

博士論文

ネムリユスリカ培養細胞を用いた
常温乾燥保存可能な
細胞バイオセンサ基盤技術の開発

布施 寛人

目次

目次	1
要旨	4
はじめに	6
参考文献	9
第 1 章 Pv11 細胞における接着系の確立	12
序論	13
材料と方法	15
1. Pv11 細胞培養プロトコル	15
2. 細胞接着用コーティング手法	15
3. Pv11 細胞の接着手法	15
4. Pv11 細胞の乾燥再水和手法	16
5. 接着乾燥保存手法：細胞接着後トレハロース処理	16
6. 接着乾燥保存手法：トレハロース処理後細胞接着	16
7. Pv11 細胞の接着系の評価	17
8. 乾燥再水和後 Pv11 細胞の接着系の評価	17
9. 画像解析	18
10. 統計解析	18
結果	19
1. Pv11 細胞における接着系の検討	19
2. Pv11 細胞における FBS の接着性への影響	22
3. Pv11 細胞における接着乾燥手法の検討	23
4. Pv11 細胞の接着乾燥における接着系の比較	25
考察	28
参考文献	30

第2章 嗅覚受容体発現細胞株の樹立と乾燥耐性評価.....34

序論35

材料と方法38

1. Pv11 細胞培養プロトコル..... 38
2. 一過性発現ベクターの作成..... 38
3. Pv11 細胞への嗅覚受容体の一過性発現と嗅覚受容体応答性の評価.... 38
4. HiBiT assay による嗅覚受容体の発現評価..... 39
5. Knock-in 用 donor vector の作成..... 40
6. Knock-in 手法とモノクローナル細胞株の樹立 40
7. Genomic PCR と sequence による目的遺伝子 knock-in の確認..... 41
8. Pv11 細胞の乾燥再水和手法と細胞生存率の評価 41
9. Pv.00443-Or47a 細胞株のリガンド応答アッセイ 42
10. リガンド応答アッセイにおける 1 細胞ごと蛍光輝度変化率定量手法
42
11. Pv.00443-Or47a 細胞株の乾燥再水和後リガンド応答アッセイ 42
12. 画像解析..... 42
13. 統計解析..... 43

結果44

1. Pv11 細胞における嗅覚受容体の検討 44
2. 嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立..... 47
3. Pv.00443-Or47a の嗅覚受容体の機能評価 49
4. 嗅覚受容体の乾燥保護評価..... 52

考察55

参考文献58

第3章 Pv11 細胞における嗅覚受容体発現系の改良と乾燥保存の実現.....61

序論62

材料と方法64

1. Pv11 細胞培養プロトコル..... 64
2. 改変 Or47a-HiBiT 一過性発現ベクターの作成..... 64

3. HiBiT assay による嗅覚受容体の発現系改良評価.....	64
4. Knock-in 用 donor vector の作成	65
5. Knock-in 手法とモノクローナル細胞株の樹立	65
6. Genomic PCR と sequence による目的遺伝子 knock-in の確認	66
7. モノクローナル細胞株におけるリガンド応答アッセイによる細胞株選 抜	66
8. Pv11 細胞の乾燥再水和手法と細胞生存率の評価	66
9. Or47a-11G 細胞株のリガンド応答アッセイ	67
10. リガンド応答アッセイにおける 1 細胞ごと蛍光輝度変化率定量手法 67	
11. Or47a-11G 細胞株の乾燥再水和後リガンド応答アッセイと定量手法 67	
12. 画像解析	68
13. 統計解析	68
結果	69
1. Pv11 細胞における嗅覚受容体発現系の改良	69
2. 改良した発現系を用いた嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立	72
3. Or47a-11G を用いた嗅覚受容体乾燥保存性の検討	77
考察	79
参考文献	82
総合考察	85
謝辞	87

要旨

ネムリユスリカはアフリカの半乾燥地帯に生息する昆虫であり、幼虫期に乾眠と呼ばれる無代謝休眠状態になることで半年以上も続く乾季を生き延びる。ネムリユスリカから培養細胞 Pv11 が樹立されており、同様に乾眠能力を持つことが分かっている。Pv11 細胞において、過剰発現系とゲノム編集技術が確立されており、乾燥耐性を損ねることなく外来遺伝子を安定発現させることが可能である。さらにルシフェラーゼを発現させた Pv11 細胞を乾燥後に常温で 1 年以上放置しても、その酵素活性は維持可能であった。このことから、Pv11 細胞はリコンビナントタンパク質を常温乾燥保存できるシステムとして利用可能だと考えられた。Pv11 細胞は昆虫細胞であるため、炭酸ガスなしかつ常温で培養が可能であり、浮遊細胞という性質から培養のスケールアップも容易であると期待できる。以上より Pv11 細胞の乾燥耐性を活かした応用利用が期待されている。

Pv11 細胞の利用方法として細胞匂いセンサに着目した。細胞匂いセンサとは嗅覚受容体等匂いを感知可能なタンパク質を培養細胞や人工細胞膜等に発現させ、匂い応答を検出するバイオセンサの一種である。嗅覚受容体がもつ高い感度と匂い物質の光学異性体をも判別できる高選択性が期待されており、応用研究が進められている。実際に嗅覚受容体を発現させた細胞を用いて、僅かなカビ臭や体臭が感知可能と報告されている。しかしながらこれらは常に培養液中で維持する必要があり、保存方法も冷凍保存に限られる。そのため取り扱いにコストと手間がかかるうえ、持ち運びも難しく使用範囲が限られるというデメリットもある。以上の理由から細胞匂いセンサは期待されているものの未だ実用化はされていない。

そこで我々は Pv11 細胞を利用することでこの問題を解決できると考えた。Pv11 細胞に嗅覚受容体を発現させ乾燥保存できれば、常温かつ培養液なしで保管、輸送することが可能になる。また再水和後すぐに細胞を利用可能であれば、実験室以外でも場所を選ばず利用することが期待できる。すなわちいつでもどこでも使用可能で、高感度、高選択的な匂いセンサ開発に繋がる。そこで本研究では Pv11 細胞を用いて常温乾燥保存可能な細胞匂いセンサ基盤技術の開発を目指し検討を行った。

常温乾燥保存可能な細胞匂いセンサ基盤技術の開発のため、まず接着系の確立を行った。Pv11 細胞は浮遊性が極めて強い細胞である。スケールアップが容易であると考えられメリットがある一方で、センサやトランデューサーといった基盤へ細胞を接着させることを前提とした細胞匂いセンサへの適応は困難である。さらに、乾燥保存後に匂いセンサとして利用するためには、乾燥再水和後も接着を維持する必要がある。そこで既存の培養細胞で用いられる接着系を用いて Pv11 細胞が接着可能か検討を行った。結果として疎水性相互利用した細胞膜修飾剤である BAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane) やムール貝由来接着タンパク質である Cell-Tak でコーティングすることで Pv11 細胞を接着することに成功

した。さらにコーティングなしに、培地中から血清を抜くことで細胞を接着できることを発見した。また、予めトレハロース処理した Pv11 細胞を、これらの接着系を用いて接着させてから乾燥処理することで、細胞を接着した状態で乾燥保存することに成功した。以上より Pv11 細胞の接着系を確立することができた。

次に嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立を行った。Pv11 細胞におけるタンパク質安定発現細胞株の樹立において、ランダムインテグレーションによる遺伝子導入は、Pv11 細胞の乾燥耐性に悪影響を与えてしまう。そこで本研究では CRISPR/Cas9 を利用した knock-in により嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立を行なった。キイロショウジョウバエ由来の嗅覚受容体 Or47a とその共受容体 Orco、機能の評価系としてカルシウムセンサタンパク質 GCaMP6f を用いた。まず Pv11 細胞で常に高発現している遺伝子 Pv.00443 遺伝子に P2A 配列を付加して knock-in し、ポリシストロニック発現によりモノクローナル細胞株の取得した(Pv.00443-Or47a 細胞株)。リガンドを添加すると応答したことから、Or47a、Orco、GCaMP6f いずれも機能しており、嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立に成功した。一方で乾燥再水和後は Or47a に対するリガンドの応答が見られず、嗅覚受容体の乾燥保存は達成できなかった。

そこで、嗅覚受容体の乾燥保存を達成するため、Or47a の発現量向上を目指し、Pv11 細胞の増殖や乾燥耐性に影響しない Genomic safe harbor というゲノム領域にプロモーターごと knock-in し、モノクローナル細胞株の取得した(Or47a-11G 細胞株)。Or47a-11G 細胞株にリガンドを添加すると応答したことから、Or47a、Orco、GCaMP6f いずれも機能しており、新たな嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立に成功した。樹立した Or47a-11G 細胞株に対し、乾燥再水和後、Or47a のリガンドを添加すると応答を示した。よって Pv11 細胞を用いて嗅覚受容体を乾燥保存することに成功した。

本研究結果より、Pv11 細胞の接着系の確立、匂い感知細胞の樹立、嗅覚受容体の乾燥保存を達成した。よって Pv11 細胞と嗅覚受容体を組み合わせることで、いつでも使用可能で高感度、高選択的な細胞匂いセンサ実現の可能性を示すことができたと考えている。

はじめに

生物は嗅覚系によって匂いを非常に高感度かつ高選択的に感知し、食料や危険等を識別することが可能である。そこで我々は生物そのものを利用するという形で、嗅覚を社会活用してきた。例えば、官能評価によって様々な食品の開発や評価を行なっているし、犬を用いた空港での麻薬探知、災害現場での被災者の探索などは、我々にとって馴染み深い光景である。さらに近年では、体臭による個人の識別、病気の診断など様々な分野での応用も期待されている(Feil *et al.* 2021; Jirayupat *et al.* 2022; di Luccio *et al.* 2022)。しかしながらこれらは生物そのものを用いるため、多くの問題がある。例えば育成に大きなコストや手間がかかるし個体差もある。また体調の変化や老化により結果が左右されてしまうなど、再現性の問題もある。そのため嗅覚を人工的に再現した匂いセンサ(人工鼻 : electronic nose)の開発が求められている。

Electronic nose は嗅覚系を模した匂いセンサシステムであり、1982 年に報告されてから多くの研究が進められてきた(Persaud and Dodd 1982)。Electronic nose は匂い供給システム、匂いセンサアレイ、パターン認識アルゴリズムの 3 要素からなる(Stitzel *et al.* 2011)。検出対象の匂いを濃縮、水溶液に溶かすなどして、センサアレイに輸送し、匂いに対する応答パターンを認識して匂い評価を行う(Fig. 1)。複数の匂いセンサをアレイ化し、機械学習等と組み合わせることで、嗅覚と同じように、美味しさの推定に繋がる複雑な匂いの評価が期待されている(Fig. 2)(Jeong *et al.* 2020)。しかしながら嗅覚と同じ様に匂い評価を行える匂いセンサシステムは未だ実現していない。技術的困難の理由は数多くあるが、その中の一つに、センサの感度や匂い選択性が挙げられる(Karakaya *et al.* 2020)。これまで水晶 (Quartz Crystal Microbalance: QCM) センサ、半導体センサ、金属酸化物センサ(Metal-Oxide-Semiconductor: MOS)、表面弾性波 (Surface Acoustic Wave: SAW) センサ、電気化学センサなど、様々な種類の工学的センサが開発されており、非常に高感度の匂い感知は達成しているものの、複合臭の中から対象の匂いを認識することは難易度が高く、使用できる温度や湿度が限られるなどの課題もある(Park *et al.* 2019; Jeong *et al.* 2020)。

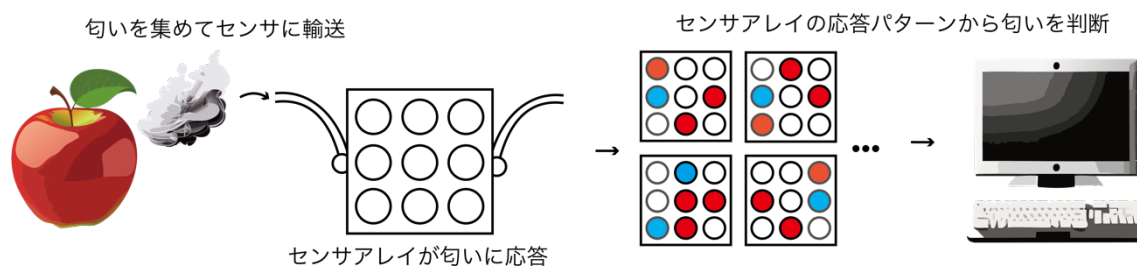


Fig. 1. Electronic nose 模式図

Electronic nose は匂い供給システム、匂いセンサアレイ、パターン認識アルゴリズムから

成り、対象の匂いをセンサ素子に輸送し、その応答パターンから匂いの評価を行う。

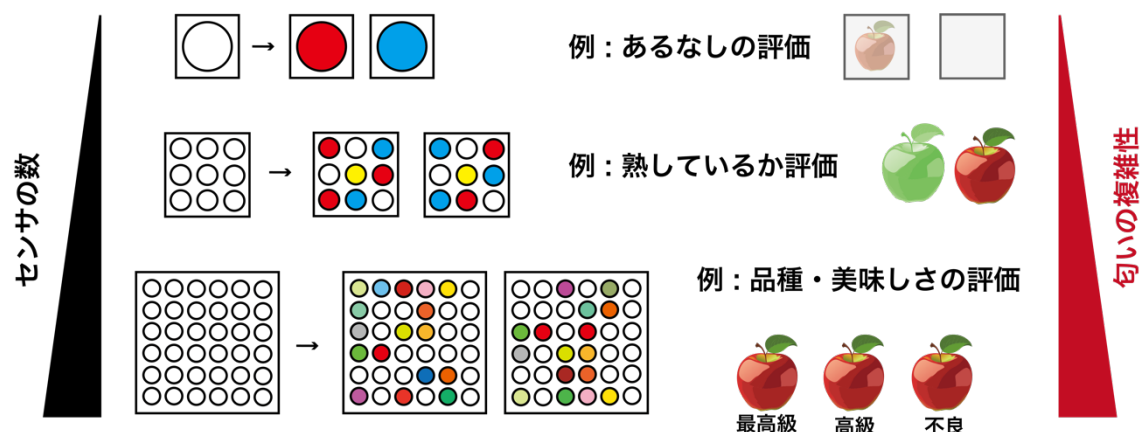


Fig. 2. 匂いセンサアレイイメージ

匂いセンサアレイの模式図。匂いを評価するセンサの数を増やすことで、複雑な匂いの応答を識別できるようになり、嗅覚と同じ様に美味しさなどの推定ができる様になると期待されている。

そこで生物由来のセンサとして嗅覚受容体そのものを利用する試みが進められている (Liu *et al.* 2006; Cheema *et al.* 2021)。生物が利用している匂いセンサをそのまま使用することから、嗅覚と同様の匂い感度、構造異性体をも識別可能な高い匂い選択性が期待されている (Sowndhararajan *et al.* 2015)。これまで実際に様々な培養細胞や人工細胞膜に嗅覚受容体を発現させ、僅かなカビ臭、人の体臭物質が感知可能であると報告されている (Saito *et al.* 2004; Misawa *et al.* 2010; Termtanasombat *et al.* 2016; Kida *et al.* 2018; Yamada *et al.* 2021)。しかしながら、生物素材を用いることから常に培養液中で維持する必要があるため、保存方法も冷凍保存に限られる。そのため取り扱いにコストと手間がかかるうえ、持ち運びも難しい。よって嗅覚受容体を利用した匂いセンサは魅力的ではあるが実用化に至っていない。

嗅覚受容体を常温乾燥保存することでこれらの課題を解決できると考えた。嗅覚受容体を乾燥保存することで、常温乾燥状態で取り扱えるようになり、再水和することで再び匂い感知が可能である。すなわち、嗅覚受容体を利用した匂いセンサのボトルネックを解消でき、いつでもどこでも使用可能で、高感度、高選択的な匂いセンサ開発に繋がる。そのためにネムリユスリカ由来の培養細胞、Pv11 を利用する。ネムリユスリカはアフリカの半乾燥地帯に生息する昆虫であり、幼虫期に乾燥耐性能力を持つ (Hinton 1960)。ネムリユスリカから樹立された Pv11 細胞も同様に乾燥耐性能力を持ち、1 年以上常温乾燥状態においても再水和後に生存、増殖が可能である (Nakahara *et al.* 2010; Watanabe *et al.* 2016)。クマムシやワムシなど乾燥耐性能力を持つ生物は数多く存在するが、培養細胞が樹立されているのはネムリユスリカのみである。よって、Pv11 細胞に嗅覚受容体を発現させ、乾燥保存することが可

能だと考えられる (Fig. 3)。そこで本研究では Pv11 細胞を用いて嗅覚受容体を乾燥保存することで、どこでも利用可能な細胞匂いセンサ開発の基盤技術の構築を目指し検討を行った。

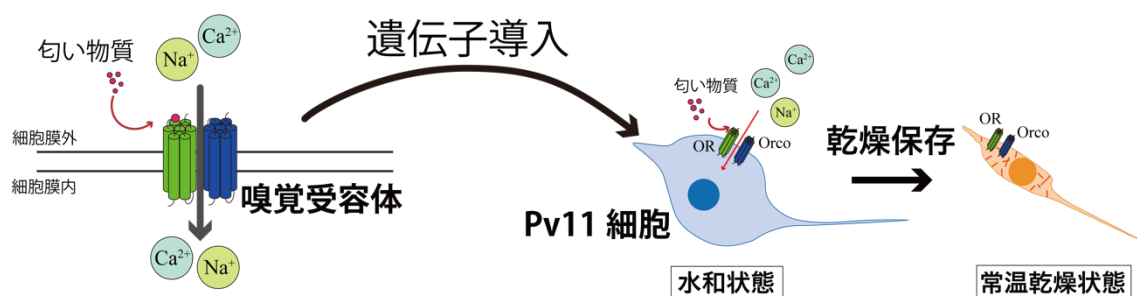


Fig. 3. Pv11 細胞を利用した乾燥保存可能な細胞匂いセンサ模式図

Pv11 細胞に嗅覚受容体を遺伝子導入し安定発現させれば、匂い感知を行えるようになり、常温乾燥状態で保存、輸送することができるようにになると期待。

具体的には以下の 3 点を検討する。1 点目は接着系の確立である。Pv11 細胞は浮遊性が極めて強い細胞であり、接着系はこれまで確立されていなかった (Nakahara *et al.* 2010)。浮遊細胞であることはスケールアップが容易であると考えられメリットがある一方で、センサやトランデューサーといった基盤へ細胞を接着させることを前提とした細胞匂いセンサへの適応は困難である。そこで既存の培養細胞で用いられる接着系を Pv11 細胞に対し検討し、Pv11 細胞に適した接着系を確立する。2 点目は安定発現細胞株の樹立である。匂いセンサとして利用するためには、常時匂いを感知可能であることが望ましい。そのため Pv11 細胞に嗅覚受容体を常時安定発現させる必要がある。Pv11 細胞においてはこれまで膜タンパク質を発現させた例がなく、嗅覚受容体が Pv11 細胞で機能するか、さらに安定発現可能か検討を行う。3 点目に嗅覚受容体の乾燥保存である。いつでもどこでも利用できる匂いセンサとして利用するためには、乾燥状態で保存・輸送を行い、再水和後速やかに匂い感知を行うことが求められる。Pv11 細胞においてこれまで乾燥保存が達成できた外来遺伝子は、ルシフェラーゼ、GFP、GCaMP 等全て細胞質局在タンパク質である (Kikuta *et al.* 2017; Sogame *et al.* 2017; Miyata *et al.* 2019)。よって嗅覚受容体の発現が Pv11 細胞の乾燥耐性に影響を与えるか、嗅覚受容体の乾燥保存が可能か定かではない。そこで樹立した嗅覚受容体安定発現細胞を用い、乾燥再水和後の細胞生存率の評価、リガンド応答アッセイを行い、嗅覚受容体が乾燥保存可能か検討を行う。

参考文献

- Cheema JA, Carraher C, Plank NOV, Travas-Sejdic J, Kralicek A (2021) Insect odorant receptor-based biosensors: Current status and prospects. *Biotechnol Adv* 53:107840. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107840>
- di Luccio E, Morishita M, Hirotsu T (2022) *C. elegans* as a powerful tool for cancer screening. *Biomedicines* 10. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102371>
- Feil C, Staib F, Berger MR, Stein T, Schmidtman I, Forster A, Schimanski CC (2021) Sniffer dogs can identify lung cancer patients from breath and urine samples. *BMC Cancer* 21:917. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08651-5>
- H.E.Hinton (1960) Cryptobiosis in the larva of *Polypedilum vanderplanki* Hint. (Chironomidae). *Journal of Insect Physiology* 5:286-288
- Jeong SY, Kim JS, Lee JH (2020) Rational design of semiconductor-based chemiresistors and their libraries for next-generation artificial olfaction. *Adv Mater* 32:e2002075. <https://doi.org/10.1002/adma.202002075>
- Jirayupat C, Nagashima K, Hosomi T, Takahashi T, Samransuksamer B, Hanai Y, Nakao A, Nakatani M, Liu J, Zhang G, Tanaka W, Kanai M, Yasui T, Baba Y, Yanagida T (2022) Breath odor-based individual authentication by an artificial olfactory sensor system and machine learning. *Chem Commun (Camb)* 58:6377-6380. <https://doi.org/10.1039/d1cc06384g>
- Karakaya D, Ulucan O, Turkan M (2020) Electronic nose and its applications: a survey. *International Journal of Automation and Computing* 17:179-209. <https://doi.org/10.1007/s11633-019-1212-9>
- Kida H, Fukutani Y, Mainland JD, de March CA, Vihani A, Li YR, Chi Q, Toyama A, Liu L, Kameda M, Yohda M, Matsunami H (2018) Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors. *Nat Commun* 9:4556. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06806-w>
- Kikuta S, Watanabe SJ, Sato R, Gusev O, Nesmelov A, Sogame Y, Cornette R, Kikawada T (2017) Towards water-free biobanks: long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells. *Sci Rep* 7:6540. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06945-y>
- Liu Q, Cai H, Xu Y, Li Y, Li R, Wang P (2006) Olfactory cell-based biosensor: a first step

- towards a neurochip of bioelectronic nose. *Biosens Bioelectron* 22:318-322.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.01.016>
- Misawa N, Mitsuno H, Kanzaki R, Takeuchi S (2010) Highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15340-15344. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004334107>
- Miyata Y, Tokumoto S, Sogame Y, Deviatiiarov R, Okada J, Cornette R, Gusev O, Shagimardanova E, Sakurai M, Kikawada T (2019) Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, *Polypedilum vanderplanki*, with conserved function in various insect cell lines. *Sci Rep* 9:7004. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43441-x>
- Nakahara Y, Imanishi S, Mitsumasu K, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, Kikawada T, Okuda T (2010) Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation. *Cryobiology* 60:138-146. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.004>
- Park SY, Kim Y, Kim T, Eom TH, Kim SY, Jang HW (2019) Chemoresistive materials for electronic nose: Progress, perspectives, and challenges. *Infomat* 1:289-316.
<https://doi.org/10.1002/inf2.12029>
- Persaud K, Dodd G (1982) Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose. *Nature* 299:352-355. <https://doi.org/10.1038/299352a0>
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 119:679-691.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.021>
- Sogame Y, Okada J, Kikuta S, Miyata Y, Cornette R, Gusev O, Kikawada T (2017) Establishment of gene transfer and gene silencing methods in a desiccation-tolerant cell line, Pv11. *Extremophiles* 21:65-72. <https://doi.org/10.1007/s00792-016-0880-4>
- Sowndhararajan K, Cho H, Yu B, Kim S (2015) Effect of olfactory stimulation of isomeric aroma compounds, (+)-limonene and terpinolene on human electroencephalographic activity. *European Journal of Integrative Medicine* 7:561-566.
<https://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.08.006>
- Stitzel SE, Aernecke MJ, Walt DR (2011) Artificial noses. *Annu Rev Biomed Eng* 13:1-25.
<https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124633>
- Termtanasombat M, Mitsuno H, Misawa N, Yamahira S, Sakurai T, Yamaguchi S, Nagamune T,

- Kanzaki R (2016) Cell-based odorant sensor array for odor discrimination based on insect odorant receptors. *J Chem Ecol* 42:716-724. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0726-7>
- Watanabe K, Imanishi S, Akiduki G, Cornette R, Okuda T (2016) Air-dried cells from the anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*, can survive long term preservation at room temperature and retain proliferation potential after rehydration. *Cryobiology* 73:93-98. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.006>
- Yamada T, Sugiura H, Mimura H, Kamiya K, Osaki T, Takeuchi S (2021) Highly sensitive VOC detectors using insect olfactory receptors reconstituted into lipid bilayers. *Sci Adv* 7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd2013>

第 1 章 Pv11 細胞における接着系の確立

序論

Pv11 細胞は蘇生可能な状態で常温乾燥保存できる唯一の動物培養細胞であることが知られる (Watanabe *et al.* 2016)。Pv11 細胞はネムリユスリカから樹立された培養細胞である (Nakahara *et al.* 2010)。ネムリユスリカはアフリカの半乾燥地帯に生息するユスリカの一種であり、幼虫期に anhydrobiosis と呼ばれる無代謝休眠状態になることで乾季を生き延びる (Hinton 1960; Watanabe *et al.* 2002; Wharton 2015)。Pv11 細胞もネムリユスリカと同様に乾燥耐性能力を持ち、トレハロース溶液に 48 時間浸漬することで乾燥保存が可能になり、これまで 1 年以上の常温乾燥保存が可能だと報告されている (Watanabe *et al.* 2016; Kikuta *et al.* 2017)。一般的にトレハロースは、タンパク質や細胞膜といった生体物質を乾燥等のストレスから保護することが知られている (Crowe 2002; Elbein *et al.* 2003; Erkut *et al.* 2011; Nguyen *et al.* 2022)。さらに Pv11 細胞においては、乾燥ストレスに対する細胞の保護だけでなく、乾燥耐性を発揮するのに必要な anhydrobiosis 関連遺伝子の誘導を担う必要不可欠な因子である (Gusev *et al.* 2014; Yamada *et al.* 2020; Tokumoto *et al.* 2021)。また、これまで Pv11 細胞において、恒常活性プロモーターが単離されており外来遺伝子発現系が確立されている (Miyata *et al.* 2019)。CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子の knock-in にも成功しており、乾燥耐性を損ねることなく外来遺伝子を安定発現させることも可能である (Miyata *et al.* 2021)。さらに外来タンパク質としてルシフェラーゼを発現させた Pv11 細胞を、1 年以上その酵素活性を保ったまま常温乾燥保存することに成功している (Kikuta *et al.* 2017)。また、Pv11 細胞は昆虫細胞の一つであることから、炭酸ガスなしに、常温で培養維持が可能である。さらに浮遊細胞であるため (Nakahara *et al.* 2010)、培養のスケールアップも容易だと期待できる。この様に Pv11 細胞は、他の動物細胞には無い乾燥耐性という特別な能力を持ちながら、一般の動物培養細胞と同様に利用しやすい性質も兼ね備えており様々な応用が期待されている。

そこで Pv11 細胞の利用方法として前述の通り細胞匂いセンサに着目した。バイオセンサとは生物の持つ優れた認識能力を利用したセンサの総称であり、生体分子からなる認識素子と、その生体応答を感知するセンサや生体応答を電気信号に変換するトランスデューサー等からなる (Thevenot *et al.* 2001; Bhalla *et al.* 2016)。中でも細胞バイオセンサは、細胞そのものを認識素子としており、受容体や酵素、調節タンパク質によって様々な化学物質を高感度かつ高選択に検出を行うことができる (Liu *et al.* 2014; Gupta *et al.* 2019)。しかしながら、嗅覚受容体に限らず、一般的にタンパク質などの生体成分や細胞は、乾燥すると変性し、その機能を失ってしまう。そのため細胞や人工細胞膜は常に溶液中で維持する必要がある。取り扱いにコストや手間がかかることから、細胞センサの難易度は高い。また、ガス供給機能や温度維持機能がついた培養装置を用いずに、細胞を生きたまま長期安定的に保存・輸送・維持するのが難しい。さらに長期安定的に保存するためには細胞を超低温で冷凍保存する必要がある、費用、設備等多くのコストがかかる。もし Pv11 細胞を細胞匂いセンサに利

