

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

(1-1)「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
- ・プラスチック基板開発
- ・増幅器集積回路開発
- ・マイクロ流路化
- ・多チャンネル化
- ・実用性能向上
- ・神経回路網形成と機能計測プロトコル開発
- ・核内反応制御物質の遺伝子導入技術確立
- ・イメージング技術開発
- ・創薬応用研究
- ・ヒト疾患モデルチップ開発

(1-2)「下島」サブグループ

① 主たる共同研究者:下島康嗣 (産業技術総合中部センター、研究員)

② 研究項目

- ・X 線マスク制作

(2-1)「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

(2-2)「重本」サブグループ(生理学研究所)

① 主たる共同研究者:重本隆一 (生理学研究所・大脳皮質機能研究科、教授)

② 研究項目

・光神経電子集積回路用細胞の樹立

(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(分子科学研究所)

① 主たる共同研究者:木村哲就 (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

・赤外分光による ChR2 および HR の分子構造解析

§2. 研究実施内容

平成 23 年度の安定電極の開発により、通常の培養細胞については安定なイオンチャンネルバ
イオセンサーを制作できる見通しを得た(文献 3)ことから、平成 24 年度は本 CREST 研究の最終
目標である、神経細胞ネットワークハイスループット素子開発に移行した。神経難病の機構解明
や創薬に応用できる性能の、神経細胞ネットワークハイスループット素子開発を目指して研究を進
めた。また、具体的な疾患として、運動ニューロンが特異的に侵されるという症状の明白さに注目
し、ALS(筋萎縮性側索硬化症)を標的とした。iPS 技術導入の必要性を強く認識し、平成 24 年度
後半からは“患者固有の神経細胞ネットワークハイスループットスクリーニング素子”の概念を明確
にして素子開発を進めた。はじめて神経細胞を扱ったため、思いがけない技術的問題に遭遇し
たが、チーム全体でそれらの問題解決に取り組み、ほぼ克服の目途が立った。以下各グループの
成果と今後の方針を述べる。

A 光神経電子集積回路開発と機能解析応用(宇理須-下島グループ)

ALS の病態は非常に複雑であるにも関わらず、細胞内 Ca^{2+} 動態に異常が共通してみられること
から、細胞内の Ca^{2+} イメージングと細胞内のイオンチャンネル電流の同時計測を目指した。哺乳
動物の神経細胞でのイオンチャンネル電流の計測に世界で初めて成功し(図1)、また、 Ca^{2+} イメ

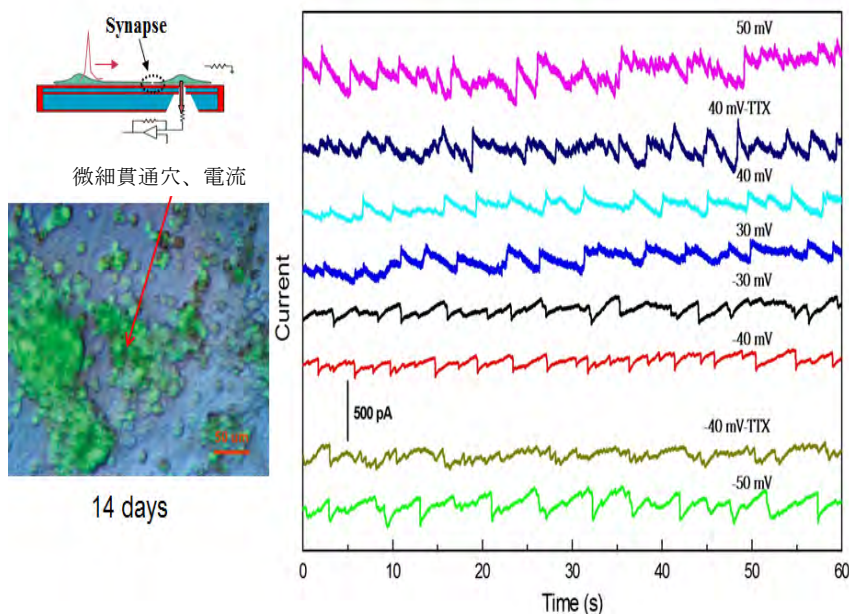


図1 ラット大脳皮質神経細胞のネットワークと細胞内イオンチャンネル電流

培養型プレーナーパッチクランプ基板(Si 基板)上に、培養14日で形成されたラット大脳皮質神経細胞のネットワーク(左下
図)。顕著な細胞の凝集がみられる。微細貫通穴を通して、膜電位固定で観測された自然発火とシナプス自然放出による細胞内
イオンチャンネル電流(右図)。図中電圧は印加した膜電位。TTX はテトロドトキシン添加。

