

研究終了報告書

「多光子現象を駆使した脳内化学情報伝達の可視化解析」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：塗谷 睦生

1. 研究のねらい

我々の脳には無数の神経細胞が情報のやり取りを行っており、化学情報伝達物質の授受がそれを実現している。そして、この化学情報伝達物質を介した神経細胞間の情報伝達が脳の高次機能や精神機能を担っている。よって、このような化学情報伝達の不調は種々の精神疾患の原因となり、その不調の調整が向精神薬の薬理学的基盤をなすと考えられる。つまり、脳健康・病気・薬の全ての理解のためには、このような神経細胞間の化学情報伝達の理解、特に「見て、理解する」ことが必要不可欠となる。しかし、各種の可視化技術の発展により飛躍的に進歩してきた脳科学においても、化学情報伝達の可視化による解析というのは未だに困難を極め、脳の理解に向けての研究において大きなハードルとなっている。本研究はこのような現状を打開し、脳健康・病気・薬の理解にブレークスルーをもたらすことを目的とした。

化学情報伝達物質の可視化を阻んできたのは、その小ささにある。パーキンソン病との関連などが知られるドーパミンは分子量が200程度で、これまで生命科学で用いられてきた、それ自体の分子量が数百ある蛍光色素を付加しての動態解析手法が適用できない。また、脳組織は散乱性が高く、通常用いられる光は届かない。そこで本研究では、新たな手法として、非常に小さく、かつラマン散乱により特異的に検出できるラマンタグを観測対象分子に導入し、更に高い組織透過性と感度で顕微鏡観察できるコヒーレントラマン顕微鏡に代表される多光子顕微鏡技術を開発・応用することで、このような低分子量の化学情報伝達物質の可視化を試みた。重要なことに、光の量子性を利用した多光子顕微鏡技術には多種多様な原理に基づいたものがあり、それらは独自の情報を同時に観測者に与える。生命科学においては多光子顕微鏡の能力が十分に開拓され活かされていない中、本研究では、化学情報伝達の可視化という目的のみならず、種々の多光子顕微鏡技術の生命科学への展開一般を模索した。新たな戦略と可視化技術の一体的な開拓により、低分子量生理活性物質の可視化、そしてそれによる生命科学の推進を図った。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では脳内化学情報伝達を可視化するために、新たなタグを付加したプローブの開発とその特性の解析、そしてこのプローブを脳組織内で可視化するための多光子顕微鏡法の開発と応用を試みた。研究は(A)化学情報伝達可視化のためのアルキンタグ神経調節物質の開発、(B)アルキンタグ神経調節物質のプローブとしての性能評価、(C)マルチモダル多光子顕微鏡の開発と生命科学への応用、そして(D)A, B, Cの統合によるアルキンタグ神経調節物質の脳組織内可視化解析、に分けて遂行した。

(A)から、プロトタイプとしてアルキンタグ化したドーパミン化合物の合成に成功し、これらが

これまで用いられたプローブなどに比較して、化学的にドーパミンに非常に近い性質を持つことが分かった。これにより、低分子量生理活性物質の新たなタグ化に関する戦略を確立した。(B)により、実際にアルキンタグ・ドーパミンが神経細胞や脳組織において、ドーパミンと同様の挙動を示すこと、これらを高い感度で検出できることが分かり、ドーパミン類似プローブとしての有用性が示された。また、これらの解析により、タグ化生理活性物質の生理活性評価法なども確立した。(C)では、これまで生命科学研究ではあまり使われることのなかった SHG, SFG, CARS, SRS といった種々の非線形光学現象を利用した顕微鏡の応用を試み、これまで可視化できなかった分子や細胞構造の可視化に成功した。これにより、量子技術である多光子顕微鏡技術の生命科学研究への更なる応用を開拓した。最後に、(D)において、これら全ての結果を総合し、実際にアルキンタグ神経調節物質を定量的に検出できることを明らかにした。現在、このようにして確立した戦略と手法を用い、他の低分子量生理活性物質の解析を進めている。

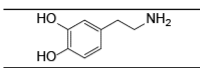
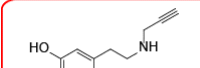
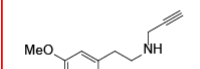
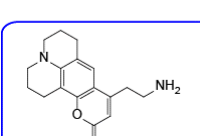
(2) 詳細