用できれば、長期安定的に常温乾燥保存することが可能になり、輸送や維持も簡便になる。さらに炭酸ガスなし、かつ室温で培養できることから、あらゆる場所で使用可能になると期待する。

しかしながら、Pv11 細胞の浮遊細胞という性質が細胞匂いセンサとして利用することを困難にしている。前述の通り細胞匂いセンサは細胞をチップ上に接着させ、匂い物質に対する応答をチップにより感知し、感知した際の細胞の変化をトランジューサーにより電気信号に変換することで検出する。また、匂い物質を細胞に運ぶことや、スループットを上げる目的、細胞を健康的な状態で利用するためマイクロ流体デバイスに組み込む手法は一般的である(Luka *et al.* 2015; Yamada *et al.* 2021)。そのため浮遊細胞である Pv11 細胞をこれらに適応させることは難しく、細胞匂いセンサとして利用するためには、接着系を開発することが必要不可欠である。これまで浮遊細胞や接着性の弱い細胞を接着させるために様々な検討がなされてきた。例えば細胞外マトリックスによる細胞接着を促進するために基盤上をコラーゲンコートすることは一般的である(Kleinman *et al.* 1981)。さらに細胞膜の電荷に着目し、基盤上を PDL(Poly-D-Lysine)や PEI(Polyethylenimine)といったカチオン性ポリマーでコートすることで静電相互作用による接着する手法も良く使われる(Vancha *et al.* 2004; Yavin and Yavin 1974)。静電相互作用より強力な接着手法である疎水性相互作用を利用した接着手法として細胞膜修飾剤である BAM も挙げられる(Kato *et al.* 2003)。BAM(Biocompatible Anchor for cell Membrane)は脂質オレイル基とポリエチレングリコールから成り、脂質オレイル基が細胞膜のリン脂質と相互作用することで細胞と基盤を接着する。またムール貝の足場接着タンパク質はポリフェノールタンパク質であり、それを利用した Cell-Tak も生体物質を多くの基盤に接着可能であると報告されている(Lin *et al.* 2007)。

本研究では Pv11 細胞に対し接着手法の検討を行い、Pv11 細胞において効果的な接着系を確立した。さらに乾燥保存を目標とするため、接着させた状態で細胞を乾燥保存し、再水和後も接着を維持する必要がある。そこで接着した状態で乾燥保存手法の検討を行い、細胞が接着しながら生存可能な標準プロトコルの確立を行なった。

材料と方法

1. Pv11 細胞培養プロトコル

Pv11 細胞は IPL-41 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に対し 2.6 g/L tryptose phosphate broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を添加し、牛胎児血清(FBS)と抗菌・抗生物質溶液 (AA mix; penicillin, amphotericin B, and streptomycin; (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)) をそれぞれ終濃度が 10 % (v/v) および 0.05 % (v/v) になるように添加して作製した培地を用いて培養した。Pv11 細胞を 3×10^5 cells/mL になるように 5 mL 培地を含む培養フラスコ (T-25) へ播種し、25°C で継代培養した。6~7 日間に一度の頻度で継代した。Pv11 細胞の培養用に調整した上記の培地を培養用 IPL-41 medium と呼んだ。

2. 細胞接着用コーティング手法

いずれのコーティングも ϕ 12mm 丸型カバーガラス(アズワン)を使用した。コラーゲンコートは Cellmatrix type I-C (Nitta Gelatin Inc., Tokyo, Japan) を HCl (pH3.0) で 10 倍(0.3 mM)、30 倍(0.1 mM)、100 倍(0.03 mM)希釈してそれぞれカバーガラス上を覆い、60 分間静置した。MilliQ 水で 2 回 wash し乾かした。BAM コートは BAM 粉末(SUNBRIGHT OE-040CS; NOF corporation, Tokyo, Japan) を Dimethyl sulfoxide (DMSO) (FUJIFILM Wako, Osaka, Japan) へ 10 mM になるよう溶解した。BAM solution を 10 μ M、100 μ M、1 mM になるよう Phosphate-buffered saline (PBS (-); FUJIFILM Wako) に希釈した。作成したコラーゲンコート済みカバーガラスを BAM solution で覆い、37°C で 60 分間インキュベートした。PBS (-) で 1 度洗浄、MilliQ 水で 2 度洗浄し乾かした。Cell-Tak コートは Cell-Tak(Corning Inc., NY, USA) を 1 カバーガラスあたり 1 μ g/cm²、3.5 μ g/cm²、10 μ g/cm² の濃度になるよう、0.1M 重炭酸ナトリウム(pH 8.0)に希釈した。Cell-Tak の半量の 1N NaOH を添加し、カバーガラスをコートし、60 分間インキュベートした。MilliQ 水で 2 度洗浄し乾かした。PDL コートは poly-d-lysine(PDL: Poly-D-lysine 0.1 mg/mL) を MilliQ 水で 5 μ g/ml、50 μ g/ml、500 μ g/ml になるよう希釈し、カバーガラスを覆い 60 分間インキュベートした。MilliQ 水で 2 度洗浄し乾かした。PEI コートは Polyethylenimine “Max” (PEI; Polysciences, Inc., Warrington, PA) を MilliQ 水で 5 μ g/ml、50 μ g/ml、500 μ g/ml になるよう溶解しカバーガラスを覆い 60 分間インキュベートした。2 回 MilliQ で洗浄し、乾かした。

3. Pv11 細胞の接着手法

Pv11 細胞懸濁液を 300 x g で 5 分間遠心して、上清を取り除いた。各種コーティング手法の接着性の検討においては、以下に示すいくつかの接着検定用溶液で、上清を除いた Pv11

細胞を 1 カバーガラスあたり 1×10^6 cells / 100 μ L になるように懸濁した。各種コーティング手法の検討においては、接着検定用溶液として PBS (-)を用いた。FBS の接着性に検討においては、FBS なしの IPL-41 medium、PBS (-)、またはそれぞれに 10% (v/v) fetal bovine serum を添加した溶液を、接着検定用溶液として利用した。これ以降接着用に使用する添加なし IPL-41 を接着用 IPL-41 medium と呼んだ。

4. Pv11 細胞の乾燥再水和手法

Pv11 細胞は、高い濃度のトレハロースに 48 時間暴露させることで、乾燥耐性が誘導される。600 mM trehalose と培養用 IPL-41 medium を 9:1 で混合して Trehalose mixture を作成した。Trehalose mixture に 2×10^7 cells/ml の濃度になるよう Pv11 細胞を懸濁し、25°C で 48 時間インキュベートすることで、トレハロースによる乾燥耐性誘導処理（以降、トレハロース処理と呼ぶ）を行った。

トレハロース処理後の細胞を 300 x g で 5 分間遠心して回収し、Trehalose mixture 40 μ L で 4×10^6 cells になるよう再懸濁し、35mm dish へ滴下した。滴下後、1 kg シリカゲルが入った相対湿度 10%以下の容器(215×220×200 mm)へ移し、7~10 日間乾燥した。乾燥処理後に、それぞれの 35mm dish へ培養用 IPL-41 medium を 1 ml 添加することで、Pv11 細胞を再水和させた。

5. 接着乾燥保存手法：細胞接着後トレハロース処理

Pv11 細胞を回収し上清を取り除き、 1×10^6 cells /100 μ L になるように接着用 IPL-41 medium で懸濁して、60 分間カバーガラス上に静置して接着させた。PBS (-)で 2 回洗浄することで浮遊細胞を除き、Trehalose mixture を用いて 25°Cで 48 時間トレハロース処理した。静置後、カバーガラス上の Trehalose mixture を除去し、再び Trehalose mixture 50 μ L で覆い、上記と同様の手法で 7~10 日間乾燥した。乾燥後それぞれの 35mm dish へ培養用 IPL-41 medium を 1ml 添加することで再水和した。再水和後 1 時間において、2 回 PBS (-) で wash し浮遊細胞を除去し、培養用 IPL-41 medium に置換し 7 日間 25°Cで培養した。

6. 接着乾燥保存手法：トレハロース処理後細胞接着

通常通りトレハロース処理した Pv11 細胞を回収し上清を取り除いた。1 カバーガラスあたり 1×10^6 cells になるよう、FBS なし Trehalose mixture(600 mM trehalose with 10% (v/v) IPL-41 medium)100 μ L に懸濁し、カバーガラス上へ 60 分間静置し接着させた。静置後、カバーガラス上の FBS なし Trehalose mixture を除去し、Trehalose mixture 50 μ L で覆い、上記と同様の手法で 7~10 日間乾燥保存した。

BAM コーティング、Cell-Tak コーティングカバーガラスに対する接着は 600 mM トレハ

コースと PBS (-)を混ぜた PBS Trehalose mixture(600 mM trehalose with 10%(v/v) PBS (-))を用いた。接着後カバーガラス上の PBS Trehalose mixture を除去し、Trehalose mixture 50 μ L で覆い、上記と同様の手法で 7~10 日間乾燥保存した。

乾燥後それぞれへ培養用 IPL-41 medium を 1 ml 添加することで再水和した。再水和後 1 時間において、2 回 PBS (-)で wash し浮遊細胞を除去し、培養用 IPL-41 medium に置換し 7 日間 25°Cで培養した。

7. Pv11 細胞の接着系の評価

接着後の細胞を 2 回 PBS (-)で洗浄することで浮遊細胞を取り除いた。トレハロース処理後においては PBS-Trehalose mixture (600 mM trehalose with 10%(v/v) PBS (-))で洗浄し浮遊細胞を除去した。細胞染色は propidium iodide (PI) (Dojindo, Kumamoto, Japan)、Hoechst 33342 solution ('Hoechst') (Dojindo, Kumamoto, Japan)で細胞を 2 重染色し、画像を取得した(BZ-X710, Keyence)。PI は 0.75 μ g/ml, Hoechst は 2 μ g/ml の濃度になるよう培養用 IPL-41 medium で調整し染色を行った。PI は励起波長/蛍光波長が 544 nm/605 nm、Hoechst は 405 nm/460 nm で撮影した。接着能は接着細胞密度(immobilized cells/cm²)で表し、全細胞数(Hoechst+)をカウントすることで算出した。接着系の毒性評価は細胞生存率(Survival rate)で表し、細胞接着状態で 24 時間培養し、生細胞数(Hoechst+, PI-)を全細胞数(Hoechst+)で除することで求めた。

8. 乾燥再水和後 Pv11 細胞の接着系の評価

乾燥再水和後においては、カバーガラスに接着した細胞の細かい破片が、死細胞染色液である PI 溶液に染まってしまい、生存率を評価できなかったため、Calcein-AM solution('calcein')(Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて生細胞を染色した。培養用 IPL-41 medium で再水和後の Pv11 細胞(DAY0)を Calcein, Hoechst で細胞を二重染色し、Calcein は励起波長/蛍光波長が 488 nm/525 nm、Hoechst は 405 nm/460 nm で撮影した。Calcein は 2 μ g/ml, Hoechst は 2 μ g/ml の濃度になるよう培養用 IPL-41 medium で調整し染色を行った。接着能は上記と同様に全細胞数(Hoechst+)から算出し、細胞蘇生率は生存率(viability)で表し、画像中の生細胞数(Calcein+, Hoechst+)を全細胞数(Hoechst+)で除することで求めた。

接着乾燥再水和後の細胞増殖能力は、再水和後 DAY0 と DAY7 の生細胞数の変化から評価した。DAY0 において上記で求めたカバーガラスに接着している全細胞数に生存率を乗じ、生細胞数を算出した。DAY7 においては接着状態で培養用 IPL-41 medium を用いて 7 日間 25°Cで培養し、細胞懸濁後、Hoechst, PI で二重染色した。染色後の細胞を血球計算盤(WATSON Bio Lab, Kobe, Japan)を用いてカウントし生細胞数(Hoechst+, PI-)を全細胞数

(Hoechst+)で除することで生細胞数を算出した。

9. 画像解析

細胞数測定には Fiji (バージョン 2.3.0) を使用した(Schindelin *et al.* 2012)。

10. 統計解析

すべてのデータは平均値と標準偏差 (SD) で表した。統計解析として、二群間比較では Student's t-test を行い検定した。三群以上の比較では 1 元配置分散分析(one-way ANOVA) と多重比較検定(Tukey's post-hoc test) を行い検討した。統計解析には GraphPad Prism 10 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)を用いた。

結果

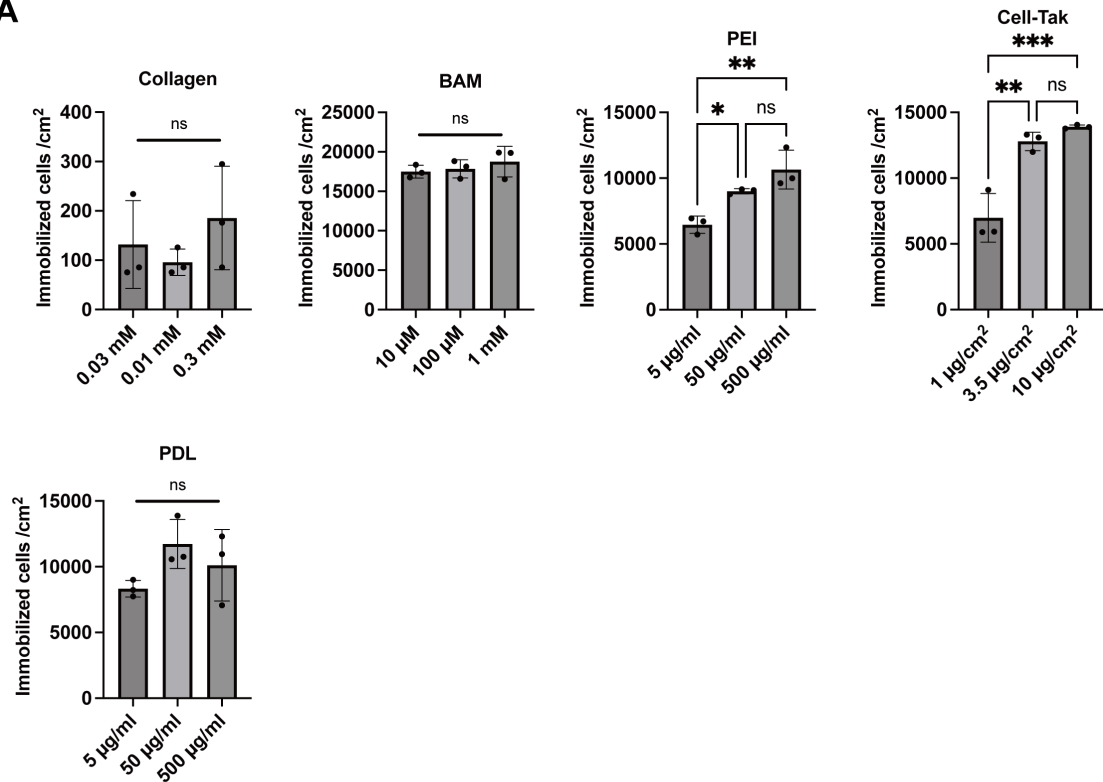
1. Pv11 細胞における接着系の検討

既存で報告されている接着系を用いて Pv11 細胞が接着するか検討した。検討する接着系としてコラーゲン、BAM、Cell-Tak、PEI、PDL を用いた。まずそれぞれの接着系の最適濃度の検討を行った(Fig. 1)。濃度を振ってカバーガラスをコーティングし、PBS (-)に置換した Pv11 細胞を 1 時間静置した。洗浄し浮遊細胞を除去後、接着している細胞の密度を算出することで接着能を評価した(Fig. 1A)。コラーゲンはいずれの濃度も他の接着方法の 1/10 程度しか細胞は接着しなかった。それ以外の接着系はいずれも 10,000 cells/cm² の高密度で接着した。次に接着性を示した BAM、Cell-Tak、PEI、PDL に着目し、接着した状態で培養用 IPL-41 medium 中で 24 時間培養し、24 時間後の細胞生存率を算出することで細胞毒性を評価した(Fig. 1B)。BAM、Cell-Tak は濃度によって毒性の違いは見られず、PEI、PDL は濃度を高くすると細胞毒性が見られた。以上の結果から接着細胞密度が高く、細胞生存率に悪影響がなかった濃度として、collagen 0.3 mM、BAM 100 µM、Cell-Tak 3.5 µg/cm、PEI 50 µg/ml、PDL 50 µg/ml をそれぞれ最適濃度に決定した。

次に決定した最適濃度を用いて Pv11 細胞を接着させ、それぞれの接着系の比較を行った。比較のためのネガティブコントロールとして何もコーティングしないガラス(UT)を用意し検討を行なった。各接着系でコートしたカバーガラス上に PBS (-)に置換した Pv11 細胞を 1 時間静置した。洗浄し浮遊細胞を除去後、接着している細胞の密度を算出することで接着能の比較を行った(Fig. 2A, B)。すると予想に反してネガティブコントロールとしておいた UT に Pv11 細胞が良く接着した。また UT と比較すると、コラーゲンコーティングに細胞はほとんど接着せず、BAM コーティング、Cell-Tak コーティングは同程度に良く接着できていた。また、PEI、PDL は接着できているものの接着している細胞数は低かった。

接着した状態で培養用 IPL-41 medium 中で 24 時間培養し、24 時間後の細胞生存率を算出することで細胞毒性の比較を行った(Fig. 2C)。いずれの接着系も 24 時間後において細胞生存率の違いが見られず、毒性は見られなかった。

A



B

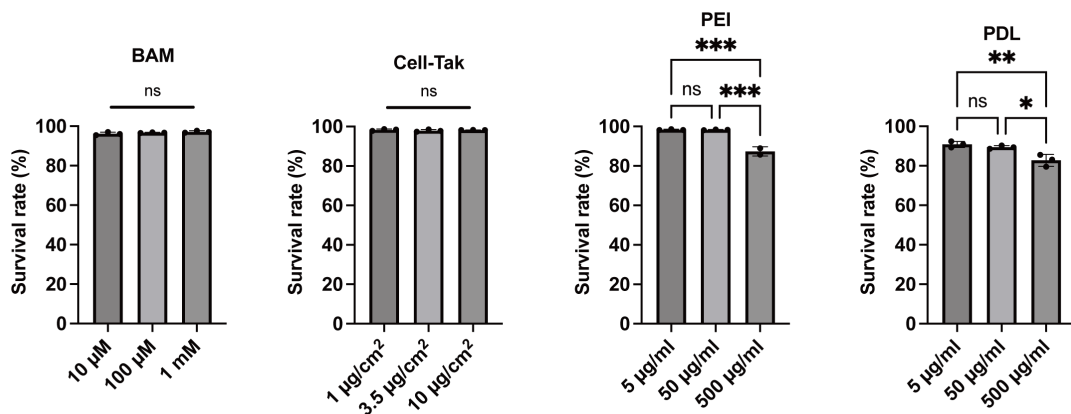


Fig. 1. Pv11 細胞における接着系の最適濃度の検討

接着系としてコラーゲン (0.03 mM、0.1 mM、0.3 mM)、BAM (10 μ M、100 μ M、1 mM)、Cell-Tak (1.0 μ g/cm²、3.5 μ g/cm²、10 μ g/cm²)、PEI (5 μ g/ml、50 μ g/ml、500 μ g/ml) または PDL (5 μ g/ml、50 μ g/ml、500 μ g/ml) でコーティングしたカバーグラスを用いて、PBS (-)に置換した Pv11 細胞を 1 時間静置し接着させた。(A)洗浄し浮遊細胞を除去後、それぞれの接着系における接着能を、Pv11 細胞の接着細胞数を算出することで評価した。(B)それぞれの接着系の細胞毒性を、接着状態で培養用 IPL-41 medium 中に 24 時間培養後の細胞生存率を算出することで評価した。グラフは mean \pm SD で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3)。P 値は 0.0001 から 0.001 は***; 0.001 から 0.01 は**; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

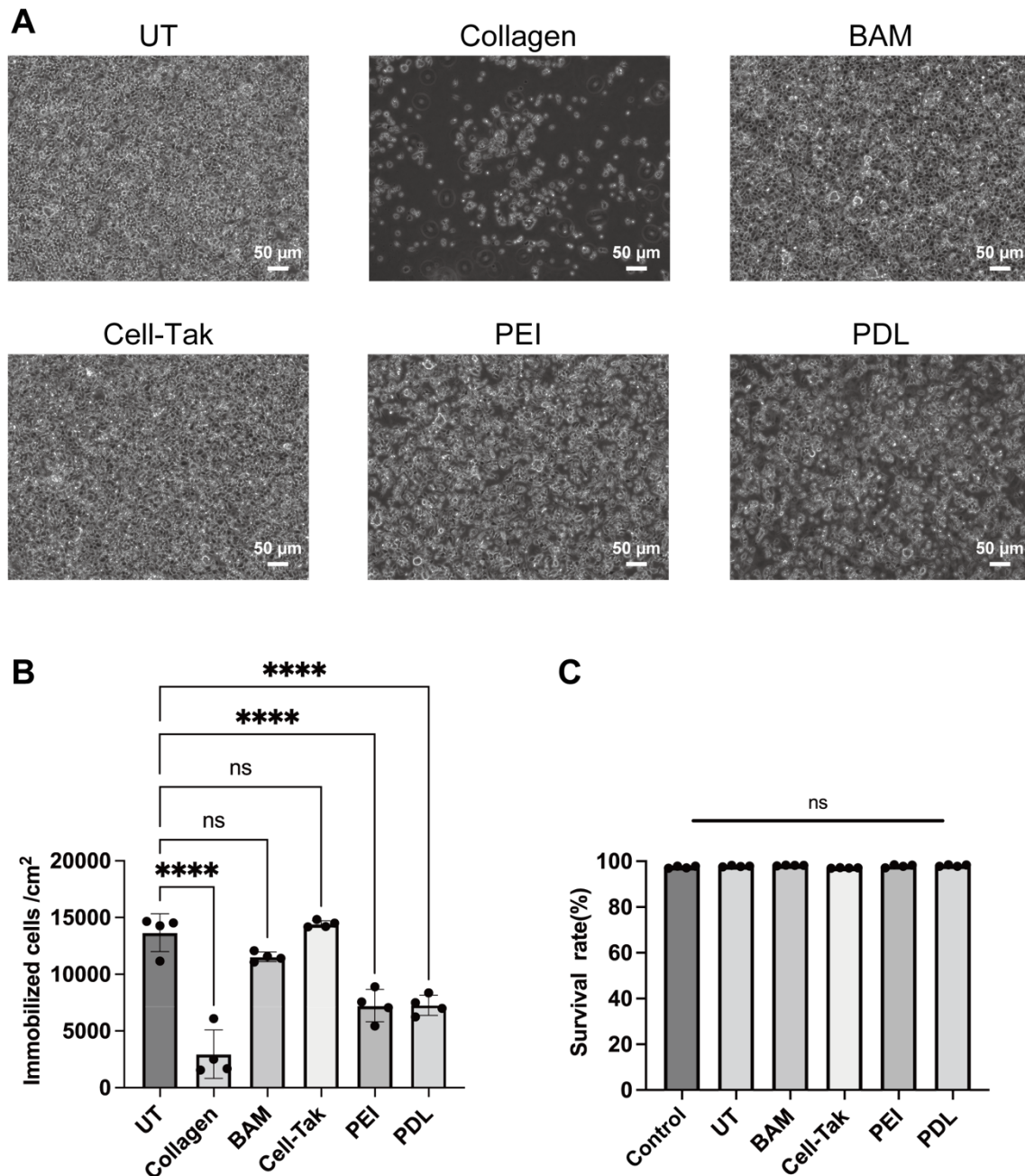


Fig. 2. Pv11 細胞の接着系の検討

コントロールとしてコートなしカバーガラス (UT)、接着系としてコラーゲン (0.3 mM)、BAM (100 μ M)、Cell-Tak (3.5 μ g/cm²)、PEI (50 μ g/ml) または PDL (50 μ g/ml) でコーティングしたカバーガラスを用いて、PBS (-) に置換した Pv11 細胞を 1 時間静置し接着させた。(A) 洗浄し浮遊細胞を除去後、それぞれの接着系で接着した Pv11 細胞の顕微鏡画像。白線は scale bar で 50 μ m を表す。(B) 洗浄し浮遊細胞を除去後、それぞれの接着系における接着能を、Pv11 細胞の接着細胞密度を算出することで評価した。(C) それぞれの接着系の細胞毒性を、接着状態で培養用 IPL-41 medium 中で 24 時間培養後の

細胞生存率を算出することで評価した。Control は接着させていない Pv11 細胞を表す。グラフは mean±SD で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=4) P 値は <0.0001 は****; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

2. Pv11 細胞における FBS の接着性への影響

予想に反し Pv11 細胞は PBS (-)に置換することで、ネガティブコントロールとしておいた UT に効率よく接着した。よって Pv11 細胞は元々細胞接着性を持っている可能性が示唆された。PBS (-)で接着したことから、通常の培養条件下で Pv11 細胞が接着性を示さない原因として、培地中に添加している FBS にあるのではないかと推測した。そこで、IPL-41 medium と PBS (-)の両方に、FBS 添加なし、ありの条件で Pv11 細胞を UT に対し接着させ、FBS の接着性への影響を検討した(Fig. 3)。FBS 非添加の場合、IPL-41 medium、PBS (-)いずれも、Pv11 細胞は 10,000 cells/cm²を超える高い細胞接着密度を示した。一方で、FBS を添加するといずれも細胞接着密度は著しく低下した。

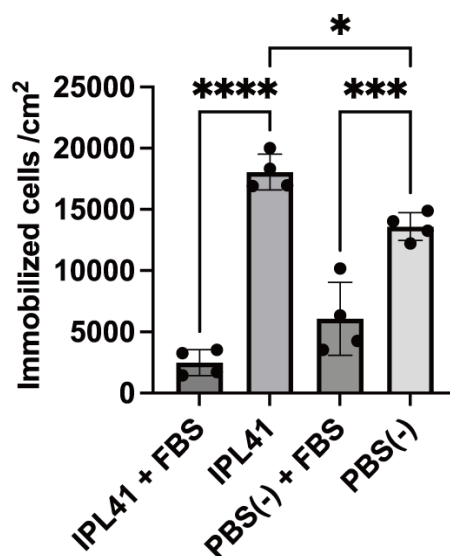


Fig. 3. Pv11 細胞における FBS の接着性への影響

コートなしカバーガラス(UT)に対し、Pv11 細胞を FBS 添加あり、なしの IPL-41 medium、PBS (-)に置換し、1 時間静置した。洗浄し浮遊細胞を除去後、接着細胞数を算出することで FBS の接着性への影響を評価した。グラフは mean±SD で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=4) P 値は < 0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***; 0.001 から 0.01 は**; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

3. Pv11 細胞における接着乾燥手法の検討

Pv11 細胞において効率良く接着する手法を複数確立した。そこで次に接着乾燥プロトコルの確立を行なった。結果より FBS を含まない IPL-41 medium によって、カバーガラス上によく接着できた。この手法が最も簡便な接着手法であったことから、本手法を用いて Pv11 細胞を接着させ乾燥保存可能か検討を行った。Pv11 細胞は Trehalose mixture (600 mM trehalose with 10%(v/v) 培養用 IPL-41 medium) 中で 48 時間インキュベートする、“トレハロース処理”を行うことで乾燥耐性が誘導され、乾燥保存可能になる。よって接着乾燥保存手法について 2 つのアプローチを検討した (Fig. 4A)。1 つ目は Pv11 細胞を接着させ、トレハロース処理後、乾燥させる手法である (以降、“**接着後トレハロース処理**”と呼ぶ)。2 つ目は、Pv11 細胞を通常通りフラスコ内でトレハロース処理した後、接着し、乾燥させる手法である (以降、“**トレハロース処理後接着**”と呼ぶ)。トレハロース処理後接着の場合、IPL-41 medium で細胞を接着させてしまうと、Trehalose mixture と培地の浸透圧の違いによる毒性や、細胞内に取り込んだトレハロースが培地中に流出してしまう恐れがある。そのためトレハロース溶液によって細胞を接着させることが必要であるが、通常のトレハロース処理溶液は培養用 IPL-41 medium を添加しており FBS が含まれている。そこで FBS が含まれない Trehalose mixture を用意し、トレハロース処理後の細胞を接着した。

