

革新的なブレインマシンインターフェスの創出に向けた細胞内刺激電極の研究開発

代表研究者 彭 祖癸 東京工業大学・博士課程
共同研究者 八木 透 東京工業大学・教授

1 研究の目的

視覚や聴覚などの感覚器や筋肉などの運動器は、神経細胞を介して脳とつながり、電気的・化学的な信号伝達を行っている。感覚系や運動系なども含めた脳・神経系の障害は、患者の労働機会を奪い多大な社会的損失をもたらす。また患者をサポートする医療費・社会保障費のコストも大きい。例えば日本では、視覚障害による損失コストは年間 8 兆 7854 億円にもものぼる⁽¹⁾。したがって脳・神経系の障害の克服は喫緊の課題であるため、神経細胞を電気刺激することで失われた身体機能を再建する様々なブレインマシンインターフェース (BMI) が開発されている。このような BMI によって障害者の QOL を向上させることはもちろん、社会の生産性増大にも大きく貢献できる。

これまでに BMI 技術を用いた自立支援、精神・神経疾患等の克服に向けた研究開発が複数の国家プロジェクトとして行われてきた。当該技術をさらに発展させるためには、生体と機械をつなぐインターフェースである「電極アレイ」を微小化・高集積化する必要がある。電荷注入能力の向上と高分解能化を実現することが課題として残されている。現在の BMI は細胞膜の外から刺激する細胞外刺激法を採用している。この方法では微小電極の電荷注入能力限界を超える高い刺激エネルギーが要求され、細胞を発火させるために十分な刺激エネルギーを供給することができない。低い刺激エネルギーで刺激するには、高い電気抵抗を持つ細胞膜の内側に電荷を直接注入する細胞内刺激法が有効であり⁽²⁾、これまで細胞に直径約 100 nm の金属針電極を刺入し電荷を注入する手法が提案された⁽³⁾。しかし刺入部から細胞質が流出するため生体適合性が低く、未だ BMI へ応用できていない。

そこで本研究では、高分解能・高生体適合性を両立できる細胞内刺激電極アレイの開発を目指し、球状人工細胞膜を電極基板上にアレイ状に配置して、膜に固定された DNA ナノチューブを細胞に刺入することで電荷注入を行う電極アレイを提案する(図 1)。DNA ナノチューブは核酸からなる管状物質であり、近年注目を集めているナノ構造体である⁽⁴⁾。ナノチューブ内を電荷が通過できるため、高い導電性を持つ。また、ナノチューブの直径が約 5 nm であり、刺入による細胞質の流出が少ない。したがって提案電極アレイは、細胞を傷つけないで細胞内刺激を実現できると考えられ、高性能かつ生体内で安定に機能できる BMI の実現のためのコア技術となる。

