

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06883

研究課題名(和文) 光遺伝学的アプローチによる神経分泌ニューロンへのシナプス入力修飾メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of synaptic input modification mechanism to neurosecretory neurons by optogenetic approach

研究代表者

石井 雅宏 (ISHII, MASAHIRO)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30461560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2%食塩水負荷を5日間したAVP-ChR2-eGFP トランスジェニックラット(5-7週齢)のSONを含む脳スライス標本を用い、AVP-ChR2-eGFP陽性ニューロンに対し青色光が照射された際に細胞内へのinward currentが照射前より増加し、青色光の照射を中止すると速やかに元に戻ることが確認できた。細胞単離だけでなく、スライスの状態でもAVPニューロン中のChR2が正常に機能していることが示された。また固定膜電位が変化することにより青色光照射中のinward currentも変化すること、固定膜電位とinward currentは比例関係にあることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スライスの状態でも細胞単離と同様にAVPニューロン中のChR2が正常に機能していることが示された。これはこの実験系でスライスと細胞単離が同一の結果を示せるかどうかという電気生理学的研究での懸念事項を解消した。また固定膜電位が変化することにより青色光照射中のinward currentも変化すること、固定膜電位とinward currentは比例関係にあることが確認でき、我々が作成したラットはヒトの生理的な興奮状態に近い現象を再現できるとことが広く知られた。

研究成果の概要(英文)：5-7weeks old AVP-ChR2-eGFP transgenic rats were given 2% (w/v) salt solution for 5 days. Dissociation of SON neurons from transgenic rats and electrophysiological experiments (whole-cell patch-clamp recordings from isolated SON neurons) were performed. SON neurons isolated from salt loaded transgenic rats were used for whole-cell patch clamp recordings. In voltage clamp condition, blue light induced sustained inward currents during light-on and inward currents reduced during light-off. These suggested that ChR2 in slice function normally as cell isolation. It was clarified that the inward currents during light-on changed as the fixed membrane potential and the membrane potentials and the inward currents were in a proportional relationship.

研究分野：電気生理

キーワード：光遺伝学 バゾプレッシン シナプス入力修飾 神経内分泌 パッチクランプ法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

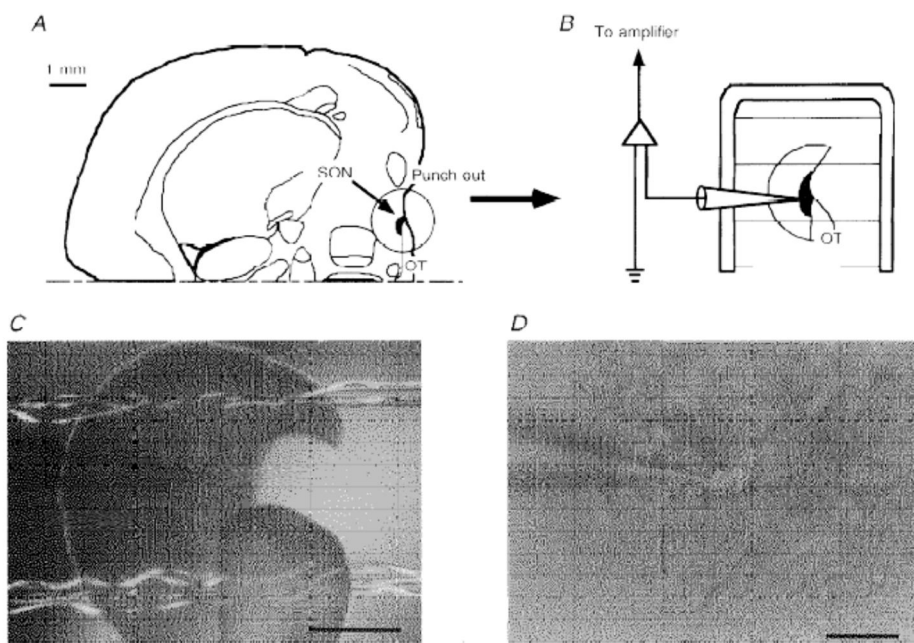
オキシトシンとともに下垂体後葉ホルモンとして知られるアルギニンバゾプレッシン (AVP) は、室傍核 (PVN) および視索上核 (SON) の大細胞性神経分泌ニューロンで生成され、下垂体後葉に投射した軸索終末から血中に分泌され、血管収縮や抗利尿作用を発揮することで体液の恒常性維持に働く。近年、この AVP が、下垂体後葉だけでなく脳内でも分泌され、中枢神経系を介して体液調節はもとより自律神経系からストレス、社会認知まで多彩な生理機能に関与していることが明らかになっている。また、作用機序は末梢において AVP は腎の集合管の V2 受容体に作用し水の再吸収を促進するが、脳内においても AVP は大細胞性神経分泌ニューロンに発現しているバゾプレッシン受容体に対して腎と類似の仕組みで作用し、ニューロンの容積を維持する働きがあることが解明された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AVP ニューロンから分泌された AVP に対する周囲の神経細胞への作用 (パラクライン) もしくは分泌した神経細胞自身への作用 (オートクライン) が存在するのか、存在するならば、どのような変化を引き起こすのかを解明するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) AVP-ChR2-eGFP トランスジェニックラットを使用し 2% 食塩水飲水負荷における視床下部視索上核での AVP ニューロンの興奮時の膜電流変化・ AVP-ChR2-eGFP トランスジェニックラット (5-7 週齢) に、2% 食塩水飲水負荷を 5 日間行う。その後、麻酔下で脳出しを行い、SON を含む 300 μm の切片を作成する。SON を含む脳スライス標本を用いて AVP-ChR2-eGFP 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ法により膜電流を記録しながら青色光照射し、その際膜電位を変化させることにより膜電流の変化を観察する。

