

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19201028

研究課題名（和文） イオンチャンネルバイオセンサーの単一神経細胞解析への応用

研究課題名（英文） Application of ion channel biosensor to single neural cell analysis

研究代表者

宇理須 恒雄 (URISU TSUNEO)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授

研究者番号：50249950

研究成果の概要（和文）：プレーナー型 パッチクランプ技術を単一神経細胞の機能解析に応用する目的で、要素技術開発を進めた。培養型のプレーナー型素子を開発しホールセルモードでのリガンド刺激電流の観測、高効率光感受性イオンチャンネルを HEK293 に遺伝子導入しクローニングを達成、神経細胞ネットワークを形成し ChR2 の遺伝子導入技術を確立、高喚声電極を開発、レーザー光刺激による活動電位発生技術を開発、と必要な要素技術をすべて達成。

研究成果の概要（英文）：We have developed the elementary technology necessary to apply the planer patch clamp technology to the single neural cell analysis. Incubation type planar patch clamp device was developed and (1) Ligand gated ion channel current measurement by whole cell mode was attained, (2) Transfection of photosensitive ion channel to HEK293 and cloning were attained, (3) Neural network was formed and photosensitive ion channel was transfected, (4) Highly stable electrode of planar patch clamp was developed, and (5) Generation of active potential by laser irradiation was attained. All necessary elementary technologies were successfully developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	13,300,000	3,990,000	17,290,000
2008 年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
総計	36,800,000	11,040,000	47,840,000

研究代表者の専門分野：ナノバイオデバイス、物理化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロナノデバイス

キーワード：プレーナーパッチクランプ、光感受性イオンチャンネル、神経細胞ネットワーク、マイクロ流路、ChR2、ホットエンボス

1. 研究開始当初の背景

生体回路と Si 電子回路の融合の概念は 10 年ほど以前から提案されており、Peter Fromherz の優れた多数の業績がある（同氏の解説、Neuroelectronic Interfacing: Semiconductor Chips with Ion Channels, Nerve Cells, and Brain, in “Nanoelectronics and Information

Technology” 781-810, Editor R. Waser, Wiley-VCH Verlag: Berlin, 2003、に詳しい）。また、最近では、さらに高度なナノテクを駆使した Charles M Lieber グループの研究（例えば、Nature Biotechnology, 23 (2005) 1294, Science, 313 (2006) 1100) がある。国内でもこのテーマは 10 年以上前

から現在に至るまで、川名明夫、鳥光慶一、神保泰彦など NTT のグループにより優れた研究がなされている（例、J. Neurophysiology 70 (1993) 1606）。これらの研究については、しかし、膜電位観測が中心で、神経伝達物質観測は全くなされていない。他方チャンネル電流観測や神経伝達物質観測については、神経伝達物質をイオンチャンネルを利用して検出するバイオセンサーの研究が古くから有り、特に最近では、ピペットパッチクランプの弱点である“小型化や多点観測が出来ない”と言う問題を克服するものとして、プレーナーパッチクランプの研究が活発である（例：F. J. Sigworth et al., IEEE Trans. Nanobioscience 4, (2005) 121 他多数）。なぜ前者の研究者たち、即ち、生体回路と Si 電子回路の融合集積回路に関心をもつ研究者が、神経伝達物質観測も取り入れた素子の研究をこれまでしなかったのか？ 推測される理由の一つとしては、プレーナー型パッチクランプ素子の製作がかなり難しく、その上先駆的なプレーナー型パッチクランプの研究者の間では“Si 基板は雑音が大きいの材料として良くない”と言うことが定説に近いまでになっていた事（例 N. Fertig et al., Phys. Rev. E 64 n(2001) 040901-1）によるのではないかと考える。

このような状況の下で、代表者は、約 5 年まえからイオンチャンネルバイオセンサーの研究を開始し、平成 18 年に、TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いカプサイシンによるリガンド刺激電流の観測に成功した。また、SOI 基板を用いることによりプレーナー型パッチクランプ素子の電流雑音を大幅に低減出来ることを実験と理論により証明した。これにより、膜電位観測のみでなく神経伝達物質観測も取り入れた素子の研

