

研究終了報告書

「コンピュータホログラフィーを応用した活動電位発生機構の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：坂本 雅行

1. 研究のねらい

我々の脳では神経細胞（ニューロン）が互いに巨大なネットワークを形成し、電気信号によって情報伝達をしている。脳の情報表現や処理の理解は現代科学の究極の課題の一つであり、脳機能を理解するためには、これらニューロンが織りなす高度に制御された神経ネットワークを正確に理解する必要がある。さらには、個々のニューロンは数千～数万の他のニューロンからシナプス入力を受けていると考えられており、これら入力の情報処理機構をシナプスレベルで理解することも重要である。

ニューロンの活動を計測ならびに操作する方法として、パッチクランプ法に代表される電極を用いた電気生理学的手法が用いられてきた。脳内の神経活動は、巨大なネットワークに内在するニューロンによって時空間的に規定されている。そのため、神経回路の情報処理メカニズムを正確に理解するためには、大規模な活動記録法が必要不可欠である。ところが、パッチクランプ法で同時に記録可能なニューロン数は1～4個と少数である。また、ニューロンには数千～数万個の樹状突起スパインと呼ばれる微小突起構造が存在し、シナプス入力を適切に処理してその情報を細胞体へと伝搬している。樹状突起スパインは活動に応じてその形態や機能を変化させることから、高次脳機能の重要な要素を担っていると考えられている。また、ニューロンは興奮性および抑制性のシナプス入力を受け取っており、これらの総和によって活動電位が引き起こされる。ところがこれらシナプス入力がどのように処理されて樹状突起を伝搬していくかについてはよく分かっていない。脳内における電氣的活動の演算処理機構を理解するためには、細胞体だけでなく、樹状突起スパインから空間的な情報を得ながらその活動を計測する必要がある。ところが、樹状突起スパインは1 μm 以下の微小構造のため、電極を用いてその電氣的活動を計測ならびに操作することは技術的に困難という問題があった。したがって、これ問題を解決するためには、従来の電気生理学的手法とは異なる新たな方法論を導入する必要がある。

本研究では、SLM（空間光位相変調機）を用いたホログラフィックな光操作技術を用いて、生体脳においてシナプスレベルで神経活動計測と操作と同時に実現可能な技術開発ならびに開発する光技術に応用可能な蛍光プローブのデザインをおこなった。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、SLM（空間光位相変調機）を用いたホログラフィックな光操作技術を用いることで、マウス生体脳において神経活動計測と操作を光によって同時に実現可能な顕微鏡の開発をおこなった。生体脳の深部においても高時空間分解能で光操作を実現するため、本研究では超短パルスレーザーを用いた光操作システムの開発をおこなった。マウスの視覚野の興奮性錐体ニューロンに神経活動を計測するためのカルシウムセンサー（励起波長：920 nm）と

神経活動を操作するための光遺伝学ツール(励起波長:1,060 nm)を、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて発現させ、開発した顕微鏡を用いて生体脳での活動計測と活動操作をおこなった。その結果、狙ったニューロンにだけ光刺激によって活動電位が誘導でき、かつその電気的活動をカルシウムイメージングで検出することに成功した。生体脳においても All-optical に神経活動計測と操作を同時におこなうことに成功し、開発したパターン照射顕微鏡が機能していることを確認することができた。

また、神経活動を計測する際に使用する蛍光カルシウムセンサーについての開発をおこなった。従来のセンサーよりも活動電位に対する蛍光変化率が上昇した高感度な緑色カルシウムセンサーG-CaMP9a ならびに赤色カルシウムセンサーRCaMP3 を創出することに成功した。加えて、細胞内シグナル分子の動態を可視化するプローブについても開発をおこなった。環状アデノシン一リン酸(cAMP)は細胞内シグナル分子として一過的に産生される環状ヌクレオチドであり、中枢神経系においては記憶形成やシナプスの長期増強(LTP)に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、生体脳においてどのような動態を示すかについては未だよく分かっていなかった。本研究では、生体脳における cAMP の動態を可視化可能なプローブ開発に取り組み、既存のセンサーと比較して、ダイナミックレンジならびに cAMP に対する親和性がいずれも世界一の超高感度 cAMP センサー(cAMPinG1)の創出に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「パターン照射顕微鏡の開発」

本研究ではまず、ニューロンにおいて SLM を用いて活動計測と活動操作を同時におこなうことが可能かどうかを検証するため、1光子レーザーと SLM を用いてパターン照射顕微鏡のプロトタイプ製の作製とその評価をおこなった。

