

山中 章弘

名古屋大学環境医学研究所  
教授

## ファイバーレス光遺伝学による高次脳機能を支える本能機能の解明

### § 1. 研究成果の概要

従来の光遺伝学は、生体透過性の低い可視光を用いていたため、脳深部への適用には光ファイバー刺入が必須であり、侵襲と行動制限が避けられなかった。これを解決するために、ランタニドマイクロ粒子(LMP)を用いて、生体透過性の高い近赤外光から可視光を発光させるアップコンバージョン(UPC)発光を利用する。本研究では、近赤外光を体外から照射し、脳深部において可視光を発生させ、その光で特定神経活動操作を行う。そのために、生物物理学と理論科学の協力を得て、既存分子の効率的な改変と新分子の探索を行い、UPC 発光に最適化した分子を作出する。これらの分子を特定神経に発現させ、近赤外光を体外から照射することにより、光ファイバーの接続なしに特定神経活動を操作する低侵襲、自由行動下のファイバーレス光遺伝学を達成する。開発したファイバーレス光遺伝学を視床下部神経細胞に適用し、高次脳機能を支える本能機能として、睡眠時に記憶を消去する神経に着目して生理的意義の解明を目指す

山中グループは、緑色発光の LMP をマウスの脳内に局所投与し、生体透過性の高い近赤外光を体外から照射して神経活動操作を行った。緑色光で神経活動を活性化させる分子である C1V1、緑色光で神経活動を抑制する ACRI を発現させた神経の活動を光ファイバーの刺入と接続なしに神経活動操作を行い、行動制御に成功した。行動制御に関わる領域である線条体神経の活動操作に成功した。脳内に注入された LMP が注入後約 8 週間留まって機能することを確認した。これらの結果をまとめてファイバーレス光遺伝学技術の確立として Cell Reports 誌に論文発表した。

須藤グループでは、ファイバーレス光遺伝学を支える分子開発と検証を目的に研究を行った。具体的には光受容分子ロドプシンを対象に、新しい分子の単離・同定ならびに機能・構造解析やそれらを基盤とした分子機能の解明および創成を行っている。今年度は、神経抑制型分子として新規アニオンポンプ(2018, Microbes Environ., 33, 89)を見いだすとともに、発色団レチナールの置換(2018, J. Phys. Chem. Lett., 9, 2857)や第二発色団の利用(2019, J. Phys. Chem. B, 123, 10)という全く新しい光遺伝学アプローチを開発することに成功した。また、固体 NMR(2018,

Biophys. J., 115, 72)とラマン分光(2018, J. Phys. Chem., 122, 6945)を駆使して、ロドプシンの機能・構造の一端を様々な時空間分解能で明らかにした。さらに、高感度であることをこれまでに実証したアニオンチャンネルロドプシンの対し、網羅的な変異体実験を行い、アニオン透過機構の一端を明らかにするとともに、野生型よりも2倍程度活性の高い変異体の取得に成功した(2018, Biophys. Physicobiol., 15, 179)。このように、ファイバーレス遺伝学を支えるロドプシンの機能と性質を次々と解明することに成功していることから、分子開発と検証は順調に進んでいると考えられる。

石北グループでは、「分子の最適化」のためには「原理・機構(メカニズム)の理解」が必要、との観点から、本研究では、タンパク質分子における量子化学的手法(QM/MM)、静電相互作用計算、分子動力学的手法、分子モデリング手法等の理論化学的手法を駆使して、ロドプシンの工学的応用を理論面からサポートする。吸収波長、プロトン・イオン輸送機構に重要なアミノ酸やタンパク質因子を特定するとともに、アミノ酸変異体作成の指針を積極的に提案した。ACR1 (anion channelrhodopsin 1)、最近須藤が同定した2価イオンSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を輸送するロドプシンをターゲットとする。

#### 【代表的な原著論文】

1. Toh Miyazaki, Srikanta Chowdhury, Takayuki Yamashita, Takanori Matsubara, Hiromu Yawo, Hideaki Yuasa, \*Akihiro Yamanaka, “Large timescale interrogation of neuronal function by fiberless optogenetics using lanthanide micro-particles”, Cell Rep., 26: 1033-1043.e1035, 2019.
2. Riko Takayama, Akihisa Kaneko, Takashi Okitsu, Satoshi P Tsunoda, Misao Mizuno, Keiichi Kojima, Takashi Tsukamoto, Hideki Kandori, Yasuhisa Mizutani, Akimori Wada and \*Yuki Sudo, “Production of a light-gated proton channel by replacing the retinal chromophore with its synthetic vinylene derivative” J. Phys. Chem. Lett., vol. 9, pp.2857-2862.
3. Keiichi Kojima, Hiroshi C Watanabe, Satoko Doi, Natsuki Miyoshi, Misaki Kato, Hiroshi Ishikita and \*Yuki Sudo, “Mutational analysis of the conserved carboxylates of anion channelrhodopsin-2 (ACR2) expressed in Escherichia coli and their roles in anion transport” Biophys. Physicobiol., vol. 15, pp.179-188.
4. Keisuke Kawashima, Tomohiro Takaoka, Hiroki Kimura, Keisuke Saito, and \*Hiroshi Ishikita, “O<sub>2</sub> evolution and recovery of the water-oxidizing enzyme” Nat. Commun. 9. (2018) 1247. doi: 10.1038/s41467-018-03545-w

## § 2. 研究実施体制

### (1)「山中」グループ

- ① 研究代表者:山中 章弘 (名古屋大学環境医学研究所、教授)
- ② 研究項目
  1. 開発:① ファイバーレス光遺伝学開発
  2. 検証:⑥ 機能確認・ウイルスベクター・遺伝子改変動物作成
  3. 適用:⑧ 視床下部神経活動操作による、睡眠覚醒と記憶制御のメカニズム解明

### (2)須藤グループ

- ① 主たる共同研究者:須藤 雄気 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)、教授)
- ② 研究項目
  - ・ファイバーレス光遺伝学を支える分子開発と検証
  1. 開発:② 既存分子の原理・動作機構の理解、④新規分子の探索・改変
  2. 検証:⑤ 線虫・培養細胞による機能確認

### (3)石北グループ

- ① 主たる共同研究者:石北 央 (東京大学先端科学技術研究センター 教授)
- ② 研究項目
  - ・ファイバーレス光遺伝学を支える分子機構の解明
  1. 吸収波長制御機構解明と長波長化
  2. プロトン移動(光中間体の寿命を制御)・イオン透過機構の解明