

# 昆虫嗅覚受容体を発現する培養細胞と電界効果トランジスタを融合した匂いセンサの開発

FET-based bio-hybrid odorant sensor using insect cells expressing insect odorant receptors

2167006



研究代表者

東京大学 先端科学技術研究  
センター

特任研究員

照月 大悟

(助成受領時：東京大学大学院 工学系研究科 先端学際工学専攻)

## [研究の目的]

近年、セキュリティ分野やヘルスケア分野において、高感度に様々な匂い物質をリアルタイムで検出する技術へのニーズが急速に高まっている。工学技術に基づく匂いセンサの開発が進められているが、その検出感度や選択性など改善すべき点は多い [Arshak et al., 2004]。一方で、生体の嗅覚系を利用したセンサ技術が進展し、昆虫の優れた嗅覚機能を利用した匂いセンサに注目が集まっている。昆虫の嗅覚機能は、嗅覚受容体 (Odorant receptor: OR) と呼ばれる膜タンパク質が担っている。昆虫嗅覚受容体は哺乳類のそれとは異なり、非選択的に陽イオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  など) を透過するイオンチャネル型受容体として機能し [Sato et al., 2008], 匂い物質の結合から数 10 ミリ秒もの速さで陽イオンを透過する。これらの機能を昆虫由来の培養細胞 (Sf21 細胞) に再構築した「センサ細胞」(図 1) は、高性能な匂いセンサ素子開発にとって有望である [Mitsuno et al., 2015]。しかし、現在のセンサ細胞の匂い応答検出はカルシウムインジケータ (GCaMP6s) を用いた光学イメージングであり、昆虫嗅覚受容体が本来持つ高感度性やリアルタイム性を十分に活用していない。また、計測には大型の蛍光顕微鏡が必要であり、センサの実用化の際に小型化が課題となる。センサ細胞に発現した昆虫嗅覚受

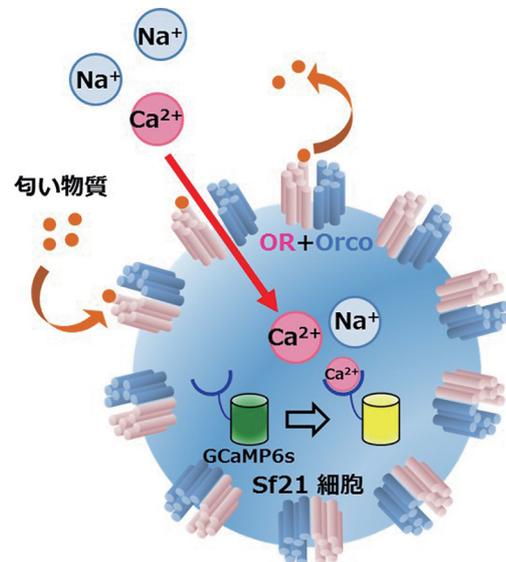


図 1 センサ細胞の模式図

容体は、匂い応答時に細胞内へ陽イオンを流入させることを述べたが、これは電気的変化が生じていることを意味する。そこで本研究では、センサ細胞と電界効果トランジスタ (Field-effect transistor: FET) デバイスを融合し、センサ細胞の匂い応答を電気的に検出可能な FET ベースのバイオハイブリッド匂いセンサの開発を目的とした。

