

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：92704

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288118

研究課題名(和文) 神経活動の精密計測・制御のためのシナプス型情報通信デバイスアレイの構築

研究課題名(英文) Fabrication of synapse-type nanobiodevice array for obtaining and communicating biological information

研究代表者

櫻村 吉晃 (Kashimura, Yoshiaki)

日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・研究主任

研究者番号：90393751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内におけるシナプス情報伝達を模倣し、生体機能に重要な役割を持つ膜タンパク質を半導体微小井戸上に配置・機能化した人工シナプス実現へ向けた取り組みを行った。自発展開法や単一脂質膜ベシクルマニピュレーションによる人工生体膜の操作技術確立した。微小井戸にハイドロゲルを充填することにより、実際の細胞に近い環境を構築できることを示した。微小井戸を人工生体膜でシールする際に、人工生体膜と基板間の静電相互作用を利用する新たな手法を見出した。低ノイズ・高感度計測に適したデバイス構造を提案し、モデルタンパク質を用いてデバイス動作原理の確認をした。本研究を通して、実際の神経細胞との連携の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We aim at achieving an artificial synapse that mimics the neuronal transmission mechanism, where semiconductor microwells are sealed with artificial cell membranes including membrane proteins. Versatile handling techniques for artificial cell membranes were established based on self-spreading of lipids and single giant vesicle manipulation. We found that the confinement of hydrogel in the microwells creates an environment similar to the living cell. We developed a new method utilizing the electrostatic interaction between the artificial cell membrane and the substrate when sealing the microwells with artificial cell membranes. We proposed a sophisticated device structure toward low noise and highly sensitive biosensors, and confirmed the operating principle of the device using model channel proteins. Our nanobiodevice will be a promising platform for analyzing and utilizing neurons.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：ナノバイオ 生体機能利用 タンパク質 人工生体膜 電気生理 巨大脂質膜ベシクル 人工シナプス

1. 研究開始当初の背景

生体内の情報処理を担うニューロンは、シナプスを介して複雑な神経回路を形成している。シナプスにおいては、ニューロン間に神経伝達物質が放出され(化学的信号)、それが受容体に結合することによって電気的信号に変換され情報が伝達する。この神経伝達メカニズムの解明は、学術的な重要性と共に、パーキンソン病等の神経機能不全に起因する難病の解明の観点からも社会的意義が高い。これまでに、培養細胞やスライスなどの *in vitro* 標本にパッチクランプ法を適用して、イオンチャネルやシナプス伝達について多くの研究が行われてきた。特に、近年のオートパッチクランプ装置の発展には目を見張るものがあり、細胞レベルでのハイスループットアクセシビリティの強力なツールとなっている。しかしながら、神経回路における有機的な信号伝達メカニズムを解明するためには、同一標本に対して入力刺激と出力信号とを多角的に調べる必要性があり、上述のパッチクランプ法は適しているとは言いがたい。現在、神経回路の機能は、海馬や小脳等をモデルとして、*in vivo* パッチクランプ法・光学的手法等を用いて主に研究が行われている状況である。

パッチクランプ法と並び、膜タンパク質研究の有力な電気生理学的手法として、脂質平面膜法がある。これは生体膜の代わりに、人工的に形成した脂質二分子膜(人工生体膜)中に膜タンパク質を再構成する方法である。この方法は、パッチクランプ法と比べて化学的に単純な構成であり、ターゲット分子本来の機能を見ることが出来るメリットがあるが、脂質の溶剤として用いる有機溶媒の人工生体膜への混入が避けられないというデメリットもある。

これらの報告を踏まえ、本研究の提案者は、半導体基板上で擬似的な細胞環境を構築する目的で、半導体上に作製した微小井戸を人工生体膜で覆い(以降、人工生体膜シール微小井戸)、そこに膜タンパク質を埋め込むことによって、生体内の情報伝達を担うシナプスを人工的に構築する研究を行ってきた。本提案と共通する技術背景を持つものであり、以下で詳述する。

(1) シリコン基板上の微小井戸の人工生体膜

シールこれまでに、微細加工技術を用いたナノバイオデバイス構築に向けた基本技術の一つとして、巨大脂質膜ベシクル(GUV)をシリコン基板上で展開することによって数 μm スケールの微小な井戸を人工生体膜で覆う技術を確認した。この方法による人工生体膜は、脂質平面膜法のデメリットであった有機溶剤を一切含まない系であり、数日間にわたって安定な膜構造を維持する。

