

審査の結果の要旨

氏名 高橋 光規

本研究は、光を用いて神経活動を制御し神経機能の解析を行う手法を確立するため、有機合成化学により波長 550 nm 以上の光で 1 光子励起できる新規の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および光学的に神経活動を記録することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 緑色蛍光色素 BODIPY の π 共役系を拡張した KFL-1 のホウ素原子に様々なフェノール誘導体を導入した化合物が波長 580 nm の光で励起可能なケージド化合物として機能することを示した。これら KFL-1 ケージド化合物の光化学特性を明らかにするため、吸収・蛍光スペクトル測定、蛍光量子収率測定、光照射後の HPLC 分析を行った。KFL-1 ケージド化合物は、波長 580 nm 付近に最大吸収波長を持ち、500 nm 以下の波長域には吸収を持たないこと、また、導入するフェノールの HOMO エネルギーレベルが高いほど蛍光量子収率が低く、フェノールの 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示された。
2. イオンチャネル共役型受容体 TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンのフェノール性水酸基に 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY ケージ基を導入すると、カプサイシン活性が 100 分の 1 に低下することを示した。また、BODIPY ケージドカプサイシンを、TRPV1 を発現させた培養細胞に適用し 514 nm のレーザー光を照射すると、BODIPY ケージドカプサイシンのアンケージによって放出されたカプサイシンが細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こすことを示した。
3. カプサイシン誘導体である *N*-vanillylnonanamide (VN) のフェノール性水酸基を KFL-1 ケージ基によって保護し、KFL-1 ケージド *N*-vanillylnonanamide (KFL-VN) を合成した。KFL-VN に 580 nm の光を照射し光反応後の溶液を LC/MS で分析したところ、KFL-VN がアンケージされて VN が放出され、最終的な VN の化学収率は 40% 程度となることが示された。
4. 野生型線虫株および ASH 感覚神経に TRPV1 を発現した線虫株に対しプラスミドマイクロインジェクションを行い、ASH 感覚神経に緑色蛍光 Ca^{2+} センサータンパク質 GCaMP6s を発現した線虫株を作製した。KFL-VN を餌である大腸菌に混ぜてこれら線虫株に投与し KFL-VN の蛍光観察を行ったところ、KFL-VN は消化管に局在することが示された。線虫に麻酔を施し、共焦点レーザー顕微鏡により GCaMP6s の蛍光観察と KFL-VN のアンケージを同時に行ったところ、KFL-VN のアンケージによって VN が放出され、TRPV1 を介して ASH 内に Ca^{2+} が流入することが示された。

5. 野生型線虫株および ASH に TRPV1 を発現した線虫株に KFL-VN を投与し，蛍光実体顕微鏡下でアンケージと行動観察を行ったところ，野生株は光照射に応答しなかったが，TRPV1 発現株は光照射に応答し，KFL-VN のアンケージによって ASH を介した嫌悪刺激を模倣できることが示された。

以上，本論文は波長 580 nm の光でアンケージ可能な KFL-1 ケージド化合物を開発し線虫 *C. elegans* に適用することで，光による神経活動の活性化および行動の光制御が可能であることを示した。本研究で開発された手法は，動き回る線虫の神経活動を光制御し，同時に行動と神経活動を記録する実験系の構築を可能にするものであり，神経活動と行動の対応関係を明らかにする神経科学研究に重要な貢献をなすと考えられ，学位の授与に値するものと考えられる。