

神経活動の光制御とモニタリングを同時に可能にするケージド化合物の開発

1. 発表者：

高橋 光規（研究当時：東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻 生体情報学分野
博士課程／現：山梨大学大学院総合研究部医学域 解剖学講座構造生物学教室
特任助教）

神谷 真子（東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻 生体情報学分野 准教授）

小田 賢幸（山梨大学大学院総合研究部医学域 解剖学講座構造生物学教室 教授）

浦野 泰照（東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室 教授／大学院医学系研究科
生体物理医学専攻 生体情報学分野 教授（兼担））

2. 発表のポイント：

- ◆蛍光色素 KFL-1 を基にして、黄色光という長波長の光で生理活性物質を放出する KFL-1 ケージド化合物の開発に成功した。
- ◆長波長光により速やかに生理活性物質を放出する KFL-1 ケージド化合物を利用することで、世界で初めて、ケージド化合物による線虫の神経活動と行動の光制御を達成した。
- ◆本研究で開発した KFL-1 ケージド化合物は、神経活動の光学観察と光制御を互いに干渉することなく実現させ、神経科学分野の研究進展に大きく貢献すると期待される。

3. 発表概要：

光照射により生理活性物質を放出するケージド化合物（注1）は、神経科学をはじめとする生命科学研究で広く用いられてきました。しかし、従来のケージド化合物は、その活性化のために生体組織にダメージを与える紫外線などの短波長光を必要とし、長波長化しても物質の放出が遅いことや、有害な活性酸素も放出されるという問題がありました。

東京大学大学院医学系研究科の浦野泰照教授、山梨大学大学院総合研究部の小田賢幸教授らの研究グループは、蛍光色素 KFL-1 を基にして、黄色光（580 nm）という長波長光で活性化できる KFL-1 ケージド化合物を開発しました。本研究では、神経細胞にカプサイシン受容体 TRPV1（注2）を発現した線虫 *C. elegans*（注3）に対し、光照射でカプサイシンを放出する KFL-1 ケージドカプサイシンを適用することで、光による神経活動の活性化を実現しました。さらに、無麻酔の線虫において上記手法で神経活動を活性化しながら、蛍光カルシウムセンサー GCaMP6s（注4）を用いることで、光制御・神経活動観察・行動観察の3つを同時に行うことに成功しました。

本研究は、神経活動に人為的に介入しながら同時に神経活動をイメージングする手法を提供するもので、神経回路の破綻により生じる精神疾患、記憶学習障害の病態解明・治療法開発につながるかと期待されます。

4. 発表内容：

①研究の背景・先行研究における問題点

光照射をトリガーとして生理活性物質を放出するケージド化合物は、細胞内のシグナル伝達を制御する目的で広く用いられてきました。神経科学分野では、グルタミン酸や GABA といった神経伝達物質がケージド化され、光を用いた神経活動の制御が試みられてきました。しかし、神経科学の有用なモデル生物である線虫 *C. elegans* に対しては、ケージド化合物の適用例がほ

とんど報告されていません。その理由の1つには、従来のケージド化合物は生理活性物質の放出のために紫外線～青色光を必要としますが、これらの短波長光は光毒性が高いために、細胞死を引き起こす、線虫の生得的な光忌避反応（注5）を惹起するという問題があることが挙げられます。こうした問題を回避するため、より長波長の光で使用できるケージド化合物の開発が試みられてきましたが、物質の放出速度が遅く素早い神経活動制御ができない、副生成物として細胞に有害な活性酸素が発生するなどの課題が残っていました。

そこで、本研究グループは上記の課題を解決するため、線虫の神経生理学的実験に適する、長波長光で使用可能な、物質の放出速度が速いケージド化合物を開発することを目的としました。

