

人工シナプスで神経細胞とエレクトロニクスを直接配線する

Engineering of physiologically functional neuron-wire connections

2171016



研究代表者

北陸先端科学技術大学院大学

准教授

筒井 秀和

[研究の目的]

神経細胞の複雑なネットワークを活動電位が行き交い、そのダイナミックな変化は生物の知的で多様な行動の基礎をなしている。電子機器と生き物とでは電気信号の使われ方がまったく異なる。まず速さ。電子機器の最新のプロセッサではギガヘルツの周波数でクロックが作動しているが、神経活動電位の時間幅は1ミリ秒程度、周波数ではキロヘルツのオーダーであり、電気製品に比べて6桁も劣る。消費電力はこの逆で、神経細胞が情報処理に使うエネルギーはトランジスタのそれと比較して圧倒的に少ないと見積もられている。また損傷に対する耐久性も大きく異なる。多くの電気製品では素子や配線が僅か一つ、二つと壊れるとたちまち動作しなくなってしまうが、脳神経機能は非常にロバストで一部の神経細胞や繊維が機能不全に陥ったぐらいでは通常大勢に影響はない。脳神経系では電気信号はどのように利用され柔軟な機能を生み出しているのか？そしてこのようなシステムは系統発生や個体発生を通して如何に獲得されたのか？このような問い、すなわち生体における電気信号に基づいた情報処理の仕組みを理解しようとする事は、現代科学の究極的な試みの一つであろう。しかしながら現在ではその本質に迫ることは残念ながらもまだ難しい。

神経細胞の活動計測は、こうした精緻な仕組みを理解しようとする試みにおいて必要な要

素技術の一つである。この目的のために、細胞内刺入電極、パッチクランプ、細胞外ユニット記録などの電氣的測定法、電気感受性色素、カルシウムイメージング、GEVI (genetically encoded voltage indicator) などの光学的計測手法、そして脳波記録、近赤外イメージングやfMRI (機能的核磁気共鳴イメージング) などのより非侵襲な計測手法が考案されてきた。これらの計測手法はそれぞれ、異なる時間・空間スケールをその計測対象としている。しかしながら、こうした個々の技術がカバーし得る範囲は決して広くない。個々の計測手法は各々の優れた特徴を持つ一方で、多くの制約が残されている。例えば、パッチクランプ法には、単一細胞の活動を低ノイズ・高時間分解能で計測できるという利点がある。しかしこの手法は同時に、侵襲性が高い、並列での計測に不向き、そしてより本質的には細胞種特異性を直接的には備えていない、という制約がある。またGEVIは、近年、計測感度や時間分解能の点で大きく性能が向上してきているものの、広い3次元組織を高速撮像することの技術的困難さなどといった原理的な制約が残されている。

そこで本研究では、神経細胞の活動計測における新たな計測原理の探求を行う事を目的とした。具体的には、近年の研究で明らかにされてきたシナプス形成因子群が持つ生理活性を利用して、遺伝学的に既定された特定の細胞と微小電極との間に機能的な接合を形成し、細胞活動

の読み出しを行う基本技術の確立を試みた。将来的に、低ノイズ性、高時間分解能に加え、細胞選択性や並列計測への親和性を同時に満たす計測原理になる発展性を備えていると考えている。

[研究の内容, 成果]

1. 微小電極付き細胞培養チャンバーの作成

ホウケイ酸ガラス (Matsunami, 22×32 mm) にイオンビームスパッタリングシステム (EIS-220, Elionix, Tokyo) を用いて Cr, Au をスパッタし (厚さそれぞれ 30, 200 nm) フォトリソグラフィにより電極ライン, 外部との接続パッドなどをパターンニングし, さらにエポキシ系レジスト Su-8 3005 (MicroChem; 厚さ 5 μm) をパターンニングして絶縁層とした。ハードベイク (200°C; 10 min) を行ったあと, ホウケイ酸ガラス管 ($\phi 20$ mm, 高さ 5 mm) をポリジメチルシロキサンで接着し, ガラス管内側を細胞培養のためのスペースとした。作成したチャンバーの写真を図 1(a, b) に示す。使用前には, 全体をプラズマクリーナ (PDC-32G, Harrick Plasma, N. Y., USA) を用いて 5 分間程度プラズマ洗浄した。HEK293 や神経細胞の正常な培養が可能であることが確認できた (図 1c)。

