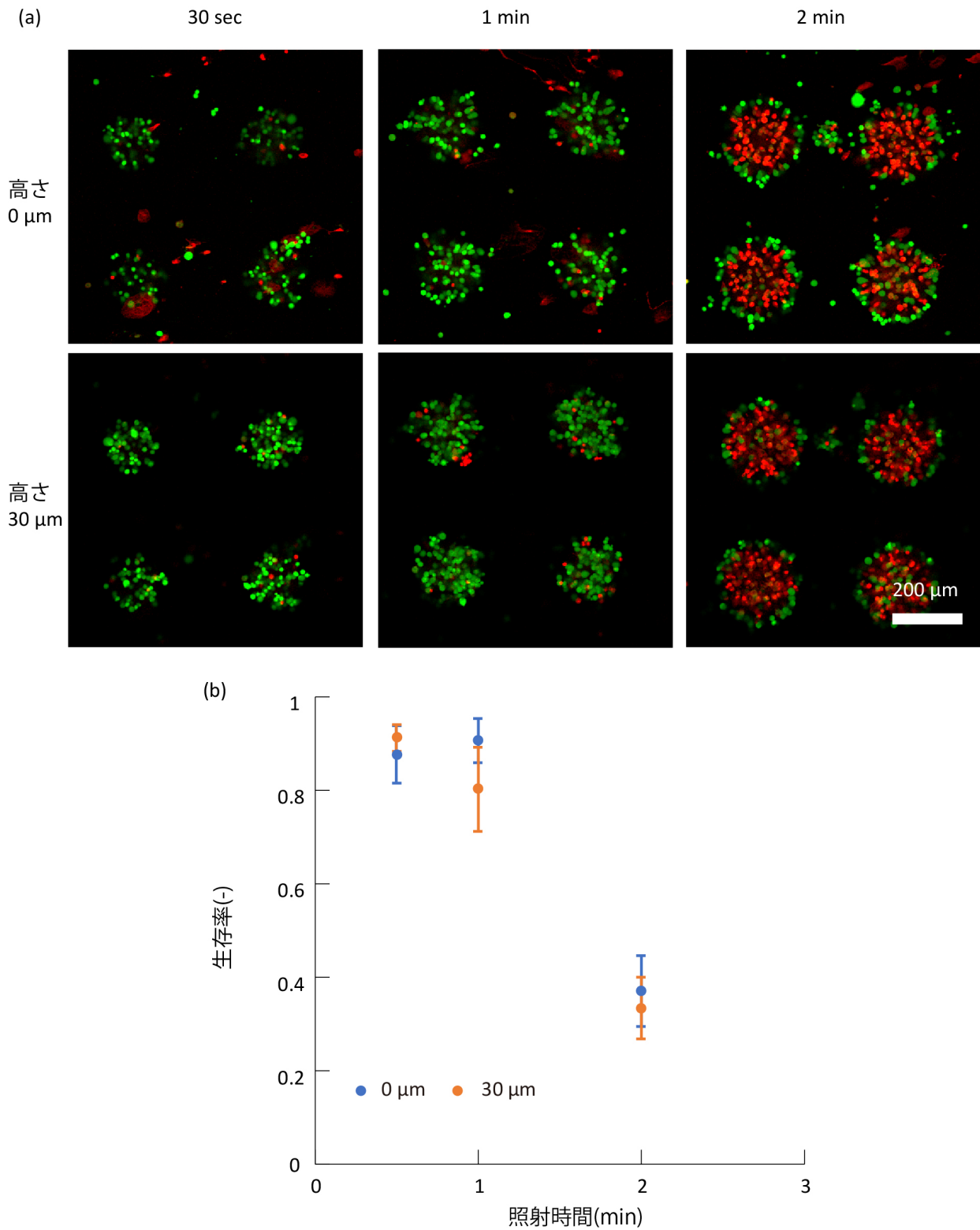
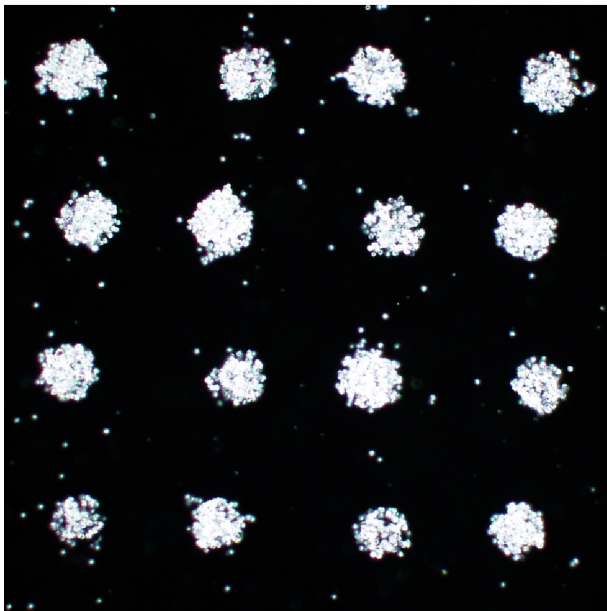


Fig. 3.6 GelMA 円柱内部の生存率 (a)GelMA の硬化時間を変化させたときの live/dead assay 共焦点画像 (b) 照射時間における細胞の生存率 最表部と内部で細胞生存率の差は確認できなかった。

た (Fig. 3.14)。

この観察には倒立型の蛍光顕微鏡を用いて行ったが、円柱は立体であるため、円柱の高さ方向に対してどのような細胞の分布になっているか、また生存率を計測することが難しかった。そこで、焦点面だけを観察することができる共焦点顕微鏡によって最底面と最底面から 30 μm の平面を観察した。30 μm 内側を観察したのは、細胞はおよそ 10-20 μm であり、異なる細胞の集団を観察していると考えたためである。最底面は倒立型蛍光顕微鏡で観察したのと同様に、外形では 30 秒が少し小さく、生存率では 2 分で死細胞が目立つ結果となった。また、30 μm 内部の平面でも最底面と同様の傾向が見られた (Fig. 3.15(a))。共焦点画像からそれぞれ生存率を計算したところ、硬化時間 1 分以内ではおよそ 80% 以上の生存率を示したのに対して、2 分硬化すると 40% 以下の生存率になることが確認できた (Fig. 3.15(b))。また、最底面と内部での生存率は大きく変化していないことが確認された。これらの結果から、5% の GelMA を 1 分で硬化することで、200 μm 径の生存率が高い GelMA 円柱を得られることが分かった。

(a) 明視野



(b) 蛍光

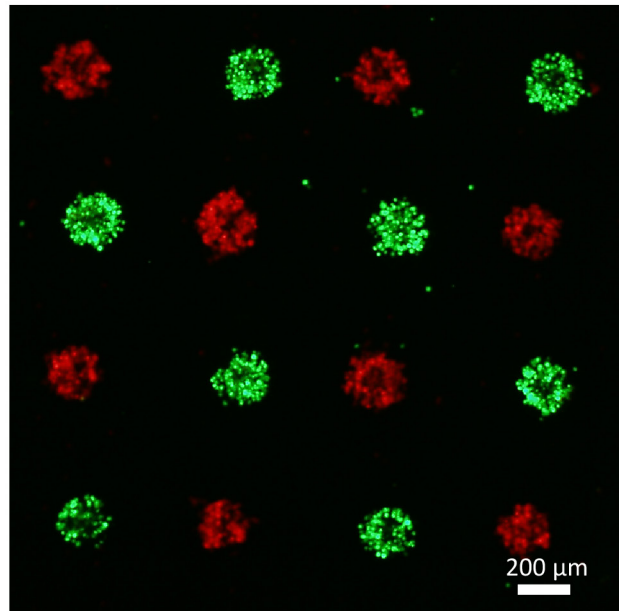


Fig. 3.7 2色に染めた細胞のパターニング 緑の円柱には緑の細胞のみが、赤の円柱には赤の細胞のみがパターンされている様子が確認された。

3.3.6 GelMA 円柱アレイ

条件検討によって求めた GelMA の硬化条件で実際に異なる細胞をアレイ化できるか確認するため、セルトラッカーでそれぞれ赤と緑に染色した細胞のアレイ化を試みた。それぞれ 200 μm の間隔で異なる色の円柱が存在することを確認できた (Fig. 3.16)。また、それぞれの円柱には異なる色の細胞が含まれていないことから、それぞれ独立した素子として使用できると考えられる。

