

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16291

研究課題名（和文）新規ケージド化合物を用いた線虫のオールオプティカル神経行動解析法の開発

研究課題名（英文）Development of an all-optical neurophysiological method by using novel caged compounds

研究代表者

高橋 光規 (Takahashi, Hironori)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：30788922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経活動と動物行動を対応づけるため、黄色光で使用可能な新規のケージドカプサイシンを用いて、線虫 *C. elegans* の神経活動を光で制御するとともに、Ca<sup>2+</sup>センサー GCaMP6s を用いて神経活動を記録する方法の開発を目指した。感覚神経・運動神経・介在神経・筋肉の各種細胞に、カプサイシン受容体 TRPV1 と GCaMP6s を発現した線虫株を作製し、GCaMP6s の蛍光を観察しながら黄色光を照射した。光照射によって GCaMP6s の蛍光は上昇し、回避行動・産卵行動・筋収縮など、各細胞機能に対応した行動を引き起こすことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自に開発した新規ケージド化合物を活用することによって、線虫の神経活動の人工操作と記録をすべて光学的に行い、線虫の神経活動と行動を対応づける手法を開発した。これは、神経回路の活動と行動を非侵襲的に直接結びつけることを可能とするもので、神経科学分野に新しい実験法を提供し、その発展に寄与できると期待される。また、神経回路機能の解析が光学顕微鏡下で容易に行えるため、本手法を活用することで神経伝達の障害から生じる神経・精神疾患、記憶学習障害などのメカニズム解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To explore the relationship between neural activity and behavior, we aimed to develop the neurophysiological method that enables simultaneous optical manipulation and recording of neuronal activity in the nematode *Caenorhabditis (C.) elegans* by using yellow-light-activatable caged capsaicin. We created worm strains expressing TRPV1 and GCaMP6s in neurons and body wall muscles. Uncaging by yellow light with simultaneous monitoring of neuronal activity using GCaMP6s demonstrated that the uncaging triggers responses in sensory neurons, motor neurons, interneurons, and body wall muscles that are associated with behavioral changes of *C. elegans*.

研究分野：神経科学

キーワード：ケージド化合物 線虫 カルシウムイメージング 光制御 *C. elegans* 神経活動制御

## 1. 研究開始当初の背景

神経活動が動物の行動とどのように対応しているかを明らかにすることは、神経科学分野の重要課題である。線虫 *C. elegans* は、体が透明で体長が 1 mm 程度と小さいため、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  センサー GCaMP を用いた光学イメージングが容易に行えるなど、上記課題の達成に有用なモデル生物である。近年では、光で開口するイオンチャネル・チャンネルロドプシンを用いて神経活動を制御する光遺伝学によって、神経活動の活性化と線虫行動を直接結びつける技術も開発された。線虫と光遺伝学を組み合わせれば、神経活動と行動の対応関係を明らかにできると期待されるが、いくつかの課題が残されている。線虫は、光遺伝学ツールの駆動に必要な青色光を忌避する性質があるため、野生型線虫ではなく光忌避反応を示さない変異体 *lite-1* を用いるか (*Nat Methods* 12, 891-896, 2009)、線虫が忌避反応を示さない赤色光で駆動する光遺伝学ツールを用いる必要がある (*Nat Neurosci* 16, 1499-1508, 2013)。しかし、*lite-1* 変異体は不健康で行動異常が見られ、野生型の完全な代替とはならない。また、光遺伝学では励起スペクトルの重複という光学的な問題のため、GCaMP と同時に用いると、GCaMP の励起光で光遺伝学ツールが活性化してしまい、本来の神経活動に干渉してしまう。ゆえに、自由に動き回る線虫の行動と神経活動を記録しながら、同時に光を用いて神経活動を制御するという実験系を組み立てることは難しかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、自由に動き回る線虫において光忌避反応を惹起することのない長波長の光で神経活動を制御し、同時に GCaMP を用いて神経活動を記録する手法の開発を目指す。さらに、この手法を用いて線虫の逃避行動を制御する神経回路の活動と行動を対応づけることを目指す。

## 3. 研究の方法

線虫の神経活動を光によって活性化するため、有機合成化学の手法によって開発したケージド化合物・ケージドカプサイシンを用いた。この化合物は、黄色光を照射すると、唐辛子の辛み成分であるカプサイシンを放出する。野生型の線虫は、カプサイシンを与えても応答を示すことはないが、特定の神経細胞にカプサイシンの受容体 TRPV1 を発現する遺伝子組み換え線虫株を作製することによって、カプサイシンによる神経細胞の活性化を目指した。また、同時に  $\text{Ca}^{2+}$  センサー GCaMP6s を神経細胞に発現させることにより、神経活動の可視化を試みた。

