

「プロセスインテグレーションによる  
機能発現ナノシステムの創製」  
平成 21 年度採択研究代表者

平成 21 年度 実績報告
------------------

宇理須 恒雄

大学共同利用機関法人自然科学研究機構  
分子科学研究所 生命錯体分子科学研究領域 生体分子情報研究部門 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

本研究課題は、宇理須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素子 (IPPC) 技術を基盤として、1. 単一素子として高性能神経細胞ネットワーク素子の開発、2. 多チャンネル化した、光神経電子集積回路素子の開発、および 3. 開発した素子の応用研究の推進、を目指している。素子開発に必要な、いくつかの要素技術開発を平行して進めた。1. に関しては、素子内での神経細胞とグリア細胞とを個別に制御した培養技術開発および光受容体チャンネル ChR2 の遺伝子導入技術開発、高性能光受容体チャンネルの開発および ChR2 を遺伝子導入したマウスの開発、IPPC の特徴である長期間計測の実証、2. に関しては、Si 基板での多チャンネル化、プラスチック基板の開発、3. に関しては、アルツハイマー病(AD)の機構解明創薬応用を前提とした調査研究として、AD の特徴である、アミロイドベータ(A $\beta$ )の凝集反応の調査研究を進めた。ガングリオシド GM1 の特殊な分子構造が A $\beta$  の凝集速度を桁違いに加速する現象を初めて発見しその分子構造を解明し論文発表と報道発表を行なった。

## § 2. 研究実施体制

(1) 「宇理須恒雄」グループ

- ① 研究分担グループ長： 宇理須 恒雄 (自然科学研究機構分子科学研究所、教授)
- ② 研究項目
  1. 単一素子として高性能神経細胞ネットワーク素子の開発

- 1-1. グリア細胞の制御
- 1-2. ChR2 遺伝子改変型の開発(石塚、古谷が担当)
- 1-3. 光神経電子集積回路用細胞(マウス)の樹立(深澤が担当)
- 1-4. 基本特性測定と長期計測の可能性の実証

## 2. 多チャンネル光神経電子集積回路素子の開発

- 2-1. プラスティック基板の開発
- 2-2. マイクロ流路による細胞外マトリックス(ECM)印刷技術開発

## 3. 素子応用調査

- 3-1. アルツハイマー病発症原因の探索:脂質二重膜上での A $\beta$ 凝集反応を解析

### (2)「石塚徹」グループ

- ① 研究分担グループ長: 石塚 徹 (東北大学、講師)
- ② 研究項目
  - 1-2. ChR2 と HR の高効率化・変異体の開発

### (3)「深澤有吾」グループ

- ① 研究分担グループ長: 深澤 有吾 (自然科学研究機構生理学研究所、助教)
- ② 研究項目
  - 1-3. 光神経電子集積回路用細胞の樹立

## § 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)

素子開発と応用に必要な多数の要素技術開発研究を平行して進めていますので、要素技術ごとに整理して報告します。

### 1. 単一素子として高性能神経細胞ネットワーク素子の開発

1-1. グリア細胞の制御: 単一チャンネルSi基板素子内でマウス大脳皮質初代培養細胞のネットワーク形成を行ない、神経細胞とグリア細胞の存在比を制御して培養することに成功した(図 1)。この技術は、光受容体チャンネルChR2 の遺伝子導入や、シナプスの成熟化に今後必要となる技術である。また、グリア細胞を制御することにより、シンドビスウイルスをベクターとするChR2 の素子内での遺伝子導入に成功した(図 2)。

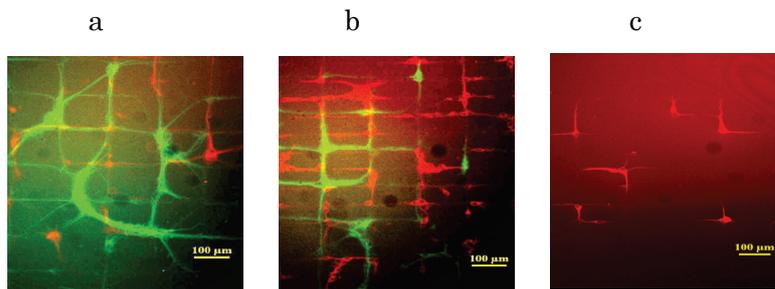


図 1、 DNA 合成を阻害する AraC (Cytosine beta-D-arabinofuranoside)を培養液中へ添加してグリア細胞の増殖を抑えた。培地に蛍光標識されたモノクローナル抗体 MAP2(神経細胞特異的)、GFAP(グリア細胞特異的)を導入し免疫染色を行った。緑色はグリア細胞、赤色は神経細胞。 a 制御無し、b AraC 0.5 $\mu$ M, c AraC 5 $\mu$ M。

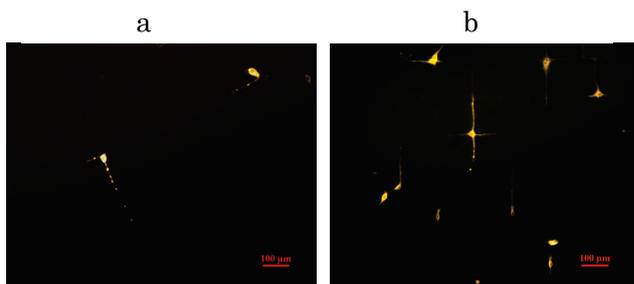


図 2、  
グリア細胞の制御無し(a)と AraC 5 $\mu$ Mで培養(b)した場合、それぞれにシンドビスウイルスベクターによる ChR2 遺伝子を導入。ChR2 遺伝子に蛍光蛋白を接続してあるので、黄色が遺伝子導入による ChR2 の発現を示す。