②研究内容

本研究に先行して、浦野泰照 教授らの研究グループにより蛍光色素 BODIPY（注6）が長波長光で使用可能なケージ基として振る舞うという知見が得られていました。そこで、本研究グループは、黄色光という長波長光で励起可能で幅の狭い吸収スペクトルを持ち、BODIPY 誘導体の中でも大きなモル吸光係数（注7）を持つ Keio Fluors-1 (KFL-1) に注目しました。まず、KFL-1 のケージ基としての基礎的な振る舞いを検証するため、KFL-1 のホウ素に様々な HOMO エネルギーレベル（注8）を持つフェノール誘導体を導入した KFL-1 誘導体を合成し、アンケージ（注9）の収率を求めました。これにより、ホウ素に導入するフェノール誘導体の HOMO エネルギーレベルが -0.2 hartree 付近の誘導体が最大のアンケージ収率を示すことが明らかになりました。この結果をもとにして神経活動の光制御のために、HOMO エネルギーレベルが -0.21 であり、TRPV1 受容体を介して細胞内にイオン流入を引き起こす合成カプサイシン *N*-Vanillylnonanamide (VN) をケージド化し、KFL-VN を合成しました（図 1A）。580 nm の黄色光を照射すると、KFL-VN は分解して VN が放出されることを確認しました。

続いて、KFL-VN を用いることで神経細胞の活動を光で活性化できるか検証するため、遺伝子組み換え技術により、ASH 感覚神経に TRPV1 受容体および蛍光カルシウムセンサー GCaMP6s を発現した線虫株を作製しました。この線虫株に KFL-VN を与え黄色光を照射したところ、ASH 神経細胞に発現した GCaMP6s の蛍光上昇が観察されました（図 1B）。また、KFL-VN を与えた線虫を寒天プレート上にのせ、自由に動き回らせて光照射したところ、ASH 神経細胞の活性化によって危険からの回避行動を引き起こすことに成功しました（図 1C）。感覚神経に加えて、筋肉、運動神経、介在神経においても、TRPV1 を発現させ KFL-VN を適用することで、光による神経活動の活性化を達成できました。上記の GCaMP6s の観察にあたっては、PDMS 樹脂製のマイクロ流路デバイス（注10）を開発し、流路内に線虫を閉じ込めることでイメージングを行いました。とくに、筋肉および HSN 運動神経においては、マイクロ流路を活用することで、(1) KFL-VN による神経活動の光制御、(2) GCaMP6s による神経活動イメージング、(3) 筋収縮あるいは HSN を介した産卵という行動の観察の3点を同時に実現しました（図 1D）。

③社会的意義・今後の予定など

本研究は、長波長のケージド化合物を開発し、線虫に適用し神経活動と行動を光制御した世界初の報告です。本研究で開発されたケージド化合物は、光遺伝学（注11）で問題となる GCaMP とのスペクトル重複がないため、神経活動に人為的に介入しながら、同時に神経活動をイメージングすることができます。神経回路機能の解析が光学顕微鏡下で容易に行えるため、本手法

を活用し、神経伝達の障害から生じる神経・精神疾患、記憶学習障害などの病態解明・治療法開発の進展が期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「*Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*」

論文タイトル：Neural and behavioral control in *Caenorhabditis elegans* by a yellow-light-activatable caged compound

著者：Hironori Takahashi, Mako Kamiya, Minoru Kawatani, Keitaro Umezawa,
Yoshiaki Ukita, Shinsuke Niwa, Toshiyuki Oda*, Yasuteru Urano*
(*共同責任著者)