(2) GUV および人工生体膜の精製、操作技術 直径 10-100 μm の GUV を精製し、単一

ベシクルレベルで操作および局所的な Ca^{2+} 刺激により人工生体膜へと展開制御する技術を確立した。また、局所電場により人工生体膜の成長を制御可能であることを見出した。

(3) 光学的手法による Ca^{2+} -ヘモリスンの Ca^{2+} イオン透過計測

井戸内部に Ca^{2+} イオン指示薬を封入することにより、ヘモリスンチャネルを透過する Ca^{2+} イオンの計測に成功した。ヘモリスンを人工生体膜に挿入することで、チャネルを形成し井戸外部から内部へ Ca^{2+} イオンが流入し、蛍光強度の増加が観察された。

2. 研究の目的

(1) 膜タンパク質の機能を利用した情報通信デバイスアレイの構築を目指すものである。この目的のために、生体内の情報伝達に重要な役割を担うシナプスの構造を半導体基板上で模倣することに着目する。基板上の微小井戸を人工生体膜で覆い、擬似的な細胞環境を作製する。そこに膜タンパク質を埋め込むことにより、信号送信部であるプレシナプス、受信部であるポストシナプスを人工的に構築する。

(2) 本提案の大きな特長は、ナノ加工技術と人工生体膜を中心としたバイオ技術とを融合することにより、上述の人工シナプス構造のアレイ化(例えば、プレ/ポストシナプスの同一チップ上での構築)にある。このため、単なる信号の検出に留まらず、より積極的な制御、すなわち対象への刺激と情報受信の並列処理が可能となる。細胞レベルではなく、(膜タンパク)分子レベルでのニューロンの機能制御と神経伝達メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マルチコンポーネントな人工生体膜アレイの作製

これまでに我々が作製してきたデバイス構造では、溶液中の陽イオン(Ca^{2+} 等)により GUV と基板の間の静電相互作用を制御することで GUV を井戸上で展開し、人工生体膜のシールを実現してきた。しかしながら、この方法では脂質組成および井戸内部は全て同一組成になってしまう。そこで、まず我々が持つマイクロピペットを用いた GUV の操作技術を用いて GUV 一個一個を操作し、 Ca^{2+} 刺激により人工生体膜への展開を制御することによって、半導体基板上で人工生体膜をアレイ化する新たな手法を確立する。次に、従来の方法では作製が困難であった、異なる脂質組成を持つマルチコンポーネントな人工生体膜アレイの作製に本手法を適用する。操作・刺激条件の最適化も行う。

(2) 電気生理計測系の構築とデバイス動作確

認

これまでに我々は光による機能計測を行ってきたが、よりダイナミックな機能計測が可能な、電気による信号の送受信を行うために、デバイスの電気生理計測化を目指す。これまでの研究で、微小電極を井戸内部に配置したデバイス構造の試作は行った。計画初年度は、現有の(シングルチャンネル)電気生理測定装置および半導体測定用プローバを組み合わせて、試作デバイスの評価(ホール径、電極構造、ホール数等)を行う。随時、デバイス構造の最適化を行うとともに、人工生体膜によるギガオームシール形成、ヘモリシン等のモデルチャンネルを用いたデバイス動作確認を行い、電気生理測定手法の確立を目指す。

(3) 微小井戸基板への人工生体膜アレイ作製

前述の人工生体膜アレイの作製技術が確立した暁には、微小井戸基板への上述の技術の適用を行う。微小井戸上で GUV の展開を制御することにより、異なる脂質組成および井戸内容物からなるマルチコンポーネントな人工生体膜シール微小井戸アレイの作製を目指す。作製したマルチコンポーネントアレイ構造のデモンストレーション実験として、例えば、エルゴステロール選択性のあるナスタチンを用いた Na^+ イオンの選択的センシングなども行う。

