

宇理須恒雄

名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター 特任教授

光神経電子集積回路開発と機能解析・応用

§1. 研究実施体制

(1)「宇理須」グループ(名古屋大学)

① 研究代表者:宇理須 恒雄 (名古屋大学・革新ナノバイオデバイス研究センター、特任教授)

② 研究項目

・光神経電子集積回路開発と機能解析・応用

(2)「深澤」グループ(名古屋大学)

① 主たる共同研究者:深澤 有吾 (名古屋大学・大学院医学系研究科、准教授)

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)「石塚」グループ(東北大学)

① 主たる共同研究者:石塚 徹 (東北大学・大学院生命科学研究科、講師)

② 研究項目

・ChR2 と HR の高効率化と利用

(4)「木村」グループ(自然科学研究機構分子科学研究所)

① 主たる共同研究者:木村 哲就 (自然科学研究機構分子科学研究所・生命錯体分子科学研究領域、助教)

② 研究項目

・赤外分光法による ChR2 および HR の分子構造解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究の目的：多チャンネル培養型プレーナーパッチクランプ技術を開発し、素子基板面に神経細胞ネットワークを形成し、神経細胞のハイスループットスクリーニング素子を開発する。神経細胞の細胞核反応を制御しネットワーク機能への影響を調べる。各種神経難病の原因解明と創薬応用の研究を進める。ネットワーク形成において光刺激による活動電位発生機能の付与を特徴とする。

A. 宇理須チーム：多点計測素子開発

素子開発後の応用の重要性を考慮し、世界に成功例の無い素子ながら、安定動作をする素子の開発を目指して研究を進めた。また、多点計測以外に、プレーナー素子の特徴を生かして、基板下方で電流計測、上方でイメージング計測をおこなえる素子構造をめざした。

1. PMMA 基板の開発：低コスト、加工性の良さ、細胞観察に重要な倒立顕微鏡との相性の良さから、これまでの Si 基板に代わり、モールド制作とホットエンボス技術を完成しPMMA基板の製作を達成した。PMMA 基板での培養型プレーナーパッチクランプ素子としての動作確認に成功した。シール抵抗は依然10MΩ台の域を出ないが、微細貫通孔周辺の表面を原子間力顕微鏡で観察し、数十ナノメートルの凹凸のあることを見出し、シール抵抗向上の糸口を見出したと考える。細胞外マトリックスとして、これまで Si 基板で良好性を確認したもの[A1,A2]のほかシール抵抗増大を期待される分子量の小さい物質を探索し神経細胞の成長を確認できた。
2. 全マイクロ流路化：溶液供給排出系と電流計測電極系を統合したマイクロ流路化は多チャンネル素子の安定動作と迅速な組立の観点から必須で、23年度は、4チャンネル素子において、マイクロ流路化を達成した。24年度の20チャンネル開発にむけて構造指針を明らかにした。
3. 増幅器集積回路化：豊橋技術科学大学澤田グループとの共同研究として進めており、23年度で2年目を迎える。23年度は、22年度に製作した増幅器回路に、キャパシタンスコンペンセーション回路を加え、さらにAD変換を行いパソコンに出力できるようにした。光受容体イオンチャンネル ChRWR を発現させた HEK293 細胞をセンサー細胞として、製作したバイオセンサーの信号を増幅して検出することに成功した。今後さらに高性能高集積化をすすめる。
4. 神経細胞ネットワークの制御：ラット大脳皮質神経細胞を用い、単一細胞を微細貫通孔の上に置き、ネットワークを形成する技術を開発し、シナプス形成の条件を見出した。また、石塚、深澤グループの協力を得て、形成したネットワーク状神経細胞に効率よく光受容体イオンチャンネル ChRWR を遺伝子導入する cDNA とレンチウイルスの組み合わせを見出した。
5. Ca イメージング：1-2週間培養して形成した神経細胞ネットワークに Oregon Green 488 BAPTA-1 を蛍光プローブとして電気刺激による Ca イメージングを行い、Na チャンネル阻害剤 CNQX および AP5 および GABA リセプター阻害剤 GABAzine を用いシナプス形成と活

