③ ナノバイオサイエンス —神経機能との融合に向けて

鳥光 慶一

1 はじめに

我々が日常、無意識に、あるいは意識的に行っている記憶や学習は、脳における神経、特にその接合部であるシナプスの可塑的变化に基づくものであることは、よく知られている。その詳細については、長い間多くの研究者により解明に向けた努力が続けられてきた。米国における「脳の世紀」や、我が国における「脳を知る」「脳を守る」「脳を創る」などのプロジェクトは、その代表的な国家的取り組みである。これらの研究により、脳に関する様々な知見が得られてきた。しかしながら、脳の仕組みは非常に複雑であり、特に記憶・学習については未だ不明な部分が多く、アルツハイマー病やパーキンソン病など、痴呆・脳疾患といった医学的見地からも、その機構解明/利用が待たれている。

一方、近年の技術発展は、今までの医療・治療とは、全く異なる分野への可能性を示してきた。特に、ES細胞など胚細胞を利用した再生医療は、今までの移植医療を根本的に変えうる画期的技術であることは周知の通りである。さらに半導体加工技術を基盤にしたナノ技術の発展は、再生医療と相まって今までのバイオテクノロジーとは全く異なる技術展開により、バイオ世界を様々な可能性を秘めた分野/技術に変化させようとしている。ナノバイオ、バイオナノ技術は、生き物固有の機能を工学的に応用させるための突破口となる技術であり、その重要さは述べるまでもない。

また、「脳の世紀」以降、生体に対する関心と脳科学の進展に伴い、特に遺伝子を中心とした疾病との関連や脳機能と疾病との関連が明らかとなってきた。その結果、ペプチド、タンパクなど、ナノレベルでの機能解析の必要性が高まってきた。ナノ技術とバイオ技術の融合は、新しい疾病治療法や治療器械、未解明の疾病メカニズムの解明や痴呆・学習など記憶に関する脳機能の解明に著しい進展をもたらすものと期待される。

その一方で、既存技術を人間の機能に対する補助的/補助的役割を担う技術として発展させた研究も注目されている。CCDカメラを視覚の代わりに用いた研究報告は、記憶にも新しい。視覚障害の患者さんの視覚野にカメラからの電気信号を入力することにより文字の認識・空間認知を可能にしたという報告は、予想されていたこととはいえ、現実として目の当たりにすると、驚きで迎えられ、人間と電子機器との共存といった新たな時代への幕開けを予感させる画期的なものであった。このような人工視覚や、人工内耳などの視覚・聴覚機能の獲得・修復は、機能代替に基づく新しい医療・治療分野への発展が期待されている。

ここでは、ラット・マウスの脳神経を中心にした神経機能、特にシナプス可塑性機構の解明に関する研究を主に紹介する。さらに高分子やDNAを分子ワイヤにし、タンパク、ナノギャップ電極と組み合わせた物性計測（伝導特性等）であるナ

ノバイオデバイス創製についても触れる。

2 神経機能解析

2.1 神経細胞試料

神経機能解析のためには神経細胞培養が必要である。神経細胞培養には、動物から採取した組織より調製する初代培養が一般的であり、一例として大脳皮質・海馬神経細胞の分散培養系とスライス培養系について以下に述べる。

分散培養系では、胎生18日のWistar系ラットの大脳皮質・海馬細胞を試料とし、酵素処理して2週間ほど培養する。大脳皮質については、パパイン (0.15 Unit/ml)、海馬細胞は、トリプシン (2.5 mg/ml) を各々用いて、37℃、10-15 minで酵素処理した後、あらかじめLaminin (20 µg/ml) と Poly-D-Lysine (100 µg/ml, M.W. 70,000-150,000) でコーティングした培養皿中で育成する。培養液は、大脳皮質の場合、不活性化した5%ウシ胎児血清と5%ウマ血清、2.5 µg/ml InsulinそしてPenicillin, Streptomycinを含むDulbecco's Modified Eagle's Mediumによる血清培地、海馬の場合には、B-27 Supplementを含むNeurobasal Mediumを基本とした無血清培地を用いる (Fig. 1)。