GCaMP6s の蛍光観察を行うためには、動き回る線虫を顕微鏡の視野内に留める必要がある。そこで、PDMS 樹脂性のチップに微小な流路を備えたマイクロ流路デバイスを作製し、線虫の行動を制限することを試みた。

GCaMP6s の蛍光観察とケージドカプサイシンの励起を同時に行うため、緑色蛍光観察および黄色光の照射を行う 2 つの光路を備えた顕微鏡を構築した。

## 4. 研究成果

### (1) 感覚神経 ASH の光制御

$\text{Ca}^{2+}$  センサー GCaMP6s とカプサイシン受容体 TRPV1 を感覚神経 ASH に発現した遺伝子組み換え線虫を作製し、マイクロ流路内で動きを制限しながら ASH の光活性化を試みた。ケージドカプサイシンは、線虫の餌である大腸菌 OP50 に混ぜて与えた。GCaMP6s の蛍光を記録しながら、黄色光を照射したところ、ASH に発現した GCaMP6s の蛍光が上昇し神経細胞が活性化した (図 1A)。各種の対照群では ASH の活性化は見られなかったため、ケージド化合物への光照射特異的な応答であることを確認した (図 1B)。また、複数回光照射したところ神経細胞を複数回活性化できたが、刺激回数が増すにつれて、応答は低下していった (図 1C)。これは、TRPV1 の脱感作が起きているものと考えられる。