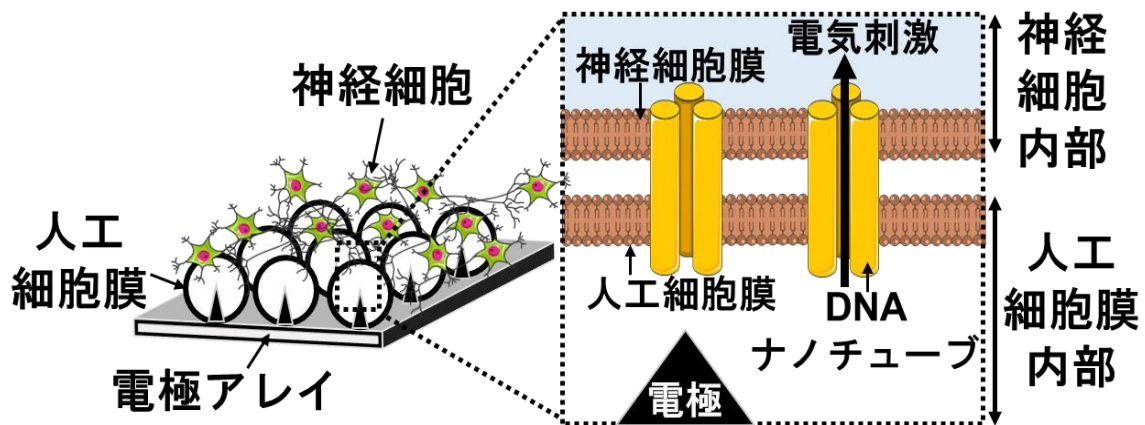


図 1. 提案電極アレイ。

2 研究内容

2-1 実験手法

図2に本研究で提案したDNAナノチューブの概要図を示す。通常、DNAナノチューブと親水性の細胞膜が結合しにくい。そこで本研究では、DNAナノチューブを疎水性分子である cholesterol で修飾することで膜との親和性を向上させた。またDNAナノチューブを可視化するため、ナノチューブに染色剤である FAM で標識している。さらに、ナノチューブを構成するオリゴの配列を変更することで、長さ 10 nm と 12 nm の DNA ナノチューブを2種類用意した。

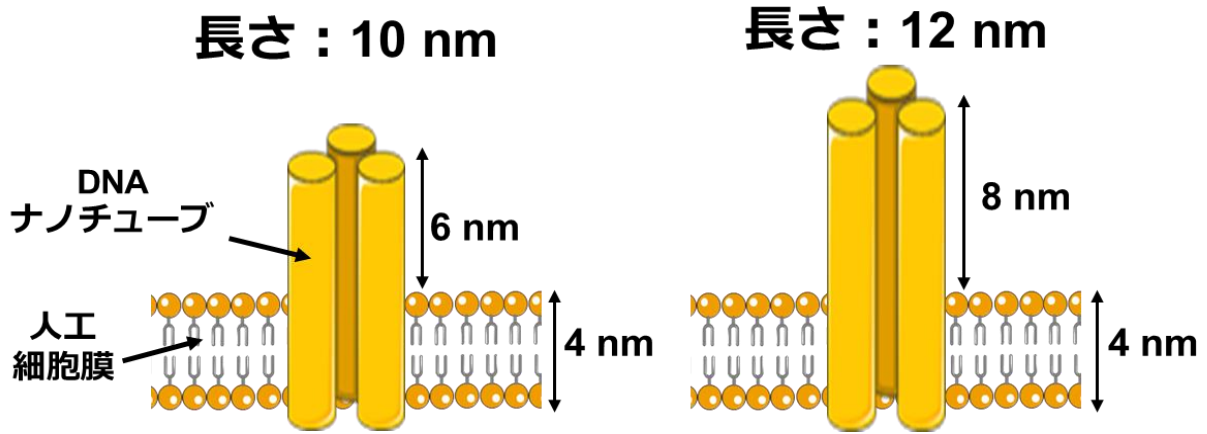


図2. 長さの異なる DNA ナノチューブ

<DNA ナノチューブの作製手法> 本研究で使用したオリゴ DNA は、Macro Japan 社より購入した。FAM, cholesterol 修飾オリゴ DNA は、ニッポンジーン (株) に合成を依頼した。DNA ナノチューブは、J. Burns⁽⁴⁾らの論文を参考に作製した。まず、オリゴ DNA の濃度が 1 μ M になるように、TE20 バッファー (20mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。オリゴ DNA をアニーリングするため、溶液を 95°C 付近まで加熱してすべての DNA を一本鎖状態にした後、室温まで 18 h かけて冷却した。作製したナノチューブは 4°C の冷蔵庫にて保存した。

<ポリアクリルアミドゲル電気泳動> 作製した DNA ナノチューブの長さを評価するため、電気泳動を行った。ゲルは 5 % のポリアクリルアミドゲルを使用した。得られた DNA ナノチューブに対して 20 mA の定電流を加え、泳動バッファー (12 mM MgCl₂, 0.5 \times TAE) 内で 1 h 泳動を行った。その後ゲルを 0.5 μ g/mL の EtBr 溶液に浸し、DNA の染色を行った。

< DNA ナノチューブの原子間力顕微鏡観察> 作製した DNA ナノチューブの形状を評価するため、原子間力顕微鏡 (AFM) を行った。マイカの上に 10 nM の DNA ナノチューブ溶液を 4 mL 滴下し、3 分間インキュベートした。その後 1.2 mL の TE20 バッファーでマイカを洗浄し、室温で乾燥させた。AFM (Cypher S; OXFORD Instruments) を用い、Olympus 製のカンチレバー AC240TS をプローブとして AC モードで観察した。

