

# 「生命機能メカニズム解明のための光操作技術」研究領域 領域活動・評価報告書

－2019 年度終了研究課題－

研究総括 七田 芳則

## 1. 研究領域の概要

本領域では、光によって生体を制御する革新的な技術の開発を目的とします。このため、「操作」および「観察」とそれらの技術を活用した「機能解明」の 3 つを領域の柱とし、異分野による連携、融合による新しい生体機能制御技術の確立を目指します。

近年、ライフサイエンス分野では、光の特性を活かした様々な操作技術の開発により、生命現象の理解が飛躍的に進展しようとしています。例えば、オプトジェネティクスは、光感受性タンパク質の神経細胞への発現と特定波長の光照射によって、脳神経回路の機能解明に革命的な変化をもたらしました。また、最近では、光感受性タンパク質を用いた酵素活性や細胞内シグナル伝達の操作技術、ゲノム編集などとの組み合わせによる遺伝子発現の制御技術など、新たな生体機能制御技術の萌芽も確認されます。

これらの技術開発が爆発的に広がろうとしている背景には、光関連タンパク質の同定や関連因子の知見が過去 70 年以上にわたって膨大に蓄積され、これらタンパク質を利用した生体への応用の基礎ができあがっていたことが挙げられます。そのため、基礎的な知見のさらなる展開により既存の技術の弱点を解消し、さらに、世界的にも新奇な光操作技術の開発が喫緊の課題として浮かび上がっています。

以上のことから、本研究領域では、生体機能を光によって操作する技術、光操作によって表出する生命現象を観察・計測・解析する技術、さらにはそれらの技術を用いて生命機能の解明を目指す研究開発を推進します。領域の運営にあたっては、我が国が強みを持つ光生物学や光学、ナノテクノロジー、工学、生理学などとの連携を促すことで、革新的な光操作技術の確立を目指します。

## 2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：12 件

備考：河野恵子研究者の課題はライフイベントによる研究中断により 2020 年 11 月終了となるため、2020 年度の事後評価対象とする。

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

## 3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「生命機能メカニズム解明のための光操作技術」領域に設けた選考委員 12 名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <https://www.jst.go.jp/pr/info/info1211/index.html> (第一期))の他、以下の点(いずれかでも構わない)を考慮した。

①光による操作・制御を実現・革新しようとする際の基本的な要素(分子設計・技術など)の新規性・独自性

②観察技術の局所から全身への展開

③光による操作・制御を通じて解明しようとする生命機能メカニズムの科学的意義

また、さきがけ研究が将来の日本の研究を牽引する若手研究者の育成も視野に入れていることから、若手研究者自身の新奇な研究・開発をサポートし、自身が corresponding author となる研究成果が期待できる研究提案を重視した。

## 4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザーの内 4 名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	200 件	30 件	13 件



備考:

- 1) 2016 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
  - ・河野恵子研究者  
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

5. 研究実施期間

- 2016 年 10 月～2020 年 3 月  
2016 年 11 月～2020 年 3 月(川上隆史研究者) 研究者の異動の時期を考慮したため。  
2017 年 4 月～2020 年 3 月(五十嵐啓研究者) 海外契約締結までに時間を要したため。  
2017 年 4 月～2020 年 3 月(野間健太郎研究者) 研究者の異動の時期を考慮したため。

6. 領域の活動状況

1) 領域会議: 7 回

研究者からの進捗報告のほか、研究総括および領域アドバイザーによるこれまでの研究活動に関する特別講演、研究者間の交流活性化を目的としてグループディスカッション、浜松ホトニクス(株)中央研究所訪問を実施した。

2) 研究総括および領域アドバイザーの研究実施場所訪問(サイトビジット): 15 回

本領域では、専門分野を考慮した「メンター(担当アドバイザー)制」を導入し、各研究者に担当アドバイザー 1 名を割り振っている。メンターのアドバイザーには、特に担当研究者の進捗状況を把握してもらい、適切な助言・指導を行っていただいている。研究実施場所訪問においても、研究総括と担当アドバイザー(1 名)により実施した。具体的には、研究者から研究実施体制(組織・人員体制・進行プロジェクト・研究設備機器など)の紹介とさきがけ研究の状況(進捗報告・今後の研究計画など)説明を受け、研究総括および担当アドバイザーからのフィードバックの機会を設けた。また、さきがけ研究期間中の具体的な目標設定も行った。

研究者名	メンター(担当アドバイザー)名
五十嵐啓	伊佐正
伊藤博	山中章弘
井上謙一	寺崎浩子
大川宜昭	能瀬聡直
川上隆史	徳富哲
高山和雄	大内淑代
角田聡	寺北明久
徳田崇	片岡幹雄
野村雄高	太田淳
野間健太郎	寺北明久
丸山剛	森郁恵
山下貴之	高本尚宜

3) CREST「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」の領域会議への参加: 2 回

- ・第 3 回領域会議 発表者:大川宜昭研究者、高山和雄研究者、野村雄高研究者
- ・第 4 回領域会議 発表者:五十嵐啓研究者、大川宜昭研究者、高山和雄研究者、野間健太郎研究者、山下貴之研究者、ほか

4) さきがけ「量子技術を適用した生命科学基盤の創出」とのスコーピング会議: 1 回

参加者:高山和雄研究者、角田聡研究者、野間健太郎研究者、丸山剛研究者、山下貴之研究者、ほか  
開催目的は、技術シーズとニーズを有する両領域間で、議論を深め、将来に向けた異分野融合が生み出すことである。ショートトークとポスターセッションによる研究紹介、両領域のトピックスや問題・課題についてのグループディスカッションを実施した。



- 5) 研究成果報告を兼ねた学会シンポジウム・ワークショップの開催：3回
- ・2019年9月13日 日本動物学会第90回大阪大会シンポジウム（大阪）  
「光を利用した生命機能メカニズムの解明」  
発表者：五十嵐啓研究者、井上謙一研究者、ほか
  - ・2019年9月25日 第57回日本生物物理学会共催シンポジウム（宮崎）  
「光操作による生命機能解析」  
発表者：大川宜昭研究者、高山和雄研究者、徳田崇研究者、野村雄高研究者、山下貴之研究者、ほか
  - ・2019年12月6日 第42回日本分子生物学会共催ワークショップ（福岡）  
「オプトジェネティクスによる生命機能解析の最前線」  
発表者：伊藤博研究者、角田聡研究者、丸山剛研究者、ほか

6) 承認された共同研究フェーズビリティスタディ：9件

承認年度	研究者名		
2017	高山和雄	徳田崇	
2017	野村雄高	山下貴之	
2017	井上謙一	川上隆史	
2018	角田聡	山下貴之	
2019	井上謙一	角田聡	吉井達之(2期生)
2019	丸山剛	市村垂生(他領域)	
2019	野間健太郎	吉井達之(2期生)	
2019	徳田崇	山吉麻子(2期生)	
2019	高山和雄	近藤邦生(2期生)	

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、これまでの評価会（研究報告会、領域会議等）での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを総合して、下記の流れで研究総括が評価を行った。

（事後評価の流れ）

- 2020年1月 評価会開催
- 2020年2月 研究総括による事後評価
- 2020年3月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 相手機関との研究交流状況(内外国の研究機関等と共同して研究を実施するものに限る。)

※該当する成果がある場合には「世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

9. 評価結果

本領域は、生体機能を光によって操作する技術、光操作によって表出する生命現象を観察・計測・解析する技術、さらにはそれらの技術を用いて生命「機能解明」を目指す研究開発、の3つを柱とし、異分野による連携・融合によって革新的な光操作技術の確立を目指すものである。2016年度には、光操作の方法や観察法を工夫して脳機能解明に取り組む課題に加え、光操作によりがんや老化の本質に迫ろうとする課題、光操作法でゲノム改変や視覚再生を試みる課題、光操作に用いる光源・分子ツールやデバイスの開発を目指す課題など、多彩な13提案を採択した。このうち、ライフイベントにより研究を一時中断した研究者1名を除き、12名が本年度にさがけ研究を終了する。12課題の大部分はさがけ研究の目的を十分に達成する研究成果を上げ、その中にはこの分野を今後牽引すると期待できる優れた成果がある。一方、当初の目的に対して十分な成果が得られなかった課題もあるが、目的達成のために最大限の努力をした結果、今後の研究展開の重要な基礎を築いたものと考えられる。

領域全体としては、専門分野も生命科学系のみならず化学、工学、光科学などに広がり、領域会議などの場



において多面的な意見交換が行われた。研究総括や領域アドバイザーによる助言・激励に加え、研究者同志が互いに助言しあうことによって研究のレベルを向上させ、これまでは異分野とされていた研究者間の共同研究が盛んに行われたのも特徴的である。また、12名の研究者のうち、研究期間中に新たな上級ポストの獲得を果たした研究者が7名、また、当初からPIであった2名以外に、6名の研究者が新たにPIとして活躍できるポストに着任し、研究者としての大きな成長が見られた。

評価対象の12課題のうち、特に優れた成果が出たと考えられる課題は4つである。大川研究者は、自由行動下のマウス脳内で記憶痕跡細胞を光で観測する技術を開発し、1つのエピソードに対応する記憶痕跡細胞群の中に複数の亜集団が存在することを発見した。この発見は、オプトジェネティクスによる初期の重要な発見（記憶痕跡細胞の発見）を革新する可能性を秘めている。高山研究者は、光制御ができるCRISPR-Cas9の系を構築し、アデノウイルスに搭載してがん細胞を攻撃するという当初の計画を完遂した。さらに、がん細胞の致死率を大幅に上げる光制御のがん細胞キラーアデノウイルスの創成にも成功し、今後臨床応用できる可能性が感じられる。徳田研究者は、世界最小（体積1mm<sup>3</sup>、重量2.3mg）の生体埋め込み対応ワイヤレス型光刺激デバイスを開発し、マウスモデルでの実証研究にも成功している。そのデバイスをさらに改良するとともに、創薬・医療分野への貢献が期待されるデバイスとしての展開を試みている。最後に山下研究者は、脳内神経細胞を光操作する技術として、アップコンバージョン粒子を利用した近赤外光照射法とシンチレーション発光を利用したX線照射法を開発し、ファイバーレス光遺伝学に近づいた。特に後者は世界的にも新奇な方法であり、このさきがけ領域の当初のもくろみ（世界的にも新奇な光操作技術の確立）を実現した顕著な成果である。

さきがけ研究が終了する12名の研究者には、領域会議や懇親会で形成したネットワークを生かして、今後さらなる研究の発展を期待する。

#### 1. 五十嵐 啓 研究者「高速光操作による記憶行動を支える脳回路同期機構の解明と回復」

本研究は、記憶行動中のマウス記憶回路（嗅内皮質）から、光遺伝学を用いて脳活動を記録し、その回路の情報交換メカニズムを理解することを目的とした。実験の結果、マウスの匂い報酬統合学習において、嗅内皮質の2種類の細胞の役割をオプトテトロードと光遺伝学により解析し、Fan cellが新規の学習に関与することを明らかにした。また、アルツハイマー病の原因解明に向けて、内側嗅内皮質の活動パターンに主要な役割を果たすグリッド細胞の活動が、アルツハイマー病モデルマウスでどのように失調しているかを解析し、グリッド細胞の活動が劣化していることを明らかにした。今後は光遺伝学によるアルツハイマー病の解明にむけて、光遺伝学によりグリッド細胞の活動を活発化させることで回復するかを検討する。

当初計画した3つの研究テーマのうち、2つについて大きな成果を得ており、テーマ3についても現在、本格的に取り組んでいる。今後の進展に期待する。

本研究者は、さきがけ研究を通じて海外で確実に研究室体制を整え、研究補助者の援助も受けて研究を遂行してきた。また、アメリカと日本の研究環境を比較し、課題と考えられる点については多数の研究者と意見交換を行い、その改善案もまとめた。さきがけスタートアップ支援制度などの実現にも大きく貢献したことは特筆できる。

さきがけ終了後の研究の発展につながる、アメリカでのグラントも採択されている。テーマ3であるアルツハイマー病のモデルマウスで失調している回路活動の回復が実現できれば、ヒトの記憶障害疾患の治療法の発展に繋がることも期待されるため、研究者としてさらに飛躍することが期待される。

#### 2. 伊藤 博 研究者「空間選択的光操作を用いた脳内生成モデルに基づく行動決定機構」

脳内で行動を決める機構の解明に向けて、空間探索課題を遂行中のラットの脳内神経細胞の活動を記録し、空間選択的な光遺伝学により特定の神経活動に摂動を与えることで脳内地図を操作し、行動決定への影響を明らかにすることを目指した。その過程で、自由行動中のラットの脳内を観察すること、また2次元照射が可能なシステムの構築を試みた。その結果、光の空間選択的制御技術としてホログラフィー技術を用い、空間光変調器を用いて光の位相を操作して実験に利用できる光照射パターンを実現した。一方、自由行動下の動物にこの技術を適用するには、脳に取り付けた光ファイバーがねじれることを補償するコミュニケーターの開発が必要になった。本課題では、その開発に成功し、現在、神経細胞活動計測と活動制御の実験を本格的に行っている。当初計画した2光子励起を用いた3次元制御については、購入できる機器では不可能なことがわかり、将来のファイバー素子開発を期待することになった。

自由行動下の実験動物の脳内において、特定神経の活動を自在に高い時空間精度で操作することは、神経科学者の夢であり、その実現に向けていくつかの課題を解決したことは大きい。本研究者は、脳内地図の研究において華々しい成果をあげており、EUでのグラントの獲得にも成功した。研究者の理想的な実験環境の整備のために、このさきがけ研究期間に行った試行錯誤が研究者の将来にとって有益であることを期待す

る。また、将来的には空間探索課題遂行中の動物に対して高い時空間精度で神経活動の操作を達成して、頭の中に描く地図がどのように表象され、行動発現に関わっているのかについて解明することを期待している。

### 3. 井上 謙一 研究者「光操作による神経ネットワークの高解像度5D解析法の確立を目指した基盤技術開発」

霊長類での光遺伝学的研究の進展を目指して、発現ベクターの開発、光ツールの脳内発現量の長期モニター、特定の投射系の選択的刺激に対する脳内ネットワークの応答観察、広範な領域の光刺激による脳内ネットワークの応答などについて、基礎的な研究を行った。効果的な光刺激を実現する遺伝子導入手法として AAV ベクター(AAV2.1)を開発し、霊長類における効率的かつ安定的な神経活動操作・計測を実現した。また、霊長類において、前頭眼野—上丘投射系の光刺激による上丘活動の変化様式が固視課題時とサッカー課題時で大きく異なることを初めて見出した。一方、光刺激による局所神経ネットワークの解析には、更なる光刺激デバイスの改良が必要であることがわかった。

また、本研究者は、追加支援【共同 FS】による共同研究のほか国内外で共同研究を広く行っており、研究能力が非常に高いことが示されている。今後は、この3年半の期間で行った成果を論文として発表することになるが、当初に立てた目標に向かい、霊長類で研究する大きな意義であるヒトの疾患を念頭に、神経ネットワークの解析を進めていくことが期待される。霊長類神経回路解析は、ヒトの高次脳機能のメカニズムの解明や、脳機能障害としての精神・神経疾患の病態の理解、および効果的な治療法開発を促進することは明白であり、研究者の今後の研究展開に期待する。

### 4. 大川 宜昭 研究者「記憶痕跡活動の可視化が開く記憶の新たな操作法」

「記憶痕跡細胞に特有の活動パターンから真の記憶痕跡を同定し、光による真の記憶痕跡の活動操作の確立を目指す」という困難な課題にチャレンジした研究である。研究の結果、1つのエピソードに対応する記憶痕跡細胞群の中に、複数の亜集団がそれぞれ別のタイミングで情報を表現・処理し、その集合として1つの記憶情報が構築されているという新たな脳内モデルを提出するに至った。つまり、真の記憶痕跡アンサンブルを同定することに成功した。この結果は、オプトジェネティクスの創成期の重要な発見(記憶痕跡細胞の発見)を革新する可能性があり、興味深い成果である。また、光による記憶アンサンブルの操作に関しては、実験系の構築がかなり進んでおり、今後の結果が期待される。

本研究者は、さきがけ期間中に獨協医科大学准教授として、独立・昇進した。さきがけ研究の成果が認められ、研究者としての飛躍につながったものと考えられ、今後の成長にも期待できる。独立後の研究体制の整備は今後の課題ではあるが、領域内で形成したネットワークを活用しながら、今後の目標である記憶障害の原因となる病態脳内での記憶情報表現機構の理解をぜひ進めほしい。

### 5. 川上 隆史 研究者「ペプチド系分子ツールを基盤とするたんぱく質光操作・光観察技術の開発」

現在の生命科学の分野では、特定の物質(タンパク質など)をラベルするのに特別なタンパク質(ハロタグなど)を利用しているが、タンパク質は高分子であるため、ラベルによるアーティファクトが危惧されている。そこで、本研究者は、独自に開発した分子進化学的手法を用いて、より分子量の小さなペプチドタグを新たに創成し、タンパク質ラベリングの技術革新を目指した。結果として10種程度のペプチドタグ候補が得られ、そのうちの1つ(ハロタグの基質でもあるクロロアルカンに結合する低分子ペプチドタグ)については従来のタンパク質タグに比べて性能は少し落ちるが、同様のラベリング効率が得られることを確認した。結果としてはまだモデル実験の域を出ていないが、今後の発展の可能性が期待できる成果である。

タンパク質の代わりに低分子のペプチドタグを用いるという着目点は優れており、これが実現できれば光操作における有用なツールが作成できると考えられる。結合の特異性の問題が解決され、本研究者が提案した様々な光操作や観察に使用可能であることが実証され、開発されたタグシステムが実用化されれば、現在商品化されているハロタグなどより有利な点が多くあり、様々な分野の研究に貢献できる可能性が高いと考えられる。さらに、同タグを用いた病気治療などの臨床研究への展開も期待できる。

本研究者は、さきがけ応募時には産業技術総合研究所の研究者であったが、その後すぐに山梨大学に助教として転出し、PIとして独立した研究室を立ち上げた。研究室の設備のセットアップも完了し、学内の共同研究なども含めて研究体制は整ったと考えられる。さきがけ研究を契機にPIとしての第一歩を踏み出したことを祝福したい。本研究者のもつケミカルバイオロジーの強みを活かして、光操作に関する本研究課題を論文発表し、さらなる新たな研究の展開を期待する。

### 6. 高山 和雄 研究者「光照射により任意の組織においてゲノム編集・遺伝子発現操作する技術の開発」





光制御できる CRISPR-Cas9 の系を構築し、アデノウイルスベクターに搭載してがん細胞（前立腺がん）を攻撃し、殺傷することができることを示した。当初の研究計画を完遂し、成果を得たことは評価される。また、がん細胞の致死率がそれほど高くないことから、新たに光で操作できるがん細胞キラーアデノウイルスを創成してがん細胞の致死率を高めたシステムも構築し、致死率の問題も確実に克服している。国民の二人に一人はがんになる時代において、様々な抗がん作用を持つ医薬の開発は欠かせない。本研究で開発された「光操作ゲノム編集遺伝子発現活性化システムによる抗がん遺伝子医薬」の社会・経済への波及効果は大きいと考えられる。

本研究者は、追加支援【共同 FS】や震災での機器破損に対する補填など、追加の研究費も有効に活用している。また、CREST 研究者とも共同研究を進めており、当該研究者の開発したツールと技術に汎用性があることを物語っている。海外との研究交流も今後進んでいくと期待される。

本領域で最年少のさきがけ研究者であったが、第一著者論文 3 報、積極的な研究交流、活発な学会発表と研究が格段に進歩し、本研究者の大いなる飛躍につながったと確信できる。PI として独立した研究室も立ち上げており、今後、新たな研究テーマを継続的に見出し、0 から 1 を生み出すような革新的な研究を行なっていくことが推察される。課題突破力があるため、若手研究者リーダーとしてますます頭角をあらわしていくことが期待される。

#### 7. 角田 聡 研究者「新規酵素型ロドプシンを用いた視覚再生の挑戦」

新規酵素型ロドプシンについては、当初の目的通り、その物理化学的特性や変異体解析を広範に行い、光反応機構の解析に成功している。また、酵素活性についても、哺乳類培養細胞系での細胞内 cAMP の光操作を実証するなど、着実に成果をあげている。さらに、視覚再生のために、新規酵素型ロドプシン遺伝子の網膜への導入を開始したことは高く評価できる。一方、得られた分子特性や活性化メカニズムの理解を、視覚再生ツールとしてどのように活かすかの戦略は今後の課題となっている。cAMP より cGMP に対する酵素活性がかなり高いという報告は、新規酵素型ロドプシンが視細胞を含めた視覚再生ツールとしての高いポテンシャルを示しているため、将来の社会・経済への波及効果は十分に期待できる。

スタートしたばかりの交流が多いが、将来の発展も含め、良い共同研究を行っているとは評価できる。特に、企業とのつながりは、将来の発展とも関係して極めて高く評価できる。

視覚再生という医学・生理学的に重要なテーマ設定は、さきがけ応募時点では非常に挑戦的であったと推測される。一方で、そのテーマを進めることで、未知の研究領域に一步踏み出したことは確かである。さきがけのテーマを今後発展させることにより、独立性と発展が期待できる。研究者として、彼自身が持つ特技（電気生理）を中心として、視覚再生やそのためのツール作りを展開することで、より飛躍してほしい。

#### 8. 徳田 崇 研究者「完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスの実現」

オプトジェネティクス研究に供するために、CMOS 技術により、赤外光照射によりエネルギーを蓄積し青色光を発光する生体埋め込み型光刺激デバイスを開発しようとする研究である。このために、1) 基本型 CMOS 光刺激チップの開発、2) 基本型インプラントブル光操作デバイス構造の開発・パッケージング、3) in vivo オプトジェネティクスでの機能実証、4) 高機能型インプラントブル光操作・電位増幅デバイス開発、5) 光制御・電気計測統合型マルチデバイス制御システムの開発の 5 課題を設定した。これまでに、独自のオンチップ太陽電池分離プロセスの開発に基づき、赤外光照射青色光発光チップの開発に成功し、これを集積しプリント基板を用いない世界最小の CMOS ワイヤレス光刺激デバイスを発表した。今後、このデバイスが多くのユーザーに使われるようになり、オプトジェネティクス研究の強力なツールとなれば、生命科学分野での貢献は大いに期待できる。また、このデバイスの応用範囲は、オプトジェネティクスにとどまらず、生体埋め込み型微小センサーとして改変を加えれば、例えば各種臓器での病変部位に埋め込み、リアルタイムでの細胞情報獲得にも展開できると考えられる。その他にも多様な効果は考えられるが、大勢のユーザーに利用されることが前提となる。多様な研究者に利用してもらい、それぞれの研究目的に沿った on demand デバイスに深化させることが重要であると考えられる。

本研究者は、さきがけ期間中に東京工業大学教授に昇進した。さきがけ研究の成果が認められ、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながったものと考えられる。独立後の研究体制の整備は今後の課題ではあるが、領域内外の研究者の研究をサポートするデバイス提供により、研究ネットワークに広がりや深まりを与え、さらに高度な研究に挑戦してほしい。

#### 9. 野間 健太郎 研究者「光による革新的ゲノム改変技術の開発」

研究者自身の研究により、ヒストンに miniSOG を結合したタンパク質によってゲノム全体への変異導入がで

きることが明らかになっていた。そこで、本さがけ研究では、ゲノムの特定領域に変異を入れる方法として、特定の転写因子に miniSOG を結合させて実験を行うことを計画した。しかし、研究の過程で、研究計画のもとになった手法は、実験条件などの大幅な改良が必要となり、京都大学との共同研究によって、その変異導入のメカニズムにまでさかのぼって検討を行っている。一方、線虫への遺伝子導入の効率を格段に高める方法を発展させ、論文として発表することができた。この研究は、モデル生物としての線虫研究を促進するという点で評価できる。

本研究者はさがけ研究の採択当時は米国での博士研究員であったが、その後、日本で独自の研究を推進できる助教ポジションを獲得した。研究意欲は盛んであり、上記の研究以外にも 5 件の共同研究を進めており、酵母などを用いた系での実験検証も、領域内で共同研究を活かして進めている。また、トランスジーンのゲノムへの挿入方法に関するデューク大学との共同研究は、さがけ研究での成果の発展として期待でき、今後の展開が興味深い。本研究者の精神力と性格は研究者としての武器であるため、このさがけ研究での経験を将来の発展につなげてほしい。

#### 10. 野村 雄高 研究者「長波長レーザーによる超深部顕微分光システムの開発」

本研究の目的は、生体透過率の高い 1.8  $\mu\text{m}$  の波長の光を発振するツリウム添加ファイバーレーザーを最適化し、それを利用して従来では到達不可能な生体深部を観察できる顕微鏡システムを開発することである。精力的な実験の結果、波長 1.8  $\mu\text{m}$  の高出力超短パルス光源の開発とその高パルスエネルギー化に成功し、このレーザーを用いて三光子励起蛍光顕微鏡の開発に成功した。また、赤色蛍光タンパクを導入した HeLa 細胞の観察と、赤色蛍光タンパク質を発現するラット海馬スライスの観察に成功し、三光子励起蛍光顕微鏡の実用化の可能性を示すことができた。実験動物を利用した生体深部の観察を行うことは時間的に不可能であったが、三光子蛍光顕微鏡に適したレーザー光源の開発から始めてそれを実現し、さらに細胞観察までを達成できたことは高く評価できる。

特筆できることは、研究者自身がレーザー光源の開発から顕微鏡までの開発を独自に行い、生体試料の観察に関してはバイオ系研究者と協力し、効率的に研究を進めたことである。領域内での情報交換を有効に活用できる研究者の積極性と協調性が大いに発揮されたと考えられる。また、本研究は本領域が期待する「世界的にも新奇な光操作技術の確立」を実現した研究としても評価できる。

ファイバーレーザーを三光子蛍光顕微鏡光源として使用できることを示した点は、従来の二光子蛍光顕微鏡よりも更に生体深部での蛍光計測を可能とするため、その科学技術への影響は大きい。また、多光子顕微鏡の小型かつ低価格化の実現に向けても大きな意義があると考えられる。さらに、1.8 $\mu\text{m}$  高エネルギー超短パルス光源は、3 倍波発生による組織の無染色観察、二光子顕微鏡への展開も期待できる。今後の本研究者の幅広い分野での活躍を期待する。

#### 11. 丸山 剛 研究者「光操作型一生体内不均一変異細胞誘導と変異細胞の挙動解明」

本研究の目的は、オプトジェネティクスと CRISPR/Cas9 システムを融合させて、1 つの変異が入った初期のがん細胞を生体内にランダムに作製させるツールを開発し、モデル動物を利用して変異細胞の動態を解明することである。光操作ツールとしては培養細胞系で機能することが確かめられ、現在、マウスにノックインしてうまく機能する系の最適化を行っている。また、変異を導入するための光照射システムも共同研究によりすでに作製している。複雑な遺伝子構造をもつツールの開発に時間を要したが、最終的な結果に向けての困難な課題を解決したことは高く評価できる。一方、周辺正常細胞の変異細胞に対する排除能惹起機構についても精力的に研究を進め、新規の機構を発見してトップジャーナルに発表することができた。

光操作、光観察を利用した研究については、ノックインマウスの作製が必須であり、今後の研究進展に期待する。発がんは、細胞に 1 つのがん遺伝子変異が生じ、段階的に変異が蓄積することでがん化すると言われているため、本研究を進展させることで、超早期段階でより効率的にがん変異細胞の排除を促進できる予防的治療の可能性を広げることができ、大きな社会的波及効果も期待できる。

本研究者はさがけ研究に採択された 2 年後に早稲田大学において PI ポジションを獲得し、上記の研究を広範に展開している。また、さがけ「量子技術を適用した生命科学基盤の創出」領域とのスコーピング会議に参加したことにより、当該領域の研究者と共同研究も開始しており、領域内外にネットワークを構築している点も評価できる。今後これらの交流を進展させることで、研究者としてのさらなる飛躍につなげてほしい。