研究テーマ A: 化学情報伝達可視化のためのアルキンタグ神経調節物質の開発

まず、これまでサイズの小ささから蛍光色素によるタグ化などの手法により解析することができなかった低分子量化学情報伝達物質につき、可視化のための新たなタグ化を試みた。特に、近年他の生理活性物質への導入で有用性が示されてきた、ラマン活性を有し、クリック反応による特異的検出(後述)を可能とし、分子量 25 程度と非常に小さいアルキン基の導入を試みた。対象としては、脳内の最も重要な神経調節物質の一つであり、その不調がパーキンソン病の本態と考えられている、ドーパミンを最初の標的とした。

有機化学的合成により、多数の新規化合物であるアルキンタグ・ドーパミン化合物の合成に成功した。ここで、ドーパミンの生理活性に必要なカテコールアミン構造、その後の性能評価時、化学固定に必要なアミノ基を保持するため、アミノ基に一つのアルキン基を導入したアルキンタグ・ドーパミンが特に有用であることが明らかとなった。これにより、複数のアルキンタグ・ドーパミン化合物の開発に成功した。

次に、合成に成功した化合物群と元のドーパミンとの類似性を、化合物の官能基の特徴から評価した。Chemometrics 解析により化合物間の類似性を調べたところ、ドーパミン

Structure	Name	Molecular Weight	Tanimoto Index		LogP
			MACCS	Daylight	
	DA	153.18	1	1	-0.12
ATDA					
	MNPD	191.23	0.85	0.87	-0.16
	MNPOMD	219.78	0.65	0.68	0.44
Existing Fluorescent Probe					
	FFN511	284.36	0.43	0.33	1.28

の アミノ基に一つのプロパルギル基を導入した Mono-N-Propargyl Dopamine (MNPD) の化

学的な性質がドーパミンに非常に近いことが明らかとなった。この類似性は、これまでドーパミンの蛍光プローブとして用いられてきた既存のものに比べてはるかに高いもので、更にはドーパミン受容体への結合と活性が知られている種々の薬剤よりも高いことが明らかとなった。更に、アルキンタグの導入の効果を検証するため、生体内において行われるドーパミンの代謝、不活性化を模した、MNPDP のカテコール基にメチル基を導入した MNPOMD (Mono-N-Propargyl O-Methyl Dopamine)も開発し、やはり既存のプローブに比べてドーパミンに高い類似性を持つことが示された。ここから、化学的観点から、ドーパミンに非常に近いドーパミン・プローブが開発されたことが明らかとなった(上表)。

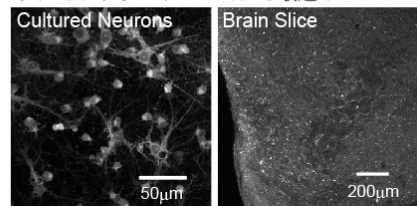
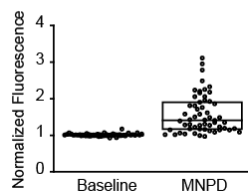
研究テーマ B: アルキンタグ神経調節物質のプローブとしての性能評価

次に、これらのプローブ分子が生体にとってもドーパミンと類似した性質を示し、プローブとして使用できるかどうかを、細胞を用いて検証した。特に、受容体への結合と活性化、そして細胞への取込みについて検証を行った。ドーパミンを投与すると、受容体活性化に伴う細胞内情報伝達の亢進により、細胞内cAMP の濃度上昇が見られた。ここで、MNPDP はドーパミン同様の受容体活性化を示したが、MNPOMD は活性を持たず、MNPDP のドーパミン類似性とそのメチル化による MNPOMD の活性消失が検証された。同様の活性は初代培養神経細胞でも確かめられ、神経細胞においてもアルキンタグ・ドーパミンがドーパミン同様の活性を持つことが示された(右図)。

