

戦略研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「ファイバーレス光遺伝学による高次脳機
能を支える本能機能の解明」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：須藤 雄気
(岡山大学学術研究院医歯薬学域
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

従来の光遺伝学(オプトジェネティクス)は、生体透過性の低い可視光を用いていたため、脳深部への適用には光ファイバー刺入が必須であり、侵襲と行動制限が避けられなかった。本研究の目的は、ランタニドマイクロ粒子(LMP)を用いて、生体透過性の高い近赤外光から可視光を発光させるアップコンバージョン(UPC)発光を利用し、体外からの近赤外光照射により、脳深部においてUPCにより可視光を発生させ、その光により光遺伝学ツールであるロドプシタンパク質の活性を制御することで、特定神経活動操作する手法を確立することである。

そのために、須藤グループによる生物物理学的研究と、石北グループによる理論科学研究により、ロドプシン分子の探索および効率的な改変を行い、UPC発光に最適化した分子を作出した。山中・小野グループは、これらの分子を特定神経に発現させ、近赤外光を体外から照射することにより、光ファイバーの接続なしに特定神経活動を操作する低侵襲、自由行動下のファイバーレス光遺伝学を開発し、本能機能の一部を解明した。

ここで、須藤グループは、約 200 種類の新規分子の発見と、様々な時空間分解能での構造・機能解析で成果を得た。また、上記の知見を光遺伝学へ適用し、1,000 倍の神経制御活性の向上、大幅な波長域の拡張(100 nm)、機能改変などを達成した。石北グループは、当時結晶構造が解かれていなかった神経抑制型ロドプシン(anion channel rhodopsin 2, ACR2)の理論構造を構築し、須藤グループにフィードバックした。また、同じく脳内で神経抑制を惹起する ACR1 の長波長化を目指すため、タンパク質の吸収波長計算、さらに野生型タンパク質において長波長化を抑制しているアミノ酸残基を同定する計算手法を開発し、ファイバーレス光遺伝学で必要となる長波長化変異体の作成を理論面から支援した。山中・小野グループでは、これら光遺伝学ツールを利用・応用し、高次脳機能を支える本能機能として、睡眠時に記憶を消去する神経に着目してそのメカニズムと生理的意義の解明を実現した。

以上の成果は、期間内に 158 報の原著論文(グループ間共著論文9報を含む)、53 件の総説・解説、4 件の特許出願につながり、3グループの有機的で強固な連携のもと、当初の目的であるファイバーレス光遺伝学の確立とそれによる本能機能の解明を達成した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 多様なロドプシン類の単離・同定・解析と光遺伝学ツール開発(須藤グループ)

概要:

遺伝学的手法を用いて、自然界から新たなロドプシン類を多数発見し、新たな機能・物性の同定とそのメカニズムの解析を行った。これにより、従来の神経制御に加え、細胞成長制御をはじめとした光遺伝学の適用範囲の拡張に成功した。さらに、タンパク質工学的的手法を用いた合理的設計により、色や反応など機能や物性を自在に制御することで、新たな光遺伝学ツールを多数開発することに成功した。

2. ロドプシン類の理論的解析と設計(石北グループ)

概要:

ロドプシン類の高分解能構造(構造未知のロドプシンの構造予測を含む)と、種々の生化学的・分光学的データを基礎に、ロドプシン機能メカニズムの理論的解明と、分子機能の合理的改変を可能とする変異体予測法を確立した。

3. 神経活動と睡眠・記憶の消去との関連性の解明(山中・小野グループ)

概要:

ロドプシン型光遺伝学ツールを用いて、本能行動の中枢である視床下部に存在するメラニン凝集ホルモン産生神経(MCH 神経)が、記憶の中枢である海馬に密に投射していることを見いだした。これにより、生理機能が良く分かっていないレム睡眠が記憶の消去を行っているという証拠を示し

た。また、報酬や快感に関わる脳部位である腹側被蓋野(VTA)の抑制性神経(GABA 神経)が、ノンレム睡眠開始に極めて重要な役割を担っていることを明らかにするとともに、VTA-GABA 神経は視床下部の覚醒に関わるオレキシン神経に投射して、オレキシン神経活動を抑制することでノンレム睡眠を惹起している可能性を示した。このように、神経活動と睡眠・記憶との関連性を世界に先駆け明らかにした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 新たな光遺伝学ツールと手法の確立(須藤グループ)

概要:

これまで神経制御に限られてきたロドプシンを基盤とした光遺伝学において、光によりプログラム細胞死(アポトーシス)を任意の時空間領域で惹起できる手法や光により微細藻類の細胞密度を2倍程度高める手法など、神経制御以外の全く新規の光遺伝学手法を確立した。個体レベルの実証も行っており、ファイバーレスオプトジェネティクスへの適用も可能であると考えられる。

2. タンパク質構造に基づくロドプシン類の長波長化変異体予測法の開発(石北グループ)

概要:

理論により、神経抑制型ロドプシンの レチナル・シッフ塩基近傍の各アミノ酸ごとに19種類の変異体構造をモデルし、量子化学計算することで、長波長化変異体の候補をスクリーニングした。その結果を踏まえて、須藤グループ(実験)により実際に変異体を作成、吸収波長測定、といった一連の検証を行うことで、理論と実験の協奏、すなわちタンパク質の structure-based wavelength design の実用性を示した。

3. レム睡眠時の記憶制御機構について(山中・小野グループ)

概要:

光遺伝学を用いて、動物の本能機能である睡眠・記憶に関する基礎学理を構築することに成功した。脳神経活動を神経回路レベルで証明したことにより、今後の治療薬の開発にも資する成果である。

< 代表的な論文 >

1. Shuntaro Izawa, Srikanta Chowdhury, Toh Miyazaki, Yasutaka Mukai, Daisuke Ono, Ryo Inoue, Yu Ohmura, Hiroyuki Mizoguchi, Kazuhiro Kimura, Mitsuhiro Yoshioka, Akira Terao, Thomas S. Kilduff, *Akihiro Yamanaka, "REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories", (2019) **Science** 365, 1308-1313.