#### 12. 山下 貴之 研究者「動物行動の神経基盤解明のための非侵襲光操作法の開発」

本研究では、ファイバーレス光遺伝学の構築を目指して、脳深部を光刺激するための方法とツールの開発を進めた。具体的には、アップコンバージョン粒子を近赤外光で照射して脳深部で可視光を発生させる方法と

シンチレーションにより発光する物質を X 線で照射する方法を試みた。アップコンバージョンについては、オプシンの活性効率をターゲットに、近赤外レーザー光強度の最適値を導き、脳深部 2mm までの光操作に成功した。また、X 線シンチレータについては、UV 光励起の併用により光操作の条件出しを行うことで、効率良く実験が進み、脳深部(4 mm)での光操作を行うことができた。どちらの方法についても論文として発表している。いずれも、自由に行動する動物の神経活動を遠隔・無線的に操作する新しい光遺伝学的手法として注目される成果と評価できる。特に X 線を利用する技術は世界的にも例がなく、本研究者の積極性と先見性が示された顕著な成果といえる。

研究者自身は電気生理学を主とした脳神経系の解析を得意とするが、広範な共同研究を構築して、光操作ツールの要となるアップコンバージョン、X 線シンチレータの素材選定を行なった。また、同じさきがけ研究者と共同して、シンチレータの発光により活性化する酵素ロドプシンの知見を集めたことは、本研究者の研究能力と積極的な情報収集能力の賜物である。本研究者はさきがけ研究期間に准教授に昇進し、近く教授のポジションを獲得して独自の研究を展開する予定である。本さきがけ研究において光操作手法の新規開発に取り組み、そのための技術開発に従事する経験を積めたことは、研究者としてのさらなる飛躍につながったものと考えられる。今後は応用研究を含めた広範な研究にチャレンジしてほしい。

## 10. 評価者

研究総括 七田 芳則 立命館大学総合科学技術研究機構 客員教授／京都大学 名誉教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は 2020 年 3 月末現在)

伊佐 正	京都大学大学院医学研究科 教授
上田 昌宏	大阪大学大学院生命機能研究科 教授
大内 淑代	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
太田 淳	奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 教授
片岡 幹雄	奈良先端科学技術大学院大学 名誉教授
高本 尚宜	浜松ホトニクス(株)中央研究所 室長
寺北 明久	大阪市立大学大学院理学研究科 教授
寺崎 浩子	名古屋大学大学院医学系研究科 教授
徳富 哲	大阪府立大学 名誉教授
能瀬 聡直	東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授
森 郁恵	名古屋大学大学院理学研究科 教授
山中 章弘	名古屋大学環境医学研究所 教授

## (参考)

件数はいずれも、2020 年 3 月末現在。

### (1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	48	49
口頭	92	31	123
その他	53	37	90
合計	146	116	262

### (2) 特許出願件数

国内	国際	計
9	3	12

### (3) 受賞等

- ・五十嵐 啓
  - 三島海雲学術賞(2017.7)
  - 安藤百福賞・発明発見奨励賞(2018.3)



New Vision Award (Donors Cure Foundation) (2018.3)

・伊藤 博

日本神経科学学会 奨励賞 (2017.7)

・大川 宜昭

田村科学技術振興財団(日医工株式会社) 第二回田村四郎科学賞 (2019.2)

・高山 和雄

日本薬学会 奨励賞 (2018.11)

第2回バイオインダストリー奨励賞 (2018.7)

・山下 貴之

文部科学大臣表彰 若手科学者賞 (2017.4)

(4)招待講演

国際 20 件

国内 62 件

## 別紙

「生命機能メカニズム解明のための光操作技術」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(2020年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
五十嵐 啓 (兼任)	高速光操作による記憶行動を支える脳回路同期機構の解明と回復 (カリフォルニア大学アーバイン校医学部)	カリフォルニア大学アーバイン校医学部 アシスタントプロフェッサー (同上)	44
伊藤 博 (兼任)	空間選択的光操作を用いた脳内生成モデルに基づく行動決定機構 (マックス・プランク脳科学研究所)	マックス・プランク脳科学研究所 リサーチグループリーダー (同上)	41
井上 謙一 (兼任)	光操作による神経ネットワークの高解像度5D解析法の確立を目指した基盤技術開発 (京都大学霊長類研究所)	京都大学霊長類研究所 助教 (同上)	42
大川 宜昭 (兼任)	記憶痕跡活動の可視化が開く記憶の新たな操作法 (獨協医科大学先端医科学統合研究施設)	獨協医科大学先端医科学統合研究施設 准教授 (富山大学大学院医学薬学研究部 講師)	48
川上 隆史 (兼任)	ペプチド系分子ツールを基盤とするタンパク質光操作・光観察技術の開発 (山梨大学大学院総合研究部)	山梨大学大学院総合研究部 助教 (産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター 研究員)	43
高山 和雄 (兼任)	光照射により任意の組織においてゲノム編集・遺伝子発現操作する技術の開発 (大阪大学大学院薬学研究科)	大阪大学大学院薬学研究科 招へい教員 (同上 特任助教)	44
角田 聡 (専任)	新規酵素型ロドプシンを用いた視覚再生の挑戦 (名古屋工業大学大学院工学研究科)	名古屋工業大学大学院工学研究科 特任准教授/科学技術振興機構 さきがけ研究者	42
徳田 崇 (兼任)	完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスの実現 (東京工業大学科学技術創成研究院)	東京工業大学科学技術創成研究院 教授 (奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 准教授)	45
野間 健太郎 (兼任)	光による革新的ゲノム改変技術の開発 (名古屋大学大学院理学研究科)	名古屋大学大学院理学研究科 特任助教 (カリフォルニア大学サンディエゴ校生物学科 研究員)	41
野村 雄高 (兼任)	長波長レーザーによる超深部顕微分光システムの開発 (自然科学研究機構分子科学研究所)	自然科学研究機構分子科学研究所 助教 (同上)	41
丸山 剛 (兼任)	光操作型一体内不均一変異細胞誘導と変異細胞の挙動解明 (早稲田大学高等研究所)	早稲田大学高等研究所 講師 (北海道大学遺伝子病制御研究所 助教)	45
山下 貴之 (兼任)	動物行動の神経基盤解明のための非侵襲光操作法の開発 (名古屋大学環境医学研究所)	名古屋大学環境医学研究所 准教授 (同上 助教)	43

# 研究報告書

## 「高速光操作による記憶行動を支える脳回路同期機構の解明と回復」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2017年4月～2020年3月

研究者: 五十嵐 啓

### 1. 研究のねらい

本研究は、記憶行動中のマウス記憶回路(嗅内皮質)から、光遺伝学を用いて脳活動を記録し、その回路メカニズムを理解すること、さらに、光遺伝学を用いて脳活動を操作し、失調した記憶回路の補償を行うことを目的とした。

主として以下の3つの目的を掲げた。

- 1) 光遺伝学を用いた optotag 記録法を用いて、細胞種特異的な記憶回路間の情報交換メカニズムを解明すること(スパイク活動、オシレーション)
- 2) 記憶疾患であるアルツハイマー病のモデルマウスで、どのような回路活動の失調が生じているのかを明らかにすること
- 3) アルツハイマー病のモデルマウスで失調している回路活動を、光操作法を用いて補償すること

本研究は脳の記憶回路における情報交換メカニズムの解明と、脳深部刺激療法に代わる将来的な記憶障害疾患の治療法の発展に繋がることが期待された。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

上記3目的のうち、目的1と2については大きな成果が得られ、現在論文を執筆、投稿中である。目的3については現在実験を遂行中であり、今後2-3年のうちに成果が得られるものと期待される。以下、詳細を記す。

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ(1)「光遺伝学 optotag 記録法を用いた、細胞種特異的な記憶回路間の情報処理メカニズムの解明」

本研究では、記憶を司る脳回路のなかでも、外側嗅内皮質における細胞種特異的な情報処理メカニズムの解明に焦点を当てて研究を行った。

我々はこれまでに、ラットがニオイ-場所連合学習を行う際に外側嗅内皮質の細胞がニオイ cue 特異的なスパイク発火活動を形成していくこと、この脳活動の形成が学習に必要であることを示した(Igarashi et al., Nature, 2014)。本研究では、この発火活動が外側嗅内皮質のどの細胞種によって担われているかを明らかにするため、optotag 記録法を用いて、細胞種特異的な記録を行った。外側嗅内皮質の layer 2 には、主に2種類の興奮性細胞が存在する。一方は Reelin および Sim1 を発現する fan cells, もう一方は Calbindin および Wfs1 を発現する pyramidal cells である。fan cell は海馬 CA3/dentate gyrus に投射していることが知られているが、pyramidal cell は海馬には投射していないことが最近の研究から明らかに



なり、この二つの細胞種の情報処理パターンを明らかにすることは重要だと考えられた。

我々はまず、Sim1-Cre マウスと Wfs1-Cre マウスを入手し、マウスに遂行可能な連合学習パラダイムの作成を行った。マウスはラットで用いたような free moving 課題の遂行が困難であることから、head-fix 条件下 go-nogo task を用いることにより、新規ニオイ群を go (sucrose water, licking) もしくは nogo (quinine water, no-lick) と連合させる記憶課題を開発した。

次に、Sim1-Cre マウスを用いて、fan cell がニオイ go-nogo 課題学習中にどのような発火パターンの変化を示すかを記録した。記録には、220um の optic fiber を 64 本の極小電極と貼り合わせたものを含む可動記録デバイスを用いた。マウスの外側嗅内皮質にまず channelrhodopsin2 を注入し、一週間後、記録デバイスを同じ部位に外科手術によって包埋した。数週間かけて電極を徐々に外側嗅内皮質に近づけ、複数の細胞からスパイク記録が行える状態にした。その後、optic fiber のもう一端に青色レーザー光源からの光を 5 ms 与え、それぞれの細胞においてスパイク活動が生じるかを検討した。その結果、一回の実験で得られる約 20 個の細胞から、1-5 個の細胞でレーザー誘因性のスパイク活動が得られた。この際、レーザー刺激後スパイクが発火するまでの latency が適切か、スパイクがレーザー刺激毎に得られるか等の検討を行い、Channelrodopsin2 を発現していると推定される細胞のみを選別した。

これまでに、約 80 個の fan cell からの記録を行い、結果を解析したところ、以下の結果が得られた。まず、fan cell は、学習済のニオイにはほとんど応答しないことが明らかになった。一方、新規ニオイ群を導入して学習を行わせた際に、fan cell は発火し始めることが明らかになった。このとき、様々な発火様式を呈する fan cell が存在するが、既知の go-odor と新規 go-odor に応答する fan cell が約 11% 存在することが明らかになった。

次に、この go-odor 細胞の割合を、マウスが連合学習出来たセッションと出来なかったセッションで比較したところ、学習出来なかったセッションでは 0% に減少していた。さらに、principal component analysis を用いて 80 個の fan cell が学習の前後でニオイ提示時にどのような動態を示すのかの軌跡を検証したところ、学習の前では既知の go-odor と新規 go-odor に応答する fan cell が別々の軌跡を描いていた一方、学習後にはほぼ同一の軌跡を描くことが明らかになった。この結果は、fan cell が、go-odor というカテゴリーのニオイを同じように分類することが学習に必要であることを示唆している。

## 研究テーマ(2)「記憶疾患であるアルツハイマー病のモデルマウスにおける、回路失調メカニズムの解明」

本研究では、嗅内皮質の失調が原因となっているアルツハイマー病において、どのような活動失調が原因となっているのかを明らかにし、研究テーマ(3)への足がかりを作ること为目标とした。

嗅内皮質は解剖学的に、外側嗅内皮質と内側嗅内皮質に分けられる。外側嗅内皮質の神経活動パターンはこれまであまり明らかになっていないが、内側嗅内皮質の活動パターンはよく明らかになっており、グリッド細胞と呼ばれる細胞が存在することが知られている。そこで我々は、グリッド細胞の活動がアルツハイマー病モデルマウスでどのように失調している

のかを明らかにすることにした。理化学研究所脳神経科学研究センターの西道博士らが開発した Amyloid precursor protein ノックインマウス (APP-KI マウス) を入手し、海馬 CA1 における場所細胞と内側嗅内皮質におけるグリッド細胞から記録を行い、野生型マウスとの比較を行った。その結果、12 ヶ月齢 APP-KI マウスでは、海馬場所細胞は野生型マウスとあまり変化がないものの、内側嗅内皮質のグリッド細胞は劣化していることが明らかになった。さらに、海馬と内側嗅内皮質のどちらにおいても、fast gamma oscillations が減少していることが明らかになった。この結果は BioRxiv においてすでに発表しており、現在論文を投稿中である。

### 研究テーマ(3)「アルツハイマー病のモデルマウスで失調している回路活動の、光操作法による回復」

研究テーマ(2)において、fast gamma oscillations が行動中のマウス海馬・内側嗅内皮質において減少していることが明らかになったが、これ以前にも我々は麻酔下の APP-KI マウス内側嗅内皮質において fast gamma oscillations が減少していることを見いだした (Nakazono et al., Front Syst Neurosci, 2017)。この結果を踏まえ、光操作法を用いて、fast gamma oscillations を上昇させることを現在実験中である。

### 3. 今後の展開

今後は、研究テーマ(3)「アルツハイマー病のモデルマウスで失調している回路活動の、光操作法による回復」を進行させる予定である。

### 4. 自己評価

目的 1 と 2 についてはおおむね達成され、論文作成を行っており、良い成果を残すことが出来たと考えている。一方、目的 3 については、現在実験を遂行中であり、成果達成までにはさらに数年が必要である。研究体制として、人手が足りなかったことがこの原因と考えられ、実験補助員を積み増す必要があったと考えられる。

本研究は、記憶研究の基礎的な知識を活かし、光操作法を用いた病気の治療法を目指したことにその新規性がある。今後このような方向性は重要になると考えられ、さらなる研究が待たれる。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tomoaki Nakazono, Travis N Lam, Ayushi Y Patel, Masashi Kitazawa, Takashi Saito, Takaomi C Saido and Kei M Igarashi, Impaired In Vivo Gamma Oscillations in the Medial Entorhinal Cortex of Knock-in Alzheimer Model, Frontiers in Systems Neuroscience, 2017, doi: 10.3389/fnsys.2017.00048
2. Tomoaki Nakazono, Heechul Juna, Mathew Blurton-Jones, Kim N. Green, Kei M. Igarashi, Gamma oscillations in the entorhinal-hippocampal circuit underlying memory and dementia, Neuroscience Research, 2018, doi: 10.1016/j.neures.2018.02.002

3. Heechul Jun, Shogo Soma, Takashi Saito, Takaomi C Saido, Kei M Igarashi, Disrupted remapping of place cells and grid cells in knock-in model of Alzheimer's disease, BioRxiv, 2019, doi: 10.1101/815993

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (受賞)三島海雲学術賞, 食の感覚を支える脳の香り認識・記憶機能の研究, 2017年7月10日
2. (受賞)安藤百福賞・発明発見奨励賞, 食の感覚を支える脳の香り記憶機構の研究, 2018年3月12日
3. (受賞)New Vision Award (Donors Cure Foundation), アルツハイマー病研究, 2018年3月10日
4. (口頭発表)Kei M. Igarashi, Parallel disruptions of entorhinal grid cells and hippocampal pattern separation in Alzheimer's disease, 日本神経科学大会(新潟, 2018年7月26日)
5. (口頭発表)Kei M. Igarashi, Roles of LEC fan cells in associative learning, Sicily Spring Memory Meeting(2019年6月4日)



# 研究報告書

## 「空間選択的光操作を用いた脳内生成モデルに基づく行動決定機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 伊藤 博

### 1. 研究のねらい

脳の作動原理を探るためには、神経細胞活動の観察のみならず回路の人工的操作を可能とする技術が不可欠である。近年の光感受性タンパク質の開発により、光を照射することで、神経細胞活動を自由に制御することは可能になった。残された問題は如何にして脳の中の特定の細胞群にのみ光を選択的に照射するかということにある。これには光の空間選択的制御技術の応用が不可欠である。この技術を確立させることで、脳回路の実験、つまり、ある脳領域に特定の活動パターンを与え、他の脳領域での計算への影響をみるという研究が初めて可能になり、それにより、これまで研究が不可能であった脳の内部モデルに踏み込んだ研究を行うことで、脳科学の新たな地平を開けると考えられる。

私の研究では特に、空間探索課題遂行中のラットの脳内において、狙った細胞特異的に光を照射する技術の開発を試みた。この研究では、如何にしてラットが目的地に向けて最適なルートを通ってたどり着くことができるのかを解明することを目標としている。多くの行動実験から、ラットはヒトと同じく地図を頭の中に描きながら目的地への経路を決めていると考えられている。ここで、頭の中に描く地図とは、過去の情報や経験に基づき作り出した、脳内のモデルであり、このモデルと実際の感覚刺激や自己の動作などの情報と結びつけながら、自己の現在位置ならびに目的地の方向を正確に把握していると考えられる。本プロジェクトでは、光技術により脳内の空間モデルが動物行動にどのような影響を与えているか、そして脳内空間モデルと外界の刺激がどのように関わり合って行動を選択しているかの計算機構の解明を目指した。

この研究は多くの臨床への可能性も秘めており、精神疾患症状の解明・治療に利用できると考えられる。例えば統合失調症の主要症状である幻聴・幻覚は、脳内のモデルが暴走して、外界からの情報を無視している状態なのではないかとの示唆があるが、実際の実験的証拠は未だ得られていない。これを本プロジェクトで開発する技術により脳の内部モデルを直接操作することで証明できるのではないかと考えられる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

多くの脳科学研究で行われている、顕微鏡下での実験では動物の頭部を固定しなければならず、感覚情報が大きく制限され、自然な脳活動観察を望めない。そのため空間選択的光操作技術を開発し、その照射パターンを光ファイバーを用いて転送することで、自由行動下の動物で実験できるようにすることを目標とした。

- 光の空間選択的照射の為に、われわれはホログラフィー技術を用いることとし、空間光変調器を用い、光の位相を操作することで、自在な光照射パターンを実現し

た。

- この照射イメージを自由行動動物の脳内に転送する為、数万個の光ファイバーの束である光ファイバー束をもちいることで、画像転送を試みた。
- さらに、神経細胞活動を観察する為に、カルシウム感受性タンパク質を用いた、細胞活動イメージングを検討した。

これらの検証実験は、単純行動をする覚醒動物の下で成功し、光ファイバー束で蛍光観察画像を脳内から取り込み、狙った細胞に光を選択的に照射することが可能であることが分かった。

しかし、実際の課題遂行中の動物にこの技術を応用する為には、コンピューターの開発が必要不可欠であることが分かった。この点は、これまでの光学論文ではあまり重視されていなかった点だが、光ファイバーがいかにかにフレキシブルとはいえ自由行動動物を観察し続けるとすぐにファイバーが捻じれ絡まってしまい実験を中止しなければならなくなる。この為に、サーボモーターと角度センサーを組み合わせたフィードバックシステム設計が必要になり、この問題を克服することが本プロジェクトの一つの鍵となった。

## (2) 詳細

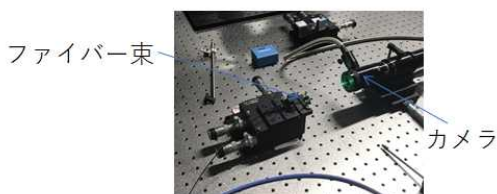
### 1. ファイバー束を用いたホログラフィー技術の開発

空間光変調器を用いることで、光位相を調節し、その照射光をファイバー束に通すことで、遠隔地点での自在な照射を可能にした。自在に照射画像を形成する為の位相の計算には Gerchberg-Saxton アルゴリズムを最適化することで、照射精度に対する計算速度を向上させた。

空間光変調器により照射画像に対応する位相変化を作り出す



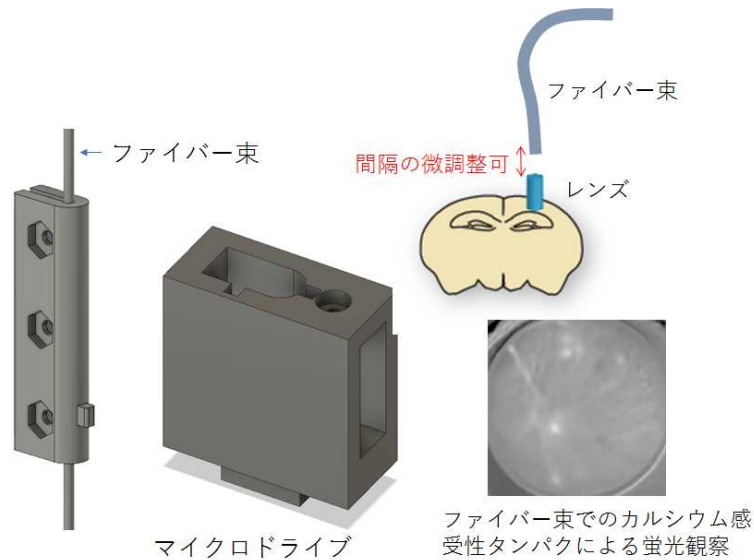
ファイバー束の先端のイメージ



### 2. カルシウム感受性タンパク質の発現による神経細胞機能イメージングの確立

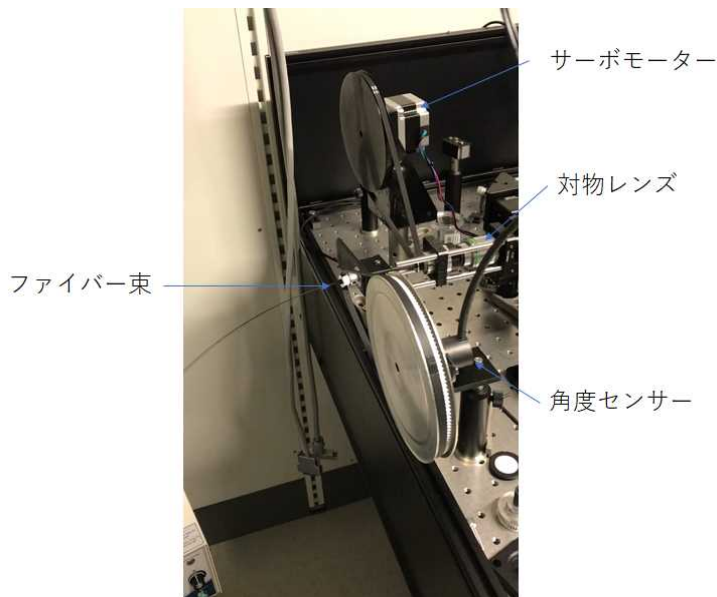
神経細胞からの蛍光観察のために、脳内にウイルス注入、レンズの埋め込みを行い、さらにはファイバー束を固定する為のマイクロドライブを開発した。レンズとファイバー束との間隔は画像の焦点を決める重要なパラメーターであり、開発したマイクロドライブではこれの微調整を可能とした。またファイバー束と対物レンズの相性があることが分かり、いくつかの対物レンズを試すことで、光伝達効率が最適なものを探し、高感度カメラで観察することで、比

較的小パワーの励起光(<1 mW/mm<sup>2</sup>)で十分な蛍光観察ができるようにした。



### 3. 課題遂行中の自由行動動物での実験を可能にするコンピューターの開発

ファイバー束が課題行動中にねじれないようにする為に、ファイバー束のねじれを角度センサーで感知し、それに応じて、ファイバー束を回転させるコンピューターを作成した。対物レンズと光ファイバー束との回転軸をずらしてしまうことのないように、ファイバー束の回転角度をサーボモーターにより正確に調節した。また回転中はイメージングや光照射を停止する必要がある為、回転速度をできるだけ上げることで、データ欠損を最小限にした。この際、フィードバックの多少のエラーが大きな問題につながるため(ファイバーの破損など)、様々な微調整が必要になったが、現在コンピューターは行動実験での使用に耐えるレベルにまでになった。





#### 4. 課題遂行中のラットでの応用

本システムを用いるための、空間探索課題を新たに開発した。この課題では、目的地と報酬の場所を分けることで、目的地に向かう際の脳状態を、報酬への期待とは独立して、観察することが可能である。現在この課題遂行中の動物から神経細胞活動計測並びに活動制御を行っているところである。

#### 3. 今後の展開

必要な技術開発をほぼ終えたことで、これを実際の脳機能解明に結びつけることが今後の課題である。この技術を応用できる実験は多くあり、一つは本プロジェクトの目的である、脳内地図の自由な改変である。脳内地図を変化させることで、外界からの刺激を変えず、行動決定に影響を及ぼすことができるなら、脳内モデルと動物行動を結びつける神経回路がより明らかになっていくと考えられる。

#### 4. 自己評価

最終成果として、イメージングならびにホログラフィーシステムを自由行動動物に応用できる段階まで来たということで、当初の目的の多くは達成できたと考えている。現在のところ、我々のようなコンピューターを用い自由行動動物に自在に使えるシステムは存在せず、これから、本システムを用いて、様々な脳現象解明に利用していきたいと考えている。このプロジェクトの目的である脳内モデル解明のための実験までは現時点では完結できていないが、これからの実験・解析により、脳内モデルと動物行動との関係の解明、さらには最終的に精神疾患症状のメカニズムの解明につながればと考えており、その為の大きな第一歩がこのプロジェクトを通じて踏み出せたのではないかと思う。

一方で、当初の研究目的まで達することができなかった部分もあり、その一つは二光子励起技術を利用できなかった点がある。しかしこれは主にハードウェア上の問題で、少なくとも限界をもたらしめている原因を突き止めたことが大きいと考えており、これからの技術開発などでこの問題点が克服できた時点でまた挑戦したいと思う。このプロジェクトを通じ、様々な点で、最先端光技術開発と動物実験への応用の理想と現実の違いを認識することが多かったが、これに関しても、どのような点を克服することが実際の実験に応用するために必要であるかを認識できたことが大きく、将来の技術開発に役立つ知見が多く得られたと考えている。

研究実施体制は私自身が中心となって行ってきた一方、我が研究所のイメージング部門との議論を定期的に行うことで、光学技術的問題解決を比較的スムーズに行えたと思う。研究費に関しても、必要な備品を必要なだけそろえることができ、本プロジェクトを支障なく進めることができた。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

なし

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

口頭発表: 光遺伝学とホログラフィー技術を利用した自由行動動物下での神経細胞の機能  
選択的制御技術、日本分子生物学学会年会(福岡、日本、2019年12月6日)

ポスター発表(予定): IMAGING AND MANIPULATING SINGLE NEURONS IN FREELY  
BEHAVING RATS、Focus on Microscopy 2020(大阪、日本、2020年4月5-8日)

# 研究報告書

## 「光操作による神経ネットワークの高解像度 5D 解析法の確立を目指した基盤技術開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月 ~ 2020 年 3 月

研究者: 井上 謙一

### 1. 研究のねらい

複雑かつ精微な脳内ネットワークによって実現する高次脳機能のメカニズムを理解するとともに、脳機能障害としての精神・神経疾患の病態を把握し、効果的な治療法を開発するために、ヒトに近縁の霊長類などの高次脳機能を持つ動物において、特定の神経回路機能に介入し、行動学および生理学的解析を行う戦略は極めて有効である。これまで研究代表者は、光遺伝学を利用して、ターゲットとする神経路のみを選択的に活性化し、神経活動および行動の変化を誘発することに霊長類で初めて成功した。本研究では、種々の要素技術開発を行うことにより、この神経路選択的な光操作による脳機能解析法を、個々の神経細胞の活動と神経ネットワークとしての活動、およびそれにより発現する行動との関係性を明らかにできる、神経回路の刺激・活動計測法へ発展させることを目的とする。具体的には、効果的な光刺激を実現するための遺伝子導入手法を確立するとともに、記録部位および刺激部位を拡大し、特定の神経投射を介する入力、ターゲットである脳領域内のネットワークダイナミクスにどのような影響を与え、それが行動発現にどのように寄与するのかを詳細に解析できる新規の光操作・計測手法を、霊長類を対象として開発することを目指す。