また、寒天プレート上で自由に動き回る線虫の感覚神経 ASH を光刺激したところ、後退運動を引き起こすことにも成功した。

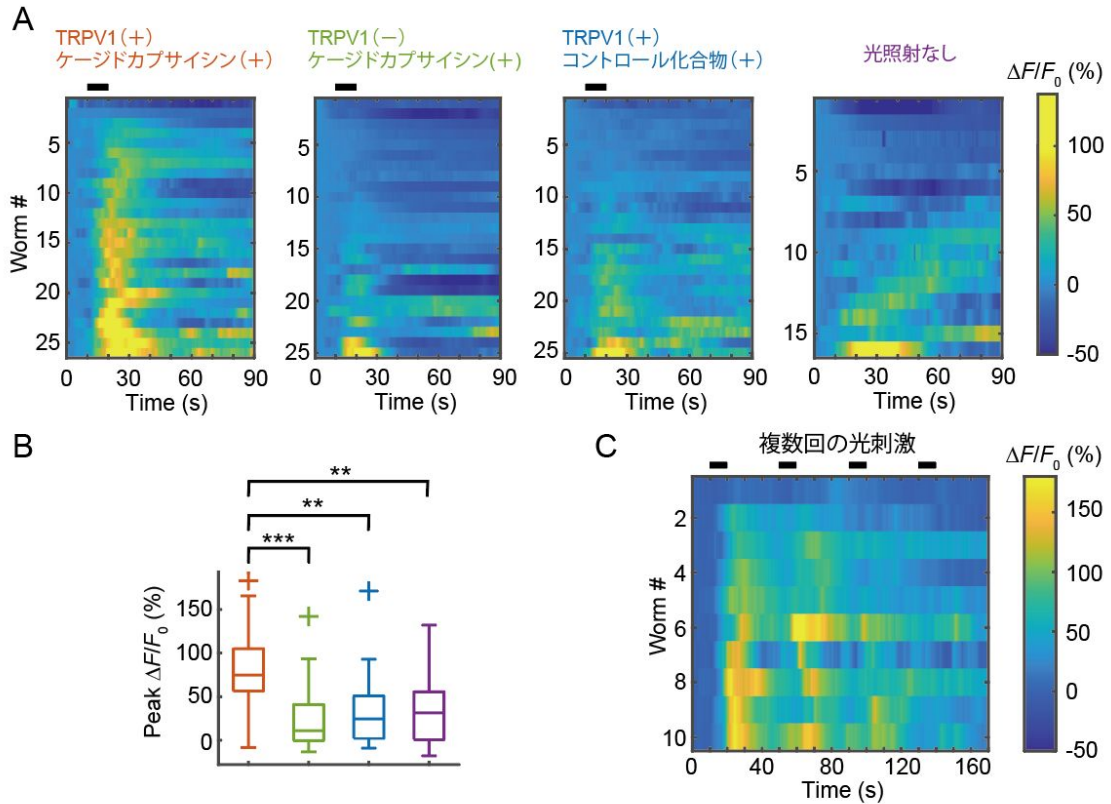


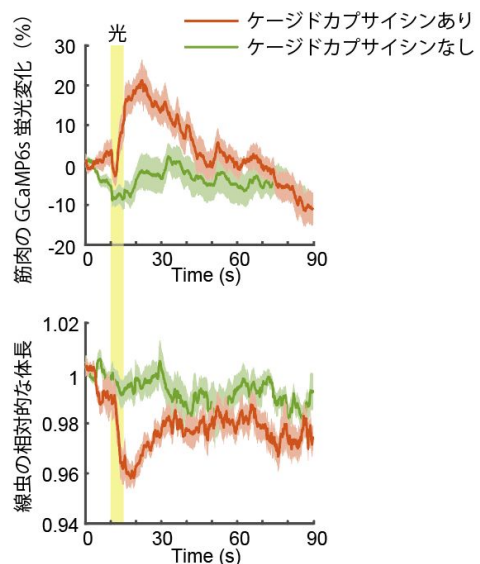
図 1 (A) ASH に発現した GCaMP6s の蛍光変化をカラーマップとして表示した。カラーマップ上の黒線は光照射のタイミングを表す。(B) A における蛍光変化の最大値を定量した。(C) 複数回光刺激した際の、ASH の応答をカラーマップで表示した。黒線は光照射のタイミングを表す。

## (2) 筋細胞の光制御

線虫の体壁筋に TRPV1 と GCaMP6s を発現した線虫株を作製し、光による筋収縮を試みた。線虫の筋収縮を観察するため、マイクロ流路中で  $Ca^{2+}$  イメージングと体長変化を同時にイメージングした。線虫にケージドカプサイシンを与え、黄色光を照射したところ、筋細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、筋収縮が引き起こされた(図 2)。



図 2 (上図) 線虫の筋肉に TRPV1 と GCaMP6s を発現させた。(右図) 光照射によって筋肉内の GCaMP6s の蛍光が上昇し、筋収縮によって相対体長が減少した。



### (3) 運動神経の光制御

運動神経 HSN に TRPV1 と GCaMP6s を発現した線虫株を作製し、黄色光照射によって HSN を活性化することを試みた。線虫をマイクロ流路に入れ、20 倍の対物レンズで撮影することで HSN の神経活動および線虫の行動を同時にイメージングした。ケージドカプサイシンを与え黄色光を照射したところ、HSN に発現した GCaMP6s の蛍光が上昇した。同時に、光照射中に卵を産む行動が観察された (図 3)。