(4) イオンチャンネルの導入とプレシナプス型デバイスの作製

モデルチャンネルによるデバイス動作確認後、イオンチャンネルの導入を試みる。まず、受容体型イオンチャンネルと比べて試料準備の容易な電位依存性イオンチャンネル(例えば、メリチンなど)の人工生体膜への再構成と機能制御を行う。また、上記のメリチンはイオンだけではなく、分子量の小さな分子に対しても透過性があることが知られている。この現象を利用して、井戸内にアセチルコリン等の比較的小さな神経伝達物質を封入することによって、電位によって物質の放出を制御可能なプレシナプス型デバイスの実現を目指す。まず、神経伝達物質の代わりに、カルセイン等の蛍光分子を用いて動作の確認を行う。

(5) マルチチャンネル電気生理計測の実現

デバイスのマルチチャンネル計測システムの確立を目指す。デバイスと測定系(市販の多チャンネルパッチクランプアンプ(16ch))との接続インターフェースが必要となるため、その作製と最適化を行う。この段階では、人工生体膜シール微小井戸構造のギガオームシール(イオンチャンネルは含まない)を確認し、装置セットアップの確認と最適化を行う。測定系の立ち上げ後、第一段階のデバイス作製技術と第二段階のデバイス測定技術との融合により、マルチチャンネル計測の実現を

目指す。マルチチャンネル計測が実現した暁には、時間の許す限り、人工生体膜シール微小井戸アレイ上で神経細胞の培養を行う。神経細胞に対して人工プレシナプス部で神経伝達物質の放出・刺激を行い、その応答を電気信号として人工ポストシナプス部でとらえる。

4. 研究成果

(1) 微小井戸へのハイドロゲル封入による人工生体膜の安定化

微小井戸内に、ハイドロゲルを封入することで、人工生体膜をハイドロゲルで機械的に支持できるようになった。ハイドロゲルがない場合に比べ、人工生体膜は長期間安定に保持される。ハイドロゲルは、構造や機能を修飾できるため、実際の細胞の細胞質や細胞骨格のような役割を果たすことが期待できる。

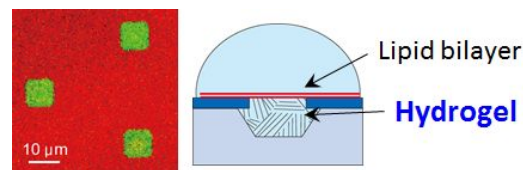


図1: ハイドロゲルによる人工生体膜の支持

(2) 自己組織化膜を利用したシール性能の向上

基板と脂質膜の間には薄い水層があり、そこからのイオンリークがあることが最近分かってきた。これはノイズレベルと同等な微小なイオンチャンネル電流を計測ためには解決すべき課題であった。本研究では、微小井戸を囲む金リング構造を新たに設け、その上に脂質と似た構造を持つ分子の自己組織化膜を形成することによってイオン拡散のブロック層とし、高ギガオームシーリング、デバイスの低ノイズ化を実現した。

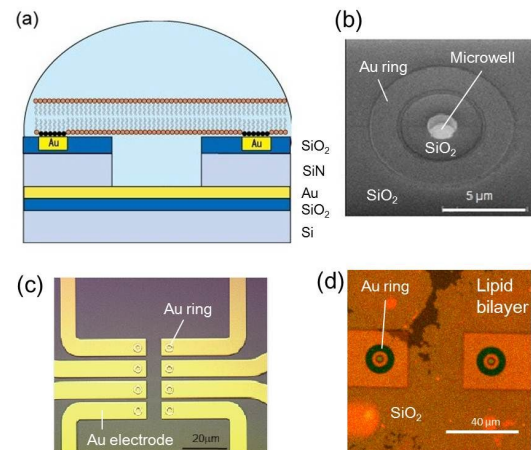


図2: 自己組織化膜によるシール性能の向上

(3) 単一 GUV 操作による人工生体膜アレイの作製

バイオセンサーのプラットフォームとして、人工生体膜のアレイ化は重要な課題だと認識されている。我々の提案している微小井戸構造では、脂質膜だけではなく、微小井戸内部の化学物質をも変えたアレイ構造を用いた、より複雑かつ高度なバイオデバイスの構築を目指している。しかしながら、従来の人工生体膜アレイ作製の技術では、前述のような構造を作製することは原理的に不可能であった。そこで本研究では、単一 GUV 操作および局所刺激による展開制御技術を用いて、従来困難であった脂質膜および井戸内容物のそれぞれ異なる人工生体膜アレイを作成することに成功した。