神経活動計測(カルシウムイメージング)と神経活動操作(光遺伝学的操作)を同時におこなうためには、クロストークフリー(カルシウムイメージングの励起光によって光遺伝学ツールが活性化されない)で使用可能なカルシウムセンサーと光遺伝学ツールを選択する必要がある。

様々なプローブの検討をおこなった結果、本研究ではカルシウムセンサーについては赤色カルシウムセンサー(XCaMP-R、励起波長:532 nm)、光遺伝学ツールについては ChR2(H134R)(励起波長:473 nm)をそれぞれ選択した。また、これらプローブのスクリーニングの過程で使用した微生物ロドプシンの様々なタイプの微生物ロドプシンの蛍光特

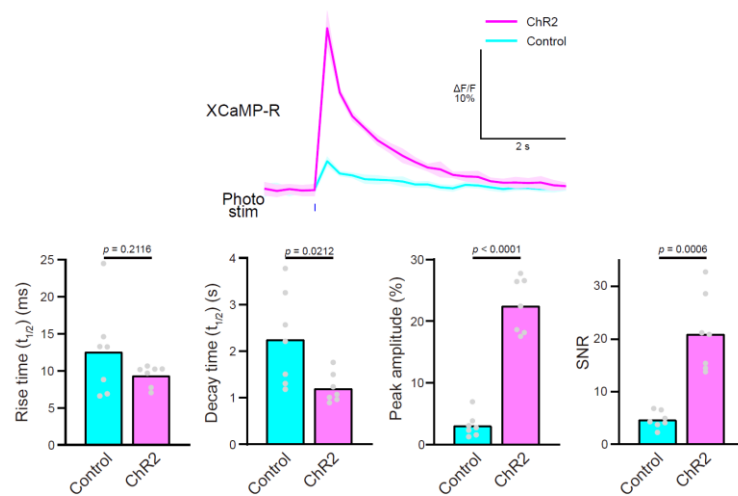


図1 SLMを用いたパターン照射による活動電位の誘導と検出

性(吸収スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトル)について定量的評価をおこなうことで、ロドプシンの蛍光発生メカニズムの一端について明らかにすることができた(代表的論文1)。

パターン照射顕微鏡を用いて培養神経細胞のイメージングをおこなったところ、ターゲットとする細胞においてのみ、光刺激によって誘導した活動電位をカルシウムイメージングで検出できていることが明らかとなった(図1)。さらに、細胞体だけでなく、樹状突起スパインなどのニューロンの微小構造においても光遺伝学ツールを用いた光操作が複数箇所と同時に可能となり、それら活動についても計測できることを確認することができた。以上の結果から、SLMを用いることで、ニューロンの活動計測と活動操作を同時におこなうことが可能であることが分かった。

次に、生体脳で神経活動計測と操作を実現可能な顕微鏡の開発をおこなった。上述の1光子励起では、脳内における光散乱が激しいため、光が脳深部まで届かない問題が発生する。そのため、生体用の顕微鏡は、超短パルスレーザーを用いた2光子励起による神経活動計測と操作をおこなうための顕微鏡の設計をおこなった。本研究では、神経活動を計測するためのプローブとして緑色カルシウムセンサーGCaMP6s(励起波長:920 nm)を、神経活動を操作するための光遺伝学ツールとしてChRmine(励起波長:1,060 nm)を、マウス視覚野のニューロンにそれぞれアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて発現させた。開発したパターン照射顕微鏡を用いて *in vivo* イメージ

ングをおこなった結果、狙った細胞体にだけ光を照射して活動電位が誘導することができ、さらにその活動変化をカルシウムイメージングで検出することに成功した(図2)。

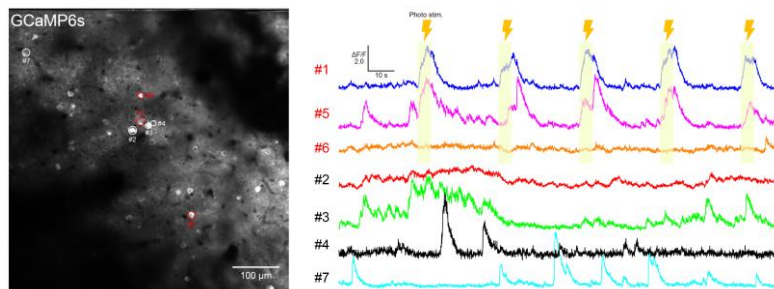


図2 パターン照射によるマウス生体脳での活動電位の誘導と検出

以上の結果から、生体脳においても、All-optical に神経活動計測と操作を同時におこなうことに成功し、パターン照射顕微鏡が機能していることを確認することができた。加えて、神経活動を計測する際に使用するカルシウムセンサーについて、従来のセンサーよりも活動電位に対するS/N比(Signal-to-Noise Ratio)が従来の2倍以上に向上した超高感度・高速カルシウムG-CaMP9aを新たに開発することにも成功した(代表的論文2)