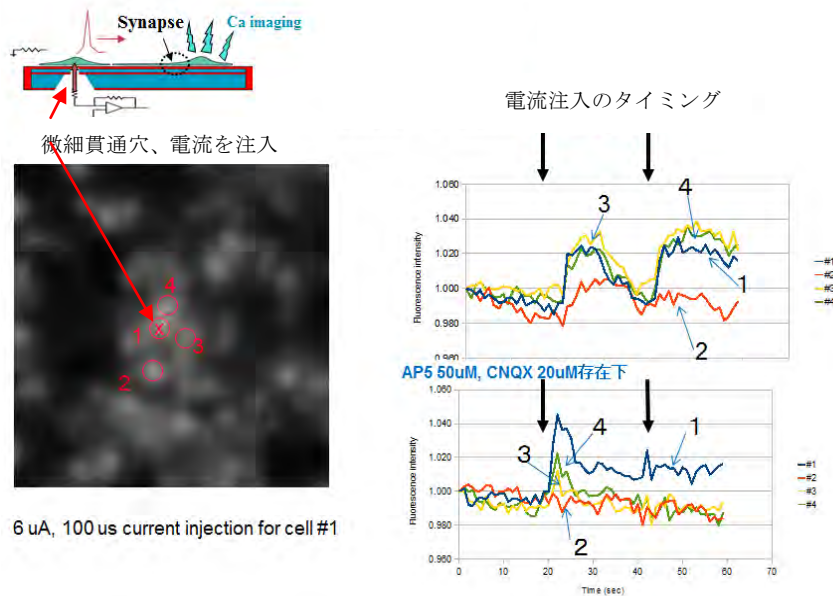


図2 Ca²⁺イメージングによる活動電位の伝搬の観測

プレーナーパッチクランプを利用して微細貫通穴上の神経細胞(#1)に電流を注入し、単一細胞に活動電位を発生。活動電位が周辺の細胞に伝搬する様子をCa²⁺イメージングで観測。AP5(NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニスト)、CNQX(AMPA型、カイニン酸型グルタミン酸受容体アンタゴニスト)により蛍光強度が大きく減少し、シナプス経路で信号が伝達していることを示す。

イメージングの測定も行うことができた(図2)。しかし、神経細胞が非常に凝集しやすく、これらの信号が細胞の播種密度に大きく依存して非線形に変化することがわかったため、まず、細胞密度分布が均一な神経細胞ネットワーク形成技術の開発が、スクリーニング素子に必須であると判断した。また、ほぼ同じころ、神経細胞の微細貫通孔上への定着方式として、これまでの凹部へのトラップ方式では細胞死の確率が高いことから、柵による細胞の位置固定方式をあらたに発案した。【特願2012-205561、外国特許出願PCT/JP2013/57976】細胞定着部500点、イオンチャンネル電流計測点20点からなるPMMA基板を制作するための、新たなモールドを準備した。また、これに伴い、この500点に細胞を播種するためのマイクロ流路方式を考案し、この新播種技術開発を進めた。この多点(20チャンネル)計測素子を本CRESTの最終目標素子と位置づけ、マイクロ流路構造の開発、流路を切り替えるマイクロバルブの開発、微細貫通孔形成のX線マスクの準備(下島サブグループと共同研究)を進め。さらに澤田チームとの共同研究によってイオンチャンネル電流計測用電子回路を製作し、素子完成を当面の重要課題と位置づけて研究を進めた。また、光受容体チャンネルChRWRを神経細胞に効率よく遺伝子導入するためのレンチウイルスベクターを深澤、石塚、木村グループが共同で開発し、レーザー励起で活動電位を発生し、神経細胞ネットワークの信号伝搬を精密に計測する光学系を立ち上げた。さらに、患者固有の概念を実現するうえで、iPS細胞技術は必須であると考えた。理化学研究所セルバンクより入手したヒトiPS細胞

胞を用い、培養技術および、運動ニューロンへの分化誘導技術の確立を目指して、研究を進めた。今後は、“マイクロバルブの完成”、“緩衝液の送排液制御系の完成”および“これによる20チャンネル素子の完成”、を重点的に進める。次いで、iPS細胞の運動ニューロンへの分化誘導技術を高め、この素子上に運動ニューロンを含む神経細胞ネットワークを形成し、患者固有の素子を完成する(ただし、生命倫理の観点から、匿名の iPS 細胞を用いる)。ついで、この素子を利用し、Ca²⁺イメージングとイオンチャンネル電流の同時計測から、ALS の原因解明に適したプロトコル(計測方法)探索の研究を進める。可塑性によるネットワーク特性の変化という複雑性を避けるため、自然発火に伴う信号の計測を基本としてプロトコルを開発し、精密解析の必要に応じて、レーザー励起システムを利用する方針である。