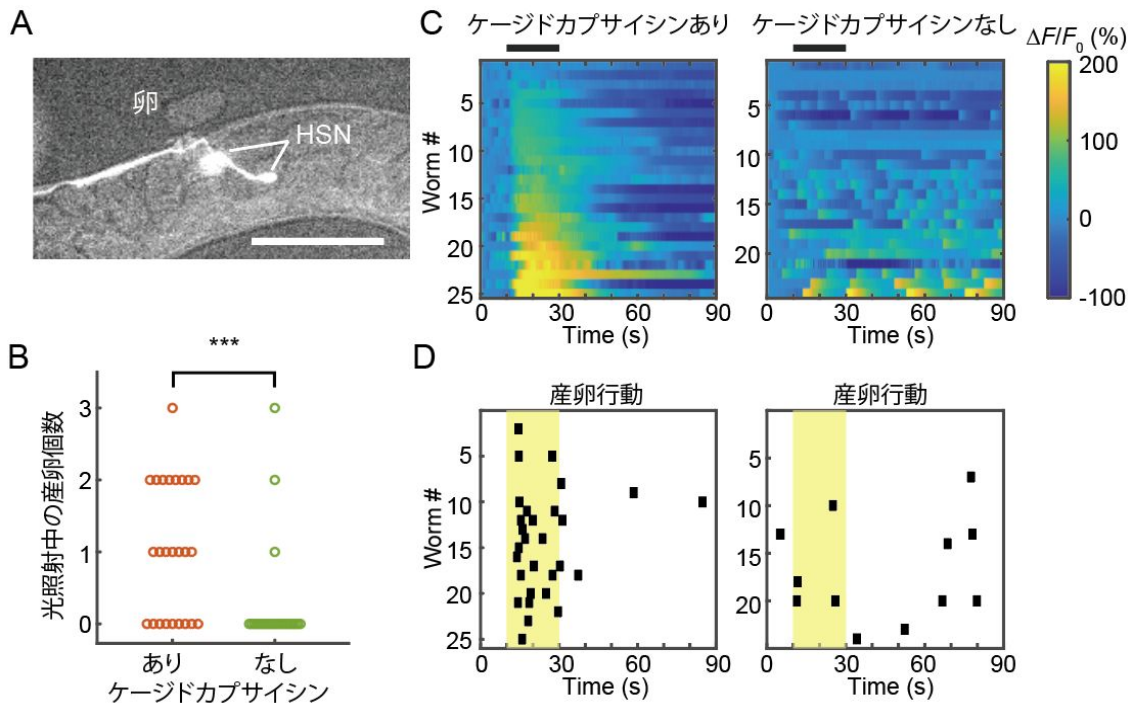


図 3 (A) TRPV1 と GCaMP6s を発現した運動神経 HSN. (B) 光照射中の産卵個数. (C) HSN に発現した GCaMP6s の蛍光変化をカラーマップで表示した。カラーマップ上の黒線は、光照射のタイミングを表す。(D) 産卵行動が起こった時間に黒点をプロットした。黄色でハイライトした部分は、光照射を表す (C のカラーマップと対応する)。

### (4) 介在神経の光制御

介在神経 RIM または AVA に TRPV1 と GCaMP6s を発現した線虫株を作製し、ケージドカプサイシンを与えて、マイクロ流路中で  $Ca^{2+}$  イメージングをしながら黄色光の照射を行った。光照射によって GCaMP6s の蛍光が上昇し、RIM または AVA の活性化が確認された。

(1) ~ (4) 以外にも、介在神経 PVQ, GLR 細胞の活動を光で制御することができた。以上のことから、ケージドカプサイシンを用いることで、線虫の運動制御に関わる感覚神経・運動神経・介在神経・筋肉という各種の細胞の活性を光で活性化し、同時に GCaMP6s によってその活動を可視化することに成功した。本研究によって開発された手法は、神経活動と動物行動を対応づける技術の発展に大きく寄与すると期待される。この成果は、国際学術誌に論文として発表された (*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, **118** (6) e2009634118)。

### (5) 線虫の逃避行動解析のためのセットアップ開発

顕微鏡下で線虫の自由な行動を観察するため、直径 200  $\mu\text{m}$ 、高さ 70  $\mu\text{m}$ 、間隔 100  $\mu\text{m}$  の円形ピラーを備えたマイクロ流路を開発し、低倍のレンズで線虫の  $Ca^{2+}$  イメージングを実施した。これにより、線虫の逃避行動と神経活動変化を対応づけることが可能になった。しかし、ここへケージドカプサイシンの活性化のために黄色光を照射すると、GCaMP6s の蛍光観察チャンネルに光が漏れ込み、GCaMP6s の蛍光変化を定量する妨げになることが判明した。解析ソフトウェア MATLAB を用いた画像解析によりこの光の漏れ込みを補正することも試みたが、研究期間内には達成できなかった。今後は、黄色光の漏れ込みを抑制するために、黄色光を遮るフィルターを光路に挿入するか、または、黄色光の入射光路を変更して対応する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Hironori, Kamiya Mako, Kawatani Minoru, Umezawa Keitaro, Ukita Yoshiaki, Niwa Shinsuke, Oda Toshiyuki, Urano Yasuteru	4. 巻 118
2. 論文標題 Neural and behavioral control in Caenorhabditis elegans by a yellow-light activatable caged compound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2009634118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2009634118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋光規、神谷真子、河谷稔、梅澤啓太郎、丹羽伸介、小田賢幸、浦野泰照
2. 発表標題 ケージド化合物を用いた黄色光による線虫神経細胞と行動の光制御
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋光規、神谷真子、河谷稔、梅澤啓太郎、丹羽伸介、浮田芳昭、浦野泰照、小田賢幸
2. 発表標題 Functional and structural approaches by photon and electron in neurobiology of C. elegans
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋光規、神谷真子、河谷稔、梅澤啓太郎、丹羽伸介、浦野泰照、小田賢幸
2. 発表標題 光子と電子による神経機能と構造の解析
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------