概要:

視床下部のメラニン凝集ホルモン産生神経(MCH 神経)が、記憶の中核である海馬に密に投射していることを見いだした。MCH 神経を光遺伝学や化学遺伝学を用いて活性化すると、記憶は悪くなり、逆に抑制すると記憶が良くなった。MCH 神経の活動をレム睡眠の時だけ止めても記憶が良くなったことから、レム睡眠時に活動する MCH 神経が記憶を消去している可能性について示した。レム睡眠が記憶の消去に関わっているという証拠を示した。各種メディアに取り上げられた。

2. Srikanta Chowdhury, Takanori Matsubara, Toh Miyazaki, Daisuke Ono, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Yuki Sudo, *Akihiro Yamanaka, "GABA neurons in the ventral tegmental area regulate non-rapid eye movement sleep in mice", (2019) **eLife**, 8:e44928.

概要:

報酬や快感に関わる脳部位である腹側被蓋野(VTA)の抑制性神経(GABA 神経)が、ノンレム睡眠開始に極めて重要な役割を担っていることを明らかにした。VTA-GABA 神経の活動を光遺伝学や化学遺伝学で活性化すると、ノンレム睡眠が開始され、抑制するとノンレム睡眠から覚醒した。VTA-GABA 神経の活動はノンレム睡眠時に高くなっており、視床下部の覚醒に関わるオレキシン神経に投射して、オレキシン神経活動を抑制することでノンレム睡眠を惹起している可能性を示した。

た。各種メディアに取り上げられた。

3. Kojima K, Miyoshi N, Shibukawa A, Chowdhury S, Tsujimura M, Noji T, Ishikita H, Yamanaka A, *Sudo Y. "Green-sensitive, long-lived, step-functional anion channelrhodopsin-2 variant as a high-potential neural silencing tool", (2020) **J. Phys. Chem. Lett.** 11, 6214-6218.

概要:

神経抑制型のアニオンチャネルロドプシン(ACR)を対象に、理論計算をもとに、緑色吸収・ステップファンクション・長時間開口型分子を創成し、実際に神経抑制に有用なツールであることを示した。日経新聞電子版に取り上げられた。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 須藤グループ

研究代表者: 須藤 雄気(岡山大学学術研究院医歯薬学域 教授)

研究項目: ファイバーレス光遺伝学を支える分子開発と検証

- ・既存分子の原理・動作機構の理解
- ・新規分子の探索・改変
- ・線虫・培養細胞による機能確認

② 石北グループ

研究代表者: 石北 央(東京大学先端科学技術研究センター 教授)

研究項目: ファイバーレス光遺伝学を支える分子機構の解明

- ・レチナルタンパク質の吸収波長計算手法の確立
- ・プロトン・イオン輸送機構の解明
- ・ACR1 長波長化変異体の同定
- ・ランタニド粒子によるアップコンバージョン機構解明

③ 山中・小野グループ

研究代表者: 山中章弘(名古屋大学環境医学研究所 教授)、小野大輔(名古屋大学環境医学研究所 講師)

研究項目: ファイバーレス光遺伝学開発

- ・機能確認・ウィルスベクター・遺伝子改変動物作成
- ・視床下部神経活動操作による、睡眠覚醒と記憶制御のメカニズム解明

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

ロドプシンの安定化で、千葉大学の村田武士教授と共同研究を行い、構造・理論面で成果を得るとともに(原著論文4報)、発見・創出したロドプシン全般において、特許化を足がかりに複数の企業との産学連携を模索している。

また、高効率にて近赤外光を可視光に変換するランタニド粒子の開発を、アップコンバージョン材料工学の第一人者であるシンガポール国立大学の Liu 教授と共同開発した。ここでは、海外招聘にて、2017 年度に Liu Xiaogang 教授を名古屋大学に招聘し、セミナーをして頂いた。加えて、2018 年度の海外派遣にて、研究代表者と大学院生が Liu 教授の研究室に赴き、ランタニド粒子の開発を行った。これらの共同研究の成果として、Nature Communications 2019 に共著論文を成果発表することに繋がった。さらに、共同グラント申請(2 件)など共同研究の発展にも繋がった。並行して、ファイバーレス光遺伝学を脳最深部に適用するために、ランタニドプローブの開発を東北大学の田中徹先生と共同で行った。また、光遺伝学の最新情報を共有する場である、光操作研究会を 2009 年より主催しており、11 回目は、CREST オプトバイオの後援によって、名古屋で開催した(2019 年 9 月 11-12 日 名古屋工業大学)。