

氏 名 宇野 秀隆

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1540 号

学位授与の日付 平成24年9月28日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 神経細胞ネットワーク機能解析応用を目的とした培養型プレー
ナーパッチクランプイオンチャネルバイオセンサの開発

論文審査委員 主 査 教授 桑島 邦博
准教授 古谷 祐詞
教授 大島 康裕
教授 平本 昌宏
特任教授 宇理須 恒雄 名古屋大学
主任研究員 上野 祐子
NTT マイクロシステムインテグレーション研究所

論文内容の要旨

膜タンパク質は多くの疾患に関与し、全創薬ターゲットの 50%以上を占めるが、それ自身が分子の表面に疎水性領域を持ち、脂質二重膜と呼ばれる内部が疎水性の細胞膜の中に埋め込まれて初めてその生体機能を発揮できる。しかし、脂質二重膜は空気に触れると簡単に分解してしまうため、固体基板への集積が容易でない。そのため、医療応用や創薬に必要な実用的なバイオセンサやバイオチップが存在しないという問題を抱えている。特にイオンチャネルや G タンパク共役受容体は神経での信号伝達や細胞内信号伝達のキーコンポーネントとして生体機能維持に直接かかわっており、多くの重篤な神経系疾患や循環器系疾患などに関与するため、実用的なイオンチャネルバイオセンサの開発に対する国家的社会的な重要性と緊急性は明白である。本研究では平面型パッチクランプ技術を基盤とした培養型平面イオンチャネルバイオセンサを開発し、その有用性を実証した。

ピペットを用いたパッチクランプ測定装置は唯一の実用的なイオンチャネルバイオセンサとして電気生理学分野にて使用されているが、ピペットの位置合わせに熟練を要するうえ、測定系が大掛かりで、安定性も悪く、スクリーニングに必要な多点測定が不可能である。それに対し多点測定が可能で安定性も良いことが期待される、固体平面基板に微細貫通孔を形成し、そこにイオンチャネル発現細胞やイオンチャネルを脂質二重膜とともに集積した平面型の素子が開発された。しかし、一般に用いられている平面型の素子は培養機能がないため、細胞の長期観測や培養が必須の神経細胞に適用できないという問題がある。出願者の研究では培養機能を平面型パッチクランプ技術に加え従来の平面パッチクランプ法では不可能であった神経細胞の信号伝達機能の機構解明に応用可能なデバイスを開発した。

バイオセンサ素子に用いた平面基板材料として SiO₂ 層が挟み込まれた SOI(silicon on insulator) を用いた。基板の微細貫通孔は半導体プロセスにて用いられる TMAH(Tetramethylammonium hydroxide solution)による異方性ウェットエッチングと集束イオンビーム(FIB; focused ion beam)加工を用いた精密三次元加工法により作製した。培養型平面イオンチャネルバイオセンサはバイオセンサ素子の微細貫通孔によって結合した上下二つのチャンバーから構成されている。その微細貫通孔上に目的のイオンチャネルを発現した細胞をセンサ細胞として配置することによって培養型平面イオンチャネルバイオセンサは動作する。また、シール抵抗が低い場合、電解質溶液等の交換により電極周辺のイオン濃度に変化をきたし大きな電位変動を引き起こす。ピペットパッチクランプ法によるシール抵抗(1 GO 以上)と比較して出願者たちの培養型平面イオンチャネルバイオセンサはシール抵抗(5-30 MO)が低い。これは電気雑音の観点において非常に大きな障害となる。しかし、出願者たちは、シール抵抗と雑音との関係を明らかにし、塩橋型電極を使用して電極電位変動を抑制することにより、十分にこの短所を克服することに成功した。塩橋型電極により、シール抵抗の低さは、培養型平面イオンチャネルバイオセンサの電気生理現象適用の

致命的な欠陥ではなくなった。

培養型平面イオンチャンネルバイオセンサの核となる細胞のセンサ素子上での培養技術の開発を行った。培養型平面イオンチャンネルバイオセンサを使用したイオンチャンネル電流記録を行う場合、目的となるイオンチャンネルを遺伝子発現した細胞をバイオセンサ素子の微細貫通孔上に配置する必要がある。バイオセンサ素子上にて培養を行うため、微細貫通孔の形成された基板上に細胞膜の足場となる細胞外基質(ECM; Extracellular matrix)のコーティングを行った。ECMは細胞外の空間を充填する物質であると同時に骨格的役割、細胞接着における足場の役割、細胞増殖因子、細胞極性、神経突起伸張等の細胞に係わる多彩な役割を担っているタンパク質である。このECMが細胞の生存にとって必須の物質であることを利用して細胞を素子の任意の位置に配置する手法としてECMのパターン形成をプラズマ除去法及びマイクロコンタクトプリンティング法にて行った。プラズマ除去法では大気圧プラズマの照射により照射部分のECMが破壊される特性を利用した。この検証をラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細胞を用いて行ったところ、大気圧プラズマの照射部位には細胞は培養されず、非照射部位には細胞の存在が確認できた。またマイクロコンタクトプリンティング法では細胞体と神経突起部を空間的に分離した神経ネットワークアレイを形成させるために、細胞体配置部と、神経突起を伸張させるライン部が連続した形状のグリッドパターンを持つポリジメチルシロキサン(PDMS; Polydimethylsiloxane)製スタンプをフォトリソグラフィを用いて作製し、PDMSスタンプを用いてバイオセンサ素子上にECMのパターンを形成し、胎生17日目マウス的大脑皮質由来の神経細胞を用いてバイオセンサ素子上に細胞の形態、成長領域が制御された神経細胞のネットワークアレイを形成させることに成功した。