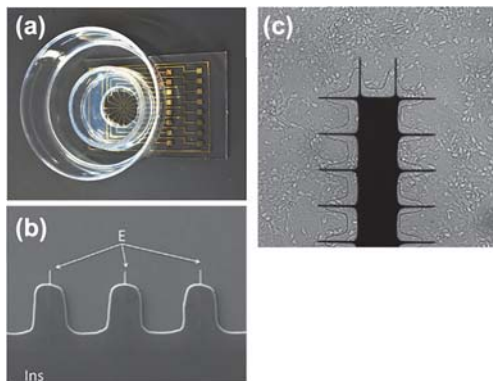


図 1 作成した細胞培養チャンバー

2. タンパク質の electrodeposition 法の確立

次に, electrodeposition による電極部へのタンパク質固定化手法の確立を行った。目的のタンパク質を緩衝液 (Hepes 20 mM, pH 9.0) に 0.1 mg/ml の濃度で調整した。このときの推定デバイ長は約 2.4 nm である。チャンバー部にタンパク質溶液を入れ, 銀・塩化銀電極を参照電極とし, 電極部に電圧パルスを加えることによりタンパク質を固定化した。デジタルソースメータ (Keithley 2401), マルチプレクサ (TC4053BP, Toshiba), 波形発生装置 (AWG-50, Elmos) をもちいて複数電極に対して異なるパラメータで固定化を行うためのコントローラを構成し, electrodeposition を行った (図 2a)。図 2b は, この方法によりプロテイン A を固定化し, YFP-Fc キメラタンパク質にてプロテイン A の蛍光検出を行った例を示す。電圧パルスを変化させることにより, 固定化

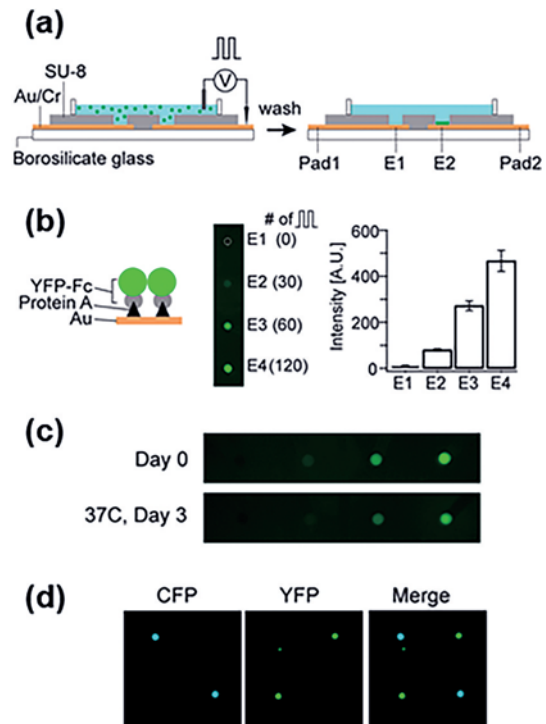
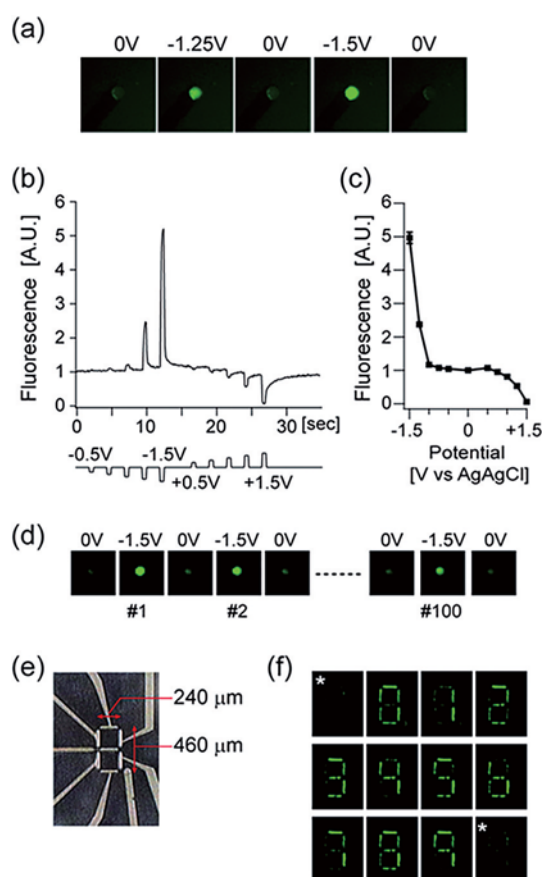


