

令和元年6月9日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03541

研究課題名(和文)分子ボトムアップテクノロジーによる神経シナプス形成

研究課題名(英文)Artificial synapse formation by molecular bottom-up technology

研究代表者

河西 奈保子(Kasai, Nahoko)

首都大学東京・大学教育センター・教授

研究者番号：50393749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では(1)ナノピラーを用いた神経細胞の軸索の誘導制御(2)マイクロウェル構造および架橋膜の最適化(3)シナプス関連因子の導入、という3つの要素技術を並行して進め、神経細胞との人工的なシナプスの形成を目指した。ナノピラーを用いることで神経細胞の突起の誘導を行い、ピラーへの分子修飾による細胞の機能発現の可能性を見出した。マイクロウェルにおいては、架橋する自立膜のドメイン構造の形成と安定化を実証し、シナプス関連因子を強制発現した出芽ウイルス粒子の作出にも成功した。基板上へのウイルス粒子のパターニングにより細胞の誘導制御を行えたことから、神経細胞の機能発現の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞のパターニングは、機能発現という目的では行われていなかった。本プロジェクトでは、前述したそれぞれの要素技術を大きく発展させることができた。ナノピラーを用いることで細胞の機能発現を示唆する結果を得た。マイクロウェルの構造および架橋自立膜におけるドメイン構造の最適化に成功し、膜タンパク質の架橋自立膜への効率的な再構成が可能となった。出芽ウイルス粒子は、これまでベシクルとして扱われていたが、平面状に再構成した膜タンパク質としての可能性が広がった。これらは産業的にも様々な分野で活用できる基礎技術であり、神経細胞の機能発現という本目標以外に、様々な分野での発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was proceeded by solving the following three issues; (1) Control of neurite growth using nanopillars, (2) optimization of microwell structures and the control of domain structure in suspended lipid bilayers and (3) introduction of synapse related factors onto the lipid bilayers. Neurites growth was successfully controlled on nanopillar substrates, and the chemical modification of the pillars suggested functional modification of neurites. The domain structures in the suspended lipid bilayer over the microwell were also optimized to be stable. Budded vesicles, overexpressed with synapse related factors, were also successfully formed. By patterning of these BVs on substrates enabled neuronal patterning, suggesting the possibility of functional expression in neurons.

研究分野：ナノバイオ

キーワード：人工シナプス 神経成長制御 ナノピラー シナプス形成因子 出芽ベシクル

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の情報伝達のしくみの理解は脳機能の解明につながるものであり、学術的にも医学的にも意義が高い。シナプスの情報伝達は、主に形態形成・機能発現・機能維持の3過程に分類される。それぞれの過程において異なるタンパク質が相互作用・情報処理を行い、複雑なプロセスを経て、情報伝達能力を発現し、記憶や学習などの脳機能に大きく関与する。それゆえシナプスの構造・機能の理解は記憶・学習のメカニズムの解明につながる。しかしながら、これらの過程が分子レベルで発現制御しているのかということを確認する分子ボトムアップ的な検討は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、分子ボトムアップテクノロジーにより神経細胞との人工的なシナプスの形成を目指す。ポストシナプスを模倣した微細加工技術を用いて作製したマイクロウェル構造（微小井戸型構造）の開口部を架橋し封止する脂質自立膜中にシナプス形成因子を集積化し、誘導した神経細胞の軸索末端との間のシナプス結合形成を実現する。（図1）さらに、人為的に発現再構成したシナプス形成因子の種類により、その機能を制御する。

分子レベルで制御した人工デバイスと、ラット神経細胞との間にシナプス結合を実現することにより、人工シナプス作製を通してシナプス結合形成メカニズムの理解を直接的に推し進める。これは、シナプス形成因子の探索プラットフォームの構築、神経・工学・医学分野での新規な技術の実現を目指すものであり、神経疾患の新しい治療法に繋がると考えられる。