まず両手法において、トレハロース処理後の細胞接着能と接着後の細胞生存率を評価した (Fig. 4B, C)。トレハロース処理後の接着させた細胞を、洗浄し浮遊細胞を除去後、接着細胞数を定量した (Fig. 4B)。両手法とも細胞は接着できており、二つの手法を比較すると“接着後トレハロース処理”は“トレハロース処理後接着”より多くの細胞が接着していた。浮遊細胞を除去後、接着細胞の細胞生存率を定量し、接着なしの通常通りトレハロース処理した細胞と比較した (Fig. 4C)。すると両手法とも接着なし細胞と比べて細胞生存率の違いは見られず、毒性は見られなかった。また細胞生存率に関しても、“接着後トレハロース処理”の方が“トレハロース処理後接着”より有意に高かった。結果としてトレハロース処理後の細胞接着能、細胞毒性の評価から、両手法とも良好であったが、“接着後トレハロース処理”の方が有効という結果であった。

次に接着状態で細胞を乾燥させ、再水和後も細胞接着を維持するか、また接着状態で細胞が蘇生するか検討した (Fig. 4D, E)。接着状態で乾燥処理を行い、再水和後 1 時間において 2 回 PBS (-) で洗浄することで浮遊細胞を除去し、接着細胞数を定量した (Fig. 4D)。トレハロース処理後と同様に、両手法とも細胞は接着できており、“接着後トレハロース処理”は“トレハロース処理後接着”より多くの細胞が接着していた。次に浮遊細胞を除去後の接着状態の細胞における生存率を定量した (Fig. 4E)。“接着後トレハロース処理”において、コントロールとして用いた接着なし Pv11 細胞と比較して著しく低く、ほとんど細胞は生存していなかった。一方で、“トレハロース処理後接着”は、通常の Pv11 細胞と同じように生存した。結果として接着状態で乾燥保存するためには、“接着後トレハロース処理”は適さず、“トレ

ハロース処理後接着”する必要があった。

接着した状態で乾燥処理しても Pv11 細胞は生存したが、細胞が生存していることを示す明確な指標である増殖能が維持されているかについても検討した(Fig. 4F)。再水和後の細胞を洗浄し浮遊細胞を除去後、培養用 IPL-41 medium で 7 日間培養した。7 日間培養後の生細胞数を算出することで細胞増殖能を評価した(Fig. 4F)。いずれの手法においても細胞は増殖しており、“接着後トレハロース処理”においても生存細胞が少ないにもかかわらず、細胞増殖が観察された。これらの結果より、乾燥処理に耐えた細胞は増殖能力を保持していることが確認できた。

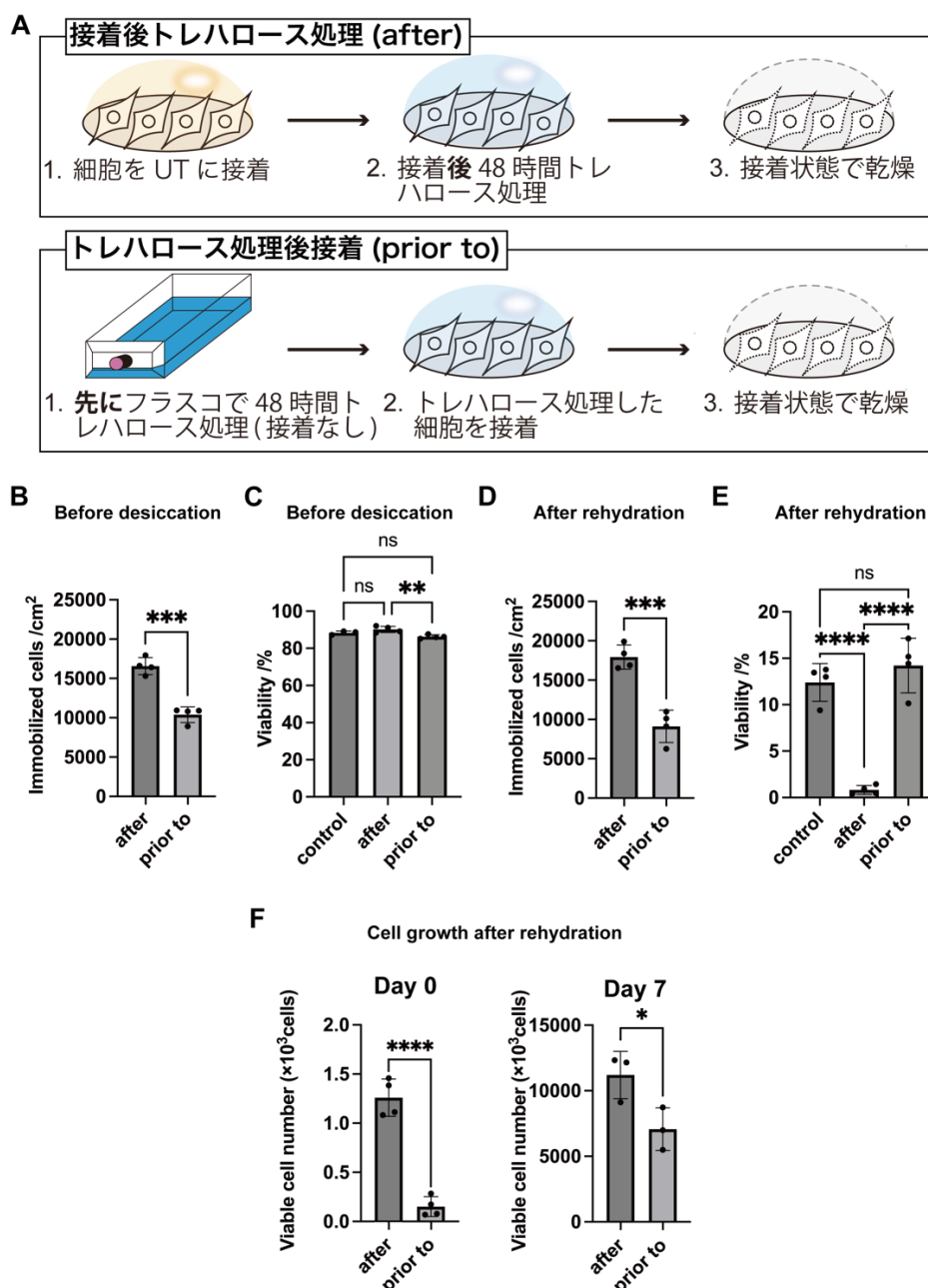


Fig. 4. Pv11 細胞における接着乾燥手法の検討

(A) Pv11 細胞の接着乾燥プロトコルの模式図。上段(接着後トレハロース処理)は細胞を接着させてからトレハロース処理を行い、乾燥処理を行う方法。下段(トレハロース処理後接着)は予めトレハロース処理した細胞を接着させ乾燥処理を行う。以下のグラフにおいて”接着後トレハロース処理”の結果は after、“トレハロース処理後接着”の結果は prior to で表記した。また接着させず通常通りのトレハロース処理、乾燥処理を行った Pv11 細胞を control として表記した。(B) 両接着手法の乾燥ステップの直前であるトレハロース処理後において、細胞が接着するか接着細胞密度を算出することで評価した。(C) 同様にトレハロース処理後における接着細胞の生存率を算出することで毒性を評価した。(D) 両接着手法において乾燥処理を行い、再水和後の接着細胞密度を算出することで、乾燥再水和後も細胞が接着可能か評価した。(E) 同様に乾燥再水和後、接着されていた細胞の生存率を算出し、接着状態で乾燥保存可能か評価した。(F) 両接着手法における再水和直後(0 日目)の接着細胞の生細胞数と 7 日目の生細胞数から細胞増殖能を評価した。グラフは mean±SD で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3 または n=4) P 値は <0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***; 0.001 から 0.01 は**; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

4. Pv11 細胞の接着乾燥における接着系の比較

Pv11 細胞は予めトレハロース処理した細胞を接着させ乾燥保存する”トレハロース処理後”で、接着状態で乾燥保存することが可能だった。そこで、UT と同様に高い細胞接着能を示した(Fig. 1)、BAM、Cell-Tak においても”トレハロース処理後接着”で接着乾燥保存が可能かどうか、また接着能や細胞生存率に向上が見られるか検討を行った(Fig. 5)。まず、トレハロース処理後の細胞の接着能を比較した(Fig. 5A)。BAM、Cell-Tak でコートしたカバーガラスに対し、トレハロース処理後の細胞を接着させ、洗浄し浮遊細胞を除去後の細胞接着密度を算出した。BAM、Cell-Tak いずれも UT と同様に細胞が接着されており、差は見られなかった。また同様にトレハロース処理後、接着している細胞の生存率を算出した(Fig. 5B)。細胞生存率も違いが見られず、BAM、Cell-Tak の細胞毒性は見られなかった。

続いて、BAM、Cell-Tak において細胞接着した状態で乾燥処理を行い、再水和後も細胞が接着しているか評価した(Fig. 5C)。乾燥再水和後の細胞を洗浄し、浮遊細胞を除去し、接着細胞密度を算出した。結果として BAM、Cell-Tak いずれも UT と同様によく細胞接着を維持していた。次に乾燥再水和後の接着している細胞の生存率を算出した(Fig. 5D)。すると BAM、Cell-Tak いずれも細胞は生存していたが、BAM においてはコントロールの非接着 Pv11 細胞より有意に低かった。さらに再水和した細胞を洗浄し浮遊細胞を除去後、培養用 IPL-41 medium で 7 日間培養し、生細胞数を算出することで細胞増殖能を評価した(Fig. 5E)。BAM、Cell-Tak いずれも、UT と同様の細胞増殖能を示した。以上より BAM、Cell-Tak いずれも、“トレハロース処理後接着”により、接着乾燥保存が可能であり、UT と比べ

ると接着能、細胞生存率の有意な向上は見られなかった。

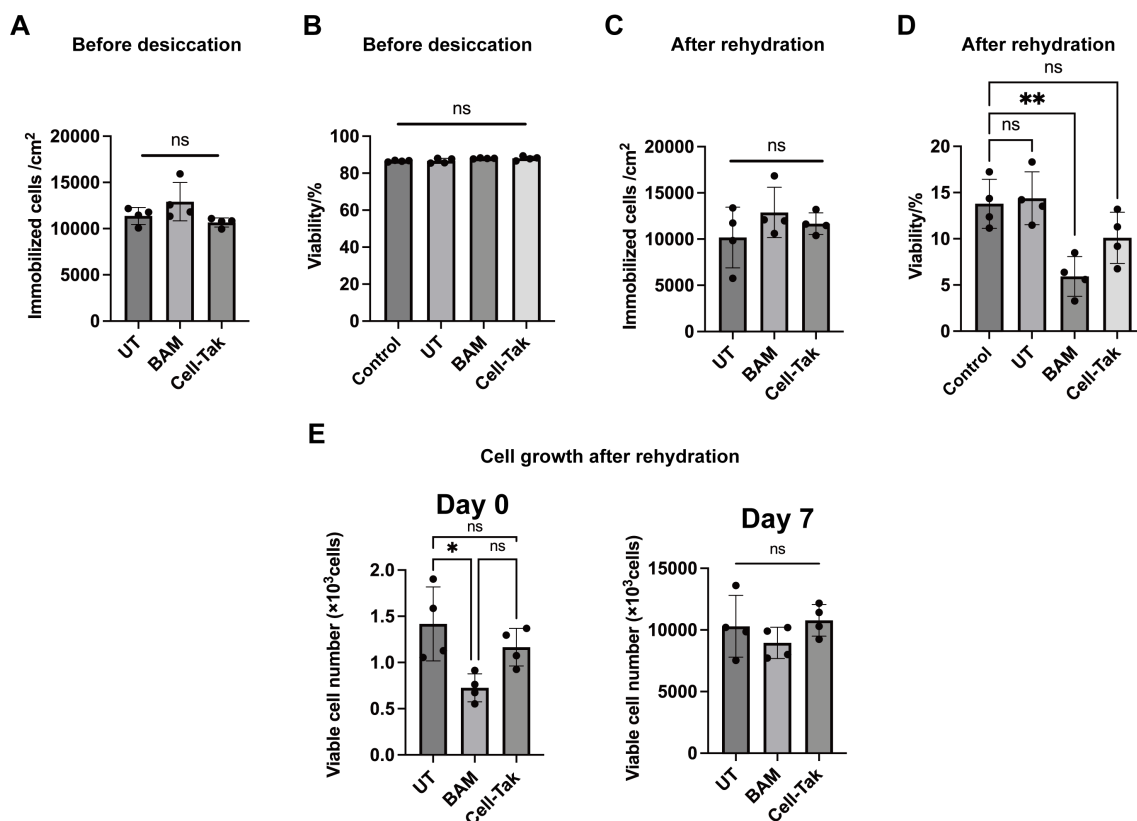


Fig. 5. Pv11 細胞における接着乾燥における接着系の比較

トレハロース処理後接着(Fig. 4A 下段)を用いて、トレハロース処理した Pv11 細胞を BAM または Cell-Tak コートガラスに接着し乾燥保存を行った。コートなしガラス(UT)と比較することで BAM、Cell-Tak で向上するか評価を行った。また接着させず通常通りのトレハロース処理、乾燥処理を行った Pv11 細胞を control として表記した。(A) 乾燥ステップの直前であるトレハロース処理後において、接着細胞密度を算出し接着系の接着能の比較を行った。(B) 同様にトレハロース処理後における接着細胞の生存率を算出することで接着系の毒性を比較した。(C) 接着状態で乾燥処理を行い、再水和後の接着細胞密度を算出することで、乾燥再水和後における接着系の接着能を比較した。(D) 同様に乾燥再水和後、接着されていた細胞の生存率を算出し、接着系の乾燥耐性への影響を比較した。(E) 接着系の乾燥耐性への影響を比較するため、再水和直後(0 日目)の接着細胞の生細胞数と 7 日目の生細胞数から細胞増殖能を評価した。グラフは mean \pm SD で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=4) P 値は 0.001 から 0.01 は**；0.01 から 0.05 は*；0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

また、“トレハロース処理後接着”において BAM、Cell-Tak は UT と違いが見られなかったが、著しく低い細胞生存率を示した“接着後トレハロース処理”においても同様の結果が見られるか評価した(Fig. 6)。BAM、Cell-Tak において細胞接着した状態で乾燥処理を行い、再水和後も細胞が接着しているか評価した(Fig. 6A)。乾燥再水和後の細胞を洗浄し、浮遊細胞を除去し、接着細胞密度を算出すると細胞は接着していた。次に接着細胞の細胞生存率を算出した(Fig. 6B)。結果より BAM、Cell-Tak はコントロールの非接着 Pv11 細胞より著しく低い細胞生存率であった。さらに再水和した細胞を洗浄し浮遊細胞を除去後、培養用 IPL-41 medium で 7 日間培養し、生細胞数を算出することで細胞増殖能を評価した(Fig. 6C)。BAM、Cell-Tak いずれも接着状態で生存した細胞は増殖能を示した。よって“接着後トレハロース処理”においても BAM、Cell-Tak は UT と同様の結果を示し、乾燥保存には適さなかった。

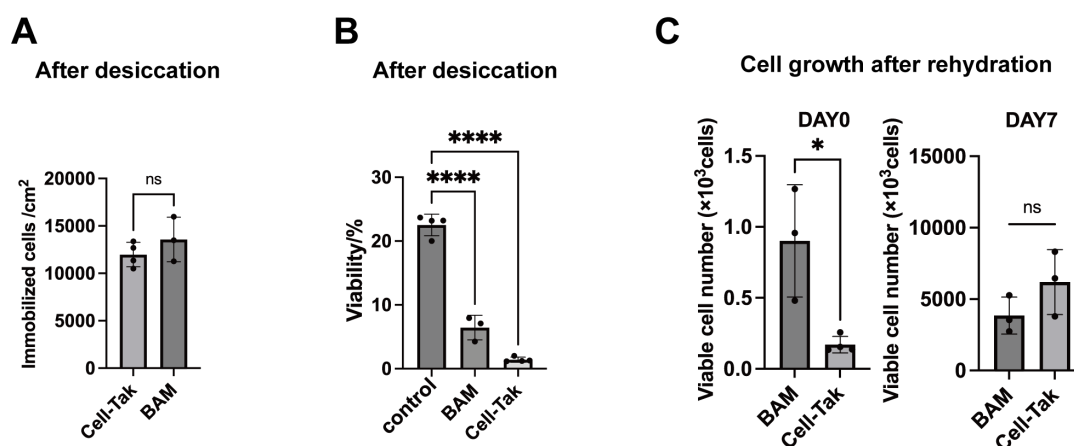


Fig. 6. 接着後トレハロース処理による BAM, Cell-Tak を用いた接着乾燥保存。接着後トレハロース処理(Fig. 4A 上段)を用いて、Pv11 細胞を BAM または Cell-Tak コートガラスに接着しトレハロース処理を行い乾燥保存した。また接着させず通常通りのトレハロース処理、乾燥処理を行った Pv11 細胞を control として表記した。(A) 接着状態で乾燥処理を行い、再水和後の接着細胞密度を算出した。(B) 乾燥再水和後、接着されていた細胞の生存率を算出し、乾燥耐性を評価した。(C) 再水和直後(0 日目)の接着細胞の生細胞数と 7 日目の生細胞数から細胞増殖能を評価した。グラフは mean±SD で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3 または n=4) P 値は < 0.0001 は****; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

考察

Pv11 細胞はこれまで接着能力がほとんどない細胞として知られていた(Nakahara *et al.* 2010)。本研究より様々な接着系を検討することで、Pv11 細胞を接着させることに成功した。さらに接着した状態で乾燥保存することに成功した。Pv11 細胞の接着手法としては BAM と Cell-Tak の二つの手法が高い接着率を示すことがわかった。さらに特筆すべきことに血清非存在下培地に置き換えることだけでガラス上に BAM やセルタックと同じ程度接着できることが明らかになった。この手法は予め接着面上をコーティングする必要のないため、実験の簡便性やコスト面から優れている。

なぜ FBS を除くことで Pv11 細胞はガラス面上に接着できるのだろうか。浮遊細胞としてよく知られる Jacket 細胞において FBS を除去することで接着性を示すことが報告されている(Lin *et al.* 2007)。他の哺乳類細胞でも同様に報告されており、哺乳類細胞では一般的な現象である。また接着細胞である HT1080 細胞や Hela 細胞においても FBS 非存在下で速やかに接着することが報告されている(Mihara *et al.* 2015; Nakayama *et al.* 2014)。これらの接着細胞は FBS 存在下では細胞接着因子と ECM(Extracellular Matrix)を介し接着するが、FBS 非存在下では静電相互作用により接着すると報告されている(Hoshiba *et al.* 2018)。FBS 非存在下での接着は基材を負電荷、正電荷いずれに帯電させても接着性を示すが、接着力は負電荷に帯電させた方が強いことが報告されている。水溶液中でガラス表面は負電荷であることが知られ、Pv11 細胞も非常に良く接着していた。一方で、ガラス上を PDL や PEI により正電荷にコートした場合、細胞は接着したものの数は少なかった。このように Pv11 細胞においても同様の現象が見られており、FBS 非存在下での接着は静電相互作用であると考えられる。また、他の昆虫細胞の 1 つである Sf21 細胞は FBS 存在下でも接着するが、特徴的な糖鎖ラフトを形成することで細胞膜電位が低くなり、強力な細胞接着能を発揮することが報告されている(Matsuzaki *et al.* 2022)。Pv11 細胞が FBS 存在下で接着できない理由として、この糖鎖ラフトが存在しない可能性も考えられる。

BAM は、オレイル鎖と細胞膜のリン脂質との疎水性相互作用を通じて、細胞を接着する(Kato *et al.* 2003)。一般的に疎水性相互作用は、静電的相互作用よりも強力な接着手法である。したがって、BAM は灌流系や動きが多い作業環境など、より過酷な条件下でも細胞を接着可能だと期待できる。一方、Cell-Tak はイガいの接着タンパク質由来の接着手法である。これらはポリフェノールタンパク質であり、そのポリフェノール環と疎水性表面が相互作用することで細胞接着が可能であり、金属やテフロンなどの素材にも接着することができる(Charlton *et al.* 2002; Lin *et al.* 2007; Waite and Tanzer 1981)。よって UT は Pv11 細胞を接着乾燥状態で保存する方法として最も簡便、かつ安価な方法であるが、用途や基質の種類によっては BAM や Cell-Tak を使い分けることが可能であり複数の接着乾燥手法を確立した価値は大きいと考える。

また本研究結果より、細胞を接着させて乾燥保存するためには、トレハロース処理と細胞接着の順番が重要であることが明らかになった。細胞を接着させた状態でトレハロース処理を行い乾燥すると、Pv11 細胞はほとんど生存しなかったが、増殖能力は保持していた。よって、限られた数の細胞でしか乾燥耐性の誘導が行われなかったことが示唆される。Pv11 細胞が接着している場合、トレハロース溶液と接する細胞表面の面積が減少するため、細胞内に十分なトレハロースを取り込むことができなかった可能性が考えられる。トレハロースはネムリユスリカにおいて、乾燥状態でガラス状態に変化することで乾燥ストレスから細胞全体を物理的に保護すると考えられている(Sakurai *et al.* 2008)。また、トレハロースは、水分子と置換してリン脂質二重層との相互作用することで、細胞膜を保護することも報告されている(Crowe 2002)。加えて、トレハロースは化学的シャペロンとして作用し、細胞質タンパク質や膜タンパク質の凝集を防ぐことも考えられている(Tapia and Koshland 2014)。

接着後トレハロース処理で乾燥耐性が著しく減少するもう一つの理由として、シグナル伝達がうまく行われず乾燥耐性関連遺伝子の十分な誘導が行われなかった可能性が考えられる。Pv11 細胞においてトレハロース処理は細胞内 Ca^{2+} の急激な上昇を引き起こし、これが乾燥耐性誘導の引き金となることが示唆された(Miyata *et al.* 2021)。細胞内 Ca^{2+} の上昇により、HSF1 や NF- κ B といった転写因子の制御ネットワークを駆動し、乾燥耐性に寄与する複数の遺伝子の発現を制御し乾燥保存が可能になると考えられている(Tokumoto *et al.* 2021; Yamada *et al.* 2020)。トレハロース処理中に起こる Ca^{2+} の上昇は、高浸透圧によって引き起こされると考えられる(Miyata *et al.* 2021)。本手法で細胞を接着状態でトレハロース処理を行うと、浸透圧ストレスが弱まり、乾燥耐性に寄与する遺伝子の発現誘導が不十分であった可能性が考えられる。接着後トレハロース処理の方が乾燥再水和後においても接着細胞数が多かったことから、十分量のトレハロースの取り込みの実現、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により乾燥耐性関連遺伝子の発現誘導ができれば、より効果的な接着乾燥保存ができるかもしれない。

これまで Pv11 細胞は接着能力がないことから使用できる範囲が限られており、匂いセンサとして利用することは困難であった。本研究より接着系の確立、さらには接着状態で乾燥保存を達成できた。これによりマイクロ流体デバイスに組み込むことや、常温乾燥状態で保管、輸送し、再水和することで、ready to use に使用できる匂いセンサの実現が期待される。さらに次章からは Pv11 細胞における嗅覚受容体乾燥保存性の検討を行うが、本章で確立した接着系を用いることで、細胞を動かすことなく嗅覚受容体の機能評価を行うことが可能になった。

参考文献

- Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P (2016) Introduction to biosensors. *Essays Biochem* 60:1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Charlton AJ, Baxter NJ, Khan ML, Moir AJ, Haslam E, Davies AP, Williamson MP (2002) Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem* 50:1593-1601. <https://doi.org/10.1021/jf010897z>
- Crowe LM (2002) Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131:505-513. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(01\)00503-7](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(01)00503-7)
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17R-27R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Erkut C, Penkov S, Khesbak H, Vorkel D, Verbavatz JM, Fahmy K, Kurzchalia TV (2011) Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. *Curr Biol* 21:1331-1336. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.064>
- Gupta N, Renugopalakrishnan V, Liepmann D, Paulmurugan R, Malhotra BD (2019) Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. *Biosens Bioelectron* 141:111435. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435>
- Gusev O, Suetsugu Y, Cornette R, Kawashima T, Logacheva MD, Kondrashov AS, Penin AA, Hatanaka R, Kikuta S, Shimura S, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Shagimardanova E, Alexeev D, Govorun V, Wisecaver J, Mikheyev A, Koyanagi R, Fujie M, Nishiyama T, Shigenobu S, Shibata TF, Golygina V, Hasebe M, Okuda T, Satoh N, Kikawada T (2014) Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge. *Nature Communications* 5:4784. <https://doi.org/10.1038/ncomms5784>
- H.E.Hinton (1960) Cryptobiosis in the larva of *Polypedilum vanderplanki* Hint. (Chironomidae). *Journal of Insect Physiology* 5:286-288
- Hoshiba T, Yoshikawa C, Sakakibara K (2018) Characterization of Initial Cell Adhesion on Charged Polymer Substrates in Serum-Containing and Serum-Free Media. *Langmuir* 34:4043-4051. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00233>
- Kato K, Umezawa K, Funeriu DP, Miyake M, Miyake J, Nagamune T (2003) Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface.