この目標を達成するために、本研究では、脳のサイズなどの問題から光遺伝学の利点を生かしくい霊長類を対象として、以下の4つの要素技術開発を実施する。

- A) 効果的な光刺激を実現するために、目的ニューロン集団に安定かつ十分な発現を担保できる遺伝子導入手法
- B) 十分なオプシン発現を確認した上で刺激実験を開始することを可能とする、生体内でのオプシン発現状態の可視化手法
- C) 特定の投射系の選択的な光刺激が、領域間ネットワークおよび領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法
- D) 光刺激を広範囲かつ選択的に実施すると同時に、同刺激が領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法

また、本研究では開発する技術を利用して、霊長類の眼球運動情報処理ネットワークの動作原理、特に上丘における大脳皮質および大脳基底核からの入力が、上丘内の情報処理にどのような影響を与えて眼球運動の発現に寄与するのかを解析することを目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では霊長類を対象とした神経路選択的な光操作法を、個々の神経細胞の活動と神経ネットワークとしての活動、およびそれにより発現する行動との関係性を明らかにできる、神経回路の刺激・活動計測法へ発展させることを目的とした基盤技術開発を行った。ま



ず、効果的な光刺激を実現する遺伝子導入手法として、新規改変 AAV ベクター(AAV2.1)を開発し、同ベクターが、霊長類において高い神経細胞選択性と外来遺伝子発現能を有し、霊長類における効率かつ安定的な神経活動操作・計測を実現することを実証した。神経路選択的な光操作によるネットワーク解析法としては、まず米国 NIH との共同研究により、刺激の価値をコードする尾状核尾部を起始とする直接路・間接路の選択的光刺激を試みた。その結果、両経路で投射先において価値をコードするニューロンに光刺激による抑制が観察されること、直接路の刺激では刺激部位である黒質網様部が投射する上丘において長い脱抑制反応が見られ、また刺激点受容野へのサッカド頻度が上昇することが明らかとなり、同経路が上丘を介して直接眼球運動をドライブできることが示唆された。特定の投射系の選択的な光刺激が領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法としては、光ファイバー出射ポート付きの多点電極を利用した。上丘の一点における前頭眼野ニューロンの軸索刺激に対する上丘の全層からのニューロン記録を試みたところ、これに一部成功し、前頭眼野 上丘投射系の光刺激による上丘活動の変化様式が固視課題時とサッカド課題時で大きく異なること、刺激効果は比較的長期間持続することなどが示唆された。また、光刺激を広範囲かつ選択的に実施すると同時に、同刺激が領域内ネットワークの活動に与える影響を解析する手法として、ドイツ・フライブルグ大学との共同研究により、マイクロ高輝度 LED を実装した刺激用シリコンプローブと記録用プローブをスタック結合させた刺激・記録プローブを開発し、ラットにおいて層選択的な光刺激と多層からの神経活動記録を実現した。

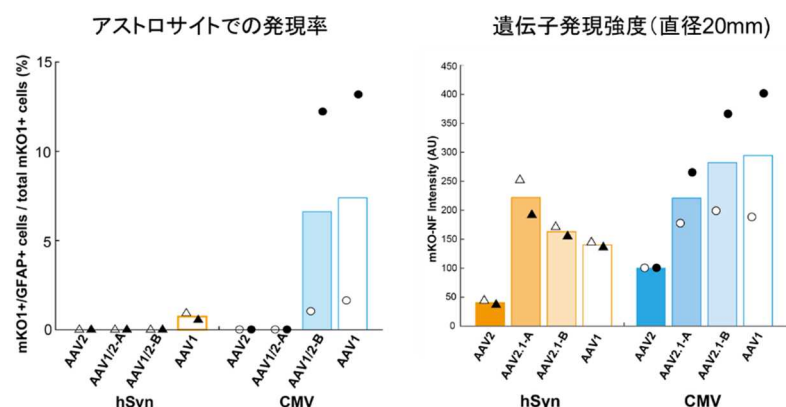
## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「神経細胞選択的かつ高発現型のアデノ随伴ウイルスベクターの開発」

霊長類の活動操作実験において多様な目的に対応することが可能で、神経路選択的な光刺激法等を安定かつ効率的に実施することを可能とするベクターシステムを確立することを目指した。具体的には、高い遺伝子発現能に加え、脳内での炎症反応に関連することが示唆された(論文 1) グリア感染能を抑えた AAV ベクターの開発を行い、高いニューロン特異性を有する AAV2 と強い外来遺伝子発現能を持つ AAV1 のモザイク AAV ベクター (AAV2.1) を開発した。GFP 遺伝子を挿入したベクターを2頭のマカクサル脳に注入し、組織学的解析を実施した結果、当該ベクターが AAV2 と同等のニューロン特異的な感染能を保持しつつ、

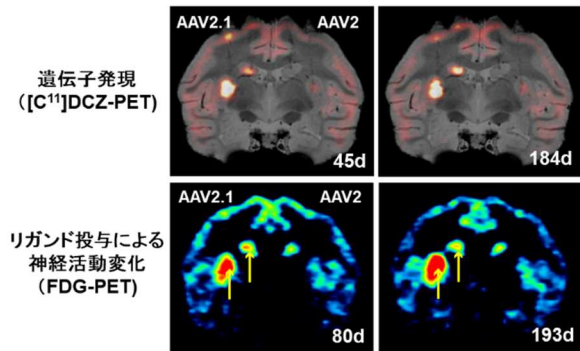
AAV1 と同等以上の外来遺伝子発現能を示すことを明らかにした(図1)。このベクターをベースとして、ニューロン特異的プロモータと発現増強配列を搭載したベクターを開発し、DREADD 発現ベクタ

図1 新規開発AAVベクター(AAV2.1-A)の感染性と発現強度



ーを2頭のマカクサルの子孫に注入した実験系において、同ベクターが1年以上にわたり導入遺伝子を安定的に高いレベルで発現し、DREADD リガンド投与による神経活動変化を誘導できることを、放射能医学総合研究所南本敬史チームリーダーとの共同研究により明らかにした(図2)。また、組織学的解析により、当該ベクターが主に注入部位のニューロンの細胞体や樹状突起から感染し、また注入部位に顕著な炎症反応は見られないことを明らかにした(その他成果3)。さらに、同ベクターを利用してマカクサル前頭眼野ニューロンおよびドーパミンニューロンの光刺激による活動操作に成功したほか、大阪大学藤田一郎教授との共同研究により、GCaMP 遺伝子発現 AAV2.1 ベクターを利用することでマカクサルにおける視覚野の2光子カルシウムイメージングに成功した。現在原著論文の作成を進めている。

図2 AAV2.1による霊長類脳活動操作



### 研究テーマ B 「生体内でのオプシン発現状態の可視化手法の開発」

実験が長期間に及ぶことの多い霊長類における光遺伝学的実験では、刺激実験前に、目的とする部位に十分な遺伝子発現が生じているかを確認できることが好ましい。本テーマでは近年放医研南本チームリーダーとの共同研究により化学遺伝学における DREADD レセプターの発現動態を PET で可視化することに成功した(図2)ことにヒントを得て、タンパク-化学物質の選択的結合を利用した光感受性タンパク発現状態の生体モニタリング法の開発を共同研究 FS により実施した。その結果、マカクサル脳内でニューロン内に発現させた eDHFR の発現を放射性標識 TMP により PET で検出することに成功したが、組織学的解析で示された eDHFR 発現量と PET シグナル強度は比例関係にないことが示唆された。この原因として放射性標識 TMP の細胞内取り込み効率がニューロン種により異なる可能性を考え、2種の細胞膜外局在型 eDHFR 発現ベクターを開発し、マカクサル脳内に注入した。今後細胞内 eDHFR と細胞膜外局在 eDHFR の発現量と PET シグナルの関係性を検討し、最終的に光感受性タンパクの発現量を高精度で検出する手法として確立させることを目指す。

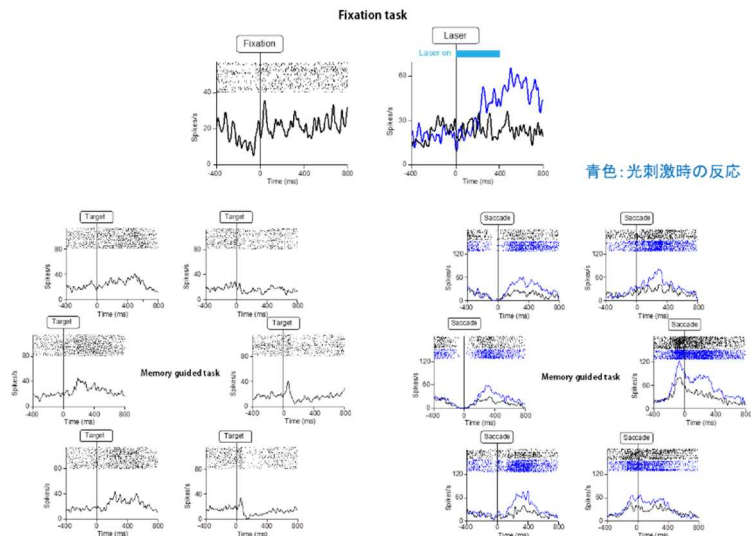
### 研究テーマ C 「神経路選択的な光刺激を利用した、領域間および領域内ネットワーク解析手法の確立」

神経路選択的な光刺激を利用した領域間ネットワーク解析として、米国 NIH 彦坂興秀氏との共同研究により、刺激の価値をコードする尾状核尾部に ChR2 発現ベクターを注入し、大脳基底核内部回路のうち直接路(尾状核 黒質網様部)と間接路(尾状核 淡蒼球内節)を選択的に光刺激する実験を行った。その結果、いずれの刺激においても光刺激が投射先である黒質網様部、淡蒼球内節の価値に反応するニューロンの活動を抑制することが確認されたが、刺激の活動変化は黒質網様部と淡蒼球内節で異なっており、特に淡蒼球内節では大きなバウンド活動が見られた。また、直接路の刺激においては黒質網様部が投射する上丘において長い脱抑制反応が見られ、Free View 課題において受容野へのサッカー頻

度が上昇することが明らかとなり、尾状核尾部 - 黒質網様部の経路が上丘を介して直接眼球運動をドライブできることが示唆された(その他成果1、Amita et al., in revision)。

一方、領域内ネットワーク解析手法として、光刺激による特定神経路の選択的活動制御と多点(多層)記録の併用による層ダイナミクス解析手法の確立をマカサル前頭眼野 上丘路をターゲットとして進めた。マカサルに固視課題および視覚誘導性サカド課題、記憶誘導性サカド課

図3 前頭眼野-上丘投射の光刺激に対する上丘ニューロンの応答例



題のトレーニングを行い、前頭眼野の眼球運動誘発部位に ChR2 を発現する AAV2.1 ベクターを注入した。ついで、光ファイバー出射ポート付きの多点電極を利用して、上記課題実行中のサルに対し、上丘の一点における前頭眼野ニューロンの軸索刺激に対する上丘の全層からのニューロン記録を試みた。その結果、上丘の一点刺激において多層のニューロンの活動が変化することが確認され(図3)、前頭眼野 上丘投射系の光刺激による上丘活動の変化様式が固視課題時とサカド課題時で大きく異なること、刺激効果は比較的長期間持続すること、および固視課題時・眼球運動課題時の活動パターンと光刺激に対する反応パターンに相関があることが示唆された。特に固視課題時には多くのニューロンで強い抑制が掛かっていることが示唆されたため、今後 Free View 課題を追加して記録実験を継続する。同実験では上丘の一点における光軸索刺激と多層からの記録を両立させることには成功したものの、単一の電極とファイバーを利用した自身の先行研究と比較すると、光ファイバー出射ポートの位置とサイズの問題のため、刺激軸索の直接投射を受けるニューロンの記録が難しく、また固視課題中の眼球運動の惹起にも至らなかった。特定投射系選択的な光刺激による領域内ネットワーク活動の変化を解析するためには、より記録点近傍への光刺激を実施する必要があると考えられたため、今後領域内連携によりそのような刺激と記録を実現する電極の開発と評価を進める。また、黒質網様部 上丘路の光刺激に関しては、開発したベクターと hDlx プロモータを利用して、黒質網様部 GABA ニューロンの上丘における軸索に高効率にハロロドプシンを発現させることに成功したが、光刺激による神経活動記録には至っていないため今後進める予定である。

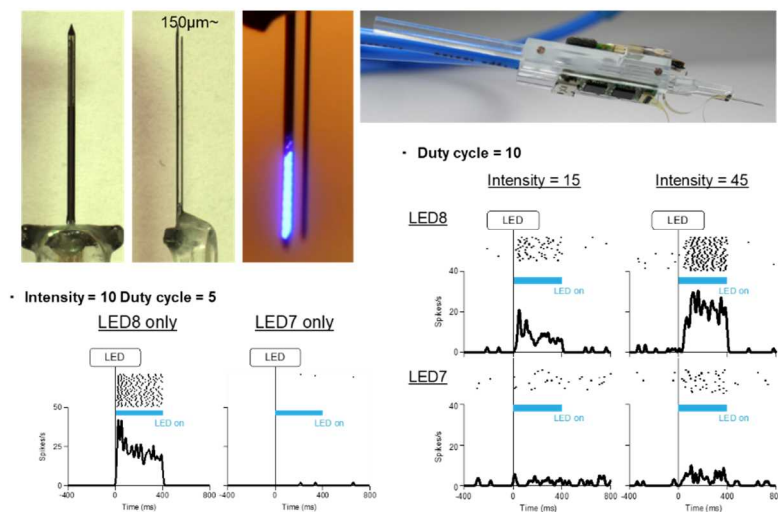
#### 研究テーマD「広範囲かつ選択的な光刺激による領域内ネットワーク解析手法の確立」

脳の大きな霊長類において光遺伝学を効率的に機能させるには、広い範囲における光刺激が必要となる。また、光刺激による領域内ネットワーク解析のためには、多点・多層記録法により同一ニューロンを記録しつつ、刺激点を変化させることが有用と考えられる。本テ



マでは、ドイツ・フライブルグ大学との共同研究により、マイクロ高輝度LEDを実装した刺激用シリコンプローブと記録用プローブをスタック結合させた刺激・記録プローブの開発を行い、同プローブを利用して、ChR2発現ベクターを注入したラットにおいて、層選択的な光刺激と多層からの神経活動記録

図4 ラット運動野における層選択的・多層神経活動記録



を同時に行うことに成功し、温度上昇を抑えた刺激パラメーターでも測定ニューロンの活動上昇を確認した(図4)。また、同プローブの霊長類脳への適用実験を行ったが、硬膜貫通方法に問題が生じ、霊長類脳での層選択的な光刺激と多層からの神経活動記録には至っていない。現在専用の硬膜貫通器を試作済みであり、これを利用することで同プローブの霊長類への適用を目指すとともに、専用のバキュームインサーターなどを開発して刺激記録実験における安定性や利便性の向上を図っている。

### 3. 今後の展開

研究テーマ A で開発したベクターは、テーマ内で行った検証実験以外にも、国内外の複数の霊長類研究者と行っている化学遺伝学・光遺伝学的活動操作などで良好な結果を示している。今年度中の原著論文投稿を目指すとともに、今後はニューロン種選択的遺伝子発現法などの開発を通して、より有用性を高める研究を進めていきたい。研究テーマ B に関しては、得られた有望な結果を発展させて、光感受性タンパク質の発現量を高精度で検出する手法として確立させることを目指すとともに、大型動物における汎用的な目的遺伝子発現の生体モニタリング法への応用を検討する。研究テーマ C に関しては、神経路選択的な光刺激法の領域間ネットワーク解析における有用性が示されたため、今後この手法の霊長類への適用を進めていく。また、電極の開発等を進めて領域内ネットワーク解析へも適用できる手法への発展を目指すとともに、上丘への入力为上丘内部回路動態に与える影響の解明を目指す。研究テーマ D に関しては既にげっし類では領域内ネットワーク解析に有用な刺激・記録法となったと考えられるため、原著論文として発表し広めるとともに、霊長類への適用を進め、将来的にはマルチ Shank 埋め込みプローブに発展させることを目指す。

### 4. 自己評価

本研究では霊長類を対象とした神経路選択的な光操作による脳機能解析法を、個々の神経細胞の活動と神経ネットワークとしての活動、およびそれにより発現する行動との関係性を明らかにできる、神経回路の刺激・活動計測法へ発展させることを目的とした基盤技術開発を行った。実施した研究テーマ4つ全てで一定の進展が見られた。まず研究テーマ A では霊長類での



神経活動操作・神経活動イメージングを促進していくために必須と考えられる神経細胞選択的かつ高発現型の AAV ベクターを開発することができ、1年以上の長期間にわたる安定的な遺伝子発現とそれに伴う神経活動制御を実現した。同ベクターは既に国内外の複数の霊長類研究者と行っている化学遺伝学・光遺伝学的活動操作などで良好な結果を実現しており、今後長期的な研究期間を要する霊長類の神経活動操作・神経活動イメージングに極めて有用なベクターとなることが考えられる。研究テーマ B は当初計画には無かったが、領域内に合成化学の専門家がいたことにより領域会議を通じて着想に至り、共同研究 FS として実施した結果、マカクサル脳内の遺伝子発現の PET 検出に成功した。現時点では発現量とシグナル強度比などの課題により実用的とは未だ言えないものの、大型動物における汎用的な目的遺伝子発現の生体モニタリング法へ発展する可能性がある結果と考えられる。また、MRI など他の検出法への応用も期待できる。研究テーマ C に関しては、本研究の基盤となった研究(Inoue et al., 2015) 以来、刺激による行動変化の報告がなかった霊長類において、神経路選択的な光刺激を他の神経路(大脳基底核神経回路)および他の伝達系(抑制性投射)で実現でき、また刺激部位から投射を受ける領野での活動変化も記録できた。これにより、霊長類領域間ネットワーク解析における有用性が示されたと考えている。一方、神経路選択的な光刺激法の領域内ネットワーク解析に関しては、特定の一点における光軸索刺激と多層からの記録を両立させることには成功したものの、刺激軸索の直接投射を受けるニューロン記録には電極の改良を含めた更なる実験の必要性が示唆された。また刺激軸索の直接投射を受けないニューロン記録が可能になったことからいくつかの新しい知見が得られたものの、上丘への入力为上丘内神経ネットワークに与える効果の解明には至っておらず、今後の課題となっている。研究テーマ D はチャレンジな課題であったが、共同研究先との緊密な連携により、げっし類においてユニークな刺激実験系を確立することができた。今後連携を維持して早急に霊長類への適用を進めたい。

合成化学研究者、プローブ開発研究者との連携は、本領域に参加していなければ成し得なかったと考えられる。霊長類へ新規技術を導入していくにあたり、他分野の専門家と直接ディスカッションし共同で開発を進めることは極めて効果的であり、非常に貴重かつ有意義な期間であった。今後期間内に生まれた共同研究をさらに発展させていきたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tanabe S, Uezono S, Tsuge H, Fujiwara M, Miwa M, Kato S, Nakamura K, Kobayashi K, \*Inoue K, \*Takada M (2019) A note on retrograde gene transfer efficiency and inflammatory response of lentiviral vectors pseudotyped with FuG-E vs. FuG-B2 glycoproteins. *Scientific Reports*, 9: 3567.
2. Kubota S, Sidikejiang W, Kudo M, Inoue K, Umeda T, Takada M, \*Seki K (2019) Optogenetic recruitment of spinal reflex pathways from 1 large-diameter primary afferents in non-transgenic rats transduced with AAV9/Channelrhodopsin 2. *Journal of Neurophysiology*, 597:5025-5040, 2019

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

< 学会発表 >

1. Amita H, Kim H.F, Inoue K, Takada M, Hikosaka O. Optogenetic modulation of saccade-controlling circuits in the monkey basal ganglia. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA
2. Maeda K, Inoue K, Takada M, Hikosaka O. Pathway-selective optogenetic modulation of amygdala-basal ganglia circuits in macaque monkeys. Neuroscience 2019, Chicago, USA
3. Kimura K, Nagai Y, Tanabe S, Zheng A, Fujiwara M, Nakano M, Minamimoto T, Inoue K, Takada M. The modified adeno associated virus vectors enable neuron specific efficient gene transduction in the primate brain. Neuroscience 2019, Chicago, USA

< 総説 >

4. \*Galvan A, \*Stauffer WR, Ackerson L, El-Shamayleh Y, Inoue K, Ohayon S, Schmid M. (2017) Nonhuman primate optogenetics: Recent advances and future directions. J Neurosci. 37:10894-10903
5. \*Matsumoto M, Inoue K, Takada M. (2018) Causal role of neural signals transmitted from the frontal eye field to the superior colliculus in saccade generation. Front Neural Circuits. 12:69

# 研究報告書

## 「記憶痕跡活動の可視化が開く記憶の新たな操作法」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 大川 宜昭

### 1. 研究のねらい

ある出来事を経験すると、その経験に応じて脳の特定の神経細胞が活動し、記憶痕跡細胞に変化することで記憶は保持される。そして同じ記憶痕跡細胞が再び活動すると、その記憶が呼び起こされることが明らかとなっている。世界的に一部の研究室では、記憶痕跡細胞の遺伝子操作法と光遺伝学を融合させることで、マウスの記憶痕跡細胞を人為的に活動させて記憶を強制的に呼び起こしたり、逆に活動を抑えて記憶を思い出す想起を止めたりすることが可能となった。私もこれまでに、マウスの2つの異なる記憶痕跡細胞を同時に活動させることで、人為的に2つの記憶を結びつけることにも成功している。このように、記憶痕跡細胞を操作することでSF映画のような世界をマウスでは実験できるようになってきた一方で、全神経細胞中の一部の細胞群だけがどのようなルールや学習中の活動パターンで記憶をコードするのか、また記憶がどのような機構で固定化され長期的に維持される状態になるのか、という根本的な疑問は残されたままである。

私は記憶痕跡細胞に特有の活動パターンを観察するという目的のため、遺伝子改変マウスと組み換えウイルスを利用した上述の記憶痕跡細胞の遺伝子操作法と、自由行動中のマウス脳内のCa<sup>2+</sup>イメージング法の融合を試みた。神経細胞は活動するとCa<sup>2+</sup>が細胞内に流入するため、Ca<sup>2+</sup>濃度の変化に応じて蛍光を発する蛍光タンパク質を指標に、個々の細胞の神経活動を観察できる(Ca<sup>2+</sup>イメージング法)。これによって、記憶痕跡細胞とそれ以外の細胞を区別して学習後の個々の細胞の神経活動を経時的に可視化できるシステムを確立することに成功した。経験した出来事の記憶は脳の海馬で形成される。本研究では、この独自システムを利用して、海馬に出現する記憶痕跡細胞の学習中の活動パターンを観察するとともに学習後のリプレイの存在を検討することによって、記憶の情報処理に重要なタイミングとそこでの記憶痕跡細胞に特有の活動パターンの抽出を目指した。さらに、得られた情報をもとに記憶痕跡細胞に対して、光遺伝学的操作技術を利用して活動パターンを人為的に導入、あるいは特異的なタイミングで活動を阻害して、対応する記憶がどのように影響を受けるのかを検討し、効率的かつ特異的に標的とする記憶へ介入する新しい方法を提案することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

新奇エピソード経験を符号化した記憶痕跡細胞とそれ以外の細胞を区別することにより、記憶痕跡細胞に特有の活動様式を検出・解析できるシステムを確立した。この解析の結果、記憶痕跡細胞集団からそれぞれ異なる同期活動で規定される複数の亜集団が新奇エピソード経験中に出現し、その約40%は、経験直後の睡眠時から経験した文脈の再体験による記憶想起時にかけて、優先的に再活動していることが明らかになった。一方、記憶痕跡

細胞以外の亜集団では、経験後睡眠時や記憶想起時に再活動するものはほとんどなかった。このように 1 つのエピソードに対応する記憶痕跡細胞集団にもかかわらず、その中に存在する複数の亜集団がそれぞれ別個のタイミングで情報を表現・処理し、その集合として 1 つの記憶情報を構築しているという、脳内での記憶情報の表現様式に関する新たな概念を提案するに至った。また、記憶は休息中や睡眠中にその直前に経験した情報が『固定化』され、経験後数時間残る短期記憶から 1 日以上残る長期記憶に変換されると示唆されてきた。今回の結果は、亜集団活動によってエピソード記憶が、経験後の睡眠時に『固定化』している様子と、『想起』時に情報を再表示している様子を可視化したという意義もある(原著論文 3, 5)。

私はこれまでに、異なる脳領域に形成された 2 つのエピソードに対応する記憶痕跡細胞集団を同時に活性化することで、2 つの記憶が連合した人工記憶の誘導に成功した(大川ら, 2015)。この研究の一環として、海馬 CA3 内に出現した 2 つの記憶痕跡細胞集団を同時に活性化したところ、人工連合記憶を誘導できることが明らかとなった。この結果から、これまでの 2 領域を標的とした操作よりも簡便に 2 つのエピソードの記憶の融合を誘導できることを提唱することができた(原著論文 2)。さらに、生理的に既に連合している 2 つの記憶を切り離すことにも成功した(原著論文 1)ことで、特に記憶の連合機構の解明に寄与することができたものとする。

## (2) 詳細

### 研究テーマ 1 「記憶痕跡細胞に特有の活動パターンから真の記憶痕跡を同定する」

神経細胞は活動すると  $Ca^{2+}$  が細胞内に流入することから、 $Ca^{2+}$  濃度の変化に応じて蛍光を発する人工的な蛍光タンパク質 G-CaMP7 を発現し、神経細胞の活動を観察することが

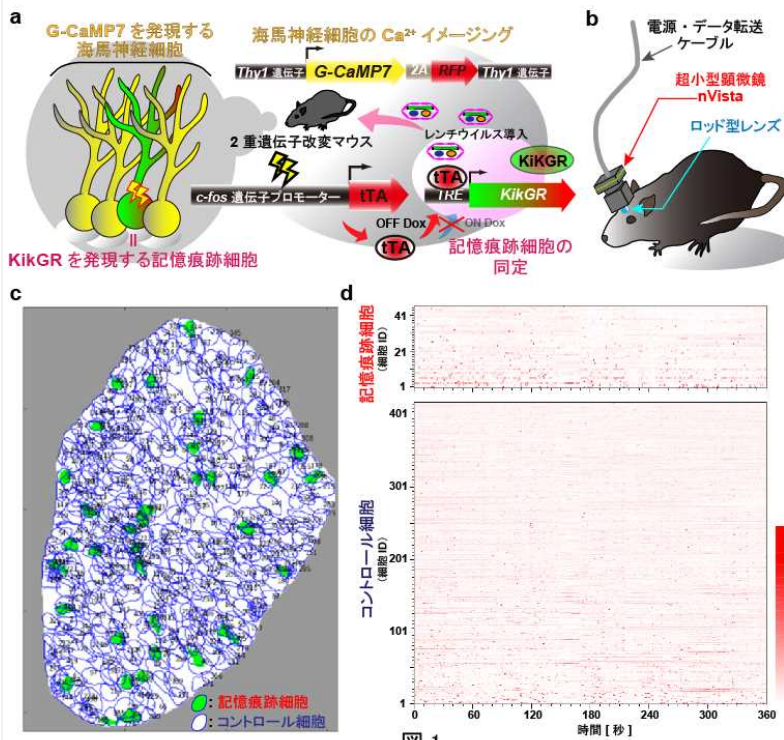


図 1

できる遺伝子改変マウス (Thy1::G-CaMP7 マウス) を準備した。さらに、記憶痕跡細胞を別の蛍光タンパク質 KikGR で観察できる遺伝子改変マウス (c-fos::tTA マウス) も準備し、この両者を交配させ、神経細胞の活動 (G-CaMP7 の蛍光) と記憶痕跡細胞の存在 (KikGR の蛍光) を区別して観察することができるマウス(二重遺伝子改変マウス)