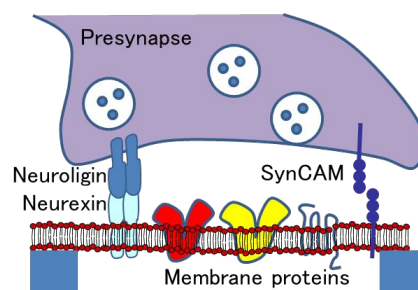


図1 人工シナプスの概念図。

3. 研究の方法

本研究では、新規インターフェース(人工ポストシナプス)としてマイクロウェル構造と、神経細胞から成長した神経突起とのシナプス形成を試みた。

ポストシナプスでは、プレシナプスからの信号を取得するための受容体タンパク質・受容体からのシグナル伝達の下流にある様々なタンパク質・細胞骨格などの因子が無数に存在し連携して機能している。そのためシナプス機能を構築するためには、人工ポストシナプスにそれらの因子を封入・機能させる必要がある。マイクロウェル構造は、ウェルの開口部を脂質自立膜で封止し、その脂質膜内で膜タンパク質が活性を保持するため、まずシナプス形成因子をボトムアップ的にマイクロウェル構造へ埋め込むための方法を検討した。一方、ラット神経突起末端を、作製した人工ポストシナプス上へ誘導するために、脂質支持膜で覆われた基板上へ細胞を成長させる必要があるが、人工脂質膜上で神経細胞の成長は困難である。そのため、ナノピラー基板を用いることで、脂質支持膜と細胞とが接することがない環境を構築した。（図2）

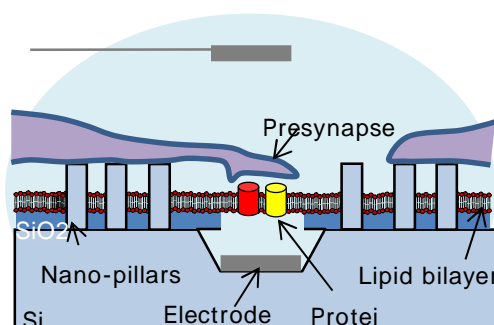


図2 ナノピラー上に細胞を誘導する

以上のストラテジーをふまえ、研究は以下3つの分野を分担して進めた。（1）ナノピラーを用いた神経細胞の軸索末端の誘導制御。（2）人工ポストシナプス構築のためのマイクロウェル構造の構築。（3）分子ボトムアップテクノロジーによるシナプス形成因子導入手段として出芽ウイルス粒子の作出とその機能確認。これらの基礎技術の検討により、マイクロウェル構造に基づく人工シナプス結合を目指した。

4 . 研究成果

(1) 神経突起の成長制御

マイクロウェルの開口部でタンパク質を再構成するために用いる脂質膜上には神経細胞が成長しないことから、神経細胞をマイクロウェルまで誘導するために、ピラーを用いて脂質膜とは接触しない環境を構築し神経細胞を成長させた。自発展開により脂質支持膜を作製した a-Si ピラー基板において、脂質がピラー上部には展開していないこと確認し、ピラー上への選択的な神経成長に成功した(図 1)。さらに金ピラー基板を用い、ピラー上部のみ選択的に SAM 修飾を行うことで神経成長の選択性を向上した。ここでは、ピラー基板における神経細胞とナノ加工基板との親和性を検討するための要素技術として、ピラー基板における神経細胞の蛍光観察技術および、FIB/SEM による界面の観察技術を構築した。

また、ピラーについては材料・直径・間隔の異なる基板を作製し、神経細胞成長を検討した。さらにピラーとマイクロウェルの混在するピラー/マイクロウェルハイブリッドチップについては、電子ビーム描画・エッチング・材料の堆積技術を駆逐することで、ガラスおよびシリコン基板上に、数 μm 直径のウェルアレイを、ピラーアレイから数 μm の位置に作製することに成功した。(図 4)

(2) 神経突起のシナプス形成因子による影響

成長した神経細胞のシナプス形成因子による影響について基礎検討を行った。シナプス形成因子である細胞接着分子 1 に着目し、基板上に金をパターンニングし、チオール SAM を介して抗体を結合し、神経細胞を培養した際の神経細胞の成長に与える影響について光学顕微鏡および SEM により検討した。コントロール基板では細胞がランダムに成長したのに対し、細胞接着分子 1 基板では抗体を結合した範囲で細胞が選択的に成長することがわかり、神経との親和性の向上が示された。(図 5 上)