研究テーマB「超高感度蛍光cAMPセンサーの開発」

テーマAで開発した神経活動を可視化するための蛍光プローブ(G-CaMP9a)に加えて、細胞内分子の動態を可視化するプローブについても開発をおこなった。

環状アデノシンリン酸(cAMP)は細胞内シグナル分子として一過的に産生される環状ヌクレオチドであり、中枢神経系においては記憶形成やシナプスの長期増強(LTP)に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、細胞内で実際にどのような動態や局在を示すかについては未だよく分かっていなかった。本研究では、生体脳におけるcAMPの動態を可視化可能なプローブ開発に取り組み、既存のセンサーと比較して、ダイナミックレンジならびにcAMPに対する親和性がいずれも世界一の超高感度cAMPセンサー(cAMPinG1)の創出に成功した。2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングにおいて、cAMPinG1は細胞体だけで

なく subcellular レベルで cAMP の動態を可視化可能であることが分かった。加えて、高感度な赤色カルシウムセンサーRCaMP3 を新たに開発し、cAMP とカルシウムシグナルを同時に可視化する技術の確立にも成功した(図3)。

本研究は、当初の計画になかったものであるが、予想外に面白い結果が得られたため、パターン照射顕微鏡の開発と並行して、プロジェクトを進めた。本プロジェクトで得られた成果について、特許を申請し、論文の原稿をプレプリントサーバへ公開した(代表的論文3)。

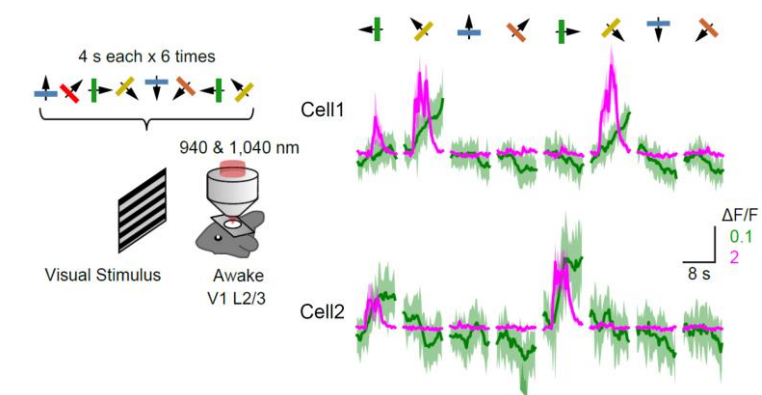


図3 超高感度 cAMP センサーを応用した cAMP と Ca²⁺ の同時イメージング

3. 今後の展開

研究テーマ A「パターン照射顕微鏡の開発」

ニューロンはスパインからたくさんのシナプス入力を受け取っており、これらの総和によって活動電位が引き起こされる。先行研究よりシナプス入力に対して細胞体で記録される膜電位変化はおよそ1~2 mV と非常に小さいことが分かっている。したがって、個々のスパインで受け取ったシナプス電位は、ダイレクトに細胞体に伝搬されるのではなく、樹状突起の分枝が局所的に受けるシナプス入力は1つのローカルな機能単位として電位情報が統合され、それらが細胞体へと伝搬されている可能性が考えられる。今後の研究計画として、異なる樹状突起上に位置するスパインの同時光刺激をおこない、各々の樹状突起の電位情報がどのように統合されるか、イメージング技術を用いて明らかにする。細胞種や樹状突起の位置(細胞体から近い場所にあるか遠い場所にあるか)の違いによる電位情報統合機構を明らかにすることで、活動電位発生メカニズムを明らかにする。また、スパインは生体において多様な形態を有しており、形態によってその電気的特性(シナプス入力に対する電位変化量)は異なることが示唆されている。これら電位情報統合に中心的な役割を果たすスパインの形態やその位置についても明らかにしたい。

