匂いセンサーマイクロチップの開発 2

匂いセンサーマイクロチップの開発 2

著者	岩佐　達郎, 大田　健吾, 竹内　義和, 高島　大貴, 高橋　司
雑誌名	サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー年報
巻	5
ページ	57-58
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10258/378

3）学内公募研究報告

匂いセンサーマイクロチップの開発－Ⅱ

室蘭工業大学・材料物性工学科　　岩佐達郎、大田健吾、竹内義和、高島大貴、高橋　司

人はおよそ３０万種類の香り、「匂い」を区別することができると言われている．しかし、現在のところ、それらの違いを数値化したり、定量的に評価することは難しい。又、個人差のあることも知られているが、その個人差を表現することも困難である。そこで、色々の「匂い」を定量的にマッピングし、一目で「匂い」の種類の違いを示すことの出来るセンサーチップが開発できれば、それによって、「匂い」の種類の違いや、個人的な「匂い」感受性の違いなどを数値化して示すことができると期待される。

本研究では、「匂い」の多様性を生物学的な観点から検討し、それを定量的に表現できるようなセンサーチップの開発を目指している。昨年度から、生理学的研究の進んでいるイモリを用いて、嗅上皮のcDNAライブラリーの作成、そのEST解析を行ってきたが、本年度は嗅覚受容体タンパク質遺伝子のクローニングを行った。

匂い受容と「感性」匂いセンサーチップ

動物の鼻の奥にある鼻腔には嗅上皮と呼ばれる組織があり、そこには嗅細胞が数多く存在する。本研究で注目している嗅覚受容体は、嗅細胞の嗅繊毛に局在し、7回膜貫通型の分子構造をとる（図１）。匂いの知覚というのは、この嗅覚受容体が外部から入ってきた匂い物質を受容するところから始まる。この際に起こる反応が電気信号に変換され脳に伝わり、匂いとして認識されるまでの過程を総称し、「嗅覚」と呼ぶ。嗅覚受容体は「嗅覚の入口」であるが、ある嗅覚受容体がどのような匂い物質を受容するのかなど、その分子機能の詳細が明らかにされていない問題が数多く残されている。

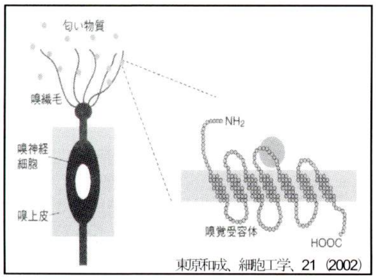

図１．嗅上皮にある嗅神経細胞（左）と嗅繊毛膜にある嗅覚受容体タンパク質（右）

「匂い」感覚は嗅上皮の嗅覚受容体の出力パターンが嗅球の糸球体にあるパターンとして反映される。このパターンを中枢が認識し、ある匂い感覚と結び付けられるものと考えられる（図２．上）。つまり、ある匂い分子と中枢での射影パターン、中枢でのパターンと匂い感覚との関係（感性？）とが、明らかになれば、匂い情報の電子化も可能になると考えられる。ここで「匂いセンサーマイクロチップ」により両者の関係を明らかにしようと考えている（図２．下）。より人の感性に近付けるように、この匂いセンサーマイクロチップには動物由来の嗅覚受容体をセンサーとして用いることを試みる。何種類かの嗅覚受容体タンパク質分子（またはその誘導体）と「匂い」分子との相互作用を高感度で検出し、それとヒトの感覚的表現とを結びつければ、種々の多様な「匂い」感覚の定量的な表現が出来るのでは、と考えられる。また、種々の嗅覚受容体と匂い分子との相互作用を検出するには表面プラズモン共鳴を利用することを計画している。

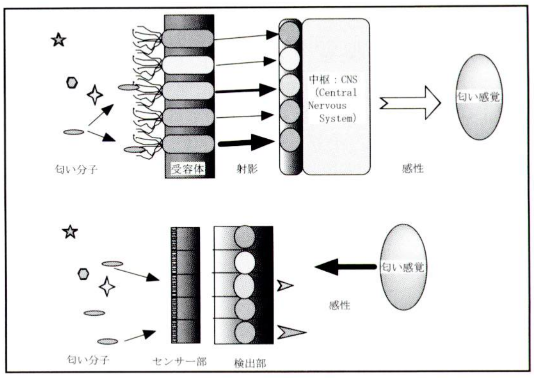

図２．生体での匂い感覚（上）と匂いセンサーによる匂い分子と匂い感覚の関連付け（下）

EST解析の現状

現在までに480クローンの解析を行った。得られた配列の相同性から遺伝子タンパク質の役割を予測し、まとめたものが以下のグラフになる（図３）。全く既知配列と相同性を示さなかったもの（no hit）と、相同性の低かったもので全体の50パーセント以上を占めている。これらの内、嗅覚情報の受容・伝達に関わるタンパク質として、No. 441；嗅覚受容体、No. 102；電位依存性陰イオンチャネル、No. 75、105、122、175、276、301、313、327、333、341；嗅覚特異的タンパク質などが得られた。