1-2. ChR2 とHRの高効率化・変異体の開発: 作出に成功したチャンネルロドプシン・ワイドレシーバー (ChRWR)にさらなる改変を加えることで、吸収波長特性がより長波長側にシフトした改変体の作出を試みた。緑色光に応答し、ホールセルコンダクタンスや脱感作などの特性などにおいてもニューロンの光刺激に最適な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) の作出に成功した。青色光と比較して緑色光は光毒性が少なく、また組織への浸透でも優れているため、in vivoへの応用も含めて野生型のChR2よりも信頼性が高く、光パルス刺激に同期したニューロンの発火を引き起こすことが可能となる。

1-3. 光神経電子集積回路用細胞(マウス)の樹立: 光神経電子集積回路の形成に適した神経細胞を安定に得るために、種々の遺伝子改変を行ったマウスを作製し、回路用神経細胞の供給源とする。本年度は石塚グループで得られた改変型チャンネルロドプシンChopFRを発現する遺伝子導入マウス系統の作製を行い、14 系統のファウンダーを得た。これまでに 8 系統のマウスで ChopFRの脳内発現パターンの解析を行い、海馬、大脳皮質領域で発現の高い系統を確認した。

1-4. 長期計測の可能性の実証: 培養型プレーナーパッチクランプ素子は長時間培養ができること、および、平面型であるので液交換が容易であることから、長時間の経過観察が可能である。

痛みや温度に感応してチャンネルを開くイオンチャンネルTRPV1 を発現したHEK293 細胞を用い、カプサイシン刺激によるチャンネル電流応答の長時間経過観察をし、その有用性を実証した。発表論文を執筆中。

## 2. 多チャンネル光神経電子集積回路素子の開発

2-1. プラスチック基板の開発: 製作コストの観点から、多チャンネル素子の基板はこれまでのSiではなくプラスチックが有用と考え、ナノインプリントエンボス技術開発に着手した。電極部は非常に薄い(5-10 $\mu$ m)ため、一枚のプラスチック板に厚い部分と薄い部分が混在し、我々が知る限りでは、これまで報告例の無いホットエンボス技術である。試作結果を解析し、下側のプラスチック基板を支持する金属板の熱伝導率を高い材料(真鍮等)とすることにより、目標の厚み制御が可能であるという見通しを得た。

2-2. マイクロ流路による細胞外マトリックス(ECM)印刷: ECMを微細孔の周辺に印刷することにより、細胞を自己走行により電極部の微細孔のところに設置できる上、長時間計測で細胞を逃がさないで電極部に確保できる。マイクロ流路を各微細孔のところに設置して流路内にECM溶液を微細孔を通して流入させる方式を考案し印刷に成功した。現在、印刷したECMによる細胞のパターン化の条件を探索している。なおマイクロ流路形成については、フォトリソグラフィによるモールド形成のほか、放射光エッチングによりPDMS材料に微細な貫通孔を形成する技術開発も平行して進めた<sup>1</sup>。

## 3. 素子応用調査

3-1. アルツハイマー病発症原因の探索: 脂質二重膜上でのA $\beta$ 凝集反応を解析。: GM1/SM/Chol脂質二重膜表面でのA $\beta$ 凝集反応を調べ、GM1分子のヘッドグループが折れ曲がってシアル酸基が表面に現れると凝集反応が大幅に加速されることを発見し解明した(図3)<sup>2</sup>。

これらの解析を通して、アルツハイマー病の機構解明には、細胞核関連の反応解析が重要であるとの認識を一層強め、素子の応用実験の方向がより明確となった。

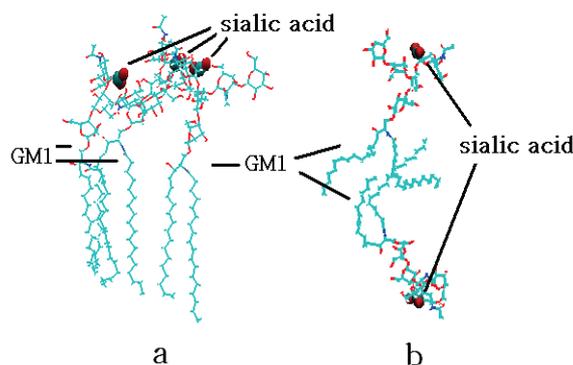


図3 GM1 ヘッドグループがアシル鎖に対して真っ直ぐな構造(a)ではシアル酸が隠れているが、折れ曲がった構造(b)ではシアル酸が表面に現れ、これにより A $\beta$ 凝集反応速度が大幅に大きくなる。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. T.Y. Chiang, T. Makimura, T.C. He, S. Torii, T. Yoshida, R. Tero, C.S. Wang and T. Urisu, "Synchrotron-radiation-stimulated etching of polydimethylsiloxane (PDMS) using XeF<sub>2</sub> as a reaction gas" *J. Synchrotron Rad.* 17 (2010) 69-74. doi:10.1107/S0909049509045658
2. Y.L Mao, Z.G. Shang, Y. Imai, T. Hoshino, R. Tero, M. Tanaka, N. Yamamoto, K. Yanagisawa, T. Urisu, "Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerate A $\beta$  oligomerization", *BBA Biomembranes*, accepted at March 2010.