

化学遺伝学ツール DREADD の小型化に成功

—「一度で二度おいしい」神経活動操作新技術の開発へ—

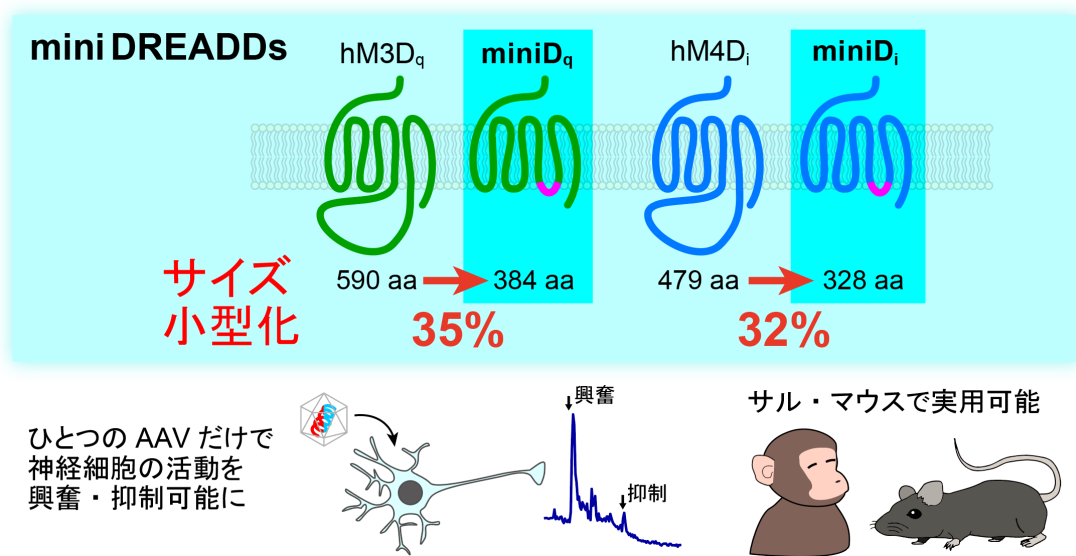
概要

三宅崇仁 薬学研究科助教、田中香帆 同学部学生、井上汐月 同修士課程学生（研究当時）、土居雅夫 同教授 のグループは、化学遺伝学ツール DREADD の小型化に成功しました。

今日の神経科学分野では、脳にある特定の神経細胞の活動を人の手で外から操ることによって、脳のどの神経細胞がどのような生命現象に責任を果たすのかを明らかにしようとしています。神経細胞の活動を操作するためには、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて、脳に神経活動操作用の分子ツールを入れ込む必要があります。しかし、AAV はとても小さいウイルスであるため、積み込むことのできる分子ツールのサイズ容量が小さいという弱点がありました。そのため、1つひとつの神経細胞の機能を真に明らかにするにも、AAV には興奮または抑制どちらか専用の分子ツール1つしか積み込むことができず、同一の神経細胞を興奮/抑制して機能を調べるといった研究は、原理的に不可能でした。

本研究では、分子ツールのひとつ DREADD について、従来使われていたツールの小型化（30%以上のサイズ縮小）を行いました。小型化した興奮用 DREADD を既存の抑制用 DREADD とともに1つの AAV に組み込むことにより、マウス脳内での同一神経細胞の人為的な興奮/抑制を実現しました。開発した小型 DREADD は、カニクイザルでも使用可能であることから、今後の神経科学分野の発展に大きく貢献することが期待されます。

本研究成果は、2024年10月21日に国際学術誌「*Cell Reports Methods*」にオンライン掲載されました。



miniDREADDs の概要とその利点を生かした神経科学への応用

1. 背景

今日の神経科学分野では、動物の脳にある特定の神経細胞の活動を人の手で外から操り、それにより表れる動物の生理機能や活動の変化を調べることによって、脳のどの神経細胞がどのような生理現象に関わるのかを明らかにしようとしています。現在、特定の神経細胞の活動を人為的に操る主要な方法として、光を用いる方法（光遺伝学）と化合物を用いる方法（化学遺伝学）の2つが知られています。このうち化学遺伝学的手法では、Gタンパク質共役受容体(GPCR)*1に遺伝子変異を加え、本来の内因性リガンドには応答せず、人工的に作られたリガンド（デザイナードラッグ）によってのみ活性化するようにデザインされた Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs（DREADD）が用いられます。特に、ヒトのムスカリン性アセチルコリン受容体を人為的に改変した hM3D_q および hM4D_i は、それぞれ、神経細胞を興奮・抑制するためのツールとして世界中で広く使われています（図1）。化学遺伝学的手法は、光照射を伴う限局的な神経活動操作を得意とする光遺伝学とは対照的に、広範な脳領域に存在する神経細胞の活動を制御することを得意としており、特にサルなど脳の大きい大型動物を用いた研究においては必要不可欠な技術です。