さらにピラー上に抗体を修飾した場合は、ピラー上の神経突起の形態に変化が確認された。(図 5 下) そのときの神経突起のタンパク質発現を超解像顕微鏡による検討したところ、シナプス形成タンパクの発現が増加している様子が見られたが、より詳細な検討のためには試料調整の最適化が必須であることが分かった。

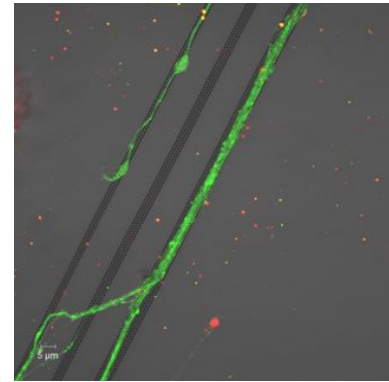


図 3 ピラー上に成長した神経突起の蛍光顕微鏡像。(G:tau , R:脂質 , ピラー直径 500nm , パターン幅 2 ~ 10 μm)

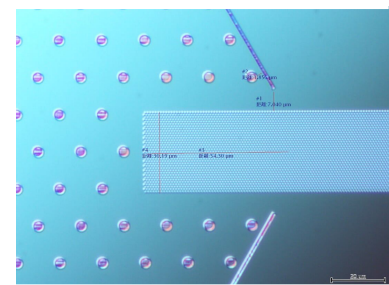


図 4 ピラー/マイクロウェルハイブリッド基板。(ピラー直径 500nm , ウェル直径 4 μm)

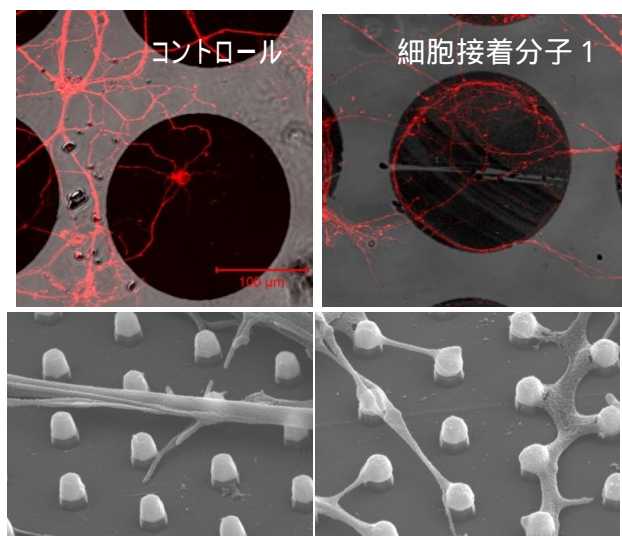


図 5 細胞接着分子 1 による神経成長への影響。(上 : 金パターン直径 200 μm , 下 : ピラー直径 500nm)

(3) 出芽ウイルス粒子の作出および脂質膜への融合 :

マイクロウェル構造ヘシナプス形成因子を導入する手段として、バキュロウイルス由来の出芽ウイルス粒子を用いた。まず動物種やバイオリソースからの cDNA 入手可能性等を参考にしながら、神経シナプスの細胞接着性膜タンパク質の一群から、人工シナプス構築のキーとなる数種類のターゲットタンパク質を選択し、発現に必要な組換えバキュロウイルスの作出を行った。また、蛍光タンパク質の融合タグを持つインテグリンを発現したウイルス粒子を用いて GUV 膜への膜融合を確認した。

シナプス関連因子のうち、ラットのカドヘリン 2、ならびに、細胞接着分子 1 について、全長のもの、ならびに C 末端に蛍光タンパク質を融合したものを提示する組換えバキュロウイルスを得た。感染させた Sf9 細胞の検鏡から、後者の発現細胞において細胞質の分離が阻まれた形態が認められることが分かり、発現したタンパク質の機能評価の一方法となることが示唆された。さらに Sf9 細胞の検鏡を進めたところ、2 種類の間で細胞レベルでの感染後の分裂途中において接着挙動に起因すると考えられる、形態的に明瞭な差異が認められることを確認したことを発表した。