図 2 タンパク質の electrodeposition (a) 手法の概念図 (b) プロテイン A の固定化の様子。1.7 V (v.s. AgAgCl) : 100 ms の方形パルスをそれぞれ異なるパルス数印加した。棒グラフは蛍光強度をプロットしたもの。(c) プロテイン A を固定化すぐ (day0), または, 37 度の PBS 中で 3 日保存後に (day3), YFP-Fc キメラタンパク質で検出した例。(d) 4 電極のうち, CFP, YFP をそれぞれ対角上の 2 電極に固定化した例。(Farha et al, 2019 より引用改変)

するタンパク質の量を良く制御できることがわかった。Au 電極への固定化は物理吸着によるものであるが、十分に安定であった。図 2c はプロテイン A を固定化したのち、37 度の PBS 中にて 3 日間保存し、その後同様に蛍光検出を行った例である。さらに、固定後に緩衝液でチャンバーを洗い、固定化のプロセスを繰り返すことにより、個々の電極に異なるタンパク質を固定化する事も可能である。図 2d は CFP と YFP を対角線上の 2 電極に固定化した例を示す。

3. 蛍光タンパク質マイクロディスプレイ

タンパク質の electrodeposition 法を確立するうえで、観察が容易な蛍光タンパク質をモデルとして用いて各種実験パラメータの最適化等を行った。この際、冒頭に述べた研究目的の副産物的な成果として、興味深い効果を見出している。すなわち、蛍光タンパク質の固定化後に、チャンバーを緩衝液 (1 mM NaCl; 20 mM HEPES; pH 7.4) で満たし、銀・塩化銀電極に対して電圧印加を行うと、蛍光強度が可逆的に電圧依存的に変調される現象を見出した。(図 3a-c)。現象は可逆的であり、繰り返し効果を観察できることが分かった (図 3d)。そこで、この電圧依存的な蛍光変調を利用したマイクロセグメントディスプレイ (240×460 μm) の試作を行い (図 3e)、その安定的な動作にも成功した (図 3f)。更に、どのような蛍光変調のメカニズムが考えられるかを検討するために、一連の実験を行った。詳細はここでは立ち入らないが、1) 電圧依存的に吸着・脱吸着が起きているわけではない、2) 金属-溶液界面でおきる局所的な pH 変化では説明ができない、3) 電圧の効果は、少なくとも基底状態にある蛍光タンパク質にも作用する、4) HOMO-LUMO 間エネルギーに有意な変化は見られないことなどを明らかにした。物理化学的なメカニズムとしては、金属表面からの電荷移動や距離依存的な Forster 型エネルギー移動、金属効果による



(a) YFP を固定化した電極。蛍光観察する際に電圧印加を行った例。(b) 蛍光強度と印加電圧を時間に対してプロットした例。蛍光は、時間 0、印加電圧 0V で正規化してある。(c) 蛍光強度と電圧との関係。(d) の 100 回の繰り返し電圧印加に対する応答。(e, f) GFP に基づく 7 セグメントマイクロディスプレイの外観と動作。(Farha et al., 2019 より引用改変)。