## [研究の内容, 成果]

### 1. FET デバイスの設計

本研究では、「センサ細胞を容易に検出部に

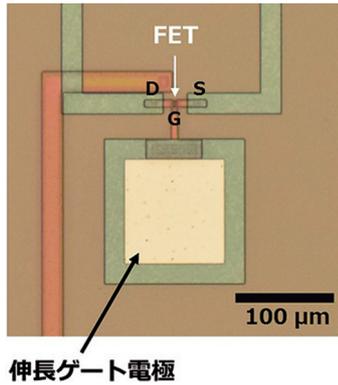


図2 設計した伸長ゲート型 FET デバイス

播種可能であり、「嗅覚受容体の微小な匂い応答を電氣的に検出可能」である FET デバイスの設計を行った。センサ細胞は神経軸索で見られるアクションポテンシャルを発生しないため、昆虫嗅覚受容体由来の微小な電気信号を検出する必要性が想定された。また、応答検出のためにはセンサ細胞を検出部に適切に播種する必要がある。そこで、複数のセンサ細胞が播種可能な伸長ゲート型 FET を設計した。また、FET ベースのバイオセンサでは、電流検出型の方が感度に優れると言われているため、FET のドレイン電流の変化を検出する方式を採用した。設計した伸長ゲート型 FET の写真を図 2 に示す。伸長ゲート電極のサイズは  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  であり、表面にはアルミナ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) をスパッタリングした。FET のゲートサイズは長さ  $2 \mu\text{m}$ 、幅  $5 \mu\text{m}$  である。伸長ゲート型 FET を使用することで、複数のセンサ細胞から信号を検出できるため、信号強度の増大が期待でき、自然接着によっても確実に細胞が播種可能となる。

## 2. FET デバイスを用いたセンサ細胞の応答検出

設計した FET デバイスによる応答検出には、カイコガの性フェロモンの 1 つであるボンビカール (Bombykal: BAL) を検出可能な BmOR3 を発現させたセンサ細胞 (BmOR3 発現細胞) と、カビ臭の 1 つである 1-octen-3-ol を検出可能なキロシヨウジョウバエの嗅覚受

容体である Or13a を発現させたセンサ細胞 (Or13a 発現細胞) を使用した。匂い物質は難水溶性であるため、有機溶媒であるジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide: DMSO) に溶解した。BmOR3 発現細胞を刺激する匂い物質には、受容体が応答するフェロモンである BAL と応答しないフェロモンであるボンビコール (Bombykol: BOL) を使用した。Or13a 発現細胞に対しては、BAL と 1-octen-3-ol を使用した。匂い刺激の際には、ペリスタルティックポンプを用いて 1% 以下の DMSO を含有するアッセイバッファ溶液を流量約  $140 \mu\text{l}/\text{min}$  で灌流した。各匂い物質の刺激時間は約 120 秒である。液中で FET を駆動させるため、市販の Ag/AgCl 参照電極を用いてゲート電圧を印加し、ソースメジャーユニットを用いて応答検出を行った。

## 3. 電気計測結果

BmOR3 発現細胞に対して、アッセイバッファ溶液 (DMSO < 1%, コントロール)  $\Rightarrow$   $30 \mu\text{M}$  BOL  $\Rightarrow$   $30 \mu\text{M}$  BAL の順番に匂い刺激を実施した。

結果として、 $30 \mu\text{M}$  BOL の刺激ではドレイン電流の変化は検出されず、 $30 \mu\text{M}$  BAL の刺激によってドレイン電流の上昇を検出した (図 3)。次に、Or13a 発現細胞に対して、アッセイバッファ溶液 (DMSO < 1%, コントロール)  $\Rightarrow$   $30 \mu\text{M}$  BAL  $\Rightarrow$   $30 \mu\text{M}$  1-octen-3-ol の順番に匂い刺激を実施した。その結果、BAL では変化がなく、1-octen-3-ol の刺激によってドレイン電流の上昇を検出した (図 4)。この結果は、先行研究の蛍光顕微鏡を用いたカルシウムイ