3.3.7 アガロースゲル濃度による細胞の生存率

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.3.8 生体用ボンドが与える細胞への影響

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.3.9 積層ゲルの形態

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.3.10 積層ゲルの寿命評価

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.4 ゲルの応答評価

3.4.1 評価用ゲルの匂い物質応答

細胞がコラーゲンに包含されたまま匂いに対して応答するか、蛍光顕微鏡を用いて確認したところ、平面培養と同様に添加後すぐに蛍光輝度が上昇していく様子が確認

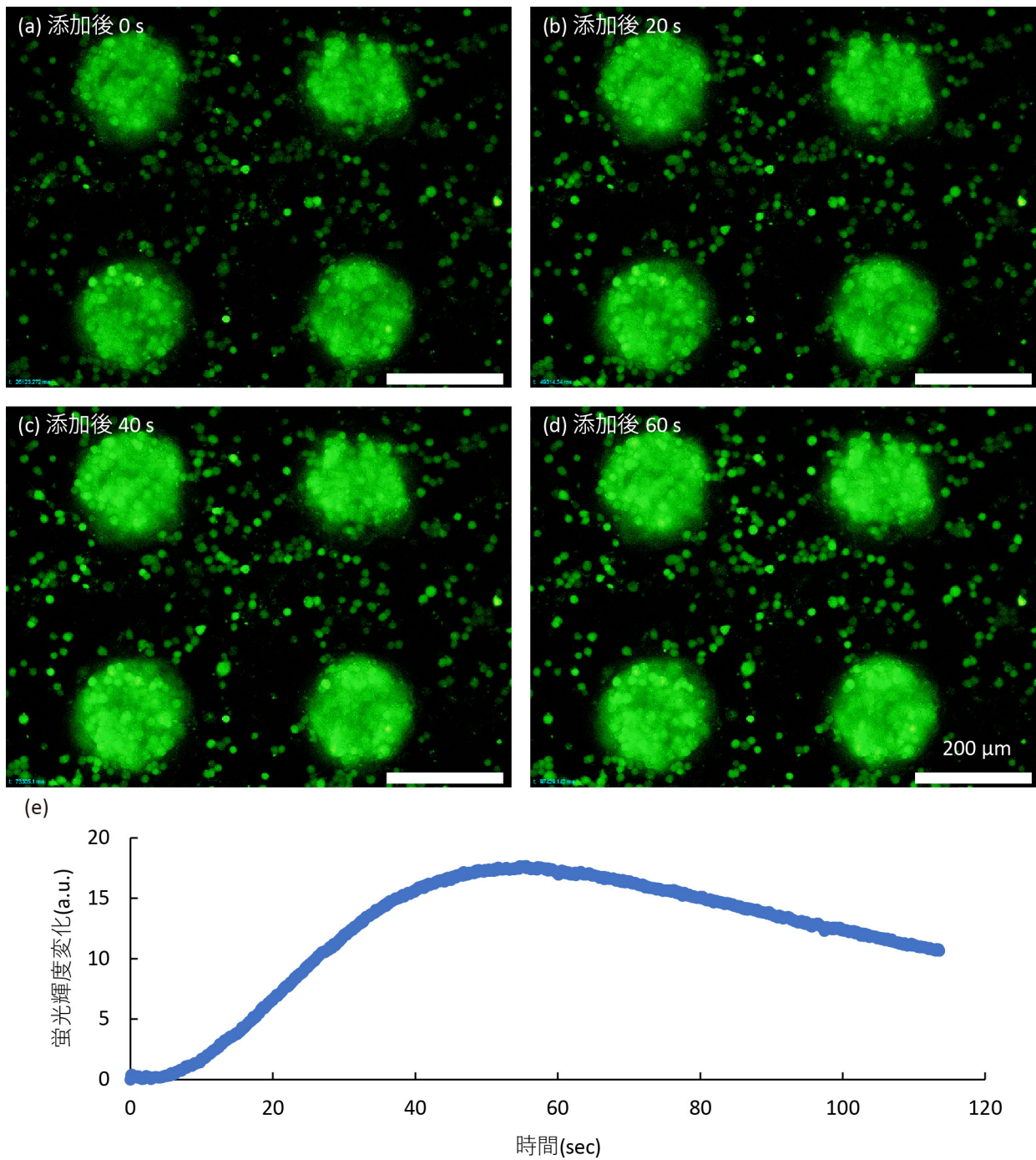


Fig. 3.8 Or98a の平面培養カルシウムイメージング (a) Methyl benzoate 添加後 0 秒 (b) Methyl benzoate 添加後 10 秒 (c) Methyl benzoate 添加後 20 秒 (d) Methyl benzoate 添加後 30 秒 (e) 蛍光輝度の時系列変化

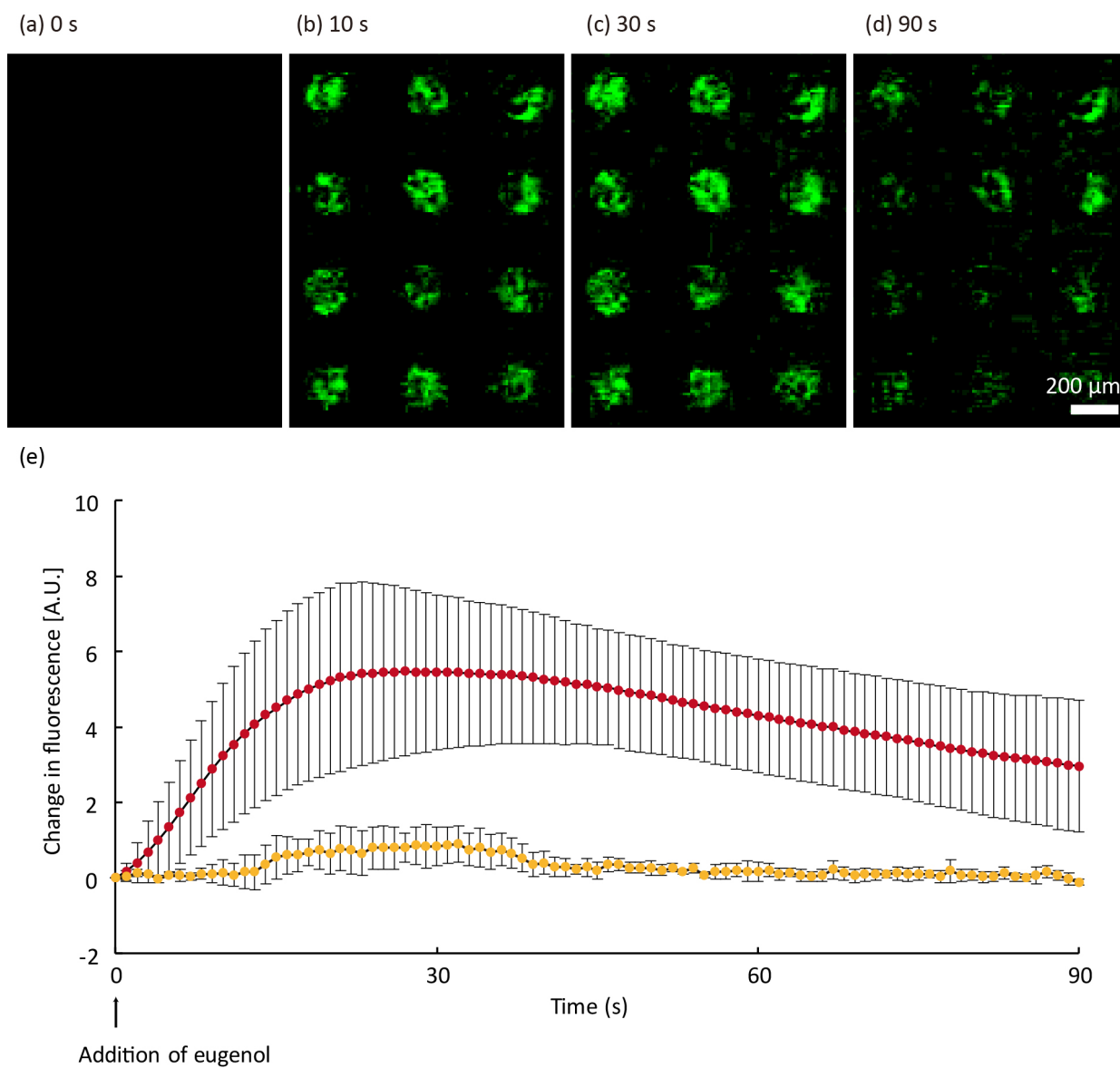


Fig. 3.9 携帯型センサ上での匂い検出 (a) 匂い物質添加後 0 秒後の蛍光輝度変化画像 (b) 10 秒後 (c) 30 秒後 (d) 90 秒後 (Hirata et al., 2019)©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2019 より一部改変

できた (Fig. 3.24(a)-(d))。これは、使用した 0.24% のコラーゲンのネットワークが低分子量の匂い分子の拡散をほとんどさまたげないからだと考えられる (Ramanujan et al., 2002)。また、蛍光輝度を時系列で確認すると、匂い物質添加後すぐに蛍光輝度が上昇を始め、50 秒付近で最大値をとっており、その後は徐々に蛍光輝度が下がっていく様子が確認できた (Fig. 3.24(e))。

3.4.2 携帯型センサによる評価用ゲルの匂い物質応答

感度の劣る CMOS イメージセンサでも、評価用ゲルを用いて匂い物質を検出できるのか確認するため、作製した携帯型デバイスの上で匂い物質を添加した。従来の平面で培養した細胞は、有意なシグナルを生じなかったのに対して、厚みのある評価用ゲルでは、蛍光輝度が上昇していく様子が確認された (Fig. 3.25(a)-(d))。また時系列変化を確認すると、顕微鏡で確認したのと同様の変化が確認されたことから ((Fig. 3.25(e))、平面培養で検出できなかった細胞の匂い物質応答が、円柱状にすることによって蛍光輝度が高まり、携帯型センサでも匂い物質を検出することが可能になったと考えられる。

3.4.3 匂い物質の濃度に対する応答の変化

嗅覚受容体発現細胞はその匂い物質の濃度に応じて、シグナル強度が変化することが知られている。そこで、携帯型センサでも匂い物質の濃度に応じて変化するシグナルを検出できるか確認した。蛍光輝度の変化を確認したところ、0 mM から 2 mM にかけて徐々に蛍光輝度変化が大きくなる様子が確認された (Fig. 3.26(a))。0 mM ではほとんど変化しないか、むしろ蛍光輝度が低下するような傾向が見られたが、これは蛍光試薬が褪色したためだと考えられる。また、0.5 mM と 0 mM の濃度で有意な差があることから、最低 0.5 mM の匂い物質が検出できることが示された (Fig. 3.26(b))。これらの結果から携帯型のセンサでも評価用ゲルを用いて匂い物質の濃度を定量することが可能であることが示された。

3.4.4 選択性の評価

このセンサの選択性を確認するために、オイゲノールとメチルイソオイゲノールに対する反応性を評価した。両者は非常に似た構造を持っており、どちらも嗅覚受容体である mOR-EG に結合することが知られているが、オイゲノールが結合した際は細胞シグナルの伝達が行われ、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇するアゴニストであ

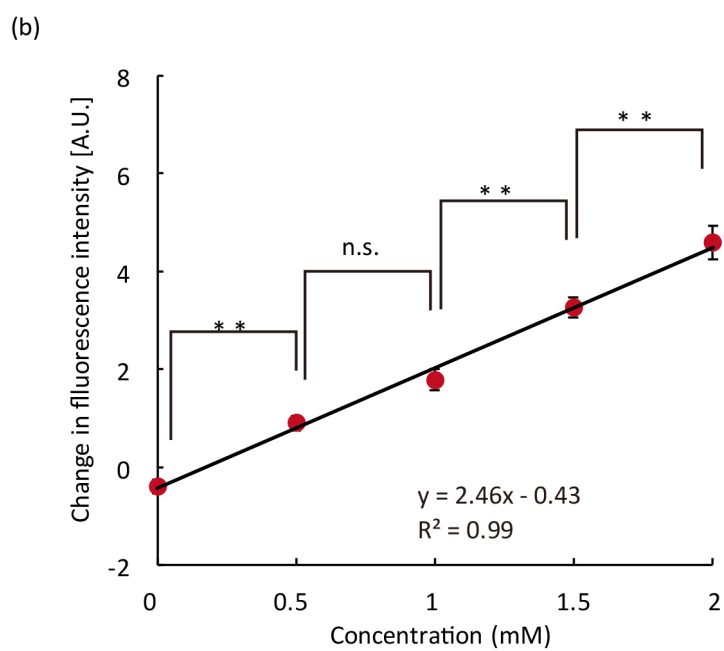
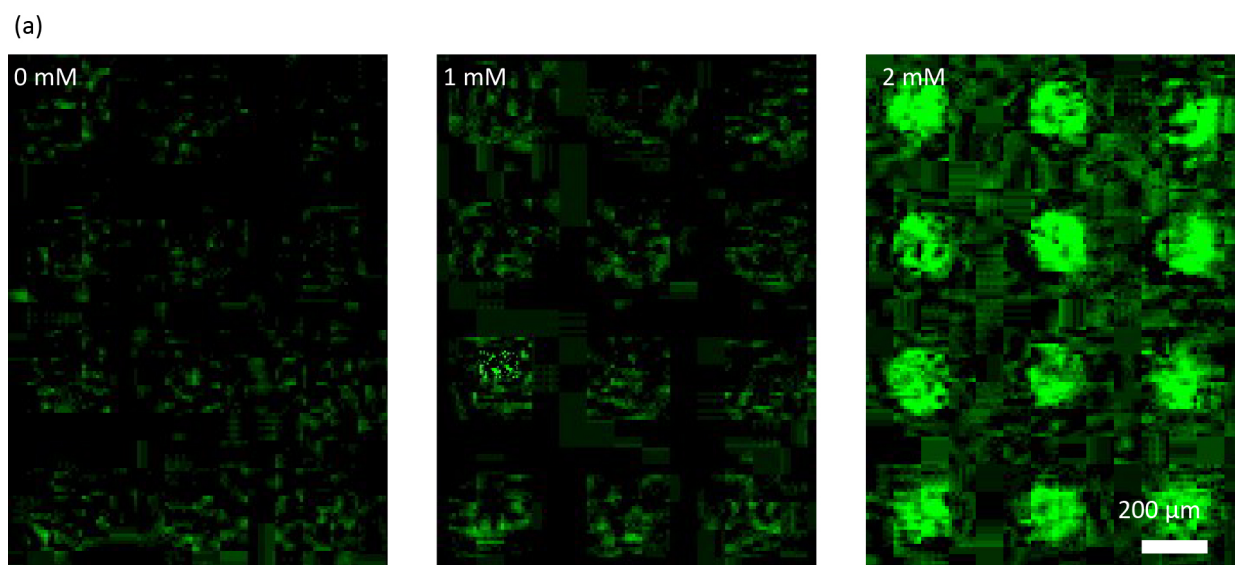


Fig. 3.10 携帯型センサ上での匂い検出 (a) 匂い物質添加後 0 秒後の蛍光輝度変化画像 (b) 10 秒後 (c) 30 秒後 (d) 90 秒後 (Hirata et al., 2019)©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2019 より一部改変

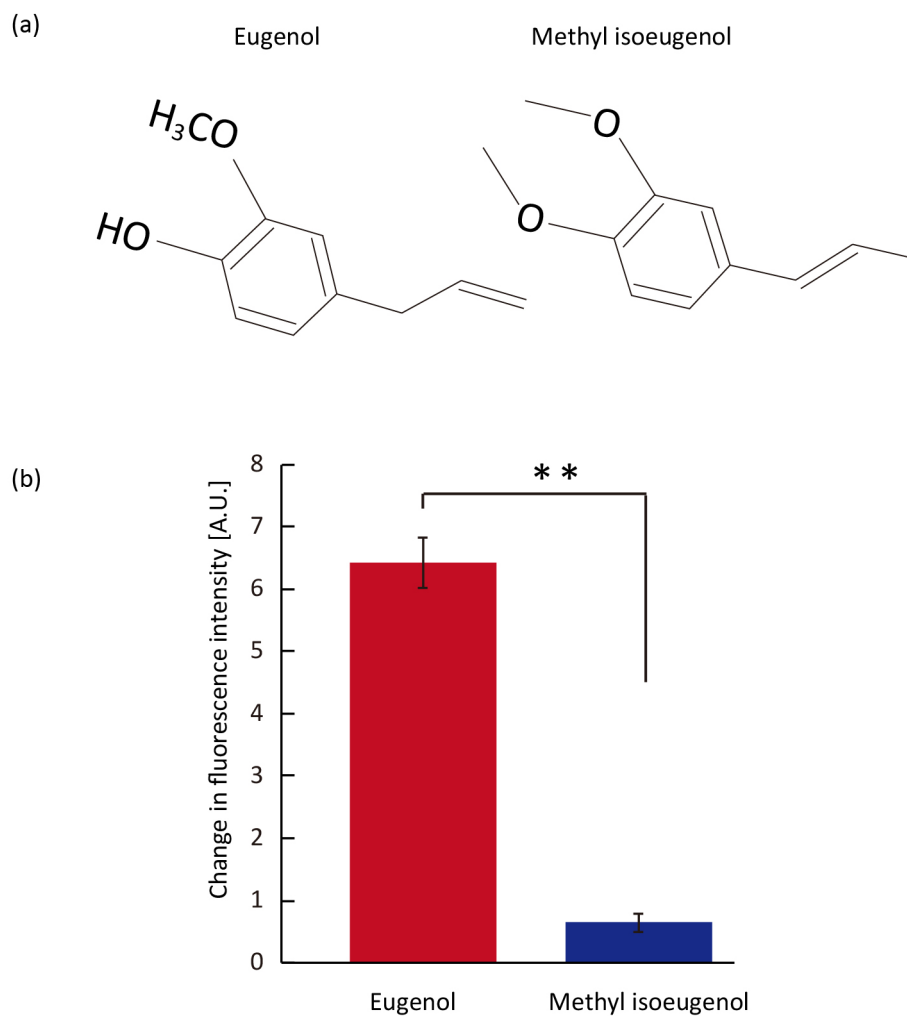


Fig. 3.11 GelMA の濃度による評価用ゲルの外形変化 (Hirata et al., 2019)©ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY 2019 より一部改変

る一方、メチルイソオイゲノールは結合してもシグナル伝達が行われないアンタゴニストである。評価用ゲルは、オイゲノールを添加すると蛍光輝度が上昇するのに対して、メチルイソオイゲノールでは反応しないことが確認された (Fig. 3.27)。このことから、評価用ゲル内の細胞も選択性を保ちながら、匂いを識別することが可能であることが示された。