< DNA ナノチューブと人工細胞膜の結合の顕微鏡観察> 人工細胞膜の作製は、静置水和法で行った。カバーガラス上に、ゾル化させた 1% agarose-LM 溶液 150 μ l をピペットで一面に塗り広げ、50 °C のホットプレート上で 30 分置いて乾燥 agarose フィルムを得た。フィルム上に 10 μ l のリン脂質溶液 (99 % 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) with 1 % Texasred 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Texasred-DHPE)) 10 μ l を滴下しニードルで塗り広げ、溶媒であるクロロホルムを蒸発させた後、-0.08 MPa 下の真空チャンバ内で 20 分静置してさらに溶媒を蒸発させた。その後、200 μ l の 200 mM sucrose 溶液を含むバッファー中に浸し、室温下で 1 時間静置することで、球状人工細胞 (リポソーム) を作製した。

DNA ナノチューブとリポソームの結合を観察するため、まず得られたリポソーム溶液 10 μ l を casein コーティング処理されたカバーガラスに滴下し、液滴に対して 2 μ l の 200 mM glucose 溶液を添加した。膜内外の

密度差でガラス表面に沈んだリポソームに対して共焦点顕微鏡 (LSM780, Carl Zeiss) で蛍光観察を行った。顕微鏡画像取得後、液滴に対して<DNA ナノチューブを添加し、再度リポソームに対して顕微鏡観察し写真撮影を行った。DNA ナノチューブ添加前後のリポソーム膜の蛍光強度を比較することで、ナノチューブとリポソームの結合を確認した。

< DNA ナノチューブの電気計測> DNA ナノチューブの電気計測には、Droplet Interface Bilayer (DIB)法を用いた⁽⁵⁾。具体的には、まず銀線を2本用意し、それぞれAgCl化した後、agarose-LMゲルでコーティングした。Agaroseがゲル化したあと、ゲルに対して5 μ lのDNAナノチューブ溶液(10nM DNA nanotube, 1M KCl, 10mM HEPES, pH 8.0)を滴下し、10mg/mLの1,2-diphytanoylphosphatidylcholine, 1,2-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)のヘキサデカン溶液に挿入した。両媒性分子であるDPhPCが相互作用により、液滴まわりを脂質一重膜でコーティングできるため、2つの液滴を接触させることで人工細胞膜形成した。その後、膜内に挿入されたDNAナノチューブに対して40mVの電圧を印加し、ナノチューブの電流応答値を記録した(Axppatch 200B, Molecular Devices)。

2-2 実験結果

<電気泳動> 作製したDNAナノチューブの電気泳動の結果を図3に示す。DNAナノチューブの分子量は200~300bpであり、一方対照群である46ntのssDNAのバンドが100bpより下に位置してある。この結果から、オリゴDNAが互いに結合し、ナノチューブを形成できたことが示唆された。さらに、長さ12nmのナノチューブのバンド位置が長さ10nmのナノチューブより高いことがわかった。電気泳動では長い分子ほど泳動速度が遅くなる特徴から⁽⁶⁾、設計したナノチューブは所定長さに形成できたと考えられる。

<AFM計測> 図4にDNAナノチューブのAFM計測の結果を示す。マイカ上の微小な構造物はDNAナノチューブである。DNAナノチューブのサイズを評価したところ、長さは34.4nmであり、AFMの探針の先端の曲率半径は7nmであることを考慮すると、本研究で作製したDNAナノチューブのサイズは理論式と一致すると考えられる。

< DNA ナノチューブと人工細胞膜の結合の顕微鏡観察> DNA ナノチューブを添加した前後のリポソームの蛍光画像を図5に示す。DNA ナノチューブ添加前、Texas red チャンネル下では赤色に光る球状リポソームが観察された。溶液に対して cholesterol 修飾された DNA ナノチューブを添加したところ、FAM チャンネル下ではリポソームの縁に沿った緑色蛍光が観察できた。一方、cholesterol 修飾されていないナノチューブを同様にリポソーム溶液に添加したが、緑色の蛍光が確認できなかった。K. Göpfrich らの研究では、親水的な DNA ナノ構造物を疎水分子である cholesterol で修飾したところ、ナノ構造物が脂質二重膜と結合できるようになった⁽⁷⁾。先行研究の結果から、本研究で作製した cholesterol 修飾 DNA ナノチューブがリポソームと結合できた可能性が高いと考えられる。