アルキンタグ・ドーパミンの受容体活性化能および細胞への取込みの評価

培養細胞の受容体活性化能

培養細胞および急性脳スライスにおけるアルキンタグ・ドーパミンの取込み



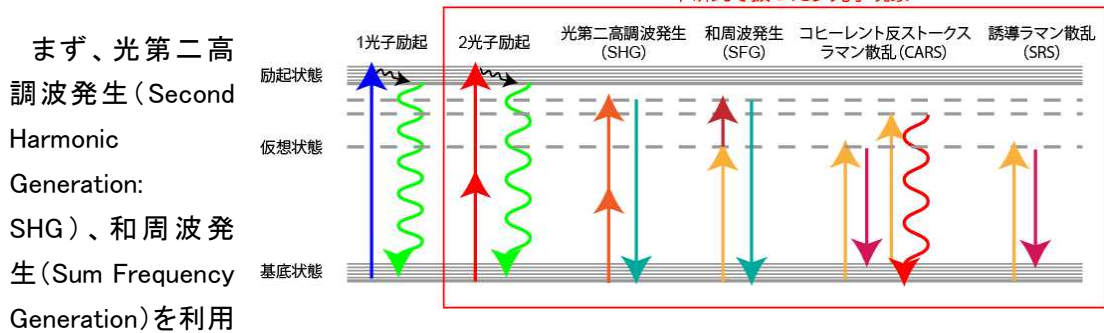
次に、脳内においてはドーパミンは積極的に細胞内に取り込まれることが知られているため、細胞内への取込みを検証した。取り込まれたアルキンタグ・ドーパミンの検出法として、クリック反応による蛍光検出を用いた。これは、生体に存在しないアルキン基とアジド基が、還元銅の存在下において、特異的に反応し、共有結合による環状構造を形成することを利用したものである。これを試みたところ、実際に、細胞内に取り込まれたアルキンタグ・ドーパミンを蛍光により検出することができることが分かった。更にこれは神経細胞でも確認され、特殊な検出試薬を用いたドーパミンそのものの可視化と併せ、アルキンタグ・ドーパミンがドーパミンと同様に取り込まれることが示された。最後に、これをマウスから調製した急性脳スライスにて行ったところ、アルキンタグ・ドーパミンが内在性のドーパミンと同様の局在を示して脳組織に取り込まれることが明らかとなった。これらの結果から、脳細胞・組織が内在性のドーパミンと同様にアルキンタグ・ドーパミンと反応し、取り込む、つまり、アルキンタグ・ドーパミンがドーパミンに極めて近い生物学的性質を持つプローブであることが示された。

研究テーマ C: マルチモダル多光子顕微鏡の開発と生命科学研究への応用

脳組織内における化学情報伝達の可視化には、組織透過性、高い時空間分解能、長期観測などが必要となる。通常の可視光を利用した顕微鏡技術ではこれらの達成が困難であるが、光の量子性に基づき近赤外領域の複数の光子と対象物質との相互作用を利用する多光

顕微鏡技術は、高い組織透過性、3次元的に高い空間分解能と感度、低侵襲性による長期観測などを実現する。ここで、非線形光学現象には蛍光分子の励起以外に多くのものがあるが、そのほとんどは生命科学研究で使われていない。これらは蛍光とは違う原理を持つため、もたらず知見も異なり、生命現象に新たな角度から光を当てることができると期待される。そこで本研究では、異なる原理に基づいた多数のモダリティの多光子現象を可視化する顕微鏡、マルチモダル多光子顕微鏡の生命科学研究への応用を図った(右図)。

本研究で扱った多光子現象



まず、光第二高調波発生 (Second Harmonic Generation: SHG)、和周波発生 (Sum Frequency Generation) を利用

することで、化学情報伝達物質放出、受容の場となる、細胞膜のイメージングを試みた。脂質二重膜は細胞表面のみならず細胞内に多く存在し、これらが非常に動的に融合・解離を繰り返すことから、細胞表面の細胞膜の特異的な観測は既存の手法では困難であった。これを克服するため、界面特異的な SHG、SFG と、蛍光を發さない新たな SHG 専用色素の利用による、細胞膜特異的イメージングを試み、これに成功した (Mizuguchi et al. 2018, 2020 など)。

