

宇理須恒雄

分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域 教授

光神経電子集積回路開発と機能解析・応用

§1. 研究実施の概要

代表者グループが世界に先駆けて開発した培養型プレーナーパッチクランプ技術を基盤とする、世界初の神経細胞ネットワーク素子の製作と応用を目指して進めた。22 年度は“素子の実用化”実現に必要な技術課題の解決に重点を置き、安定電極の開発、マイクロ流路による細胞配列制御技術開発、多チャンネル化技術開発、電流計測用集積電子回路開発、高効率光感受性イオンチャンネルの開発、マウス脳神経細胞の自己機能化制御を重点的に進めた。特に、(1)従来パッチクランプ電流計測の成功確率を落としている原因が、電極が励起光に応答することおよび電極と計測溶液との界面電位変動にあることを見だしこの問題を解決した電極開発に成功した。また、(2)マイクロ流路技術について、両面ホットエンボスに必要な電鑄モールド製作と、その後の Deep Xray Lithography (DXL)による微細貫通孔形成に必要な高精度X線露光マスクの製作に見通しを得た。さらに(3)高効率型および緑色光応答型のイオンチャンネル開発とそのクロージングに成功するなど、その重要性にも係わらず世界に例の無い神経細胞ハイスループットスクリーニング素子実現に大きな重要な前進を得た。これらの成果をもとに、名大医学部の研究者との交流も経て応用の目標を“神経細胞ハイスループットスクリーニング素子”により一層明確化できた。

§2. 研究実施体制

(1)「宇理須」グループ(分子科学研究所)

- ① 研究分担グループ長:宇理須恒雄 (分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域、教授)
- ② 研究項目
 - ・多点計測素子開発
 - ・ChR2 とHR の高効率化(古谷准教授が担当)
 - ・神経細胞の自己機能化制御と機能計測(深澤グループと共同)

(2)「石塚」グループ(東北大学)

① 研究分担グループ長:石塚 徹 (東北大学大学院生命科学研究科、講師)

② 研究項目

・変異体ChR2,HR の開発

(3)「深澤」グループ(生理学研究所)

①研究分担グループ長:深澤有吾 (生理学研究所、助教)

②研究項目

・神経回路網の解剖学的解析と自己機能化制御

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

A 多点計測素子開発

これまで行なってきたマイクロコンタクト印刷法は技術的に素人には容易でなくまた、高価な位置合わせ装置を必要とすることから、実用性に欠けると判断し、素子製造側がすべての負担を負うマイクロ流路方式を採用する方針とし、其の技術開発を進め、Si-SOI 基板で素子基板表面に電極部との位置合わせを行なって所定のマイクロ流路を形成し、流路の所定の位置に細胞を単一細胞レベルで設置する技術を開発した。さらに、多チャンネル化にむけて、上部にマイクロ流路を下部に電極とピペット液のウエルを形成する両面ホットエンボス技術開発を進めた。上部のマイクロ流路のマスターをSi 基板表面のポジ型のホトレジストパターンとして制作し、さらに電鍍によりNiモールドを完成し、エンボスによるPMMA基板のマイクロ流路製作に成功した。このマイクロ流路上での神経細胞の培養とCaイメージングに着手した。昨年度開発した下部ウエル構造形成のモールドとの位置合わせが重要な技術課題で、そのためのエンボス装置の改造を完了した。さらに素子製作の最終段階として基板への微細貫通孔形成が必須で、現在進めている4チャンネル素子では、FIB による形成と、DXL による形成、との両手法を平行してすすめた。前者はチャンネル数が少ない場合製作時間が短いというメリットがあり、後者は、チャンネル数の増大とともにメリットが増えるという特徴がある。この孔あけ工程で最も重要な技術課題は、マイクロ流路内の径30 μ m前後の細胞設置場所に位置を合わせて形成することで、其の条件を満たした(ポリイミドメンブレンに金膜のパターンを形成した)、X 線マスクの製作に見通しを立てた。また、DXLにおける位置合わせ装置を完成した。

澤田チームとの共同研究: イオンチャンネル電流計測用の小型増幅器回路を澤田チームと協力して設計し、製作した。単一チャンネルでHEK293にChR2を発現し、レーザー励起での信号検出に成功した。