究をする展望が初めて明確に開けたと考える。

2. 研究の目的

本提案代表者は、Si の SOI 基板を用いることにより、プレーナー型イオンチャンネルバイオセンサーを製作し、低雑音でのリガンド刺激イオンチャンネル電流の Si 基板での観測に世界で初めて成功した。本研究では、この成果をベースに、培養した単一神経細胞について、従来からの膜電位観測に加え、これまでになされたことのないイオンチャンネルによる神経伝達物質観測を加え、神経細胞の機能の解析を行う。とくに生体系の場合新陳代謝や成長という回路構成の時々刻々の変化がある点が Si 電子回路系との大きな違いで、このような構造と機能の経時変化の観測に着目して研究を行う。マイクロ流体回路内に位置を指定して細胞体を置き、樹状突起や軸索を方向を指定して伸長させる技術を確立し、所定の位置に、膜電位を観測する電極を配置し、かつ神経伝達物質を観測するパッチクランプセンサーを配置した素子を製作する。また、これらの電気計測に必要な電子回路装置を設計製作する。これにより、神経細胞の成長に伴う、特にシナプス形成時の膜電位信号伝搬特性や神経伝達物質信号の変化を単一神経細胞レベルで調べ、神経細胞の基本的性質を明らかにする。また、電気刺激を与えることによる神経細胞の成長への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プレーナー型パッチクランプセンサーの開発、改良：神経細胞をセンサー細胞として利用できるためには培養機能が必要であることから、培養機能を有するセンサーを開発し、さらにプレーナー型の特徴を反映した多点計測型を開発する。分子研装置開発室の

協力を得て、種々のナノマイクロ加工技術を駆使して進める。

(2) マイクロ流体回路の設計製作、パッチクランプ技術の核心である、微細貫通孔に細胞を設置することが最も重要な技術課題である。この問題を解決するため、マイクロ流体回路を基板表面に形成し、さらに細胞外マトリックスのパターンニング技術を駆使して、細胞のパタンニング技術の確立を目指す。

(3) 電子回路系の設計と製作、多点計測に向けたチャンネル電流計測のための電子回路を、分子研装置開発の協力を得て開発する。

4. 研究成果

(1) イオンチャンネルバイオセンサー開発

イオンチャンネルの特性を計測する装置として最も良く知られているものは、ピペットパッチクランプがある。これは現在電気生理学の最も重要な計測装置の一種であるが、高度な手技を必要とする以外に、装置が大型であるため、ハイスループットスクリーニング応用が困難であるという問題を有する。神経細胞ネットワーク素子開発においてにおいても、伝搬する活動電位信号の受信素子としてもイオンチャンネルバイオセンサーは重要であるが、ピペットパッチクランプでは小型集積化が困難となる。そこで我々は、小型集積化が容易なプレーナー型のパッチクランプ素子を開発した。プレーナー型の素子自体は数年前に提案され、スクリーニング装置として実用化しているが、現在実用化している装置は培養機能を有しないため、神経細胞への適用が不可能である。我々は、これを改良し、培養機能を有するプレーナー型のパッチクランプ素子の開発に成功した(図 1)

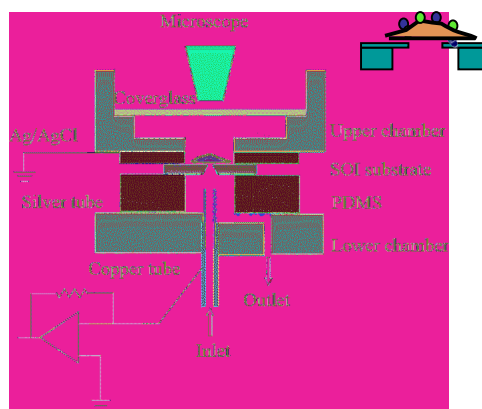


図 1 開発した培養機能付きプレーナーパッチクランプ素子の概念図。

(2) チャンネルロドプシンの遺伝子導入と光刺激による伝達信号発信。

チャンネルロドプシンは光刺激によりチャンネルを開き非選択的にカチオンを通すため、高い空間分解能と時間分解能で、神経細胞の興奮を誘起できるとして、最近注目を集めている。われわれは、神経細胞にこれを発現し、シナプスを介した信号の送信と受信を行う (図 2) ことを考え、ウイルスを利用した神経細胞への遺伝子導入を行った。また、レーザー刺激により、活動電位を発生させることにも成功した。