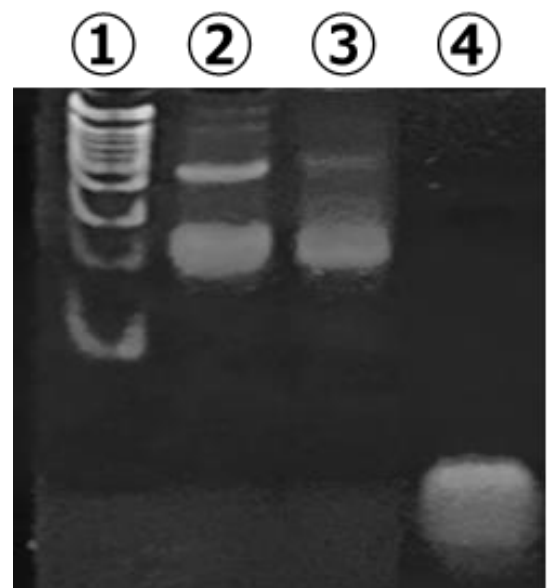


図3. バンド①：100 bp DNA ladder；バンド②：10 nm DNA ナノチューブ；バンド③：12 nm DNA ナノチューブ；バンド④：ssDNA

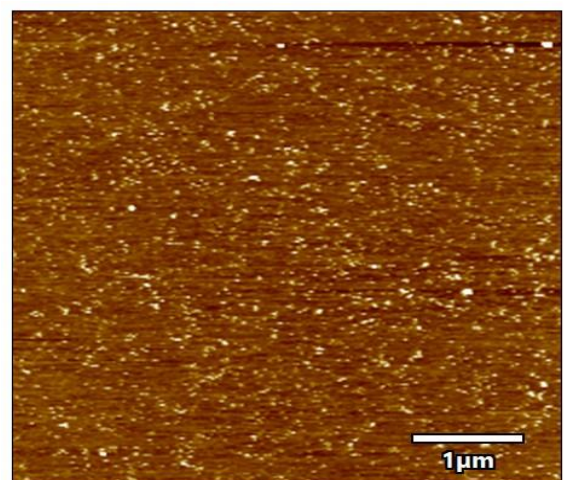


図4. DNA ナノチューブの AFM 像。

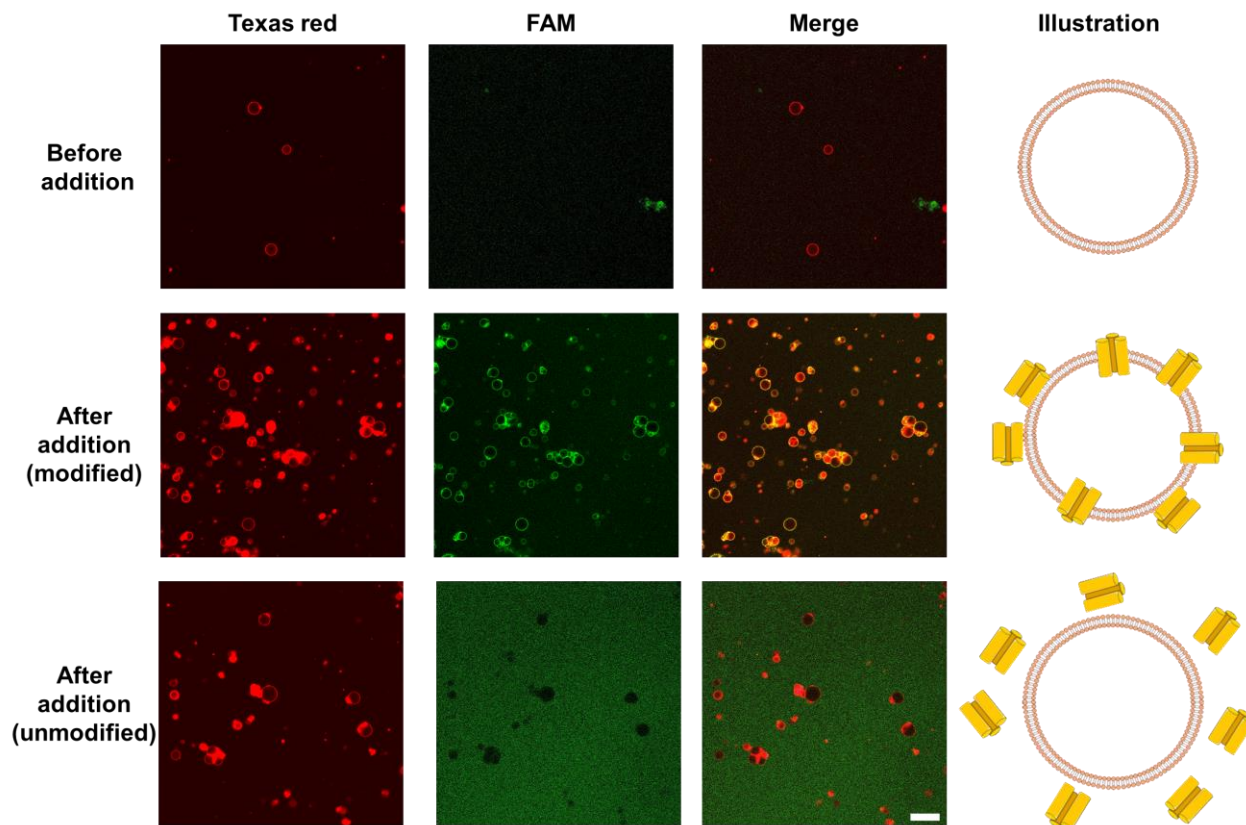


図 5. DNA ナノチューブ添加前後の人工細胞膜の蛍光画像。

< DNA ナノチューブの電気計測 > 図 6 に DNA ナノチューブの電気計測の結果を示す。1M KCl 中、電圧 40 mV 印加下の内径 2 nm の DNA ナノチューブの応答電流値は、ナノチューブ 1 つにつき 20 pA~60 pA と報告されている⁽⁸⁾。