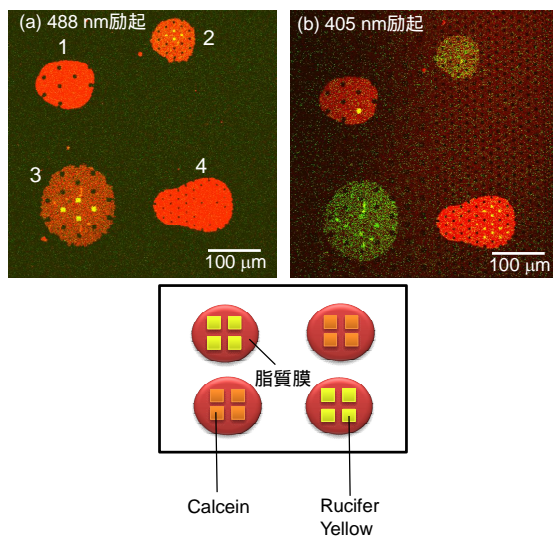


図 3: 単一 GUV 操作による人工生体膜アレイ

(4) ナノギャップ構造を用いた人工生体膜の時間的・空間的成長制御

ナノギャップ電極を通過する人工生体膜の自発展開膜に電圧を印可・開放することによって人工生体膜の成長を時間的・空間的に制御できることを見出した。この現象を説明するために、電解質濃度に依存した電気二重層の厚さとナノギャップ間隔を考慮した動作モデルを提唱し、実験的にその妥当性を証明した。この現象は電気二重層の厚さとナノギャップの大きさが同程度になって初めて現れるナノ領域特有の現象であることが明らかとなった。

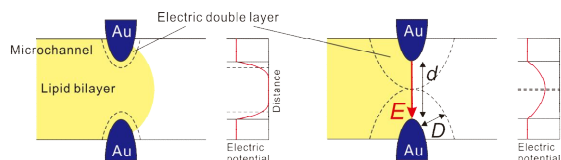


図 4: ナノギャップによる人工生体膜の成長制御

(5) ナノホールアレイによる人工生体膜支持
電子線ビームリソグラフィによりナノホ

ールアレイを薄層膜（熱酸化膜）に形成し、その下の Si 基板を選択的にエッチングすることにより、微小井戸を形成した。エッチング条件を選ぶことで、開口径に関係なく微小井戸の容量を生体内のシナプスと同程度にできる。また、ナノホールの開口径(100 nm)は、実際の細胞膜において細胞骨格で囲まれたドメインサイズと同程度に設計した。架橋膜の開口径を小さくすることでその安定性が向上し、ほとんどの微小井戸で脂質膜シールが成功している。さらにナノホールをアレイ化することで、一つひとつの架橋膜の開口径は小さくしながら、脂質二分子膜の架橋部の総面積を十分に維持し、ナノバイオデバイスの構築に必要な膜タンパク質の導入を可能にしている。脂質膜のシール効率の向上と同時に、ナノバイオデバイスの寿命の延長にも効果があり、10日後にもほとんどの微小井戸で封入したプローブからの蛍光が観察された。

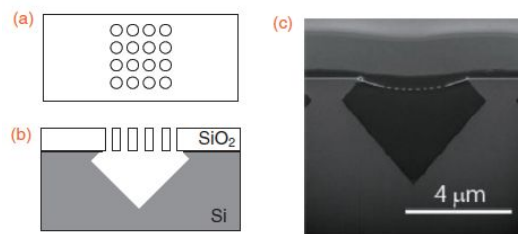


図 5: ナノホールアレイによる人工生体膜支持

(6) ナノピラーを足場とした神経細胞成長制御

神経細胞が成長するためには、それに適した足場が必要である。人工生体膜で覆われたナノバイオデバイスの上に神経細胞を誘導するためには、適した足場を構築する必要がある。ナノピラーを足場とすることで、人工生体膜との間隔を適度に保ちながら、神経細胞の成長を制御することを提案した。神経細胞は、ナノピラーを感知し選択的に成長することを明らかにした。ナノピラーをパターンニングすることで、望みの位置に神経細胞を成長させることに成功した。