を作出した(図 1a)。そして、このマウスの海馬に内視鏡としてロッド型レンズ{Gradient index (GRIN) レンズ}を挿入し、神経細胞の活動(G-CaMP7 蛍光)と記憶痕跡細胞の存在(KikGR 蛍光)を超小型蛍光顕微鏡(nVista)で観察できる技術を確立した(図 1b)。このマウスをこれまで経験したことのない空間に入れて自由に行動させ、部屋を記憶する様子を調べたところ、海馬で数百個の神経細胞の活動を示す G-CaMP7 の蛍光を直接観察することができた(図 1c)。また、これらの活動している神経細胞について KikGR の蛍光を観察することで、記憶痕跡細胞とそれ以外のコントロール細胞に区別して神経活動(G-CaMP7 の蛍光)を検出することに成功した(図 1c, d)。

そこで、マウスが新規空間に入れられたときなど新しい出来事(新奇エピソード)を経験している際、記憶痕跡細胞がどのようなパターンで活動するかを検討した。相関行列解析と呼ばれる手法で解析したところ、記憶痕跡細胞集団は、新しい出来事(新奇エピソード)の経験中に、類似したパターンの活動を頻繁に繰り返していることが明らかとなった。この現象は、記憶痕跡以外のコントロール細胞集団では見られなかった。

近年、学習後の Non-REM や REM 睡眠時にそれぞれ異なる形態のリプレイが起こることや、それぞれの睡眠自体やそこに特徴的な脳波の攪乱によって記憶の固定化が阻害されることが報告されてきている。そこで、マウスが、「(1)新たな形の空間を経験しているとき(新奇エピソード)」、「(2)Non-REM 睡眠中」、「(3)REM 睡眠中」、「(4)それらの睡眠後に再度同じ空間に入れたとき(2 度目の経験)」、「(5)それらの睡眠後に同じ実験室で違う空間に入れたとき」について検討したところ、(2)～(5)での記憶痕跡細胞の集団の活動パターンは、「(1)最初の経験」から一貫して類似性を保持していることが分かった。

その後の睡眠や 2 度目の経験を経ても類似の活動パターンを繰り返すことから、記憶痕跡細胞の集団の中で同期活動している特徴的な亜集団の存在を検討した。(1)～(5)の記憶痕跡細胞の集団的な活動パターンについて、非負値行列因子分解解析を行ったところ、新奇エピソードで現れた記憶痕跡細胞の集団の中に複数の亜集団が存在していることが明らかとなった。それらの亜集団が活動するタイミングや細胞構成はばらばらであったことから、それぞれの亜集団は異なる記憶を保持するのに関わっていると考えられる。

さらに、「(1)新奇エピソード」で現れた記憶痕跡細胞の亜集団の活動パターンが、その後の睡眠や再度同じ箱に入れられたときにも出現するのかどうかを調べたところ、亜集団の約 40%が一貫して再出現していた。一方、記憶痕跡細胞以外の亜集団で活動が再出現するものはほとんどないことが分かった。

また、この記憶痕跡細胞の再活動の多くは、同じ実験室で違う箱に入れたときには消失した。このことから、記憶痕跡細胞の亜集団のうち約 40%は、睡眠中に自発的に再度活動するとともに、記憶を呼び起こす際にも再び優先的に活動す

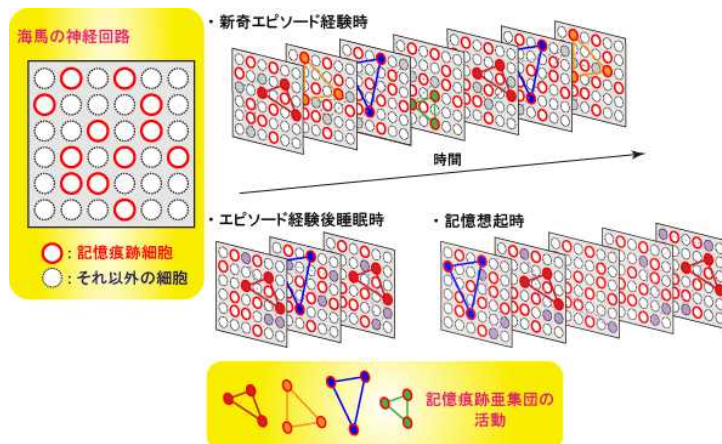


図 2

ることが分かった(図 2)。

このように、記憶痕跡細胞は複数の亜集団を構成し、それぞれが経験した記憶の全体像をつくる個別の情報に応じて、時間的にずれて活動していることが明らかとなった。つまり、ある出来事を経験する記憶の全体像は、複数の記憶痕跡細胞の亜集団からなる活動が協奏的に脳内で出現することで表現されていること、そして、睡眠中に亜集団の一部の活動が再現されることによって、脳内に定着することが強く示唆された(原著論文 3, 5)。

### 研究テーマ 2 「光を用いた記憶痕跡亜集団の活動操作法の確立」

デジタルミラーデバイス(DMD)でパターン照明光をつくり、亜集団を構成する一部の記憶痕跡細胞のみを標的にした光遺伝学的操作法の開発を試みている。これまでに、DMD パターン照明光システムを製作したアスカカンパニー社と共同で、顕微鏡にパターン照明を導入し、対物レンズから脳に挿入した GRIN レンズを介して標的脳部位へパターン光を導入できるか検証を行った。その結果、GRIN レンズ直下のミラーから反射し再度 GRIN レンズを経て顕微鏡に戻った像がパターンを保持していることを確認した(図 3)ことから、GRIN レンズを経て脳内にもパターン光を導入できるものと考えている。さらに、海馬内の神経細胞の  $Ca^{2+}$  イメージングと光操作の両立を試みている。これまでに、活性化型オプシンの ChrimsonR を神経細胞に発現するウイルスを感染させた G-CaMP マウスにおいて、視野全体への励起光を照射することにより、視野内の神経細胞全体の活動に対応した G-CaMP 蛍光の上昇を誘

GRIN レンズに対物レンズから  
パターン照明を照射中

照射したパターン照明

GRIN レンズ下のミラーから  
反射し対物レンズに戻った像



図 3

導できている。今後は、このマウスに DMD パターン照明光システムを適用し、実際に標的化した細胞特異的な活性制御の評価を進める予定である。

### 研究テーマ 3 「光を用いた様々な記憶の操作」

もともと関連していない複数の過去の記憶を何らかのきっかけで関連づけてより深い意味のある情報に進化させていくことは、脳機能にとって非常に重要な特性である。私はこれまでに、マウスが円柱形の箱に入れられた時に出現した海馬 CA1 領域と立方体の箱内で軽微な電気ショックを経験した時に出現した扁桃体領域の 2 つのセル・アンサンブルを同時に活性化すると、円形の箱の中で恐怖を思い出してしまう人工連合記憶の誘導に成功していた(大川ら, 2015)。この研究の一環として、海馬 CA3 領域内に出現した 2 つのセル・アンサンブルを同時に活性化したところ、人工連合記憶を誘導できることが明らかとなった。CA3 領域内の神経細胞同士は反回性シナプスで連絡し合っていることから、2 つの記憶痕跡細胞集団が同時に活動すると、それぞれの集団が活動している間にもう一方の集団からの入力を受け取ることになり、2 つの情報が容易に混じり合うことが想定された。この結果から、CA3 の記憶痕跡細胞の操作でこれまでの 2 領域を標的とした操作よりも簡便に 2 つのエピソードの記憶の融合を誘導できることを提唱した(原著論文 2)。さらに、生理的に 2 つの記憶が連合する際には、2 つの記憶痕跡細胞集団で重複する細胞が増加することから、この重複した

部分集合に相当する細胞集団の活動を抑制することにより、元となる 2 つの記憶はそのままに、記憶の連合のみを切り離すことに成功した(原著論文 1)。以上の結果は、特に記憶の連合機構の解明に寄与するものとなることが考えられる。また、光での記憶の操作に加えて、学習時の入力を反映すると考えられる電気生理学的な刺激パターンを用いて特定回路の活性化を誘導することにより、記憶形成に必須な分子挙動の空間的制御にも成功した(原著論文 4)。

### 3. 今後の展開

記憶情報の表現様式が、記憶障害を示す認知症や統合失調症でどのように変化しているのかは不明である。これらの病態脳を診断する上では CT や MRI による画像診断が有用とされ、認知機能と脳の形態異常(脳の萎縮等)との相関が主な診断基準となっていることから、早期診断は未だ難しいものと考えられる。そこで、脳波や fMRI を利用することにより、形態学的異常に至る前の脳機能の観察から認知症を診断する取り組みがなされており、その中で、ヒトにおける複数脳領域の活動観察から類推される神経ネットワークが健常者と認知症患者との間で異なっていることが報告されているが、実際に認知機能との直接の関連を示した上での理解には至っていない。今回の研究から、記憶痕跡亜集団活動によってエピソード記憶が、経験後の睡眠時に『固定化』している様子と、『想起』時に情報を再表出している様子の可視化が可能となった。この知見を踏まえ、認知機能の 1 つである“記憶”に障害が現れるヒト型変異を導入したアルツハイマー病(AD)モデルマウスや統合失調症モデルマウスにおいて、記憶痕跡細胞の活動と記憶レベルの関連を検討することにより、記憶障害の原因となる病態脳内での記憶情報表現機構の理解が進むものと期待される。そして、病態脳理解の新たな概念や診断・治療の指針も提供可能となるであろう。さらにこの取り組みは、記憶障害の理解から“記憶できる”とはどういうことなのか、という記憶に対する本質的な疑問への答えに結びつくものと考えられる。

### 4. 自己評価

記憶痕跡を扱う他の研究室が着手していなかった、記憶痕跡に特化した活動パターンを観察できるシステムを確立していたことから、記憶成立の機構解明に寄与できる何らかの観察結果を出すことができるだろう、という漠然とした期待を胸にさきがけ研究の船出をした。研究開始直後の七田総括との面談で、本研究の目標を、「記憶痕跡細胞に特有の活動パターンから真の記憶痕跡を同定」し、「光による真の記憶痕跡の活動操作法の確立」をする、という明快かつ困難とも思われる 2 つの目標を設定することとなった。

この 3 年半のさきがけ期間のほとんどを、「真の記憶痕跡の同定」に集中することになったが、脳の中で、記憶痕跡細胞からなる複数の亜集団活動によってエピソード記憶の全体像が表現されている様子、そして、亜集団活動による記憶の固定化と想起の様子を可視化できたという点で、この目標に関しては達成できたとともに、独自の記憶研究の世界観を構築できたと考えている。今後はこの知見を病態モデルマウスに適用し、記憶障害と記憶痕跡亜集団活動の破綻との関連を明らかにしていこうと考えている。近い未来、1 細胞レベルの解像度と秒レベルの時間分解能を持った非侵襲的な脳活動のイメージングシステムが登場するならば、エピソードに対応した亜集団活動を指標とした記憶障害の早期診断法のヒトへの応用も夢ではないだろうと期待している。



さきがけで支援いただいたことや、七田総括と掲げた難しい目標設定にチャレンジしたことで、明瞭なメッセージに繋がる研究成果を得ることができた。このおかげで、多くの講演の機会をいただき、たくさんの方々から研究に対してのご質問や激励をいただくことができた。この経験によって、自身の研究の意義や社会的な位置づけを今まで以上に考えるようになったという点で、研究に対峙する心境の変化を感じている。

一方で、「記憶痕跡の活動操作法の確立」に関しては、未だ達成には至っていない。より高度な技術を利用した神経細胞の光操作法が報告され始めているが、私も着実に検証を進め、この達成に向けて検討を継続していく。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yokose J, Okubo-Suzuki R, Nomoto M, **Ohkawa N**, Nishizono H, Suzuki A, Matsuo M, Tsujimura S, Takahashi Y, Nagase M, Watabe AM, Sasahara M, Kato F, Inokuchi K  
Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories.  
**Science** (2017) Vol. 355, No. 6323: pp398-403.
2. Oishi N, Nomoto M, **Ohkawa N**, Saitoh Y, Sano Y, Tsujimura S, Nishizono H, Matsuo M, Muramatsu S, Inokuchi K  
Artificial association of memory events by optogenetic stimulation of hippocampal CA3 cell ensembles.  
**Molecular Brain** (2019) Vol. 12, No. 1: 2
3. Ghandour K<sup>#</sup>, **Ohkawa N<sup>#,\*</sup>**, Fung CCA<sup>#</sup>, Asai H, Saitoh Y, Takekawa T, Okubo-Suzuki R, Soya S, Nishizono H, Matsuo M, Osanai M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Sakurai T, Kitamura T, Fukai T, Inokuchi K<sup>\*</sup> (#筆頭著者, \*責任著者)  
Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.  
**Nature Communications** (2019) Vol. 10, No. 1: 2637
4. Asai H, **Ohkawa N**, Saitoh Y, Ghandour K, Murayama E, Nishizono H, Matsuo M, Hirayama T, Kaneko R, Muramatsu S-I, Yagi T, Inokuchi K  
Pcdh deficiency affects hippocampal CA1 ensemble activity and contextual fear discrimination.  
**Molecular Brain** (2020) Vol. 13, No. 1: 7
5. Nihonmatsu I<sup>#</sup>, **Ohkawa N<sup>#,\*</sup>**, Saitoh Y<sup>#</sup>, Okubo-Suzuki R, Inokuchi K (#筆頭著者, \*責任著者)  
Selective targeting of mRNA and following protein synthesis of CaMKII at the long-term potentiation-induced site.  
**Biology Open** (2020) Vol. 9, No. 1: pii: bio042861

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件



(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Ensemble representation of contextual memory in hippocampal engram cells.  
第 41 回日本神経科学大会・シンポジウム:最先端光イメージングによる深部脳観察へのアプローチ・Seeing the invisible: the art of deep brain imaging, 神戸, 2018 年 7 月 27 日
2. Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram.  
第 57 回日本生物物理学会年会・シンポジウム:Elucidation of biological functions by optical control, 宮崎, 2019 年 9 月 25 日

受賞

1. 田村科学技術振興財団・第二回 田村四郎科学賞, 2019 年 2 月 10 日

著作物

1. 記憶の操作  
中外医学社, 『Clinical Neuroscience』・特集:光が開く神経科学の未来 - オプトジェネティクスと光イメージング. (2018) Vol. 36, No. 8, pp916-920.
2. 記憶痕跡セル・アンサンブルを利用した人工連合記憶の創出  
日本認知症学会誌 『Dementia Japan』, (2019) Vol. 33, No. 1: 2-9.
3. 光で記憶を見る・操作する  
ニューサイエンス社, 月刊『細胞』・特集:光操作が拓く生体機能解明への道, (2020) Vol. 52, No. 1: 12-16.

プレスリリース

1. 経験を記憶する新たな神経細胞集団を発見 ~ 睡眠中に記憶が定着する様子の観察にも成功 ~  
科学技術振興機構(JST)・富山大学, 2019 年 6 月 12 日  
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190614/index.html>

# 研究報告書

## 「ペプチド系分子ツールを基盤とするたんぱく質光操作・光観察技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年11月～2020年3月

研究者: 川上 隆史

### 1. 研究のねらい

現在、光を利用した生体機能メカニズム解明の研究は、蛍光タンパク質(GFP など)、光受容タンパク質(ロドプシンなど)、光増感タンパク質(Killer Red など)、光依存的二量体化タンパク質(CRY2-CIB、PhyB-PIF など)、光スイッチング蛍光タンパク質(PA-GFP など)、分割型蛍光タンパク質(split GFP など)の、数十 kDa、100 残基以上のアミノ酸からなる巨大なタンパク質プローブを中心に用いて行われている。しかし本アプローチには、数十 kDa もの巨大なタンパク質プローブを融合することによって、標的タンパク質の不適切な局在を引き起こしたり、他の生体分子との相互作用を阻害したりするなどの影響が懸念されるという問題点が存在する。また、遺伝子(DNA)レベルにおける光操作によって、野生型(タグ無し)タンパク質の発現を光制御する手法等も存在するが、遺伝子レベルでの光制御では、転写・翻訳・フォールディング・翻訳後修飾などの時間的経過(空間的拡散)を経てしまうため、光制御の利点の一つである時間的・空間的制御を数分数秒レベル以下・一細胞内オルガネラレベル以下ではできなくなってしまうという問題点が存在する。そこで本研究では、研究者の専門とする分子進化学(バイオテクノロジー)と有機合成化学(ケミストリー)を融合することによって、タンパク質系分子プローブを中心として行われている光操作・光観察研究を、約1 kDa、10 残基程度のペプチド系分子プローブで実現することを目指す。より具体的には、光観察・光操作が可能な合成小分子に特異的に結合する10 アミノ酸程度のペプチドタグを遺伝子操作でターゲットタンパク質に組み込み、非常に小さい分子を利用して生体分子を観察・操作する技術を開発することを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

大腸菌由来の再構成型の無細胞転写・翻訳系(PURE system)を用いた分子進化学的スクリーニングによって、10 種類の合成小分子に結合する新規人工ペプチドタグ(ペプチド系分子ツール)の探索を行った。配列解析の結果、3 種類の合成小分子について、結合する新規人工ペプチドタグを複数種類同定することに成功した。また、同定したペプチドタグを融合したポリペプチドを合成小分子と反応させ、MALDI-TOF 質量分析による解析を行った結果、部位特異的に合成小分子がペプチドタグに標識されていることも判明した。

小分子蛍光プローブを修飾させた3 種類の合成小分子について、無細胞転写・翻訳系(PURE system)内で、ペプチドタグ融合モデルタンパク質(DHFR)と反応させ、SDS-PAGEによる解析を行った。In-gel 蛍光イメージング解析の結果、3 種類全ての合成小分子に結合するペプチドタグについて、標的モデルタンパク質への蛍光ラベリングを確認することに成功した。また、ペプチドタグ融合タンパク質の蛍光ラベリングは、N 末端融合とC 末端融合どちらにも利用可能であり、様々な種類のタンパク質に適用できること、かつ、様々な種類の小

分子蛍光プローブ (coumarin、fluorescein、tetramethylrhodamine、silicon rhodamine、Alexa Fluor、Janelia Fluor など) においても可能であることが分かった。

さらに、ペプチドタグ融合モデルタンパク質 (核局在 GFP) を発現させた培養動物細胞を用い、ラベリング特異性の最も高かったペプチドタグ / 合成小分子ペアについて、蛍光顕微鏡観察による蛍光イメージング解析を行った。その結果、生細胞内の標的タンパク質の蛍光ラベリングを達成し、タンパク質の光観察技術への応用を実証することに成功した。

また、ペプチドタグ融合モデルタンパク質 (ルシフェラーゼ) を培養動物細胞に発現させ、小分子光増感剤で修飾された合成小分子を用いて、光照射によるルシフェラーゼ活性の変化を解析した。その結果、生細胞内の標的タンパク質を光照射によって不活性化することに成功し、タンパク質の光操作技術への応用を実証した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニング法による新規小分子結合ペプチドタグの探索」

大腸菌由来の再構成型の無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニングによって、複数の合成小分子に結合する新規人工ペプチドタグ (ペプチド系分子ツール) の探索を行った (図 1)。合成小分子を担体に固定化し、調製した数兆種類の cDNA 連結型ペプチドタグのコンビナトリアルライブラリーを用いてブルダウンを行い、定量 PCR 法でスクリーニングをモニタリングしながら、PCR 増幅を行った。DNA シーケンスによる配列解析の結果、3 種類の合成小分子について、結合する新規人工ペプチドタグを複数種類同定することに成功した。担体から切り離された合成小分子と cDNA から切り離されたペプチドタグの反応産物を MALDI-TOF 質量分析することにより、合成小分子が人工ペプチドタグに共有結合していることも確認された。また、同定したペプチドタグを融合したポリペプチドを合成小分子と反応させ、MALDI-TOF 質量分析による解析を行った結果、部位特異的に合成小分子がペプチドタグに標識されていることも判明した。



図 1. 無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニングによる合成小分子に結合する新規人工ペプチドタグの探索

### 研究テーマ B「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光観察技術への応用」

小分子蛍光プローブを修飾させた 3 種類の合成小分子について、無細胞転写・翻訳系 (PURE system) 内で、ペプチドタグ融合モデルタンパク質 (DHFR) と反応させ、SDS-PAGE による解析を行った。In-gel 蛍光イメージング解析の結果、3 種類全ての合成小分子に結合するペプチドタグについて、標的モデルタンパク質への蛍光ラベリングを確認することに成功した。また、ペプチドタグ融合タンパク質の蛍光ラベリングは、N 末端融合と C 末端融合どち

らにも利用可能であり、様々な種類のタンパク質に適用できること、かつ、様々な種類の小分子蛍光プローブ(coumarin、fluorescein、tetramethylrhodamine、silicon rhodamine、Alexa Fluor、Janelia Fluor など)においても可能であることが分かった。

さらに、ペプチドタグ融合モデルタンパク質(核局在 GFP)を発現させた培養動物細胞を用い、ラベリング特異性の最も高かったペプチドタグ/合成小分子ペアについて、蛍光顕微鏡観察による蛍光イメージング解析を行った。その結果、生細胞内の標的タンパク質の蛍光ラベリングを達成し、タンパク質の光観察技術への応用を実証することに成功した(図 2)。



図 2. 生きた動物細胞内のペプチドタグ融合タンパク質に対する小分子蛍光プローブ修飾合成小分子によるラベリングと蛍光イメージング解析への応用

### 研究テーマ C「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光操作技術への応用」

ペプチドタグ融合モデルタンパク質(ルシフェラーゼ)を培養動物細胞に発現させ、小分子光増感剤で修飾された合成小分子を用いて、光照射によるルシフェラーゼ活性の変化を解析した。その結果、生細胞内の標的タンパク質を光照射によって不活性化することに成功し、タンパク質の光操作技術への応用を実証した。

### 3. 今後の展開

本研究により、培養細胞におけるペプチドタグ融合タンパク質の小分子による蛍光イメージング解析や光照射分子不活性化法への応用は達成できたが、生物個体中のタンパク質の蛍光イメージング解析や光照射分子不活性化法への応用は実現できていない。そのため、今後更なるペプチドタグ探索系の改良を施すことによって、生物個体中のタンパク質の光観察や光操作を実現したいと考えている。そのためには、スクリーニングシステムを更に高速化するための改良や、培養細胞を用いたスクリーニングシステムの開発、より高性能のペプチドタグ同定につながるような合成小分子の設計などを今後も継続して進める必要があると考える。これにより、生物個体中のタンパク質の光観察や光操作が可能になれば、生命機能メカニズム解明の研究分野において非常に大きなインパクトをもたらすことができると考えられる。

また、本研究ではタンパク質の部位特異的に小分子プローブをラベリングすることにも成功している。開発したペプチドタグの標的合成小分子の一つは極めて安価かつプローブ誘導体合成が容易なものであるため、蛍光タンパク質プローブでは困難な長時間の 1 分子蛍光イメージングにも応用できる合成蛍光プローブ(量子ドットなど)でラベルされたタンパク質の調製なども可能である。また、蛍光イメージングのみならず、光増感剤を用いて標的タンパク質と相互作用するタンパク質の機能阻害を光操作することや、光架橋剤を用いて光照射で相互作用タンパク質を同定することなどにも応用可能であり、*in vitro*での光操作を用いたタンパク質機能解析の



ための基盤技術としても非常に有用であると考え。

#### 4. 自己評価

本研究においては、テーマ A「無細胞転写・翻訳系 (PURE system) を用いた分子進化工学的スクリーニング法による新規小分子結合ペプチドタグの探索」、テーマ B「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光観察技術への応用」、テーマ C「小分子結合ペプチドタグのタンパク質光操作技術への応用」の 3 つを目的として、研究を推進した。

テーマ A については、新規人工ペプチドタグ同定のための 10 種類の合成小分子に対する分子進化工学的スクリーニングを展開し、その内 3 種類の合成小分子について、完全新規の結合ペプチドタグを開発することに成功した。残りの合成小分子についても、更に改良したスクリーニング法を用いることによって、新規の結合ペプチドタグの同定が期待でき、目標は十分に達成できたと考えられる。

テーマ B についても、生細胞内のペプチドタグ融合タンパク質の小分子蛍光プローブ修飾合成小分子によるラベリングと蛍光イメージング解析という光観察技術への応用を実証できたため、目標を達成したと考えられる。蛍光イメージングは、超解像蛍光イメージングなどのより高度な解析が注目されており、タンパク質プローブよりサイズの小さな小分子修飾ペプチドタグを利用することによって、解像度向上にも貢献することが期待できる。

テーマ C についても、生細胞内のペプチドタグ融合タンパク質の小分子光増感剤修飾合成小分子によるラベリングと光照射分子不活性化法という光操作技術への応用を実証できたため、目標を達成したと考えられる。タンパク質プローブよりサイズの小さな小分子修飾ペプチドタグを利用することによって、光増感剤を標的タンパク質により近接させることができるため、効率的な光照射によるタンパク質不活性化の実現を期待できる。

本研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果としては、光を利用した生体機能メカニズム解明の研究分野への貢献に加えて、ペプチドタグを介した抗体薬物複合体 (ADC) の調製・開発など、医療・創薬への波及効果を通じた社会への貢献も期待することができる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文 (原著論文) 発表

なし

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

##### (3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 川上隆史、分子進化工学的スクリーニング法を用いた機能性タンパク質のペプチドへの小型化、新学術領域研究「化学コミュニケーションのフロンティア」第 4 回若手シンポジウム、2019 (招待講演)
2. 川上隆史、ケミカルバイオロジーを基盤とする機能性ペプチドの創製、Kofu Stem Cell Conference、2018 (招待講演)
3. 川上隆史、DIVERSE スクリーニングシステムの開発とバイオイメージングへの応用、日本

- 化学会第 97 春季年会コラボレーション企画 AMED・MFSP シンポジウム、2017(招待講演)
4. 川上隆史、DIVERSE システムを用いた蛋白質ラベリング用ペプチドタグ創製とバイオイメージングへの応用、第 7 回「産と学をつなぐ SENRI の会」、2017(招待講演)
  5. 山本美月、川上隆史、2 種類の人工塩基を有する DNA アプタマー、News & Hot Paper Digest、2018、実験医学 2018 年 1 月号、pp62-63
  6. 山本美月、鈴木宏輝、岩淵智宏、清水優、川上隆史、細胞膜透過性ペプチド創製を指向した PURE システムと mRNA ディスプレイ法による大環状 N アルキルペプチドの超高速スクリーニング、2017、ペプチド医薬品開発のためのスクリーニング・安定化・製剤化技術 第 9 章 -第 4 節、pp332-342

# 研究報告書

## 「光照射により任意の組織においてゲノム編集・遺伝子発現操作する技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 高山 和雄

### 1. 研究のねらい

10年前に登場したオプトジェネティクス技術は、光照射による厳密な時空間の人為的操作のもと、生命現象の因果関係を明確に言及しうる科学をもたらした。時を同じくして開発された、ゲノム編集のみならず任意の遺伝子発現を操作できる CRISPR-Cas9 システムも飛躍的発展を見せたが、時空間の細かな狙い撃ちまでは達成できていない。その問題克服には、CRISPR-Cas9 システムへのオプトジェネティクス技術の導入が有用である。すなわち、両者の技術融合により、特定の組織におけるゲノム配列や遺伝子発現レベルを、特定のタイミングの光照射により操作できるため、生命現象に変化を与える要因を高精度に特定することが可能になる。

したがって、CRISPR-Cas9 システムとオプトジェネティクス技術の融合は、生命科学の躍進に寄与すると期待されているが、光感受性を付与した CRISPR-Cas9 タンパク質を設計・作製するだけでは汎用性が高いツールにはなり得ない。なぜならば、観察対象となる組織や個体への遺伝子導入の段階で、遺伝子改変動物の作製は労力と時間を要するものであり、一方で簡便さを優先した従来のウイルスベクターの利用では感染効率の低さがゆえに標的とする組織への高効率かつ均一な遺伝子導入が望めないからである。