本研究では、412 nm のナノチューブに対して電圧印加したところ、40pA のステップを確認できたことから、ナノチューブが脂質二重膜に挿入できたことが考えられる (図 5 a)。また長さが 10 nm、12 nm のナノチューブのコンダクタンスはそれぞれ 0.915 ± 0.290 [nS]、 0.746 ± 0.179 [nS]であり、ナノチューブが長くなるにつれ、コンダクタンスが小さくなることがわかった。Cruickshank らは、イオンチャネルである MscL のコンダクタンスがチャンネルの長さに反比例することを報告している⁽⁹⁾。本研究で作製した DNA ナノチューブがイオンチャネルと同様の機能を有するため、コンダクタンスがナノチューブの長さに依存する可能性がある。

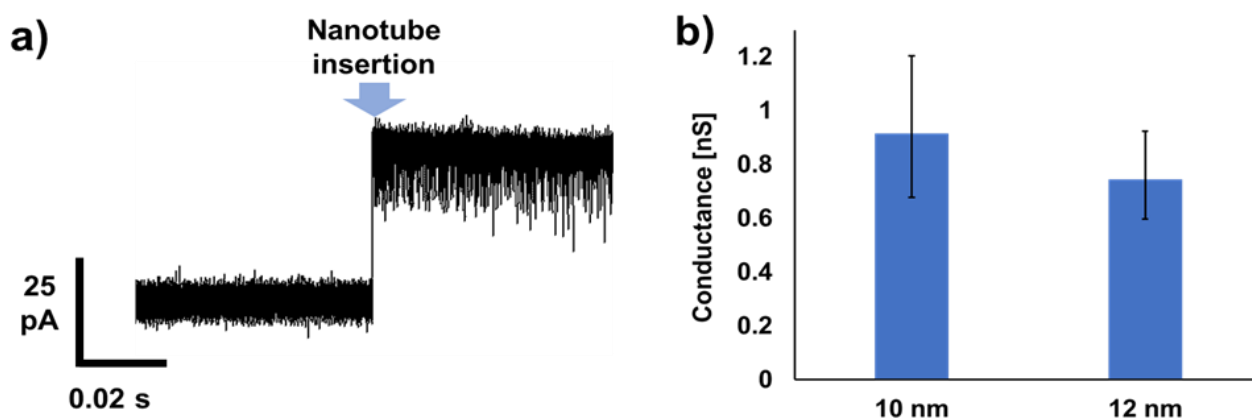


図 6. DNA ナノチューブの電気計測。a) DNA ナノチューブの人工細胞膜挿入の一例 (長さ 12 nm)。b) 長さ 10 nm と 12 nm のナノチューブのコンダクタンス (n=20)