動物脳への化学遺伝学ツールの導入には、アデノ随伴ウイルス（AAV）と呼ばれるウイルスベクターがよく用いられます。AAVは他のウイルスベクターとは異なり、免疫原性が低く、神経細胞に高効率に感染し、導入遺伝子の発現を長期にわたり誘導できることから、神経科学分野において広く使われています。しかし、AAVの運ぶことのできる遺伝子サイズは約4.7 kbと小さく、このことが遺伝学ツールを脳に導入する際の足かせとなっていました。特に、神経活動を興奮・抑制させるために、興奮用・抑制用の2つのDREADDを1つのAAVに組み込むことは非常に難しいのが現状でした。

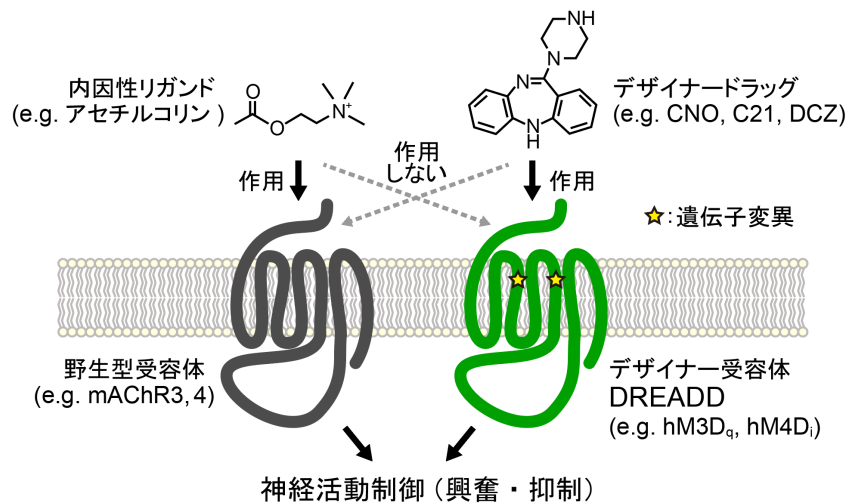


図1. 化学遺伝学による神経活動操作に必要な不可欠な DREADD

2. 研究手法・成果

私たちは、hM3D_q および hM4D_i には、非常に長い細胞内第3ループ領域（intracellular loop 3, ICL3）があることに気がつきました（それぞれ、211 アミノ酸長と、156 アミノ酸長）。GPCR のデータベースである GPCRdb によれば、class-A と呼ばれる GPCR 群（312 種類）の中で、hM3D_q は1番目、hM4D_i は5番目に長い ICL3 をもつ GPCR でした（図2）。そこで私たちは、この ICL3 を5アミノ酸からなる配列に置換することで、hM3D_q および hM4D_i の小型化を行いました（それぞれ miniD_q および miniD_i）（図2）。作製した miniD_q および miniD_i を培養細胞に発現させ、その細胞内分布を観察したところ、miniD_q/miniD_i は

hM3D_q/hM4D_iと同じように、細胞膜に局在することがわかりました (図2)。また miniD_q/miniD_iの GPCR 機能について評価したところ、デザイナードラッグ選択性/感受性、細胞内 Ca²⁺濃度変化、細胞内 cAMP 濃度変化、ERK リン酸化誘導など、検討した全項目において、miniD_q/miniD_iは hM3D_q/hM4D_iと同等の機能を有することがわかりました。これらの結果より、miniD_q/miniD_iは、従来の hM3D_q/hM4D_iの機能を引き継ぎつつ、サイズだけが圧縮された (~30%のサイズダウン) DREADD であることが明らかになりました。