スライス培養系の場合、生後3日のラットの海馬を400 µm厚にスライスしたスライス切片を用い、あらかじめlamininとpoly-D-lysineをコーティングした多孔質のポリカーボネート膜 (膜厚7 µm, 孔径0.8 µm) 上で、34℃、5% CO₂、水蒸気飽和下で1週間培養したものを用いる。このように培養した細胞を用いて、種々の機能解析が検討されている他、動物から取り出して切片を作成し、1時間程度、酸素飽和溶液中で回復・安定化処理を行った後、すぐに使用する急性 (acute) 神経試料による研究も盛んに行なわれている。

Fig. 1 神経細胞初代培養法 (分散培養系)

Fig. 2 細胞成長及び神経成長方向の制御 I^{1,2)}

2. 2 神経成長方向制御〈ニューロエンジニアリング〉

神経細胞は、中心部にある、およそ2~30 ミクロンの細胞体と細胞体からのびる幅数ミクロンの神経突起から成り、成長に際し神経突起先端にある大きさ10 ミクロン程度の成長円錐が周囲の状態を判断して成長方向を決定している。今までの研究で、神経細胞を人工的環境下で育成した場合、神経細胞の成長状況は、育成基板との接着性に依存することが明らかになっている。すなわち、接着性が悪いと成長だけでなく、生存することすら出来なくなる。通常、このような接着性を良くするため、育成基板はポリリジンやラミニンなど主として生体由来の細胞外マトリックス (ECM) や、生体適合性に優れた合成材料で表面をコーティングしている。このような表面処理により、神経細胞の成長は劇的に変化するが、同じ材料でもコーティングの仕方によって、表面状態が異なるため、成長度合いは全く異なるので注意したい。表面コーティングは、細胞と基板との間の親和性を増加させることにより接着性を増加させるが、この仕組みを利用して細胞の成長を制御しようという試みがいくつか報告されている¹⁻³⁾ (Fig. 2)。

一方、表面状態によっては、細胞育成に必ずしも表面コーティングを必要としない。例えば、石英基板を光リソグラフィ技術によりパターン化した材料では、Fig. 3 に示すように、パターンに沿って神経細胞は成長する。この場合、基板表面のコーティングは行っていないが、表面の状態や重力によって溝の凹部に選択的に成長している⁴⁾。その特異性は、パターンの幅や深さ、形状などの基板の三次元状態によって異なることから、神経細胞は成長する際、周囲の三次元形状を識別しながら成長しているものと考えられる。実際、ある種の神経はグリア細胞などで形作られた空間に沿って突起を成長させることが知られている。さらに、表面に、微細ナノ構造を形成した基板を用いると、ある特定の構造の時にのみ基板に対する親和性が高い結果が得られており、神経成長と成長する表面の構造との間に密接な関係があるものと思われる⁵⁾。

また、金属酸化物を用いてパターンニングした場合にも、特定の金属酸化物に対し選択的に成長することが明らかになっている⁶⁾。その選択性は、使用する金属酸化物によって異なり、表面を異なる電荷を持った物質でコーティングして電

Fig. 3 細胞成長及び神経成長方向の制御 II⁶⁾

Fig. 4 神経成長方向の制御による神経回路形成 (パターン幅 10 μm)

気の状態を変化させると、選択性が変化することから、表面の電気的性質が神経の基板選択性に影響を与えているものと考えている。すなわち、神経細胞は、成長の際に前述の基板表面の三次元構造認識とともに、表面電気状態に依存して選択的に成長する。その際に成長円錐が成長方向の決定に重要な役割を果たしているのである。このような性質を利用して、様々な形状の神経回路を構成することが可能であり、Fig. 4 のような六角形状の回路や直線回路などが実現できている。