3 結論と今後の展望

本研究では「生体適合性が高い細胞内刺激電極の実現に向けた細胞膜貫通 DNA ナノチューブ」を提案し、その基本的な機能を検証した。実験では、1)ナノチューブと人工細胞膜の結合評価、2)ナノチューブの電気特性評価の2点を行った。その結果、cholesterol で修飾したナノチューブが人工細胞膜に挿入できることがわかった。また電気計測の結果から、ナノチューブが長くなるにつれ、コンダクタンスが小さくなることが示唆された。今後は、提案ナノチューブの性質をより理解するために、チューブ径や DNA 配列のコンダクタンスへの影響を評価が必要である。また将来的には、ナノチューブを生細胞膜へ導入し、ナノチューブと生細胞膜の親和性を評価することともに、ナノチューブを介した電荷注入の実現可能性を検証する。

【参考文献】

1. 三宅謙作, 「日本における視覚障害の社会的コスト」日本眼科医会研究班報告 2006~2008, 2009
2. M. Spira, A. Hai, “Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology”, *Nature Nanotechnology*, Vol. 8, pp. 83-94, 2013
3. J. Robinson, M. Jorgolli, A. Shalek, M. Yoon, R. Gertner, H. Park, “Vertical nanowire electrode arrays as a scalable platform for intracellular interfacing to neuronal circuits”, *Nature Nanotechnology*, Vol. 7, pp. 180-184, 2012
4. J. Burns, A. Seifert, N. Fertig, S. Howorka, “A biomimetic DNA-based channel for the ligand-controlled transport of charged molecular cargo across a biological membrane”, *Nature Nanotechnology*, Vol. 11, pp. 152-156, 2016
5. S. Leptihn, O. K. Castell, B. Cronin, E. Lee, L. C. M. Gross, D. P. Marshall, J. R. Thompson, M. Holden, M. I. Wallace, “Constructing droplet interface bilayers from the contact of aqueous droplets in oil”, *Nature Protocol*, Vol. 8, pp. 1048-1057, 2013
6. P. Zhan, P. K. Dutta, P. Wang, G. Song, M. Dai, S. Zhao, Z. Wang, P. Yin, W. Zhang, B. Ding, Y. Ke, “Reconfigurable three-dimensional gold nanorod plasmonic nanostructures organized on DNA origami tripod”, *ACS Nano*, Vol. 11, pp. 1172-1179, 2017
7. K. Gopfrich, T. Zettl, A. C. Meijering, S. Hernandez-Ainsa, S. Kocabey, T. Liedl, U. F. Keyser, “DNA-tile structures induce ionic currents through lipid membranes”, *Nano Letters*, Vol. 15, pp. 3134-3138, 2015
8. A. Seifert, K. Gopfrich, J. R. Burns, N. Fertig, U. F. Keyser, S. Howorka, “Bilayer-spanning DNA nanopores with voltage-switching between open and closed state”, *ACS Nano*, Vol. 9, pp. 1117-1126, 2015
9. C. C. Cruickshank, R. F. Minchin, A. C. Dain, B. Martinac, “Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of *Escherichia coli*”, *Biophysical Journal*, Vol. 73, pp. 1925-1931, 1997

〈発表資料〉

題名	掲載誌・学会名等	発表年月
Neural Interface for Biohybrid Prosthetic Hands to Realize Sensory and Motor Functions,	Journal of Robotics and Mechatronics	2022年4月
A Study of the Effects of Plasma Surface Treatment on Lipid Bilayers Self-Spreading on a Polydimethylsiloxane Substrate under Different Treatment Times	Langmuir	2021年8月
生体適合性が高い細胞内刺激電極の実現に向けた細胞膜貫通 DNA ナノチューブの開発	電気学会 電子・情報・システム部門大会	2021年9月