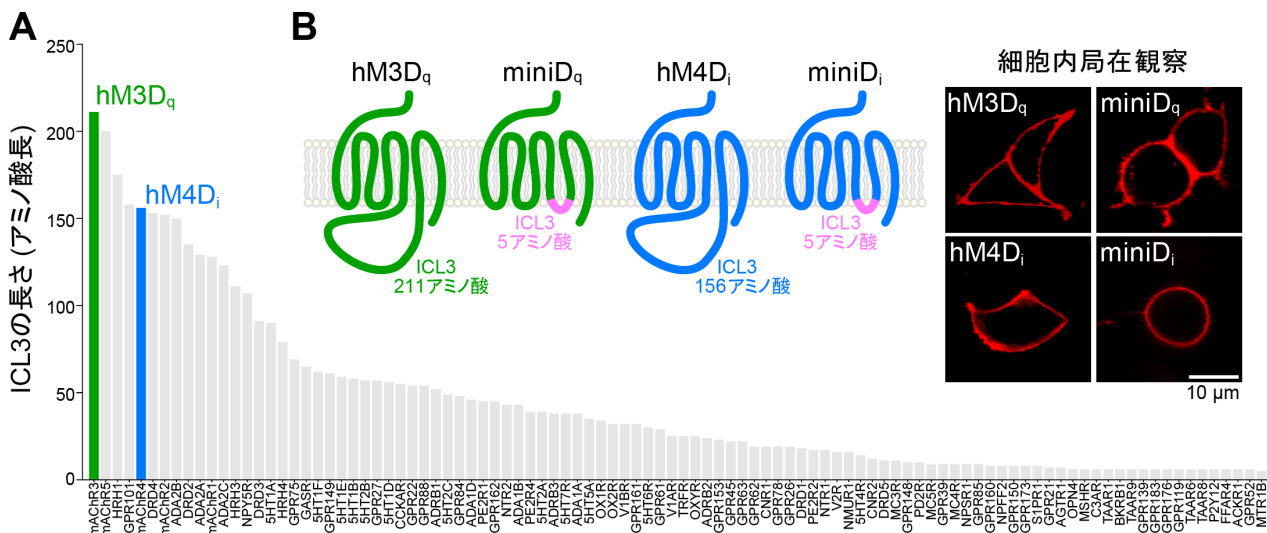


図2. A) クラス-A GPCRのICL3長さ比較図. B) 今回作製した miniD_q/miniD_iの模式図と細胞内局在.

作出した miniD_q/miniD_iの動物脳内での機能を確認するために、私たちは miniD_q/miniD_iを AAV に組み込み、それをマウスの視床下部背内側核背側 (dorsal part of the dorsomedial hypothalamus, DMD) に感染させました。DMD は動物体温制御に重要な脳部位とされています。用意したマウスに DREADD アゴニストを投与すると、予想通り、miniD_q感染マウスでは体温上昇が、miniD_i感染マウスでは体温低下が、それぞれ観察されました (次頁図3)。

DREADD の有用性はサル等の大きな脳を持つ動物においてより高まります。そこで私たちは、カンクイザルの脳に miniD_q/miniD_i/hM3D_q/hM4D_iを発現させる4種類の AAV を感染させました。放射性標識を施した DREADD アゴニストをサルに投与したのち、脳内の放射性化合物の所在を可視化できる PET 技術*2を用いて、アゴニストの脳内分布を調べると、miniD_q/miniD_i/hM3D_q/hM4D_iの発現した場所にアゴニストが集積する様子を観察することに成功しました (図3)。さらに、糖代謝を指標とした PET による神経活動イメージングを行ったところ、DREADD アゴニスト投与に伴い、miniD_q/hM3D_qを発現した脳部位の神経活動が増加することもわかりました (図3)。これらの結果より、miniD_q/miniD_iはマウス・サルの脳において、hM3D_q/hM4D_iと同じように機能することがわかりました。

DREADD を小型化したことによる利点は、1つの AAV に2種類以上の遺伝学的ツールを組み込むことによって、神経細胞の活動を複雑に制御することが可能になることです。私たちはこのことを実証するために、神経細胞を興奮させる miniD_qと抑制する KORD*3を、ひとつの AAV に組み込みました (図4)。この AAV をマウス初代培養神経細胞に感染させ、その活動を Ca²⁺イメージング法で評価すると、miniD_q活性化に伴い細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を示したすべての細胞において、KORD 活性化に伴う Ca²⁺濃度低下が観察されました (図4)。さらに、同一 AAV をマウス脳 DMD に感染させ、miniD_q・KORD のアゴニストを投与したところ、