- Biotechniques 35:1014-1018, 1020-1011. <https://doi.org/10.2144/03355rr01>
- Kikuta S, Watanabe SJ, Sato R, Gusev O, Nesmelov A, Sogame Y, Cornette R, Kikawada T (2017) Towards water-free biobanks: long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells. *Sci Rep* 7:6540. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06945-y>
- Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 88:473-485. <https://doi.org/10.1083/jcb.88.3.473>
- Lin Q, Gourdon D, Sun C, Holten-Andersen N, Anderson TH, Waite JH, Israelachvili JN (2007) Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3782-3786. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607852104>
- Liu Q, Wu C, Cai H, Hu N, Zhou J, Wang P (2014) Cell-based biosensors and their application in biomedicine. *Chem Rev* 114:6423-6461. <https://doi.org/10.1021/cr2003129>
- Luka G, Ahmadi A, Najjaran H, Alocilja E, DeRosa M, Wolthers K, Malki A, Aziz H, Althani A, Hoorfar M (2015) Microfluidics integrated biosensors: a leading technology towards lab-on-a-chip and sensing applications. *Sensors (Basel)* 15:30011-30031. <https://doi.org/10.3390/s151229783>
- Matsuzaki T, Terutsuki D, Sato S, Ikarashi K, Sato K, Mitsuno H, Okumura R, Yoshimura Y, Usami S, Mori Y, Fujii M, Takemi S, Nakabayashi S, Yoshikawa HY, Kanzaki R (2022) Low surface potential with glycoconjugates determines insect cell adhesion at room temperature. *J Phys Chem Lett* 13:9494-9500. <https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.2c01673>
- Mihara K, Nakayama T, Saitoh H (2015) A convenient technique to fix suspension cells on a coverslip for microscopy. *Curr Protoc Cell Biol* 68:4 30 31-34 30 10. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0430s68>
- Miyata Y, Fuse H, Tokumoto S, Hiki Y, Deviatiiarov R, Yoshida Y, Yamada TG, Cornette R, Gusev O, Shagimardanova E, Funahashi A, Kikawada T (2021) Cas9-mediated genome editing reveals a significant contribution of calcium signaling pathways to anhydrobiosis in Pv11 cells. *Sci Rep* 11:19698. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98905-w>
- Miyata Y, Tokumoto S, Sogame Y, Deviatiiarov R, Okada J, Cornette R, Gusev O, Shagimardanova E, Sakurai M, Kikawada T (2019) Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, *Polypedilum vanderplanki*, with conserved function in various insect cell lines. *Sci Rep* 9:7004. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43441-x>

- Nakahara Y, Imanishi S, Mitsumasu K, Kanamori Y, Iwata K, Watanabe M, Kikawada T, Okuda T (2010) Cells from an anhydrobiotic chironomid survive almost complete desiccation. *Cryobiology* 60:138-146. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.004>
- Nakayama T, Mihara K, Kawata J, Kimura H, Saitoh H (2014) Adhesion of suspension cells on a coverslip in serum-free conditions. *Anal Biochem* 466:1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.023>
- Nguyen K, Kc S, Gonzalez T, Tapia H, Boothby TC (2022) Trehalose and tardigrade CAHS proteins work synergistically to promote desiccation tolerance. *Communications Biology* 5. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04015-2>
- Sakurai M, Furuki T, Akao K, Tanaka D, Nakahara Y, Kikawada T, Watanabe M, Okuda T (2008) Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5093-5098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706197105>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Tapia H, Koshland DE (2014) Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Curr Biol* 24:2758-2766. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.005>
- Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* 16:121-131. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00115-4)
- Tokumoto S, Miyata Y, Deviatiiarov R, Yamada TG, Hiki Y, Kozlova O, Yoshida Y, Cornette R, Funahashi A, Shagimardanova E, Gusev O, Kikawada T (2021) Genome-wide role of hsf1 in transcriptional regulation of desiccation tolerance in the anhydrobiotic cell line, Pv11. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22115798>
- Vancha AR, Govindaraju S, Parsa KV, Jasti M, Gonzalez-Garcia M, Ballesteros RP (2004) Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer. *BMC Biotechnol* 4:23. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-23>
- Waite JH, Tanzer ML (1981) Polyphenolic substance of *mytilus edulis*: novel adhesive containing l-dopa and hydroxyproline. *Science* 212:1038-1040. <https://doi.org/10.1126/science.212.4498.1038>

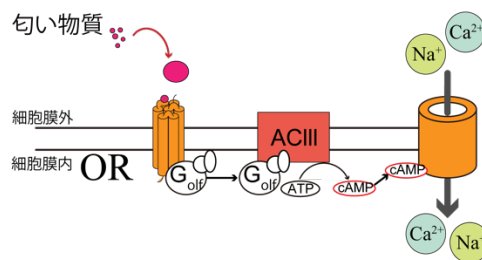
- Watanabe K, Imanishi S, Akiduki G, Cornette R, Okuda T (2016) Air-dried cells from the anhydrobiotic insect, *Polypedilum vanderplanki*, can survive long term preservation at room temperature and retain proliferation potential after rehydration. *Cryobiology* 73:93-98. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.006>
- Watanabe M, Kikawada T, Minagawa N, Yukuhiro F, Okuda T (2002) Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J Exp Biol* 205:2799-2802. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.18.2799>
- Wharton DA (2015) Anhydrobiosis. *Curr Biol* 25:R1114-1116. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.047>
- Yamada TG, Hiki Y, Hiroi NF, Shagimardanova E, Gusev O, Cornette R, Kikawada T, Funahashi A (2020) Identification of a master transcription factor and a regulatory mechanism for desiccation tolerance in the anhydrobiotic cell line Pv11. *PLoS One* 15:e0230218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230218>
- Yavin E, Yavin Z (1974) Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface. *J Cell Biol* 62:540-546. <https://doi.org/10.1083/jcb.62.2.540>

第 2 章 嗅覚受容体発現細胞株の樹立と乾燥耐性評価

序論

第1章より、Pv11細胞における接着系の確立を達成できた。次にPv11細胞を用いて嗅覚受容体が乾燥保存可能か検討を行う。嗅覚受容体は脊椎動物がもつGタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor: GPCR)型と昆虫がもつリガンド作動性イオンチャネル(Ligand-gated ion channel: LIC)型に分けられる(Fig. A) (Buck and Axel 1991; Sato *et al.* 2008)。脊椎動物の嗅覚受容体は、匂い物質が結合するとGタンパク質が活性化され、アデニル酸シクラーゼ(ACIII)を活性化する。それにより作られたcAMPがイオンチャネルを開き、 Na^+ や Ca^{2+} といった陽イオンが細胞内に流入することで匂いを感知する(Fig. A 上段) (Kaupp 2010)。一方で昆虫の場合は、匂い物質が結合するORと嗅覚受容体共受容体(Olfactory receptor co-receptor: Orco)がヘテロテトラマーを形成し、この複合体そのものがリガンド作動性の陽イオンチャネルとして機能している(Fig. A 下段) (Kaupp 2010)。嗅覚受容体を利用するために、細胞に発現させることが必要である。そのため昆虫の場合はORとOrcoという2種類の膜タンパク質を細胞に発現させるだけで、匂い物質に対し応答することが可能であり、GPCR型の嗅覚受容体より簡便に利用できる。

GPCR 型嗅覚受容体 (哺乳類等)



LIC 型嗅覚受容体 (昆虫)

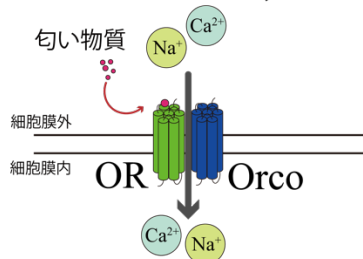


Fig. A. 嗅覚受容体模式図

上段：主に脊椎動物等がもつGタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor: GPCR)型の嗅覚受容体。下段：昆虫がもつリガンド作動性イオンチャネル(Ligand-gated ion channel: LIC)型の嗅覚受容体を表した模式図。昆虫の場合はOR、Orcoが複合体を形成しイオンチャネルとして機能しているため、GPCR型に比べ発現させるユニットが少なく済む。

また、嗅覚受容体の数においても、昆虫の方が動物に比べて少ないことが知られている(表 A) (Robertson *et al.* 2003; Robertson and Wanner 2006; Niimura *et al.* 2014)。このことは、昆虫の嗅覚受容体の応用可能性を高める一因となり得る。例えば、62 種類の嗅覚受容体発現細胞をそれぞれ揃えれば、キイロショウジョウバエの嗅覚を完全に再現したデバイスが開発可能になる。しかも嗅覚受容体の数が少ないからと言って、機能的に劣るというわけではなく、キイロショウジョウバエでカビ臭やガンの探知が可能であるという報告もされている(Stensmyr *et al.* 2012; Strauch *et al.* 2014)。すなわち昆虫の嗅覚受容体を利用することは簡便であり、生体の嗅覚の完全な再現も比較的容易かつ応用可能性も十分に高く優れた手法である。さらにキイロショウジョウバエはモデル生物であることから、嗅覚受容体の機能評価が生体を用いてよく行われており、それぞれの嗅覚受容体が応答するリガンドが多く明らかになっている(Mao *et al.* 2009; Mao *et al.* 2014)。一般的に外来膜タンパク質を培養細胞に発現させることは難しいことが知られるが、培養細胞に発現させ機能した実績のあるキイロショウジョウバエの嗅覚受容体が存在し、それらが Pv11 細胞においても利用可能だと期待できる(Kiely *et al.* 2007; Termtanasombat *et al.* 2016; Zboray *et al.* 2023)。

表 A. 動物ごとの嗅覚受容体の数

キイロショウジョウバエ	62 個
ハマダラカ	79 個
ミツバチ	170 個
ヒト	396 個
マウス	1130 個
イヌ	811 個

嗅覚受容体の機能評価系としてセンサタンパク質である GCaMP6f を利用した(Friedel *et al.* 2013)。GCaMP は GFP とカルモジュリン、ミオシン軽鎖キナーゼおよびそれらを繋ぐペプチドからなる融合タンパク質である。周囲の Ca^{2+} 濃度が上昇すると、GCaMP と Ca^{2+} が結合し、立体構造変化を起こし、蛍光を発する性質を持つ。従って、リガンドと応答した嗅覚受容体が、細胞内に陽イオンを取り込み、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことで、GCaMP は蛍光を発する。すなわち蛍光変化を観察することで嗅覚受容体の応答性の評価を行うことができる。Fura-2 など他のカルシウムイメージング試薬と異なり、細胞に発現させてしまえば試薬を加える必要がないというメリットを持つことから、嗅覚受容体の応答評価に良く用いられる(Mitsuno *et al.* 2015; Termtanasombat *et al.* 2016)。

上記の利点から Pv11 細胞にキイロショウジョウバエ嗅覚受容体と GCaMP を組み合わせることで蛍光変化から嗅覚受容体の検討を行う。嗅覚受容体の機能評価において、リガン

ド添加時に細胞が流れていくのを防ぐため、第 1 章で確立した接着系を用いて細胞を接着させることで正確に機能評価を行なうことが可能である。また、これまで Pv11 細胞において嗅覚受容体を含む外来膜タンパク質を発現させた実績がなく、まずこれらが Pv11 細胞で機能するか一過性発現で検討を行なう必要がある。さらに嗅覚受容体を乾燥保存するという本研究の目標達成のために、嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立を行う必要がある。Pv11 細胞における遺伝子導入方法は、他の培養細胞のようにケミカルトランスフェクション法が使用できず、エレクトロポレーション法に限られる。そのため細胞に大きなダメージを与えてしまい乾燥保存できない。細胞の回復を待つと導入した遺伝子の発現量が減少してしまう。以上の理由から、目的遺伝子の安定発現細胞株の樹立を行い、乾燥耐性の検討を行う必要がある。細胞株の樹立に関してはこれまで、*Pv.00443* 遺伝子という Pv11 細胞において恒常的に高発現している遺伝子の stop codon 直前に 2A 配列を付加した遺伝子をフレームシフトが起きないように knock-in することで、乾燥耐性に影響なくポリシスロトロニック発現が可能だと明らかになっている(Miyata *et al.* 2021)。そこで本章では Pv11 細胞に対しキイロショウジョウバエ嗅覚受容体を一過性発現させ、リガンド応答アッセイを行い、機能する嗅覚受容体を選抜した。そして *Pv.00443* 遺伝子に knock-in を行い、安定発現細胞株の樹立を試みた。最後に樹立した嗅覚受容体安定発現細胞株を常温乾燥し、再水和後、リガンド応答アッセイを行うことで嗅覚受容体が乾燥保存可能か検討を行なった。

材料と方法

1. Pv11 細胞培養プロトコル

Pv11 細胞は IPL-41 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に対し 2.6 g/L tryptose phosphate broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), 10% (v/v) fetal bovine serum, 0.05% (v/v) of an antibiotic and antimycotic mixture (AA mix; penicillin, amphotericin B, and streptomycin; (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)) を添加し培養した。細胞密度は 3×10^5 cells/mL で播種し、25°C で 6 日から 7 日間培養した。

2. 一過性発現ベクターの作成

キイロショウジョウバエ (Canton-S) の頭部を切断し ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) を用い RNA を抽出した。PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて RNA を逆転写して cDNA を作成した。得られた cDNA をテンプレートとし Prime STAR Max DNA Polymerase (Takara Bio) を用いて PCR し Orco、Or22a、Or47a をクローニングした。Or13a は flybase より Or13a の配列を取得し合成遺伝子を合成し、同様にクローニングした。GCaMP6f は pGP-CMV-GCaMP6f (Addgene : #40755) から同様にクローニングした。バックボーンベクターとして pPv121-MCS (BamHI-HindIII-XhoI) (Miyata *et al.* 2019) を BamHI, XhoI により制限酵素処理し、PCR 産物を NEBuilder HiFi Assembly (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を用いてアッセンブルし、pPv121-Orco、pPv121-Or13a、pPv121-Or22a、pPv121-Or47a、pPv121-GCaMP6f を作製した。

作成した pPv121-Orco、pPv121-Or13a、pPv121-Or22a pPv121-Or47a をテンプレートとし、linker 配列を含む HiBiT タグ (GSSGGSSGVSGWRLFKKIS) を終始コドン直前に挿入出来るようプライマーを設計し同様に PCR を行った。PCR 産物を同様に pPv121-MCS に HiFi Assembly して、pPv121-Orco-HiBiT、pPv121-Or13a-HiBiT、pPv121-Or22a-HiBiT、pPv121-Or47a-HiBiT を作製した。

3. Pv11 細胞への嗅覚受容体の一過性発現と嗅覚受容体応答性の評価

培養 6 日目の細胞を 1×10^7 cells 回収し、300 x g、5 分間で遠心して上清を除き、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に置換した。発現ベクター 20 µg を加え、NEPA21 (Nepa Gene, Chiba, Japan) を用いてエレクトロポレーションにより細胞に各ベクターを導入した。エレクトロポレーションは以下の条件で行った。

Poring Pulse: 250 V、パルス幅 4 ms、パルス間隔 4 ms、6 回、減衰率 40 %、極性+

Transfer Pulse: 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、5 ± 回、減衰率 40 %、極性+/-

トランスフェクション後の細胞は 2 mL の培地を入れた 6-well プレートに播種し 3 日間培養した。リガンド応答アッセイを行うために BAM コーティングを用いて細胞接着を行った。BAM コーティングは最適濃度である 100 μ M を使用し第一章の通り行った。培養 3 日目の Pv11 細胞を回収し、300 x g、5 分間で遠心して上清を取り除き、ACSF buffer (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM Na_2HPO_4 , 4.5 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.2) に置換した。96-well plate (EZVIEW カルチャープレート LB ガラスボトム; AGC TECHNO GLAS, Shizuoka, Japan) を BAM コーティングし、ACSF buffer に置換した細胞を 30 min 静置し細胞接着した。ACSF buffer で 1 回洗浄し浮遊細胞を取り除き、再び ACSF buffer 50 μ L を加えそれに対しリガンド溶液を加えることで、リガンド応答アッセイを行った。

リガンド応答アッセイとして Ionomycin (>95 % purity; FUJIFILM Wako)、VUAA1 (>98 % purity ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、1-octen-3-ol (>98 % purity; Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)、Ethyl hexanoate (>95 % purity; FUJIFILM Wako)、Pentyl acetate (>97 % purity; FUJIFILM Wako) それぞれをジメチルスルホキシド (DMSO; FUJIFILM Wako) に 10 mM Ionomycin、200 mM VUAA1、200 mM 1-octen-3-ol、200 mM Ethyl hexanoate、200 mM Pentyl acetate になるよう溶解した。次に ACSF buffer に対して 100 倍希釈し 1 % DMSO を含むそれぞれ 100 μ M Ionomycin、2 mM VUAA1、2 mM 1-octen-3-ol、2 mM Ethyl hexanoate、2 mM Pentyl acetate のリガンド溶液を調整した。上記で細胞を接着させた 96-well plate (ACSF buffer 50 μ L 中に細胞) に調整したリガンド溶液 50 μ L を添加し、それぞれ終濃度 50 μ M Ionomycin、1 mM VUAA1、1 mM 1-octen-3-ol、1 mM Ethyl hexanoate、1 mM Pentyl acetate になるようリガンド応答アッセイを行なった。リガンド溶液添加前の細胞を 10 秒ごと 3 回撮影し、リガンド添加後 10 秒ごと 6 回撮影した。蛍光画像は励起波長/蛍光波長が 470 nm/525 nm で撮影した (Axio Observer7; Carl Zeiss)。取得した蛍光画像の画像全体の蛍光輝度 (F) を Fiji によって定量した。撮影 1 枚目 (リガンド添加前) の蛍光輝度を F_0 とし、リガンド添加後の最大の蛍光輝度を F_{\max} とした。以下の式のように蛍光輝度変化量を求め ($\Delta F = F_{\max} - F_0$)、 F_0 で除することで正規化した蛍光輝度変化率を算出し ($\Delta F/F_0$)、応答評価した。

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F_{\max} - F_0}{F_0}$$

4. HiBiT assay による嗅覚受容体の発現評価

上記で作成した、pPv121-Orco-HiBiT、pPv121-Or13a-HiBiT、pPv121-Or22a-HiBiT、pPv121-Or47a-HiBiT に加え、ネガティブコントロールとして empty vector である pPv121-MCS、トランスフェクションコントロールとして pPv632bp-luc2 (Tokumoto *et al.* 2020) を使用した。

・ empty vector または、HiBiT タグ付き OR 発現 vector (pPv121-OrX-HiBiT) 1 pmol

- ・ OR 発現 vector (pPv121-OrX) 1 pmol
- ・ トランスフェクションコントロールとして pPv632bp-luc2 0.6 pmol

以上を材料と方法 3 の手法で同時トランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞は 250 μ L の培地を入れた 48-well プレートに 12.5 μ L ずつ播種した。播種 2 日後の細胞溶液 50 μ L を回収し、等量の調整済み HiBiT assay 溶液(Nano Glo HiBiT Extracellular Detection System(Promega)または Nano Glo HiBiT Lytic Detection System(Promega))と混合し、96-well white microtitre plate に分注した。600 rpm で 10 分間振とうし、ARVO multi-label plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて HiBiT の発光を定量した。また同様の方法で、Luc2 は Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用して定量を行なった。定量した HiBiT の発光の値を Luc2 の値で除することで relative luciferase activity を算出した。

5. Knock-in 用 donor vector の作成

上記で作成した pPv121-Orco, pPv121-Or47a, pPv121-GCaMP6f に加え Zeocin 耐性遺伝子(Zeocin resistance gene; Zeocin^R)発現ベクター-pPv121-Zeocin^R(Miyata *et al.* 2019)をテンプレートとし、いずれも 5'末端に P2A 配列(GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP)を付加するようプライマーを設計し、増幅した PCR 産物をインサートとした。

バックボーンベクターとして pCR4-Pv.00443#1 μ H-P2A-BbsI (Miyata *et al.* 2021)を使用し、BbsI (New England BioLabs) で制限酵素処理したバックボーンベクターに、増幅した PCR 産物を NEBuilder HiFi Assembly(New England BioLabs)で挿入し、それぞれドナーベクターとして pCR4-Pv.00443#1 μ H-P2A-GCaMP6f-P2A-Orco, pCR4-Pv.00443#1 μ H-P2A-Zeocin^R-P2A-Or47a を作成した。

6. Knock-in 手法とモノクローナル細胞株の樹立

材料と方法 3 と同じ手法でトランスフェクションを行った。

- ・ 作成した donor vector をそれぞれ 0.3 μ g ずつ、
- ・ PvU6b-DmtRNA-Pv00443#1(gRNA 発現 vector) 5 μ g、
- ・ pPv121-SpCas9 (Cas9 発現 vector) 5 μ g

以上を同時トランスフェクションし、IPL-41 medium に播種した。播種 5 日後の細胞を Zeocin 400 μ g/mL の IPL-41 medium に 1×10^5 cells/ mL の濃度で播種し、1 週間培養することで Zeocin 薬剤セレクションを行なった。一週間後、半量の IPL-41 medium を除き、新しく等量の Zeocin 400 μ g/ mL の IPL-41 medium を添加し、さらに 1 週間培養することで 2 回目の Zeocin 薬剤セレクションを行なった。2 回薬剤セレクションを行った細胞を通常

の IPL-41 medium に播種し 1 週間回復培養を行ない、その後、シングルセルソーティングすることでモノクローナル細胞株の樹立を行った。

シングルセルソーティングは回復培養後の細胞を DAPI(Dojindo)で染色し、MoFlo Astrios cell-sorter (Beckman Coulter, Brea, CA)を利用して 355 nm と 488 nm のレーザーを用いることで、生細胞かつ GCaMP6f が発現している細胞を取得した。96-well plate に播種したフィーダー細胞 1×10^3 cells に対しシングルセルソーティングを行い、一週間培養後、2 度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Zeocin で薬剤セレクションを行うことでフィーダー細胞を除去した。このフィーダー細胞除去後のモノクローナル細胞株を Pv.00443-Or47a 細胞株と名付けた。

7. Genomic PCR と sequence による目的遺伝子 knock-in の確認

取得した細胞株から FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan)を用いてゲノムを抽出した。抽出したゲノムをテンプレートとして、*Pv.00443* 遺伝子の knock-in 領域が増幅するよう KOD One PCR Master Mix -Blue (TOYOBO, Osaka, Japan)で PCR を行い、ゲル電気泳動することで knock-in を確認した。ゲル電気泳動後、PCR 産物を精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて塩基配列解析を行い、正確に knock-in できていることを確認した。

8. Pv11 細胞の乾燥再水和手法と細胞生存率の評価

Pv11 細胞の乾燥保存処理は、第一章と同じ手法を用いた。600 mM trehalose と IPL-41 medium を 9 : 1 で混合して Trehalose mixture を作製した。Trehalose mixture に 2×10^7 cells/ml の濃度になるよう Pv11 細胞を懸濁し、25°C で 48 時間インキュベートすることで、トレハロースによる乾燥耐性誘導処理（トレハロース処理）を行った

トレハロース処理後の細胞を 300 x g で 5 分間遠心して回収し、Trehalose mixture 40 μL で 4×10^6 cells になるよう再懸濁し、35 mm dish へ滴下した。滴下後、1 kg シリカゲルが入った相対湿度 10%以下の容器(215×220×200 mm)へ移し、14 日間乾燥した。乾燥後それぞれの 35 mm dish へ培養用 IPL-41 medium を 1 ml 添加することで再水和した。

再水和後 1 時間の細胞を propidium iodide (PI; Dojindo)、Hoechst 33342 solution (Hoechst; Dojindo)で細胞を 2 重染色し、画像を取得した(BZ-X710, Keyence)。PI は 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Hoechst は 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるよう IPL-41 medium で調整し染色を行った。PI は励起波長/蛍光波長が 544 nm/605 nm、Hoechst は 405 nm/460 nm で撮影し、生細胞数 (Hoechst+, PI-)を全細胞数(Hoechst+)で除することで細胞生存率を算出した。

9. Pv.00443-Or47a 細胞株のリガンド応答アッセイ

樹立した Pv.00443-Or47a 細胞株を 25 cm² フラスコで培養し、培養 8 日後の細胞を回収し材料と方法 3 と同じ手法で細胞接着を行った。

リガンド応答アッセイも上記と同じ手法(材料と方法 3)を用いて行った。また Pentyl acetate に関しては濃度を振ってリガンド応答アッセイを行った。2 mM、200 μ M、20 μ M、2 μ M の濃度になるよう Pentyl acetate 溶液を調整し、細胞にリガンド溶液添加後、終濃度 1 mM、100 μ M、10 μ M、1 μ M になるようリガンド応答アッセイを行なった。蛍光輝度変化率も材料と方法 3 と同じ手法を用いて定量した。

シグモイド曲線の計算は GraphPad Prism 10 software を使い、蛍光輝度変化率の最小値を 0、Max 値を 100 となるようそれぞれの値を補正し、4 パラメーター非線形回帰分析によって算出した。

10. リガンド応答アッセイにおける 1 細胞ごと蛍光輝度変化率定量手法

材料と方法 9 で取得したリガンド応答アッセイにより取得したタイムラプス画像を細胞位置合わせした(Zeiss Zen Blue edition)。位置合わせを行ったタイムラプス画像の 1 枚目の明視野画像を用い、Cellpose 2.0 (Pachitariu and Stringer 2022)のモデル'cyto2'を用いて細胞をセグメンテーションした。セグメンテーション後の結果を修正し、再学習モデルを作成した。再学習モデルを使用し、細胞のセグメンテーションを行い、細胞の ROI (Region of Interest)ごとに位置合わせしたタイムラプスデータの蛍光画像の蛍光輝度を定量した。定量した蛍光輝度から、材料と方法 3 と同じ手法で蛍光輝度変化量を算出し、1 細胞ごとプロットしたグラフを作成した。

11. Pv.00443-Or47a 細胞株の乾燥再水和後リガンド応答アッセイ

乾燥再水和手法は上記(材料と方法 8)に従った。また翻訳阻害剤を用いた再水和に関しては、先行研究において Pv11 細胞で働くことが明らかになった手法を用いた(Kikuta *et al.* 2017)。具体的には Cycloheximide (CHX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を再水和に使用する IPL-41 medium に濃度 0.35 mM になるよう調整し、再水和を行った。再水和後 1 時間もしくは 24 時間の細胞を回収し、上記と同様の手法(材料と方法 3, 材料と方法 8)を用いてリガンド応答アッセイを行なった。また Cycloheximide を用いて再水和を行った場合は、接着に用いる ACSF buffer に濃度 0.35 mM になるよう Cycloheximide を溶解し、細胞接着を行った。

12. 画像解析

細胞数測定には Fiji (バージョン 2.3.0) を使用した(Schindelin *et al.* 2012)。

13. 統計解析

すべてのデータは平均値と標準誤差 (SEM) で表した。統計解析として、三群以上の比較では 1 元配置分散分析 (one-way ANOVA) と多重比較検定 (Dunnett's post hoc test) を行なった。統計解析は GraphPad Prism 10 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いた。

結果

1. Pv11 細胞における嗅覚受容体の検討

Pv11 細胞において嗅覚受容体が機能するか検討を行なった。キイロショウジョウバエの嗅覚受容体においてリガンドが明らかになっており、培養細胞系でも機能が報告されている Or13a、Or22a、Or47a に着目し検討を行なった(Kiely *et al.* 2007; Termtanasombat *et al.* 2016; Miazzi *et al.* 2019; Zboray *et al.* 2023)。Pv11 細胞に Orco、GCaMP6f に加えそれぞれの OR を一過性発現させ、リガンド応答アッセイを行い機能を検討した(Fig. 1)。Pv11 細胞に GCaMP6f を一過性発現させ、カルシウムイオノフォアである Ionomycin (50 μ M)を添加するといずれも蛍光の上昇を示した。さらに Orco を一過性発現させた際、いずれの場合においてもアゴニストである VUAA1 (1 mM)に応答を示した。一方で Or13a を発現させた際、リガンドである 1-octen-3-ol (1 mM)を添加しても応答は見られなかった。また Or22a においてもリガンドである Ethyl hexanoate (1 mM)に対して応答を示さなかった。Or47a の場合はリガンドである Pentyl acetate (1 mM)に対し応答性を示し、1-octen-3-ol、Ethyl hexanoate には応答しなかった。以上より Pv11 細胞において、GCaMP6f、Orco、Or47a が機能することが確認できた。一方で、Sf9 細胞や HEK293 細胞等、他の培養細胞で機能することが明らかになっている Or13a、Or22a に関しては機能が確認できなかった。

次に Orco、Or13a、Or22a、Or47a が Pv11 細胞に発現しているか、HiBiT システムを用いて検討を行なった。HiBiT システムとは、11 アミノ酸からなるペプチドタグ (HiBiT タグ)を検出したい遺伝子に付加することで、タグに結合する NanoLuc ルシフェラーゼ (LgBiT) と基質を用い、発光から目的タンパク質を検出することができるシステムである。タンパク質のフォールディングによっては HiBiT タグに LgBiT が結合することができず、発現していても発光が検出できない、タンパク質のフォールディングの違いから異なるタンパク質間の発現量の比較はできないという課題はあるものの、目的タンパク質の発現を簡便に評価可能である。さらに HiBiT Extracellular Detection System は膜タンパク質の細胞膜外に HiBiT タグを付加することで、細胞膜外に発現している膜タンパク質を細胞非破壊で検出可能である。また HiBiT Lytic Detection System では細胞を溶質することで細胞全体に発現しているタンパク質を検出可能である。

そこで Orco、Or13a、Or22a、Or47a の細胞膜外領域である C 末端に HiBiT タグを付加し、Pv11 細胞に一過性発現させることで、細胞膜(Orx-HiBiT-Extracellular, Fig. 2A)、細胞全体(Orx-HiBiT-Lytic, Fig. 2B)に発現しているか評価した。またトランスフェクションコントロールとして Luc2 発現 vector も導入し、NanoLuc (HiBiT system)の値を Luc2 で除することで relative luciferase activity を求め評価した。結果より Or13a は Extracellular、Lytic とともに negative control である HiBiT タグなしの empty vector と比較して、値を検出できなかった。一方で Or22a、Or47a は発現が確認でき、Orco を共発現させた場合、発現量の

向上が確認できた。また Orco に HiBiT タグを付加し発現量の定量を行うと、単体で発現させた場合、Or13a、Or22a を共発現させても違いは見られなかつ、Or47a を共発現させた際は発現量の向上が見られた。