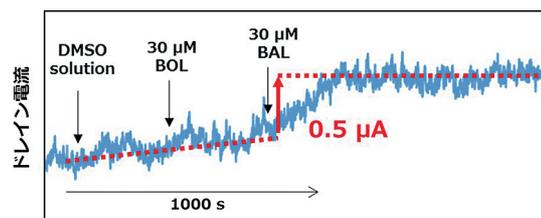


図3 BmOR3 発現細胞の応答検出結果  
[3] より修正して使用。

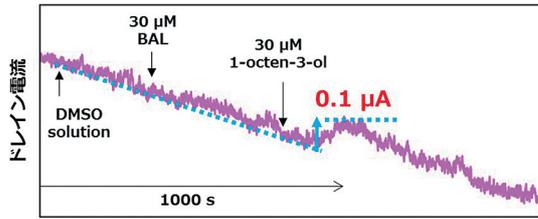


図4 Or13a 発現細胞の応答検出結果  
[3] より修正して使用。

メーキングの選択性と一致しており、センサ細胞の匂い応答をFETデバイスによって電氣的に検出することに成功した。

#### 4. デバイス上のセンサ細胞観察

接着状態のSf21細胞の観察はほとんど実施されていないため、伸長ゲート電極上に接着したセンサ細胞を走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) によって観察し、その接着状態の解明を試みた。まず、センサ細胞の鳥瞰的観察を実施し、BmOR3発現細胞が伸長ゲート電極上に形状変化などを起こさずに接着していることを確認した(図5)。次に、クロスセクションポリリッシャによって高精度なセンサ細胞-デバイス接着界面の断面試料を作成し、SEM観察と画像分析を実施した。その結果、同一電極上に接着した2つのBmOR3発現細胞と $\text{Al}_2\text{O}_3$ 膜の接着距離は $10.3 \pm 0.5 \text{ nm}$ であった。通常細胞はfocal adhesion (接着斑)によって基板と接着することが知られており[Burridge et al., 1988], 10-100 nm程度の間隙が細胞とデバイスの間に存在する[Wrobel et al., 2008]。一方で、センサ細胞の接着距離は先行研究で報告された他種の細胞より明確に短く、センサ細胞に用いるSf21細胞は電気計測に有利な電極への密着が可能であることが示唆された。

#### 5. Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET)

本研究の検出結果より、Odor-Sensitive Field Effect Transistor (OSFET, オスフェット) という新しいバイオハイブリッド匂いセン

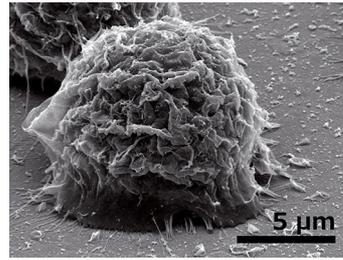


図5  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 伸長ゲート電極上に接着したBmOR3発現細胞の鳥瞰SEM写真  
[1] より修正して使用。

サを提案する。OSFETの模式図を図6に示す。OSFETは、センサ細胞とFETを電氣的に結合した検出部を持ち、この検出部で細胞内電荷の変化を検出し、FETにより電流に置換するデバイスである。OSFETは、センサ細胞の匂い応答をFETのドレイン電流変化として検出可能である。

#### 6. まとめ

本研究では、昆虫嗅覚受容体を発現した昆虫由来の培養細胞(センサ細胞)の匂い応答を電氣的に検出する伸長ゲート型FETデバイスを設計した。応答検出結果は過去の蛍光計測の選択性と一致することを確認し、確立した匂いセンサはOSFETとして提案した。また、センサ細胞とデバイス間の接着界面をSEM観察と画像分析によって明らかにした。この分析より、昆虫嗅覚受容体を発現したSf21細胞は、他種の細胞で報告されているfocal adhesionとは異なるメカニズムで電極上に接着し、電気計測に有利な短距離での密着が可能であることが示唆された。