2. 3 神経活動と神経伝達物質

神経活動は、神経同士の結合部位であるシナプスにおいて、電気信号とそれに伴う神経伝達物質を介して情報授受を行うことにより、生じる。神経の電気的計測は、ガラス微小電極法を中心に電気生理学として発展してきた。その後、Sakmann, Neher らによりパッチクランプ法が開発され⁷⁾、今日電気測定における標準的方法として使用されている。この方法により、細胞膜電位 (Whole cell patch) や、細胞膜に存在する受容体・チャネルの性質を調べることを可能にした。しかしながら、この方法では最大でも30分程度の測定に限界で、長時間測定には針型電極や、プレナー電極を用いた細胞外測定法が適当である。我々の研究室では、半導体加工技術を利用した64チャンネル微小アレイ電極を用いて長時間測定を行っている。電極は、導電性のITO膜をパターンニングし、電極の大きさが10-30 μm角のものを作製している (Fig. 5)。本電極上に神経細胞を培養することにより、神経

Fig. 5 神経活動計測用のプレーン型微小電極アレイ (B) は、海馬用に最適化している。

回路形成に伴う自発活動変化を、長時間にわたり計測している⁸⁾。また、この手法では神経活動の刺激応答性変化の計測が可能であり、記憶・学習などのシナプス可塑性の機構検討や、制御因子の解析の他、薬物応答等の評価ツールとして応用性を検討している^{9,10)}。この手法は、神経細胞のインターフェイス機能が特徴であるが、同様の試みとして、半導体素子上に神経を育成することにより機能利用・解析を行っているグループ（欧米）もあり、将来の新しい情報処理デバイスとして検討が進められている。

一方、神経伝達物質は、シナプス前終末にあるシナプス小胞に含まれており、電気信号を受け取ると、電位依存性のカルシウムチャンネルにより細胞内カルシウム濃度が上昇、これによりシナプス小胞が開裂し、内包された伝達物質がシナプス間隙に放出される。情報は、この物質に応答する受容体を介しシナプス後細胞へと伝達される。すなわち、情報は、シナプスで電気シグナルから化学シグナルへ変換され、再び電気シグナルに変換されて伝達されるのである。伝達物質には、興奮性と抑制性の2種類があり、脳神経では前者の代表的なものが、グルタミン酸であり、後者の代表的なものがGABA（γ-アミノ酪酸）である。本項では、興奮性の代表的物質であるグルタミン酸について着目し、その測定法を述べる。神経活動に伴うカルシウム濃度変化は、Fura-2やFluo-4などの蛍光色素を用いてCCDや共焦点レーザー顕微鏡、二光子顕微鏡により光学的に計測している¹⁰⁾。

電気化学的手法による神経伝達物質の検出は、カテコールアミン類を例にとると、炭素電極による測定¹¹⁾、HPLCの検出器にも応用されている。また、酵素反応を利用した物質測定も試みられ、グルタミン酸の分解酵素と補酵素を組み合わせ、発光や蛍光を利用して測定したものや、酵素反応と電気化学反応を組み合わせた高感度測定法が報告されている。特に後者の測定法は、MDプローブと組み合わせ、細胞近傍に存在するグルタミン酸をグルタミン酸に対して特異的に反応するグルタミン酸酸化酵素により分解し、生成された過酸化水素を西洋ワサビペルオキシダーゼと高分子メディエーターにより最終的に電流変化として検出することにより、高選択性・高感度化を実現している¹²⁾。さらにワンチップ状に微小化を図った検出系（Fig. 6）では、極少量のサンプルで高感度測

Fig. 6 酵素電気化学法によるオンライングルタミン酸センサー

Fig. 7 マルチアレイグルタミン酸センサーの検出原理と測定例

定が可能であることから、神経機能の解析をはじめ、薬効評価・支援ツールとしての利用等様々な分野での利用が期待される^{13,14)}。グルタミン酸受容体機能解析を目的とし、Caged化合物と組み合わせた局所投与量の計測などは、その良い例である¹⁵⁾。