動電位の伝達を確認した。

B. 深澤グループ: 神経細胞の自己機能化制御と機能計測

宇理須グループが作製する基板上の神経回路網の活動を光照射により制御出来るように、光感受性陽イオンチャンネルを代表とするオプトジェニックプローブの開発とこれらを発現する神経細胞の作製を行っている。また同時に、動物個体の脳内神経細胞とそれらが形成する神経回路を特定の分子の発現分布に着目して解析し明らかにすることで、将来基板上神経回路網の解析を行う際の観察項目を提供することも同時に行っている。

23年度は、石塚グループで開発された改良型 ChR の内、ChRFR 型を中心に実験を行い、ChRFR のマウス神経細胞での発現効率を向上させるために、コドン配列の最適化を行い、これを用いて哺乳類細胞での発現プラスミド、遺伝子改変マウス、遺伝子導入用レンチウイルスの作製を行った。また、野生型 ChR が神経細胞に発現する遺伝子導入ラットを石塚グループと開発し、末梢からの知覚が光刺激より誘導できることを証明し、報告した。

また、脳内神経回路網の解剖学的特徴付けについては、脳内分子を高感度に定量出来る実験系の確立[B1]、AMPA 型、および NMDA 型グルタミン酸受容体の脳内局在[B2,B3]、カリウムチャンネルの脳内局在[B4]を明らかにして報告した。

C. 石塚グループ: ChR2 と HR の高効率化-変異体 ChR2, HR の開発

光受容イオンチャンネル・チャンネルロドプシンの構造-機能関連解析の成果として、チャンネルロドプシン・ファストレシーバー(ChRFR)、チャンネルロドプシン・ワイドレシーバー(ChRWR)、チャンネルロドプシン・グリーンレシーバー(ChRGR)の3種類の高効率型チャンネルロドプシンの作製に成功していた。これらについて、哺乳類細胞での発現量の増加・細胞膜上での発現効率の改善をめざして、コドンをヒトあるいはマウスのコドン頻度に最適化したクローンを作製して、オプトジェネティクスツールとしての完成度を高めた。また、そのうちの一つ mChRFR を用いて、いくつかの step-function opsin (SFO)型変異体を作製し、その性能を解析した。mChRFR の SFO 変異体でも、ChR2 の SFO 変異体と同様にチャンネルの開状態を持続させる効果が確認でき、光パルスのパターン刺激とは異なる形で、ニューロンの活性化状態を長時間持続させるツールとしての活用が期待できる。

さらにこれらのオプトジェネティクスツールを、目的のニューロンに効率よく遺伝子導入するための手段として、新たに抗体掲示型ウイルスベクターを用いた細胞種特異的遺伝子導入法を開発した。バクテリア由来のプロテインAの IgG 結合ドメイン(Z ドメイン)を、ウイルスのエンベロープタンパク質に組み込んだ ZZ-Sindbis ウイルスと、標的細胞の形質膜タンパク質の細胞外ドメインを認識する抗体を用いることで、抗体の反応特異性に依存した遺伝子導入が可能であることを報告した[C1]。

ChR2 を組み込んだトランスジェニックラット(W-TChR2V4)は、中枢および末梢の様々なニューロンで ChR2 が発現している。このうち、脊髄後根神経節においては、触覚や深部感覚をつかさどる大型ニューロンに選択的に ChR2 が発現しており、痛覚や温度感覚をつかさどる小型ニューロンには発現していない。メルケル触盤やマウスナー小体などの末梢機械受容器にも ChR2 が発現しており、皮膚を光で刺激することで機械受容感覚を誘発できることを報告した[C2]。

D. 木村グループ: ChR2, HR の高効率化—ChR2, HR 分子構造解析

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 23 年度は赤外分光の測定に供することのできる ChR の大量発現、精製の技術の立ち上げを進め、それに成功した。具体的には、石塚グループより提供を受けた 3 種類の改変型 ChR (WR, FR, GR) をほ乳動物培養細胞 COS-1 を用いて野生型および改変型 ChR を発現、Ni-NTA アフィニティーカラムを用いて精製を進め、脂質二重膜へと再構成を行うことで FTIR 測定を行うに十分な高い純度の試料を得ることに成功した。これらの改変型 ChR について全反射型 FTIR 測定を行い、チャンネル電流の結果と同様、光照射状態から基底状態への戻り速度が FR の方が WR より速いことがわかった。また、HR については野生型について H_2O , H_2^{18}O を用いて計測を行い、塩化物イオンを輸送する光反応サイクル中において水分子の輸送も起こることを明らかにした。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