そこで本研究課題における達成目標は、次世代の生命科学研究において、あらゆる研究者が使用できる「高い汎用性と利便性を兼ね備えたゲノム編集および遺伝子発現操作のためのオプトジェネティクス技術」を開発することである。本研究者の所属する研究室ではこれまでに、全身のあらゆる細胞や組織に対して高効率に遺伝子導入できる改良型 Ad (アデノウイルス) ベクターを独自に開発している。ゲノム編集および遺伝子発現操作のためのオプトジェネティクス技術の汎用性と利便性を高めるために、改良型 Ad ベクターを駆使して本達成目標を実現するツール (称して「Opt/Cas-iAd ベクターシステム (Optogenetically-modified CRISPR/Cas9-expressing improved-Ad vector system) 」) の開発に取り組む。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、【テーマ 1】ゲノム編集のみならず任意の遺伝子発現を操作できる CRISPR-Cas9 システムに時空間の細かな狙い撃ちができる能力を付与するため、光感受性のある CRISPR-Cas9 システムを用いる。次に、【テーマ 2】光感受性 CRISPR-Cas9 システムを簡便かつ効率的に標的組織に導入するために、遺伝子導入効率に優れた改良型 Ad ベクターを用いて、「Opt/Cas-iAd ベクターシステム (Optogenetically-modified CRISPR/Cas9-expressing improved-Ad vector system) 」を構築した。最後に、【テーマ 3】前立腺癌の治療を例として、Opt-Cas-iAd ベクターシステムの有効性の証明を行った。

【テーマ 1】 Opt-Cas-iAd ベクターに内蔵する Opt-Cas カセットの作製

CRISPR/Cas9 システムを使えば、わずか 20 塩基からなる gRNA (guide RNA) を設計するのみで、いかなる遺伝子座におけるゲノム編集も遺伝子発現操作も、簡単・迅速に実施できることが担保されている。本研究では、CRISPR-Cas9 システムに光依存性を付与するため、光照射により CIB1 (Calcium and integrin-binding protein 1) とヘテロ二量体を形成できる光感受性タンパク質 CRY2 (Cryptochrome 2) を用いる。CRISPR-Cas9 システムに改変を加え 2 分割し、それぞれ CIB1 と CRY2 と融合させることにより、光応答的にゲノム編集や遺伝子発現操作できる CRISPR-Cas9 カセット (Opt-Cas カセット) を作製した。

### **【テーマ 2】感染能力の高い改良型アデノウイルスベクターへの搭載**

従来のオプトジェネティクス技術では、レンチウイルスベクターや AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターが遺伝子導入ツールとして汎用されてきたが、それぞれ感染効率の低さ、搭載する遺伝子カセットの大きさ等に厳しい制限がある。これらの問題点を克服できるツールとして Ad ベクターが期待できる。特に、所属研究室が独自開発した改良型 Ad ベクターは Ad 受容体の発現の有無に関わらず、ほとんどの細胞や組織に対して高効率に遺伝子導入できる。また、改良型 Ad ベクターは AAV ベクターとは異なり、サイズの大きい CRISPR-Cas9 システムも搭載できる。所属研究室が有する Ad ベクター改変技術を駆使し、細胞種や臓器を問わず光応答性のゲノム編集・遺伝子発現操作カセットを高効率に導入可能な改良型 Ad ベクター「Opt-Cas-iAd ベクター」を開発した。

### **【テーマ 3】Opt-Cas-iAd ベクターの有用性の検証**

本研究で開発した Opt-Cas-iAd ベクターの有用性を証明するために、前立腺癌治療への効果を検証した。前立腺は経尿道的にアクセス可能な位置にあるため、非侵襲的に光照射及び Ad ベクターを局注できる。癌抑制遺伝子を搭載した Opt-Cas-iAd ベクターを作製し、前立腺癌の細胞株に対する効果を検証するとともに、前立腺癌モデル動物を用いて、本ベクターの有用性を詳細に検討した。

上述の研究開発により完成した Opt-Cas-iAd ベクターは、動物や臓器の種類を問わない高効率なゲノム編集・遺伝子発現操作を可能とするツールである。簡便かつ汎用性の高い本システムにより、光遺伝学を神経科学だけにとどまらず、疾患・生命科学全般にイノベーションを起こす技術へと発展させたい。

## **(2) 詳細**

### **【テーマ 1】Opt-Cas-iAd ベクターに内蔵する Opt/Cas カセットの作製**

本研究では、まず、光照射によって、任意の遺伝子発現を操作する技術の開発を行った。CIB1 (Calcium and integrin-binding protein 1) とヘテロ二量体を形成できる光感受性タンパク質である CRY2 (Cryptochrome 2) を活用した。また、任意の領域の転写制御を行うために、CRISPR-Cas9 システムを適用した。通常の Cas9 タンパク質は、DNA 2 本鎖切断活性を有しているが、DNA 2 本鎖切断能を失活した dCas9 と転写調節ドメインを融合することにより、gRNA (guide RNA) を設計した位置において転写を制御できる。これらの要素を組み合わせ、まずは、CIB1-dCas9 の融合体、CRY2 と転写活性化ドメイン VP64 の融合体 (CRY2-VP64) を作製した。gRNA 発現プラスミド、CIB1-dCas9 発現プラスミド、CRY2-VP64 発現プラスミドを培養細胞に同時にトランスフェクションし、光を照射した。その結



果、gRNA を設計した位置において CIB1-dCas9 と CRY2-VP64 が複合体を形成し、転写の操作ができることを確かめた (Takayama K and Mizuguchi H. ACS Chem Biol 2018)。標的遺伝子として、がん抑制効果がある遺伝子 Dkk3 をターゲットとする Opt-Cas カセットを作製した。

#### **【テーマ 2】感染能力の高い改良型アデノウイルスベクターへの搭載**

次に、上述の光応答性のゲノム編集および遺伝子発現操作の技術を動物個体レベルに適用可能なものにするため、本研究では、所属研究室が開発したあらゆる組織に対して高効率に感染可能な改良型 Ad ベクターを用いた。改良型 Ad ベクターとして、CAR とヘパラン硫酸を認識する AdK7 ベクターを使用した。CIB1-dCas9 と gRNA を発現する改良型 Ad ベクター、CRY2-VP64 を発現する改良型ベクターの 2 種類を作製した。なお、単一の Ad ベクターが複数の遺伝子発現を操作できるように、単一 Ad ベクターに複数の gRNA 発現カセットを搭載させた。動物実験を実施するためには高タイトルのウイルスが必要であることから、Opt-Cas-iAd ベクターの大量調製も行った。

#### **【テーマ 3】Opt-Cas-iAd ベクターの有用性の検証**

Opt-Cas-iAd ベクターの有用性を証明するために、本研究では前立腺癌への応用を目指した。まずは、*in vitro* で前立腺癌の細胞株 (LNCaP、PC-3 細胞等) を用いて、本ベクターの癌抑制効果を確認した。これらの細胞株に Opt-Cas-iAd ベクターを作用させたのちに、青色光を照射することにより、標的遺伝子である Dkk3 の遺伝子発現を誘導できることを確かめた。その際に、標的以外の遺伝子の誘導が認められないことを網羅的な遺伝子発現解析により確かめた。次に、皮下に PC-3 細胞を移植した異所性前立腺癌モデルマウスを作製し、これを用いて本ベクターの癌抑制効果を確認した。皮下腫瘍に対して、Opt-Cas-iAd ベクターを投与したのち、青色光を照射することにより、腫瘍体積がコントロール群 (非光照射群) よりも小さくなることを確認した。さらに、腫瘍部位で標的遺伝子である Dkk3 がタンパク質レベルで発現誘導できていることを確かめた。

以上のことから、開発した Opt-Cas-iAd ベクター (Takayama K and Mizuguchi H. ACS Chem Biol 2018) を用いて、光依存的な遺伝子治療が可能であることが証明できた。本技術により、遺伝子治療技術の正確性と安全性が向上することを期待する。

### **3. 今後の展開**

上述のスキームによって完成した Opt-Cas-iAd ベクターは、あらゆる組織や個体を標的とした任意の遺伝子座におけるゲノム編集や遺伝子発現の操作を可能とする。本技術はマウスだけでなく、より大型の動物やヒトにも適用可能な技術としての発展性が見込まれる。様々な動物個体のあらゆる臓器において光遺伝学を用いて生命現象の解明を試みる研究分野の開拓と創造が期待できる。

### **4. 自己評価**

当初の研究目標はほぼ 100% 達成できた。また、研究体制および研究費予算執行も特に問題なかったと自己評価している。光照射デバイスの開発や光操作のためのカセット開発では、他分野との研究者と緊密な共同研究を行った。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. **Takayama K.\***, Mizuguchi H.\* Generation of Optogenetically Modified Adenovirus Vector for Spatiotemporally Controllable Gene Therapy. *ACS Chem Biol.*, 2018 Feb 16;13(2):449-454.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 3 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 2018 年 日本薬学会 奨励賞
2. 2018 年 第 2 回バイオインダストリー奨励賞

# 研究報告書

## 「新規酵素型ロドプシンを用いた視覚再生の挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 角田 聡

### 1. 研究のねらい

チャンネルロドプシン2(ChR2)等の光感受性イオンチャンネルを応用した神経活動の光操作技術開発によって、中枢神経をはじめとする神経回路の光操作法が確立され、生命機能の理解、解明に大きく貢献してきた。本研究では光遺伝学の新規ツールとなりうる酵素活性をもつ新たな光感受性分子の開発を行い、オプトジェネティクス(光遺伝学)のボトムアップを目指す。チャンネルロドプシンによる光操作では、細胞膜内外のイオン流入によって膜電位の「脱分極」、「過分極」を制御しているが、本研究では細胞内のサイクリックヌクレオチド(cAMP、cMP)の環境を光により抑制することでシグナル伝達を高い時空間精度で阻害するための新たな手法を確立する。cAMPやcGMPは細胞内シグナル情報伝達物質であり、細胞内で働くさまざまな生体分子機能を調節している。例えば平滑筋の収縮や網膜視細胞の光情報伝達、嗅覚情報伝達などが挙げられる。サイクリックヌクレオチドは細胞内において必要に応じてシクラーゼ(Cyclase)により合成され、フォスフォジエステラーゼ(Phosphodiesterase、PDE)により分解されることで、細胞内での濃度が変動する。

サイクリックヌクレオチドの光操作を実現するために、本研究では襟鞭毛虫ゲノム中に見つかったロドプシン-フォスフォジエステラーゼ(Rh-PDE)の分子物性の解析を行う。Rh-PDEの分子機能を生化学的、分光学的手法により解析することで分子機構理解を目指す。まずは新規分子であるRh-PDEが光依存的なフォスフォジエステラーゼ活性を示すかを*in vitro*における酵素活性測定によって検証する。その後、過渡吸収分光法、フーリエ変換赤外分光法等を用い分子解析を行う。得られた知見をもとに改変体分子の開発を試みる。基質特異性、吸収波長特性、酵素活性の異なる改変体Rh-PDEの開発を行う。

さらにはこの新規光遺伝学ツールであるRh-PDEの応用性についても検証を行う。ここでは視覚機能再生のためのオプトジェネティクス実験を試みる。網膜変性モデルマウスの視細胞にRh-PDEを導入し、光感受機能が回復するかを電気生理学的手法や動物行動実験によって検証する。オプトジェネティクスを用いた今までにない高感度でより生理条件に近い視覚再生に向けた基盤技術形成が狙いである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

襟鞭毛虫ゲノム解析から発見された新規酵素型ロドプシンは光スイッチ型フォスフォジエステラーゼ(Rh-PDE)として機能すると期待された。本研究では 1)分子機能の解明、2)光スイッチとしての性能評価、3)視覚再生への応用の3つのテーマを設定した。

#### 1)分子機能の解明

Rh-PDE 遺伝子を HEK293 細胞に発現させ細胞膜から可溶化後、タンパク精製を試みた。

得られた標品の分光学的測定により光吸収特性等の物性を調べた。レーザーフラッシュフォトリス法により光反応サイクルを測定し、反応中間体を同定後、サイクルの時定数を決定した。さらに、FTIR 法を用いることで光照射前後のタンパク質骨格の構造変化を検出した。このようにいくつかの分光法を駆使してこのタンパク質分子の基本的物性を解明した。また HPLC を用いた生化学的手法により *in vitro* における光依存的 PDE 活性 (cAMP、cGMP 加水分解活性) を測定することで、Rh-PDE は cGMP に対する特異性が高いことを見出した。また、暗状態においても PDE の恒成活性が存在した。さらに、cAMP、cGMP の加水分解活性は非対称的な pH 依存性を示したことから、タンパク質中の His 残基が基質選択性に寄与することを提唱した。

さらに、2019 年に発見された 8 種の新規 Rh-PDE についても機能解析を試みた。

## 2) 光スイッチとしての性能評価

哺乳類培養細胞である HEK293 細胞へ Rh-PDE を導入し、発光アッセイ (Glo-sensor assay) による光依存的な細胞内サイクリックヌクレオチド濃度減少を測定した。一方、cGMP 濃度の光操作は、Rh-PDE の恒成活性により検出することができなかった。

## 3) 視覚再生への応用

まず Rh-PDE 遺伝子のマウス視細胞への発現を試みる。Rh-PDE 発現用のアデノ随伴ウイルスベクター (7M8 ベクター) を作成し、網膜下注射によって網膜変性モデルマウス (rd1 マウス) 視細胞への遺伝子導入を行った。また対照実験用にチャンネルロドプシン遺伝子を組み込んだウイルスベクターも作成した。

視細胞への安定的な発現が達成された後、電気生理学的手法により視細胞の visual evoked potential (VEP) を計測することで光応答性を検証した。

## (2) 詳細

### 1) 分子機能の解明

精製 Rh-PDE タンパク質を用いた分光計測により、その吸収極大波長が 492 nm であり、光照射後その波長は 392 nm へシフトしたことから、M 中間体を形成し光サイクル反応を検出することを試みた。Rh-PDE の全長タンパク質、および膜貫通ドメインのみの精製タンパク質を用いて、紫外可視領域の過渡吸収分光測定を行い、それぞれのタンパク質の光反応サイクルを測定した (図 1) (論文 3)。全長タンパク質 (図 1A-C) および膜貫通ドメイン (図 1D-F) はいずれもほぼ同様の光反応サイクルを示し

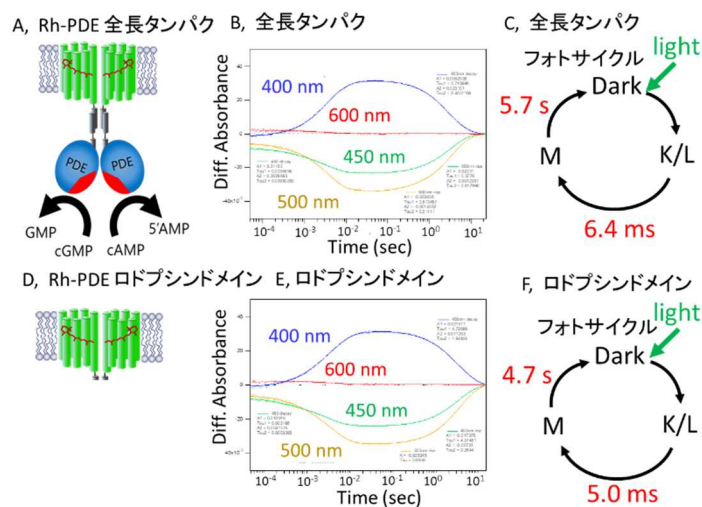


図 1、過渡吸収分光測定



た。光吸収に伴い K/L 中間体形成後、レチナルが脱プロトン化した M 中間体を経て始状態に戻ることが判明した。それぞれの中間体形成、減衰の時定数も酵素ドメインの有無にかかわらずほぼ同様であった。

次に、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR 法) により膜貫通ドメインタンパク質の測定を行い、K 中間体、M 中間体でのスペクトルを得た (図 2) (論文 3)。このスペクトル解析により、all-*trans* 型レチナルから 13-*cis* 型レチナルへの異性化が観察された。K 中間体形成時にはシフベースの水素結合強度が増加したが、これはバクテリオロドプシン等のポンプ型ロドプシンでは観察されない特徴である。また、M 中間体の形成に伴いアルファヘリックスの再配置が観測されたことから、この構造変化が酵素ドメインへのシグナル伝播に重要であると結論付けた (図 3)。

*in vitro* における光依存的 PDE 活性 (cAMP、cGMP 加水分解活性) の結果を図 4 に示す (論文 1)。cAMP、cGMP 両方に対する加水分解活性を示すが、cGMP の分解活性が cAMP のおよそ 10

倍であることから、Rh-PDE は cGMP への高い特異性をもつことが示唆された。また、暗状態 (dark) においても活性を示すことが分かった。加水分解活性の pH 依存性は cAMP と cGMP において非対称な挙動を示したことから、中性 pH 付近に pKa を持つヒスチジン残基が基質認識に寄与していることが示唆された (図 5) (投稿準備中)。

2019 年には 8 種の新規 Rh-PDE 遺伝子が同定されたため、それらの機能検証を行った (図 6)。既存の Rh-PDE

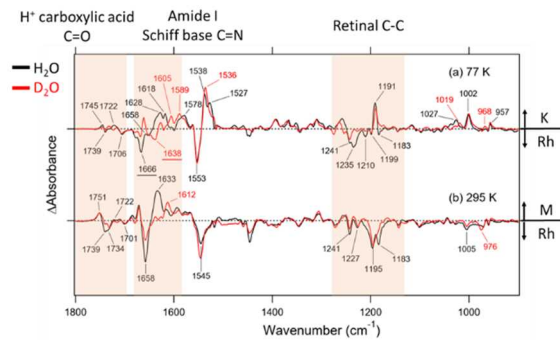


図2、FTIRスペクトル (a) K中間体と始状態との差スペクトル (b) M中間体と始状態との差スペクトル

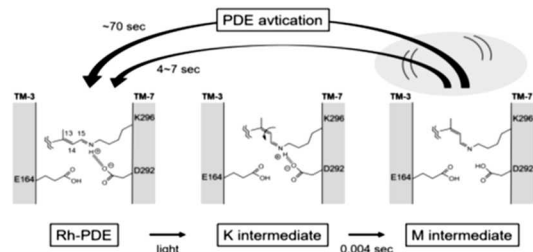


図3 光反応サイクルに伴うタンパク質内部の構造変化モデル

A, Rh-PDE 1D4 tag 付き

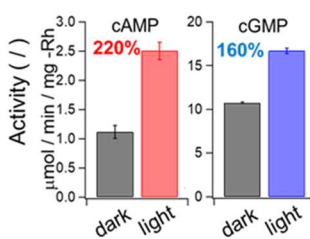


図4、Rh-PDEによるcAMP、cGMPの加水分解活性

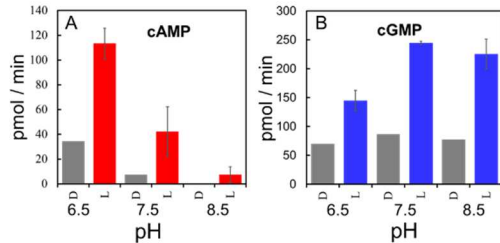


図5、Rh-PDE における活性のpH依存性

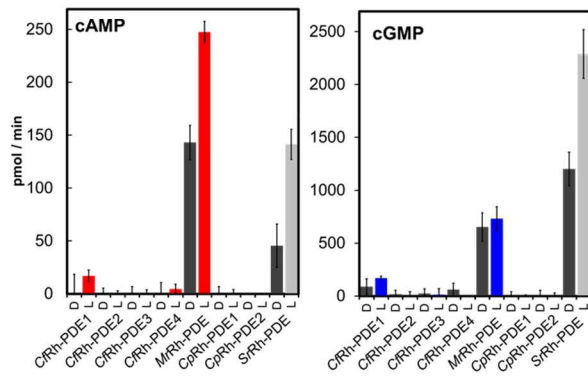


図6、8種の新規Rh-PDEの活性比較

(SrRh-PDE)と比較して *Microstomoeca roanoka* 由来 Rh-PDE (MrRh-PDE) は cAMP に対する高い基質特異性を示すことが判明した (Sugiura et al. 印刷中)。その他の分子については著しく低い機能のみが検出された。

以上のように分子機能については分光学的解析、生化学的解析により詳細な検証を行った。

## 2) 光スイッチとしての性能評価

HEK293 細胞へ Rh-PDE を導入し、発光アッセイ (Glo-sensor assay) による光依存的な細胞内サイクリクヌクレオチド濃度減少を検出し、光操作ツールとしての有用性を示した (図 7A) (論文

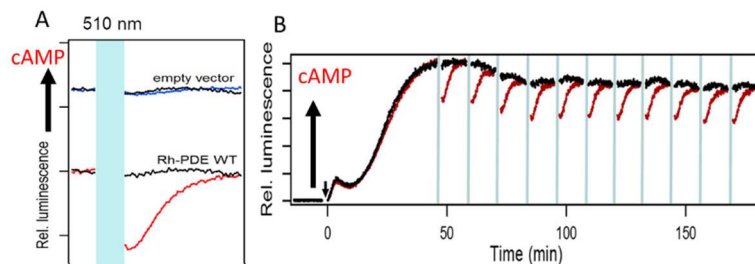


図7. Glo-sensor assayによる細胞内cAMP濃度の測定  
A, Rh-PDE発現細胞へ光照射時のみcAMP濃度の低下が観察された。B, 繰り返しの光刺激。

1)。また、cAMP 濃度については繰り返しの操作が可能であり、この反応が可逆であることを示した (図 7B)。一方、cGMP 濃度の光操作は、Rh-PDE の恒成活性により検出することができなかった。

## 3) 視覚再生への応用

Rh-PDE 発現用のアデノ随伴ウイルスベクター (7M8 ベクター) を井上謙一博士 (京大、霊長研) の協力により作成し、網膜下注射によって網膜変性モデルマウス (rd1 マウス) の網膜へ遺伝子導入を行った (上野真司博士 (名大、医学部) の協力による)。

## 3. 今後の展開

現在までに、Rh-PDE の分子機構を生化学的手法、分光学的手法により解明しつつある。今後は変異体や新規 Rh-PDE との機能比較を通して、さらに詳細な分子メカニズム解明を目指す。また、視覚再生への応用実験に関しても実験系がほぼ確立しつつある。今後はより詳細な計測を行うことでオプトジェネティクスツールとしての有用性を検証する。

## 4. 自己評価

本研究開始当初、以下の3つの研究テーマを掲げた。

### 1) 分子機能の解明、2) 光スイッチとしての性能評価、3) 視覚再生への応用

1) については、当初の計画通り生化学的手法や分光学的手法によりその分子機能解析を行い、計画通りの研究を遂行し十分な目標を達成した。さらに、2019 年に発見された新規酵素型ロドプシンについてもその機能を検証することができたことから、予想以上の成果を得た。本研究を礎として、将来的にはさらに広がりつつある酵素型ロドプシンファミリータンパク質の分子機構解明がなされると期待される。

2) についても、哺乳類細胞において細胞内 cAMP の光操作を実証した。従っておおむね目的を達成できた。しかし、cGMP の操作ツールとしてはいまだ有用性が示されておらず、今後の研究に期待される。

3)については、ウィルス作成、マウス網膜への酵素型ロドプシンの導入、電気生理学実験系がほぼ構築できた。当初の計画ではこの系を用いた視覚再生の検証まで行う予定であったが、時間的制約により最終目標に間に合わなかった。しかし、実験系は確立することができたため、引き続き視機能回復の検証を遂行する。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Yoshida K, Tsunoda SP, Brown LS, Kandori H. "A unique choanoflagellate enzyme rhodopsin exhibits light-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity." *J Biol Chem.* **292**, 7531-7541, 2017
2. Pushkarev A, Inoue K, Larom S, Flores-Urbe J, Singh M, Konno M, Tomida S, Ito S, Nakamura R, Tsunoda SP, Philosof A, Sharon I, Yutin N, Koonin EV, Kandori H, B  $\hat{e}$   $\hat{a}$  O. "A distinct abundant group of microbial rhodopsins discovered using functional metagenomics" *Nature* **558**, 595-599, 2018
3. Watari M, Ikuta T, Yamada D, Shihoya W, Yoshida K, Tsunoda SP, Nureki O, Kandori H. "Spectroscopic study of the transmembrane domain of a rhodopsin-phosphodiesterase fusion protein from a unicellular eukaryote." *J Biol Chem.* **294**, 3432-3443, 2019
4. S. Shigemura, S. Hososhima, H. Kandori, SP. Tsunoda "Ion Channel Properties of a Cation Channelrhodopsin, *Gt\_CCR4*" *Appl. Sci.* **9**, 3440, 2019
5. W. Shihoya, K. Inoue, M. Singh, M. Konno, S. Hososhima, K. Yamashita, K. Ikeda, A. Higuchi, T. Izume, Okazaki S, Hashimoto M, Mizutori R, Tomida S, Yamauchi Y, Abe-Yoshizumi R, K. Katayama, SP. Tsunoda, M. Shibata, Y. Furutani, A. Pushkarev, O. B  $\hat{e}$   $\hat{a}$  T. Uchihashi, H. Kandori, O. Nureki "Crystal structure of heliorhodopsin" *Nature.* **574**, 132-136, 2019

### (2)特許出願

研究期間累積件数:3件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発明者: 神取秀樹、角田聡、吉田一帆  
発明の名称: ロドプシンホスホジエステラーゼ  
出願人: 名古屋工業大学  
出願日: 2017/9/12  
出願番号: 2017-174601

2.