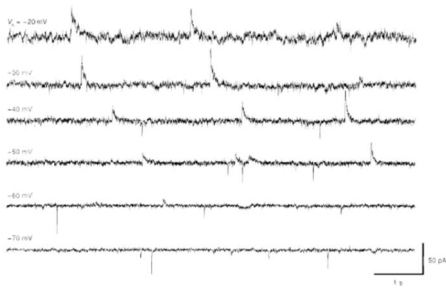


ラットの脳切片から視索(OT)を目印にSONをパンチアウトする(A)。パンチアウトした切片を顕微鏡のステージに固定し電極を刺入する(B)。記録する位置に固定したスライスを顕微鏡から見た(C)。強拡大にして大細胞性神経分泌ニューロンに電極を刺入した際の顕微鏡写真(D)

(2) AVP-ChR2-eGFP トランスジェニックラットで (1) と同様に、2% 食塩水飲水負荷を 5 日間行い、AVP-ChR2-eGFP 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ法により膜電位を固定した状態で青色光照射前の膜電流を観察する。

・その後照射し、人為的に AVP ニューロン終末から AVP が放出させた後の膜電流を観察する。具体的には照射前(AVP 放出前)と照射後(AVP 放出後)で EPSC や IPSC の頻度やその電流の大きさに変化があるかを観察する。膜電位を -70mv 固定で EPSC、15mv 固定で IPSC を観察する。

・変化がある場合は AVP 受容体拮抗薬を投与しその電流変化が修飾されるかを確認する。また同様の実験を AVP-ChR2-eGFP 陰性の AVP ニューロンでも行う。



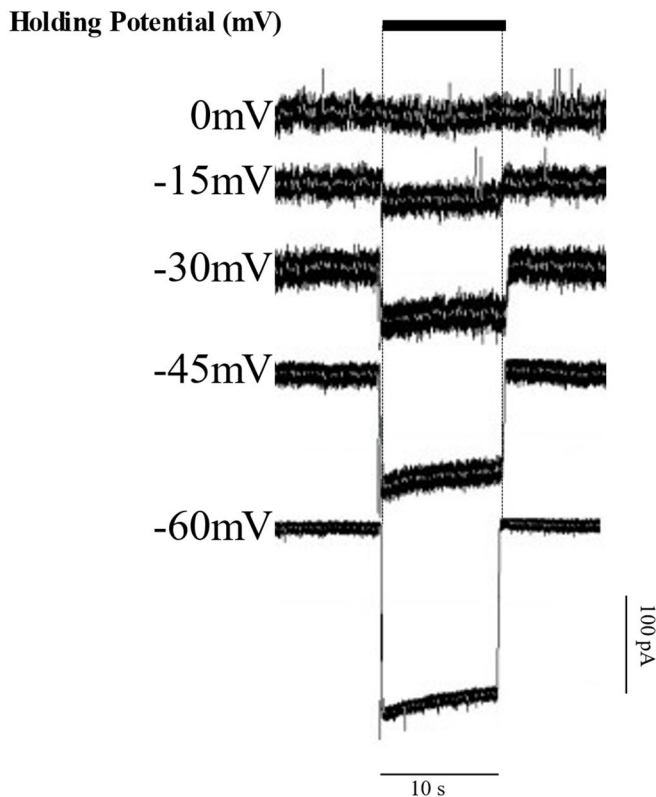
SONの大細胞性神経分泌ニューロンで膜電位を固定し、膜電流を記録した。-20mV（最上段）や 30mV（上から二段目）では上向きのIPSCが記録された。 40mVから下向きのEPSCが出現し始め(四段目)、-70mVではIPSCは消失しEPSCのみになっている（六段目）