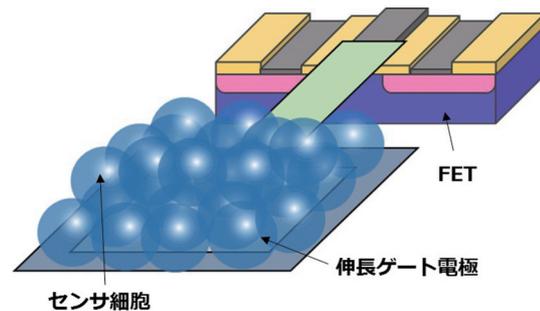


図6 OSFETの模式図

## [今後の研究の方向, 課題]

エレクトロニクスをベースとするバイオセンサ技術では、デバイスの検出信頼性が常に議論の対象となっている。今後は、OSFETの検出信頼性を向上させるため、インターフェースの最適化を実施する必要がある。具体的には、現時点で明確になっていない、センサ細胞の応答がFETに伝達するメカニズムの解明と、細胞とデバイスの適切な接着条件・細胞数の検討を行うことが挙げられる。

## [成果の発表, 論文等]

## 論文

- [1] **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Yuki Okamoto, Agnès Tixier-Mita, Hiroshi Toshiyoshi, Yoshio Mita, and Ryohei Kanzaki, "Increasing cell-device adherence using cultured insect cells for receptor-based biosensors", *R. Soc. open sci.*, 5, 172366, 2018.

## 国際学会

- [2] **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Takeshi Sakurai, Yuki Okamoto, Agnès Tixier-Mita, Hiroshi Toshiyoshi, Yoshio Mita, and Ryohei Kanzaki, "Cell-sensor interface analysis of a bio-hybrid electric odorant sensor," in *Biosensors 2018*, Miami, Florida, USA, 12-15 June 2018.
- [3] **Daigo Terutsuki**, Hidefumi Mitsuno, Yuki Okamoto, Takeshi Sakurai, Agnes Tixier-Mita, Hiroshi Toshiyoshi, Yoshio Mita, and Ryohei Kanzaki, "Odor-sensitive field effect transistor (OSFET) based on insect cells expressing insect odorant receptors," in *Proc. 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical*

*Systems (MEMS 2017)*, Las Vegas, NV, USA, pp. 394-397, 22-26 January 2017.

## 国内学会・シンポジウム

- [4] **照月大悟**, "昆虫嗅覚受容体を用いた細胞-FETハイブリッド匂いセンサの開発", 2017 国立大学フェスタ, 微細加工・微細構造解析プラットフォーム公開セミナー, 東京, 2017年11月. (招待講演)
- [5] **照月大悟**, "Extended-gate ISFETと昆虫嗅覚受容体発現細胞を融合した匂いバイオセンサ", VDEC デザイナーズフォーラム, 福岡, 2017年9月.
- [6] **照月大悟**, 光野秀文, 岡本有貴, 櫻井健志, テイクシェ三田アニエス, 年吉洋, 三田吉郎, 神崎亮平, "An ISFET-based bio-hybrid odorant sensor using insect cells expressing insect odorant receptors", 第17回 東京大学生命科学シンポジウム (BIO UT), 東京, 2017年4月.

## 特許

- [7] 神崎亮平, 光野秀文, **照月大悟**, 櫻井健志, テイクシェ三田アニエス, 三田吉郎, 年吉洋, 岡本有貴, "匂いセンサ," PCT 出願 PCT/JP2018/001284, 出願日 2018年1月17日.
- [8] **照月大悟**, 神崎亮平, 光野秀文, 櫻井健志, テイクシェ三田アニエス, 三田吉郎, 岡本有貴, 年吉洋, "匂いセンサ," 特願 2017-080896, 出願日 2017年4月14日.

## 受賞

- [9] 第32回「独創性を拓く 先端技術大賞」文部科学大臣賞 (学生部門最優秀賞), 昆虫テクノロジーと工学の融合が拓くりビングデバイス—昆虫嗅覚受容体発現細胞と FET を融合したバイオハイブリッド匂いセンサー, フジサンケイビジネスアイ, 2018年7月11日.
- [10] VDEC デザインアワード嘱望賞, VDEC デザイナーズフォーラム, 2017.
- [11] IEEE MEMS Student Travel Grant, Transducer Research Foundation, USA, 2017.