一方、この測定原理を基に、神経活動に伴って放出されるグルタミン酸の空間分布や部位による放出量変化を調べることを目的とした、グルタミン酸マルチアレイセンサーを開発した。本センサーは、前出の微小アレイ電極をベースに多層状に酵素を積層化したものであり、ラット海馬における刺激応答性のグルタミン酸放出の分布が報告されている¹⁶⁾（Fig. 7）また、従来の電気生理学的手法を用いて神経細胞以外の細胞の電気活動より放出量変化を推定する方法や、光学的手法を用いてグルタミン酸空間分布を測定する試みも行なわれている。これら手法の特徴は、グルタミン酸放出の空間分布を画像化できること、各部位における刺激応答と薬物応答の違いを調べられることであり、電気応答や細胞内カルシウム濃度変化と併せて解析することにより新たな解析・評価の手段を得ることが出来る。最近発表されたATPやマグネシウムの神経活動に対する影響を調べた報告も、その一つの例である¹⁷⁾。

さらに、新しい試みとして、レーザー光を利用したトラッ

Ref 19

K. Hamada, T. Miyata, K. Mayanagi, J. Hirota & K. Mikoshiba, *J. Biol. Chem.*, **277**, 21115 (2002)Fig. 8 IP₃レセプターの構造と変化¹⁹⁾

ピンク技術を応用し、神経終末中のシナプス小胞に存在するグルタミン酸の挙動を測定する研究がある。現在の技術では、この大きさ 50 nm 程度の単一小胞内に内包されるグルタミン酸の挙動を測定するのは困難であるが、この小胞を含む神経終末を単離したシナプトソーム（大きさ 500-600 nm）をトラッピングし、その中に内包されるグルタミン酸の変化をラマン分光法で計測しており、今後、金などによるラマン増強を利用し、単一小胞での解析を予定している¹⁸⁾。

以上、神経活動とそれに関連する神経伝達物質について述べたが、これを受け取る受容体の研究も進んでいる。特に、神経伝達物質に関する受容体はその作用によって細かく分類されてきた。ここではその詳細は省略するが、神経伝達物質同様、神経活動に関連して注目される受容体である IP₃ 受容体について最近、興味深い研究報告があったので紹介する。

IP₃ 受容体は、細胞内の小胞体に局在し、受精に伴うカルシウム振動の誘起や神経突起の伸展、さらには学習や記憶に関連した神経可塑性に重要な役割を担っていることが知られている。興味深いのは、IP₃ 受容体を単離精製し電子顕微鏡下で解析すると、Ca²⁺ が結合していない状態では、4 量体から成る「四角型」の受容体構造を有し、Ca²⁺ が結合する状態では「風車型」の構造を形成する¹⁹⁾ (Fig. 8)。つまり、Ca²⁺ 結合に伴って構造を変化させる様子が観測されており、アロステリック制御では説明できない可能性があることから、従来の K チャネルモデルに適合しないチャンネルの存在を示唆する結果も出ている。このようにタンパク質・受容体構造のナノ解析は、機能との関連性を解明するため、ますます重要になってきている。

3 生体分子とナノギャップ電極を組み合わせたナノバイオデバイス

最後に、今まで述べてきた神経機能解析とは少し異なり、DNA やペプチドなどの生体分子を分子ワイヤとし、電極（ナノギャップ電極）と組み合わせた微小バイオデバイス創製について簡単に述べる。DNA については、レーザートラップ法と組み合わせ、その伸縮性などの物性²⁰⁾ (Fig. 9) が詳細に調べられている他、その電気伝導性²¹⁾ (Fig. 10) に関しては、未だ議論が分かれているものの、材料として大変興味深い。特に、その配列は容易に組み替えることが可能であるため、様々な特性を持つ分子ワイヤを実現することができ

Ref 20
C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield and C. Bustamante, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **94**, 6185-6190 (1997).Ref 22
Y. Cui and C. Bustamante, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 127-132 (2000).Fig. 9 レーザートラップによる染色体系、単一 DNA 鎖の伸縮性測定^{20, 22)}