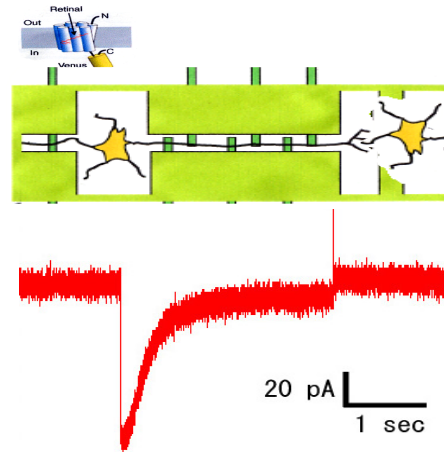


図 2 シナプスを介した神経細胞間の信号の送受信の概念図と、チャンネルロドプシンを遺伝子導入した C2C12 細胞にレーザーを照射し、観測されたイオンチャンネル電流。

(3) 多チャンネル神経細胞ネットワーク素子開発をめざした、プラスチック基板の

開発。

これまでに、発信器と受信機という要素技術を開発し、現在これらを組み合わせた神経細胞ネットワーク素子の開発を進めた。マウス海馬の神経細胞を用いてネットワーク回路を製作した例を図3に示す。このような神経細胞回路に発信機能と受信機能を搭載したものを製作する予定である。これまでの単体素子では、成熟した微細加工技術のある Si 基板を用いてきたが、将来の多チャンネル化、高機能マイクロ流路の導入などを考えると、プラスチック基板の開発はきわめて重要であると考えた。これまで上面にマイクロ流路構造を、下面にセンサーとして必要な電極構造を有する基板の開発を、先に述べた、各種の精密加工技術を組み合わせて開発した。開発した製作工程を図4に示す。両面エンボスを主要な技術とし、電極構造側の金型は、サブミクロンからナノレベルの精度が必要で、超精密多軸加工機が必須である。また上面のマイクロ流路構造の形成は、機械加工による金型の製作は難しく、フォトリソグラフィにより形成したレジストパターンを利用した電鍍加工により製作した。

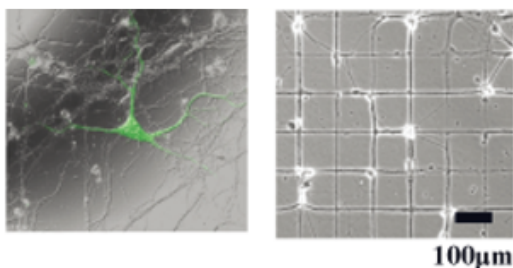


図3 マウス海馬の神経細胞のディッシュでの培養(左)(生理学研究所、深澤有吾先生提供)と細胞外マトリックスを印刷してパターン化培養したもの(右)