3.4.5 スマートフォン型センサによる評価用ゲルの匂い物質応答

本項は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

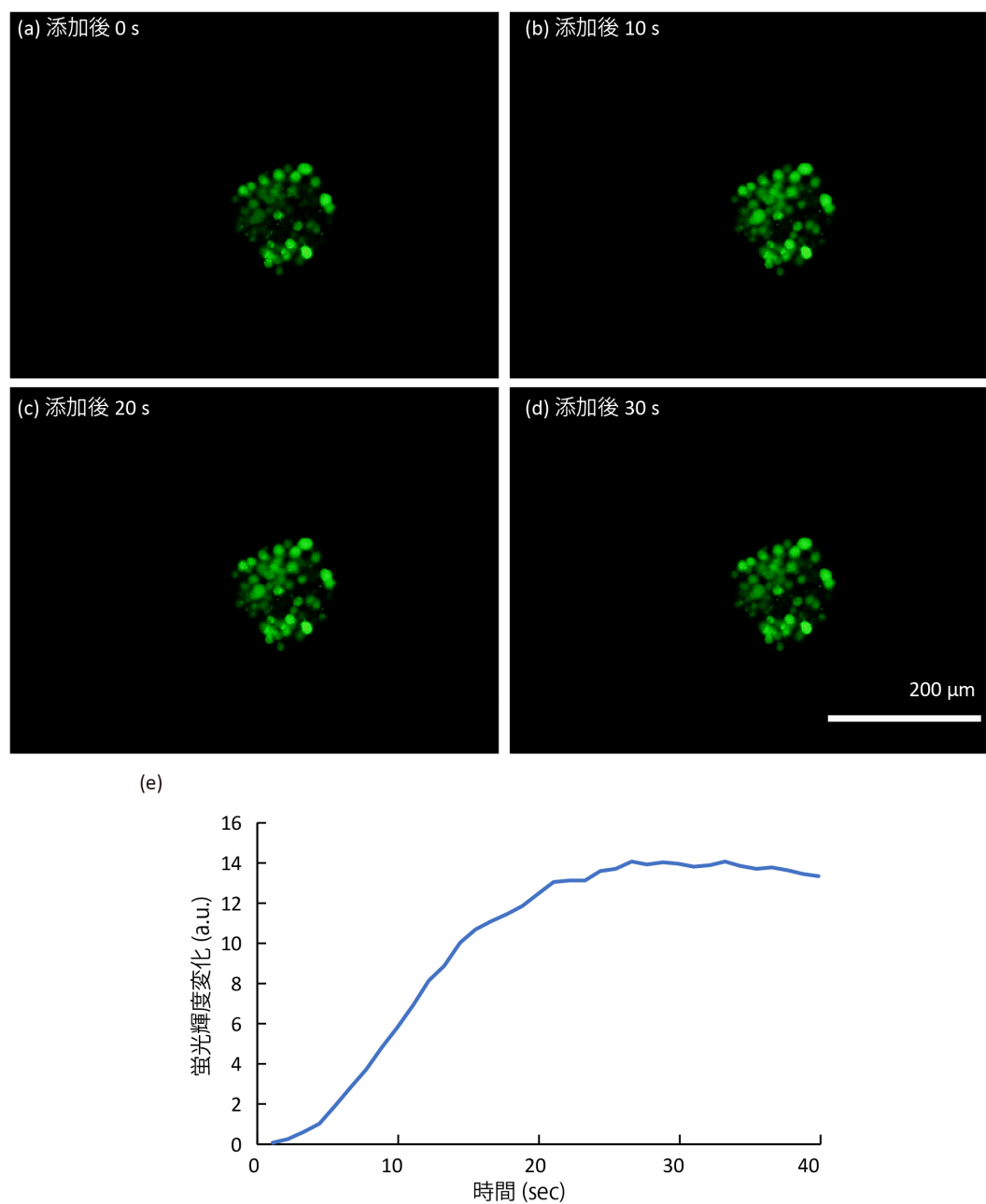


Fig. 3.12 GelMA 円柱の匂い応答観察

3.4.6 GelMA 評価用ゲルの匂い物質応答

GelMA 円柱でアレイを作製できることが分かったので、匂い応答細胞が GelMA 内で匂い物質に対して応答するか、蛍光顕微鏡を用いてカルシウムイメージングにより確認した。匂いを滴下後 10 秒ごとに撮影した画像を確認したところ、円柱の中心の一部の蛍光輝度が上昇している様子が確認できた (Fig. 3.29(a)-(d))。円柱全体の蛍光輝度の変化を時系列で確認したところ、滴下後すぐに蛍光輝度が上昇していく様子が確認できた (Fig. 3.29(e))。しかしながら、画像で確認されたように円柱の一部しか輝度が上昇しなかった。光硬化性のゲルは硬化に際して UV 光を当てる必要があり、また光重合開始剤からフリーラジカルが発生するため、細胞の生存率に大きな影響はないものの、GelMA の硬化によって少なからず細胞の膜表面に存在する受容体などにダメージを与えられた結果、匂いに対する応答の低下につながっているのではないかと考えられる。

3.4.7 異なる濃度に対する積層ゲルアレイの反応

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.4.8 積層ゲルを用いた匂いセンサの再利用性

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.4.9 積層ゲルアレイを用いた気相検出

本項は雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、
非公開とする

3.4.10 積層ゲルを用いた匂いセンサアレイの匂い物質応答

本項は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

3.5 結言

本節は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

第 4 章

結 論

4.1 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。

本研究で示した PDMS モールドに細胞の積層方法を用いることで、再現性高く評価用ゲルを構築することに成功した。また、円柱の高さを変えながらシグナルの強さを計測することで、積層という手法がシグナルの強度を高めることを示した。加えて、オンサイトでの匂い検出に対する応用可能性を示すために、携帯型デバイス上で匂い応答反応を観察したところ、従来の平面培養では検出できないシグナルを評価用ゲルを用いることで観察することができた。さらに、このセンサの定量性及び選択性が失われていないことが判明し、評価用ゲルのオンサイト匂い検出に対する利用可能性が示された。本方法によるシグナルの増強は感度の低い小型センサでの蛍光応答を検出するのはもちろんのこと、細胞自体の蛍光応答が弱い際にも用いることができるため、細胞匂いセンサの開発に役立つことが期待される。

また、スマートフォン型センサを作製するに当たり、より実際の使用状況に近い移動時のノイズを加えることで蛍光輝度値の変化を解析し、画像解析の方法を工夫する

ことでノイズを低減できることを示した。これは、匂いセンサを作製する上で細胞や計測機器をどのように使用するかというハードウェア的な取り組みだけでなく、得られたシグナルの解析方法など、ソフトウェア的な取り組みによって匂いセンサの性能が上がることを示唆している。

厚み方向に対する蛍光の累積を活かしながら、異なる種類の細胞をアレイ化する方法として、細胞を懸濁したゲルの硬化を繰り返して積層する方法を構築した。本方法ではおよそ 300 μm 間隔に異なる種類の細胞が含まれたレイヤーが配置される。本方法を用いて嗅覚受容体である Or47a と Or98a をアレイ化したところ、ペンチルアセテートには Or47a と Or98a が、ヘキシルアセテートには Or47a が、メチルベンゾエートには Or98a がそれぞれ反応し、この反応したレイヤーの組み合わせにより 3 種類の匂い物質の識別に成功した。このような反応をパターンとして識別する方法は生体でひろく用いられている一方で、細胞センサで識別した例は初めてであり、多様な匂い物質を検出できるセンサを構築する際に役立つ知見となると考えられる。

4.2 今後の展望

本研究ではシグナルの増強とアレイ化の 2 点について実証を行った。シグナル増強に関しては、センサにおいてメインピックであり、細胞センサにおいてはシグナル経路の改変から、タンパク質の共発現まで様々な方法が試みられてきた。今回提案した厚み方向の累積という方法は、1 細胞内でのシグナル増強ではなく、複数の細胞からのシグナルを集積することで強度を高めるというものであり、従来の方法と同時に使用することが可能である。また、シグナル増強の応用として示した携帯型センサでの匂い検出は、ウェブカメラやスマートフォンでの匂い検出の可能性を示しており、現在匂い検出によって爆発物や麻薬などの探索を行っている保安分野、自宅や災害現場で病気の診断を必要としている POCT の分野で、持ち運べる匂いセンサとしての発展が期待できる。その他にも、細胞の蛍光観察は匂いセンサに限らず様々な分野で用いられているため、医薬品のスクリーニング等、匂い応答検出以外への応用も期待できる。

次にアレイ化に関しては、本研究で 2 種類の嗅覚受容体を用いて 3 種類の匂い物質を分類できることを示した。これは従来の n 個の受容体で n 個の匂い物質を検出することから、 n 個の受容体を使って $2^n - 1$ 個の匂い物質を分類するために必要な一歩である。遺伝子導入効率の低さや、嗅覚受容体とアクセサリタンパクを共発現させないと反応強度が上がらないなど、使用できる n 個の受容体には現状限りがあるが、遺伝

子改変等で使用できる嗅覚受容体数が増えることで、識別できる匂い物質が指数関数的に増加していくことが期待できる。また、匂い物質によって細胞が反応する強度が違うということも明らかになっている。そのため、もし匂い物質に対する応答を k 個の閾値で区切ることができると、 k^n-1 個の匂い物質が分類できるようになり、さらに分類できる匂い物質が増加する。厚み方向によるシグナルの増強により、区切ることができる k 個の数が増大するのではないかと期待される。これらの特性から、食べ物のような複数の匂い物質から構成される食品を見分ける検疫などの用途で有用なセンサが作製できるのではないかと考えている。

参考文献

- Benbernou, N. et al. (2011) 'cAMP and IP3 Signaling Pathways in HEK293 Cells Transfected with Canine Olfactory Receptor Genes', *Journal of Heredity*, 102(Suppl_1), pp. S47–S61. doi: 10.1093/jhered/esr033.
- Corcelli, A. et al. (2010) 'Detection of explosives by olfactory sensory neurons', *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), pp. 1096–1100. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.054.
- Dacres, H. et al. (2011) 'Greatly enhanced detection of a volatile ligand at femtomolar levels using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier B.V., 29(1), pp. 119–124. doi: 10.1016/j.bios.2011.08.004.
- Von Dannecker, L. E. C., Mercadante, A. F. and Malnic, B. (2006) 'Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), pp. 9310–9314. doi: 10.1073/pnas.0600697103.
- Datta-Chaudhuri, T. et al. (2016) 'Olfaction on a chip', *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier B.V., 235, pp. 74–78. doi: 10.1016/j.snb.2016.05.048.
- Du, L., Wu, C., Peng, H., Zhao, L., et al. (2013) 'Bioengineered olfactory sensory neuron-based biosensor for specific odorant detection', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 40(1), pp. 401–406. doi: 10.1016/j.bios.2012.08.035.
- Du, L., Wu, C., Peng, H., Zou, L., et al. (2013) 'Piezoelectric olfactory receptor biosensor prepared by aptamer-assisted immobilization', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier B.V., 187, pp. 481–487. doi: 10.1016/j.snb.2013.02.009.
- Du, L. et al. (2014) 'Label-free functional assays of chemical receptors using a bioengineered cell-based biosensor with localized extracellular acidification measurement', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 54, pp. 623–627. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.049.
- Du, L. et al. (2015) 'A novel biomimetic olfactory cell-based biosensor with DNA-directed site-specific immobilization of cells on a microelectrode array', *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Elsevier B.V., 217, pp. 186–192. doi: 10.1016/j.snb.2014.08.054.
- Edwards, T. L. et al. (2015) 'Giant African pouched rats (*Cricetomys gambianus*) that work on tilled soil accurately detect land mines', *Journal of Applied Behavior Analysis*, 48(3), pp. 696–700. doi: 10.1002/jaba.214.
- Elsaesser, R. et al. (2005) 'Phosphatidyl-inositide signalling proteins in a novel class of sensory

cells in the mammalian olfactory epithelium' , *European Journal of Neuroscience*, 21(10), pp. 2692–2700. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04108.x.

Figueroa, X. A. et al. (2010) 'Large-scale investigation of the olfactory receptor space using a microfluidic microwell array' , *Lab on a Chip*, 10(9), pp. 1120–1127. doi: 10.1039/b920585c.

Fukutani, Y. et al. (2015) 'Improving the odorant sensitivity of olfactory receptor-expressing yeast with accessory proteins' , *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc., 471, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.ab.2014.10.012.

Gao, K. et al. (2019) 'Integrated olfaction, gustation and toxicity detection by a versatile bioengineered cell-based biomimetic sensor' , *Bioelectrochemistry*. Elsevier B.V., 128, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.02.009.

Goldsmith, B. R. et al. (2011) 'Biomimetic Chemical Sensors using Nanoelectronic Read out of Olfactory Receptor Proteins.' , *ACS nano*, (7), pp. 5408–5416. doi: 10.1021/nn200489j.

