「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

H25 年度
実績報告

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：

・主項目：　光神経電子集積回路開発と機能解析応用

・副項目

- 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　（産業技術総合研究所中部センター、研究員）

② 研究項目

・X 線マスク製作

(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)｢須藤｣グループ(名古屋大学)

①　主たる共同研究者:須藤雄気　(名古屋大学大学院理学系研究科、准教授)

②　研究項目

・主項目:光受容分子の機能・構造解析

・副項目

・脱分極(ChR2)･過分極(HR, AR3)型分子

・新規光受容体分子の単離同定とその利用

・モデル生物での実証と改造

§2. 研究実施の概要

我々のチームにおいて開発を進めている素子が、神経難病の原因解明、治療法開発・創薬、発症前診断などに利用できる、世界初のかつかなり高性能な手法を提供する可能性を有するものであると判断し、平成 25 年度はその実用化に向けた研究に取り組んだ。

神経難病が長年の研究にもかかわらず、発症原因も治療法も不明である。その理由は、(1)患者の生存中にその人の患部〔脳神経〕を採取できないこと、及び、(2)神経ネットワークの適切な解析手法(ハイスループットスクリーニング法)が無かったことによる。前者については、iPS 細胞の発明が突破口を開いた。後者については、現在利用できる技術として多電極アレイ(MEA)法があるがこれは細胞外の情報しか取れないうえ、適切な神経ネットワーク形成技術が開発されていない。このため、神経難病のような複雑な系には全く役立たない。また、アルツハイマーについては、アミロイドベータ(A 経難の検出をよりどころとするアッセイ法が実用化されているものの、細胞外の情報しか得られないため、神経難病という難問に立ち向かうにはかならずしも十分な手法とは言えない。

平成 24 年度に測定に成功したラット大脳皮質の神経ネットワークからのプレーナーパッチクランプによる電流記録データ[A-3]を解析した結果、自然発火電流およびシナプス自然放出電流であることが明らかとなった。すなわち、同じく平成 24 年度に計測した Ca^{2+}イメージングのデータとあわせて解析すると、神経難病に密接にかかわる細胞内 Ca^{2+}の動態の詳細な情報を多点で、即ちハイスループットスクリーニング解析できることが判明した。まだかなり初歩的段階ではあるが、上記(2)の問題を解決できる可能性が見えたといえる。

そこで、この技術の実用化を目指して平成 25 年度は、先のチャンネル電流記録の解析のほか、以下の研究開発を進めた。

<u>細胞体の位置を指定した、神経細胞ネットワーク形成技術の開発</u>: 密度の高い神経細胞は、面内で不均一に凝集しやすく、多点計測が要求されるハイスループットスクリーニングに適用できない。そこで、プレーナーパッチクランプのため、微細貫通穴のうえに細胞体の位置を固定して、かつ凝集を回避できる基板構造と播種・培養技術を開発した。現在ラットの神経細胞であるが、来年度にかけて、ヒトの神経細胞のネットワーク形成を行う。

<u>iPS 細胞の分化誘導技術の開発</u>:疾患モデルチップ実現のためには、iPS 細胞技術はきわめて重要である。健常者および ALS 患者の iPS 細胞を理研 CelBank より入手し、培養、運動ニューロンへの分化誘導実験をすすめた。運動ニューロンへの分化には成功したが、ネットワーク形成のためには、分化効率の増大と安定な培養技術の確立などの努力を継続する必要がある。

<u>多チャンネル計測にむけたマイクロバルブの開発</u>: プレーナーパッチクランプによるイオンチャンネル電流記録の成功は、ハイスループットスクリーニングに必要な多チャンネル電流記録が可能であることを意味する。しかし、この機能をフルに活用するためには、各種の溶液を各測定点に送排液する構造が必要で、それは高い集積度のマイクロ流路構造を形成し、マイクロバルブにより同時に動作させる流路を切り替えて使用することにより、小型で高集積なハイスループットスクリーニン

グ素子を実現できる。平成 25 年度はこのマイクロバルブの制作に成功し、5 チャンネルを切り替えるチャンネル切り替え装置を製作し、多チャンネル計測に見通しを付けた。

§3. 成果発表等

(3－1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

A 宇理須・下島グループ

A-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 chips for an incubation type planar patch clamp"、 Int. J. Nanomanufacturing, (in printing).

A-2 Senthilkumar Obuliraj, Noriko Takada, Zhi-hong Wang, Kei Kobayashi, Yasutaka Nagaoka, Jongduk Kim, Mineharu Suzuki, Yoshito Hirose, Yuichi Utsumi, Tsuneo Urisu, "Surface characteristics and electrical properties of PMMA chips for an incubation-type planar-patch-clamp biosensor" , Colloid & Surface B, vol. 116, 193-200, 2014. (DOI 10.1016/j.colsurfb.2013.12.055)

A-3 Hidetaka Uno, Zhi-hong Wang, Ysutaka Nagaoka, Noriko Takada, Senthilkumar Obuliraj, Kei Kobayashi, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, Yukio Komatsu, Tsuneo Urisu, "Improvement of performances in incubation-type planar patch clamp biosensor by using salt bridge electrode and plastic (PMMA) substrates" Sensors & Actuators B: Chemical, vol. 193, pp. 660-668, 2014. (DOI: 10.1016/j.snb.2013.12.019)

A-4 Ayumi Ando, Hidetaka Uno, Tsuneo Urisu, Satoshi Hamaguchi, "Grid-pattern formation of extracellular matrix on silicon by low-temperature atmospheric-pressure plasma jets for neural network biochip fabrication" Appl. Surf. Sci., vol. 276, pp.1-6, 2013 (DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.02.001).