発明者: 重村竣太、細島頌子、角田聡、神取秀樹  
発明の名称: 光応答性タンパク質及びその利用  
出願人: 名古屋工業大学  
出願日: 2018/9/14  
出願番号: 2018-172990

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表等

- ・「酵素型ロドプシン：細胞内シグナル伝達を光で操る」、第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3-6 日、博多
  - ・「光を使って細胞の働きを操作する技術」、JST 新技術説明会～光科学～、2019 年 10 月 18 日、東京
  - ・「酵素型ロドプシンの分子機構と光遺伝学への応用」、東京大学物性研ワークショップ「レチナールタンパク質の光機能発現の物理と科学」、2019 年 9 月 5-6 日、柏
  - ・“Enzyme rhodopsins, potential optogenetics tools for modulating intracellular cyclic-nucleotide levels” International symposium on Optobiotechnology, 2019 年 2 月、名古屋
  - ・“Enzyme rhodopsins –potential optogenetics tools for modulating intracellular cyclic-nucleotide levels –“ 18<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins, September 24-29, 2018, Ontario, Canada
  - ・“Enzyme Rhodopsins –Molecular Properties of potential optogenetics tools-” 56<sup>th</sup> Annual meeting of the Biophysics society of Japan, 2018 年 9 月、岡山
- プレスリリース
- ・「光で働くホスホジエステラーゼ分子を自然界から初めて発見～新しい光遺伝学ツールとしての応用に期待～」、2017 年 3 月 21 日、  
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20170321/index.html>



# 研究報告書

## 「完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスの実現」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 徳田 崇

### 1. 研究のねらい

CMOS 集積回路技術(以下、CMOS 技術)を用いた光エネルギーハーベスト技術をキーテクノロジーとして、超小型ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスを開発し、機能実証を行った。実用性のあるデバイスであることを示し、研究ツールとしての実用化を目指した。

本研究で実現を目指したインプラントブル光操作デバイスは、以下の特長を備える。

- ・デバイスコア部のサイズ  $1 \times 1 \times 1$  mm (1 mm 立方) 以内を実現する。
- ・生体透過性がよい赤外線デバイスを駆動することが可能。
- ・電力蓄積のメカニズムにより、刺激光より弱いパワーの赤外線動作可能。
- ・完全ワイヤレスとし、組織内の位置ずれに起因するダメージ(例: 脳プローブ)を抑制する。

このインプラントブル光操作デバイスは、赤外線の照射を受けると電力を蓄積し、可視の光刺激に必要なエネルギーがたまれば LED を駆動する、という自律動作を行う。そのため多数のデバイスを簡便なシステムで制御することができる。すなわち、『デバイスが埋まっている部分を体外から赤外線で照らせば光刺激ができる』というシステムを実現することができる。

本研究プロジェクトは、インプラントブルエレクトロニクス技術として難度の高い研究であるが、開発に成功すれば、オプトジェネティクス研究における光操作技術としてトップクラスの低侵襲性・自由行動への適応性を実現し、*in vivo*(生きた動物での)オプトジェネティクスの強力なツールになり得る。研究を通して、『エレクトロニクス研究におけるプロトタイプデバイスの実証』にとどまることなく、『バイオ・医療分野の研究ツールとしての利便性』を確保したデバイス、システムとして完成させることを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

研究計画に基づき、生体埋め込み可能な超小型光刺激デバイスを開発した。デバイス構造は、当初のプラン通り

超小型太陽電池と制御回路を搭載した CMOS 集積回路チップ

1 回分の光刺激に必要なエネルギーを蓄積できるチップキャパシタ

InGaN 青色 LED

の 3 つを、プリント基板を用いずに直接集積した。研究プロジェクト前半の最重要課題はこのチップの開発・機能実現と、 $\sim$  を超小型に集積化するデバイス構造実現であった。予測された困難としては、超小型化による発電量の低下であった。太陽電池の発電量は面積に比例するためである。加えて CMOS 集積回路技術で実現できるオンチップ太陽電池は、本来は別の用途に利用される PN 接合構造の流用であり、太陽電池としての最適化がなされているわけではなかった点も不利だった。本プロジェクトではこれらの課題を解決するた

めに、エネルギー蓄積と間欠動作としての現実的な機能実現に特化した回路とし、電力の無駄を最小限にする方法を選択した。

複数回の回路設計により、当初は2  $\mu\text{A}$  であった[論文 3] 動作限界光電流を、200 nA 程度まで小さくすることができた[論文 2]。加えて、光起電力による正常なバイアス電圧の取得や電圧監視とスイッチング回路も実現した。ここでは最重要プロセスとして、CMOS 集積回路チップを独自のプロセスで裏面からエッチングして太陽電池を直列化することに成功している。これらの技術研究開発の結果、図 1、2 に示す完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスを実現した[論文 1、その他 1]。このデバイスは、赤外光を受けてエネルギーを蓄積し、必要なエネルギーがたまったら青色光刺激を実現するという、当初狙った機能を実現できた。サイズは最も小さいバージョンで1.3 mm  $\times$  1.3 mm  $\times$  0.6 mm ( $\sim$ 1.0 mm<sup>3</sup>)、重量 2.3 mg である。これらの値は論文発表時点から現在に至るまで、生体埋め込み光刺激デバイスとしては世界最小である。

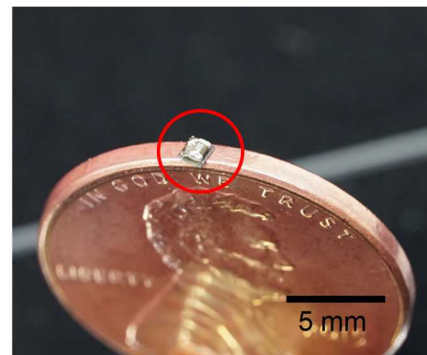
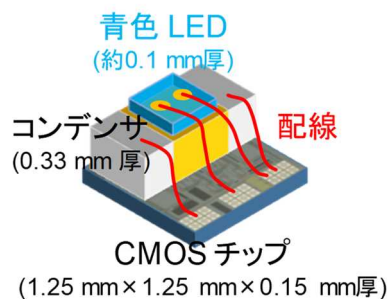


図 1: 本研究で実現した完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイス



図 2: 完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスの動作の様子

プロジェクト後半は、このデバイスを用いた光刺激実験を進めるとともに、光強度の制御、バイアスの内部生成と動作下限電流の低減といった回路面の性能向上を行った。図 1 のデバイスの光出力強度は、励起用赤外光を強くすれば大きくすることができるが、両者の比はデバイスを構成する各要素の効率によって左右される。理論的には、図 1 のデバイスの性能(効率)からさらに1桁程度の改善が期待できる。また、図 1 のデバイス構造はシンプルだが、ツールとしての実用化のためには、安定して多数を作製できるようにする必要がある。そこで本プロジェクト最終年度においては、太陽電池の性能向上と両立可能なデバイ

ス構造の見直しを行い、新しいデバイス構造を開発した。

## (2) 詳細

### [課題 ] 基本型 CMOS 光刺激チップの開発

本さがけプロジェクトで開発した独自チップによる、生体内光給電による青色神経刺激パルス光の発生に成功した。複数回の設計・試作による回路性能の改善[論文 2, 3]と、独自のオンチップ太陽電池分離プロセスの開発に成功し、実験条件として現実的な赤外光によって青色光パルス(強度 10 mW/mm<sup>2</sup>, パルス長さ 1 ms 以上)を周波数 1 Hz 以上で発生させることに成功した[論文 2]。

### [課題 ] 基本型インプラント光操作デバイスの開発

課題 で設計・試作した CMOS チップに、発光デバイスである GaInN 青色 LED のほか、光発電エネルギーを蓄積するキャパシタを集積化した。プリント基板を用いない、CMOS チップ上直接実装により、世界最小のデバイスを実現した。最小体積 1 mm<sup>3</sup>、重量 2.3 mg は現時点においてもエレクトロニクス型のワイヤレス光刺激デバイスとして世界最小である。また、プローブ構造を搭載して、脳の内部を刺激可能なデバイスの開発にも成功した[論文 1]。

### [課題 ] *in vivo* オプトジェネティクスでの機能実証

動物実験によって光刺激機能を評価した。ChR2 発現マウスの脳表にデバイスを配置し、赤外線デバイスを駆動、光刺激機能を確認した。脳神経細胞の反応については光刺激への反応の兆候が見られている。ただし再現性が不完全であるため、今後さらに実験による確認が必要である。

### [課題 ] 高機能型インプラント光操作デバイス開発

課題 、 では、『赤外線から電力を得て、ためて、青色刺激を行う』というシンプルな機能に特化したチップとデバイスを開発した。課題 ではこのデバイスの機能を高度化、高性能化した。特に、基本型デバイスの課題であった、光強度の時間変動の解消、回路のバイアス電圧を小型太陽電池から得ていたことによる好ましくない励起赤外光強度依存性の解消、最低動作光電流の低減、複数デバイスからの選択動作可能な構造の開発などを行った。また、赤色 LED を搭載したバージョンも開発した。

### [課題 ] 制御システムの開発

タブレット PC 等から制御可能な、励起光発生システムを開発した。ただし本課題は既存の情報処理システムの組み合わせとプログラミングによって実現可能なものであり、新規技術の研究開発ではなく、課題 - を利用するための補課題である。

## 3. 今後の展開

本プロジェクトが目的としたデバイスの実現にはめどが立ったが、『ユーザとなるバイオ・医療研究者が道具として遠慮なく利用する』ためには、実証データの蓄積、デバイスの物理的強度

の向上、光強度上限の向上など、さらに継続した評価、改善を行っていく必要がある。またプロジェクト後半では種々の機能向上を行ったが、さらに多様な機能搭載(脳計測機能や複数デバイスの統合的動作など)を期待することができる。

本プロジェクト終了後も本アーキテクチャの開発を進展させ、実用可能な光刺激デバイスを開発し、積極的にバイオ・医療系研究者に提供し、共同研究による評価を進める。おおむね 1-3 年程度を想定する。

並行して、回路開発とデバイス構造の改善、安定した製造技術の開発を行う。回路については研究課題として実施し、製造については外部企業による実装サービスを利用した体制を確立する。これにより、性能・数量両面で安定したデバイスを製造・提供できるようになると期待される。

本研究で実現したワイヤレス光電力伝送プラットフォームの展開として、生体内バイオセンサや IoT マイクロノードへの応用が可能である。本プロジェクト終了後は複数の研究展開として発展させる予定である。

#### 4. 自己評価

本研究プロジェクトでは、最も重要な要素課題である『赤外線によってエネルギーを伝送し、極小の太陽電池構造で発生した電力を蓄積したうえで、十分な強度の青色刺激光を発生させる機構』を実証し、実際にデバイスを実現した。デバイスは発表当時(2018 年 4 月)から現在に至るまで世界最小の光刺激デバイスであり、“smallest optogenetic stimulator”あるいは“smallest optogenetic implant”といったキーワードで google 画像検索を行うとトップに表示される。多数の科学系ニュースサイトに掲載され、論文注目度指標である Altmetric Score は 86 となり、同サービスでスコアを持つ論文の上位 3-5%に含まれている。プロジェクトの最も重要なテクノロジーを、狙った形で実現することができた点について成功したと考えている。この技術は、本プロジェクトで目指した光操作だけでなく、生体埋め込みセンサ技術や IoT (Internet of things) の超小型センサにも応用できる革新的な技術である。

最終年度は、2019 年 4 月の所属機関異動によりプロジェクトの手法の調整が必要であった。設備面でのギャップについてはさきがけのスタートアップ支援によるサポートにより大部分を埋めることができた。一方で、大学院学生を含めた複数人の研究チームによるトライアル実験・開発の集積による実証や最適化を行うことができなくなり、研究者自身によるエレクトロニクス要素の研究開発を中心に注力することとなった。

しかしながら、異動に伴う研究体制のシフトは必ずしもデメリットばかりではなかった。2019 年度には、上述の世界最小の光刺激デバイス製造に利用した、特殊で難しいデバイス加工を回避し、汎用性の高い技術で本プロジェクトの成果(デバイス)を生産できる手法を開発することができた。このアイデアをもたらしたのは異動に伴って生じた設備面での変化と問題意識であり、特定の設備でなければ作れない、という制約を克服するきっかけとなった。

これら当初のプロジェクトに加え、さきがけ領域において複数の研究者が利用する生体内光刺激(照射)デバイスを提供することができた。エレクトロニクス研究者のノウハウを、バイオ・医療・薬学系研究者のニーズときめ細かくすり合わせて役立ててもらおう機会となり、大変有意義であった。彼ら、あるいはほかの研究グループに提供できる技術やノウハウはあると考えており、今後も共同研究のネットワークを構築していきたい。



## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. T. Tokuda, T. Ishizu, W. Nattakarn, M. Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, M. Sawan, and J. Ohta, "1 mm<sup>3</sup>-sized Optical Neural Stimulator based on CMOS Integrated Photovoltaic Power Receiver," AIP Advances, 8(4) 045018 (2018)
2. T. Tokuda, T. Ishizu, N. Wuthibenjaphonchai M. Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, M. Sawan, and J. Ohta, "Design Optimization of CMOS Control Circuit for Integrated Photovoltaic Power Transfer," Sensors and Materials 30, pp. 2343-2357 (2018).
3. W. Nattakarn, T. Ishizu, M. Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, \*T. Tokuda, M. Sawan, and J. Ohta, "CMOS-based Optical Energy Harvesting Circuit for Biomedical and Internet of Things Devices," Jpn. J. Appl. Phys. 57(4S), 04FM05 (2018).

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:1件(予定)(公開前の出願件名については件数のみ記載)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (プレスリリース)『生体内で神経を光刺激する世界最小のワイヤレス型デバイスを開発』2018/4/23(奈良先端科学技術大学院大学、JST)、2018/4/25(EurekAlert!、英文)
2. (国際会議発表)(受賞) N. Wuthibenjaphonichai, M Haruta, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, M. Sawan, S. Carrara, and J. Ohta, "Battery-Free Sticker-Like Device for Health Monitoring Operated by Optical Power Transfer," 2018 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS2018), 2018/10/17-19, Cleveland, OH, USA, "Charles Desoer Awards"(最優秀学生トラベルアワード).
3. (国際会議招待講演) T. Tokuda, "1mm<sup>3</sup>-sized optogenetic stimulator with CMOS-integrated optical power receiver," The 1st Optical Wireless and Fiber Power Transmission Conference, 2019/4/25, Pacifico Yokohama.
4. (著作物) 徳田 崇, 春田 牧人, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 太田 淳, "超小型ワイヤレス神経光刺激デバイスの創製," 生物物理『理論/実験 技術』59(3) 156-160 (2019)
5. (著作物) 徳田 崇, 春田 牧人, 笹川 清隆, 太田 淳, "光電力伝送による超小型インプラントプル光神経刺激デバイス," 月刊 OPTRONICS 2019 年 12 月号 特集記事, 89-92 (2019)

# 研究報告書

## 「光による革新的ゲノム改変技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2017年4月～2020年3月

研究者: 野間 健太郎

### 1. 研究のねらい

遺伝子の異常は様々な疾患を引き起こす。一遺伝子の異常によって起こる疾患についての理解が進んできた今、次の重要な課題は、「複数の遺伝子が関連する複雑な疾患を理解すること」と「重要な遺伝子がコードするタンパク質の機能を一アミノ酸レベルで深く理解すること」である。本研究の目的は、これらの生物学的課題に挑戦するために、世界初の光を用いたゲノム改変技術を確立することである。

本研究の一つ目の課題は「機能が重複した遺伝子群の発見」である。これまでの研究では、単一の変異では表現型があらわれない、機能が重複した遺伝子群についての解明が進んでいない。そこで、ゲノム全体ではなく、機能重複が疑われる一部の遺伝子群に重点的に変異を導入し、未知の多重変異体を単離することを目指す。この研究は、複数の遺伝子の変異が原因となって生じる疾患の理解につながる可能性がある。二つ目の課題は「特定のタンパク質内における重要なアミノ酸の発見」である。重要な遺伝子が同定された後に必要なことは、その遺伝子がコードするタンパク質がどのようにはたらくかを一アミノ酸レベルで理解することであるが、多細胞生物でこれを行うことは難しい。そこで、多細胞生物での一遺伝子に対するランダムなアミノ酸置換変異導入方法の開発を目指す。この研究はタンパク質機能メカニズムの本質的理解につながるだろう。

これらの課題の実現のために、私はこれまでに光依存的に活性酸素を産生するタンパク質 (miniSOG) を利用した変異導入方法を開発し、線虫を用いて研究を進めてきた (Noma and Jin, *Nat. Comm.*, 2015)。本さきがけ研究では、miniSOG を様々な DNA 結合タンパク質と組み合わせることにより、上記の課題を実現することを目指す。

本研究で開発する光を用いたゲノム改変技術は幅広い遺伝子スクリーニングへの応用が可能であり、また、線虫のみならず光を通しやすい細菌、酵母、ショウジョウバエ、哺乳動物細胞など多様な生物に利用できる。たとえば、ヒトのガン化に関わる転写因子の標的を発見することなどに、本研究を応用できるだろう。このように、光を用いたゲノム改変技術は、多くの分野、モデル生物で新たな発見に貢献し、生命現象の理解、さらには遺伝子疾患の原因解明につながることを期待される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

これまでの研究で、ヒストンに miniSOG を結合したタンパク質を用いて、ゲノム全体への変異導入を行ってきた。この技術を応用して、関連する遺伝子群 (たとえば神経系ではたらく遺伝子群) に重点的に変異を導入すれば、機能が重複した遺伝子群の多重変異体を得られるのではないかと発想した。そこでゲノムの特定の領域に結合する転写因子に miniSOG を融

合したタンパク質を発現する線虫を作製し、光による変異の導入を試みた。しかしながら、光照射依存的な変異の導入は確認できなかった。同様に単一遺伝子に様々なアミノ酸置換変異を導入するために、不活性化 Cas9 と miniSOG の融合タンパク質を用いた変異導入を試みたが、光照射によって変異体が生じなかった。

上記の事実は、これまで全ゲノムに対する変異導入に用いてきたヒストン-miniSOG とは異なる、転写因子-miniSOG や不活性化 Cas9-miniSOG に特有の問題が存在することを示唆している。そこで、原因と考えられる以下の三つの問題それぞれについて対策を講じた：1)生殖細胞におけるトランスジーンサイレンシング、2)miniSOG による変異導入効率が不十分であること、3)miniSOG と標的タンパク質を融合する条件が不適切。1)については、PATC イントロン (Frokjaer-Jensen et al., *Cell*, 2016) の挿入によって、サイレンシングが抑制されることを見出した。2)については、miniSOG をタンデムに結合することによって、変異導入効率の上昇が見られることを明らかにした。3)については、条件検討すべき課題が多く、線虫を用いた実験ではスループット性が低すぎるのが問題になった。そこで新たに、酵母と生化学的手法を用いて、転写因子-miniSOG による光依存的な変異導入系の開発を行った。

以上のように、線虫を用いた原理の証明には至らなかったものの、本さきがけ研究を通して、この目的を達成するための基盤となる技術の開発や知識の蓄積を行うことができた。

また、当初は予定しなかったが、ヒストン-miniSOG を用いて、光依存的に簡便にトランスジーンをゲノムに挿入する方法を開発し、論文として発表した (Noma and Jin, *G3*, 2018)。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1「転写因子-miniSOG による特定の遺伝子群への変異導入方法の開発」

既知の転写因子として DAF-16 と UNC-3、また、生殖細胞に発現する DNA 結合因子として PIE-1 と TBP-1 を選択し、それぞれについて、miniSOG 融合タンパク質を生殖細胞で発現する線虫を作製した。これらに光照射を行ったが、変異導入はトランスジーンを発現していない線虫と比べて優位に高くはならなかった。また、DAF-16 を用いた系統については、全ゲノムシークエンスを用いた解析も行ったが、光照射依存的な変異導入は確認できなかった。この問題を解決するために以下の三つの課題に取り組んだ。(1)生殖細胞においては、多コピーの外来遺伝子がサイレンシングされることが知られているため、単一コピーの挿入を行った。しかしながら、転写因子-miniSOG を用いた場合には、単一コピーにもかかわらず、ヒストン-miniSOG には見られないサイレンシングが起こった。そこで、生殖細胞でのサイレンシングを抑制するとされる PATC イントロン (Frokjaer-Jensen et al., *Cell*, 2016) を挿入したコンストラクトを作製し、サイレンシングが抑制されることを見出した。(2)活性酸素を用いた変異導入方法の効率化を目的として、miniSOG 以外の活性酸素産生タンパク質の検討 (SuperNova など)、光照射条件の検討、miniSOG のタンデム化を行い、ヒストン-miniSOG による変異導入を用いて効率を評価した。その結果、miniSOG をタンデム化した場合にのみ、変異導入効率の上昇が見られた。ただし、タンデム化する miniSOG の分子数を増やすことによって、(1)で述べたサイレンシングが起きやすくなったため、PATC イントロンを増やすなどの工夫が必要である。(3)転写因子と miniSOG との融合タンパク質をつくる場合、転写因

子のどの部分を用いるか、また、リンカーの長さ・種類・位置など検討項目が多い。さきがけの期間内に線虫を用いてこれらの検討を行うことは困難であると判断し、出芽酵母と *in vitro* の系を導入することにした。現在、GAL4-miniSOG と GAL4 に結合する UAS 配列をもとにした、光による変異導入方法の構築を行っている。

以上のように、研究テーマ1に関しては、原理の証明を行うことに予想以上に時間がかかっており、当初目的としていた二重変異体の単離には至らなかった。しかしながら、光によるゲノム改変の基盤となる技術やノウハウを蓄積することができ、さらに当初は予定していなかった酵母や *in vitro* の実験系を立ち上げることができた。

### 研究テーマ2「不活性化 Cas9-miniSOG による特定の遺伝子に対する網羅的変異導入方法の開発」

不活性化 Cas9-miniSOG と、*dpy-10* のガイド RNA を用いて、光依存的な変異の導入を試みた。miniSOG は多数のヌクレオチド置換変異を導入することが明らかになっているので (Noma and Jin, *Nat. Comm.*, 2015)、この方法が成功すれば、Cas9 では得ることが難しい、アミノ酸置換変異体を得ることができるはずである。しかしながら、ポジティブコントロールとして用いた Cas9 では変異導入が起こるのに対して、不活性化 Cas9-miniSOG については光依存的な変異の導入が見られなかった。これはおそらく上記で示したサイレンシングと、miniSOG を用いた変異導入効率が不十分であることが問題であると考えられる。この研究を進めていた 2017 年に、Harvard 大学の David Liu 博士らのグループから、不活性化 Cas9 と塩基置換酵素を組み合わせた方法により、原理的には一遺伝子に対して、網羅的にアミノ酸置換変異を導入できる方法が報告された (Gaudelli et al., *Nature*, 2017)。このことから、2017 年以降はテーマ1と3を中心に研究を進めた。

### 研究テーマ3「光依存的変異導入法によるトランスジーンゲノム挿入方法の開発」

これまで、線虫における多コピーのトランスジーンゲノムへの挿入は、多くの時間と労力を要する作業であった。そこで、当初の研究計画にはなかったが、これまでに開発してきた光による変異導入方法を用いて、トランジーンゲノムへの挿入を短期間かつ簡便に行う方法を開発した (Noma and Jin, *G3*, 2018)。現在、この論文を元にした二つの共同研究が進んでおり、一つについては論文査読中である。

## 3. 今後の展開

これまでの研究で、酵母と *in vitro* の系を用いて、光依存的変異導入を検出する系を立ちあげた。まずはこれらの系を用いて、光依存的な変異導入がどのように起こるのかを明らかにする。これまでの研究で、光依存的変異導入を多細胞生物である線虫に応用する際に問題となる、効率の低さや生殖細胞での外来遺伝子の発現方法についての知見を蓄積してきた。そこで今後は、それらをいかして、線虫を用いた原理の証明を行う。さらに、この方法を用いて、神経系ではたらく機能が重複していると思われる遺伝子群に変異を導入し、未知の多重変異体の単離を目指す。



#### 4. 自己評価

##### ・研究目的の達成状況

当初予定していた研究目的である *in vivo* での原理証明、および二重変異体の単離には至らなかった。しかしながら、研究を進めていく上で生じた問題を一つ一つ解決していくことによって、今後、原理の証明にいたる上で必要な基礎技術や、当初は予定していなかった酵母や *in vitro* の系を確立することができた。

##### ・研究の進め方

研究期間が始まってすぐに、名古屋大学に特任助教としてのポジションを獲得し、研究室のセットアップをすることができた。このことにより、当初予定していたよりも多くの研究費を、機器の購入などの設備費に使用することになった。また、常時一人から二人の研究補助者とともに研究を行うことによって、効率的に研究を進めることができた。

##### ・波及効果

本研究は基礎研究に利用するためのツール開発が主たる目的であるため、すぐに社会実装ということにはならないが、この技術が完成すれば、遺伝子スクリーニングをデザインする際の幅が広がり、重要な遺伝子群の発見に寄与できると考えている。また、本研究で開発に成功した光を用いたトランスジーンゲノムへの挿入方法については、現在までに問い合わせや共同研究の申し込みをいただいております。今後さらなる普及が期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Noma and Jin, Rapid Integration of Multi-copy Transgenes Using Optogenetic Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*, *G3*, 2018, 8, 2091-2097

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・2018.9.14-15, **Kentaro Noma**, Future of the nematodes studies, Mishima, Oral and Poster

・2019.8.21-22, **Kentaro Noma**, Future of the nematodes studies, Nagoya, Poster

・2019.9.26-30, **Kentaro Noma**, JAGFoS, Kyoto, Poster

# 研究報告書

## 「長波長レーザーによる超深部顕微分光システムの開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 野村 雄高

### 1. 研究のねらい

生体細胞内で起きる現象を観察し理解するために、様々な顕微分光技術が開発されてきました。特に、超短パルスレーザー光を利用した二光子励起蛍光顕微鏡は、蛍光の発生する領域が3次的に制約されることにより光軸方向の空間分解能が高いことや、長波長の光を用いることにより細胞内の散乱が抑制されるため細胞の深部を観測できるといった利点があり、生体内の細胞のその場観測などに利用されてきました。ただし、それでも従来の二光子顕微鏡で見ることのできる深さは0.5-1 mm程度であり、たとえば脳内でさらに深くにある海馬の活動解明などのために、より深い部位を観察するための技術が待ち望まれています。

生体細胞に光を照射する場合、一般に波長が長い光のほうが散乱の影響を受けにくいいため、細胞のより深部まで到達させることが可能となります。従来の二光子励起蛍光顕微鏡は1  $\mu\text{m}$  よりも短い波長の光を励起光として用いてきましたが、励起光としてさらに波長の長い光を用いれば、散乱の影響が少なくなりさらに深い部位を観察できる可能性があります。ただし、波長が長くなりすぎると生体細胞内の水分子などによる吸収の影響が大きくなるため、波長2  $\mu\text{m}$  以上の光はあまり深部まで到達しなくなります。これらの両方のバランスが取れる1.8  $\mu\text{m}$  近傍の波長の光を利用できれば、生体細胞内で散乱も吸収もされずに深部まで到達でき、従来の二光子顕微鏡よりもさらに数倍深くまで光を送り込むことが可能になると考えられます。

この波長1.8  $\mu\text{m}$  近傍はレーザー開発が未熟な領域であり、このような波長の超短パルス光を出せる光源はほとんどありません。チタンサファイアレーザーなど、別の波長の超短パルス光を波長変換することでこの波長域の光を発生させることはできますが、非線形過程を利用するために効率や安定性が損なわれるのが問題です。直接この波長域の光を出すのが理想ですが、その有力な候補として、波長2  $\mu\text{m}$  帯の超短パルス光源として注目を集めているトリウム添加ファイバーレーザーがあります。本研究では、トリウム添加ファイバーレーザーによって、必要な波長域である1.8  $\mu\text{m}$  近傍において顕微鏡用途として適切なパラメーターを持つ超短パルス光源を開発することで、従来よりも細胞の深い部位まで光を届かせることができるような顕微分光システムの開発を目的とします。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

まず、本研究開始前までに開発していたトリウム添加ファイバーレーザーシステムの短パルス化に取り組みました。これまでのシステムは、出力は高いものの、増幅に付随するスペクトルの狭窄化やトリウムイオンの再吸収により、パルス幅が長くなってしまいう問題がありました。これらの問題に対処するために、波長1.6  $\mu\text{m}$  のシングルモード励起光源を用いてコア励起したほか、チャープ・パルス増幅をやめて増幅ファイバー内の非線形効果を利用

することで、スペクトルの広帯域化に成功しました。この結果、非線形効果によってパルス品質が損なわれることもなく、時間幅50フェムト秒以下の超短パルス光を平均出力4.2 Wで得ることができました[研究成果: 論文1]。

上記のレーザーシステムではパルスの強度不足のためか、三光子励起に起因するシグナルを観測することができませんでした。そこで、パルスエネルギーをさらに増強するためにレーザーシステムの改造を行いました。ただし、これ以上のパワーの増強を行うのは難しいほか、単純にパワーを増強してしまうと観察対象の破壊にもつながるため、パルスの繰り返し周波数を一旦減らした上で再増幅することで、平均パワーを変えないままで一パルスあたりのエネルギーを上げることを試みました。この結果、平均出力は1 Wとほぼ同等ながら、パルスエネルギーは1  $\mu\text{J}$ まで引き上げることができ、細胞への損傷を抑制したまま三光子励起信号が増強されることが期待できます。

上記の、パルスエネルギーを増強した後のパルスを顕微鏡システムに導入し、再度三光子シグナルの観察を試みたところ、シグナルを観測することができ、このシグナルは三光子吸収によって発生した蛍光に由来すると結論づけられました。さらに、顕微鏡の空間構造を観察する能力を確認するために、赤色の蛍光ビーズの観察を試みました。蛍光ビーズを3次元的に観察した画像を解析することにより、この顕微鏡の分解能は $0.8 \times 0.8 \times 1.9 \mu\text{m}$ と見積もることができました。さらに、実際の生体細胞を観察することができるかを確かめるため、赤色蛍光タンパク質をHeLa細胞およびラットの海馬スライスの神経細胞に導入することで、それぞれ細胞の構造を観察することに成功しました。すなわち、今回開発した三光子励起蛍光顕微鏡システムが、実際に生体細胞の観察に利用可能なことを示すことができました。

## (2) 詳細

### 研究テーマ「超短パルスの広帯域増幅」

本研究開始前までに開発していたトリウム添加ファイバーレーザーシステムは、出力は高いものの、増幅に付随するスペクトルの狭窄化やトリウムイオンの再吸収により、パルス幅が長くなってしまいう問題がありました。

トリウムイオンの再吸収による影響で短波長側が増幅できない問題に対しては、一般にファイバーレーザーの増幅でよく用いられるクラッド励起ではなく、コア励起を行うことで解決を試みました。コア励起のためにはビーム品質の良い励起光源が必要ですが、これにはトリウム添加ファイバーレーザーの励起に広く用いられている波長790 nmの光源の代わりに、波長1.6  $\mu\text{m}$ のシングルモード励起光源を用いました。