Gong, X. et al. (2015) 'Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing' , *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0130348.

Guo, H. and Smith, D. P. (2017) 'Odorant Receptor Desensitization in Insects' , *Journal of Experimental Neuroscience*, 11, pp. 1–5. doi: 10.1177/1179069517748600.

Habasaki, S. et al. (2015) 'Vertical Flow Lithography for Fabrication of 3D Anisotropic Particles' , *Small*, 11(48), pp. 6391–6396. doi: 10.1002/smll.201502968.

Hallem, E. A., Ho, M. G. and Carlson, J. R. (2004) 'The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna' , *Cell*, 117(7), pp. 965–979. doi: 10.1016/j.cell.2004.05.012.

Halty-deLeon, L. et al. (2016) 'The mouse receptor transporting protein RTP1S and the fly SNMP1 support the functional expression of the *Drosophila* odorant coreceptor Orco in mammalian culture cells' , *Journal of Neuroscience Methods*. Elsevier B.V., 271, pp. 149–153. doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.07.005.

Hirata, Y. et al. (2019) 'Portable biohybrid odorant sensors using cell-laden collagen micropillars' , *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry, 19(11), pp. 1971–1976. doi: 10.1039/C9LC00131J.

Kiely, A. et al. (2007) 'Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells' , *Journal of Neuroscience Methods*, 159(2), pp. 189–194. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.07.005.

-
- Krautwurst, D. et al. (1998) 'Identification of Ligands for Olfactory Receptors' , 95, pp. 917–926.
- Lee, S. H. et al. (2009) 'Cell-based olfactory biosensor using microfabricated planar electrode' , *Biosensors and Bioelectronics*, 24(8), pp. 2659–2664. doi: 10.1016/j.bios.2009.01.035.
- Lee, S. H. et al. (2015) 'Bioelectronic nose combined with a microfluidic system for the detection of gaseous trimethylamine' , *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 71, pp. 179–185. doi: 10.1016/j.bios.2015.04.033.
- Lee, S. H., Ko, H. J. and Park, T. H. (2009) 'Real-time monitoring of odorant-induced cellular reactions using surface plasmon resonance' , *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), pp. 55–60. doi: 10.1016/j.bios.2009.06.007.
- Lee, S. H., Oh, E. H. and Park, T. H. (2015) 'Cell-based microfluidic platform for mimicking human olfactory system' , *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 74, pp. 554–561. doi: 10.1016/j.bios.2015.06.072.
- Ling, S. et al. (2010) 'The fabrication of an olfactory receptor neuron chip based on planar multi-electrode array and its odor-response analysis' , *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier B.V., 26(3), pp. 1124–1128. doi: 10.1016/j.bios.2010.08.071.
- Liu, Q., Ye, W., Xiao, L., et al. (2010) 'Extracellular potentials recording in intact olfactory epithelium by microelectrode array for a bioelectronic nose' , *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier B.V., 25(10), pp. 2212–2217. doi: 10.1016/j.bios.2010.02.024.
- Liu, Q., Ye, W., Yu, H., et al. (2010) 'Olfactory mucosa tissue-based biosensor : A bioelectronic nose with receptor cells in intact olfactory epithelium' , *Sensors & Actuators: B. Chemical*. Elsevier B.V., 146(2), pp. 527–533. doi: 10.1016/j.snb.2009.12.032.
- Liu, Q., Ye, W., Hu, N., et al. (2010) 'Olfactory receptor cells respond to odors in a tissue and semiconductor hybrid neuron chip' , *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier B.V., 26(4), pp. 1672–1678. doi: 10.1016/j.bios.2010.09.019.
- Liu, Q. et al. (2012) 'Olfactory epithelium biosensor : odor discrimination of receptor neurons from a bio-hybrid sensing system' , *Biomedical Microdevices*, pp. 1055–1061. doi: 10.1007/s10544-012-9705-0.
- Machado, R. F. et al. (2005) 'Detection of Lung Cancer by Sensor Array Analyses of Exhaled Breath' , *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), pp. 1286–1291. doi: 10.1164/rccm.200409-1184OC.

- Marrakchi, M. et al. (2007) 'A new concept of olfactory biosensor based on interdigitated microelectrodes and immobilized yeasts expressing the human receptor OR17-40', *European Biophysics Journal*, 36(8), pp. 1015–1018. doi: 10.1007/s00249-007-0187-6.
- Misawa, N. et al. (2010) 'Highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(35), pp. 15340–15344. doi: 10.1073/pnas.1004334107.
- Mitsuno, H. et al. (2015) 'Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 65, pp. 287–294. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.026.
- Mulla, M. Y. et al. (2015) 'Capacitance-modulated transistor detects odorant binding protein chiral interactions', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6, p. 6010. doi: 10.1038/ncomms7010.
- Münch, D. and Galizia, C. G. (2016) 'DoOR 2.0 - Comprehensive Mapping of *Drosophila melanogaster* Odorant Responses', scientific report. Nature Publishing Group, (February), pp. 1–14. doi: 10.1038/srep21841.
- Oh, E. H., Lee, Seung Hwan, et al. (2014) 'Cell-based high-throughput odorant screening system through visualization on a microwell array', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 53, pp. 18–25. doi: 10.1016/j.bios.2013.09.039.
- Oh, E. H., Lee, Sang Hun, et al. (2014) 'Odorant detection using liposome containing olfactory receptor in the SPR system', *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier B.V., 198, pp. 188–193. doi: 10.1016/j.snb.2014.03.042.
- Oh, E. H. et al. (2015) 'Coupling of olfactory receptor and ion channel for rapid and sensitive visualization of odorant response', *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc., 22, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.actbio.2015.04.034.
- Panigrahi, S. et al. (2012) 'Olfactory receptor-based polypeptide sensor for acetic acid VOC detection', *Materials Science and Engineering C*. Elsevier B.V., 32(6), pp. 1307–1313. doi: 10.1016/j.msec.2011.11.003.
- Park, K. C. et al. (2002) 'Odor Discrimination using Insect Electroantennogram Responses from an Insect Antennal Array', *Chem Senses*, pp. 343–352. doi: 10.1093/chemse/27.4.343.
- Pilatus, U. et al. (2001) 'Real-time measurements of cellular oxygen consumption, pH, and energy metabolism using nuclear magnetic resonance spectroscopy', *Magnetic Resonance*

-
- in *Medicine*, 45(5), pp. 749–755. doi: 10.1002/mrm.1102.
- Radhika, V. et al. (2007) ‘Chemical sensing of DNT by engineered olfactory yeast strain’ , *Nature Chemical Biology*, 3(6), pp. 325–330. doi: 10.1038/nchembio882.
- Ramanujan, S. et al. (2002) ‘Diffusion and Convection in Collagen Gels: Implications for Transport in the Tumor Interstitium’ , *Biophysical Journal*, 83(3), pp. 1650–1660. doi: 10.1016/S0006-3495(02)73933-7.
- Ramón-Azcón, J. et al. (2012) ‘Gelatin methacrylate as a promising hydrogel for 3D microscale organization and proliferation of dielectrophoretically patterned cells’ , *Lab on a Chip*, 12(16), p. 2959. doi: 10.1039/c2lc40213k.
- Saito, H. et al. (2004) ‘RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors’ , *Cell*, 119(5), pp. 679–691. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.021.
- Sakurai, T. et al. (2011) ‘A single sex pheromone receptor determines chemical response specificity of sexual behavior in the silkworm *Bombyx mori*’ , *PLoS Genetics*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pgen.1002115.
- Sato, K. and Takeuchi, S. (2014) ‘Chemical Vapor Detection Using a Reconstituted Insect Olfactory Receptor Complex’ , *Angewandte Chemie International Edition*, 53(44), pp. 11798–11802. doi: 10.1002/anie.201404720.
- Shepard, B. D. et al. (2013) ‘A Cleavable N-Terminal Signal Peptide Promotes Widespread Olfactory Receptor Surface Expression in HEK293T Cells’ , *PLoS ONE*, 8(7), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0068758.
- Shiba, K. et al. (2017) ‘Data-driven nanomechanical sensing: Specific information extraction from a complex system’ , *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-03875-7.
- Smart, R. et al. (2008) ‘Drosophila odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins’ , *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(8), pp. 770–780. doi: 10.1016/j.ibmb.2008.05.002.
- Soleja, N. et al. (2019) ‘FRET-based nanosensors for monitoring and quantification of alcohols in living cells’ , *Organic and Biomolecular Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 17(9), pp. 2413–2422. doi: 10.1039/c8ob03208d.
- Su, C. Y., Menuz, K. and Carlson, J. R. (2009) ‘Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits’ , *Cell*, 139(1), pp. 45–59. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.015.
- Sukekawa, Y. et al. (2019) ‘Odor Discrimination Using Cell-Based Odor Biosensor System

- With Fluorescent Image Processing’ , *IEEE Sensors Journal*, 19(17), pp. 7192–7200. doi: 10.1109/jsen.2019.2916377.
- Suska, A. et al. (2009) ‘G protein-coupled receptor mediated trimethylamine sensing’ , *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), pp. 715–720. doi: 10.1016/j.bios.2009.08.012.
- Suzuki, M. et al. (2016) ‘Deciphering the Receptor Repertoire Encoding Specific Odorants by Time-Lapse Single-Cell Array Cytometry’ , *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 19934. doi: 10.1038/srep19934.
- Tanada, N. et al. (2012) ‘Dissociated neuronal culture expressing ionotropic odorant receptors as a hybrid odorant biosensor—proof-of-concept study’ , *The Analyst*, 137(15), p. 3452. doi: 10.1039/c2an35058k.
- Termtanasombat, M. et al. (2016) ‘Cell-Based Odorant Sensor Array for Odor Discrimination Based on Insect Odorant Receptors’ , *Journal of Chemical Ecology*. *Journal of Chemical Ecology*, 42(7), pp. 716–724. doi: 10.1007/s10886-016-0726-7.
- Terutsuki, D. et al. (2018) ‘Increasing cell–device adherence using cultured insect cells for receptor-based biosensors’ , *Royal Society Open Science*, 5(3), p. 172366. doi: 10.1098/rsos.172366.
- Wagner, B. A., Venkataraman, S. and Buettner, G. R. (2011) ‘The rate of oxygen utilization by cells’ , *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 51(3), pp. 700–712. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024.
- Willis, C. M. et al. (2004) ‘Olfactory detection of human bladder cancer by dogs: proof of principle study’ , *BMJ*, 329(7468), p. 712. doi: 10.1136/bmj.329.7468.712.
- Wu, C. et al. (2009) ‘A novel biomimetic olfactory-based biosensor for single olfactory sensory neuron monitoring’ , *Biosensors and Bioelectronics*, 24(5), pp. 1498–1502. doi: 10.1016/j.bios.2008.07.065.
- Wu, C. et al. (2011) ‘A novel surface acoustic wave-based biosensor for highly sensitive functional assays of olfactory receptors’ , *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 407(1), pp. 18–22. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.073.
- Wu, T. Z. (1999) ‘A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: Electronic nose’ , *Biosensors and Bioelectronics*, 14(1), pp. 9–18. doi: 10.1016/S0956-5663(98)00086-4.
- Xu, Q., Lu, D. and Pang, G. (2019) ‘Study on Bombykol Receptor Self-Assembly and Universality of G Protein Cellular Signal Amplification System’ , *ACS Sensors*. American

Chemical Society, 4(1), pp. 257–264. doi: 10.1021/acssensors.8b01446.