B. 変異体ChR2,HR の開発と高効率化

緑藻類の光感受性イオンチャンネル・チャンネルロドプシンの構造-機能連関を解析することで、緑色光に対して高い感受性を持ち、光電変換効率に優れた改変型チャンネルロドプシン、チャンネルロドプシン・グリーンレシーバー (ChRGR) を世界に先駆けて作出した[B-1]。シンドビスウイルスベクターを用いてChRGR をマウス大脳皮質運動野のニューロンに組み込み、緑色LED 光を0.1-100 Hz の周波数を連続的に変化させながら振動するパターンで麻酔したマウスの脳表面に照射したところ、運動野の局所フィールド電位の3-10 Hz の周波数成分が増大したことなどから、緑色LED 光で駆動された小数のニューロンの活動が再帰性ネットワークの創発的な活動レベルを亢進させたことが示唆される。この研究成果により、光を用いてニューロンを駆動する技術の精度が飛躍的に向上した。脳スライス培養やニワトリ胚毛様体神経節杯状シナプス前終末といったin vitro のニューロンのみならず、in vivo でのニューロンにおいても目的とするニューロンを

選択的に固有の発火パターンで駆動させることで、効率よく外部から信号を入力することが可能になった。

ChR2 とHR の光誘起赤外差スペクトルを時分割計測し、野生型および改変型における光誘起構造変化を比較解析することで、チャンネルの開閉、イオン透過に重要なアミノ酸残基の構造変化を明らかにし、高効率なChR2 やHR の開発の指針を与えることを目的として研究を進めた。平成22年度は赤外分光の測定に供することのできる大量発現、精製の技術の立ち上げを進めた。HR の塩化物イオン輸送機構を解明するために光誘起時間分解赤外分光計測を行った。タンパク質骨格の主鎖N-H 基に由来するamide A モードから、塩化物イオン取り込みと放出の過程で特徴的なスペクトル変化を観測した。Br⁻、NO₃⁻等との同様な計測によりamide A の信号にアニオン種依存性があることを見いだした。

C. 神経回路網の解剖学的解析と自己機能化制御・機能計測

光電子集積回路の形成に使用できる神経細胞の樹立を目指して、石塚グループが作出した光によるイオン透過性がより向上したFR 型チャンネルロドプシン(ChRFR)と細胞種特異的な遺伝子発現制御が可能なプロモーターを利用して遺伝子改変マウスの作製を行った。更に、ウイルスによる遺伝子導入でChRFRを興奮性神経細胞で発現させることが出来るCaMKII 遺伝子プロモーターを利用したChRFR 発現レンチウイルスの作製も行い、野生型マウスより調製した初代培養神経細胞系でも興奮性神経細胞特異的にChRFR を発現させられるようにした。

抑制性シナプス伝達を担うイオン透過型GABA受容体の海馬錐体細胞の局在を明らかにし[C-3]、痛覚刺激により形成される負の情動記憶を支える神経回路[C-4]と睡眠覚醒サイクルの調節に関与する神経回路[C-6]についても解析を行い発表した。シナプス形成機構に関する研究も行い、Neurexin-Cbln1-Neurologin複合体がシナプスの形成と維持に働いていることを明らかにした[C-7]。さらに、成熟した神経細胞の周期的活動を支える分子メカニズムに関しても研究を進め、T型電位依存性カルシウムチャンネルの1つであるalpha1Gsubunitの脳内局在と神経細胞膜上の分布を明らかにした[C-5]。

光神経電子集積回路上の神経細胞ネットワークの特徴を解剖学的に解析する目的で、細胞種や各細胞種の機能ドメイン(シナプスや軸索)を特異的に可視化する特異的抗体を用いた免疫細胞染色の解析系を立ち上げた。具体的には神経細胞種を同定するために、抑制性神経細胞で特異的に発現するグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、グリア細胞特異的グルタミン酸トランスポーター、シナプス後に発現するAMPA型グルタミン酸受容体、軸索に存在する微小管関連タンパク質等に対する特異抗体を用いて抗体染色を行い、この手法で形成された神経回路を評価できることを確認した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

A. 多点計測素子開発

(宇理須グループ)

A-1. Tingchao He, Changshun Wang, Tsuneo Urisu, Takeshi Nagahiro, Ryugo Tero, Rong Xia, "The PDMS-based microfluidic channel fabricated by synchrotron radiation stimulated etching", *Optics Express*, 18 (2010) 9733 – 9738.

