JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	細胞認識機能を有する神経細胞活動記録に向けた次世代微小電極技術の開発
Author(s)	羽賀, 渉
Citation	
Issue Date	2024-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/19074
Rights	
Description	Supervisor: 筒井 秀和, 先端科学技術研究科, 博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

氏　　名	羽賀　　渉		
学位の種類	博士（マテリアルサイエンス）		
学位記番号	博材第 579 号		
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 22 日		
論文題目	Development of next generation microelectrode technique toward neuronal activity recordings with cell recognition capability		
論文審査委員	筒井秀和	北陸先端科学技術大学院大学	准教授
	水谷五郎	同	教授
	平塚祐一	同	准教授
	山口拓実	同	准教授
	阿部秀樹	名古屋大学	准教授

論文の内容の要旨

Molecules called synapse organizers are involved in the formation of synapses. Among them, clustering of neurexin-1β (b) by interacting with neuroligin-1 is known to cause synaptogenesis. The ability of Neurexin-1β to induce synaptogenesis in synapse organizers has been studied from various viewpoints, and although the elucidation of this molecular function has been widely attempted, the use of this function as a molecular machine has not been quite common. In this study, I developed an engineered synapse organizer based on Neurexin-1β and established a method to fabricate a glass microelectrode in which the main body was insulated by glass and only the tip was metal (Gold). By combining these, I attempted to induce selective synaptogenesis in the glass microelectrode. The engineered synapse organizer we developed formed synapse-like structures on the surfaces of inorganic microbeads and glass microelectrodes by artificial binding, not intrinsic binding. The localization of synapsin, which acts as a synaptic marker molecule, and Rab3 in the introduced marker was consistent. The engineered synapse organizer we developed can be said to be capable of inducing synaptogenesis in the glass microelectrode. When the tips of microbeads and glass microelectrodes bearing Rab3 antibodies were contacted with neurons expressing Rab3, I confirmed the accumulation of Rab3 despite the binding by antibodies. The

method for fabricating the glass microelectrode was developed by preferentially selecting a tool that is universally used for the patch clamp method, which may be a compatible tool for fields that employ such electrophysiological measurement methods. I employed a focused ion beam (FIB) machine for the fabrication of the tip of the microelectrode, and I was able to perform highly reproducible fabrication. This allowed us to efficiently fabricate an electrode with an arbitrary tip shape using the FIB, if an electrode with gold conducting could be fabricated by a micropipette puller. Finally, in a proof-of-principle experiment using chick forebrain neurons, selective synaptogenesis was induced in the glass microelectrode in a non-CO2-dependent culture medium. Chick neurons are simple to culture, and unlike rats and other mammals, it is known that removing the forebrain neuron from an egg embryo is unlikely to cause biological problems. Experiments showed that synaptogenesis by the engineered synapse organizer took at least 4 hours, but chick forebrain neurons transfected at room temperature and open air survived for at least 8 hours and formed synapses with antibody-modified microbeads and glass microelectrodes.

Keywords: Electrophysiology, Neuron, Synapse Organizer, Glass Microelectrode, Protein Adsorption

論文審査の結果の要旨

シナプスオーガナイザーとは、生体内でニューロンが精緻に配線される際に重要な役割を果たす分子群の総称である。シナプスオーガナイザーの生理機能を用いることにより、細胞種に対する選択性を備えた、ニューロン電気活動計測の新しい基本原理を確立できることが期待されている。本学位論文は、将来的にこうした新規計測原理の実証実験を成功させることを目標とした、三部の研究から構成される。

第Ⅰ部では、生体に備わる内在性のシナプスオーガナイザーとは交差反応を起こさない、小型の人工シナプスオーガナイザーの設計と評価を行った。具体的には、プレシナプスに存在するニューレキシン 1β と呼ばれるオーガナイザーにおいて、内在性リガンドと相互作用する LNS ドメインを除去し、12 アミノ酸からなるペプチドタグを挿入した。この人工改変ニューレキシンを発現するニューロンは、ペプチドタグに対するナノボディで修飾したマイクロビーズと接触するとプレシナプスの分化誘導を引き起こすことから、設計した分子が人工シナプスオーガナイザーとしての生理機能を持つことが示された。さらに、計測原理の実証を行う為の実験系として、Chick forebrain neuron に着目し、人工シナプスオーガナイザーの機能評価を行った。大気下・室温という環境下においても、マイクロビーズとの接触後、およそ 4 時間

でプレシナプスへの分化誘導が引き起こされることを見出した。一般的に初代培養ニューロンを大気下・室温で維持することは困難であることから、今後、計測原理の実証を目指す上で、Chick forebrain neuron がユニークな利点を持つ優れた細胞モデルとなり得ることを示した。第 II 部では、こうした計測原理を実証するために必要な、リガンド修飾微小電極の開発を行った。具体的には、硼珪酸ガラス管に金線を封入し、熱伸展と FIB を組み合わせ、金の先端露出部が 1 μm 程度とニューロンシナプスと同程度となるような先端加工方法を施し、さらに、先端露出部を第 I 部で開発した人工シナプスオーガナイザーに対するリガンドで表面修飾する手法を確立した。第 III 部では、I 部で開発した人工シナプスオーガナイザー、及び、プレシナプスマーカーEGFP-Rab3 を予め導入した chick forebrain neuron に対し、II 部で開発したリガンド修飾微小電極を光学顕微鏡観察下にて接触させ、それにより誘起されるシナプス分化誘導をリアルタイム観察する実験を行った。接触後数時間で Rab3 の集積が確認され、設計通りに金封入微小電極と標的ニューロンとの間にシナプス様の接合構造が形成されることを示唆する結果を得ている。

以上の成果は、将来的に、細胞種選択性を備える微小電極技術の開発に向けた重要な足掛かりとなるものであり、学術的な貢献は大きい。よって、博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。