B 神経回路網の解剖学的解析と自己機能化制御 (深澤-重本グループ)

石塚グループで開発された高速応答性 ChR (ChRFR) の遺伝子をマウス細胞での発現に遺伝子コドン最適化し、これを用いて、任意の神経細胞で ChRFR の発現が制御できる遺伝子導入マウスの作製とその評価を中心に重本サブグループの協力を得て実験を行った。また、この遺伝子を培養神経細胞に導入するためのレンチウィルスの作製を行い、宇理須グループに提供した。

一方、脳内神経回路網の解剖学的特徴付けについては、野生型 ChR が神経細胞に発現する遺伝子導入ラットを用いて感覚神経や海馬神経の活動を制御し、これら神経回路を構成するシナプスの特性と神経細胞の興奮性について石塚グループと共同で明らかにし、発表した(文献 4, 6, 8, 15)。また、シナプス結合の形成と維持に重要な働きを持つ細胞間接着分子(Neuroligin)がシナプスに集積するための分子メカニズム(文献 5)、てんかんやシナプス可塑性に関与することが知られる R 型電位依存性カルシウムチャンネル(文献 10)とカリウムチャンネル(SK2、文献 12)の海馬錐体細胞における発現分布を電子顕微鏡レベルで明らかにし、報告した。

C ChR2 と HR の高効率化と利用 (石塚グループ)

ChR1, ChR2 の分子構造とチャンネル電流特性の関係を解析した。ChR2 の第3膜貫通領域および第4膜貫通領域のアミノ酸置換によって作られた ChR2(C128T), ChR2(C128A), ChR2(C128S), ChR2(D159A)およびこれらの組み合わせによる点変異体は、中間体 P520 から P470 への移行が遅延し、光照射を終了しても数十 ms~数分のオーダーで光電流が流れ続ける特徴がある。同様の点変異を我々が開発したキメラ体 ChRFR に導入し、ChRFR(C167A/S/T), ChRFR(D195A)およびこれらの組み合わせによる点変異体を作製し、その光電流特性を詳細に解析した。いずれの変異体も細胞膜での良好な発現が認められ、脱活性化時間(τ_{OFF})が 0.5-500 s に遷延した。この内、ChRFR(C167A)は、 τ_{OFF} が約 20 s で光電流ピーク値も大きく、実用性に優れていることを明らかにした。

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

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) およびそれらの変異体を、ほ乳

動物培養細胞 COS-1 を用いて発現した。さらに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。平成 23 年度の実施研究から、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ていたが、変異体を用いた平成 24 年度の実施研究から、この戻り速度がチャンネルの経路を構成する特異的なアミノ酸に由来する現象であることを明らかになりつつある。また、HR については野生型および変異体について $H_2O, H_2^{18}O, D_2O$ 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(文献 21)。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Noriko Takada, Masaki Aoyama, Mitsukazu Suzui, Yosuke Hachisu, Hitoshi Ohmori, Zhi-Hong Wang, Senthil Kumar Obuliraju, Yasutaka Nagaoka, Miho Saito-Goto, Tsuneo Urisu, "Microfabrication of PMMA sensor chip for neural network device based on incubation type planar patch clamp", *nanoMan2012*, (2012) 286-289.
2. H. Uno, Z. Wang, N. Takada, T. Ishizuka, H. Yawo and T. Urisu, "Channelrhodopsin as a Noble Biomaterial Useful for the Operation and Performance Test of the Ionchannel Devices", *Materials Transactions*, 53 (2012) 1305-1309. (DOI: 10.2320/matertrans.N-M2012814)
3. 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* 96 (2012) 44-49. (DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.03.018).
4. Ohta H, Sakai S, Ito S, Ishizuka T, Fukazawa Y, Kemuriyama T, Tandai-Hiruma M, Mushiake H, Sato Y, Yawo H, Nishida Y. "Paired stimulation between CA3 and CA1 alters excitability of CA3 in the rat hippocampus" *Neuroscience Letters*, 534, (2012) 182-187 (DOI: 10.1016/j.neulet.2012.11.058).
5. Budreck EC, Kwon O-B, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim H-S, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, Kim J-H. "Neuroigin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling" *PNAS*, 110 (2013) 725-730 (DOI: 10.1073/pnas.1214718110).
6. Kuki T, Ohshiro T, Ito S, Ji Z-G, Fukazawa Y, Matsuzaka Y, Yawo H, Mushiake H, "Frequency-dependent entrainment of neocortical slow oscillation to repeated