B. 変異体ChR2,HR の開発と高効率化

(石塚グループ)

B-1. Lei Wen, Hongxia Wang, Saki Tanimoto, Ryo Egawa, Yoshiya Matsuzaka, Hajime Mushiake, Toru Ishizuka and Hiromu Yawo, "Opto-current-clamp actuation of cortical neurons using a strategically designed channelrhodopsin", *PLoS ONE*, vol. 5, No. 9, pp. e12893, 2010 (DOI: 10.1371/journal.pone.0012893)

B-2 Jun Yokose, Toru Ishizuka, Takeshi Yoshida, Jun Aoki, Yoshio Koyanagi and Hiromu Yawo, "Lineage analysis of newly generated neurons in organotypic culture of rat hippocampus", *Neuroscience Research*, vol 69, No. 3, pp. 223-233, 2011 (DOI: 10.1016/j.neures.2010.11.010)

C. 神経回路網の解剖学的解析と自己機能化制御・機能計測

(宇理須グループ)

C-1. Zhiguo Shang, Yanli Mao, Ryugo Tero, Tyuji Hoshino, Motohiko Tanaka, Tsuneo Urisu, "Clustering effects of GM1 and formation mechanisms of interdigitated liquid disordered domains in GM1/SM/CHOL-supported planar bilayers on mica surface", *Chem. Phys. Lett.* (doi:10.1016/j.cplett.2010.07.071)

C-2. Yanli Mao, Zhiguo Shang, Yosuke Imai, Tyuji Hoshino, Ryugo Tero, Motohiko Tanaka, Naoki Yamamoto, Katsuhiko Yanagisawa, Tsuneo Urisu, "Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerate A β oligomerization", *BBA Biomembranes*, 1798 (2010) 1090-1099.
(doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.003)

(深澤グループ)

C-3. Yu Kasugai, Jerome D. Swinny, David B Roberts, Yannis Dalezios, Yugo Fukazawa, Warner Sieghart, Ryuichi Shigemoto and Peter Somogyi, “Quantitative localization of synaptic and extrasynaptic GABAA receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling”, *Eu J Neurosci*, vol. 32, pp.1868-1888, 2010 (DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07473.x)

C-4. Yu-Lin Dong, Yugo Fukazawa, Wan Wang, Naomi Kamasawa and Ryuichi Shigemoto “Differential postsynaptic compartments in the laterocapsular division of the central nucleus of amygdale for afferents from the parabrachial nucleus and the basolateral nucleus in the rat”, *J Comp Neurol*, vol. 518, pp.4771-4791, 2010 (DOI: 10.1002/cne.22487)

C-5 Laxmi Kumar Parajuli, Yugo Fukazawa, Masahiko Watanabe and Ryuichi Shigemoto “Subcellular distribution of $\alpha 1G$ subunit of T-type calcium channel in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus”, *J Comp Neurol*, vol. 518, pp.4362-4374, 2010 (DOI: 10.1002/cne.22461)

C-6. Akihiro Yamanaka, Sawako Tabuchi, Tomomi Tsunematsu, Yugo Fukazawa and Makoto Tominaga, “Direct interaction between orexin neurons activates these neurons through the orexin 2 receptor”, *J Neurosci*, vol.30, pp12642-12652, 2010 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2120-10.2010)

C-7. Keiko Matsuda, Eriko Miura, Taisuke Miyazaki, Wataru Kakegawa, Kyoichi Emi, Sakae Narumi, Yugo Fukazawa, Aya Ito-Ishida, Tetsuro Kondo, Ryuichi Shigemoto, Masahiko Watanabe and Michisuke Yuzaki M, “Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor d2, bidirectional synapse organizer”, *Science* vol.328, pp.363-368, 2010 (DOI: 10.1126/science.1185152)

(4-2) 知財出願

① 平成22年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)