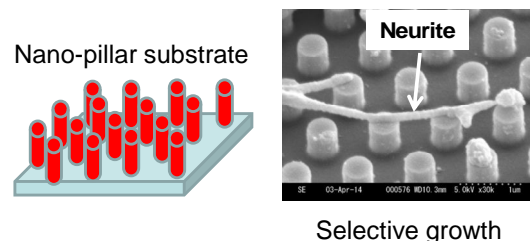


図 6: ナノピラーを足場とする神経細胞成長制御

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 9件)

Touichiro Goto, Nahoko Kasai, Rick Lu, Roxana Filip, Koji Sumitomo, “Scanning Electron Microscopy Observation of Interface Between Single Neurons and Conductive Surfaces”, *J. Nanoscience and Nanotechnology*, **16**, 3383-3387 (2016). 査読有

DOI: 10.1166/jnn.2016.12311

Ruaridh Forbes, Yoshiaki Kashimura*, Koji Sumitomo, “Hermetically sealed microwell with a lipid bilayer created using a self-assembled monolayer”, *Appl. Phys. Express*, **8**, 117201 (2015). 査読有

DOI: 10.7567/APEX.8.117201

Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, “Electrostatically induced planar lipid membrane formation on a cationic hydrogel array by the fusion of small negatively charged unilamellar vesicles”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **477**, 63 (2015). 査読有

DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.03.049

Touichiro Goto, Yuichi Harada, David Cox, Koji Sumitomo, “Fabrication of a ring structure at the aperture of a hole for the efficient suspension of lipid bilayer”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 096503 (2014). 査読有

DOI: 10.7567/JJAP.53.096503

Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, “Fabrication of a cytoskeleton-mimetic structure array on a silicon substrate”, *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 01AF02 (2014). 査読有

DOI: 10.7567/JJAP.53.01AF02

Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Eiichi Kuramochi, Koji Sumitomo, “Formation of a suspended lipid membrane on a microcavity covered by a thin SiO₂ layer with a nanohole array”, *Appl. Phys. Express*, **7**, 017001 (2014). 査読有

DOI: 10.7567/APEX.7.017001

Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, Kazuaki Furukawa, “Electrostatic control of the dynamics of lipid bilayer self-spreading using a nanogap gate”, *Mater. Res. Express*, **1**, 035404 (2014). 査読有

DOI: 10.1088/2053-1591/1/3/035404

Yuichi Shinozaki, Aya Tanaka, Nahoko Kasai, Keiichi Torimitsu, Koji Sumitomo, “Ligand-induced structural changes in a membrane-reconstituted ion channel observed with atomic force microscopy”, *Appl. Phys. Express*, **7**, 027001 (2014). 査読有

DOI: 10.7567/APEX.7.027001

Nahoko Kasai, Rick Lu, Touichiro Goto, Aya Tanaka, Shingo Tsukada, Yuichi Harada, Koji Sumitomo, “Observation of neuronal death *in vitro* by SEM and optical microscopy”, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology*, **12**, 179-184 (2014). 査読有

DOI: 10.1380/ejssnt.2014.179

〔学会発表〕(計 33件)

Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, Hiroshi Nakashima, “Control of ion leakage from/into a microwell sealed with differently charged lipid bilayers”, MRS Spring meeting, March 28-31, 2016, Phoenix (USA).

Nahoko Kasai, Akie Watanabe, Roxana Filip, Aya Tanaka, Touichiro Goto, Yoshiaki Kashimura, Shingo Tsukada, Koji Sumitomo, “Neuronal growth control using SAM modified nano-pillars as scaffolds”, PacificHwM2015, Dec. 15-20, 2015, Hawaii (USA).

Azusa Oshima, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, “Vesicle fusion into supported lipid bilayer on SiO₂ substrates observed by atomic force microscopy”, ICSPM22, Dec. 11-13, 2014, Atagawa Heights (Atagawa, Shizuoka).

Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, “Sealed microwells with lipid bilayers on a Si substrate for detecting ion channel activity”, The 7th International Symposium on Surface Science, Nov. 2, 2014, Kunibiki Messe (Matsue, Shimane).

Azusa Oshima, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, “Control of Vesicle Fusion into Bilayer Lipid Membranes by Using Electrostatic Interaction”, The 7th International Symposium on Surface Science, Nov. 2, 2014, Kunibiki Messe (Matsue, Shimane).