また、本研究で開発した光刺激システムを用いることで、特定の感覚刺激や記憶情報を担うニューロンの活動を選択的に操作することが可能となる。今後は、この技術を応用することで、げっ歯類において感覚刺激等を一切用いず、光によって感覚刺激を再現することや、記憶を人工的に操作する技術の確立することを計画している。これにより、外科的手術をおこなわずに、光によって非侵襲的に脳機能の向上や神経変性疾患における脳機能障害の回復や治療が可能になる。さらに将来的には、ヒトの脳機能へ介入できるような光操作技術を確立していきたいと考えている。

研究テーマ B「超高感度蛍光 cAMP センサーの開発」

本さきがけ研究で新たに開発した超高感度蛍光 cAMP センサーは生体脳における cAMP の動

態を計測するだけでなく、創薬ターゲットのスクリーニングへの応用が可能である。

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、医薬品の主要な分子群のひとつであり、現在承認されている薬剤のうち、およそ3分の1が GPCR を標的とするものである。GPCR は神経系疾患、呼吸器系疾患、オンコロジーなど、幅広い疾患領域に関わっているため、GPCR を標的とする薬剤を開発することができれば、幅広い治療薬となることが期待される。GPCR のうち、Gs タンパク質共役型の受容体は、活性化により細胞内 cAMP 濃度が増加し、一方 Gi タンパク質共役型の受容体は cAMP 濃度が減少する。したがって、cAMP の変化を指標にすることで、GPCR をターゲットとした化合物のスクリーニングシステムを構築することが可能となる。cAMP センサーは遺伝子にコードされたセンサーであるので、ケミカルセンサーと異なり、センサーの濃度(コピー数)の調節や細胞種特異的な発現誘導が可能となり、cAMP 濃度の正確な定量が可能となる。

また、ヒト GPCR ファミリーのうち、およそ半分はそのリガンドが同定されていないオーファン受容体である。cAMP センサーと化合物ライブラリーを用いることで、オーファン受容体のリガンドをハイスループットで同定することが可能となる。これらが実現できれば、オーファン GPCR の機能解明へ繋がり、さらにはリガンドの化学式をもとに同定したオーファン受容体のアゴニスト/アンタゴニストの予測・同定についても可能となる。GPCR をターゲットした医薬品は、既知の受容体およびリガンドを標的としている。それ故、本研究計画で開発するイメージング技術を応用することで、オーファン受容体をターゲットとする創薬システムを新たに構築することができるものと期待される。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

本さがけ研究開始してまもなく異動が決まったことやコロナ禍の影響により、2光子励起顕微鏡の納期が大幅に遅れてしまった。そのため、計画に必要な備品が手に入らず研究計画を進めることができない期間がおよそ1年生じてしまった。その後何とか挽回し、当初の大きな目標であった生体脳での神経活動操作と活動計測を同時におこなうための顕微鏡を確立することができた。概ね研究目的は達成できたものと総括している。また、本研究に関連する成果についてもいくつか論文として公表することができた。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本さがけ研究は主に、研究室の博士研究員ならびに技術補佐員と共に進めてきた。またパターン照射顕微鏡作製については、レーザーの専門家と意見交換をおこないながら共同研究を進めてきた。様々な分野の専門家たちと綿密な連携を取ることで、非常にスムーズに研究を遂行することができたと総括している。研究費についても、当初の計画どおりに執行することができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究で開発した光操作技術を用いて生体脳におけるニューロンの活動を操作することが可能となれば、感覚刺激等を用いず、光によって感覚刺激を再現することや、記憶を人工的に操作することが可能となる。これにより、外科的手術をおこなわずに、光によって非侵襲的に脳機能の向上や神経変性疾患における脳機能障害の回復や治療ができるようになる。本研究ではげっ歯

類レベルでの内容であるが、将来的には、ヒトの脳機能へ介入できるようになるものと期待できる。

領域独自の評価項目(当初計画では想定されていなかった展開やそれによる成果、及び研究者としての飛躍につながるような成果)

研究テーマB「超高感度蛍光cAMPセンサーの開発」については、異動やコロナ禍の影響により、顕微鏡やレーザーの納期が遅れたことが原因で実験を進めることができない時期に開始した。当初計画にはなかったが、世界一高感度なセンサーを創出することができ、研究期間内に特許出願や論文投稿までプロジェクトを進めることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:6件

1. Kojima K*, Kurihara R*, **Sakamoto M***, Takanashi T, Kuramochi H, Zhang X, Bito H, Tahara T, Sudo Y. Comparative Studies of the Fluorescence Properties of Microbial Rhodopsins: Spontaneous Emission Versus Photo-Intermediate Fluorescence. *The Journal of Physical Chemistry B* 2020; 124, 7361-7367.