最後にセンサー構造として必要な微細貫通孔の形成には基板として PMMA を使用し、

LIGA プロセスにより形成した。

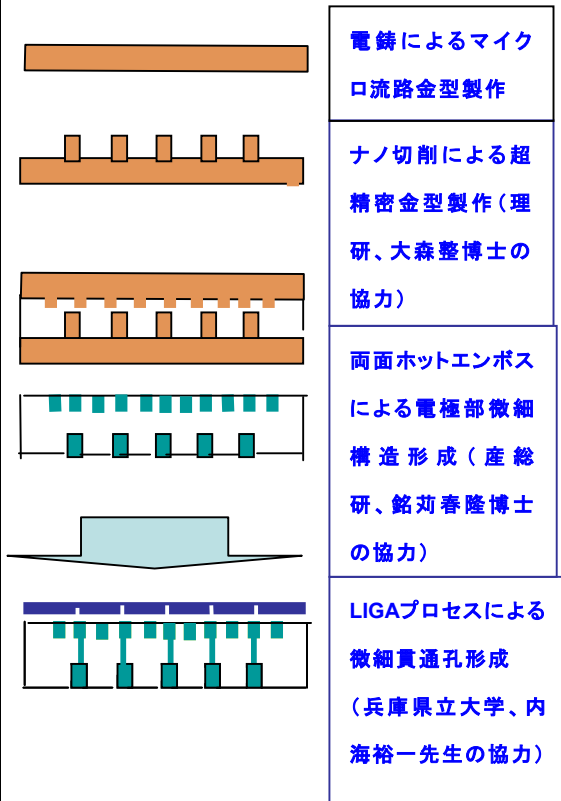


図4 両面ホットエンボスによる神経細胞ネットワーク素子基板の製作工程。(分子研装置開発室、高田紀子、青山正樹、鈴木光一、水谷伸雄氏らの協力により開発した)。

エンボスの上下のモールドの位置合わせ、また、上部のマイクロ流路と微細貫通孔との位置合わせなど、正確な位置合わせも重要な技術課題で現在開発中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件) すべて査読あり

- ① Zhiguo Shang, Yanli Mao, Ryugo Tero, Tyuji Hoshino, Motohiko Tanaka, Tsuneo Urisu, “Clustering effects of GM1 and formation mechanisms of interdigitated liquid disordered domains in GM1/SM/CHOL-supported planar bilayers on mica surface”, Chem. Phys. Lett 497 (2010) 108-114.
- ② Tingchao He, Changshun Wang, Tsuneo Urisu, Takeshi Nagahiro, Ryugo Tero,

- Rong Xia, "The PDMS-based microfluidic channel fabricated by synchrotron radiation stimulated etching", *Optics Express*, 18 (2010) 9733 – 9738.
- ③ Yanli Mao, Zhiguo Shang, Yosuke Imai, Tyuji Hoshino, Ryugo Tero, Motohiko Tanaka, Naoki Yamamoto, Katsuhiko Yanagisawa, Tsuneo Urisu, "Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerate A β oligomerization", *BBA Biomembranes*, 1798 (2010) 1090-1099.
- ④ Tsungyi Chiang, Tetsuya Makimura, Tingchao He, Shuichi Torii, Tomoko Yoshida, Ryugo Tero, Changshun Wang and Tsuneo Urisu, "Synchrotron-radiation-stimulated etching of polydimethylsiloxane (PDMS) using XeF₂ as a reaction gas" *J. Synchrotron Rad.* 17 (2010) 69-74.
- ⑤ R. Tero, T. Ujihara, T. Urisu, "Shape Transformation of Adsorbed Vesicles on Oxide Surfaces: Effect of Substrate Material and Photo-Irradiation", *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **34**, (2009) 183-188.
- ⑥ Toshifumi Asano, Takuya Nakamura, Akihiro Wakahara and Tsuneo Urisu, "Noise Property of Incubation Type Planar Ion Channel Biosensor", *Jpn. J. Appl. Phys.* **48** (2009) 027001-1-4.
- ⑦ Md. Abu Sayed, Hidetaka Uno, Kensuke Harada, Keiichi Tanaka, Yong-Hoon Kim, Yuichiro Nakaoki, Koji Okumura, Ryugo Tero and Tsuneo Urisu, "New Infrared reflection absorption spectroscopy (IRRAS) system for observation of solid-solution interface biomaterials" *Chem Phys. Lett.* **466** (2008) 235-239..
- ⑧ Ryugo Tero, Toru Ujihara and Tsuneo Urisu, "Lipid Bilayer Membrane with Atomic Step Structure: Supported Bilayer on a Step-and-Terrace TiO₂(100) Surface" *Langmuir* **24** (2008) 11567-11576.
- ⑨ Yanli Mao, Ryugo Tero, Yosuke Imai, Tyuji Hoshino, Tsuneo Urisu, "The morphology of GM1_x/SM_{0.6-x}/Chol_{0.4} planar bilayers supported on SiO₂ surfaces", *Chem. Phys. Lett.* 460 (2008) 289-294.
- ⑩ Tsuneo Urisu, Toshifumi Asano, Zhenlong Zhang, Hidetaka Uno, Ryugo Tero, Han Junkyu, Isoda Hiroko, Yusuke Arima, Hiroo Iwata, Koji Shibasaki, Makoto Tominaga: "Incubation type Si-based planer ion channel biosensor", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391** (2008) 2703-2709.
- ⑪ Toshifumi Asano, Hidetaka Uno, Koji Shibasaki, Makoto Tominaga and Tsuneo Urisu "A Cell Culture Type Planar Ion-Channel Biosensor" *Transaction of Materials Research Society* **33**, 767-770 (2008) .
- ⑫ R. Tero, T. Ujihara, and T. Urisu" Supported lipid bilayers membranes on SiO₂ and TiO₂: Substrate effects on membrane formation and shape transformation", *Proc. of SPIE* 6769, 67690J (2007).
- ⑬ Toshifumi Asano, Zheng Long Zhang, Hidetaka Uno, Ryugo Tero, Koichi Suzui, Satoshi Nakao, Takashi Kaito, Koji Shibasaki, Makoto Tominaga, Yuichi Utsumi and Tsuneo Urisu, "Fabrication of a planar type patch-clamp biosensor using