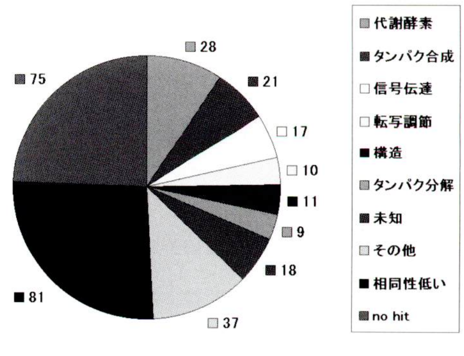

図３．EST解析の現状でのまとめ

マウスの嗅覚受容体と高い相同性を示したNo.441遺伝子の全長配列の決定について報告する。

試料441遺伝子全長配列の決定

試料441遺伝子の全長配列を決定したところ、308アミノ酸からなるタンパク質遺伝子cDNAであることがわかった。このタンパク質がどのようなものであるかを知るために、その親水性・疎水性を調べてみた。嗅覚受容体は7回膜貫通型の構造を取ることが予想されている。試料441遺伝子から予測されるアミノ酸配列のハイドロパシープロットを作成した。その結果、図4のように試料441遺伝子は7回膜貫通型構造を取るタンパク質のものであると結論できた。

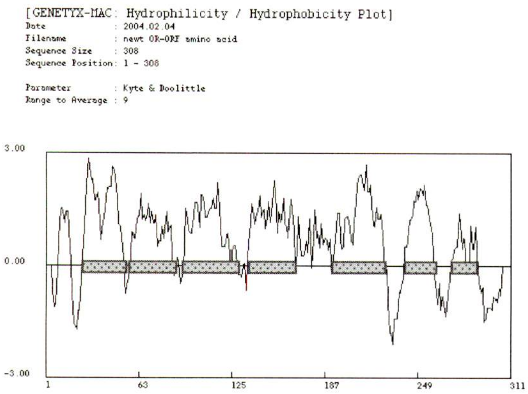

図4．441タンパク質のハイドロパシープロット。図の横軸は、アミノ酸番号をN末側から示している。縦軸は疎水性を表し、上側は疎水性で、下側は親水性であることを示している。図中横棒部分が膜貫通部分と予測される。

PCR（遺伝子増幅）法を利用した嗅覚受容体類似遺伝子断片の増幅

EST解析からは予想されたほど嗅覚受容体遺伝子が得られてこなかったので、PCR法を用いることを考えた。嗅覚受容体はそのアミノ酸配列の相同性により、Class I（水性の匂い物質を受容すると考えられている）とClass II（空気中の匂い物質を受容すると考えられている）に分けられている。そこで、Class I、Class IIに属する嗅覚受容体遺伝子のアミノ酸配列を比較し、それらの間で保存されたアミノ酸配列から遺伝子増幅用のプライマーを作製した（図5）。そして、PCR法により2つのプライマーの間に相当するイモリの嗅覚受容体遺伝子を増幅した。この際、非特異的な増幅を避けるため、二本鎖形成温度を検討し、PCRを2回行うNested PCR法をとった。

図5．アフリカツメガエル嗅覚受容体Class I（上部3種）とClass II（下部6種）のアミノ酸配列の比較。PCRプライマー作成部位を囲んで示した。Nested PCRを行うため、各Classに対して2本のプライマーを作成した。

その結果、5種類のイモリ嗅覚受容体遺伝子の増幅に成功した。その中の試料II-2-14については、その遺伝子の全長配列を決定した。

今回得られた嗅覚受容体類似遺伝子断片を既知の嗅覚受容体のアミノ酸配列と比較し、分子系統樹を作製したところ（図6）、3種はClass IIに属していると判断した。1種はクラスの帰属が不明である。両生類であるイモリは陸と水中の両方を行き来して生活している。この点からも、今回得られた嗅覚受容体遺伝子は、空気中の匂い物質を受容するものだと思われる。しかし、水性の匂い物質を受容すると考えられているClass Iに属する嗅覚受容体遺伝子は今のところ得られておらず、今後の課題である。

今後更にEST解析を続けると供に、全長を決定した嗅覚受容体のタンパク質を発現し、その生理機能の解明を進めたい。

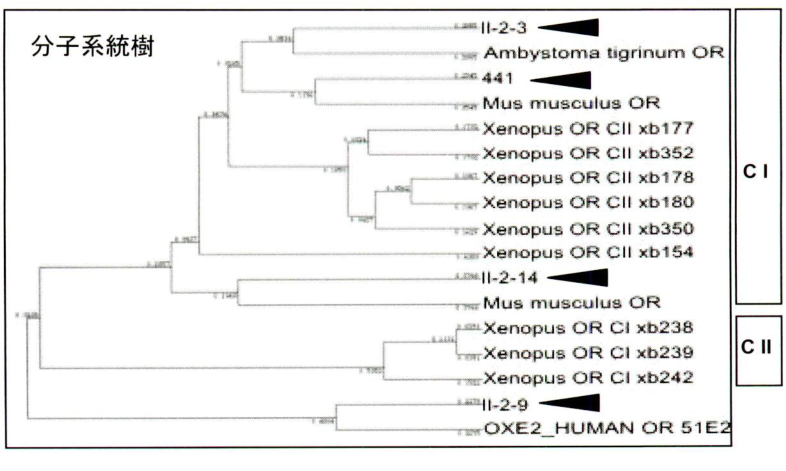

図6．今回得られたイモリ嗅覚受容体と既知の嗅覚受容体遺伝子から作成した分子系統樹。分子系統樹作成にはGenetyx MacのUPGMAソフトを用いた。今回得られたものは矢頭で指示した。Class IとClass IIの別は図右側に記載した。最下部にあるII-2-9については今のところ帰属を決定できていない。