また、スペクトルの狭窄化に対処するために、増幅ファイバー内の非線形効果を利用することを試みました。一般に、超短パルス光の増幅の際には、増幅器内で制御することが難しい非線形効果を避けるために、チャープ・パルス増幅法が広く利用されています。本研究では、この非線形効果をあえて利用することにより、スペクトルの広帯域化に挑みました。この結果、目論見通り非線形効果によってスペクトル幅を大幅に広げることができました。非線形効果が強いためにパルス品質の劣化が懸念されましたが、パルス形状を解析したところパルス品質の劣化は認められず、時間幅48フェムト秒の超短パルス光を平均出力2.4 W

で得ることができました。また、増幅器に入れる前のパルスを僅かに成型することで平均出力を引き上げることができ、最終的に4.2 Wの出力が得られています。

この結果は、本研究開始前のレーザーシステムに比べて、平均出力を下げずにパルス幅を1/3にまで短縮できたということになり、ピーク強度を3倍に引き上げることができたということの意味します。さらに、このシステムは一般的なチャープ・パルス増幅システムと異なり増幅後のパルス圧縮器が必要ないため、光のロスが少なくなるほか、システムの簡素化による扱いやすさや安定性の向上、廉価化なども見込まれ、本光源の実用化にも重要な位置づけとなっています。

#### 研究テーマ「パルスエネルギーの増強」

上記のレーザーシステムの出力はスペクトル幅が広いですが、波長1.85  $\mu\text{m}$ 以上の光は生体内の水分子などに吸収されて熱となり、生体細胞サンプルの損傷につながるため、実際に励起光として利用する前に除去する必要があります。そのために、4-f光学系と呼ばれるシステムを構築し、その途中にビームブロックを挿入することで、必要なスペクトル領域だけを切り出すことを可能としました。

このレーザーによって実際に三光子励起が可能かどうかを確認するため、クレジルバイオレットと呼ばれる蛍光色素を用いてテストを行いました。この色素は波長600 nm近傍の光を吸収し、620 nmの蛍光を放出するため、波長1800 nmのパルス光を当てた場合に三光子励起されて620 nmの蛍光が観察できることが期待されます。しかし、実際に実験を行ったところ、そのような蛍光は観察されませんでした。この原因としては、パルスの繰り返し周波数が高すぎるためにパルス一個あたりのエネルギーが不足しており、三光子励起に必要な強度を達成できていないということが考えられます。

そこで、パルスエネルギーをさらに増強するためにレーザーシステムの改造を行いました。ただし、これ以上のパワーの増強を行うのは難しいほか、単純にパワーを増強してしまうと観察対象の破壊にもつながるため、平均パワーを変えないままで一パルスあたりのエネルギーを上げることを試みました。具体的には、ポッケルスセルと呼ばれる素子を導入してパルスの繰り返し周波数を一旦67 MHzから1 MHzまで、すなわちパルスの個数を1/67に減らしました。その後、ツリウム添加ファイバーを用いた増幅器を新たに開発しました。この増幅器を用いることで、パルスエネルギーは1  $\mu\text{J}$ まで引き上げることができました。なお、平均パワーは1 Wであり、ポッケルスセルおよび増幅器の導入前とほとんど変わっておらず、細胞への損傷を抑制したまま三光子励起信号が増強されることが期待できます。

#### 研究テーマ「三光子励起蛍光顕微鏡の開発」

上記の、パルスエネルギーを増強した後のパルスを顕微鏡システムに導入し、再度三光子シグナルの観察を試みました。具体的には、赤色の蛍光色素をジメチルスルホキシドと呼ばれる溶媒に溶かしたものを観察対象とし、顕微鏡を通してレーザーパルスを対象に集光することで発生する光を、光電子増倍管を用いて観察しました。赤色の色素としては、吸収波長が600 nm近傍のものを用いたため、波長1800 nmのレーザー光を用いた場合、強度が十分であれば、三光子吸収によって励起されて蛍光が発生すると期待されます。実際、この



測定によってシグナルを観測することができました。また、このシグナル強度の入射レーザー強度依存性を調べたところ、もとのレーザー光の強度の3乗に比例して強くなることから、このシグナルは三光子過程すなわち三光子吸収によって発生していると推察されます。実際には三光子吸収以外にも三光子過程は存在しますが、発生する蛍光の強度や蛍光が発生する集光点の位置などから、このシグナルは三光子吸収によって発生した蛍光に由来すると結論づけられました。すなわち、三光子シグナルの観察に成功しました。

上記の実験は蛍光色素の溶液、つまり構造のない対象を観察したものです。実際に顕微鏡として用いるためには空間構造を観察する能力が重要です。この顕微鏡の空間分解能を確認するために、赤色の蛍光ビーズの観察を試みました。具体的には、波長600 nm付近の光を吸収する蛍光ビーズのうち、平均直径が500 nm程度のものをアガロースゲルの中に埋め込み、それにレーザーパルスを集光して観察しました。その結果、蛍光ビーズを3次元的に観察することができ、画像を解析することにより、この顕微鏡の分解能は $0.8 \times 0.8 \times 1.9 \mu\text{m}$ と見積もることができました。

この顕微鏡で実際の生体細胞を観察することができるかを確かめるため、赤色蛍光タンパク質を導入したHeLa細胞をサンプルとして観察し、蛍光タンパク質のスクリーニングを行いました。この結果、図1のように赤色蛍光タンパク質の三光子励起蛍光信号によって、細胞のイメージを鮮明に観測することができました。さらに、生きた細胞における観察テストとして、ラットの海馬スライス神経細胞に同じ赤色蛍光タンパク質を発現させたものを観察した結果、図のように神経細胞の構造を観察することに成功しました。すなわち、本光源が実際に三光子励起蛍光顕微鏡の励起光源として使用可能なことを示すことができました。

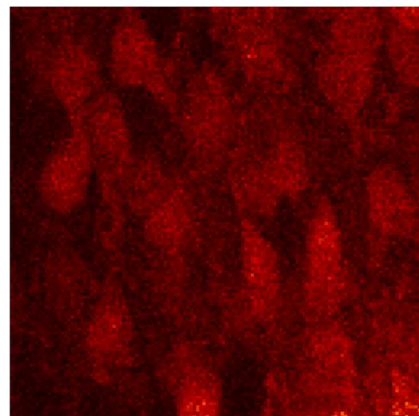
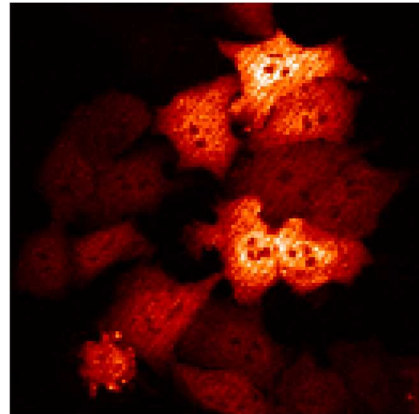


図1: HeLa細胞およびラットの海馬スライスの観察イメージ。

### 3. 今後の展開

ここまでの研究で、三光子励起蛍光顕微鏡の励起光源として適したレーザー光源を開発し、そのレーザー光源を顕微鏡システムに適用することで、実際の生体細胞を観察することができています。ただし、これらの観察は、細胞サンプルの制約などもあり、細胞表面の観察にとどまっています。

今後の展開としてはまず、本顕微鏡でどの程度の深さまで観察できるのかを確認し、その情報からフィードバックを受けてレーザー光源のパラメーターを最適化していきます。これにより、細胞イメージの損傷を防ぎつつ観察イメージのS/N比の最大化を図ることで、細胞内部の深い

部位までの観察を実現できると考えています。

将来的には、本顕微鏡システムをプロトタイプとした顕微鏡システムを生物系の研究者が広く利用できるようにすることで、生物学的に意義のある対象の観察や操作などにつながることを期待しています。

#### 4. 自己評価

本研究の研究目的として、三光子励起蛍光顕微鏡のための光源開発および、その光源を用いた顕微鏡の開発は達成できています。ただし、当初の目的の一つであった、細胞深部の観察の実証にはまだ至っていません。今後、適切な細胞サンプルを用いて観察し、その結果からフィードバックを得てレーザーシステムや顕微鏡システムのパラメーターを最適化していくことで、細胞深部の観察の実現につながると考えます。

本研究の成果として、新たな波長域の光源を利用した三光子励起蛍光顕微鏡システムのプロトタイプを開発することができました。今後、このシステムの最適なパラメーターを見つけ、より扱いやすくしたシステムを開発することで、生物学系の研究者が実際に使用可能な顕微鏡システムが実現し、生物学の最先端の研究をさらに発展させることができるようになることを期待しています。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yutaka Nomura and Takao Fuji, Generation of watt-class, sub-50 fs pulses through nonlinear spectral broadening within a thulium-doped fiber amplifier, Optics Express, 2017, No. 12, 13691–13696.

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- Yutaka Nomura and Takao Fuji, “Watt-level 50 fs pulse generation from thulium-doped ZBLAN fiber amplifier system,” the Conference on Lasers and Electro-Optics/Europe, ICM Munich, Munich, Germany (2017).
- Yutaka Nomura and Takao Fuji, “Ultrafast thulium-doped ZBLAN fiber amplifier utilizing nonlinear spectral broadening,” OSA Laser Congress/Advanced Solid State Lasers, Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan (2017).
- **(Invited)** Yutaka Nomura, “Femtosecond light source at 2  $\mu$  m based on thulium-doped ZBLAN fiber,” 11th Asia Pacific Laser Symposium, Sheraton Xi'an North City Hotel, Xi'an, China (2018).
- Yutaka Nomura and Takao Fuji, “Ultrafast thulium-doped fiber laser system at 1.8  $\mu$  m for multi-photon microscopy,” CLEO: Science and Innovations, San Jose Convention Center, San Jose, CA (2019).
- Yutaka Nomura, Hideji Murakoshi, and Takao Fuji, “Short-wavelength thulium-doped fiber

laser for three-photon microscopy,” Advanced Solid State Lasers Conference, Austria Center Vienna, Vienna, Austria (2019).



# 研究報告書

## 「光操作型 -生体内不均一変異細胞誘導と変異細胞の挙動解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 丸山 剛

### 1. 研究のねらい

青色 LED 照射により、1 つのがん変異をもつ変異細胞の発生を時空間的に制御する革新的システムを開発する。これにより、変異細胞の挙動の 1 つである、「正常細胞による変異細胞の排除現象」をマウス生体内にて、世界で初めて解析する。「発がんは、細胞に 1 つのがん遺伝子変異が生じ、段階的に変異が蓄積することでがん化すること」が通説となっている(図 3 左)。しかし、「1 つの変異を生じた変異細胞がどのような挙動を示すか」はこれまで全く観察されたことがない。本研究では、CRISPR ノックイン技術と光技術を融合させ、時空間的変異細胞誘導モデルシステムの構築を図ることで、1 つの変異が入った変異細胞の挙動という、これまで全くのブラックボックスであった機構の解明に挑む。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

これまでのコンディショナル・ノックインマウスに取って代わる、光操作性コンディショナル・ノックインマウスを開発し、がんの発生機序を解明する。詳細として、青色 LED ナノデバイスにより、特定のがん遺伝子変異細胞を意図的に誘導する革新的変異細胞誘導マウスモデルを開発する。さらに、マウスモデルを使うことにより、世界で初めての生体内における 1 つのがん遺伝子に変異を持つ変異細胞の挙動解析を行う。

特に、**について**はがん変異細胞が排除される機構解明を同時並行して行うことで、解析対象とする機構を同マウスモデルにて証明する。

#### (2) 詳細

##### 変異細胞の動態解析のための光照射型・変異細胞誘導技術の開発

##### 研究経過

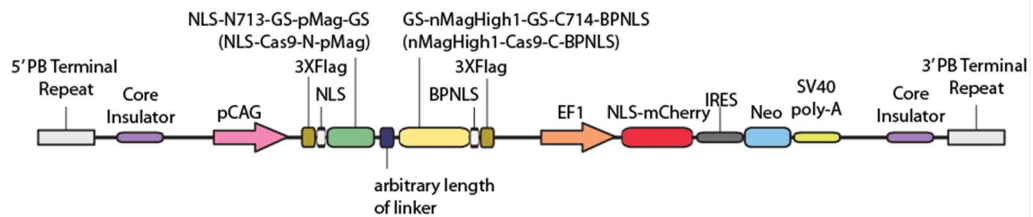
##### 1)-1 青色 LED 照射によって活性化するスプリット Cas9 の最適化

スプリット Cas9 の N 末端ドメインに pMag を、C 末端に nMag を融合させた後、ベクターにのせることで、pPB-EF1-pMag-Cas9<sup>NT</sup>-P2A-nMag-Cas9<sup>CT</sup> とする。同コンストラクトを HEK293 細胞に遺伝子導入することで、KRas 遺伝子座への G12V 変異ノックインが可能かどうかを検討した。その結果、ほとんどの細胞でノックインは確認できなかった。このとき、通常の Cas9 をコントロールとしたが、ノックイン効率は 1%程度とこれまでの報告と一致していたため、スプリット Cas9 のゲノム編集効率が低いことが予想される。

この問題点を解決するために、以下のコンストラクトを作成し、ノックイン効率を再検討した。



pPB533A-1-Based photo-activatable **linkered BP-NLS**-spCas9 EF1-**NLS-mCherry**



上記プラスミドコンストラクトは、スプリット Cas9 の両端に p および nMag を保持したまま、Cas9 の N 末端および C 末端をリンカーにて接合したコンストラクトである。これにより分子内 FRET の要領で、より効率的な光依存的な Nuclease 活性を得ることが可能であると予想される。

1)-2 KRasV12 変異導入のためのノックイン検討

変異細胞の発生には、CRISPR/Cas9 ノックイン (KI) 法 (homology-independent targeted integration: HITI) をもとに、「蛍光タンパク質 Venus の挿入」および「KRas がん変異 G12V の KRas のプロモーター下流への挿入」を行う。当初、相同性配向型修復 (HDR) を基にした相同組み換えをもとに、KRas 変異を誘導する予定であった。しかし、以下の点を考慮し、変異型 KRasV12 を HITI 法により挿入することとした。

1. KRas 遺伝子の大きさが 567 bps と比較的小さい
2. 分化した上皮細胞は HDR 効率が比較的低い
3. HDR の場合と異なり、HITI 法ではフランキングアームがほとんど必要ない

上記の点より、HITI 法に移行し、HEK293 細胞でのノックイン効率を検討した。

2) 新規マウス作成法の導入

これまで、受精卵へ Cas9、sgRNA、およびテンプレートドナーを導入することで、ゲノム編集を行ってきた。上記の方法では、時間および実験費用が大きな問題となる。そのため、GONAD 法を導入することで、上述した煩雑さを克服することができると考えられる。

3) 照射用デバイスの開発

マウス *in vivo* にて光照射依存的に変異細胞を誘導するため、マウス生体内に挿入可能かつ遠隔での無線給電による光励起システムを東京工業大学の藤枝俊宣講師と共同で開発する。

進捗状況、成果

1)-1 HEK293 細胞を用いて検討したところ、通常の Cas9 程度のノックイン効率を得られた。また、照射時間および照射強度がゲノム編集効率へ大きく寄与することが分かっているため、さらなる検討を行っている段階である。

1)-2 NHEJ を基にして KI を誘起する HITI 法では、ドナーテンプレートにおいて、ホモロジーアームが不要となる。ホモロジーアームの代わりに、CRISPR/Cas9 システムにおける KRas のガイド配列を、ノックインしたい DNA フラグメントの両端に逆向きに挿入する。これにより、NHEJ を基にした KI を誘起することが可能となる。リンカー付きスプリット Cas9 (図中の Linkered BP-NLS-paCas9) の安定発現株である HEK293 細胞を用いて、光照射後における Venus-KRasV12 のノックインを確認したところ、RasV12 に特徴的な

膜局在化した Venus の蛍光が確認された。

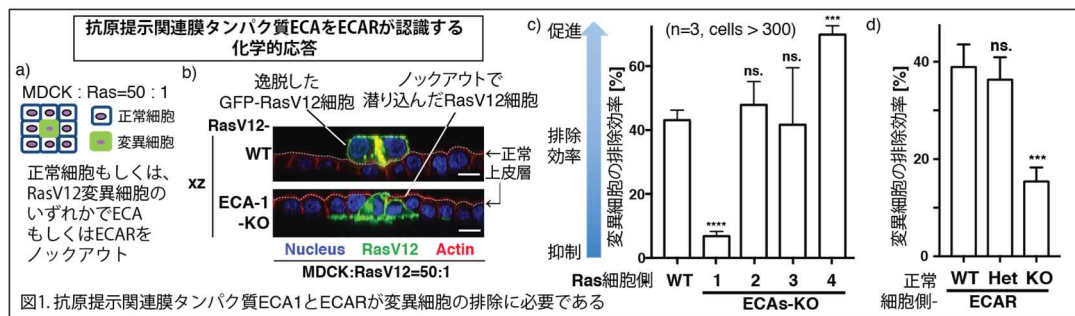
- 2) これまで特定の DNA フラグメントをゲノムに挿入するにあたり、受精卵へ CRISPR コンポーネントをマイクロインジェクションもしくはエレクトロポレーションを用いて導入してきた。しかしながら、ノックイン効率は欠損効率よりも低いため、多くのマウスが必要となる。これらの問題を GONAD 法の導入により解決した。GONAD 法においては、自然交配したマウスの卵管膨大部内に CRISPR コンポーネントを注射し、卵管内でエレクトロポレーションによる遺伝子導入をおこなう。そのため、受精卵を一旦体外に取り出して、仮親マウスに移植するなどの煩雑な過程をスキップできる。実際に、卵管膨大部でのエレクトロポレーションの後、二日後の受精卵においてゲノム編集が可能である結果を得ている。
- 3) ナノシートに電子回路を組み込むことで、外部からの電磁波照射により青色 LED を発光させるシステムを開発した。以下に成果として、東京工業大学の藤枝俊宣講師との共同研究による特許明細書および論文の要約を記載する。
  1. 高分子超薄膜(ナノシート)と印刷配線からなり、微小細管(注射針・カテーテル・内視鏡トロッカー)や容器(カプセル)に収納し、その後放出可能な機械的柔軟性と導電性を有する薄膜状構造体(総膜厚: 10  $\mu\text{m}$  未満)である。
  2. 基材表面に予め有機コロイド系導電性物質(グラフェンフレーク, PEDOT:PSS)をインク受容層として印刷しておくことで、受容層に選択的に金属性ナノ粒子を集積できる。これにより構造的にも電氣的にも欠陥の無い導電配線が得られる。
  3. グラフェンフレークの層状構造を利用することで、水溶性支持膜(ポリビニルアルコール)にてグラフェンと金ナノ粒子からなる導電配線を基材から剥離できる。この時、基材の種類は限定されないため、例えばガラスなどの耐熱性基材を選択すれば配線抵抗値を下げるための高温プロセスを適用できる。
  4. 基材から剥離した配線を別途調製したナノシートに転写し、これをさらに別のナノシートにて被覆することで、薄膜の厚さに応じて注射針・カテーテル・カプセルに収納して放出可能な薄膜状導電体を供する。
  5. 4. と類似の方法で剥離した微細配線を絶縁性高分子にて被覆し、その先端をハサミなどの刃物で切断すれば電極部を簡便に露出できる。この時、印刷のデザインにより配線の幅と厚さを制御することで、測定対象の生体電位に応じたインピーダンスが得られる。また、切断を繰り返すことで何度でも同等のインピーダンスを有する電極を作製できる。
  6. 当該デバイスを利用することで、生体内部への電子機器の低侵襲な埋め込みが可能になるため、生体内部へのセンサ・光源・薬物徐放機器の設置が可能になる。本デバイスの応用分野には、脳科学・光遺伝学・薬物送達システムが見込まれる。

### 周辺正常細胞の変異細胞に対する排除能惹起機構の解明

#### 研究経過

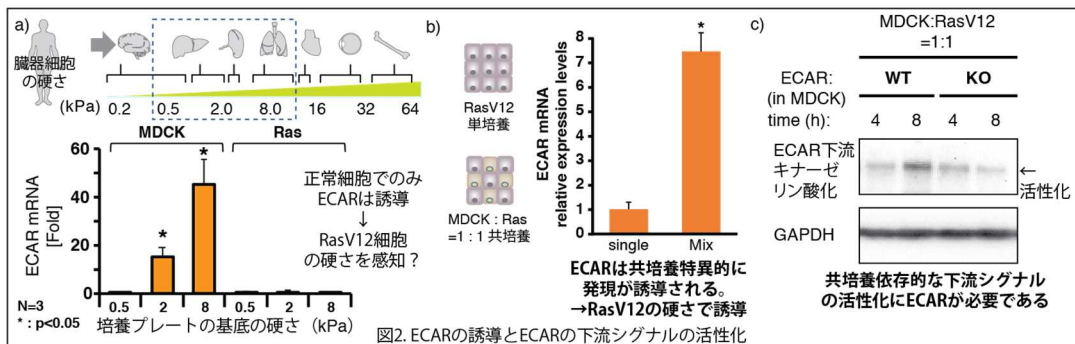
- 1) 抗原提示関連膜タンパク質リガンドとトリガンドに対する受容体の同定  
Ras 変異依存的なタンパク質発現のプロファイル変化は、この抗原提示を亢進することが

知られている。そこで、抗原提示関連膜タンパク質 ECA1 から 4 が変異細胞の排除に関与するかを検討した。テトラサイクリン(Tet)誘導性 pTRE3G-RasV12 安定発現 MDCK 細胞 (Ras 細胞)を正常 MDCK 細胞(正常細胞)と共培養すると、Tet 依存的に Ras 細胞は正常上皮細胞層から排除される。一方で、ECAs を欠損した Ras 細胞と正常細胞を共培養すると、ECA1 でのみこの変異細胞の排除が低下した(図 1a,b,c)。また更に、正常細胞側の受容体 ECAR のノックアウト解析でも、変異細胞の排除効率が減弱することがわかった(図 1d)。



## 2) 同定した ECAR の誘導機構(上流)および下流シグナルの解析

RasV12変異細胞はmyosin, plectin, paxillinなどの骨格形成因を集積させる。特に myosin は正常細胞との境界面に集積することで変異細胞の細胞膜テンションを亢進させ、細胞を硬化させる。正常細胞はこの RasV12 細胞の硬さをセンスすることが示唆されている(Kajita et al., Nat commun 2014)。興味深いことにこれと一致して、すでに同定している正常細胞側の受容体 ECAR はこの変異細胞の硬さを認識し、発現誘導されるという結果を得た(図 2a,b)。また更に、Ras 細胞で発現する ECA1 を認識した ECAR は下流のチロシンキナーゼを活性化することが分かってきた(図 2c)。



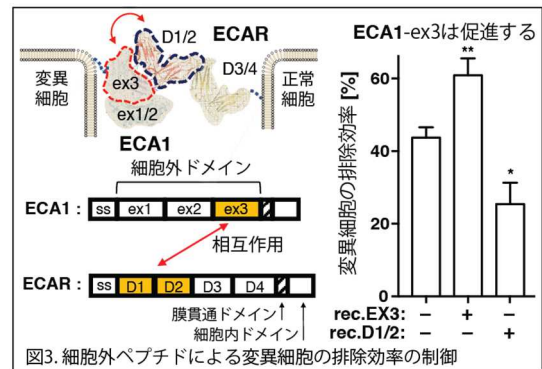
## 3) ECA の細胞外ドメイン・ペプチドは正常細胞の攻撃能を高める

類似タンパク質の結晶構造解析を基にした結合予測および *in vitro* の結合結果より、ECA1 の ex3 および ECAR の D1/2 ドメインが直接的に結合することをすでに示している(図 3 左)。それぞれのリコンビナントタンパク質を細胞に処理したところ、ECA1-ex3 は変異細胞の排除を促進した(図 3 右)。一方で、ECAR-D1/2 は排除効率を抑制した。これらのリコンビナントタンパク質を最適化することで、マウス生体内で変異細胞の排除を促進できるかを検討する。これにより、予防的治療法の確立に必須である薬剤リードを創出する。

### 進捗状況、成果

1)から 3)において、薬剤シードとしての ECA1-ex3 を創出し、国内特許を取得した。加えて、ヒト上皮正常細胞を樹立し、同細胞を用いた造腫瘍アッセイにより、変異細胞の腫瘍化の指標としたアッセイにおいて、ECA1-ex3 が腫瘍形成を抑制することを見出した。

同研究結果は、海外特許申請中かつ論文発表予定である。



### 3. 今後の展開

現在構築中の光照射依存的に変異細胞を誘導できるマウスを用いて、ECA1-ex3 の効果を *in vivo* レベルで実証する。また、正常細胞側の ECAR の発現誘導については、変異細胞の硬さが関与することが分かっている。そのため、正常細胞がどのようにしてこの硬さを認識し、ECAR を誘導するかという機構を解明する。これにより、より効率的に変異細胞の排除を促進できる予防的治療の可能性を広げることができる。

### 4. 自己評価

マウス *in vivo* で光照射するためのインジェクタブル・デバイスを共同研究により開発した。また、光活性化型 CRISPR システムの最適化を行っているが、まだ *in vivo* で活用するレベルには達していないため、当初の目標の 8 割程度の達成度といえる。しかし、光依存的に特定遺伝子を誘導する GAVPO システムへ変更し、構築したインジェクタブル・デバイスを利用することで、*in vivo* での光照射依存的な変異細胞誘導が可能となる。このシステムを用いることで、目標は達成できると予想される。一方で、がん変異細胞の排除機構について、これまで全く不明であった機構を見出すなど、生命科学領域において大きな波及効果を生む発見に至っている。この機構を基にした薬剤の開発は、がん領域において科学的な根拠に基づいて予防的に治療するという新たな治療法を確立するための大きな第一歩となる。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

- 1) Tetsu Y, Kido Y, Hao M, Takeoka S, **Maruyama T**, Fujie T  
Graphene/Au Hybrid Antenna Coil Exfoliated with Multi-Stacked Graphene Flakes for Ultra-Thin Biomedical Devices  
*Advanced Electronic Materials* (2019) *in press*
- 2) Kasai N, Kadeer A, Kajita M, Saitoh S, Ishikawa S, **Maruyama T\*** (責任著者), Fujita Y\*.  
The paxillin-plectin-EPLIN complex promotes apical elimination of RasV12-transformed cells by modulating HDAC6-regulated tubulin acetylation.  
*Sci Rep.* (2018) Feb 1;8(1):2097.
- 3) Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, **Maruyama T**, et al.



Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes

*Nat Cell Biol.* (2017) May;19(5):530-541.