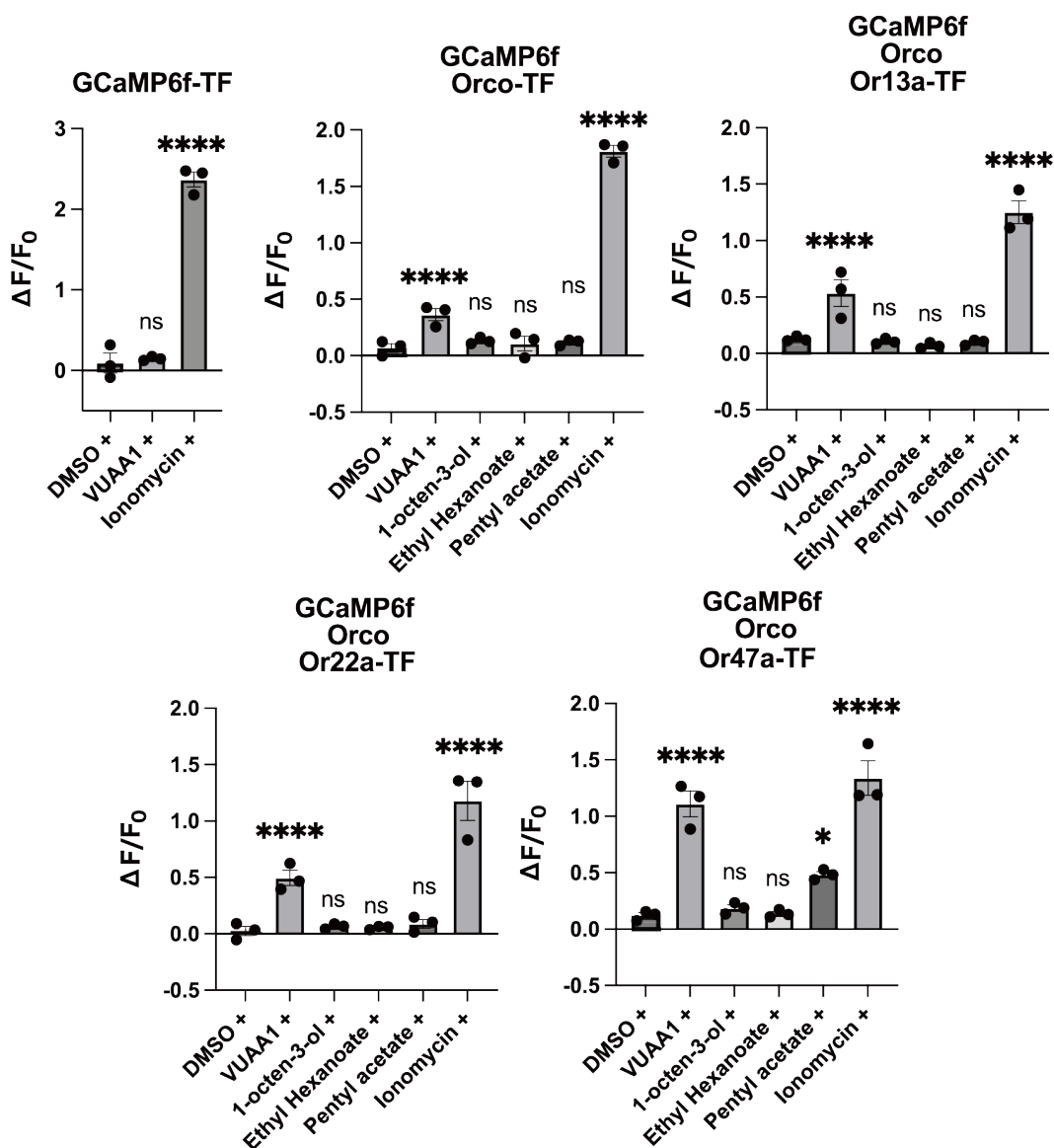
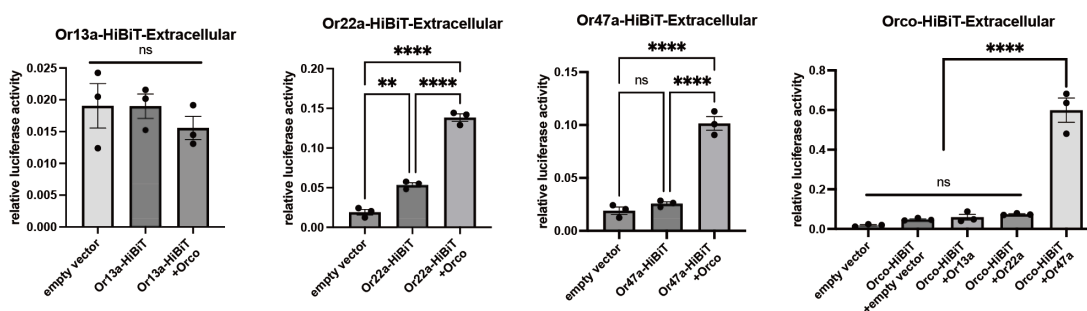


Fig. 1. 一過性発現系を用いた Pv11 細胞における嗅覚受容体の機能評価
Pv11 細胞に GCaMP6f、GCaMP6f+Orco、GCaMP6f+Orco+Or13a、GCaMP6f+Orco+Or22a、GCaMP6f+Orco+Or47a をそれぞれ一過性発現させリガンド応答アッセイを行った。ネガティブコントロールとして DMSO (0.5%)、Orco のアゴニストとして VUAA1 (1 mM)、Or13a のリガンドとして 1-octen-3-ol (1 mM)、Or22a のリガンドとして Ethyl hexanoate (1 mM)、Or47a のリガンドとして Pentyl acetate (1 mM)、カルシウムイオノフォアとして Ionomycin (50 μ M) の最終濃度になるよう添加した。応答はリガンド添加後の最大蛍光強度(F)から添加前の蛍光強度(F_0)を引き、輝度変化量を求め(ΔF)、 F_0 で除す

ることと蛍光輝度変化率($\Delta F/F_0$)を算出した。ネガティブコントロールである DMSO と比較することでリガンドに応答を示すか評価した。グラフは mean \pm SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3) P 値は < 0.0001 は****; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

A



B

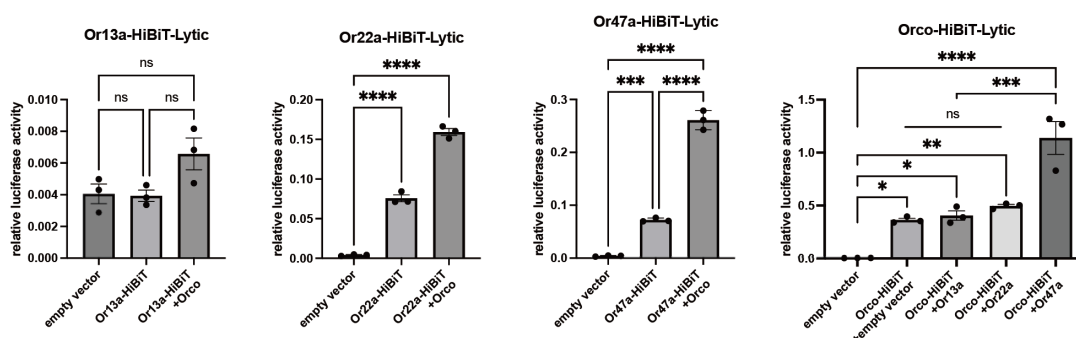


Fig. 2. Pv11 細胞における嗅覚受容体発現の検討

嗅覚受容体の細胞膜外領域である C 末端に HiBiT タグを付加した発現ベクターを Pv11 細胞に一過性発現させ、HiBiT assay を行なった。トランスフェクションコントロールとして Luc2 発現 vector も同時にトランスフェクションし、相対発光輝度(relative luciferase activity)を算出した。ネガティブコントロールとして HiBiT タグなし empty vector をトランスフェクションし、比較することで HiBiT タグを付加したタンパク質が発現しているか評価した。それぞれ empty vector、121-OrX-HiBiT、121-OrX-HiBiT+121-OrX の 3 パターンを一過性発現させ比較を行った。(A) HiBiT Extracellular Detection System を利用し、HiBiT タグ付きタンパク質の細胞膜発現を評価した。(B) HiBiT Lytic Detection System を利用し、細胞を溶質することで細胞全体に発現している HiBiT タグ付きタンパク質を評価した。グラフは mean \pm SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3)。P 値は < 0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***; 0.001 から 0.01 は**; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

2. 嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立

Pv11 細胞に対する一過性発現において、リガンド応答アッセイにより機能を示し、HiBiT assay においても発現が確認できた Or47a に着目し、安定発現細胞株の樹立を行なった。*Pv.00443* 遺伝子の終止コドンの直前に P2A 配列を付加した GCaMP6f と Orco および Or47a、薬剤セクション用 Zeocin 耐性遺伝子を knock-in し、安定発現細胞株の樹立を試みた(Fig. 3A)。knock-in 後、薬剤セクションを行い、GCaMP6f の蛍光でシングルセルソーティングを行なった。モノクローナル細胞株を取得し、Genomic PCR を行うことで狙い通りに遺伝子挿入ができていないか評価した(Fig. 3B)。さらにシークエンスを行うことで目的遺伝子が正確にモノクローナル細胞株に knock-in されていることを確認した。以降この細胞株を *Pv.00443-Or47a* と命名した。次に樹立した *Pv.00443-Or47a* 細胞株に対しリガンド応答アッセイを行い、嗅覚受容体が機能しているか検討を行なった(Fig. 3C)。溶媒の DMSO を添加した場合と比べ、VUAA1、Pentyl acetate、Ionomycin を添加すると蛍光輝度変化率が上昇したことから Orco、Or47a、GCaMP6f いずれも機能していることが確認できた。また樹立した *Pv.00443-Or47a* 細胞株の乾燥耐性能力に問題がないか評価を行なうため、乾燥処理を行った。再水和後の細胞生存率を通常の Pv11 細胞と比較すると乾燥耐性能力の低下は見られなかった(Fig. 3E)。以上より嗅覚受容体が安定発現しており、乾燥耐性も保持した細胞株の取得に成功した。

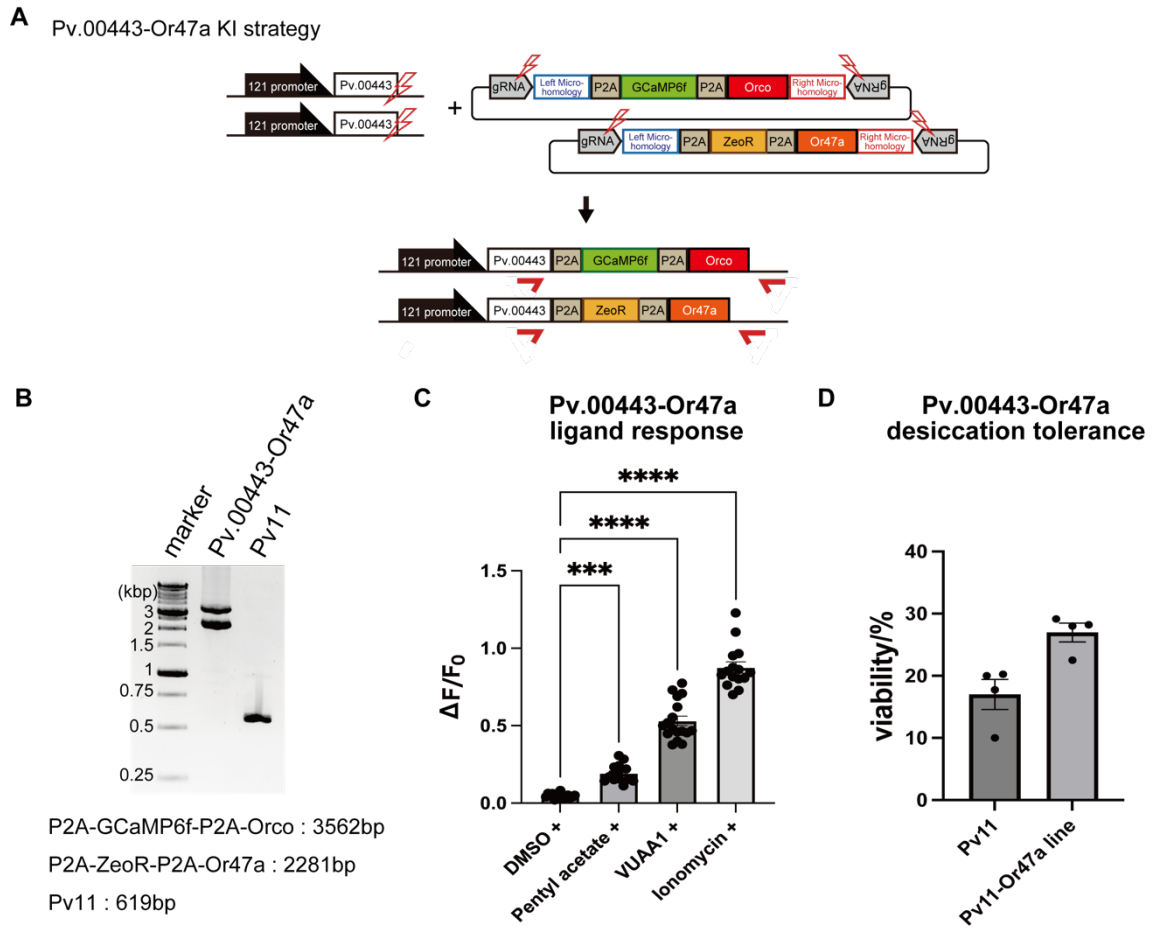
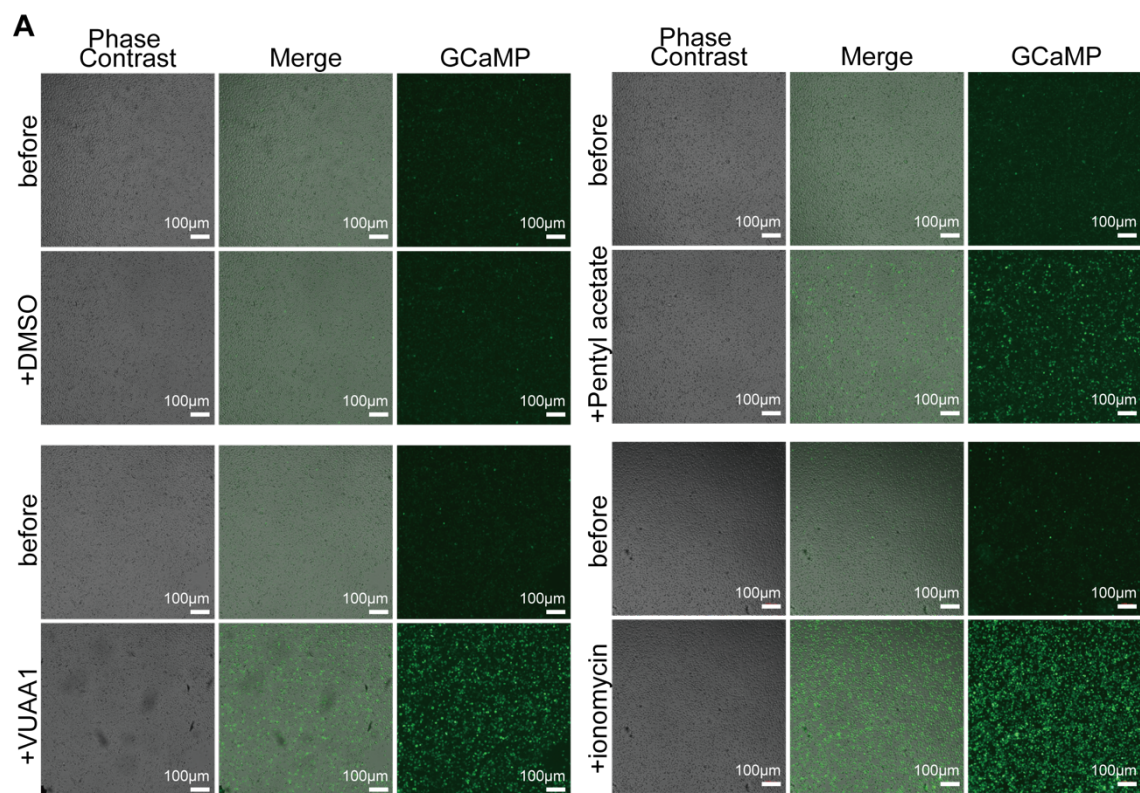


Fig. 3. Pv11 細胞における嗅覚受容体の安定発現細胞の樹立

(A) GCaMP6f、Orco、Or47a 安定発現細胞株を樹立するための模式図。Pv11 細胞で常時高発現している *Pv.00443* 遺伝子の終止直前に P2A 配列を付加したドナーベクターを作成し、knock-in を行なった。knock-in を行なった細胞集団に対し、薬剤セレクション、シングルセルソーティングを行い、モノクローナル細胞株の取得を行った。(B)取得したモノクローナル細胞株に対し Genomic PCR を行い、目的サイズのバンドが検出できるか検討を行なった。(C)狙い通りに knock-in が確認できた *Pv.00443-Or47a* 細胞株に対し、リガンド応答アッセイを行った。DMSO (0.5%)、VUAA1 (1 mM)、Pentyl acetate (1 mM)、Ionomycin (50 μ M)を添加する前、添加後の蛍光画像から、蛍光輝度変化率を算出した。(D)樹立した *Pv.00443-Or47a* 細胞株の乾燥耐性能力を評価するため、乾燥再水和後の細胞生存率を算出し、wild type の Pv11 細胞と比較した。グラフは mean \pm SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=15 または 17、n=4)。P 値は < 0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***で表した。

3. Pv.00443-Or47a 細胞株の嗅覚受容体の機能評価

樹立した Pv.00443-Or47a 細胞株は Pentyl acetate、VUAA1、Ionomycin にそれぞれに反応していたことから、GCaMP6f、Or47a、Orco いずれも機能していることが確認できた。一方で応答には違いが見られた(Fig. 3C)。P2A 配列を付加しポリシストロニック発現させておりモノクローナル細胞株を取得していることから、GCaMP6f、Or47a、Orco それぞれの発現量に違いがないことを期待していたそこで、全ての細胞が一様に同じ程度応答することにより蛍光輝度が変化したのか、強く応答する細胞数が増えることにより蛍光輝度が変化したのか検討を行った(Fig. 4)。Pv.00443-Or47a 細胞株に対し DMSO、Pentyl acetate、VUAA1、Ionomycin を添加前、添加後の蛍光画像を比較した(Fig. 4A)。蛍光画像から Pentyl acetate、VUAA1、Ionomycin いずれも全ての細胞が一様に反応しているのではなく、Pentyl acetate、VUAA1、Ionomycin の順に強く反応した細胞の数が増えているように見えた。次に反応の違いを正確に評価するため、リガンド反応アッセイを行った際の 1 細胞ごとの蛍光輝度変化率を定量し評価を行なった(Fig. 4B、表 A)。また Pentyl acetate を添加した際の蛍光輝度変化率の平均値 0.36 以上を非常に強く反応した細胞と定義し、強く反応する細胞の割合を算出した(表 B)。Pentyl acetate を添加した際、非常に強く反応する細胞はあるものの比較的少なく、DMSO と比較すると中央値、最頻値はともに向上していた。すなわち細胞集団全体が反応しているものの、中には非常に強く反応する細胞が存在することを意味する。また VUAA1 を加えた際は Pentyl acetate と比較すると、強く反応する細胞は増えており中央値は上がっているが、最頻値は変わらなかった。Ionomycin を添加した場合はほとんどの細胞が強く反応しており、中央値、最頻値ともに上昇していた。また、蛍光輝度が減少した細胞も見られたが、リガンドを添加した際、接着がうまくいかなかった一部の細胞が流れてしまうことを観察しており、数が少ないことからそれに該当すると思われる。細胞以上の結果より、DMSO、Pentyl acetate、VUAA1、Ionomycin の反応の違いは、全ての細胞の反応、強く反応する細胞数、両方がリガンドによって異なることが理由であると明らかになった。



B Pv.00443-Or47a-細胞蛍光輝度変化プロット

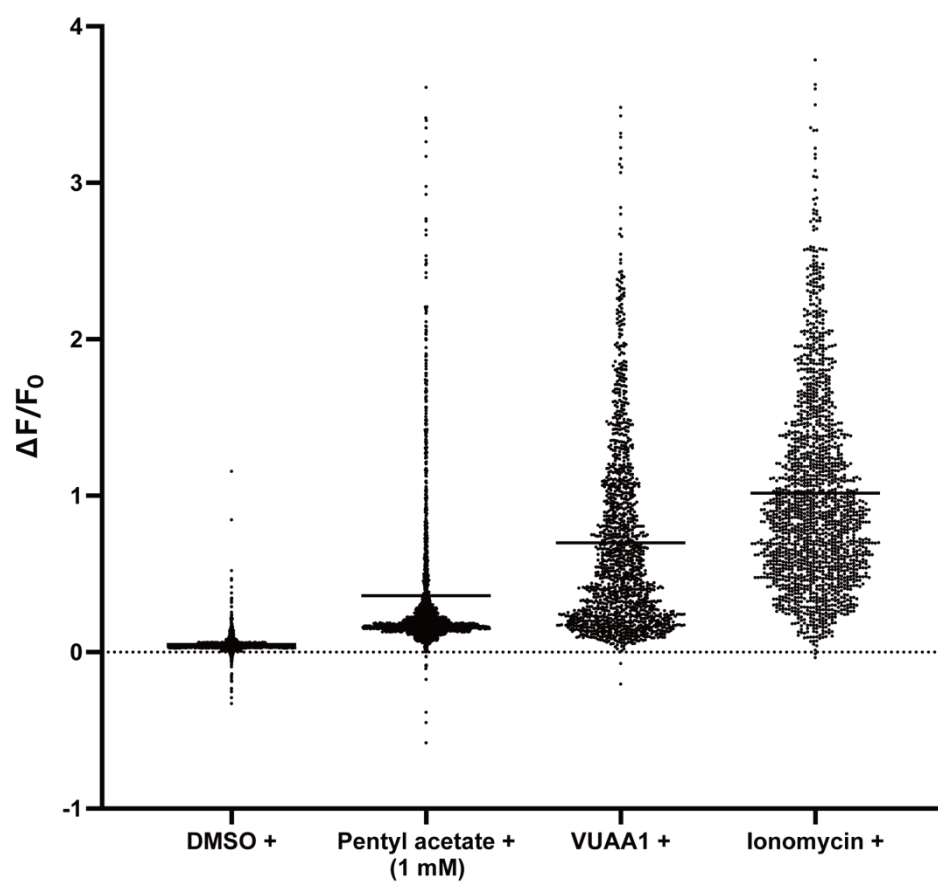


Fig. 4. Pv.00443-Or47a 細胞株のリガンドに対する 1 細胞ごと蛍光輝度変化 (A)樹立した Pv.00443-Or47a 細胞株に対し、DMSO (0.5%)、VUAA1 (1 mM)、Pentyl acetate (1 mM)、Ionomycin (50 μ M)になるよう添加し、添加前、添加後の明視野画像、蛍光画像を取得した。Before はリガンド添加前、+はリガンド添加後を示し、scale bar は 100 μ m を表す。 (B)リガンド添加後の蛍光輝度変化率を 1 細胞ごとに算出し、それぞれの値を細胞ごとにプロットした。黒横線は平均値を表した。

表 A Pv.00443-Or47a のリガンド応答アッセイにおける 1 細胞ごとの蛍光輝度変化率定量結果

	DMSO +	Pentyl acetate +	VUAA1 +	Ionomycin +
平均値	0.05	0.36	0.70	1.02
中央値	0.04	0.18	0.51	0.87
最頻値	0.04	0.17	0.17	0.48

表 B Pv.00443-Or47a のリガンド応答アッセイにおける強応答細胞割合

	DMSO +	Pentyl acetate +	VUAA1 +	Ionomycin +
強応答細胞数 ($\Delta F/F_0 \geq 0.36$)	7	309	842	1486
全細胞数	1420	1465	1372	1684
強応答細胞割合(%)	0.00	21.1	61.4	88.2

次に Pv.00443-Or47a に対し、濃度を振った Pentyl acetate を用いリガンド応答アッセイを行うことで、Or47a の評価を行なった(Fig. 5)。ネガティブコントロールとして DMSO (Pentyl acetate の溶媒)を用い、Pentyl acetate 1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM の終濃度になるよう細胞に添加し、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した。Pentyl acetate に対し濃度依存的に応答を示し、DMSO を添加した場合と比べ、1 μ M では蛍光輝度変化率の有意な差は見られなかったが、10 μ M 以上では有意な差を示した(Fig. 5A)。さらに蛍光輝度変化率の最小値を 0、最大値を 100 とした曲線をプロットした(Fig. 5B)。既知の嗅覚受容体発現培養細胞と同じように、リガンド濃度依存的なシグモイド曲線型応答を示し、 EC_{50} は 4.28 μ M となった。以上の結果から、Pv11 細胞において Or47a が動作する事が確認できた。

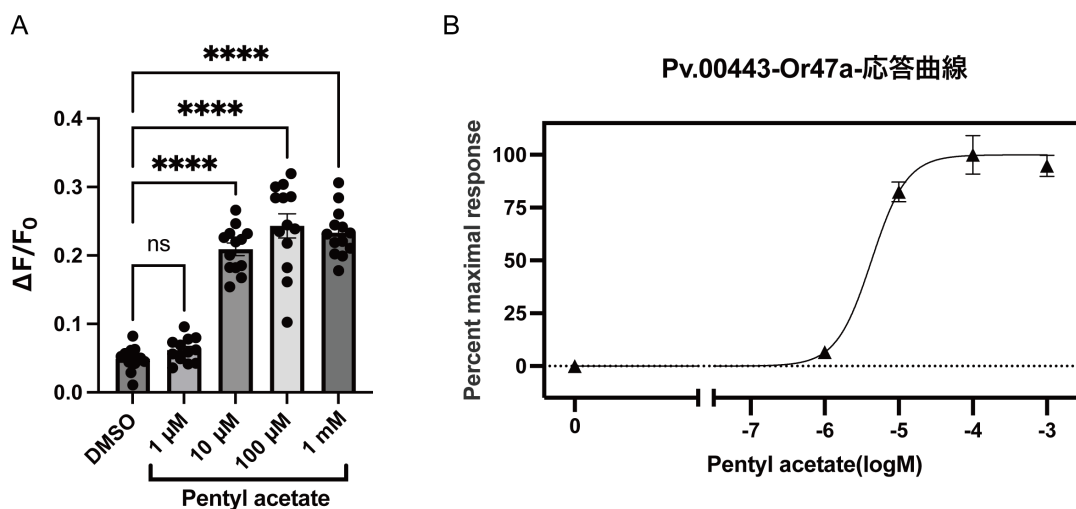


Fig. 5. Pv.00443-Or47a における Or47a の機能性評価

(A) 樹立した Pv.00443-Or47a に対し、DMSO(Pentyl acetate 0 μM に相当)を用い、Pentyl acetate 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM の終濃度になるよう細胞に添加し、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した。(B) 同じデータを、蛍光輝度変化率の最小値を 0、最大値を 100 と補正して曲線プロットした。グラフは mean±SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=12 または 13)。P 値は <0.0001 は****; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

4. 嗅覚受容体の乾燥保護評価

樹立した Pv.00443-Or47a 細胞株を用い、嗅覚受容体が乾燥保存可能か検討を行なった。Pv.00443-Or47a 細胞株を乾燥処理し、再水和後 1 時間においてリガンド応答アッセイを行うことで、嗅覚受容体が乾燥保存可能か評価を行なった(Fig. 6)。再水和 1 時間後において DMSO を添加した場合と比べ、Pentyl acetate を添加しても蛍光輝度変化率の上昇は見られなかった。一方で VUAA1、Ionomycin に対しては蛍光輝度変化率の上昇が見られた(Fig. 6A)。また、これらの応答が乾燥保存されたタンパク質由来か、再生産されたらものか評価するために、以前の研究において Pv11 細胞で機能すると報告されている翻訳阻害剤 Cycloheximide (0.35 mM) 入りの培地で再水和を行なった。再水和 1 時間後に同様にリガンド応答アッセイを行なうと、Cycloheximide なしの場合と同様に Pentyl acetate に対して蛍光輝度変化率の上昇を示さず、VUAA1、Ionomycin は上昇した(Fig. 6B)。また、再水和後 24 時間においてリガンド応答アッセイを行なうと、応答が回復し、乾燥前(Fig. 3C)と同様に Pentyl acetate、VUAA1、Ionomycin に対し蛍光輝度変化率の上昇を示した(Fig. 6C 左)。同時に濃度を振った Pentyl acetate (0 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM)を添加すると、乾燥前(Fig. 5A)と同様に 10 μM 以上で蛍光輝度変化率の上昇が見られた(Fig. 6C 右)。翻訳阻害剤が機能していることを確認するため、Cycloheximide 存在下で再水和 24 時間後においてリガンド応答アッセイを行なうと、Pentyl acetate に対する蛍光輝度変化率の上昇は示さ

ず、応答の回復は行われていなかった(Fig. 6D)。以上の結果より、Pv.00443-Or47a において、Or47a の乾燥保存は達成できなかったが、Orco、GCaMP6f は乾燥保存できることが明らかになった。