ニューロンの膜電位変化を計測するための膜電位センサーとして微生物型ロドプシンが用いられているが、その電位依存的な蛍光変化の分子メカニズムについてはよく分かっていなかった。本研究では、様々なタイプの微生物ロドプシンの蛍光特性(吸収スペクトル、励起スペクトル、蛍光スペクトル)について定量的評価をおこなうことで、蛍光発生メカニズムの一端を明らかにすることができた。

2. **Sakamoto M**, Inoue M, Takeuchi A, Kobari S, Yokoyama T, Horigane S, Takemoto-Kimura S, Abe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K, Fujii H, Bito H. A Flp-dependent G-CaMP9a transgenic mouse for neuronal imaging in vivo. *Cell Reports Methods* 2022, 2, 100168.

神経活動を計測するために使用されてきた従来のカルシウムセンサーは、神経活動の有無やその強度のみを検出しかできなかった。本研究では、反応速度が早く、神経発火の回数とセンサーの蛍光変化量のあいだに線形関係を示す新規カルシウムセンサーの開発に取り組み、既存のセンサー(GCaMP6f)に比べてカルシウムに対する親和性が高く、活動電位に対するS/N比が2倍以上に向上した高速・高感度カルシウムセンサー(G-CaMP9a)を開発した。

3. Yokoyama T, Manita S, Uwamori H, Tajiri M, Imayoshi I, Yagishita S, Murayama M, Kitamura K, **Sakamoto M**. A multicolor suite for deciphering population coding in calcium and cAMP in vivo. *bioRxiv* 2023.

cAMPは細胞内シグナル分子として一過的に産生される環状ヌクレオチドであり、様々な生理機能に関与していることが知られているが、生体脳においてどのような動態を示すかについてはよく分かっていなかった。本研究では、生体脳におけるcAMPとカルシウムシグナルを同時に可視化可能な蛍光輝度プローブの開発に取り組み、既存のセンサーよりも高感度な緑色cAMPセンサー(cAMPinG1)と赤色カルシウムセンサー(RCaMP3)の創出に成功した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 2 件(特許公開前のものも含む)

| | | |
|---|-------|--|
| 1 | 発明者 | 坂本雅行、チョウシャオミン、尾藤晴彦、須藤雄気、小島慧一 |
| | 発明の名称 | 膜電位センサー |
| | 出願人 | 東京大学 |
| | 出願日 | 2020/4/9 |
| | 出願番号 | 2020-70136 |
| | 概要 | 神経細胞の膜電位変化を可視化するための蛍光膜電位プローブの開発をおこなった。これまで知られていなかったバクテリア由来の微生物ロドプシンがニューロンの電位変化に依存してその蛍光輝度を変化することを発見した。 |
| 2 | 発明者 | 横山達士、坂本雅行 |
| | 発明の名称 | ポリペプチド |
| | 出願人 | 京都大学 |
| | 出願日 | 2022/5/24 |
| | 出願番号 | 2022-084523 |
| | 概要 | 細胞内の cAMP の動態を可視化するための超高感度な蛍光 cAMP センサーを開発した。また開発したセンサーをドラッグスクリーニングへの応用方法について確立した。 |

(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

Masayuki Sakamoto

Imaging voltage and biochemical signaling *in vivo*.

Merocyanine 540/Flash conference, Woods Hole Marine Biological Laboratory, MA, USA. August 2022. Imaging voltage and biochemical signaling *in vivo*.

坂本 雅行

遺伝子にコードされた膜電位センサーの開発と応用

第 42 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、京都府宇治市、2021 年 10 月.

Masayuki Sakamoto

Rational design of genetically encoded indicators and their application.

第 64 回 日本神経化学会大会 シンポジウム「先端的イメージング技術で読み解く高次脳機能の仕組み」、奈良県奈良市、2021 年 9 月.

受賞

コニカミノルタ画像奨励賞(優秀賞)(2020 年 11 月)

プレスリリース

Sakamoto et al (2022)の論文に関するプレスリリース
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-02-15>