A1. Zhi-hong Wang, Noriko Takada, Hidetaka Uno, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, Tsuneo Urisu, “Positioning of the sensor cell on the sensing area using cell trapping pattern in incubation type planar patch clamp biosensor” *Colloid and Surface B* (in printing)

A2. Ayumi Ando, Hidetaka Uno, Toshifumi Asanao, Tsuneo Urisu, Satoshi Hamaguchi, “Arrangement of PC12 cells on a silicon chip via extracellular matrix (ECM) layer patterning by atmospheric pressure plasmas” *Plasma and Fusion Research: Letters* 6 (2011) 1306155(4pp). (DOI: 10.1585/pfr.6.1306155).

A3. Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Tsuneo Urisu, Satoshi Hamaguchi, “Micro-pattern formation of extracellular matrix (ECM) layers by atmospheric-pressure plasmas and cell culture on the patterned ECMs” *J. Phys. D: Appl. Phys.* 44 (2011) 482002 (5pp). (DOI:10.1088/0022-3727/44/48/482002)

A4. Ryugo Tero, Gen Sasaki, Toru Ujihara, Tsuneo Urisu, “Anomalous Diffusion in Supported Lipid Bilayers Induced by Oxide Surface Nanostructures”, *Langmuir* 27

(2011) 9662-9665. (DOI: 10.1021/la201474h)

A5. Ayumi Sumino, Takehisa Dewa, Toshikazu Takeuchi, Ryuta Sugiura, Nobuaki Sasaki, Nobuo Misawa, Ryugo Tero, Tsuneo Urisu, Alastair T. Gardiner, Richard J. Cogdell, Hideki Hashimoto, and Mamoru Nango, "Construction and Structural Analysis of Tethered Lipid Bulayer Containg Photosynthetic Antenna Proteins for Functional Analysis" , *Biomacromolecules* 2011, 12, 2850-2858. (DOI: 10.1021/bm200585y)

B1. Sumegi M, Fukazawa Y, Matsui K, Lorincz A, Eyre MD, Nusser Z, Shigemoto R "Virus-mediated swapping of zolpidem-insensitive with zolpidem-sensitive GABAA receptors in cortical pyramidal cells" *J Physiol*, vol 590, pp. 1517-1534, 2012 (DOI:10.1113/jphysiol.2012.227538)

B2. Fukazawa Y, Shigemoto R. Intra-synapse-type and inter-synapse-type relationships between synaptic size and AMPAR expression. *Current Opinion Neurobiology*, vol 22, pp. 1-7, 2012 (DOI:10.1016/j.conb.2012.01.006)

B3. Budisantoso T, Matsui K, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R. "Mechanisms underlying signal filtering at a multi-synapse contact" *J Neuroscience*, vol 32, pp. 2357-2376, 2012 (DOI: 10.1523/JNEUROCI.5243-11.1012)

B4. Ballesteros-Merino C, Lin M, Wu WW, Ferrandiz-Huertas C, Cabañero MJ, Watanabe M, Fukazawa Y, Shigemoto R, Maylie J, Adelman JP, Luján R. "Developmental profile of SK2 channel expression and function in CA1 neurons." *Hippocampus*, 2012 (DOI: 10.1002/hipo.20986)

C1. Ayumu Konno, Tatsuya Honjo, Atsushi Uchida, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, "Evaluation of Sindbis virus vector displaying immunoglobulin-binding domain - antibody-dependent infection to neurons in living mice", *Neurosci Res.* 71(4):328-334, 2011, (DOI 10.1016/j.neures.2011.08.013).

C2. Zhi-Gang Ji, Shin Ito, Tatsuya Honjoh, Hiroyuki Ohta, Toru Ishizuka, Yugo Fukazawa, Hiromu Yawo, "Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats which express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells", *PLoS ONE* 7(3):e32699, 2012 (DOI 10.1371/journal.pone.0032699)

C3. Toshifumi Asano, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells”, *Biotechnol. Bioeng.* 109(1):199-204, 2012, (DOI 10.1002/bit.23285).

C4. Seiichiro Sakai, Kenichi Ueno, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a DMD-based projector” *Neurosci. Res.* (in printing). (DOI 10.1016/j.neures.2012.03.009).

(3-2) 知財出願

① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数 (国内 2 件)