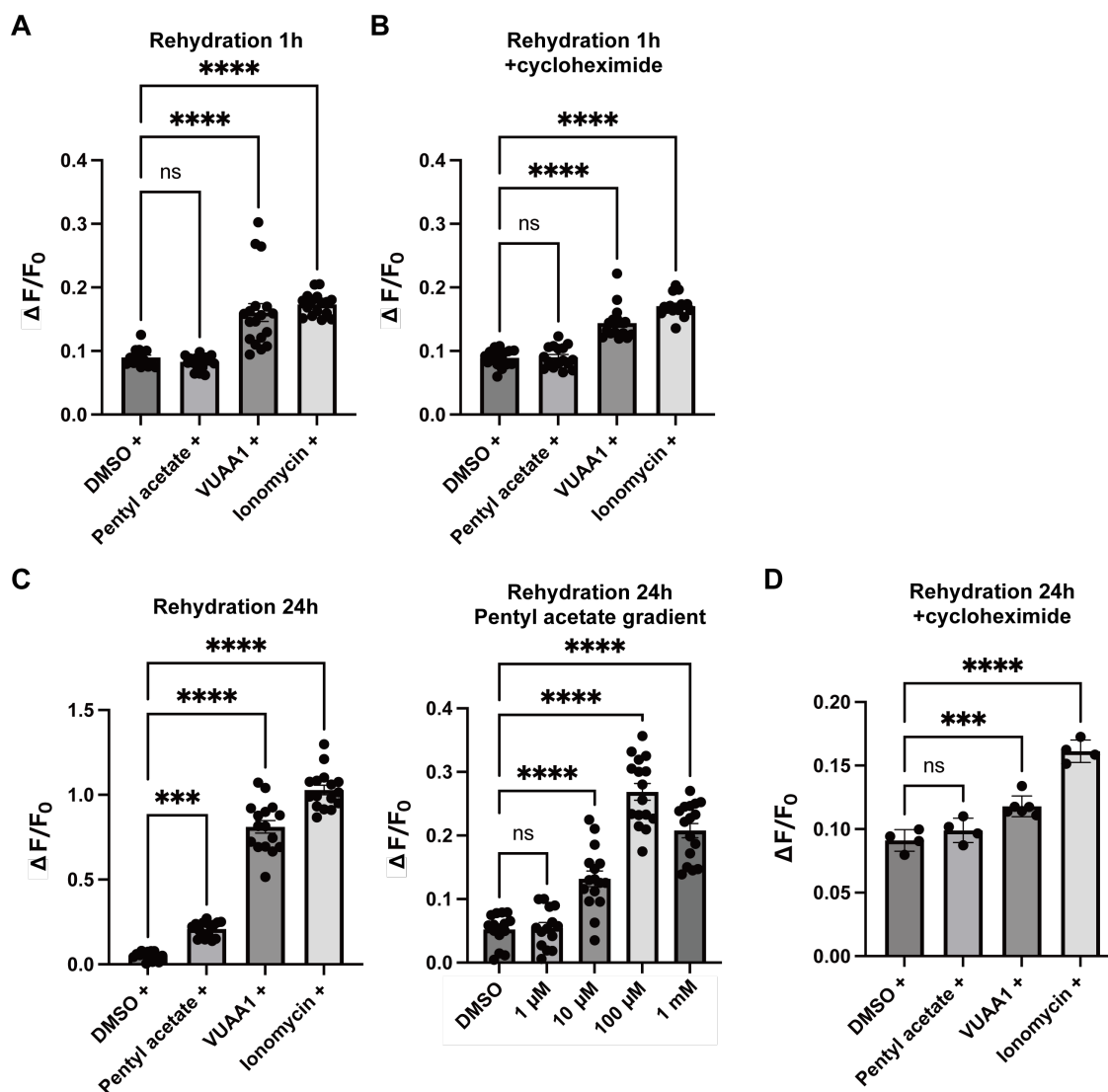


Fig. 6 Pv11 細胞における嗅覚受容体の乾燥耐性評価

(A) 樹立した Pv.00443-Or47a に対し、乾燥処理を行い、再水和 1 時間後にリガンド応答アッセイを行なった。DMSO (0.5%)、VUAA1 (1 mM)、Pentyl acetate (1 mM)、Ionomycin (50 μ M) を添加し、蛍光輝度変化率を算出した。(B) 翻訳阻害剤 Cycloheximide (0.35 mM) を加えた培地を用い再水和 1 時間後、同様のリガンド応答アッセイを行い、蛍光輝度変化率を算出した。(C) 再水和 24 時間後に同様のリガンド応答アッセイし、蛍光輝度変化率を算出した。さらに Pentyl acetate の濃度を振り(0 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM)、リガンド応答アッセイを行い、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した。(D) 翻訳阻害剤 Cycloheximide (0.35 mM) を加えた培地で再水和を行い

24 時間後、同様のリガンド応答アッセイを行い、蛍光輝度変化率を算出した。グラフは $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で示し、ドットはそれぞれの値を示した ($n \leq 14$ 、D のみ $n=4$)。P 値は < 0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

考察

本研究より Pv11 細胞において嗅覚受容体である Orco、Or47a が機能した。しかしながら一過性発現におけるリガンド応答アッセイの結果より、Or13a、Or22a の機能は Pv11 細胞で確認できなかった(Fig. 1)。また、HiBiT assay の結果より Or47a は発現が確認でき、Orco が共発現すると発現量の増加が見られた(Fig. 2)。OR の正常な膜輸送、立体構造をとるには Orco が必要であると報告されており(Larsson *et al.* 2004)、この結果は一致している。さらに Or13 は HiBiT assay においても発現が確認できなかった。HiBiT システムの問題として、タンパク質に付加した HiBiT タグにルシフェラーゼ断片である LgBiT が結合して発光するため、タンパク質のフォールディングによっては HiBiT タグに LgBiT が結合することができず、発光が検出できないことがある。そのため、Or13a が真に発現していないかどうか検証するためには、western blotting のようにタンパク質のフォールディングを壊して検出する方法を取る必要があり、さらなる検討が必要である。また、予想外にリガンドアッセイで機能が確認できなかった Or22a に関しては HiBiT assay では発現が確認できた。Or22a の機能が確認できなかった理由については、膜に発現しているものの正しく立体構造をとれておらず機能しなかったのかもしれない。もしくは Or22a の立体構造が C 末端の HiBiT タグに LgBiT が非常に結合しやすい構造をしており、検出できたものの発現量そのものは非常に低かった可能性も考えられる。実際に Orco に対する HiBiT assay の結果では、Or47a を共発現させた場合は、Orco の発現量は上昇したが、Or13a、Or22a いずれを共発現させても発現量の向上が確認できておらず、タンパク質発現、細胞膜移行の過程で何らかの問題が発生したと思われる。

Or13a、Or22a は他種の培養細胞である Sf21 細胞や HEK293 細胞等において機能することが報告されている(Kiely *et al.* 2007; Termtanasombat *et al.* 2016; Zboray *et al.* 2023)。一般的に外来膜タンパク質の発現は難しいことが知られ、実際に昆虫培養細胞で発現実績のある昆虫嗅覚受容体は多くない。さらに哺乳類培養細胞である HEK293T 細胞や CHO 細胞において、哺乳類嗅覚受容体は遺伝子単体で発現が難しく、アクセサリタンパク質や、シグナルペプチドを付加する事で発現できた例も多くある(Lu *et al.* 2003; Saito *et al.* 2004; Shepard *et al.* 2013)。そのため Pv11 細胞で Or13a、Or22a の機能が見られなかったのは不自然ではないと考えられる。また Or47a が機能したことから、相性の良い嗅覚受容体も存在すると考えられ、スクリーニングを行うことで複数の嗅覚受容体アレイを構築することが可能だと考える。

また *Pv.00443* 遺伝子の stop codon 直前に P2A 配列を付加し、GCaMP6f、Orco、Or47a を knock-in することで嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立に成功した。モノクローナル細胞株を取得したが、Pentylacetate、VUAA1、Ionomycin に対する細胞ごとの応答の違いは多く見られた(Fig. 4)。よって細胞ごとに GCaMP6f、Orco、Or47a の発現量が異なると考え

られる。非常に強く応答する細胞が存在することから、大半の細胞は GCaMP6f、Orco、Or47a 最大に発現していないと考えられる。すなわち、発現システムを制御できればより高感度の細胞集団を用意でき、匂いセンサとして機能を向上できるかもしれない。実際に Pv11 細胞において、Tet-on システムを用いた遺伝子発現誘導系が構築されており、これを利用することで均一の嗅覚受容体発現において効果的かもしれない(Tokumoto *et al.* 2020)。

Pv.00443-Or47a 細胞株を用いた乾燥再水和処理の結果(Fig. 3D)より、嗅覚受容体が発現していても Pv11 細胞の乾燥耐性に影響はなかった。さらに乾燥再水和 1 時間のリガンド応答アッセイ、翻訳阻害剤を用いた検討より、Orco が乾燥保存できることが明らかになった(Fig. 6)。これまで Pv11 細胞において安定発現させた外来タンパク質はルシフェラーゼ、GFP 等細胞質内に局在するもののみであり、外来膜タンパク質の乾燥保存は初の成果である。一方で、乾燥再水和 1 時間後において Or47a のリガンド応答は見られないという課題に直面した。再水和後 24 時間においては応答が見られたが、匂いセンサとして使用するためには、再水和後すぐに利用することが望ましく、嗅覚受容体の再生産を待つのは実用的ではない。乾燥再水和 1 時間後において Or47a のリガンド応答が見られない理由として、乾燥前の発現量の低さが原因だと考えた。Pv.00443-Or47a 細胞株におけるリガンド応答アッセイの結果より、各リガンドに対する応答と DMSO の差を算出した(表 C)。Orco、GCaMP6f は乾燥保存可能であったが、再水和 1 時間後において VUAA1、Ionomycin に対する応答は乾燥前より低下していた。よって Or47a、Orco、GCaMP6f は同様に乾燥過程において減少しており、Orco、GCaMP6f においては応答するに足る、十分量が残っていたと考えられる。乾燥前において、Pentyl acetate に対する蛍光輝度変化率は VUAA1、Ionomycin に比べて低かったことから(表 C)、Or47a の発現量を向上させ、リガンド応答を強化できれば、Or47a の乾燥保存を達成できると考えられる。

表 C Pv.00443-Or47a の各リガンドと DMSO との蛍光輝度変化率($\Delta F/F_0$)の違い

	乾燥前	再水和後 1 時間	再水和後 24 時間
Pentyl acetate (1 mM)	0.1458 ($p=0.0005$)	0.0828 ($p=0.886$)	0.2077 ($p=0.0001$)
VUAA1 (1 mM)	0.4846 ($p<0.0001$)	0.1605 ($p<0.0001$)	0.8108 ($p<0.0001$)
Ionomycin (50 μ M)	0.8287 ($p<0.0001$)	0.1732 ($p<0.0001$)	1.028 ($p<0.0001$)

以上の結果より、Pv11 細胞で機能する嗅覚受容体が存在すること、尚且つ乾燥耐性に悪影響を与えず嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立が可能であることが明らかになった。さらに Orco の乾燥保存に成功したことから、外来性の膜タンパク質の常温乾燥保存自体は可能

であり、乾燥前の発現量が重要であることが示唆された。いつでも使用できる実用的な匂いセンサとして使用するためには、再水和後すぐに匂い応答が必須であり、応答に足る嗅覚受容体の乾燥保存を達成する必要がある。よって次章で Pv11 細胞における嗅覚受容体の発現系を改良し、目標である嗅覚受容体の乾燥保存を実現する。

参考文献

- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90418-x)
- Friedel P, Bregestovski P, Medina I (2013) Improved method for efficient imaging of intracellular Cl(-) with Cl-Sensor using conventional fluorescence setup. *Front Mol Neurosci* 6:7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00007>
- Kaupp UB (2010) Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat Rev Neurosci* 11:188-200. <https://doi.org/10.1038/nrn2789>
- Kiely A, Authier A, Kralicek AV, Warr CG, Newcomb RD (2007) Functional analysis of a *Drosophila melanogaster* olfactory receptor expressed in Sf9 cells. *J Neurosci Methods* 159:189-194. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.005>
- Kikuta S, Watanabe SJ, Sato R, Gusev O, Nesmelov A, Sogame Y, Cornette R, Kikawada T (2017) Towards water-free biobanks: long-term dry-preservation at room temperature of desiccation-sensitive enzyme luciferase in air-dried insect cells. *Sci Rep* 7:6540. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06945-y>
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB (2004) *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43:703-714. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.019>
- Lu M, Echeverri F, Moyer BD (2003) Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors. *Traffic* 4:416-433. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00097.x>
- Mao F, Dam P, Chou J, Olman V, Xu Y (2009) DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* 37:D459-463. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn757>
- Mao X, Ma Q, Zhou C, Chen X, Zhang H, Yang J, Mao F, Lai W, Xu Y (2014) DOOR 2.0: presenting operons and their functions through dynamic and integrated views. *Nucleic Acids Res* 42:D654-659. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1048>
- Miazzi F, Hoyer C, Sachse S, Knaden M, Wicher D, Hansson BS, Lavista-Llanos S (2019) Optimization of insect odorant receptor trafficking and functional expression via transient transfection in HEK293 cells. *Chem Senses* 44:673-682. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjz062>

- Mitsuno H, Sakurai T, Namiki S, Mitsuhashi H, Kanzaki R (2015) Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. *Biosens Bioelectron* 65:287-294. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.026>
- Miyata Y, Fuse H, Tokumoto S, Hiki Y, Deviatiiarov R, Yoshida Y, Yamada TG, Cornette R, Gusev O, Shagimardanova E, Funahashi A, Kikawada T (2021) Cas9-mediated genome editing reveals a significant contribution of calcium signaling pathways to anhydrobiosis in Pv11 cells. *Sci Rep* 11:19698. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98905-w>
- Miyata Y, Tokumoto S, Sogame Y, Deviatiiarov R, Okada J, Cornette R, Gusev O, Shagimardanova E, Sakurai M, Kikawada T (2019) Identification of a novel strong promoter from the anhydrobiotic midge, *Polypedilum vanderplanki*, with conserved function in various insect cell lines. *Sci Rep* 9:7004. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43441-x>
- Niimura Y, Matsui A, Touhara K (2014) Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Res* 24:1485-1496. <https://doi.org/10.1101/gr.169532.113>
- Pachitariu M, Stringer C (2022) Cellpose 2.0: how to train your own model. *Nat Methods* 19:1634-1641. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01663-4>
- Robertson HM, Wanner KW (2006) The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Res* 16:1395-1403. <https://doi.org/10.1101/gr.5057506>
- Robertson HM, Warr CG, Carlson JR (2003) Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 2:14537-14542. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335847100>
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 119:679-691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.021>
- Sato K, Pellegrino M, Nakagawa T, Nakagawa T, Vossell LB, Touhara K (2008) Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452:1002-1006. <https://doi.org/10.1038/nature06850>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat*

Methods 9:676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

- Shepard BD, Natarajan N, Protzko RJ, Acres OW, Pluznick JL (2013) A cleavable N-terminal signal peptide promotes widespread olfactory receptor surface expression in HEK293T cells. PLoS One 8:e68758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068758>
- Stensmyr MC, Dweck HK, Farhan A, Ibba I, Strutz A, Mukunda L, Linz J, Grabe V, Steck K, Lavista-Llanos S, Wicher D, Sachse S, Knaden M, Becher PG, Seki Y, Hansson BS (2012) A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*. Cell 151:1345-1357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.046>
- Strauch M, Ludke A, Munch D, Laudes T, Galizia CG, Martinelli E, Lavra L, Paolesse R, Ulivieri A, Catini A, Capuano R, Di Natale C (2014) More than apples and oranges detecting cancer with a fruit fly's antenna. Sci Rep 4:3576. <https://doi.org/10.1038/srep03576>
- Termtanasombat M, Mitsuno H, Misawa N, Yamahira S, Sakurai T, Yamaguchi S, Nagamune T, Kanzaki R (2016) Cell-Based odorant sensor array for odor discrimination based on insect odorant receptors. J Chem Ecol 42:716-724. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0726-7>
- Tokumoto S, Miyata Y, Usui K, Deviatiiarov R, Ohkawa T, Kondratieva S, Shagimardanova E, Gusev O, Cornette R, Itoh M, Hayashizaki Y, Kikawada T (2020) Development of a tet-on inducible expression system for the anhydrobiotic cell line, Pv11. Insects 11. <https://doi.org/10.3390/insects11110781>
- Zboray K, Toth AV, Miskolczi TD, Pesti K, Casanova E, Kreidl E, Mike A, Szenes A, Sagi L, Lukacs P (2023) High-throughput ligand profile characterization in novel cell lines expressing seven heterologous insect olfactory receptors for the detection of volatile plant biomarkers. Sci Rep 13:21757. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47455-4>

第3章 Pv11 細胞における嗅覚受容体発現系の改良と 乾燥保存の実現

序論

第2章より、Pv11細胞において乾燥耐性に影響を与えずに嗅覚受容体を安定発現する細胞株の樹立が可能であった。しかしながら、乾燥再水和後すぐには Or47a に対する Pentyl acetate の応答が検出できなかった。その原因として Or47a の発現量の低さに起因すると予想した。いづどこでも使用可能な細胞センサ実現のために、乾燥再水和後すぐに匂い検出可能であることが望ましい。そこで本章では Pv11 細胞における嗅覚受容体の発現系の改良を行い、発現量を向上することで、嗅覚受容体を乾燥保存することを試みた。

これまで培養細胞において外来タンパク質の発現量を向上させる試みは多く行われてきた。代表的な手法の一つに非翻訳領域配列(untranslated region; UTR)を付加する手法が挙げられる。UTR とは mRNA の翻訳されない領域であり、mRNA の構造として 5'末端の cap 構造、開始コドン上流の 5'-UTR (5 prime untranslated region)、タンパク質コード領域、終始コドン下流の 3'-UTR(3 prime untranslated region)、3'末端のポリ A テールから成る (Mignone *et al.* 2002)。5'-UTR は二次構造を形成する領域やエンハンサー領域を含み、mRNA の安定性や翻訳効率に関わることが知られる (Leppek *et al.* 2018)。実際に 5'-UTR を付加することで目的タンパク質の発現量の向上を促進することが多く報告されており、5'-UTR の改変等多くの試みが行われている (Dvir *et al.* 2013; Asrani *et al.* 2018; Cao *et al.* 2021)。また 3'-UTR も mRNA の安定性や分解、翻訳、局在化など多くの役割を担っていることが知られている (Mayr 2019)。実際に哺乳類細胞において、3'-UTR 領域が細胞膜局在を制御することが報告されている (Berkovits and Mayr 2015)。そこで Pv11 細胞においても、嗅覚受容体に UTR 配列を付加することで、翻訳効率の促進や膜局在の促進が期待できると考えた。

また他の手法に codon usage を宿主に最適化する手法が挙げられる。それぞれの生物種においてコドンの使用頻度が異なり、発現させる遺伝子のコドン頻度を最適化することでタンパク質発現量の向上させる検討は一般的である (Hanson and Coller 2018)。ネムリユスリカ遺伝子は AT 割合が高く (GC-content: 28.1%) であり (Yoshida *et al.* 2022)、キイロショウジョウバエは GC 割合が比較的高いことが知られている (Vicario *et al.* 2007)。実際に Orco は 56.1%、Or47a は 48.6% の GC 割合であった。そのため Orco、Or47a の発現効率が悪い可能性が考えられ、codon usage を最適化することでタンパク質発現量の向上が期待できる。

さらに膜タンパク質の細胞膜移行を促進する目的で signal 配列を付加する手法も良く用いられる。膜タンパク質は細胞膜に局在するため、N 末に輸送後切断される膜局在 signal 配列を有すものがあり、それを輸送タンパク質が認識することで細胞膜に輸送される (Schulein *et al.* 2012)。そのため、膜移行 signal 配列を付加することで細胞膜移行を促進することが期待でき、実際にシグナル配列を付加し昆虫細胞で分泌タンパク質の生産量の向上や、哺乳類細胞で嗅覚受容体を含む膜タンパク質の細胞膜発現の向上が可能と報告され

ている (Tessier *et al.* 1991; Shepard *et al.* 2013)。

遺伝子 knock-in コンストラクトの改良も嗅覚受容体発現量向上に寄与しうる。前章の Pv.00443-Or47a 細胞株は内在性プロモーターを用いたポリシストロニック発現により安定発現を達成している。P2A 配列を用いるポリシストロニック発現は、P2A 配列を複数使用すると、翻訳が中止されたりや切断に失敗してたんぱく質発現量の偏りや減少が起きることが報告されている (Liu *et al.* 2017)。そのため Pv.00443-Or47a 細胞株においても P2A 配列を利用したため、嗅覚受容体の発現量が低くなり、Pentyl acetate に対する応答が弱かった可能性が考えられる。以上の問題を解決するため、1 つのプロモーターで 1 つの遺伝子を制御するよう knock-in を行う。これまで Pv11 細胞における乾燥耐性に影響を与えない遺伝子挿入箇所は Pv.00443 遺伝子下流のみであったが、新たに Genomic Safe Harbors (GSH) 領域が発見された (Miyata *et al.* 2022)。GSH 領域とは、表現型に影響を与えず目的遺伝子を組み込むことができ、新しく組み込まれた遺伝子が設計通りに機能することが可能なゲノム上の部位である (Papapetrou and Schambach 2016)。そのため Pv.00443 遺伝子領域も GSH 領域といえるが、内在性遺伝子を破壊することができず、knock-in コンストラクトの制限があった。一方新たに発見された GSH 領域 (Chr1:21164645) は遺伝子をコードしておらず、プロモーターごと knock-in が可能である。

そこで本章では UTR 配列、codon usage の最適化、signal 配列の付与が Pv11 細胞において、嗅覚受容体の発現量向上に有効か検討を行う。そして有効であった手法を用いて、新たに発見された GSH 領域 (Chr1:21164645) にプロモーター直結で遺伝子の knock-in を行い、細胞株の樹立を行う。そして新たに樹立した嗅覚受容体安定発現細胞株において嗅覚受容体のリガンド応答の向上が見られるか、乾燥再水和後も嗅覚受容体の応答が保存されているか評価を行い、嗅覚受容体乾燥保存の実現を達成する。

材料と方法

1. Pv11 細胞培養プロトコル

Pv11 細胞は IPL-41 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に対し 2.6 g/L tryptose phosphate broth (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), 10% (v/v) fetal bovine serum, 0.05% (v/v) of an antibiotic and antimycotic mixture (AA mix; penicillin, amphotericin B, and streptomycin; (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)) を添加し培養した。細胞密度は 3×10^5 cells/mL で播種し、25°C で 6 日から 7 日間培養した。

2. 改変 Or47a-HiBiT 一過性発現ベクターの作成

検討する UTR として、Pv11 細胞で高発現している膜タンパク質遺伝子である *g5495* と *g6534* を用いた。UTR 領域は、ネムリユスリカゲノムデータベース MidgeBase2 (Yoshida *et al.* 2022) の CAGE データ、SAGE データから決定した。Pv11 細胞から、Nucleospin Tissue (Takara Bio) を用いてゲノムを抽出した。抽出したゲノムをテンプレートとして、*g5495* と *g6534* の 5'-UTR 領域、3'-UTR 領域を Prime STAR Max DNA Polymerase を用いて PCR を行いクローニングした。クローニングした UTR 領域を、pPv121-Or47a-HiBiT をバックボーンベクターに、それぞれ HiFi Assembly して挿入し、pPv121-*g5495*-5'-UTR-Or47a-HiBiT、pPv121-*g5495*-5'-UTR-Or47a-3'-UTR-HiBiT、pPv121-*g5495*-Or47a-3'-UTR-HiBiT、pPv121-*g6534*-5'-UTR-Or47a-HiBiT、pPv121-*g6534*-5'-UTR-Or47a-3'-UTR-HiBiT、pPv121-*g6534*-Or47a-3'-UTR-HiBiT を作成した。

Or47a の Codon usage を AT へと変換した遺伝子を人工合成し、HiBiT タグが付加するよう PCR を行い、バックボーンベクターとして pPv121-MCS を用いてアッセンブルし、Codon を最適化した pPv121-Or47a-HiBiT を作製した。

検討するシグナル配列として、melittin signal peptide(MKFLVNVALVFMVVYISYIYA)、Lucy Rho signal peptide(MRPQILLLLALLTLGLAMNGTEGPNFYVPFSNKTGVV)を用いた。pPv121-Or47a に対し、これらのシグナル配列、HiBiT タグが付加するよう PCR を行い、バックボーンベクターとして pPv121-MCS に対しそれぞれ HiFi Assembly して挿入し、pPv121-melittin -Or47a-HiBiT、pPv121-LucyRho -Or47a-HiBiT を作製した。

3. HiBiT assay による嗅覚受容体の発現系改良評価

上記で作成した改変 Or47a-HiBiT 一過性発現ベクター、コントロールとして pPv121-Or47a-HiBiT を用いた。

- ・ 121-Orco 0.8 pmol

- ・ 121-Or47a-HiBiT(+UTR or codon optimization or +signal peptide) 0.8 pmol
- ・ トランスフェクションコントロールとして pPv632bp-luc2 0.75 pmol

以上を同時トランスフェクションした。トランスフェクション後の細胞は 250 μ L の培地を入れた 48-well プレートに 12.5 μ L ずつ播種した。播種 2 日後の細胞溶液 50 μ L を回収し、等量の調整済み HiBiT assay 溶液 (Nano Glo HiBiT Extracellular Detection System(Promega)または Nano Glo HiBiT Lytic Detection System(Promega))と混合し、96-well white microtitre plate に分注した。600 rpm で 10 分間振とうし、ARVO multi-label plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて HiBiT の発光を定量した。また同様の方法で、Luc2 は Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用して定量を行った。定量した HiBiT の発光の値を Luc2 の値で除することで relative luciferase activity を算出した。

4. Knock-in 用 donor vector の作成

上記で作成した pPv121-Orco、pPv121-Or47a、pPv121-GCaMP6f に加えブラストシジン耐性遺伝子(Blasticidin resistance gene; BlaR)発現ベクターpPv121-BlaR をテンプレートとし、増幅した PCR 産物をインサートとした。

バックボーンベクターとして pCR4-21164645#9_40bpHA-HaloTag-121-121-AcGFP1 を使用し、増幅した PCR 産物を NEBuilder HiFi Assembly(New England BioLabs)で挿入し、それぞれドナーベクターとして pCR4-21164645#9_40bpHA-GCaMP6f-121-121-g5495-5'-UTR-Orco-3'-UTR と pCR4-21164645#9_40bpHA-BlaR-121-121-g5495-5'-UTR-Or47a-3'-UTR を作成した。

5. Knock-in 手法とモノクローナル細胞株の樹立

上記と同じ手法でトランスフェクションを行った。作成した donor vector をそれぞれ 0.3 μ g ずつ、pPvU6b-DmtRNA-21164645#9 (gRNA 発現 vector) 5 μ g、pPv121-SpCas9 (Cas9 発現 vector) 5 μ g を混合して、Pv11 細胞へ同時トランスフェクションし、IPL-41 medium に播種した。播種 5 日後の細胞を Blasticidin 150 μ g/mL の IPL-41 medium に 1×10^5 cells/mL の濃度で播種し、1 週間培養することで Blasticidin 薬剤セレクションを行なった。一週間後、半量の IPL-41 medium を除き、新しく等量の Blasticidin 150 μ g/mL の IPL-41 medium を添加し、さらに 1 週間培養することで 2 回目の Blasticidin 薬剤セレクションを行なった。2 回薬剤セレクションを行った細胞を通常の IPL-41 medium に播種し 1 週間回復培養を行ない、シングルセルソーティングすることでモノクローナル細胞株の樹立を行った。

シングルセルソーティングは回復培養後の細胞を DAPI (Dojindo)で細胞染色し、MoFlo Astrios cell-sorter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を利用して 355 nm, 488 nm のレーザーを用い、生細胞かつ GCaMP6f が発現している細胞を取得した。シングルセルソーティングを行い、96-well plate に播種した Pv11 フィーダー細胞 1×10^3 cells に対し目的の細胞を 1 個ソーティングした。一週間培養後、2 度 $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で Blasticidin 薬剤セレクションを行うことでフィーダー細胞を除去した。このフィーダー細胞除去後のモノクローナル細胞株を、Or47a-11G 細胞株と命名した。