次に、脳組織の7割強を占め、化学情報伝達を制御する可能性が示唆されながら、可視化による解析が困難であった水分子の解析を試みた。このため、分子の官能基そのものを検出するラマン散乱を利用したラマン散乱顕微鏡の利用を試みた。特に、通常の可視光を利用した自発ラマン散乱顕微鏡で問題となる時間分解能の低さと組織への低透過性を克服するため、多光子現象を利用したコヒーレントラマン散乱顕微鏡を用い、細胞内外の水分子の化学イメージングを試みた。ここから、このようなイメージングにより、生きた細胞内外における水のイメージングが可能になり、詳細の解析により水の状態の違い、更には薬剤投与時における水の状態の変化を捉えることに成功した (Nuriya et al. 2019)。

研究テーマD: A, B, C の統合によるアルキンタグ神経調節物質の脳組織内可視化解析

A により開発し、B により生理学的類似性を示したアルキンタグ・ドーパミンを、C により開発したマルチモダル多光子顕微鏡により可視化を図った。ここから、生体試料のラマン散乱シグナルが少ないサイレント領域において、アルキンタグ・ドーパミンが鮮明なラマンシグナルを發することが明らかとなった。また、溶液において非常に高い線形応答性も確認された。現在は C の顕微鏡開発・改良を更に推進し、生きた細胞・脳組織内における観測を進めている。

3. 今後の展開

本研究の展開としては、(1)ドーパミンの生命科学・医学研究の推進と、より一般的なものとして、(2)低分子量生理活性物質の可視化研究の推進、の二つがある。

まず(1)では、今回の研究により、これまでそのサイズの小ささからラベルして可視化することができなかったドーパミンについて、新たなプローブが開発されたことから、ドーパミンの研究の推進が期待される。例えば、パーキンソン病において脳内のドーパミンの量が減少することが知られており、治療薬としてはその前駆体の導入や代謝の阻害による補充療法が主となっている。このような、ドーパミンの量の調整をするような薬剤の解析、更には薬剤開発時の大規模スクリーニングなどにあたって、高い感度と安全性でドーパミンの動態を可視化できる本研究成果は非常に有用となると期待される。また、生理学的観点からは、ドーパミンの脳内での動態とその制御が、正常の脳機能の発現に重要な役割を果たすと考えられるが、これが可視化できるようになったことで、脳の機能発現に関する基礎的な理解へとつながる研究が推進されるものと期待される。

次に、より一般的なものとして、新たな手法の開発により、低分子量生理活性物質の可視化に関する今後の更なる展開が期待される。ドーパミンに限らず、ほとんどの神経伝達・調節物質はサイズが小さいため、可視化することができていない。このように、これまで見ることができなかった低分子量生理活性物質は数多くあり、そのような技術的な限界が研究の推進を阻んでいる。本研究により方法論が確立したことで、このような低分子量生理活性物質一般について、可視化、そしてそれによる研究の飛躍的な推進が可能になるものと期待される。

また、顕微鏡システムとして、マルチモダル多光子顕微鏡は非常に幅広い展開を持っていると期待される。これまで、生命科学研究における多光子顕微鏡の使用はほとんどが蛍光分子の2光子励起に限られてきた。一方、本研究により、光第二高調波発生(second harmonic generation: SHG)や和周波発生(sum frequency generation: SFG)、そしてコヒーレントラマン散乱であるコヒーレントアンチストークスラマン散乱(coherent anti-Stokes Raman scattering: CARS)や誘導ラマン散乱(stimulated Raman scattering: SRS)などが、生物学の立場から応用された。これらはそれぞれの原理に基づいて、蛍光励起とは別の情報を生命科学研究に与え、しかもそれらを同時に観察することで多面的な可視化を実現する。このような顕微鏡が生命科学研究に導入されることにより、生命科学研究が新たな強力な解析手法を手にし、推進されるものと期待される。

4. 自己評価

本研究の目的については、当初の目的の8割ほどが達成できたものと考えられる。つまり、かつてないプローブ分子を作り、その性質について統合的な評価を行い、同時にマルチモダル多光子顕微鏡技術の生命科学研究への応用を図る、という、個々の目標については全てが達成されたものと考えられる。一方、これらを統合しての脳組織内における直接的な情報伝達の可視化については、細胞レベルで検出ができたものの、まだ感度の問題などから実現できていない。これは要素技術が確立することによって初めて明らかとなった新たな課題であり、今後、この新たな課題を乗り越えて、脳組織における化学情報伝達の可視化を実現するための新たな展開研究の基盤が確立された。