Yeh, J. et al. (2006) ‘Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels’ , *Biomaterials*, 27(31), pp. 5391–5398. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.005.

Yoshikawa, K. and Touhara, K. (2008) ‘Myr-Ric-8A Enhances G 15-Mediated Ca²⁺ Response of Vertebrate Olfactory Receptors’ , *Chemical Senses*, 34(1), pp. 15–23. doi: 10.1093/chemse/bjn047.

Zhang, D. et al. (2015) ‘Smartphone-based portable biosensing system using impedance measurement with printed electrodes for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) detection’ , *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 70, pp. 81–88. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.004.

付録 A 薬品、培地

本研究で使用した薬品、培地を以下にまとめる.

DMEM D5796	Sigma-Aldrich
細胞培養用ウシ胎児血清 (FBS)	Biosera
リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 1102P05	細胞科学研究所
水酸化ナトリウム	和光純薬工業株式会社
炭酸水素ナトリウム	ナカライテスク
HEPES	和光純薬工業株式会社
AR-M2	株式会社キーエンス
AR-S1	株式会社キーエンス
パリレン C	Cookson Electronics
エタノール	関東化学株式会社
2- プロパノール	関東化学株式会社
アセトン	関東化学株式会社
PDMS のエラストマー Sylpot184	Dow Corning Toray
硬化剤 Sylpot184 CAT	Dow Corning Toray
光硬化性樹脂 HTM140	Envision Tec
ウシ血清アルブミン (BSA)	Sigma-Aldrich
TMAH 2.38%	多摩化学工業株式会社
プラスミド精製キット	QIAGEN
コラーゲン (3 mg/ml)	新田ゼラチン株式会社
コラーゲン (5 mg/ml)	株式会社高研
HBSS	Thermo Fisher Scientific
HY 液	和光純薬工業株式会社
No.3 ガラス	松並硝子工業株式会社
SU-8 ドライフィルム	日本化薬
SU-8 ディベロッパ	日本化薬

SFMIII medium	Thermo Fisher Scientific
Grace medium	Thermo Fisher Scientific
Cellfectin	Thermo Fisher Scientific
TransIT	タカラバイオ
4% パラホルムアルデヒド	武藤化学
ジメチルスルホキシド	関東化学
オイゲノール	Sigma-Aldrich
ペンチルアセテート	東京化成工業
ヘキシルアセテート	東京化成工業
メチルベンゾエート	東京化成工業

付録 B 円柱検出のためのプログラム

本節は雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、
非公開とする

付録 C ブラスミドの配列

myc-Or10a 挿入配列

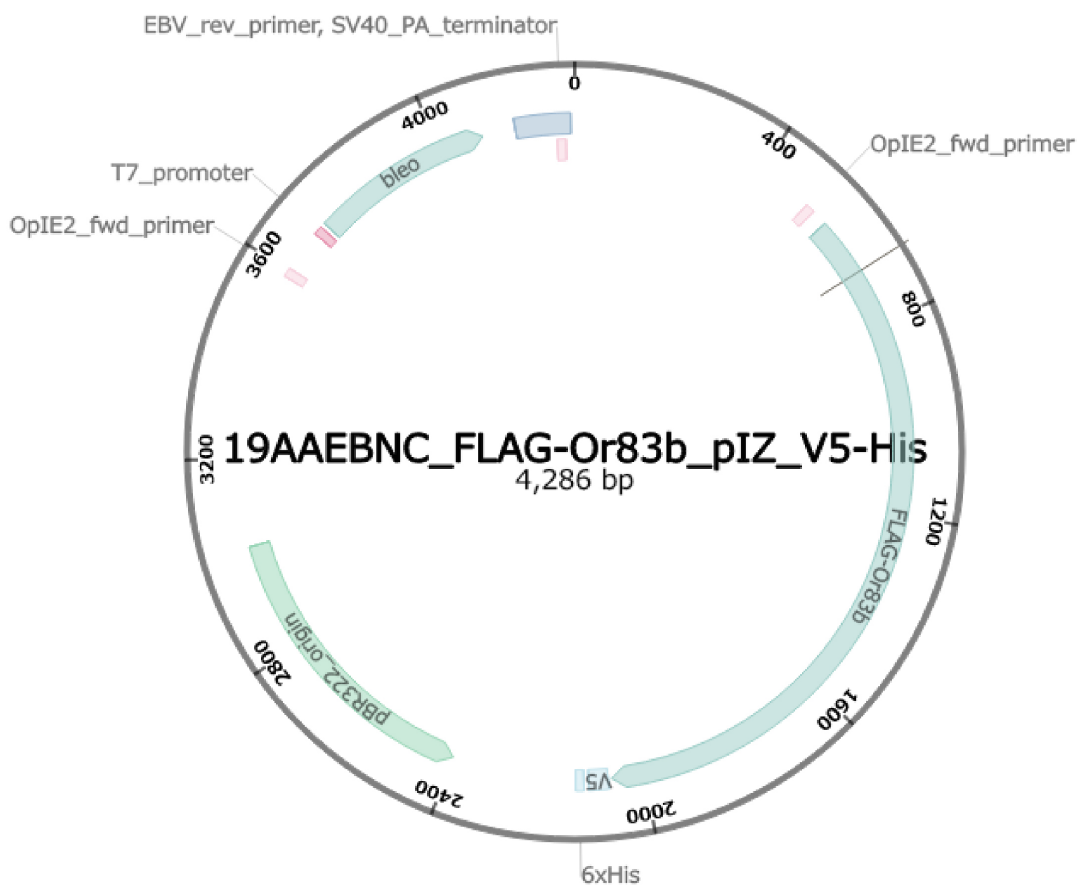
1 AAGCTTGGTA CCATGGAACA GAAGCTGATC TCCGAAGAGG ACCTGATGTC CGAGTGGCTG
 61 CGTTTCTCGA AGCGTGACCA GCAGCTGGAC GTGTAATTCT TCGCTGTGCC TCGTCTGTCC
 121 CTGGACATCA TGGGATACTG GCCTGGAAAG ACCGGCGACA CTTGGCCTTG CGGTCTCTCG
 181 ATCCACTTCG CTATCCTGGC TATCGGTGTC GCTACTGAGC TGCACGCTGG CATGTGTTTC
 241 TTGGACCGTC AGCAGATCAC CCTGGCTCTG GAAACTCTGT GCCCTGTGG TACTTCCGCT
 301 GTGACTCTGC TGAAGATGTT CCTGATGCTG CGCTCCGTC AGGACCTGTC CATCATGTGG
 361 AACCGTCTGC GTGGACTGCT GTTCGACCCT AACTGGGAAC GTCCTGAGCA GCGTGACATC
 421 CGTCTGAAGC ACTCTGCTAT GGCTGCTCGT ATCAACTTCT GGCCCTGTGC CGCTGGTTTC
 481 TTCACTTGCA CCACCTACAA CCTGAAGCCT ATCCTGATCG CTATGATCCT GTACCTGCAG
 541 AACCGTTACG AGGACTTCGT GTGGTTCACC CCGTTCAACA TGACCATGCC TAAGGTGCTG
 601 CTGAACTACC CTTTCTTCCC GCTGACCTAC ATCTTCATTG CTACACCGG TTACGTGACC
 661 ATCTTCATGT TCGGTGGTTG CGACGGTTTC TACTTCGAGT TCTGCGCTCA CCTGTCTGCT
 721 CTGTTGAGG TGCTGCAGGC TGAGATCGAG TCCATGTTCC GTCCTTACAC CGACCACTG
 781 GAACTGTCTC CCGTGCAGCT GTACATCCTC GAGCAGAAGA TGCGTTCCTG CATCATCCGT
 841 CACAACGCTA TCATCGACCT GACTCGTTTC TTCCGTGACC GTTACACCAT CATCACTCTG
 901 GCTCACTTCG TGTCGGCTGC TATGGTCATC GGTTCCTCCA TGGTCAACCT GCTGACCCG
 961 GGCAACAACG GACTGGGTGC TATGCTGTAC GTGGCTTACA CTGTGGCTGC TCTGTCCCAA
 1021 CTGCTGGTGT ACTGCTACGG TGGTACTCTG GTGGCTGAGT CCTTACTAGG ACTGTGCCCT
 1081 GCTATGTTCT CTTGCCCTG GCAGCTGTTT AAGCCAAAG AACGTCGCTT GGTGCAGCTG
 1141 CTGATCTGTC GTTCTCAGCG TCCTGTGTC ATGGCTGTGC CTTTCTTCT CCCATCTCTG
 1201 GCTACCTTCG CTGCCATCCT GCAGACCTCC GGTTCATCA TTGCTCTGCT CAAGTCTTCT
 1261 CAGTAACCGC GG