Ref 21

D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries & C. Dekker, *Nature*, **403**, 635 (2000)Fig. 10 単一 DNA 鎖の電気伝導特性²¹⁾ Fig. 11 ナノギャップ電極概略図（ギャップ間隔 10 nm）²³⁾

る。また、λDNA もその由来元の性質を反映させている点で利用価値がある。一方、単にワイヤだけでなく、受容体やイオンチャンネルなどのタンパク機能を組み込むことにより、センサー機能やゲート機能を有するナノデバイス作製の検討も進めている。これらを実現するためには、ワイヤなり、タンパクを電極上に配置するためのハンドリング技術が必要であり、この良し悪しで、研究の成否が決まる。ハンドリング技術の代表的なものは、光トラップ法や、SPM によるナノマニピュレーションであるが、この他に、表面にピット構造を作製・加工する試みや、ナノ微粒子を配列して基板表面との親和性を制御する方法、対象分子の末端化学修飾による選択的結合を利用したハンドリングなども有用である。実際、

これらの手法により電極との選択的結合を実現するなど（金電極の場合、末端のスルフィド化等）、生体分子と有機分子（導電性）のハイブリッド化、AFMを利用したナノマニピュレーション、ナノ微粒子と組み合わせた光トラップ技術^{20, 22)}などを組み合わせ、分子マニピュレーションを検討している。

また、このような分子マニピュレーションと組み合わせる電極は、電子ビーム露光で第一段階のプレ電極を作製した後、メッキ法により電流を制御し、およそ 10 nm の電極間ギャップでメッキを止め、作製する²³⁾。Fig. 11 に作製したナノギャップ電極の概略図を示す。この電極上に、DNA や有機分子を分子ワイヤとして形成したデバイスの IV 測定に成功し、整流特性を示す結果を得ている。現在、受容体やイオンチャンネル導入法を検討中である。

上述（前項）の電極・センサーは、見方を変えれば、電子機器と神経とのインターフェイスであり、これを介することにより、初めて神経活動をモニターする、あるいは、制御することが出来る。すなわち、脳神経との間で情報をやりとりすることが出来るのである。これにより得られたノウハウを前述のバイオナノ、ナノバイオデバイスに応用すれば、単なる微小デバイスとしてだけでなく、医療・治療に応用可能なデバイスとなりうる。例えば、パーキンソン病などの脳疾患や脳虚血、アルツハイマー病などの機能代替として威力を発揮するものと考えられる。

4 おわりに

以上、神経機能との融合に向けたナノバイオサイエンスの概略を述べてきた。本稿で取り上げた技術も含め、生体の機能を解析するための手法は、近年急速な進歩を遂げた。中でも微細加工技術など様々な工学的手法をバイオ計測技術と組み合わせた融合技術の発展が目ざましい。今後、この傾向はさらに加速されていくものと思われる。それに伴い、今までのような特化した分野・技術のみに立脚した研究から、広い視野に立って研究を見渡せる柔軟な人材の確保が重要になってくる。特に、必要とされる機能をダウンサイズされたどのような素材の組み合わせで効率的に実現するか、今までとは全く異なる発想が新たな機能を生み出していく。これからの研究/研究者には、より一層柔軟な発想が求められるのである。

近年のナノテクノロジーの進展は、想像以上に早く、今まで夢物語とされてきた分子・バイオ素子の実現や、一時期盛り上がりを見せては消えていったバイオコンピュータの実現などを現実の物語に書き換えてくれるほどである。

この技術を基にしたナノバイオ/バイオナノは非常に魅力的な分野である。これらは、単にナノテクノロジーとバイオテクノロジーを組み合わせただけでなく、各々の長所と短所をうまく融合することにより、従来の単なるデバイス作製技術から、機能発現を通して医療・治療にも有効なナノデバイスの創製につながるのである。さらにこの融合技術は、デバイス創製にとどまらず、ナノバイオサイエンスといった新たな学問領域の創出・進展にもつながっていくものと考えられる。今後の発展に期待したい。