同一マウス個体において、miniD_q 活性化に伴い体温が上昇し、KORD 活性化に伴い体温が低下することがわかりました (図4)。つまり、DREADD を小型化したことによって、動物脳にある神経細胞を1つの AAV で複雑に制御することに成功しました。

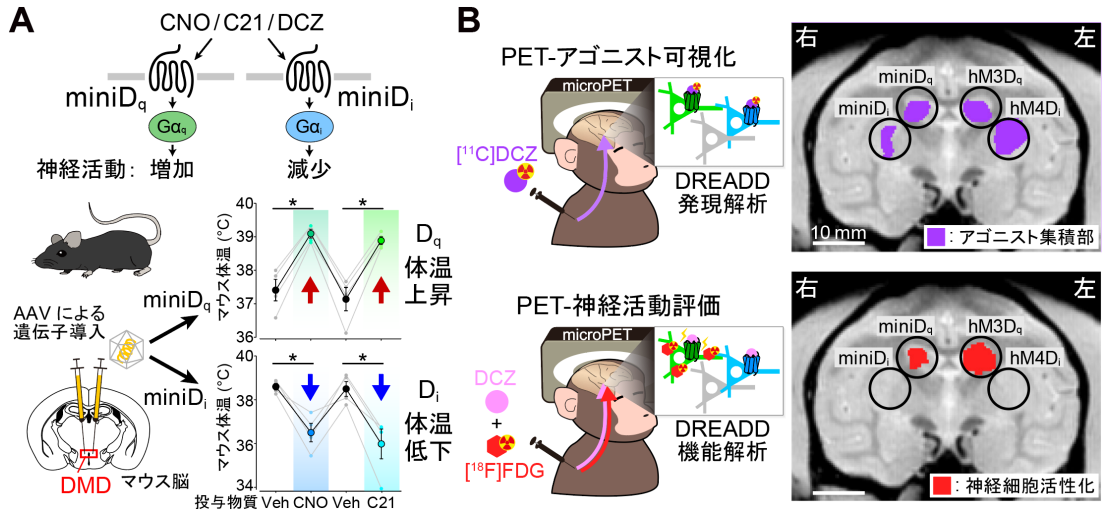


図 3. A) マウス脳および B) カニクイザル脳を用いた miniD_q/miniD_i の機能解析。

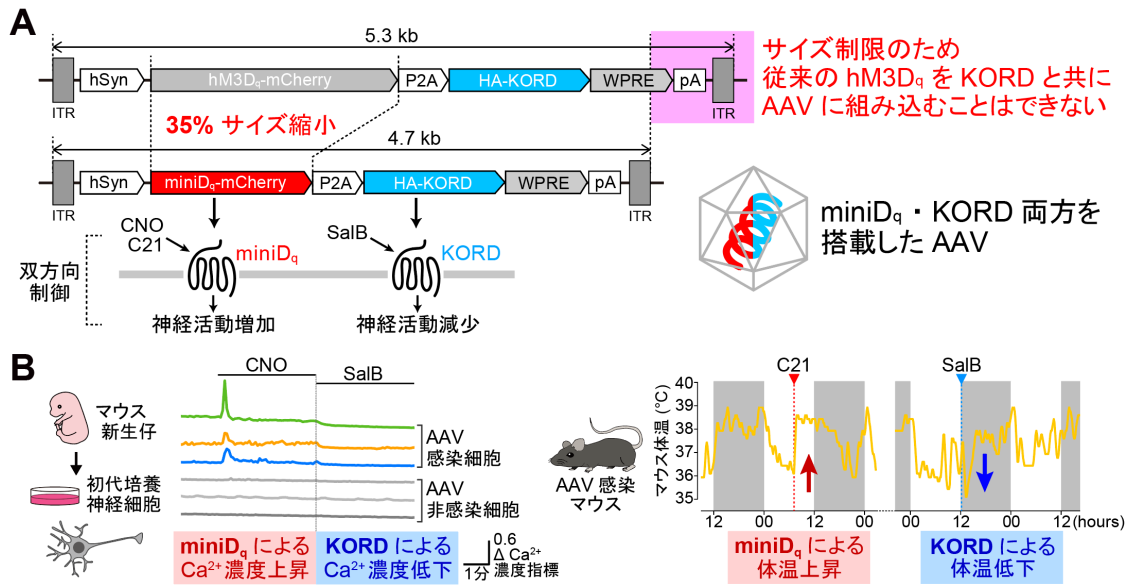


図 4. A) 2つの DREADD を組み込んだ AAV の模式図. B) A) を用いたマウス神経活動の双方向操作。

3. 波及効果、今後の予定

本研究では、化学遺伝学ツール DREADD を小型化することにより、ひとつの AAV で神経細胞の活動を双方向（興奮・抑制）に制御する仕組みを生み出すことに成功しました。マウスなど、近親交配により確立された系統が存在する実験動物とは異なり、サルでは、個体ごとに個性があり、また研究に使用できる匹数にも限りがあります。そのため、マウスのように、神経細胞を興奮させた場合・抑制させた場合をそれぞれ別のマウスで解析し、動物数をこなして研究を進めることは難しいのが現状です。私たちの作製したツールを用いることによって初めて、1匹のサルから、神経細胞を興奮させた場合・抑制した場合両方のデータを取

ることが可能になると考えています。また、マウス等においても興奮・抑制両方のデータを1匹から取得できるようになるため、実験に使用する動物数の削減にも貢献する可能性があります。

DREADDによる神経活動の人為的な操作をヒト脳に応用すれば、アルツハイマー病やうつ病など、さまざまな神経系疾患の治療にも貢献すると考えられています。しかしその際のひとつの問題として、ヒトがDREADDアゴニストを過量に服用してしまった場合、現存の技術では救済方法がないことがあります。私たちのツールは、同一神経細胞に必ず興奮・抑制の2種類のDREADDを発現させることが可能なため、過量投与の際にも、逆向きに神経活動を操作することで、この問題を解決する手段を生み出します。