また、波長の違う 2 種の蛍光タンパク質をそれぞれ融合・提示した出芽ウイルス粒子を得るとともに、細胞レベルでの機能発現の検討、およびウイルス-脂質膜融合による膜への移行挙動を、人工ベシクル (リボソーム) および脂質支持膜を用いて、顕微鏡観察した。さらに、細胞接着分子 1 の出芽ウイルス粒子の脂質支持膜への融合挙動について脂質や溶液の条件を変え検討を行った。

一方、出芽ウイルス粒子の SLB、井戸型自立膜や SAM との融合条件の比較検討のため、自立膜を有するリン脂質ベシクル (リボソーム)、とくに光学・蛍光顕微鏡による直接観察が可能な巨大単層ベシクル (Giant Unilamellar Vesicle : GUV) を標的とした出芽ウイルス粒子の膜融合実験を行った。GUV 膜へのウイルス融合による蛍光シグナルの移行、分布状況から、融合を効率的に引き起こすために好ましい脂質条件や溶液条件などを調査し、情報共有することで前記の分子膜との類似点・相違点を考察した。また、出芽ベシクル粒子の融合特性に関する知見を用い、基板上に作成した脂質支持膜へ細胞接着分子 1 を発現した出芽ベシクルの融合実験を行った。脂質支持膜への融合挙動について脂質や溶液の条件を変え検討、AFM による観察を行ったところ、リボソームへの融合の pH 依存性とほぼ一致することを確認した。

(4) マイクロウェル構造および自立膜の最適化 :

シナプス形成因子である細胞接着因子は膜タンパク質であり、脂質膜に再構成したうえで機能を果たす。人工シナプスとして想定しているマイクロウェル構造において、それらのタンパク質の再構成・タンパク質の機能化を制御することを目的として、マイクロウェルを架橋する自立膜におけるラフト様のドメイン構造形成とその安定化を検討した。自立膜においてはより流動性の高い無秩序相の方が安定に存在する。無秩序相を形成する不飽和脂質の量を制限することで、自立膜におけるドメイン構造の形成と安定化を実証した。

一方、脂質の相分離のダイナミクスに関する詳細な検討を行うため、脂質支持膜における脂質分子の側方拡散とラフト様ドメイン形成について検討した。光退色後蛍光回復法 (FRAP) の解析を通して、ミクロンオーダーの微小領域における側方拡散の解析モデルを提案し、微小井戸を架橋する脂質二分子膜の解析に適用した。

続いて、ベシクル融合やタンパク質再構成に重要な役割を果たす脂質膜ドメインの制御を試みた。特に、マイクロウェルを架橋する自立膜において、基板支持膜と自立膜の間の脂質の側方拡散を通したドメイン形成・消失についてモデルを提唱するとともに制御方法を検討し、タンパク質の融合制御の可能性についても思量した。

(5) 出芽ウイルス粒子による細胞成長への影響 :

出芽ウイルス粒子由来の細胞接着因子 1 を用いた場合の神経細胞の成長・機能への影響を検討した。基板の上に複数の方法で組換え体出芽ウイルス粒子を固定し、AFM による観察により、単一ウイルス粒子が固定されている場合、および、基板上で融合して支持膜様に固定している場合があることが確認された。続いてウイルス粒子の基板へのパターンニングを行った。さらに、神経細胞成長への影響についても検討し

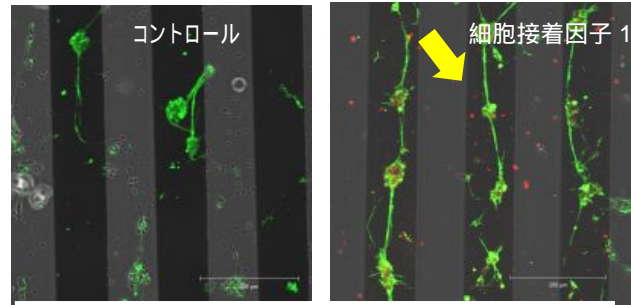


図 6 基板上にパターンニングした細胞接着分子 1 発現 BV による神経成長制御。(Line/space 100/100um)