謝 辞

本研究ならびに、本稿執筆に当たり、NTT 物性科学基礎

研究所、NTT マイクロインテグレーション研究所の関係者の皆様に感謝致します。特に分子生体機能研究 G のメンバー各位の協力に感謝します。本研究の一部は、科学技術振興事業団 CREST および、ヒューマンサイエンス振興財団創薬等ヒューマンサイエンス研究事業の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) D. Kleinfeld, K. H. Kahler, and P. E. Hockberger, *J. Neurosci.*, **8**, 4098 (1988).
- 2) T. B. Kuhn, M. F. Schmidt, and S. Kater, *Neuron*, **14**, 275 (1995).
- 3) Kindt and Lander, *Neuron*, **15**, 79 (1995).
- 4) T. Hirono, K. Torimitsu, A. Kawana, A. and J. Fukuda, *Brain Res.*, **446**, 189 (1988).
- 5) K. Torimitsu, Y. Furukawa, and H. Tabei, *Proc. 9TH Int. Conf. Comp. Eng.*, 795 (2002).
- 6) K. Torimitsu and A. Kawana, *Dev. Brain Res.*, **51**, 128 (1990).
- 7) B. Sakmann and E. Neher, *Single-channel recording second edition*, Plenum Publishing Corporation (1995).
- 8) H. P. C. Robinson, M. Kawahara, Y. Jimbo, K. Torimitsu, Y. Kuroda, and A. Kawana, *J. of Neurophysiol.*, **70**, 1606 (1993).
- 9) Y. Jimbo, N. Kasai, K. Torimitsu, T. Tateno, and H. P. C. Robinson, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **50**, 241 (2003).
- 10) K. Torimitsu, Y. Furukawa, N. Kasai, Y. Jimbo, and T. Tsumoto, *39th Am. Soc. for Cell Biol.*, (1999).
- 11) O. Niwa, M. Morita, and H. Tabei, *Electroanalysis*, **6**, 237 (1994).
- 12) 鳥光慶一, 丹羽 修, 日本生理学会誌, **61**, 279 (1999).
- 13) O. Niwa, K. Torimitsu, M. Morita, P. Osborne, and K. Yamamoto, *Anal. Chem.*, **68**, 1865 (1996).
- 14) K. Torimitsu and O. Niwa, *NeuroReport*, **8**, 1353 (1997).
- 15) K. Torimitsu and O. Niwa, *NeuroReport*, **9**, 599 (1998).
- 16) N. Kasai, Y. Jimbo, and K. Torimitsu, *Anal. Sci.*, **18**, 1325 (2002).
- 17) K. Torimitsu, N. Kasai, Y. Jimbo, and Y. Furukawa, *Gordon Research Conference, Magnesium in biochemical processes and medicine* (2002).
- 18) K. Ajito and K. Torimitsu, *Lab on a chip*, **2**, 11 (2002).
- 19) K. Hamada, T. Miyata, K. Mayanagi, J. Hirota, and Miko-shiba, *J. Biol. Chem.*, **277**, 21115 (2002).
- 20) C.G. Baumann, S.B. Smith, V.A. Bloomfield, and C. Bustamante, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **94**, 6185 (1997).
- 21) D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, and C. Dekker, *Nature*, **403**, 635 (2000).
- 22) Y. Cui and C. Bustamante, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 127 (2000).
- 23) Y. Kashimura, H. Nakashima, K. Furukawa, and K. Torimitsu, *Thin Solid Films*, in press.

●著者プロフィール

氏名：鳥光 慶一 Keiichi TORIMITSU
 所属：NTT 物性科学基礎研究所 (〒243-0198 厚木市森の里若宮 3-1)
 役職：グループリーダー (分子生体機能研究G)
 趣味：フルート、音楽、ガーデニング