B 深澤グループ

B-1 Hernandez VH, Reuter K, Jing Z, Schulz AM, Hoch G, Bartels M, Yawo H, Fukazawa Y, Augustine GJ, Bamberg E, Kügler S, Salditt T, Strenzke N, Moser T. "Optogenic stimulation of the auditory pathway", J Clin Invest. Vol. 124, pp. 1114-1129, 2014 (DOI:10.1172/JCI69050).

B-2 Ballesteros-Merino C, Watanabe M, Shigemoto R, Fukazawa Y, Adelman JP, Luján R. "Differential subcellular localization of SK3-containing channels in the hippocampus". Eur J Neurosci Early view. Vol. 39, pp.883-892, 2014 (DOI: 10.1111/ejn.12474).

B-3 Beppu K, Sasaki T, Tanaka K, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. "Optogenic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage". Neuron vol. 81, pp. 314-320, 2014 (doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.011)
B-4 Aziz W, Wang W, Kesaf S, Mohamed AA, Fukazawa Y#, Shigemoto R. "Distinct kinetics of synaptic structural plasticity, memory formation and memory decay in massed and spaced learning". PNAS vol. 111, pp. E194-202, 2014 (DOI: 10.1073/pnas.1303317110) #Corresponding author.
B-5 Wang W, Nakadate K, Masugi-Tokita M, Shutoh F, Aziz W, Tarusawa E, Lorincz A, Aziz W, Molnar E. Kesaf S, Li Y-Q, Fukazawa Y, Nagao S, Shigemoto R. (2014.1) "Distinct cerebellar engrams in short-term and long-term motor learning". PNAS vol. 111, pp. E188-193, 2014. (DOI: 10.1073/pnas.1315541111)
C 石塚グループ
C-1 Shin-ichiro Osawa, Masaaki Iwasaki, Ryosuke Hosaka, Yoshiya Matsuzaka, Hiroshi Tomita, Toru Ishizuka, Eriko Sugano, Eiichi Okumura, Hiromu Yawo, Nobuzazu Nakasato, Teiji Tomonaga, Hajime Mushizke, "Optogenetically induced seizure and the longitudinal hippocampal network dynamics", PLoS ONE, vol. 8, No. 4, pp. e60928, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0060928)
C-2 Yukiko Kimura, Chie Satou, Shunji Fujioka, Wataru Shoji, Keiko Umeda, Toru Ishizuka, Hiromu Yawo, Shin-ichi Higashijima, "Hindbrain V2a neurons in the excitation of spinal locomotor circuits during zebrafish swimming", Current Biology, vol. 23, No. 10, pp. 843-849, 2013 (DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.066)
D 須藤グループ
D-1 Yuki Sudo, Misao Mizuno, Zhengrong Wei, Satoshi Takeuchi, Tahei Tahara and Yasuhisa Mizutani, "The Early Steps in the Photocycle of a Photosensor Protein Sensory Rhodopsin I from *Salinibacter ruber*", Journal of Physical Chemistry B, vol. 118, pp.1510-1518, 2014 (DOI:10.1021/jp4112662)
D-2 Takashi Tsukamoto, Keiichi Inoue, Hideki Kandori and Yuki Sudo, "Thermal and Spectroscopic Characterization of a Proton Pumping Rhodopsin from an Extreme Thermophile", Journal of Biological Chemistry, Vol. 288, pp.21581-21592, 2013 (DOI:10.1074/jbc.M113.479394)
D-3 Yuki Sudo, Ayako Okazaki, Hikaru Ono, Jin Yagasaki, Seiya Sugo, Motoshi Kamiya, Louisa Reissig, Keiichi Inoue, Kunio Ihara, Hideki Kandori, Shin Takagi and Shigehiko Hayashi, "A Blue-shifted Light-driven Proton Pump for Neural Silencing", Journal of Biological Chemistry, vol. 288, pp.20624-20632, 2013 (DOI:10.1074/jbc.M113.475533)
D-4 Arisa Mori, Jin Yagasaki, Michio Homma, Louisa Reissig and Yuki Sudo, "Investigation of the Chromophore Binding Cavity in the 11-*cis* Acceptable Microbial Rhodopsin MR", Chemical Physics, vol. 419, pp.23-29, 2013

(DOI:10.1016/j.chemphys.2012.11.020)

D-5 Yuji Furutani, Takashi Okitsu, Louisa Reissig, Misao Mizuno, Michio Homma, Akimori Wada, Yasuhisa Mizutani and Yuki Sudo, "Large Spectral Change due to Amide Modes of a β-sheet upon the Formation of an Early Photointermediate of Middle Rhodopsin", Journal of Physical Chemistry B, vol. 117, pp.3449-3458, 2013 (DOI:10.1021/jp308765t)

（3－2） 知財出願

① 平成 25 年度特許出願件数(国内 3 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 6 件)