神経回路ネットワーク解析素子への機能応用が可能な培養型平面イオンチャンネルバイオセンサの動作試験及び得られたイオンチャンネル電流の解析を行った。目的となるイオンチャンネルタンパク質としてリガンド作動性のTransient receptor potential type-1 (TRPV1)および、光刺激作動性のChannelrhodopsin-2(ChR2)および、Channelrhodopsin- Wide receiver (ChR-WR)を採用した。測定目的となるイオンチャンネルタンパク質を遺伝子発現した培養細胞をバイオセンサ素子の微細貫通孔上に配置しそれぞれの活性刺激に応じたイオンチャンネル電流記録を行った。培養型平面イオンチャンネルバイオセンサでは素子内にて細胞培養を行うことが可能であるので、他の平面パッチクランプ法では不可能な培養状態の生きた細胞の膜中でのイオンチャンネルタンパク質の生の挙動が記録可能である。また、この培養型平面イオンチャンネルバイオセンサの精度チェックとしてTRPV1発現HEK293細胞を用いたカプサイシン濃度による検出限界の測定を行った結果、検出限界は約 $0.01\mu\text{M}$ であった。培養型平面イオンチャンネルバイオセンサはHEK293,C2C12,PC12といった複数の種類の細胞種での動作を確認しており、これによって得られたイオンチャンネル電流の記録結果はピペットパッチクランプ法にて記録された結果と比較し電流波形や応答において遜色のない事を証明した。これより、バイオセンサ素子上での細胞培養の技術を上げることで神経回路ネットワーク

解析素子として十分機能するバイオセンサであるといえる。将来的に出願者の開発した素子は難病と言われる神経変性疾患の神経細胞死の基礎過程との関係や発症機構の解明及び治療法の新規開発に応用できると期待される。

固体平面基板に微細貫通孔を形成した平面型素子によるパッチクランプ法は、ピペット・パッチクランプ法に代わる手法として実用化されつつあるが、一般に用いられる平面型素子には培養機能がないため、培養による細胞の長期観測が必須な神経細胞には適用できないという欠点があった。本論文は、神経細胞ネットワーク機能の解析を目的とした、培養機能を持った平面パッチクランプ・イオンチャンネル・バイオセンサ (Incubation-type Planar Patch Clamp Ion channel biosensor (IPPI)) の開発とその機能解析について書かれている。

本論文は全5章よりなる。第1章は緒論であり、研究の背景、研究の目的、研究成果の概要について書かれている。第2章では、IPPIに用いるバイオセンサチップの作製手順と構造機能評価について述べられている。構造評価には走査型電子顕微鏡と原子間力顕微鏡が用いられた。機能評価では、バイオセンサの電気的特性を検証し、特に、塩橋型の安定電極を用いることにより、ベースライン変動の抑制に成功した結果が述べられている。第3章では、本研究で作製されたIPPI上での細胞培養の結果について述べられている。ポリ-L-リシンを細胞外基質 (ECM) として、バイオセンサチップ表面全体にコーティングすることにより、市販の培養ディッシュと比べても遜色のない培養環境を実現することが出来た。また、マイクロコンタクトプリンティング法を用いてグリッド状のECMパターンを形成することにより、バイオセンサチップ上に細胞の形態や成長領域が制御された、神経細胞ネットワークを形成することにも成功した。第4章では、本研究で作製されたIPPI上にイオンチャンネルタンパク質を発現した細胞を培養し、イオンチャンネルを介した全細胞膜電流を記録した結果について述べられている。イオンチャンネルタンパク質として、リガンド作動性のTRPV1と光刺激作動性のチャンネルロドプシン2(ChR2)およびその改変体であるChR-WRを採用し、培養細胞もHEK293、C2C12、PC12等複数の細胞種を用いて動作を検証した。その結果、ピペットパッチクランプ法と比べて、遜色のない結果が得られることが示された。第5章では本論文全体のまとめとIPPI上における神経細胞回路網構築に関する将来の展望が述べられている。

以上のように、本研究は、神経回路全体のシグナル伝達機構の詳細な解析に向けて、IPPIを開発し、その構造と動作機能の基本的特性を詳細に検討した。その結果、従来法では困難であった、多数の神経細胞による神経回路網の構築や神経細胞活動の同時多点測定などへの可能性を開く、基盤的な研究として高く評価することが出来る。本研究のIPPIの作製、解析、結果の取り纏めから論文作成の一連の過程において、申請者が主体的に行っていることが認められる。また、本論文の内容の一部は、申請者が筆頭著者の英文学術論文1報を含め、3報の国際的な学術雑誌に公表済みであり、語学力においても学位授与に十分なレベルであると判断された。したがって、本審査委員会は本論文が博士(理学)の授与に値すると全員一致で判断した。