4. 研究成果

AVP-ChR2-eGFP トランスジェニックラット(5-7 週齢) に、2%食塩水負荷を5日間行い、脱水状態にする。その後、麻酔下で迅速に脳出しを行い、SON を含む 300 μm の切片を作成した。SON を含む脳スライス標本を用い、蛍光顕微鏡で AVP-ChR2-eGFP 陽性ニューロンを同定した。同定したニューロンに対しホールセルパッチクランプ法により膜電位を固定した状態で膜電流は問題なく記録できた。

次に記録しながら青色光照射した。青色光が照射された際に細胞内への inward current が照射前より増加していることが複数回、異なった切片で確認できた。また、この変化は青色光の照射を中止すると速やかに元に戻った。これにより細胞単離だけでなく、スライスの状態でも AVP ニューロン中の ChR2 が正常に機能していることが確認できた。(A)

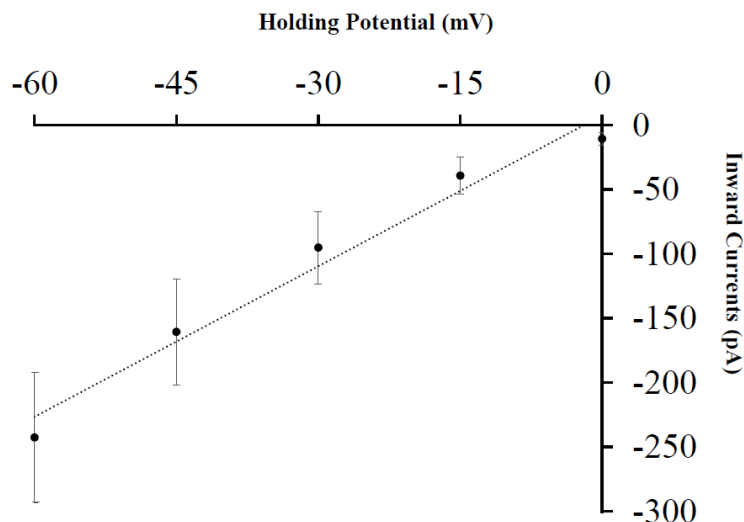
A



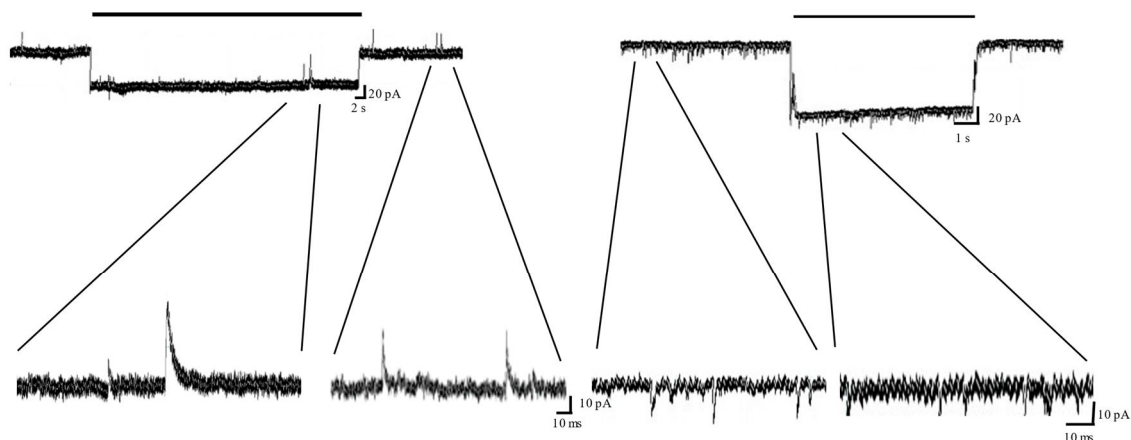
次に固定膜電位が変化すること

により青色光照射中の inward current も変化することが確認できた。また、固定膜電位を変化とさせることにより膜電流の変化も起こることが観察できた。固定膜電位と inward current の測定を繰り返し行い 2 者は比例関係にあることが確認できた (B)。

B



膜電位を固定した状態で青色光照射前の膜電流を観察し、その後照射し、人為的に AVP ニューロン終末から AVP が放出させた後の膜電流観察実験を行った。



照射前(AVP 放出前)と照射後(AVP 放出後)で EPSC や IPSC の頻度やその電流の大きさに変化を観察した。変化が生じるケースもあったが、生じない場合もあり、有意差をもった変化は確認できなかった。様々な条件を変化させたり、測定方法を変えたりしたが、変化の度合いは一定ではなく、一定の傾向は確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	上田 陽一 (UETA YOICHI) (10232745)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

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