silicon on insulator substrate”, *J. Surf. Sci. Society Japan*. 28 (2007) 385-390.

- ⑭ Z.L. Zhang , T. Asano , H. Uno, R. Tero , M. Suzui, S. Nakao, T. Kaito, K. Shibasaki, M. Tominaga , Y. Utsumi, Y.L. Gao, T. Urisu · “Fabrication of Si-based Planar Type Patch-Clamp Biosensor Using SOI Substrate”, *Thin Solid Films* 516/9 (2007) 2831-2833.

[学会発表(国際会議の招待講演のみ)] (計5件)

- ① Tsune Urisu, “An in vitro neural network device as a useful research platform of neuro science and nanomedicine” The 2nd Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine” Feb. 24-25, 2011, Academia Sinica, Taipei.
- ② T. Urisu, "Development of planar patch-clamp type photostimulation neural cell network device", Japan-Taiwan Symposium on Nano-Medicine Research and Education, Kyoto, 25 January, (2010).
- ③ T. Urisu, "Development of Neural Network Devices as a New Methodology for Physical Chemistry Investigation of Neurocience and Neurodegenerative Diseases", The 2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences- Experiments and Simulations, Nagoya, 22-23 December, 2009.
- ④ T. Urisu, “Development of Planer type ion-channel biosensor” The 5th International Forum of Post-Genome Technologies (5thIFPT), September 10-11, 2007 Suzhou, China.
- ⑤ T. Urisu “Si based planer type ion-channel biosensor and its applications”, The 2007 International Conference on Solid State

Devices and Materials, September 19-21, 2007, Tsukuba.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：神経細胞機能解析素子およびイオンチャンネル電流の測定方法

発明者：宇理須恒雄、鈴木光一、青山正樹、高田紀子、王志宏、宇野秀隆、

権利者：大学共同利用機関法人自然科学研究機構

種類：特許出願

番号：2010-204326

出願年月日：2010年9月13日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇理須 恒雄 (URISU TSUNEO)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授

研究者番号：50249950

(2) 研究分担者

毛 艶麗 (MAO YANLI)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：80442531

(H19)

金 勇勲 (KIM YONGHOON)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：80509852

(H20)

(3) 連携研究者

手老 龍吾 (TERO RYUGO)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・助教

研究者番号：40390679

(H19:研究分担者)(H20→H21:連携研究者)

石井 清 (ISHII KIYOSHI)

中部大学・工学部・准教授

研究者番号：70410644

(H19:研究分担者)(H20:連携研究者)

浅野 豪文 (ASANO TOSHIFUMI)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：30552476

(H21)

永廣 武士 (NAGAIHIRO TAKESHI)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・特別協力研究員

研究者番号：40585113

(H22)