6. Genomic PCR と sequence による目的遺伝子 knock-in の確認

取得した細胞株から FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit(Favorgen, Taiwan)を用いてゲノムを抽出した。抽出したゲノムをテンプレートとして、knock-in した Chr1:21164645 上と knock-in 遺伝子領域が増幅するよう KOD One PCR Master Mix -Blue (TOYOBO, Osaka, Japan)で PCR を行い、ゲル電気泳動することで knock-in を確認した。ゲル電気泳動後、PCR 産物を精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて塩基配列解析を行い、正確に knock-in できていることを確認した。

7. モノクローナル細胞株におけるリガンド応答アッセイによる細胞株選抜

Genomic PCR により狙い通り knock-in されていたモノクローナル細胞株を培養し、培養 7 日後の細胞を懸濁した。懸濁した細胞溶液 $200 \mu\text{L}$ を 48-well plate に取り、IPL-41 medium に溶かした Pentyl acetate 溶液 $50 \mu\text{L}$ を DMSO 終濃度 1%、Pentyl acetate 終濃度 1 mM になるよう調整し、細胞溶液に添加した。リガンド溶液添加前、添加後の細胞の蛍光画像を励起波長/蛍光波長が 470 nm/525 nm で撮影し(オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710、Keyence)、蛍光輝度変化率を算出した。

8. Pv11 細胞の乾燥再水和手法と細胞生存率の評価

Pv11 細胞の乾燥保存処理は、第一章と同じ手法を用いた。 600 mM trehalose に対し 10% (v/v)IPL-41 medium を添加して Trehalose mixture を作成した。Trehalose mixture に 2×10^7 cells each ml の濃度になるよう Pv11 細胞を懸濁し 25°C で 48 時間インキュベートしてトレハロース処理を行った。

トレハロース処理後の細胞を $300 \times g$ で 5 分間遠心して回収し、35 mm dish へ Trehalose mixture $40 \mu\text{L}$ へ細胞数 4×10^6 cells になるよう再懸濁し滴下した。滴下後、1 kg シリカゲルが入った相対湿度 10%以下の容器($215 \times 220 \times 200 \text{ mm}$)へ移し、14 日間乾燥した。乾燥後それぞれの 35 mm dish へ培養用 IPL-41 medium を 1 ml 添加することで再水和した。

再水和後 1 時間の細胞を propidium iodide (PI; Dojindo)、Hoechst 33342 solution (Hoechst; Dojindo)で細胞を 2 重染色し、画像を取得した(BZ-X710, Keyence)。PI は 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Hoechst は 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるよう IPL-41 medium で調整し染色を行った。PI は励起波長/蛍光波長が 544 nm/605 nm、Hoechst は 405 nm/460 nm で撮影し、生細胞数 (Hoechst+, PI-)を全細胞数(Hoechst+)で除することで細胞生存率を算出した。

9. Or47a-11G 細胞株のリガンド応答アッセイ

樹立した Or47a-11G 細胞株を T-25 フラスコで培養し、培養 8 日後の細胞を回収し上記と同じ手法(第 2 章 材料と方法 3)で接着処理を行った。

リガンド応答アッセイも上記と同じ手法(第 2 章 材料と方法 3)を用いて行った。また細胞接着も同様に BAM を用いて行った(第 2 章 材料と方法 3)。Pentyl acetate に関しては 2 mM、200 μM 、100 μM 、20 μM 、10 μM 、2 μM 、1 μM の濃度になるようリガンド溶液を調整し、細胞にリガンド溶液添加後、終濃度 1 mM、100 μM 、50 μM 、10 μM 、5 μM 、1 μM 、0.5 μM になるようリガンド応答アッセイを行なった。リガンド溶液添加前の細胞を 10 秒ごと 3 回撮影し、リガンド添加後 10 秒ごと 6 回撮影し、蛍光輝度変化率も上記と同じ手法(第 2 章材料と方法 3)を用いて行った。

シグモイド曲線の計算は GraphPad Prism 10 software を用い、蛍光輝度変化率の最小値を 0、Max 値を 100 となるようそれぞれの値を補正し、4 パラメーター非線形回帰分析によって算出した。

10. リガンド応答アッセイにおける 1 細胞ごと蛍光輝度変化率定量手法

材料と方法 9 で取得したリガンド応答アッセイにより取得したタイムラプス画像を位置合わせした(Zeiss Zen Blue edition)。位置合わせを行ったタイムラプス画像の 1 枚目の明視野画像を用い、Cellpose2.0 のモデル'cyto2'を用いて細胞をセグメンテーションした。セグメンテーション後の結果を修正し、再学習したモデルを作成した。再学習したモデルを使用し、再び細胞のセグメンテーションを行った。位置合わせしたタイムラプスデータの蛍光画像を、セグメンテーションした細胞の ROI (Region of Interest)ごとに蛍光輝度を定量し、1 細胞ごとの蛍光輝度変化量を算出した。

11. Or47a-11G 細胞株の乾燥再水和後リガンド応答アッセイと定量手法

乾燥再水和手法は上記(材料と方法 8)に従った。また翻訳阻害剤を用いた再水和に関しては、先行研究で行われた手法を用いた。具体的には Cycloheximide (CHX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を再水和に使用する IPL-41 medium に濃度 0.35 mM になるよう溶解し、再水

和を行った。再水和後 1 時間の細胞を回収しリガンド応答アッセイを行なった。また Cycloheximide を用いて再水和を行った場合は、BAM コーティング 96-well plate に細胞を接着する際、接着に用いる ACSF buffer に濃度 0.35 mM になるよう Cycloheximide を溶解し、細胞接着を行った。

リガンド応答アッセイにより取得したタイムラプス画像を位置合わせした(Zeiss Zen Blue edition)。位置合わせを行ったタイムラプス画像の 1 枚目の蛍光画像を用い、第 2 章で再学習したモデルでセグメンテーションした。セグメンテーションした画像を修正し、再び学習させた。再学習したモデルを使用し、改めて細胞のセグメンテーションを行った。位置合わせしたタイムラプスデータの蛍光画像を、セグメンテーションした細胞の ROI(Region of Interest)ごとに蛍光輝度を細胞ごとに定量し、平均することで 1 実験ごとの蛍光輝度変化率とした。

12. 画像解析

細胞数測定には Fiji (バージョン 2.3.0) を使用した。

13. 統計解析

すべてのデータは平均値と標準誤差 (SEM) で表した。統計解析として、三群以上の比較では 1 元配置分散分析(one-way ANOVA) と多重比較検定(Dunnett's post hoc test) を行い検討した。P 値は < 0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***; 0.001 から 0.01 は**; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns"(優位差なし)で表した。統計解析には GraphPad Prism 10 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)を用いた。

結果

1. Pv11 細胞における嗅覚受容体発現系の改良

第2章にて Pv11 細胞で機能した Or47a に利用し、嗅覚受容体発現系の改良を行なった。検討する内容として UTR 配列の付加、codon usage の最適化、シグナル配列の付加を検討した。UTR においては、Pv11 細胞において膜局在遺伝子(GO:0016020)を選び、RNA seq の結果から、通常状態を意味する(トレハロース処理前)T0、トレハロース処理後である T48 において発現量(TPM 値)の平均上位二遺伝子として *g5495*, *g6534* を選び検討を行った(表 A) (Yamada *et al.* 2018)。また、ネムリユスリカの遺伝子の codon usage は AT リッチであることから、Orco と Or47a をコードする遺伝子の codon usage をネムリユスリカ codon usage に合わせて改変した合成遺伝子を用いて検討した(表 B)。signal 配列に関しては、これまで他種の昆虫細胞である Sf9 細胞で分泌タンパク質において実績のある melittin signal peptide(Tessier *et al.* 1991)、哺乳類培養細胞 HEK293T において哺乳類嗅覚受容体において実績のある Lucy Rho signal peptide を検討した(Friedel *et al.* 2013)。

表 A. Pv11 細胞における膜局在遺伝子の発現量上位遺伝子

	T0_TPM	T48_TPM	Mean_TPM
<i>g6534</i>	2508.69573	1492.36131	2000.52852
<i>g5495</i>	796.54251	1898.65827	1347.60039
<i>g10988</i>	1292.18139	861.47752	1076.82946
<i>g16541</i>	735.80277	1138.86626	937.33451
<i>g14212</i>	791.57365	704.28586	747.92976
<i>g11511</i>	672.27757	669.42075	670.84916
<i>g7224</i>	449.93925	749.46823	599.70374

表 B. ネムリユスリカ codon usage への調節による塩基使用割合の違い

	Orco	改変 Orco	Or47a	改変 Or47a
A	0.217	0.321	0.227	0.298
C	0.294	0.149	0.250	0.149
G	0.267	0.185	0.236	0.180
T	0.222	0.345	0.287	0.374

発現量の定量は第 2 章と同じく HiBiT assay を用いて評価を行なった。第 2 章で作成した HiBiT tag 付き Or47a 発現ベクター(121-Or47a-HiBiT)に UTR 全体(5'-UTR & 3'-UTR)を付加したベクターを作成し、HiBiT extracellular detection system を用いて定量した(Fig. 1A 左)。結果として *g5495*-UTR および *g6534*-UTR を付加するといずれも発現量が向上し、特に *g5495* は約 15 倍と顕著に上昇した。次に codon usage を改変した Or47a HiBiT tag 付き vector を作成し、HiBiT assay で発現量の評価を行うと、発現量は向上せず、むしろ減少してしまった(Fig. 1A 中央)。同様にシグナルペプチドに関しても、HiBiT tag 付き Or47a 発現ベクターに付加し、HiBiT assay を行うも発現量の向上は見られなかった(Fig. 1A 右)。

Pv11 細胞の嗅覚受容体発現に効果的であった UTR に着目し詳細な検討を行った。UTR の発現量向上メカニズムが細胞膜移行を促進するのか、それとも発現量そのものを向上した結果として細胞膜発現量が上昇したのか評価するため、HiBiT Extracellular detection system(細胞膜発現量)、HiBiT Lytic detection system(細胞全体発現量)を利用して検討した。さらに UTR のどの箇所が効果的か評価するため 5'-UTR & 3'-UTR、3'-UTR のみ、5'-UTR のみをそれぞれ付加した HiBiT tag 付き Or47a 発現ベクターを作成し比較した(Fig. 1B)。結果として Extracellular と Lytic とともに同じように発現量が向上したことから、細胞膜局在が促進されているわけではなく、タンパク質発現量そのものが向上した結果として細胞膜発現が向上したと分かった。また *g5495* と *g6534* いずれにおいても 3'-UTR 単独でほとんど効果は見られず、5'-UTR の付加が効果的であった。また 5'-UTR 単独よりも 3'-UTR を付加した UTR 全体が最も効果的であり、5'-UTR、3'-UTR とともに重要であった。

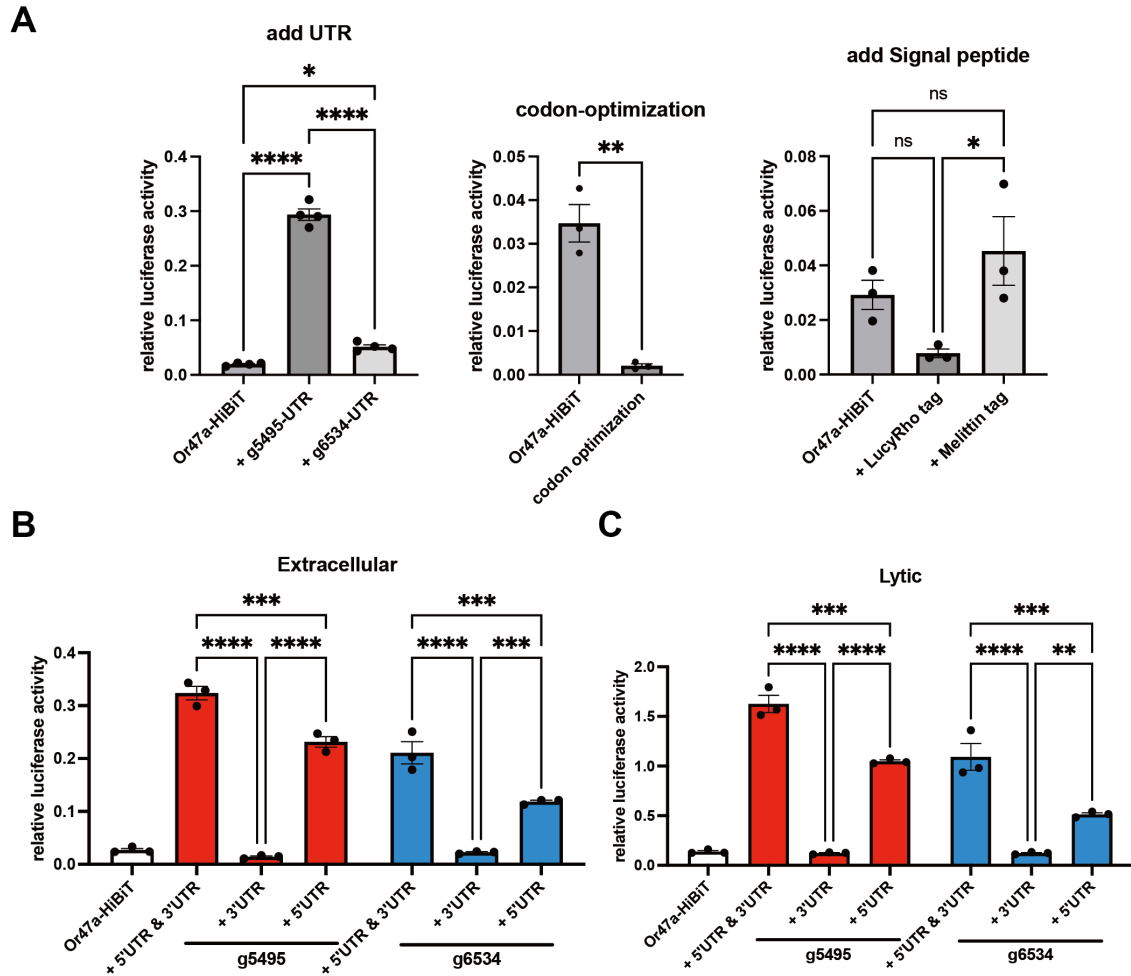


Fig. 1. Pv11 細胞における嗅覚受容体発現系の改良

(A) HiBiT Extracellular detection system を用いて、Or47a の細胞膜発現量を定量した。HiBiT tag 付き Or47a 発現ベクターに加え、121-Orco、トランスフェクションコントロールとして Luc2 発現 vector を同時にトランスフェクションし、相対発光輝度(relative luciferase activity)を算出することで発現量を評価した。121-Or47a-HiBiT に対し、g5495-UTR(5'-UTR & 3'-UTR)、g6534-UTR(5'-UTR & 3'-UTR)を付加、121-Or47a-HiBiT、121-Orco の codon usage をネムリユスリカ仕様に改変、121-Or47a-HiBiT に signal 配列として Lucy Rho, Melittin タグを付加して検討を行った。いずれも 121-Or47a-HiBiT をコントロールとして比較することで効果を評価した。発現量の向上に効果的であった UTR 配列に着目し、HiBiT Extracellular detection system (B)と HiBiT Lytic detection system (C) を用いて、細胞膜発現量、細胞全体における発現量を評価した。また UTR のどの箇所が効果的か評価するため 5'-UTR & 3'-UTR、3'-UTR のみ、5'-UTR のみの付加による発現量の違いを評価した。グラフは mean±SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3)。P 値は < 0.0001 は****; 0.0001 から 0.001 は***; 0.001 から 0.01 は**; 0.01 から 0.05 は*; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

2. 改良した発現系を用いた嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立

Pv11 細胞において *g5495*-UTR を付加することで Or47a の発現量が向上した。そこで *g5495*-UTR を付加した Orco および Or47a を Pv11 細胞ゲノムの GSH 領域アリル (Chr1:2116464) に knock-in することを試みた。GCaMP6f と *g5495*-UTR-Orco および *g5495*-UTR-Or47a、薬剤セクション用 Blasticidin 耐性遺伝子をそれぞれ 1 つずつの promoter で発現するよう knock-in コンストラクトを作成し、安定発現細胞株の樹立を試みた (Fig. 2A)。knock-in 後、Blasticidin セクションを行い、GCaMP6f の蛍光でシングルセルソーティングを行なった。モノクローナル細胞株を取得し、Genomic PCR を行うことで狙い通りに遺伝子導入ができているか評価した (Fig. 2B)。複数のモノクローナル細胞株が取得できたので、最も良い細胞株の選抜を行った。11C 細胞株は細胞増殖しなかったことから、以降検討を行わなかった。それぞれに対し Pentyl acetate を用いてリガンド応答アッセイを行い、Or47a の応答を評価した (Fig. 2C)。いずれも Pentyl acetate 1 mM に対し、蛍光輝度変化率の上昇を示し、中でも 11G 細胞株がより強く応答するように見えた (n=1 のため統計解析は行わず)。次に 3 つの細胞株を乾燥処理し、再水和後の細胞蘇生率を評価した (Fig. 2D)。いずれの細胞株も再水和後の細胞生存し、通常の Pv11 細胞と比較すると 11G は高い細胞生存率を示した。以上より新たな嗅覚受容体安定発現細胞株として Or47a-11G を選抜した。なお Or47a-11G においてシーケンスを行うことで目的遺伝子の正確な knock-in も確認した。

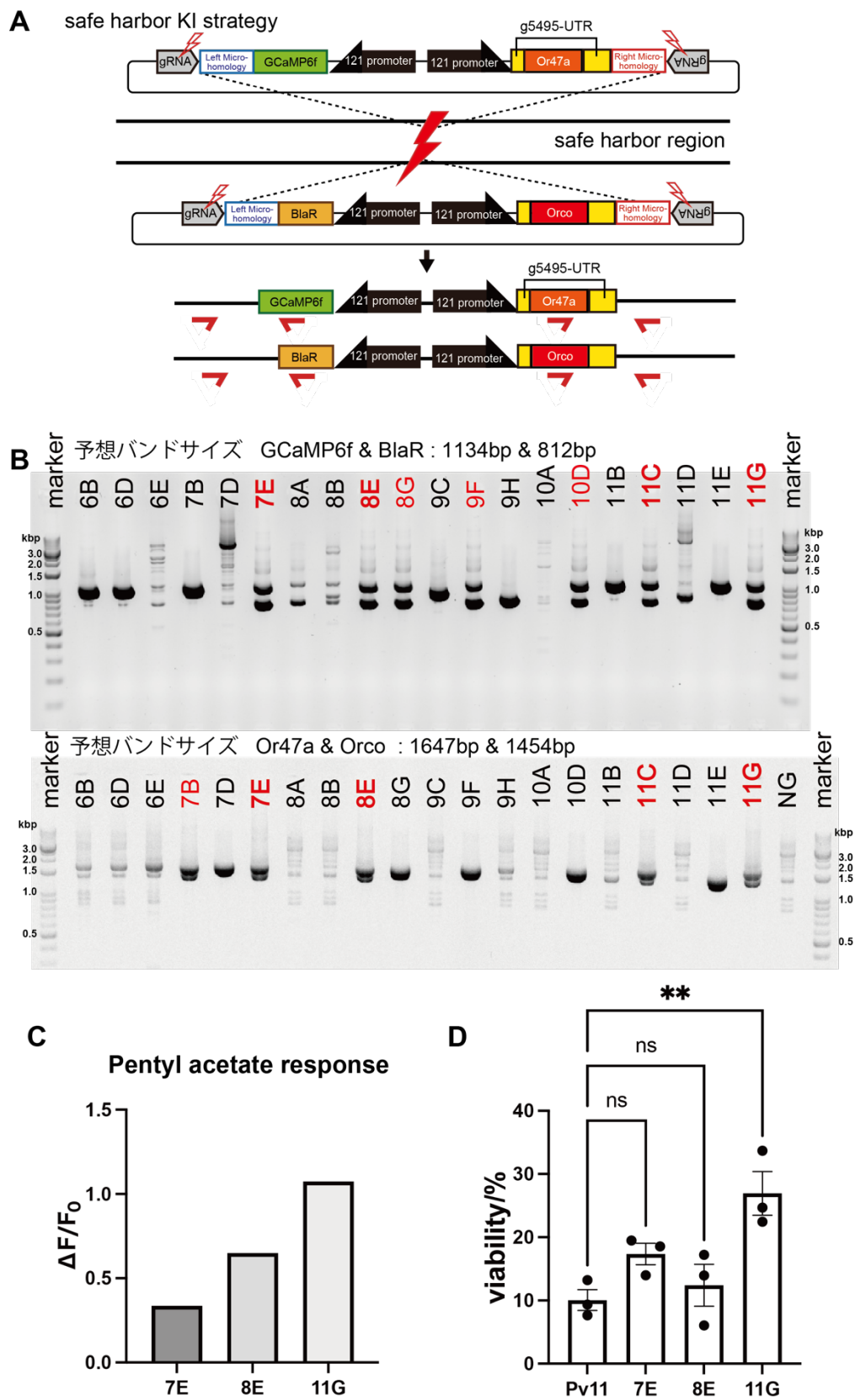


Fig. 2. 改良した発現系を用いた嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立

(A) Pv11 細胞ゲノムの GSH 領域のアリルに GCaMP6f、g5495-UTR-Orco、g5495-UTR-Or47a を knock-in し安定発現細胞株を樹立するための模式図。薬剤耐性遺伝子として Blasticidin 耐性遺伝子(BlaR)を knock-in した。knock-in を行なった細胞集団に対し、Blasticidin による薬剤セレクション、GCaMP6f の蛍光でシングルセルソーティングを行い、モノクローナル細胞株の取得を行った。(B) 複数のモノクローナル細胞株が取得できたので、それぞれに対し Genomic PCR を行い、目的サイズのバンドが検出できるか細胞株を選抜した。A の赤矢印の領域を PCR 増幅できるよう PCR を行い、GCaMP6f & BlaR、Orco & Or47a のダブルバンドが検出できるよう 2 回に分けて Genomic PCR を行った。狙い通りのサイズのダブルバンドが検出できた細胞株を赤で示し、両方ともバンドが検出できた細胞株が正しく knock-in された細胞株として太赤線で示した。(C) 狙い通りに knock-in が確認できた細胞株(7E、8G、11G)に対し、Pentyl acetate(1 mM)でリガンド応答アッセイを行い、蛍光輝度変化率を算出した。(D) 狙い通りに knock-in が確認できた細胞株(7E、8G、11G)の乾燥耐性能力を評価するため、乾燥再水和後の細胞生存率を算出し、knock-in を行っていない野生型の Pv11 細胞と比較した。グラフは mean±SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=3)。P 値は 0.001 から 0.01 は**、0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

選抜した Or47a-11G 細胞株に対し、濃度を振った Pentyl acetate を用いリガンド応答アッセイを行うことで、Or47a の機能評価を行なった(Fig. 3)。ネガティブコントロールとして DMSO (Pentyl acetate の solvent: 0 μ M に相当)を用い、Pentyl acetate 0.5 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、500 μ M、1 mM の終濃度になるよう細胞に添加し、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した。Pentyl acetate に対し濃度依存的に応答を示し、DMSO を添加した場合と比べ、1 μ M 以上で蛍光輝度変化率の有意な差は見られた(Fig. 3A)。なおかつ Pentyl acetate 1 mM に対する蛍光輝度変化率は 1.5 ほどであり、第 2 章で評価した Pv.00443 に knock-in した場合より 6~7 倍ほど向上した。さらに蛍光輝度変化率の最小値を 0、最大値を 100 とした際の応答曲線をプロットした (Fig. 3B)。Pv.00443-Or47a 細胞株と同じ様に濃度依存的なシグモイド曲線型の応答を示し、EC₅₀ は 17.1 μ M だった。以上より樹立した Or47a-11G 細胞株においても Or47a は正しく機能した。

また Or47a-11G 細胞株の Pentyl acetate に対する濃度ごとの応答の違いを 1 細胞ごとの蛍光輝度変化率を定量し評価を行なった(Fig. 4)。Pentyl acetate 10 μ M から急激に応答する細胞の数が増えており、濃度が高くなるごとに応答する細胞数が上昇していた。一方でほぼ応答が max に到達している Pentyl acetate 1 mM においても、DMSO と比べてほぼ全ての細胞が上方向にシフトしており、応答をしているものの、応答強度のかなりばらつきが見られた。

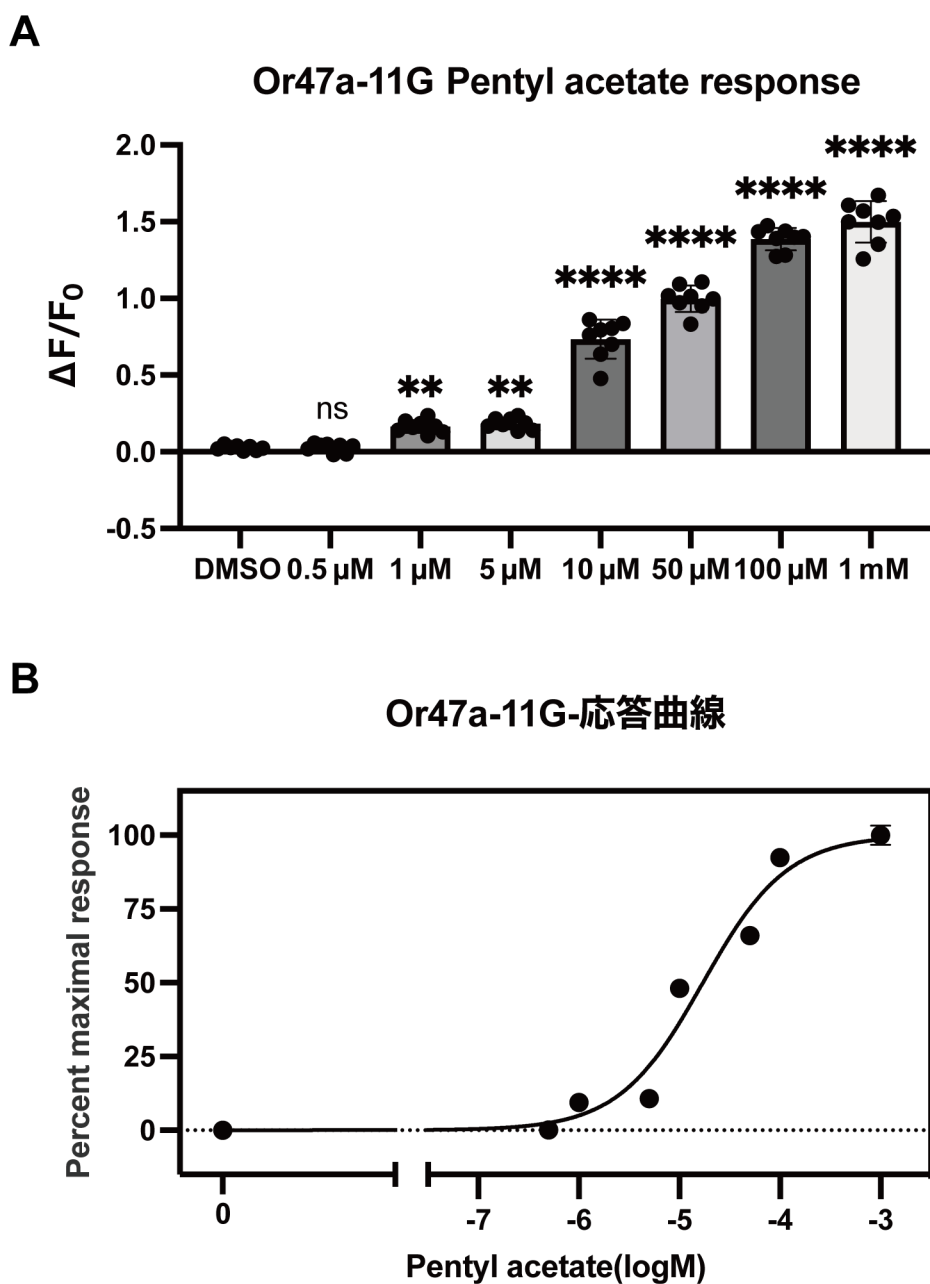


Fig. 3. Or47a-11G における Or47a の機能性評価

(A) 樹立した Or47a-11G に対し、DMSO 0.5%(Pentyl acetate 0 μ M に相当)を用い、Pentyl acetate 0.5 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、1 mM の終濃度になるよう細胞に添加し、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した。(B) 同じデータを、蛍光輝度変化率の最小値を 0、最大値を 100 と補正して曲線プロットした。グラフは mean \pm SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=12 または 13)。P 値は < 0.0001 は****; 0.001 から 0.01 は**; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

