

論文の内容の要旨

論文題目 線虫の神経活動の光制御を実現する長波長光でアンケージ可能な新規ケージド化合物の開発

氏名 高橋 光規

研究の背景と目的

近年、ケージド化合物、光スイッチング分子、光遺伝学などのように光に応答する分子を用いることで細胞や動物個体内での分子レベルの現象を制御する実験技術が広く用いられるようになった。このうち、ケージド化合物は、ケージ基と呼ばれる光分解性保護基によって化学修飾され、生理活性が低下した分子である。光照射によってケージ基が脱離し活性が回復する（アンケージと呼ぶ）ため、光照射した部位でのみ刺激を与えることができる。これまでに開発されたケージド化合物は、アンケージに細胞毒性の高い波長 300 ~ 400 nm の紫外光を必要とするものが大部分であり、波長 500 nm 以上の可視光でアンケージ可能なケージド化合物は数少ない。

本研究では、550 nm 以上の可視光でアンケージできるケージド化合物を開発し、線虫 *C. elegans* の神経活動を光制御することを目指す。線虫は、体が透明であることから光を用いた実験技術と組み合わせやすく、神経科学のモデル生物として多くの利点を持つ。一方、線虫は波長 300 ~ 500 nm の紫外光～青色光に対して、先天的な光忌避反応を示すため、光制御技術を用いた神経機能解析が正確にできない恐れがある。そこで、本研究では波長 550 nm 以上の光でアンケージでき、生理活性物質の放出速度が速い新規ケージド化合物を開発し、線虫の神経活動の光制御を試みた。また緑色蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質 GCaMP6s を用いて、神経活動の同時記録を行った。

結果

新規ケージド化合物の開発は、以前当研究室で開発した 4-aryloxy BODIPY ケージド化合物を長波長化することで行った。4-Aryloxy BODIPY ケージド化合物は、蛍光色素 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY のホウ素原子にフェノール誘導体（アリルオキシ基）を導入したものであり、波長 500 nm の光照射により 4 位 B-O 結合が開裂しフェノール誘導体が放出される。このアンケージ反応は、アリルオキシ基から蛍光団への photo-induced electron transfer (PeT) により生じる電荷分離状態を経て進行すると考えられており、導入するフェノール誘導体の HOMO エネルギーレベルを最適化し PeT 効率を調整することで、高いアンケージ効率を

実現できる.

本研究では、580 nm の光で励起可能な長波長 BODIPY 誘導体である KFL-1 をケージ基として利用できないか検討した. はじめに、KFL-1 でも同様のアンケージ反応が起こるか、またどの程度の HOMO エネルギーレベルを有するフェノール誘導体を導入した際にアンケージ反応が効率よく起こるかを検討すべく、KFL-1 のホウ素に HOMO エネルギーレベルの異なる 4 種類のフェノール誘導体を導入した aryloxy KFL-1 を合成した. Aryloxy KFL-1 は導入したフェノール誘導体の HOMO エネルギーレベルが高いほど蛍光量子収率が低く、PeT による消光が起こっていることが確かめられた. 続いて、これらの KFL-1 誘導体に 580 nm の光照射を行い、アンケージ反応が進むかどうかを分析したところ、導入するフェノール誘導体の HOMO エネルギーレベルが -0.2 hartree 付近でアンケージ量子収率が最大となることが分かった.

線虫の神経活動を光制御するため、唐辛子の辛み成分であるカプサイシンとそのイオンチャネル共役型受容体 TRPV1 を利用することとした. カプサイシンは、フェノール類似構造からアミドリンカーを介して脂肪鎖が伸びた構造をしており、その HOMO エネルギーレベルは -0.204 hartree であるため高いアンケージ効率が期待される. ケージド化にあたっては、カプサイシンと同等の活性を持ち、高純度な市販品が安価に手に入るカプサイシン誘導体 *N*-vanillylnonanamide (VN) を用いることとした.

VN のフェノール性水酸基を KFL-1 ケージ基で保護した KFL-VN は、最大吸収波長が 577 nm であり、580 nm の光を照射して LC/MS で分析したところ、光分解して VN が放出されることが確かめられた. 光反応における VN の化学収率は 40%程度となった.

KFL-VN を生きた状態の線虫に適用し、神経活動の光制御を行うにあたり、線虫頭部に存在する感覚神経 ASH に注目することとした. まず、餌である大腸菌に KFL-VN を混合して線虫に取り込ませ、KFL-1 に由来する蛍光を観察することで KFL-VN の局在を観察したところ、口腔、咽頭、腸管といった消化管に分布が認められた. 次に、ASH の神経活動を観察するため、ASH に TRPV1 を発現した線虫株 *kyIs200 X* および野生株に対し、*sra-6* プロモーター下に GCaMP6s を配置したプラスミドをマイクロインジェクションして、ASH に GCaMP6s を発現する線虫株を作製した. これらの線虫株に KFL-VN を与え、共焦点蛍光顕微鏡を用いて GCaMP6s の蛍光変化を観察しながら、565, 575, 585 nm の混合レーザーを照射しアンケージを試みた. 線虫の頭部全体に光照射したところ、TRPV1 発現株では、光照射に応じて ASH 内の Ca^{2+} 濃度上昇が観察された. 一方、対照群では光照射しても ASH の Ca^{2+} 濃度に変化は見られなかった.

最後に、KFL-VN を用いて線虫行動の光制御を行った。線虫は、嫌悪刺激に出会うと ASH が活性化し、前進停止・後退・方向転換という一連の回避行動を示す。そこで、ASH に TRPV1 を発現した株と野生株それぞれに KFL-VN を投与し、実体顕微鏡下で線虫の行動を撮影しながら 545-580 nm の光照射を行い、嫌悪刺激の模倣を試みた。光照射すると、TRPV1 発現株は一連の回避行動を示したが、野生株は行動変化を示さず前進を続けた。

結論

本研究では、長波長 BODIPY 骨格蛍光色素 KFL-1 を母核として KFL-1 ケージド化合物の開発に成功した。具体的な化合物として KFL-VN を開発し、ASH に TRPV1 を発現した線虫において光忌避反応を惹起しない 580 nm 前後の光でアンケージし神経活動を光制御できること、また、GCaMP6s と併用してイメージングすることで神経活動の同時記録ができることを示した。さらに、自由行動中の線虫に KFL-VN を適用することで、嫌悪刺激による ASH の活性化を模倣し、個体の行動までも光制御できることを示した。

今後、本研究で開発した手法を用いて、動き回る線虫において青色光忌避反応を惹起することなく神経活動の光制御と記録を同時に行うことも可能であると考えられる。また、4-aryloxy BODIPY ケージド化合物と aryloxy KFL-1 ケージド化合物を組み合わせることにより、500 nm および 580 nm の 2 色の光で、独立して異なる生理活性物質をアンケージし細胞機能を制御することもできると期待される。