Koji Sumitomo, Nahoko Kasai, Yoshiaki Kashimura, Aya Tanaka, Azusa Oshima, Touichiro Goto, Tetsuhiko Teshima, Shingo Tsukada, Hiroshi Nakashima, “Nanobiodevice for mimicking synaptic connections with living neurons”, The 7th International Symposium on Surface Science, Nov. 2, 2014, Kunibiki Messe (Matsue, Shimane).

Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, “Electrophysiological detection using microwells sealed with lipid bilayers”, ISOME2014, May 15, 2014, Tokyo University of Agriculture and Technology

(Koganei, Tokyo).

Nahoko Kasai, Rick Lu, Touichiro Goto, Yoshiaki Kashimura, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, “Neuronal growth on nano-pillar substrates”, 26th European Conference on Biomaterials, Aug. 31, 2014, Liverpool (UK).

Aya Tanaka, Hiroshi Nakashima, Yoshiaki Kashimura, Koji Sumitomo, “Formation of a gel-supported lipid membrane array on a micropatterned substrate”, Bioohys. Soc. 58th Annual meeting, Feb. 15-19, 2014, San Francisco (USA).

Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Koji Sumitomo, “Platform for low noise biosensors using microwells sealed with lipid bilayers”, 26th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Nov. 5-8, 2013, Royton Sapporo (Sapporo, Hokkaido).

Koji Sumitomo, Nahoko Kasai, Yoshiaki Kashimura, Aya Tanaka, Touichiro Goto, Azusa Oshima, Shingo Tsukada, Hiroshi Nakashima, “Nanobiodevice for mimicking synaptic connections”, ACSIN-12 /ICSPM-21, Nov. 4-8, 2013, Tsukuba International Congress Center (Tsukuba, Ibaraki).

Koji Sumitomo, Nahoko Kasai, Aya Tanaka, Yoshiaki Kashimura, Touichiro Goto, Azusa Oshima, Shingo Tsukada, “Nanobiodevice that consists of membrane proteins and an artificial lipid bilayer”, EMN Fall meeting, Dec. 7-10, 2013, Orlando (USA).

Yoshiaki Kashimura, Ruaridh Forbes, Yukihiro Tamba, Koji Sumitomo, Keiichi Torimitsu, “Controlling manipulation, stimulation, and rupture of giant unilamellar vesicles on Si substrate for lipid bilayer array”, MRS Spring meeting, Apr. 1-5, 2013, San Francisco (USA).

Koji Sumitomo, “Nanobiodevice for mimicking synaptic connections”, ISPlasma2015/IC-PLANTS2015, Mar. 26-31, 2015, Chubu Univ. (Nagoya, Aichi). (招待講演)

住友弘二, 河西奈保子, 「膜タンパク質で機能するナノバイオデバイス」日本学術振興会、薄膜131委員会/半導体界面制御技術第154委員会合同研究会、2015.2.24. アジュール竹芝(東京)(招待講演)

住友弘二, 田中あや, 櫻村吉晃, 河西奈保子, 大嶋梓, 後藤東一郎, 塚田信吾, 中島寛「膜タンパク質で機能するナノバイオデバイスの構築」有機分子・バイオエレクトロニクス研究会、2014.3.5. 東京大学(東京)(招待講演)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 3件)

名称: プロテインチップの製造方法およびプロテインチップ
発明者: 田中あや、大嶋梓、住友弘二、手島哲彦
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2014-260861
出願年月日: 2014年12月24日
国内外の別: 国内

名称: 脂質二分子膜基板
発明者: 櫻村吉晃、大嶋梓、住友弘二、中島寛
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2015-161218
出願年月日: 2015年8月18日
国内外の別: 国内

名称: 脂質二分子膜基板、及びその製造方法
発明者: 大嶋梓、住友弘二、櫻村吉晃、中島寛
権利者: 日本電信電話株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2016-015803
出願年月日: 2015年12月16日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻村吉晃 (KASHIMURA, Yoshiaki)
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・研究主任
研究者番号: 90393751

(2) 研究分担者

住友弘二 (SUMITOMO, Koji)
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・主幹研究員
研究者番号: 30393747

塚田信吾 (TSUKADA, Shingo)
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・上席特別研究員
研究者番号: 80454205