- optogenetic stimulation in the anesthetized rat" *Neurosci Res*, 75 (2012) 35-45 (DOI: 10.1016/j.neures.2012.10.007).
7. Budisantoso T, Harada H, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. "Evaluation of glutamate concentration transient in the synaptic cleft" *J Physiol*, 591 (2012) 219-239 (DOI: 10.1113/jphysiol.2012.241398).
 8. Abe Y, Sekino M, Terazono Y, Ohsaki H, Fukazawa Y, Yawo H, Hisatsune T. "Opt-fMRI analysis for exploring the neuronal connectivity of the hippocampal formation in rats" *Neuroscience Res*, 74 (2012) 248-255 (DOI: 10.1016/j.neures.2012.08.007).
 9. Sasaki T, Beppu K, Tanaka K, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K "Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation" *PNAS* 109 (2012) 20720-5 (DOI: 10.1073/pnas.1213458109).
 10. Parajuli LK, Nakajima C, Kulik A, Matsui K, Schneider S, Shigemoto R, Fukazawa Y. "Quantitative regional and ultrastructural localization of Ca_v2.3 subunit of R-type calcium channel in mouse brain" *J Neurosci*, 32 (2012) 13555-13567 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1142-12.2012).
 11. Fukazawa Y, Shigemoto R. "Intra-synapse-type and inter-synapse-type relationship between synaptic size and AMPAR expression" *Current Opinion Neurobiol*, 22 (2012) 446-452 (DOI: 10.1016/j.conb.2012.01.006).
 12. 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*, 22 (2012) 1467-1480 (DOI: 10.1002/hipo.20986).
 13. 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*, 590 (2012) 2181-2192 (DOI: 10.1113/jphysiol.2012.227538).
 14. Shin Ito, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, "Remodeling of hippocampal network in pilocarpine-treated mice expressing synaptopHluorin in the mossy fiber terminals", *Neuroscience Research*, 74 (1) (2012) 25–31 (DOI: 10.1016/j.neures.2012.07.003).
 15. 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) (2012) e32699 (DOI 10.1371/journal.pone.0032699).
 16. Toshifumi Asano, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, "Optically controlled contraction of

- photosensitive skeletal muscle cells”, *Biotechnol. Bioeng.* 109(1) (2012) 199-204 (DOI: 10.1002/bit.23285).
17. Saki Tanimoto, Yuka Sugiyama, Tetsuo Takahashi, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Involvement of glutamate 97 in ion influx through photo-activated channelrhodopsin-2”, *Neuroscience Research*, 75, (1) (2013) 13-22 (DOI: 10.1016/j.neures.2012.05.008).
 18. Seiichiro Sakai, Kenichi Ueno, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Parallel and patterned optogenetic manipulation of neurons in the brain slice using a DMD-based projector” *Neuroscience Research*, 75 (1) (2013) 59-64. (DOI 10.1016/j.neures.2012.03.009).
 19. Keiko Umeda, Wataru Shoji, Seiichiro Sakai, Akira Muto, Koichi Kawakami, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, “Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system”, *Neurosci Res*, 75 (1) (2013) 69-75 (DOI: 10.1016/j.neures.2012.08.010).
 20. Ryo Egawa, Shoko Hososhima, Xubin Hou, Hidetaka Katow, Toru Ishizuka, Harukazu Nakamura, Hiromu Yawo, “Optogenetic probing and manipulation of the calyx-type presynaptic terminal in the embryonic chick ciliary ganglion”, *PLoS ONE*. (in printing), (DOI: 10.1371/journal.pone.0059179).
 21. Yuji Furutani, Kuniyo Fujiwara, Tetsunari Kimura, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, and Hideki Kandori, “Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation” *J. Phys. Chem. Lett.*, 3(20) (2012) 2964-2969 (DOI 10.1021/jz301287n).
 22. Hao Guo, Tetsunari Kimura, and Yuji Furutani, “Distortion of the amide-I and -II bands of an α -helical membrane protein, *pharaonis* halorhodopsin, depends on thickness of gold films utilized for surface-enhanced infrared absorption spectroscopy” *Chem. Phys.*, (in printing), (DOI 10.1016/j.chemphys.2012.11.011).

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)