DOI 番号：10.1073/pnas.2009634118

アブストラクト URL：https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2009634118

6. 問い合わせ先：

<本研究に関するお問い合わせ>

東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室／

大学院医学系研究科 生体物理医学専攻 生体情報学分野（兼担）

教授 浦野 泰照（うらの やすてる）

TEL: 03-5841-4850（薬）、03-5841-3601（医）

FAX: 03-5841-4855（薬）、03-5841-3563（医）

E-mail: uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

山梨大学大学院総合研究部医学域 解剖学講座構造生物学教室

教授 小田 賢幸（おだ としゆき）

TEL: 055-273-6743

FAX: 055-273-6743

E-mail: toda@yamanashi.ac.jp

<報道に関するお問い合わせ>

東京大学大学院医学系研究科 総務係

Tel:03-5841-3304、Fax:03-5841-8585

Email: ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

山梨大学 総務部・総務課・広報企画室

Tel:055-220-8005、Fax:055-220-8799

Email: koho@yamanashi.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）ケージド化合物：神経伝達物質、核酸、イオン、薬剤、蛍光物質、タンパク質などの生理活性物質の活性部位が光分解性の官能基によって修飾され、活性が低下した化合物の総称。光照射によって光分解性官能基（ケージ基）が外れ本来の活性が回復するため、光をトリガーとして生体内のシグナル伝達に干渉できる。

(注2) TRPV1 受容体: Transient Receptor Potential Vanilloid 1。トウガラシの辛み成分カプサイシンの受容体であり、カプサイシンとの結合により細胞内に Ca^{2+} などの陽イオンを透過する。

(注3) 線虫 *C. elegans*: 体長 1 mm ほどの透明な身体を持つ線虫の一種。簡単に飼育でき、遺伝子組み換え株の作製が容易であるため、発生学、遺伝学、細胞生物学、神経科学など、多くの生命科学研究分野でモデル生物として用いられている。学名は *Caenorhabditis (C.) elegans*。

(注4) 蛍光カルシウムセンサー GCaMP6s: Ca^{2+} と結合することで蛍光強度が変化する蛍光タンパク質センサーの1つ。神経活動の活性化に伴って神経細胞内に Ca^{2+} が流入するため、GCaMP の蛍光値が上昇し、神経活動を間接的に可視化できる。

(注5) 光忌避反応: 短波長の光 (紫外線~青色光) に対して線虫が示す応答の一種。短波長光の照射により線虫の光受容体 LITE-1 が活性化し、移動速度の増加や後退運動が引き起こされる。

(注6) BODIPY: boron dipyrromethene の略称。2 フッ化ホウ素 (BF_2) とジピロメテンが複合体を形成した蛍光色素であり、鋭い吸収・蛍光スペクトルを持つ。

(注7) モル吸光係数: 物質が光を吸収する程度を表す定数。この値が大きければ大きいほど、その物質は光を吸収しやすいといえる。ケージド化合物の場合、モル吸光係数の大きさとアンケージ効率が比例する。

(注8) HOMO エネルギーレベル: 電子を持っている分子軌道の中で最もエネルギーが高い分子軌道 Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO、最高占有分子軌道)の軌道エネルギー。分子の構造が判明していれば、コンピュータ計算で HOMO エネルギーレベルの値を求めることができる。

(注9) アンケージ: 光照射によってケージド化合物が分解し生理活性物質が放出されること。

(注10) マイクロ流路デバイス: 深さ・幅が数~数百 μm の微小な流路構造をもつ小型の実験装置。ガラスの微細加工による作製や、鋳型にシリコンの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) などの樹脂を流し込んで成型し作製する方法がある。

(注11) 光遺伝学: 光によって構造変化するタンパク質を利用し、細胞機能を光制御する手法。チャンネルロドプシンと呼ばれる光で開口するイオンチャンネルを用いることが多い。

8. 添付資料:

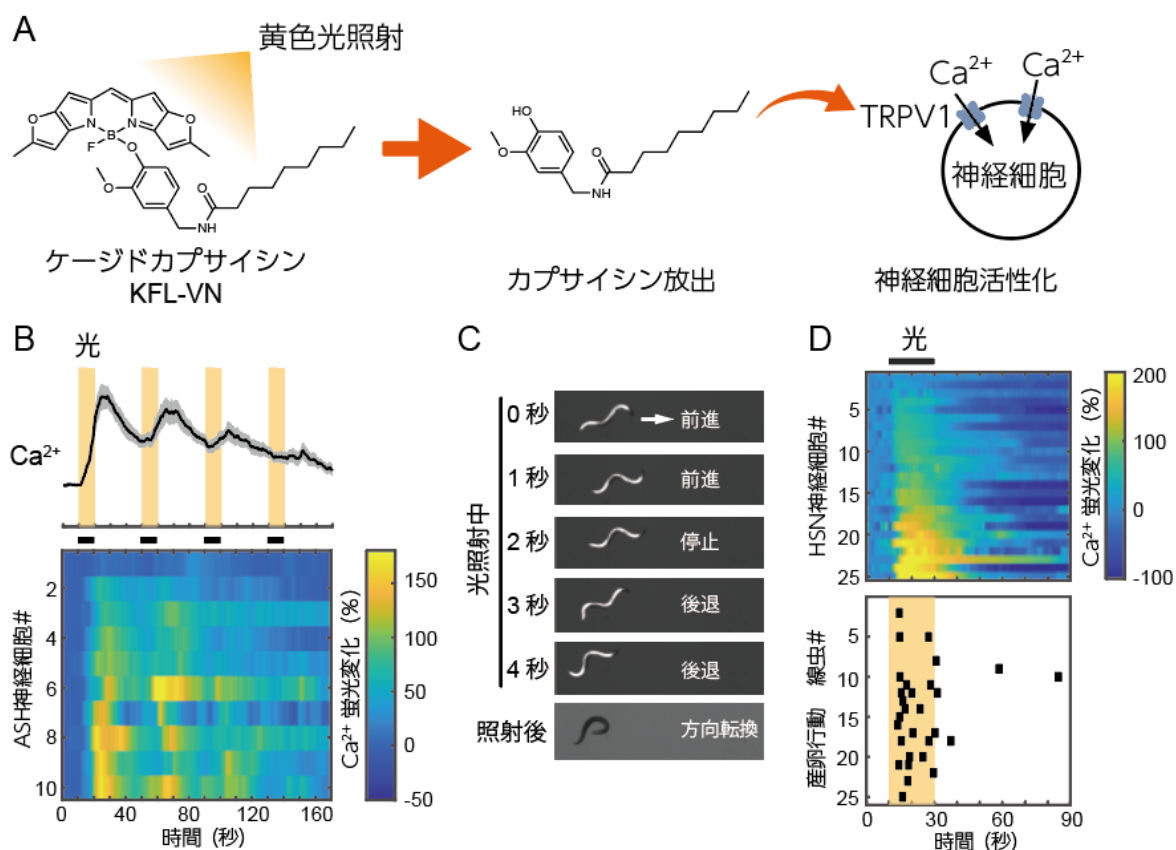


図 1. 本研究で開発したケージド化合物による線虫神経活動・行動の光制御

- (A) 本研究で開発したケージドカプサイシン KFL-VN。黄色光を照射するとカプサイシンが放出され、神経細胞上の TRPV1 受容体に結合し、神経細胞を活性化する。
- (B) ASH 神経細胞内の Ca^{2+} 蛍光変化をグラフ化。ASH 神経細胞に TRPV1 を発現した線虫に KFL-VN を投与し、光で ASH を活性化させることに成功した。
- (C) 自由に動き回る線虫の ASH 神経細胞を光照射によって活性化し、後退運動を引き起こすことに成功した。
- (D) HSN 神経細胞内の Ca^{2+} 蛍光変化をグラフ化（上）。産卵行動が観察された時間に黒点を打った（下）。HSN 神経細胞に TRPV1 を発現した線虫に KFL-VN を投与し、(1) 光照射による HSN の活性化、(2) Ca^{2+} センサー-GCaMP6s による神経活動モニタリング、(3) 産卵行動の観察の 3 つを同時に達成した。