- 4) †Maruyama T(†:equally contributed), †Saitoh S, Yako Y, Kajita M, Fujioka Y, Ohba Y, Kasai N, Sugama N, Kon S, Ishikawa S, Hayashi T, Yamazaki T, Tada M and Fujita Y  
Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells.  
*Proc Natl Acad Sci USA.* (2017) 114(12):E2327-E2336
- 5) Kadeer A, Maruyama T, Kajita M, Morita T, Sasaki A, Ohoka A, Ishikawa S, Ikegawa M, Shimada T and Fujita Y  
Plectin is a novel regulator for apical extrusion of RasV12-transformed cells.  
*Sci Rep.* (2017) 10(7):44328

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1) 丸山 剛「光照射によるがん変異細胞の誘導と挙動解析」  
第 42 回日本分生生物学会 (福岡) 2019 年 12 月
- 2) 丸山 剛「上皮細胞によるがん変異細胞の排除」  
定量生命科学研究所シンポジウム (東京) 2019 年 8 月
- 3) 丸山 剛「細胞競合によるがん変異細胞の排除促進; がんの予防的治療を目指して」  
日本医学会連合 Rising Star リトリート (千葉) 2019 年 3 月
- 4) Takeshi Maruyama Epithelia cell-cell communication via antigen presentation  
Organoid 2019 (沖縄) 2019 年 4 月
- 5) 丸山 剛「細胞競合によるがん変異細胞の排除効率促進; がんの予防的治療を目指して」  
癌研セミナー (東京) 2019 年 1 月 21 日
- 6) 丸山 剛、藤田恭之「がんの予防的治療を目指した哺乳類細胞競合 促進化合物の探索」  
第 91 回日本生化学会 (京都) 2018 年 9 月 24 日
- 7) 丸山 剛、藤田 恭之「上皮細胞層における哺乳類細胞競合現象の観察方法」  
実験医学 36(4): 93-101 (2018)

# 研究報告書

## 「動物行動の神経基盤解明のための非侵襲光操作法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 山下 貴之

### 1. 研究のねらい

体外から安全かつ自由に特定の細胞機能を操作することができれば、科学研究における介入実験の手段としてのみならず、様々な疾患の治療手段として幅広く活用されると考えられる。近年、藻類などが持つ光感受性タンパク質(オプシン)を特定の細胞に発現させることで、光照射により細胞機能を制御することが可能となってきた。この方法は光遺伝学(optogenetics)と呼ばれ、高い時間精度を背景に神経科学分野にて幅広く利用が進んでいる。しかしながら、オプシンを活性化する光の波長は可視光領域であり、体外から照射しても体の奥にある組織には到達しない。その欠点を回避するため、従来は光ファイバーを組織に刺入して可視光を送達する方法が採用されてきた。ところが、光ファイバーの刺入は組織侵襲性が高い上に、実験上の様々な不都合を生むことが明らかになっており、光ファイバーを用いずに可視光を組織深部へ送達する手法の開発が求められている。そこで、本研究は、生体組織をよく透過する様々な電磁波を吸収して可視光を放出する物質を組織深部に埋め込み、体外からの電磁波照射により遠隔的に組織深部に発光させ、その光エネルギーでオプシンを活性化させる手法の開発を行った。具体的には、近赤外光を可視光へ変換するアップコンバージョン素材、あるいはX線を可視光へ変換するシンチレーターを用いた無線・遠隔的な光操作法について、マウスの脳神経細胞への応用をモデル系として技術開発を進めた。本手法の更なる進展により、侵襲が少なく遠隔的な細胞機能操作が汎用化すれば、脳神経科学分野を中心に光遺伝学の応用範囲が拡大するとともに、がん治療分野を含めた臨床分野への応用も期待される。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

光遺伝学のさらなる汎用化を目指して、自由に行動する動物の神経活動を遠隔・無線的に操作する新しい光遺伝学的手法の開発を行った。具体的には、近赤外光照射により可視光を発するアップコンバージョン粒子を用いた光操作法とX線照射により可視光を発するシンチレーターを用いた光操作法の2種類について開発を行った。

アップコンバージョン粒子を用いた方法については、各種条件検討の結果、マイクロサイズの緑色発光ランタニド粒子(LMP)が緑色光に反応するオプシン(C1V1およびGtACR1)を効率よく活性化することを明らかにした。LMPとこれらオプシンを組み合わせると、光ファイバーを刺入せずに、脳表から約2mm程度までの深さにおいては体外からの近赤外光照射により神経細胞活動の制御と関連行動の誘発・抑制が可能であることを、マウスを用いて示した。ところが、2mmよりもさらに組織深部における本手法の適用は、近赤外光の組織透過性の限界と近赤外光照射面にあたる体表における組織温度上昇が問題となり、現段階では困難であることが明らかになった。

アップコンバージョン粒子を用いた手法の問題に鑑み、近赤外光に比して格段に組織透過性の高いX線を可視光へ変換するシンチレーターを用いることを新たに考案した。各種条件検討を行ったところ、黄色発光シンチレーターであるCe:GAGGが赤色シフトしたオプシンであるbReaChESとGtACR1を効率よく活性化することが明らかになった。さらに、Ce:GAGGの棒状結晶とこれらオプシンを組み合わせ、X線照射によるマウス中脳ドーパミン神経の活動操作を試みたところ、マウスの場所嗜好性の変化を誘導できたことから、Ce:GAGG結晶からの発光による神経活動操作の実行性が証明された(特願2019-155659; Matsubara et al., bioRxiv, 2019)。シンチレーターを用いた光操作法の開発は、X線の生物医学的な応用範囲を拡大し、様々な機能生物学的研究や新たな治療戦略の開発に役立つと期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「アップコンバージョンの光遺伝学への応用」

本研究開始以前に、八尾寛教授(東北大学・当時)との共同研究により、培養神経細胞における概念実証に成功していた(Hososhima et al., Scientific Reports, 2015)ことから、本さきがけ研究では、当該論文で用いたアップコンバージョン粒子(ランタニド・ナノ粒子、LNP)の*in vivo*マウス標本への適用を目指した。しかしながら、組織内に拡散したLNPでは神経活動を操作するために十分なアップコンバージョン発光を得ることは難しく、それどころか高強度の近赤外光照射に伴う脳表面組織の熱傷という回避できない問題を引き起こすことが分かった。そこで、組織内においても十分なアップコンバージョン発光を得るためランタニド粒子のサイズを大きくし、マイクロサイズのランタニド粒子(LMP)を用いて神経操作を試みたところ、

0.1-0.2 mW/mm<sup>2</sup>の近赤外光パルス照射により、LMP周囲の神経細胞に発現させた脱分極型オプシンC1V1を活性化し、活動電位上昇およびそれに伴う行動変化を引き起こすことが明らかとなった(図1)。この強度の近赤外光照射では、脳表面温度は40度未満となり、組織熱傷は最小限に抑えられる(図2)。さ

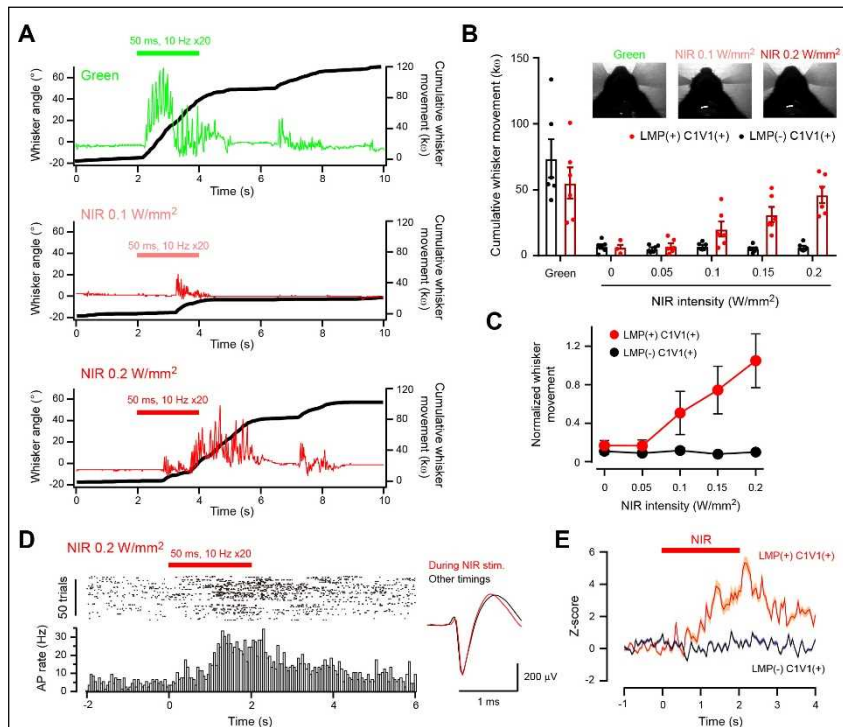


図1 近赤外光とアップコンバージョンによる大脳皮質一次運動野洞毛領域の光操作 (Miyazaki et al., Cell Reports, 2019; Fig. 4)

らに、拡散フィルターを通して近赤外光を照射することにより広範囲の近赤外照射が可能な行動実験チャンバーを作成し、脳表より約 2 mm 程度の深さにある背側線条体の活性化と関連行動の誘発に成功した。

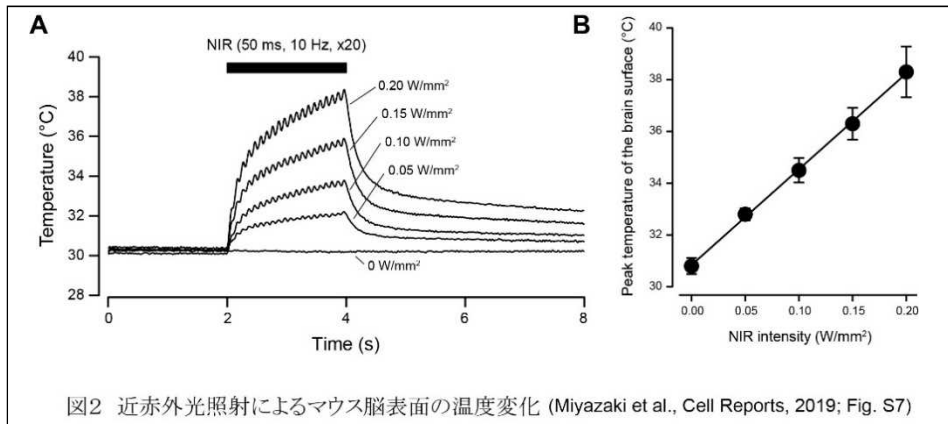


図2 近赤外光照射によるマウス脳表面の温度変化 (Miyazaki et al., Cell Reports, 2019; Fig. S7)

### 研究テーマ B 「X 線を用いた新たな光操作法の開発」

上記の近赤外光を用いた手法の場合、体表から 2-3 mm 程度以上の深度では神経操作が難しく、また体表における熱発生を抑制することも必要であることが分かってきたため、さらに深部に到達しうる X 線を用いた新規技術について開発を行った。X 線を可視光に変換する素材であるシンチレーターの結晶サンプルを柳田健之教授(奈良先端科学技術大学院大学)より入手し、透明かつ潮解性のない Ce:GAGG (黄色発光) および Ce:YSO (青色発光) を候補として、HEK293 細胞に各種オプシンを発現させ、シンチレーターからの発光に誘発された電流変化を記録することにより、発光波長に適したオプシンの探索を行った(図3)。結果として、Ce:GAGG の黄色発光に対しては興奮性の bReaChES と抑制性の GtACR1 が適することが分かり、Ce:YSO の青色発光に対しては興奮性のステップ・ファンクション・オプシン SSFO と抑制性の GtACR2 または GtACR1 が適することが明らかとなった。

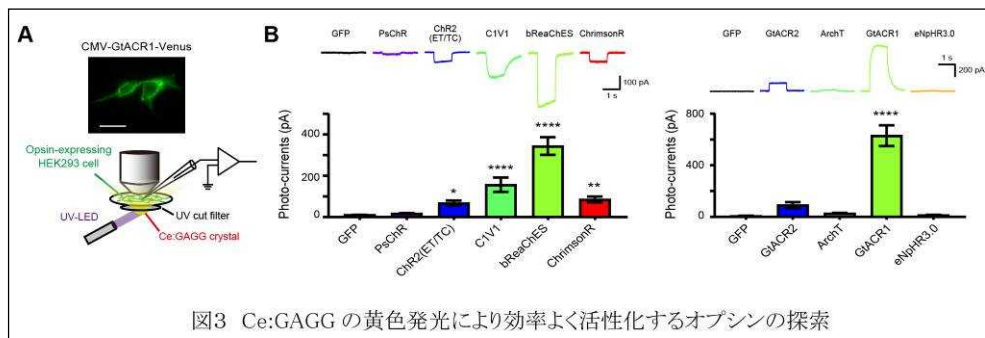


図3 Ce:GAGG の黄色発光により効率よく活性化するオプシンの探索

次に、遺伝子改変マウスを用いて中脳ドーパミン神経にこれらオプシンを発現させ、急性脳スライス標本を用いて、シンチレーターからの発光により神経活動を操作できるか否かを検討した。Ce:GAGG と Ce:YSO のいずれも 10 uW/cm<sup>2</sup> 程度の弱い発光でも神経活動を操作できることが明らかになった(図4)。さらに、生きたマウスにおいても、上記と同様に中脳ドーパミン神経に bReaChES を発現させて、その直上に Ce:GAGG 結晶(縦 0.5 mm 横 0.5 mm 長さ 1.0-1.5 mm)を留置し、場所嗜好性テストを行ったところ、X 線( 0.5 Gy/min)を照射した



チャンパーに対して、bReaChES 発現マウスではより嗜好性が上昇し、GtACR1 発現マウスでは嗜好性が低下した(図 5)。VTA ドーパミン神経の活性化は場所嗜好性を上昇させ、不活性化はそれを低下させることが知られていることから、これらの結果は自由行動中のマウスにおいても Ce:GAGG からの発光によりドーパミン神経活動の操作が可能である、つまり、X 線を用いた神経機能の無線遠隔操作が可能であることを示唆している (Matuabara et al., bioRxiv, 2019; 特願 2019-155659)。

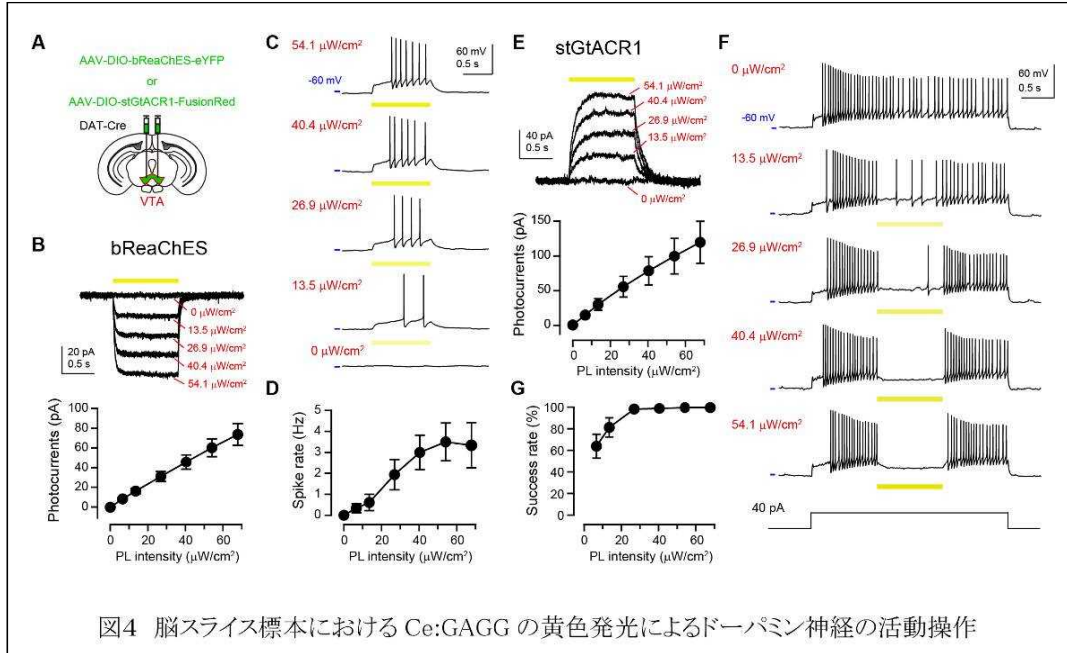


図4 脳スライス標本における Ce:GAGG の黄色発光によるドーパミン神経の活動操作

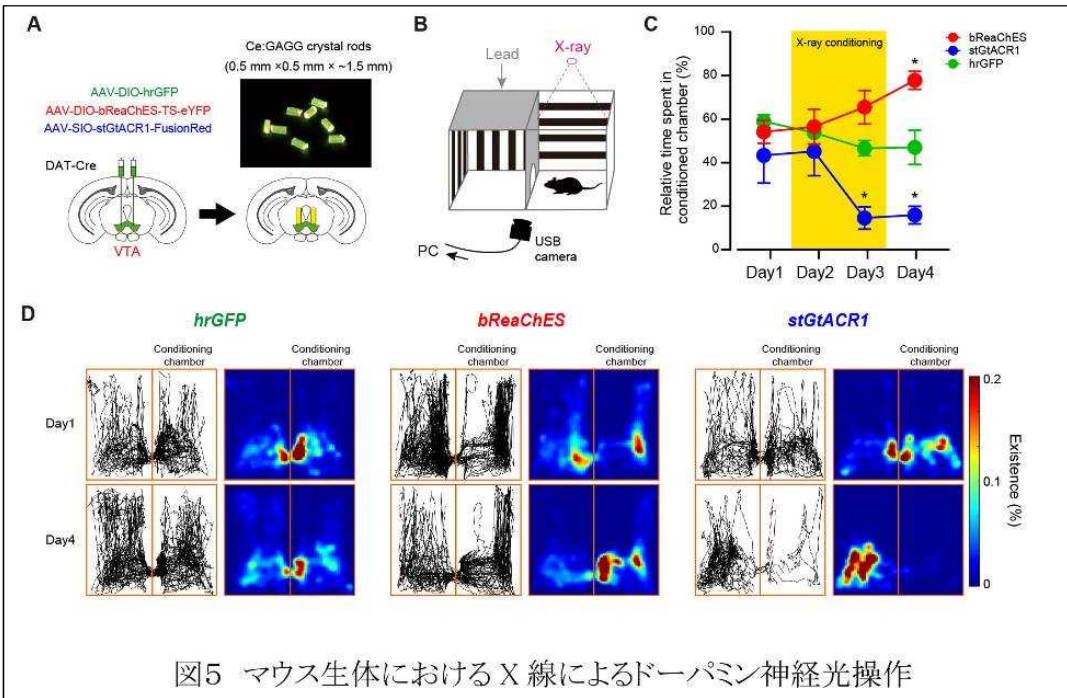


図5 マウス生体における X 線によるドーパミン神経光操作

### 3. 今後の展開

本研究結果により X 線を用いた神経機能操作が可能であることが示された。このことは、生きた動物個体の深部組織においても、X 線を用いて特異的に細胞機能を光で操作できることを示唆する。しかしながら、本手法は X 線被爆という根本的な問題を抱えており、これをいかに軽減するかが手法の汎用化の鍵となる。X 線照射法の改善策としては、生体透過性が高く(生体へのダメージが少なく)、かつ、シンチレーター発光効率の高い X 線波長の検討、パルス照射装置の開発、ターゲット照射システムの開発などが有効と考えられる。また、シンチレーター素材の改善策としては、より発光効率の高い液体シンチレーターのコンポジット粒子化、分子ターゲットのためのタグ付け修飾などが考えられる。これらの手法改善のためには、物理・化学・生物学・医学の学際的なコラボレーションが必要である。

### 4. 自己評価

研究目的の達成状況は順調であったと考える。特に X 線を用いた光操作法の開発は、前例がない非常に挑戦的な研究であった。ゼロから独自の人脈を開拓して候補材料の調達を行うところから始め、条件検討を経て概念実証実験に成功し、特許出願にまで到達したことは自身としても高く評価したい。ところが、X 線を用いる手法は被爆の問題が避けられず、特許出願後の企業との交渉が全く進まなかったことは残念であった。本手法の潜在的な応用可能性をさらにアピールできるよう手法の改善を進めたい。

研究費の執行状況は妥当と考える。独自研究グループとして研究を進めはじめてから 1 年半程度経過した段階で本さきがけ研究を開始したため、研究開始当初はメンバーが少なく、実験設備への投資が主な研究費の使い道であった。徐々に研究グループメンバーを増員し、実験用の消耗品と技術補助員の人件費への充当分が増加した。

研究論文としては、最も挑戦的な研究であった X 線の神経操作の開発の論文文化はもとより時間がかかることを想定していたが、すでにプレプリントとして内容を公開しており (Matsubara et al., bioRxiv, 2019)、各種学会でもデータを紹介している。本論文は現在投稿・改訂を複数回繰り返しており、1 年以内に原著論文として報告できる予定である。今後、本研究を契機として、X 線光操作法が光の届かない組織深部における遠隔的細胞機能操作法のスタンダードとして成長し、生物医学分野で広く利用されるよう研究を継続したい。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

1. Yamashita T\*, Vavladeli A\*, Pala A\*, Galan K\*, Crochet S, Petersen SSA, Petersen CCH. Diverse long-range axonal projections of excitatory layer 2/3 neurons in mouse barrel cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2018. 12, 33. (\*, Co-first authors)
2. Busse L, Cardin J, Chiappe E, Halassa M, McGinley M, Yamashita T, Saleem A. Sensation during active behaviors. *The Journal of Neuroscience*. 2017. 37, 10826-10834.
3. Yamashita T, Yamanaka A. Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control. *Current Opinion in Neurobiology*. 2017. 44, 94-100.

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

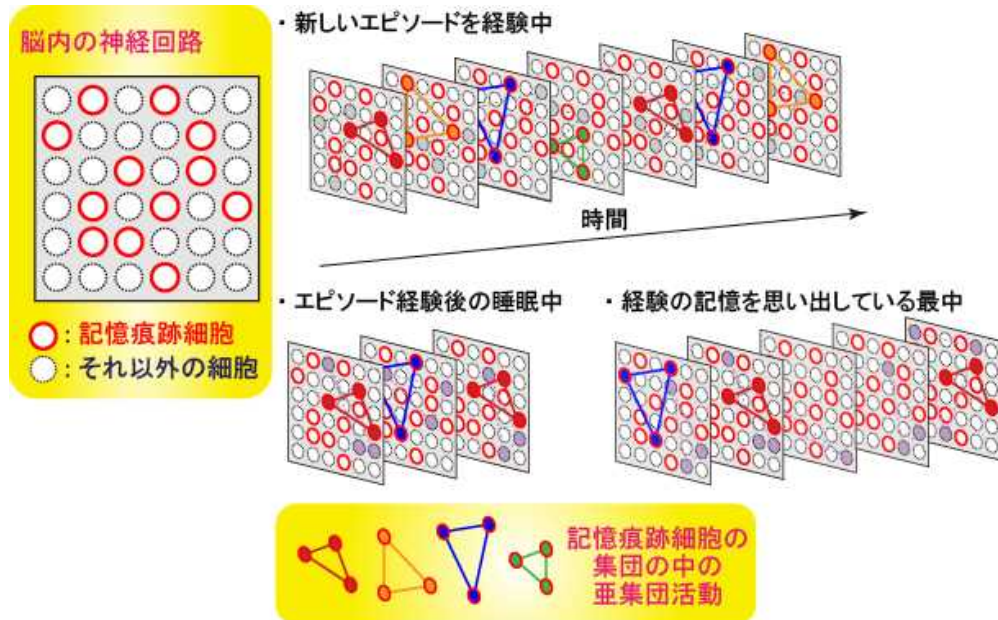
(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 受賞:山下貴之「文部科学大臣表彰 若手科学者賞」、2017年4月
2. 和文総説:山下貴之「脳深部の遠隔的光操作法」月刊「細胞」、2020年2月号
3. 学会発表:Yamashita T. “Remote control of neuronal function using inorganic phosphor absorbing electromagnetic waves” CSH-Asia Conference: Latest Advances in Development & Function of Neuronal Circuits、淡路、2018年9月28日(一般口演)
4. 学会発表:山下 貴之 “Deep brain stimulation using X-rays” 第11回光操作研究会、名古屋、2019年9月12日(招待講演)
5. プレプリント:Matsubara T, Yanagida T, Kawaguchi N, Nakano T, Yoshimoto J, Tsunoda SP, Horigane S, Ueda S, Takemoto-Kimura S, Kandori H, Yamanaka A, Yamashita T\*. Remote control of neural function by X-ray-induced scintillation. bioRxiv. 2019. 798702; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/798702>. (\*, Corresponding author)

## 経験を記憶する新たな神経細胞集団を発見

**大川 宜昭**（獨協医科大学 先端医科学統合研究施設・准教授）

研究課題名：「記憶痕跡活動の可視化が開く記憶の新たな操作法」 研究期間：2016.10～2020.03



### 図 睡眠と記憶痕跡亜集団の活動パターンとの関係

新しいエピソードの経験中に出現した複数の記憶痕跡細胞集団中の亜集団の約40パーセントは、エピソード経験後の睡眠中から経験の記憶を思い出している最中にかけて高い確率で再出現します。この睡眠時の再活動が記憶を定着している過程であり、そして脳が記憶を思い出している様子であると考えられます。

新しく経験したエピソードを記憶するとき、脳内では神経細胞集団が活動しますが、動物が自由に行動できる状況で、記憶を保持した神経細胞（記憶痕跡細胞と呼びます）の集団活動を継続して観察することは困難でした。そこで、自由行動中のマウスの脳内で記憶痕跡細胞の集団を光で観測する技術を開発しました。

この技術を使い、新しいエピソードを経験中、経験後の睡眠中、また、経験を思い出している最中の記憶痕跡細胞の集団活動を観察しました。その結果、記憶痕跡細胞の集団の中には、それぞれ違うパターンで活動する複数の小さなグループ（亜集団）が存在し、その亜集団の一部は、睡眠中や経験を思い出している最中に再び活動することで、記憶が定着していることが分かりました。

これらの記憶痕跡細胞の亜集団の解析によって、脳内に保持されている情報の詳細な解読につながり、

効率の良い記憶学習法や記憶障害の診断法の開発などへの応用が期待されます。

#### >>参考情報

##### ➤ 論文

1. Ghandour K., Ohkawa N., et al.. **Nature Communications**, (2019) 10: 2637  
DOI: 10.1038/s41467-019-10683-2

##### ➤ プレスリリース

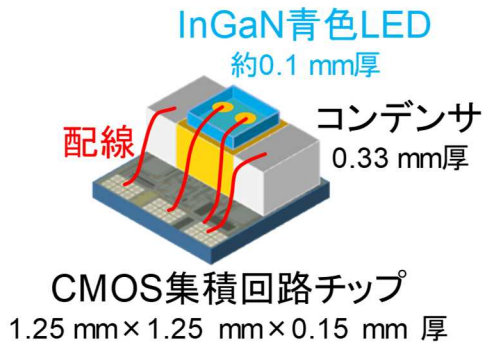
1. 「経験を記憶する新たな神経細胞集団を発見～睡眠中に記憶が定着する様子の観察にも成功～」(2019年6月)  
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190614/index.html>



## 世界最小・最軽量の生体埋め込み光刺激デバイスを実現

**徳田 崇**（東京工業大学 科学技術創成研究院・教授）

研究課題名：「完全ワイヤレス・インプラントブル光操作デバイスの実現」 研究期間：2016.10～2020.3



### 図 開発した生体埋め込み光刺激デバイス

コインの縁に収まるほど小さいデバイスです。生体組織を透過する赤外光を電気エネルギーに変換し強い青色の光パルスを発します。光遺伝学などにより光感受性を付与した生体細胞やタンパクを刺激することができます。

生体の光操作技術では青色光が特に重要ですが、組織を透過できません。そのため生体内に青色光を届ける必要があります。そしてワイヤレスで、小型軽量が望ましいのはいうまでもありません。

本研究では

- ・光を使ったワイヤレス電力伝送
- ・CMOS集積回路と太陽電池を集積化
- ・プリント基板を用いない実装技術

などの独自の工夫によって、図に示す超小型(体積 1 mm<sup>3</sup>、重さ 2.3 mg)の生体埋め込み光刺激デバイスを実現しました。このデバイスは、生体を透過する赤外光を裏面で受けて発電し、蓄えてから強い青色光パルスを発します。

このデバイスであれば生体への負担(手術の傷や重さ)を小さくすることができます。たとえば脳科学の動物実験ではマウスが重さを感じずに自由に動けることは大きな利点があります。複数を組み合わせて使えば、複合的な刺激を行うこともできます。

次のステップとして、ただ光るだけではなく情報処理機能の搭載を目指しています。将来的には、図のように小さな生体埋め込み型センサや超小型コンピューターへの発展を狙います。

### >>参考情報

#### ▶ 論文

1. T. Tokuda et al., *AIP Advances*, 8, 045018 (2018).
2. T. Tokuda et al., *Sensors and Materials*, 30, 2343 (2018).

#### ▶ プレスリリース

1. 「生体内で神経を光刺激する世界最小のワイヤレス型デバイスを開発～光遺伝学の新たなツールとして脳神経科学研究や医療の発展に期待～」(2018年4月)

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20180420/index.html>