このように本ツールは「フェールセーフ機能」として、今後ヒト臨床においてDREADDを用いる際に有効活用されるのではないかと、私たちは考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業 基盤研究(S)（22H04987）を含む補助金・基金（24K02178、23H02405）、日本医療研究開発機構（AMED）創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（JP21am0101092）、科学技術振興機構（JST）ムーンショットミレニア・プログラム（JPMJMS2295）、JST ACT-X（JPMJAX222J）、SRF、アステラス病態代謝研究会、花王芸術・科学財団、上原記念生命科学財団、京都大学創立125周年記念ファンドくすのき・125、京都大学SPIRIT2 2024の支援を受けて行われました。

<用語解説>

* 1 Gタンパク質共役型受容体（GPCR）

細胞膜に局在し、外からの刺激を受け、細胞内のGタンパク質を活性化する7回膜貫通型タンパク質の総称

* 2 PET（Positron Emission Tomography）

陽電子放出断層撮影。陽電子放出核種で標識された化合物の体内分布を断層画像表示する方法

* 3 KORD

κ オピオイド受容体（KOR）に変異を加えることにより作製されたDREADD

<研究者のコメント>

「miniD_q・miniD_iおよびminiD_q/KORD発現プラスミドは、理研バイオリソースセンター（[RDB No. 20117-20119](#)）およびAddgene（Plasmid #204357-204359）に登録してあります。今後私たちの発明が、国内外問わず、多くの研究者の研究において有用な選択肢となることを切に願っております。」

<論文タイトルと著者>

タイトル： The size-reduced DREADD derivatives for AAV-assisted multimodal chemogenetic control of neuronal activity and behavior. (AAVを用いた神経活動/動物行動の化学遺伝学的操作の多様化に資する小型化DREADD誘導体の開発.)

著者： 三宅崇仁^{1*#}, 田中香帆^{1*}, 井上汐月^{1*}, 永井裕司², 西村怜緒¹, 瀬田孟仁¹, 中川俊平¹, 井上謙一³, 長谷川恵美¹, 南本敬史², 土居雅夫^{1#}

¹京都大学薬学研究科, ²量子科学技術研究開発機構, ³京都大学ヒト行動進化研究センター, *同等貢献著者, #責任著者

掲載誌： *Cell Reports Methods* DOI : 10.1016/j.crmeth.2024.100881