波及効果については、十分なものが得られたと考えている。つまり、これまで生命科学研究においてサイズの小ささから観測できなかった生理・病態生理・薬理学に重要な対象物質に対し、それを可視化するための方法論が確立した。これを応用することで、生命科学研究一般に幅広い展開がもたらされるものと期待される。また、生命科学研究では多光子顕微鏡技術の応用が非常に限られてきたが、本研究は生命科学研究への応用を開拓することでその潜在能力を明らかにした。これらを踏まえ、生命科学研究に新たな解析手法が導入され、やはり、これまで見ることはできなかった現象の可視化研究、そしてそれにより新たな知見の獲得が期待される。

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: 8件

1. Mizuguchi T, Momotake A, Hishida M, Yasui M, Yamamoto Y, Saiki T and Nuriya M., “Multimodal multiphoton imaging of the lipid bilayer by dye-based sum-frequency generation and coherent anti-Stokes Raman scattering.”, (2020), *Analytical Chemistry*, 92(8):5656–5660.

この論文ではマルチモダル多光子顕微鏡の応用として、コヒーレントラマンによる脂質の直接可視化と細胞膜の SFG による同時検出を試みた。コヒーレントラマン散乱による脂質の可視化により、ラベルをすることなく生きた細胞内の脂質構造を可視化した。これに併せ、SHG 専用色素として開発した Ap3 の可視化を試みたところ、SFG により細胞膜を特異的に可視化できることが明らかとなった。これにより、化学情報伝達で鍵を握る、細胞膜への小胞の融合などのプロセス可視化への基盤が確立した。

2. Nuriya M, Yoneyama H, Takahashi K, Leproux P, Couderc V, Yasui M & Kano H. “Characterization of Intra/Extra-Cellular Water States Probed by Ultrabroadband Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Spectroscopic Imaging.”, (2019), *J Phys Chem A*, 123(17):3928–3934.

この論文では、コヒーレントラマン顕微鏡により細胞内外の水分子とその状態を直接可視化することを試みた。水分子は生体組織の約 7 割ほどの重量を占め、細胞・組織の機能の制御の鍵を握りながら、可視化が困難であった。この論文では、CARS 顕微鏡により生きた細胞において高い時空間分解能で水のラマン散乱スペクトルを取得できることを明らかにした。更に、細胞内外においてスペクトルの形状が異なること、それは水分子の状態、特に水素結合状態の違いを反映していることなどを明らかにした。

3. Mizuguchi T, Yasui M & Nuriya M., “High-resolution plasma membrane-selective imaging by second harmonic generation.”, (2018), *iScience*, 9: 359–366.

この論文では、光第二高調波発生 (Second Harmonic Generation: SHG) の細胞生物学研究への応用を試み、細胞膜の特異的可視化に成功した。これまで蛍光色素を用いた手法では細胞内に存在する脂質二重膜からも同様にシグナルが検出されるため、細胞表面

の細胞膜の特異的可視化は不可能であった。ここで特殊な発生条件を要する SHG を利用することで細胞膜のみの可視化、更に同時に細胞内の細胞骨格などの 2 光子励起による可視化が可能となり、広く細胞生物学に応用できる手法が確立された。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件(特許公開前のものも含む)

(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)

第 27 回日本バイオイメーjing学会 シンポジウム(2018 年) 招待講演
「マルチモダル多光子顕微鏡のバイオイメーjingへの応用」

第 44 回日本微小循環学会総会 シンポジウム(2019 年) 招待講演
「組織内の溶媒・溶質動態の可視化」

第 6 回国際バイオイメーjingシンポジウム・第 28 回 日本バイオイメーjing学会学術集
会(2019 年) 招待講演
「Multimodal multiphoton imaging of solutes and solvents in the brain tissue」

第 2 回アクアフォトミクス研究会(2019 年) 招待講演
「Coherent Anti-Stokes Raman (CARS) 顕微鏡による生細胞・組織内外の水分子の可視化
解析」

日本分光学会 第 56 回 秋期セミナー(2020 年) 招待講演
「非線形光学顕微鏡～SHG 顕微鏡～」