myc-Or22a 挿入配列

1 AAGCTTGGTA CCATGGAACA GAAGCTGATC TCCGAAGAGG ACCTGATGCT GTCCAAGTTC
 61 TTCCCGCACA TCAAAGAGAA GCCCCTGTCC GAGCGTGTGA AGTCCCCTGA CGCTTTCATC
 121 TACCTGGACC GTGTGATGTG GTCCTTCGGA TGGACCGAGC CTGAGAACA GCGTTGGATC
 181 CTGCCTTACA AGCTGTGGCT GGCTTTCGTG AACATCGTGA TGCTGATCCT GCTGCCTATC
 241 TCCATCTCCA TCGAGTACCT GCACCGTTTC AAGACCTTCT CCCTGGCGA GTTCCTGTCC
 301 TCCTTGAGGA TCGGTGTCAA TATGTACGGT TCCAGCTTCA AGTGCCTTTT CACCTGATC
 361 GGTTCAAAGA AGCGTCAAGA GGCTAAGGTG CTGCTGGACC AACTGGACAA ACGTTGCCTG
 421 TCCGACAAG AGCGTTCCAC CGTCCACCGT TACGTGGCAA TGGGCAACTT CTTGACATC
 481 CTGTACCACA TCTTCTACTC CACCTTCGTC GTGATGAAT TCCCCTACTT CCTGCTCGAG
 541 CGTCGTACG CTTGGCGTAT GTACTTCCCT TACATCGACT CCGACGAGCA GTTCTACATC
 601 TCCTCTATCG CTGAGTGCTT CTTGATGACC GAGGCTATCT ACATGGACCT CTGCACCGAC
 661 GTGTGCCCTC TGATCTCTAT GCTGATGGCT CGTTGCCACA TCTCCCTGCT GAAGCAGCGT
 721 CTGCGTAACC TGCGTTCTAA GCCTGTGCTG ACCGAGGACG AGTACCTCGA GGAACGTGACT
 781 GAGTGCATCC GTGACCACCG TCTGCTGTG GACTACGTGG ACGCTCTGCG TCCTGTGTTT
 841 TCCGTACTA TCTTCGTGCA GTTCTGCTG ATCGGAACCG TGCTGGGCTT GTCATGATC
 901 AACCTGATGT TCTTCTTAC CTTCTGGACC GGTGTCGCTA CCTGCCTGTT CATGTTTCGAT
 961 GTGTCCATGG AAACGTTCCC GTTCTGTAC CTGTGCAACA TGATCATCGA CGACTGCCAA
 1021 GAGATGTCCA ACTGCCTCTT CCAGAGCGAC TGGACTTCCG CTGACCGTGC TTACAAGTCT
 1081 ACCCTGGTGT ACTTCTTCCA CAACCTGCAG CAGCCCATCA CTCTGACCGC TGGTGGTGT
 1141 TTCCCAATCT CCAATGCAGC CAACCTGGCT ATGGTCAAGC TGGCCTTCTC CGTGTGACCC
 1201 GTGATCAAGC AGTTCAACCT GGCCGAAAGA TTCCAGTAAC CGCGG

myc-Or67a 挿入配列

1 AAGCTTGGTA CCATGGAACA GAAGCTGATC TCCGAAGAGG ACCTGATGGA CAACGTGGCC
 61 GAGATGCCCG AAGAGAAATA CGTCGAGGTG GACGACTTCC TGCGTCTGGC TGTGAAGTTC
 121 TACAACACCC TGGGTATCGA CCCCTACGAG ACTGGTGC GA AGCGTACCAT CTGGTTCACG
 181 ATCTACTTCG CCCTCAACAT GTTCAACATG GTGTTAGCT TCTACGCTGA AGTGGCTACC
 241 CTGGTGGACC GTCTGCGTGA CAACGAGAAC TTCTCGAGT CCTGCATCCT GCTGTCTTAC
 301 GTGTCCTTCG TGGTCATGGG CCTGTCAAAG ATCGGTGCTG TGATGAAGAA AAAGCCCAAG
 361 ATGACCGCTC TCGTGCCTGA GCTGGAACCT TGCTTCCAT CACCTCCGC TAAGGTGCAA
 421 GAGGAATACG CTGTCAAGTC CTGGCTGAAG CGTTGCCACA TCTACACCAA AGTTCGCTG
 481 GGCCTGTTC TATTATGTA CTTGCTCAC GCTCTGATCC CGCTGTTTCT CTACTTCATC
 541 CAGCGTGTGC TGCTGCACTA CCCGACGCT AAGCAGATCA TGCCTTCTA CCAGCTCGAG
 601 CCCTGGGAGT TCCGTGACTC TTGGCTGTTT TACCCTCCT ACTTCCACCA GTCCTCCGCT
 661 GGTTACACCG CTACTTGTGG TTCTATGCT GCGCACCTGA TGATCTTCG TGTGTTGCTG
 721 CAAGTGTATG TGCATACGA GCGTTTGGCT AAGGTCTGCG GCGAGTTCAA GATCCAGGCT
 781 CACAACGCTC CCAACGGTGC TAAAGAGGAC ATCCGCAAGC TGCACTCCCT GGTGGCTAAC
 841 CACATCGACA TCCTGCGCCT GACCGACCTC ATGAACGAGG TGTTGCTGAT CCCTCTGCTG
 901 CTGAACCTCA TTGCTTCCG TCTGCTGCTG TGCCTGCTGG GAGTGCAACT GACTATCGCT
 961 CTGTCCCTG AGTACTTCTG CAAGCAGATG CTGTTCTGTA TCTCTGTGCT GCTCGAGGTG
 1021 TACCTGCTGT GCTCATTCTC CCAGAGGCTG ATCGACGCTT CCGAGAACGT TGGTACGCT
 1081 GCTTACGACA TGGACTGGCT GGGTTCCGAC AAGGCTTCA AGAAGATCCT GATCTTATC
 1141 TCCATGCTG CCCAGAAGCC TGCTGCTG AAGGCTACTG TGGTCTGGA CCTGTCTATG
 1201 CCTACTATG CCACTTCTT GGGAAATGCT TACAAGTTCT TCTGCGCTG GCTGACCATG
 1261 TACCAATAAC CGCGG



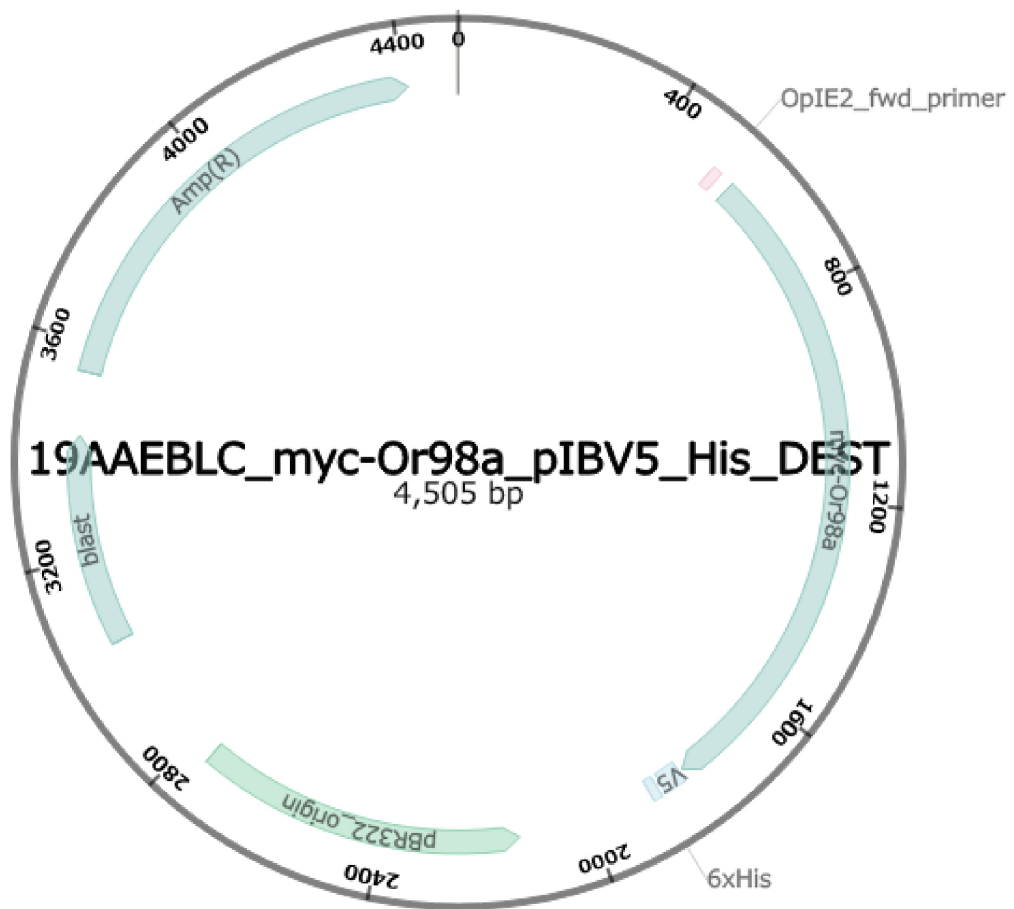
FLAG-Or83b 挿入配列

```

1 GGTACCATGG ACTACAAGGA CGACGACGAC AAGATGACCA CCTCCATGCA GCCTTCCAAG
61 TACACCGGAC TGGTGGCTGA CCTGATGCCT AACATCCGTG CTATGAAGTA CTCCGGCCTG
121 TTCATGCACA ACTTCACCGG TGGTTCCGCT TTCATGAAGA AGGTGTA CTCCGTCCAC
181 CTGGTGTCT TGCTGATGCA GTTCACCTTC ATCCTGGTCA ACATGGCTCT GAACGCTGAG
241 GAAGTGAACG AGCTGTCCGG CAACACCATC ACCACTCTGT TCTTACCCA CTGCATCACG
301 AAGTTCATCT ACCTGGCTGT GAACCAGAAG AACTTCTACA GGACCCTGAA CATCTGGAAT
361 CAAGTGAACA CACACCTCT GTTCGCTGAG TCCGACGCTC GTTACCCTCT TATCGTCTG
421 GCTAAGATGC GCAAGCTGTT CTTCCTGGTC ATGCTGACCA CCGTGGCTTC CGTACCCTG
481 TGGACCACTA TCACTTTCTT CGGCGACTCC GTGAAGATGG TGGTGGACCA CGAGACTAAC
541 TCTTCTATCC CCGTCGAGAT CCCTCGTCTG CCCATCAAGT CTTTCTACCC CTGGAACGCT
601 TCCCACGGAA TGTTTACAT GATCAGCTTC GCGTTCAGG TCTACTACGT GCTGTTACGC
661 ATGATCCACT CCAACCTGTG CGACGTGATG TTCTGCTCCT GGCTGATCTT CGCTTGCAGG
721 CAGCTGCAGC ACCTGAAGGG TATCATGAAG CCCCTGATGG AACTGTCCGC TTCTTGGAC
781 ACCTACCGTC CTAACCTCCG TGCTCTGTTT CGTTCTCTGT CCGCTAACTC CAAGTCCGAG
841 CTGATCCACA ACGAGGAAAA GGACCCTGGC ACCGACATGG ACATGTCTGG TATCTACTCC
901 TCCAAGGCTG ACTGGGGTGC TCAGTTCCGT GCTCCTTCCA CTCTGCAGTC CTTCGGTGGG
961 AATGGTGGCG GTGGAACCGG ACTGGTCAAC GGTGCTAACC CCAACGGCCT GACCAAGAAA
1021 CAAGAGATGA TGGTCCGATC CGCCATCAAG TACTGGGTGC AGCGTCACAA GCACGTCGTG
1081 CGTTTGGTGG CTGCTATCGG AGACACTTAC GGTGCTGCTC TGCTGCTGCA CATGCTGACT
1141 TCCACCATCA AGCTGACCTT GCTGGCTTAC CAGGCTACCA AGATCAACGG TGTCACGCTG
1201 TACGCTTTCA CCGTCGTGGG TTACCTGGGT TACGCTCTCG CTCAGGTGTT CCACTTCTGT
1261 ATCTTCGGCA ACCGTCTGAT CGAGGAATCC TCCAGCGTGA TGAAGCTGTC TTACTCCTGC
1321 CATTGGTACG ACGGCTCCGA AGAGGCTAAG ACCTTCGTGC AGATCGTGTG CCAGCAGTGC
1381 CAAAAGGCTA TGTCATCTC CGGTGCTAAG TTCTTCACTG TGTCCTGGA CCTGTTCTGC
1441 TCCGTGCTGG GTGCTGTGGT CACCTACTTC ATGGTGTGGT TGCAGTGAA GTAACCGCGG