図 3 蛍光タンパク質に基づくマイクロディスプレイ

放射減衰速度の変化などを想定しており、さらにより詳しいメカニズムを明らかにするための実験を計画している。

4. グルタミン酸電極の作成

次に細胞培養チャンバー内に神経伝達物質であるグルタミン酸検出センサーを構成できるかを確認するために、ヘキサクロリド白金酸白を電極上で還元し白金粒子を析出させ、そこにポリエチレンイミン、グルタミン酸オキシダーゼを滴下し、グルタルアルデヒドで架橋、固定化した。グルタミン酸はグルタミン酸オキシダーゼにより酸化されオキソグルタル酸となるが、この際に過酸化水素を生成する。過酸化水素は白金触媒のもと電極電位によって酸化または還

元され、電流として検出される。既知濃度のグルタミン酸を含む溶液を培養チャンバーに還流し、応答電流を計測したところ、 $\sim 2 \mu\text{M}$ の程度の検出力を十分に備えていることが確認できた。

5. シナプスオーガナイザーの固定化と選択的なシナプス誘導

本研究で確立したタンパク質の electrodeposition 法を用いて、微小電極細胞培養チャンバーの微小電極部にシナプスオーガナイザーの固定化を試みた。プロテイン A を同様に固定化し、興奮性神経細胞のシナプス後部に発現することが知られているシナプスオーガナイザー IL1RAPL1 と Fc ドメインのキメラタンパク質をプロテイン A に結合させ、固定化を行った。細胞培養液中での安定性を確認するために、10% 血清を含む最小必須培地中で 6 日間、37 度でインキュベートした。その後、リン酸緩衝液でチャンバーを洗浄後、PTP δ と蛍光タンパク質の融合体を数時間インキュベートし、蛍光観察を行った。PTP δ はシナプス前部に発現し、IL1RAPL1 と結合することが知られているオーガナイザーである。その結果、良好な蛍光シグナルが観察でき、IL1RAPL1 が安定的に固定化できていることが確認できた。IL1RAPL1-Fc 及び PTP δ は共同研究者の吉田博士（富山大）より提供を受けた。

次に、IL1RAPL1 を一部の電極に固定化した細胞培養チャンバーに、神経細胞を分散培養し、微小電極部への選択的なシナプス誘導を試みた。神経細胞の培養 5 または 6 日後にパラフォルムアルデヒドで固定し、シナプス前部のマーカーであるシナプシンに対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、IL1RAPL1

を固定化した電極には有意に強度の高いシナプスシグナルが現れ、IL1RAPL1 を固定化しなかった電極におけるシナプスシグナルは、バックグラウンドと同程度であった。これからのことから、IL1RAPL1 を固定化した電極に選択的にシナプス前部を誘導できていることが確認できた。

[今後の研究の方向, 課題]

本研究において、細胞培養チャンバー内に微小金属電極を作成し、タンパク質を安定的に固定化する手法を確立した。グルタミンオキシダーゼを用いて、神経伝達物質であるグルタミン酸のセンサーを構築すること、シナプスオーガナイザーを固定化して、神経細胞の微小電極上に接触した部位にシナプス前部を誘導することに成功した。今後の課題は、まずシナプスの機能性を確認することがあげられる。すなわち、シナプス誘導能をもち、かつ、グルタミンセンサーとして機能する微小電極部を構成し、自発的あるいは刺激により誘導されるトランスミッター放出を検出することを目指す。さらに、将来的には、容量結合的に直接電気活動を検出すること、オーガナイザーの分子改変、脳スライスあるいは in-vivo 標本に対して適応できる、刺入型の電極の作製も行っていく予定である。

[成果の発表, 論文等]

T. D. Farha, K. Hama, M. Imayasu, Y. Hiratsuka, A. Miyawaki, H. Tsutsui, "Electric-field control of fluorescence protein emissions at the metal-solution interface" *Appl. Phys. Express* (2019) doi.org/10.7567/1882-0786/ab1ff6