Or47a-11G-細胞蛍光輝度変化プロット

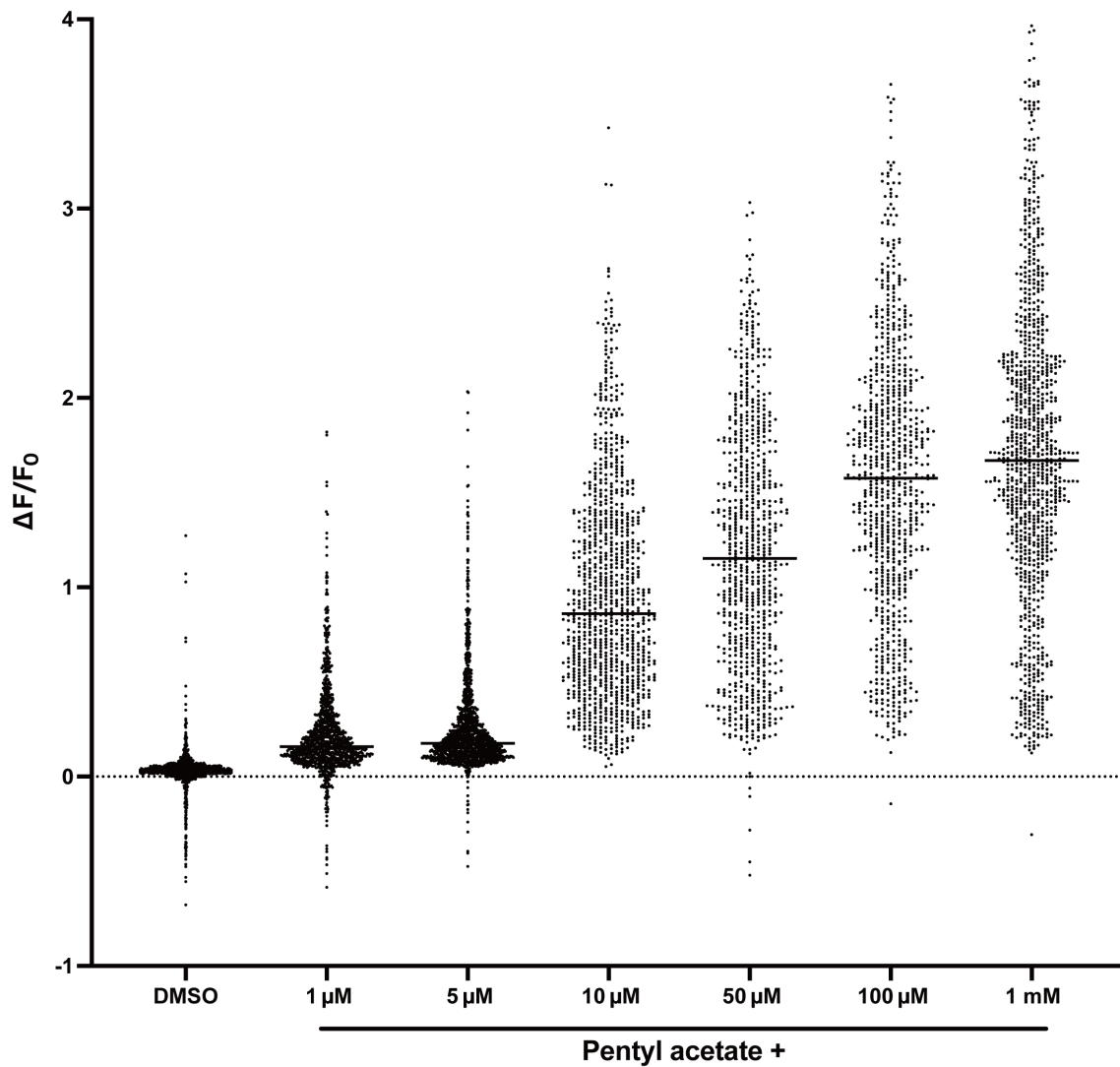


Fig. 4 Or47a-11G 細胞株における Pentyl acetate に対する蛍光輝度変化
樹立した Or47a-11G 細胞株に対し、DMSO 0.5% (Pentyl acetate 0 μ M に相当)を用い、
Pentyl acetate 0.5 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、1 mM の終濃度にな
るよう細胞に添加した。リガンド添加後の蛍光輝度変化率を 1 細胞ごとに算出し、それ
ぞれの細胞個々のデータを swarm plot した。黒横線は平均値を表した。

3. Or47a-11G 細胞株を用いた嗅覚受容体乾燥保存性の検討

樹立した Or47a-11G 細胞株を用い、嗅覚受容体が乾燥保存可能か検討を行なった。Or47a-11G 細胞株を乾燥処理し、再水和後 1 時間においてリガンド応答アッセイを行うことで、嗅覚受容体の乾燥耐性の評価を行なった(Fig. 5)。乾燥前の Or47a-11G 細胞株のリガンド応答評価は画像全体の蛍光輝度変化率から定量したが、乾燥後の細胞の生存率は 20% ほどであったので、画像全体の定量だと、応答を低く見積もってしまう。死細胞は GCaMP6f が漏出することから、蛍光輝度が低いと考え、リガンド添加前の蛍光画像から細胞をセグメンテーションし、1 細胞あたりの蛍光輝度変化率を算出しそれを平均することで評価した。ネガティブコントロールとして DMSO 0.5% (Pentyl acetate 0 μ M に相当)を用い、乾燥前応答が見られた Pentyl acetate 1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、500 μ M、1 mM の終濃度になるよう細胞に添加し、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した(Fig. 5A)。乾燥再水和後 1 時間において Pentyl acetate に対し濃度依存的に応答を示し、DMSO を添加した場合と比べ、10 μ M 以上で蛍光輝度変化率の有意な差が見られた。

これらの応答が乾燥保存されたタンパク質由来か、再生産されたらものか評価するために、第 2 章と同様に翻訳阻害剤 Cycloheximide (0.35mM)入りの培地で再水和を行なった。再水和 1 時間後に同様にリガンド応答アッセイを行なうと、Cycloheximide なしと同様 Pentyl acetate に対し濃度依存的に応答を示し、DMSO を添加した場合と比べ、10 μ M 以上で蛍光輝度変化率の有意な差が見られた(Fig. 5B)。

以上の結果より新たに樹立した Or47a-11G を用い、Or47a の乾燥保存に成功した。

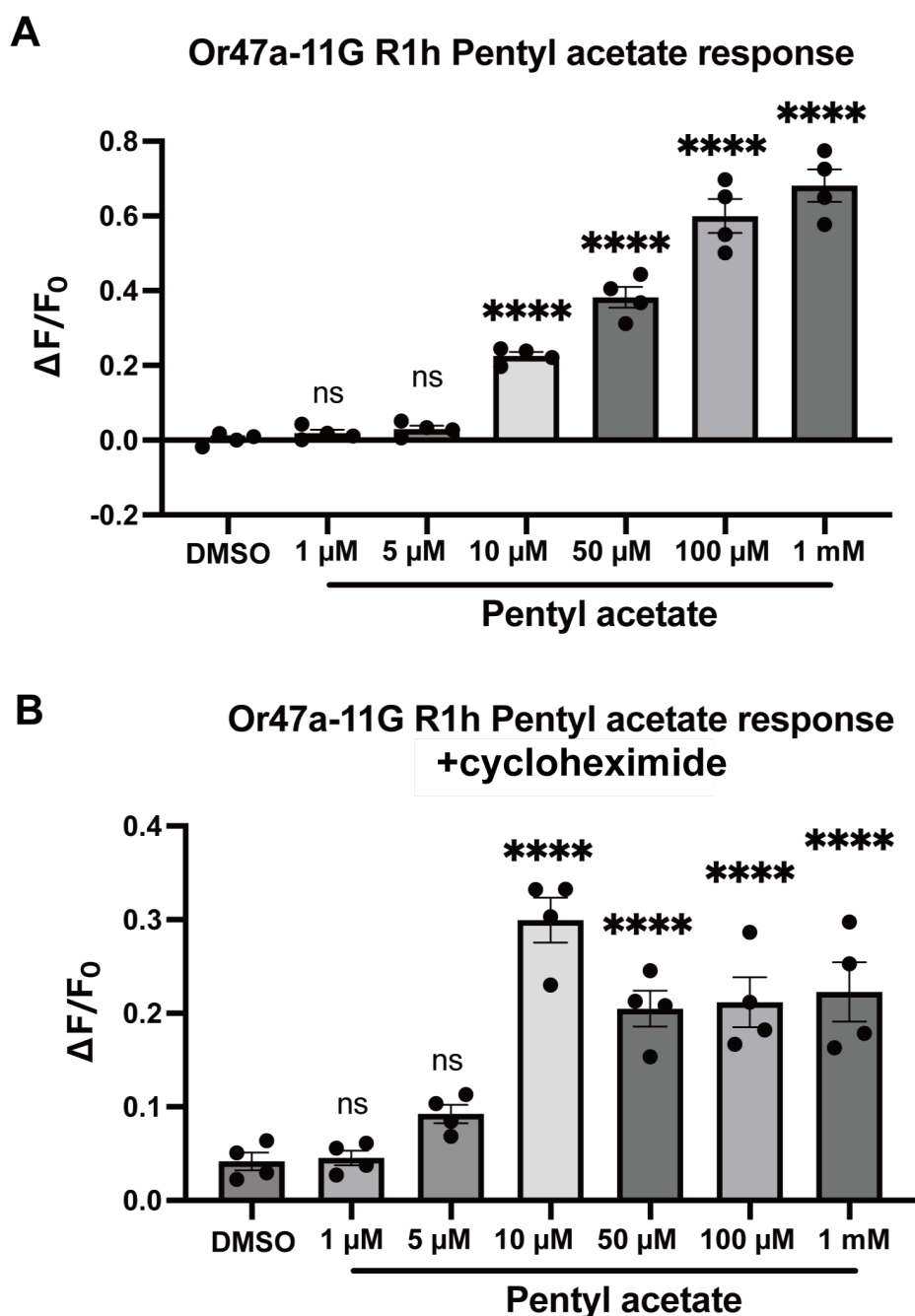


Fig. 5. Pv11 細胞における嗅覚受容体の乾燥耐性評価

(A) 樹立した Or47a-11G 細胞株に対し、乾燥処理を行い、再水和 1 時間後にリガンド応答アッセイを行なった。DMSO 0.5% (Pentyl acetate 0 μ M に相当)、Pentyl acetate 1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、500 μ M、1 mM の終濃度になるよう細胞に添加し、蛍光輝度変化率を求め応答を評価した。(B) 翻訳阻害剤 Cycloheximide (0.35 mM) を加えた培地で再水和を行い 1 時間後、同様のリガンド応答アッセイし、蛍光輝度変化率を算出した。グラフは mean \pm SEM で示し、ドットはそれぞれの値を示した (n=4)。P 値は < 0.0001 は****; 0.05 以上は "ns" (優位差なし) で表した。

考察

本研究結果より、乾燥再水和後 1 時間において Pentyl acetate に対し、濃度依存的に応答を示した。よって新たに樹立した Or47a-11G 細胞株を用い、Or47a の乾燥保存に成功した (Fig. 5)。第 2 章では Or47a の乾燥保存は出来なかったが、Pentyl acetate に強く応答する細胞株を樹立することで乾燥保存が可能になった。よって、仮説通り乾燥前の十分タンパク質を発現させることが重要だと示唆された。また本章で樹立した Or47a-11G 細胞株は Pentyl acetate 1 μM まで応答を示し、嗅覚受容体の特徴である濃度依存的に応答を示した (Fig. 4)。シグモイド曲線の結果より、他の培養細胞における嗅覚受容体発現系と比較すると、Sf21 細胞における Or13a の 1-octen-3-ol への応答は、 EC_{50} は 5 μM ほどであった (Termtanasombat *et al.* 2016)。HEK293 細胞における Or47a の Pentyl acetate に対する応答は、非常に強く EC_{50} は 2.22 μM であった (Zboray *et al.* 2023)。一方、別の報告では HEK293 細胞に Or47a を発現させて、Pentyl acetate に対する応答が 10 μM から 100 μM の間で急激に上昇した。第 2 章で樹立した Pv.00443-Or47a 細胞株の EC_{50} は 4.28 μM であり、本章で樹立した Or47a-11G 細胞株において EC_{50} は 17.1 μM だった。よって一般的によく用いられる他の培養細胞と同レベルの匂いセンサ細胞を樹立できたと考える。さらに本研究では乾燥保存を実現しており価値は大きいと考える。また HEK293 細胞において嗅覚受容体の評価系は GCaMP と Orco の融合タンパク質を利用しており、Pv11 細胞においてもそれを利用すれば、さらなるリガンド応答の向上が可能かもしれない (Zboray *et al.* 2023)。

嗅覚受容体は七回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞膜外に飛び出ている箇所が存在するが、乾燥保存可能ということはその部分も保護できていることになる。Pv11 細胞の膜保護メカニズムとして細胞内、細胞外のトレハロースがガラス化することによって保護されていると考えられている (Sakurai *et al.* 2008)。保護タンパク質の候補として LEA タンパク質が挙げられる。LEA タンパク質は溶液中では立体構造を取らないが、乾燥時に立体構造をとり、乾燥から細胞を保護することが知られている (Hong-Bo *et al.* 2005)。LEA タンパク質はネムリユスリカに 27 種類存在しているが、PvLEA1 のように細胞膜に局在するものも確認されている (Hatanaka *et al.* 2015)。さらに LIL タンパク質と呼ばれる膜貫通ドメインを持つ乾燥耐性関連遺伝子も発見された (Voronina *et al.* 2020)。これらの膜を保護していると予想される保護タンパク質のメカニズムは明らかになっていないが、本実験で樹立した細胞株が利用できるかもしれない。例えば PvLEA1 のような候補となる保護タンパク質を knock-out、もしくは knock-down することで、乾燥後の嗅覚受容体の活性が落ちれば、膜保護に関わっている可能性が示唆される。

また、UTR 配列の付加が嗅覚受容体の発現量向上に寄与した。結果より UTR 配列の付加により細胞膜輸送効率は上がらず、たんぱく質生産量そのものが向上していた。よって報告通り mRNA 安定性の向上や翻訳の促進が行われたと考えられる (Leppek *et al.* 2018)

(Mayr 2019)。本検討では細胞膜輸送効率の向上を目的に、膜タンパク質の UTR に絞って検討を行ったが、Pv11 細胞全遺伝子中でより高発現している遺伝子は数多くある。そのため、*g5495*-UTR より効果的な UTR 配列があると期待できる。一方、Codon optimization、signal peptide の付加は発現量の向上が見られなかった。Codon optimization は Or47a の発現が見られなくなってしまったことから、AT リッチに偏りすぎバランスが崩れてしまい、転写翻訳が正常にされなかったと考えられる。signal peptide に関しては、主に哺乳類細胞で多く検討がされており、昆虫細胞で機能する実績を持つシグナルペプチドがほとんどなかった。そのため、Pv11 細胞で働くシグナルペプチドを同定できれば、嗅覚受容体の発現向上に効果的かもしれない。

また、Or47a-11G 細胞株の 1 細胞ごとのリガンド応答アッセイの結果より、Pentyl acetate 濃度が上がると細胞全体が応答したが、応答の強弱はかなり見られた(Fig. 4)。この現象は Pv.00443-Or47a 細胞株でも VUAA1、Ionomycin において見られたことから、Pv11 細胞共通の現象であると考えられる。Or47a-11G、Pv.00443-Or47a いずれもモノクローナル細胞株として樹立したが、培養の過程で遺伝的背景は変化するため、細胞ごとの嗅覚受容体の発現量の違いが生まれたのかもしれない。もしくは細胞周期の違いによって、細胞ごとに嗅覚受容体の発現量が異なる可能性も考えられる。Pv11 細胞において細胞周期と嗅覚受容体の発現量に違いが見られるかについては検証が必要であるが、相関が見られた場合は細胞周期等の制御により細胞の性質を均一化できれば、応用利用に有効かもしれない。

Or47a-11G 細胞株で Or47a の乾燥保存ができた一方で、乾燥再水和後、Pentyl acetate に対する応答は蛍光輝度変化率の Max 値、検出限界ともに減少した(Fig. 3、Fig. 5)。よって Or47a-11G 細胞株においても、Orco、Or47a、GCaMP6f はある程度壊れてしまっていると考えられる。もしくは細胞蘇生率が 20%ほどであることから、応答を低く見積もってしまったことが考えられる。乾燥再水和後の蛍光輝度変化率は、蛍光画像から細胞をセグメンテーションし定量したが、死細胞でも GCaMP6f の蛍光輝度を保つ細胞もあり認識してしまう。よって生細胞のみリガンド応答を評価できれば改善が期待できる。PI、Hoechst の二重染色より、生細胞は判定できるが、再水和後の細胞を染色する必要があり簡便ではない。そこで、乾燥再水和後の細胞の明視野データを用い、生細胞と死細胞を学習させることができれば、明視野画像から生細胞のみを抽出できる様になり、簡便かつ正確に応答の評価ができるかもしれない。機械学習を用いたラベルフリー生細胞死細胞判定は多く研究されており、十分可能であると考えられる(Chen *et al.* 2016)。

嗅覚受容体の評価手法も重要だと考える。本検討では、嗅覚受容体の乾燥保存を実証したく、評価しやすい手法として GCaMP6f を利用した。一方細胞匂いセンサをコンパクトかつ持ち運びしやすくすることを目指し、細胞をセンサチップに接着させることで匂い応答を膜電位から評価する手法も用いられる(Terutsuki *et al.* 2018)。膜電位の評価であれば、センサチップ上の細胞全体の変化から評価可能であり、乾燥再水和後の細胞生存率が低い状態

でも評価が可能かもしれない。よって今後は機械学習やセンサチップなど異分野との連携が必要不可欠になると考える。

参考文献

- Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, Miller RL, Cheng CJ, Subramanian RR, Brown JM (2018) Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. *RNA Biol* 15:756-762. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1450054>
- Berkovits BD, Mayr C (2015) Alternative 3'-UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature* 522:363-367. <https://doi.org/10.1038/nature14321>
- Cao J, Novoa EM, Zhang Z, Chen WCW, Liu D, Choi GCG, Wong ASL, Wehrspaun C, Kellis M, Lu TK (2021) High-throughput 5'-UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nat Commun* 12:4138. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24436-7>
- Chen CL, Mahjoubfar A, Tai LC, Blaby IK, Huang A, Niazi KR, Jalali B (2016) Deep learning in label-free cell classification. *Sci Rep* 6:21471. <https://doi.org/10.1038/srep21471>
- Dvir S, Velten L, Sharon E, Zeevi D, Carey LB, Weinberger A, Segal E (2013) Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E2792-2801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222534110>
- Friedel P, Bregestovski P, Medina I (2013) Improved method for efficient imaging of intracellular Cl(-) with Cl-Sensor using conventional fluorescence setup. *Front Mol Neurosci* 6:7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00007>
- Hanson G, Collier J (2018) Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:20-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91>
- Hatanaka R, Gusev O, Cornette R, Shimura S, Kikuta S, Okada J, Okuda T, Kikawada T (2015) Diversity of the expression profiles of late embryogenesis abundant (LEA) protein encoding genes in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki*. *Planta* 242:451-459. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2284-6>
- Hong-Bo S, Zong-Suo L, Ming-An S (2005) LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 45:131-135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.017>
- Leppek K, Das R, Barna M (2018) Functional 5'-UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:158-174. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.103>

- Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Qian L, Liu J (2017) Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep* 7:2193. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>
- Mayr C (2019) What are 3' -UTRs doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034728>
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3:REVIEWS0004. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-3-reviews0004>
- Miyata Y, Tokumoto S, Arai T, Shaikhutdinov N, Deviatiiarov R, Fuse H, Gogoleva N, Garushyants S, Cherkasov A, Ryabova A, Gazizova G, Cornette R, Shagimardanova E, Gusev O, Kikawada T (2022) Identification of genomic safe harbors in the anhydrobiotic cell line, Pv11. *Genes (Basel)* 13. <https://doi.org/10.3390/genes13030406>
- Papapetrou EP, Schambach A (2016) Gene insertion into genomic safe harbors for human gene therapy. *Mol Ther* 24:678-684. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.38>
- Sakurai M, Furuki T, Akao K, Tanaka D, Nakahara Y, Kikawada T, Watanabe M, Okuda T (2008) Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5093-5098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706197105>
- Schulein R, Westendorf C, Krause G, Rosenthal W (2012) Functional significance of cleavable signal peptides of G protein-coupled receptors. *Eur J Cell Biol* 91:294-299. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.02.006>
- Shepard BD, Natarajan N, Protzko RJ, Acres OW, Pluznick JL (2013) A cleavable N-terminal signal peptide promotes widespread olfactory receptor surface expression in HEK293T cells. *PLoS One* 8:e68758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068758>
- Termtanasombat M, Mitsuno H, Misawa N, Yamahira S, Sakurai T, Yamaguchi S, Nagamune T, Kanzaki R (2016) Cell-based odorant sensor array for odor discrimination based on insect odorant receptors. *J Chem Ecol* 42:716-724. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0726-7>
- Terutsuki D, Mitsuno H, Sakurai T, Okamoto Y, Tixier-Mita A, Toshiyoshi H, Mita Y, Kanzaki R (2018) Increasing cell-device adherence using cultured insect cells for receptor-based biosensors. *R Soc Open Sci* 5:172366. <https://doi.org/10.1098/rsos.172366>
- Tessier DC, Thomas DY, Khouri HE, Laliberte F, Vernet T (1991) Enhanced secretion from insect

- cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98:177-183. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90171-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90171-7)
- Vicario S, Moriyama EN, Powell JR (2007) Codon usage in twelve species of *Drosophila*. *BMC Evol Biol* 7:226. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-226>
- Voronina TA, Nesmelov AA, Kondratyeva SA, Deviatiiarov RM, Miyata Y, Tokumoto S, Cornette R, Gusev OA, Kikawada T, Shagimardanova EI (2020) New group of transmembrane proteins associated with desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge *Polypedilum vanderplanki*. *Sci Rep* 10:11633. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68330-6>
- Yamada TG, Suetsugu Y, Deviatiiarov R, Gusev O, Cornette R, Nesmelov A, Hiroi N, Kikawada T, Funahashi A (2018) Transcriptome analysis of the anhydrobiotic cell line Pv11 infers the mechanism of desiccation tolerance and recovery. *Sci Rep* 8:17941. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36124-6>
- Yoshida Y, Shaikhutdinov N, Kozlova O, Itoh M, Tagami M, Murata M, Nishiyori-Sueki H, Kojima-Ishiyama M, Noma S, Cherkasov A, Gazizova G, Nasibullina A, Deviatiiarov R, Shagimardanova E, Ryabova A, Yamaguchi K, Bino T, Shigenobu S, Tokumoto S, Miyata Y, Cornette R, Yamada TG, Funahashi A, Tomita M, Gusev O, Kikawada T (2022) High quality genome assembly of the anhydrobiotic midge provides insights on a single chromosome-based emergence of extreme desiccation tolerance. *NAR Genom Bioinform* 4:lqac029. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqac029>
- Zboray K, Toth AV, Miskolczi TD, Pesti K, Casanova E, Kreidl E, Mike A, Szenes A, Sagi L, Lukacs P (2023) High-throughput ligand profile characterization in novel cell lines expressing seven heterologous insect olfactory receptors for the detection of volatile plant biomarkers. *Sci Rep* 13:21757. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47455-4>

総合考察

Pv11 細胞を利用した細胞匂いセンサの基盤技術構築を目指し、目標であったセンサチップ等への固定を目指した接着系の確立、匂い感知可能な嗅覚受容体安定発現細胞株の樹立に成功した。さらに樹立した嗅覚受容体安定発現細胞株を用いて嗅覚受容体の乾燥保存を達成した。本研究で樹立した Or47a-11G 細胞株は、乾燥保存可能な培養細胞でありながら、これまで報告があった、一般的によく使われる培養細胞と似たレベルの匂い応答を達成した。以上より Pv11 細胞を利用することで、実現の難易度が高い細胞匂いセンサに対し、常温乾燥保存という可能性を示すことができたと考えている。

一方で本研究において乾燥保存を達成できた嗅覚受容体は、Or47a 一種類のみである。Or47a が最も応答するリガンドは Pentyl acetate であるが、Butyl acetate など他の酢酸アルキルにも応答する (Mao *et al.* 2014; Zboray *et al.* 2023)。これらのリガンドに対する応答強度はそれぞれ異なるため、Or47a 一種類でも応答の強弱から、匂いの識別センサとして利用できるかもしれない。

GC-MS を用いて匂いの詳細な解析は可能であるし、匂いの単純な強い、弱い既存のガスセンサで評価可能である。そのため細胞匂いセンサの強みとして、複数の異なる嗅覚受容体をアレイ化することで、実際の嗅覚と同じように美味しさなど複雑な匂いを評価しうることだと考える。実際他の官能膜や半導体を用いた工学的センサも、膜の組成や用いる物質を変えアレイ化することによって、匂い応答の違いを評価する (Jeong *et al.* 2020; Minami *et al.* 2022)。そのため、Pv11 細胞においても使用できる嗅覚受容体の数を増やすことは必須である。しかしながら Pv11 細胞で Or13a、Or22a は機能が見られなかったことから、今後数多くの嗅覚受容体の機能スクリーニング、もしくは膜移行を助けるシャペロンやアクセサリタンパク質等を利用するなど更なる発現系改良の必要があるかもしれない。

さらに乾燥再水和後の嗅覚受容体の応答が実用に足るのか検討する必要がある、センサデバイスや機械学習の専門家との連携など、これまで以上に分野横断的に研究を行う必要があると考える。それにより将来的には Pv11 細胞を用いた、細胞匂いセンサの実現を期待する。

参考文献

- Jeong SY, Kim JS, Lee JH (2020) Rational design of semiconductor-based chemiresistors and their libraries for next-generation artificial olfaction. *Adv Mater* 32:e2002075. <https://doi.org/10.1002/adma.202002075>
- Mao X, Ma Q, Zhou C, Chen X, Zhang H, Yang J, Mao F, Lai W, Xu Y (2014) DOOR 2.0: presenting operons and their functions through dynamic and integrated views. *Nucleic Acids Res* 42:D654-659. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1048>
- Minami K, Imamura G, Tamura R, Shiba K, Yoshikawa G (2022) Recent advances in nanomechanical membrane-type surface stress sensors towards artificial olfaction. *Biosensors (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/bios12090762>
- Zboray K, Toth AV, Miskolczi TD, Pesti K, Casanova E, Kreidl E, Mike A, Szenes A, Sagi L, Lukacs P (2023) High-throughput ligand profile characterization in novel cell lines expressing seven heterologous insect olfactory receptors for the detection of volatile plant biomarkers. *Sci Rep* 13:21757. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47455-4>

謝辞

本研究は、農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 黄川田研究室にて行われました。

大学院修士課程から博士課程における長い期間、多くの方々からご支援・ご指導を賜りました。本博士論文は次の方々の協力があって完成されたもので、深く感謝いたします。

指導教員である黄川田先生、共同研究グループの宮田佑吾博士、コルネット・リチャー博士、志村幸子博士、オレグ・グセフ博士には、日々の研究生活の中で度重なるディスカッションをしていただきました。博士課程の先輩である徳本さん、研究員として加入した吉田さんは年齢が近いこともあり、実験指導だけでなく、学生生活のアドバイスもたくさんいただきました。白鳥朋枝様、喜久里友紀様、斎藤陽子様には実験のサポートだけでなく、より良い毎日を送る上での心構えを教えていただきました。

また、ここには挙げきれないほど、たくさんの方々のおかげで、実りある研究生活を送ることができました。ここに感謝いたします。