```

Fig. S1 嗅覚受容体共受容体遺伝子挿入配列及び pIZ_V5_His プラスミドマップ



myc-Or98a 挿入配列

```

1 AAGCTTG GTA CCATGGAACA GAAGCTGATC TCCGAAGAGG ACCTGATGCT GTTCAACTAC
61 CTGCGCAAGC CCAATCCTAC CAACCTGCTG ACCTCTCCTG ACTCCTTCCG TTA CTTCGAG
121 TACGGCATGT TCTGCATGGG CTGGCACACC CCTGCTACTC ACAAGATCAT CTACTACATC
181 ACCAGCTGCC TGATCTTCGC TTGGTGCCT GTGTACTGC CTATCGGTAT CATCATCAGC
241 TTCAAGACCG ACATCAACAC CTTCACTCCC AACGAGCTGC TGACCGTAT GCAGCTGTT
301 TTCAACTCCG TGGGCATGCC TTTCAAGGTT CTCTTCTCA ACCTGTACAT CTCCGGCTTC
361 TACAAGGCCA AGAAATGCT GTCCGAGATG GACAAGCGTT GCACCACTCT GAAAGAGCGT
421 GTCGAGGTCC ACCAAGGTGT CGTGCCTTGC AACAAAGGCTT ACCTGATCTA CCAGTTCATC
481 TACACCGCCT ACACCATCTC CACTTCTTG TCCGCTGCTC TGCCGGAAA GCTGCCCTGG
541 CGCATCTACA ACCCTTTCGT GGACTTCCGC GAGTCCCGTT CCTCATTCTG GAAGGCTGCT
601 CTGAACGAGA CTGCTCTCAT GCTGTTGCT GTGACCCAGA CTCTGATGTC CGACATCTAC
661 CCTCTGCTGT ACGGCCTGAT CCTGCGTGTG CACCTGAAGC TGTGCGTCT GCGTGTGGAA
721 TCTCTGTGCA CCGACTCCGG AAAGTCCGAC GCTGAAAACG AGCAGGACCT CATCAAGTGC
781 ATCAAGGACC ACAACCTGAT CATCGACTAC GCTGCTGCTA TCCGTCCTGC TGTCACCCGT
841 ACTATCTTCG TGCAGTTCCT GCTGATCGGT ATCTGCCTGG GCCTGTCCAT GATCAACCTG
901 TTGTTCTTCG CTGACATCTG GACCGGCCTG GCTACCGTGG CTTACATCAA CGGACTGATG
961 GTGCAGACTT TCCCCTTCTG CTTCGTGTGC GACCTGCTGA AGAAGGACTG CGAACTGCTG
1021 GTGTCCGCTA TCTTCACTC CAACTGGATC AACTCCTCCA GGTCTACTAA GTCCTCTCTG
1081 CGTACTTCC TGAAGAACGC TCAGAAGTCT ATCGCTTTCA CCGCTGGTTC TATCTTCCT
1141 ATCTCCACCG GTTCCAACAT CAAGGTGGCC AAGCTGGCTT TCTCCGTGGT CACCTTCGTG
1201 AACAGCTGA ACATTGCTGA CCGCCTGACT AAGAATTAAC CGCGG

```

Fig. S2 嗅覚受容体遺伝子挿入配列及び pIB_V5_His_DEST プラスミドマップ

付録 D 業績一覧

論文

Y. Hirata, Y. Morimoto, E. Nam and S. Takeuchi, “Portable biohybrid odorant sensors using cell-laden collagen micropillars” , Lab on a Chip, vol. 19, pp. 1971-1976, 2019

受賞

2019年5月 化学とマイクロ・ナノシステム学会 優秀発表賞

2017年2月 東京大学大学生産技術研究所 発明コンテスト 産学協創推進本部長賞

2017年1月 Outstanding Student Paper Award Finalist in the 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017)

学会

(国際学会・口頭発表)

○ Y. Hirata, Y. Morimoto, S. Takeuchi, “HETEROGENEOUS CELL-LADEN HYDROGEL ARRAY FOR PORTABLE ODORANT SENSOR” , The 21st MicroTAS, pp.103-104, Georgia, USA, Oct. 2017

○ Y. Hirata, Y. Morimoto, E. Nam, S. Yoshida, S. Takeuchi, “Cells smell on a CMOS; a portable odorant detection system using cell-laden collagen pillars” , The 30th MEMS, pp.13-16, Nevada, USA, Jan. 2017

○ Y. Hirata, S. Yoshida, S. Tabata, E. Nam, Y. Morimoto, S. Takeuchi, “Enhancement of fluorescence by forming spheroids for a portable odorant sensor” , MNST 2016, p. 99, Tokyo, Japan, Dec. 2016

(国内学会・口頭発表)

○平田優介, 森本雄矢, 竹内昌治 “細胞センサに向けたスマートフォンによる蛍光計測”, バイオ・マイクロシステム研究会, 沖縄, 6月2019年

(国際学会・ポスター発表)

○ Y. ishii, Y. Hirata, Y. Morimoto, A. Shima, S. Takeuchi “CENTIMETER-SIZED TISSUE WITH PERFUSABLE CHANNELS TOWARD CULTURED STEAK”, The 23rd MicroTAS, pp. 322-323, Basel, Switzerland, Oct. 2019

○ Y. Hirata, Y. Morimoto, S. Takeuchi, “CELL-LADEN MICROPILLARS DETECT GASEOUS ODORANTS ON A LIQUID-AIR INTERFACE”, The 31th MEMS, pp.304-307, Belfast. UK, Jan. 2018

○ Y. Hirata, Y. Morimoto, S. Takeuchi “Cell-based odorant sensor on a smartphone”, The 22th MicroTAS, pp. 786-787, Kaohsiung, Taiwan, Nov. 2018

○ Y. Hirata, S. Yoshida, S. Tabata, E. Nam, Y. Morimoto, S. Takeuchi “Spheroid on a CMOS chip for a portable odorant sensor”, The 20th MicroTAS, pp. 1214-1215, Dublin, Ireland, Oct. 2016

(国内学会・ポスター発表)

○大岸憲人, 平田優介, 澤山淳, 竹内昌治, “嗅覚受容体発現細胞を用いた無線匂いセンサの開発”, 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 19am3-PN3-19, 静岡, 11月2019年

○平田優介, 森本雄矢, 竹内昌治, “携帯型バイオハイブリッド匂いセンサの開発”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会, p. 86, 金沢, 5月2019年

○平田優介, 森本雄矢, 竹内昌治, “細胞コラーゲン円柱による気相匂い物質検出”, 第9回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 30am3-PN-39, 札幌, 10月2018年

○平田優介, 森本雄矢, 竹内昌治, “積層した細胞をセンサとする携帯型匂いセンサ”, 第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 02pm1-PN-123, 広島, 11月2017年

○平田優介, 吉田昭太郎, 田畑誠司, 南垠列, 森本雄矢, 竹内昌治, “CMOSによる細胞センサーのためのスフェロイド蛍光計測”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第34回研究会, p. 94, 千葉, 9月2016年

特許

平田優介, 吉田昭太郎, 南垠列, 森本雄矢, 竹内昌治 “CMOS を用いたポータブル匂いセンサ” US62/382822

謝辞

本節は個人情報に関わるため非公開とする

以上

博士論文

平田 優介