たところ、金パターン上に接着したウイルス粒子に沿って細胞のパターンニングができることが確認された。出芽ウイルス由来の膜タンパク質を基板上に配置、パターンニングすることで、神経細胞の成長制御に有用な基板を形成することが可能であることが示された。(図 6)

5 . 主な発表論文等

1. Aya Tanaka, Yuki Fujii, Nahoko Kasai, Takaharu Okajima, Hiroshi Nakashima Regulation of Neuritogenesis in Hippocampal Neurons using Stiffness of Extracellular Microenvironment. PLoS ONE 13(2): e0191928 (2018).
2. Yuto Nakatani, Kano Kawahara, Koki Harada, Azusa Oshima, Hiroshi Nakashima, Koji Sumitomo, Control of Phase Separation in Freestanding Lipid Bilayer over Microwells. Jpn. J. Appl. Phys. (Accepted)
3. 住友弘二, 大嶋梓, 中島寛, 原田幸輝, 中谷悠人, 「マイクロウエルを架橋する脂質膜の側方拡散と相分離」, 応用物理学会 有機バイオエレクトロニクス分科会 会誌 28(2), 52-55 (2018).
4. Koji Sumitomo and Azusa Oshima, Liquid-Ordered/Liquid-Crystalline Phase Separation at a Lipid Bilayer Suspended over Microwells. Langmuir 33, 13277-13283 (2017).
5. Misako Nishigami, Takaaki Mori, Masahiro Tomita, Kingo Takiguchi, Kanta Tsumoto, Membrane fusion between baculovirus budded virus-enveloped particles and giant liposomes generated using a droplet-transfer method for the incorporation of recombinant membrane proteins. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces : 155 , 248-256 (2017).
6. Kanta Tsumoto, Kenichi Yoshikawa, The Aqueous Two Phase System (ATPS) Deserves Plausible Real-World Modeling for the Structure and Function of Living Cells. MRS Advances : 2, 2407-2413 (2017).
7. Nahoko Kasai, Rick Lu, Roxana Filip, Toichiro Goto, Aya Tanaka, Koji Sumitomo Neuronal growth on a-Si and Au nanopillars. Electrochemistry, 84(5), 296-298 (2016).
8. Nahoko Kasai, Nano-biointerfaces for detection and controlling of biological information. Electrochemistry, 84(9), 688-694 (2016).
9. Toichiro Goto, Nahoko Kasai, Rick Lu, Roxana Filip, and Koji Sumitomo, SEM observation of interface between single neurons and conductive surfaces, J. Nanosci.

Nanotechnol. 16, 3383-3387 (2016).

10. Tomomi Hattori, Kohei Nakanishi, Takaaki Mori, Masahiro Tomita, Kanta Tsumoto
The method used to culture host cells (Sf9 cells) can affect the qualities of baculovirus budding particles expressing recombinant proteins. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 80(3), 445-451 (2016).

[雑誌論文] (計 23 件)

[学会発表] (計 82 件)

[図書] (計 0 件)

[その他] 受賞 2 件

・応用物理学会 2018 年秋季学術講演会 Poster Award

「ナノピラーの化学修飾による神経細胞の制御の試み」

河西奈保子, 田中あや, 手島哲彦, 住友弘二, 中島寛

・電気学会 平成 30 年電子・情報・システム部門 技術委員会奨励賞

「マイクロウェル架橋膜におけるラフト様構造の制御」

中谷悠人

(受賞対象論文共著: 川原香乃, 原田幸輝, 佐藤寿樹, 森本凌, 大嶋梓, 中島寛, 住友弘二)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河西 奈保子 (Nahoko Kasai)

(2015 ~ 2017 年度)

首都大学東京 大学教育センター・教授

田中 あや (Aya Tanaka)

研究者番号 : 50393749

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・研究員

研究者番号 : 80564278

(2)研究分担者

住友 弘二 (Koji Sumitomo)

(2015 ~ 2017 年度)

兵庫県立大学 工学研究科・教授

大嶋 梓 (Azusa Oshima)

研究者番号 : 30393747

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・研究員

研究者番号 : 90751719

湊元 幹太 (Kanta Tsumoto)

三重大学 工学研究科・准教授

研究者番号 : 80362359

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。