

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700421

研究課題名（和文）メラノプシンを用いた光操作法による網膜介在神経細胞の樹状突起ごとの機能差異の解明

研究課題名（英文）Functional dissection of retinal neurons and their dendrites by optogenetic approaches with ectopic melanopsin expression

研究代表者

小泉 周 (KOIZUMI AMANE)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授

研究者番号：10296551

研究成果の概要（和文）：本研究は、光分子センサーであるメラノプシンを網膜の介在神経であるアマクリン細胞等に遺伝子導入させ、その神経細胞を光で操作し、その役割と神経回路機構を明らかにすることを目的とした研究である。そのため、げっ歯類（マウスやラット）成熟網膜の組織培養法と遺伝子銃を用いて遺伝子導入する方法（メラノプシン遺伝子）を確立した。さらに、BitetO-OPN4-mCherry 遺伝子改変マウスを開発しメラノプシンの網膜内異所性発現に成功した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to investigate the function of retinal interneurons, namely amacrine cells, and their dendrites by optogenetic approaches with ectopic expression of photosensitive pigment, melanopsin. We successfully established organotypic tissue culture of adult rodent retina with particle-mediated gene transfer of melanopsin. In addition, we established transgenic mouse line, BitetO-OPN4-mCherry, which express melanopsin (OPN4) as well as mCherry under the presence of tetracycline-activator (tTA).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学 ・ 神経・筋肉生理学

キーワード：脳・神経、神経科学、生理学、脳神経疾患、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の樹状突起は、複雑な神経回路において他の様々な神経細胞から情報を受け取るための細胞局所の構造である。当初、樹状突起は受動的に情報を受け取り情報の統合を行っていると考えられていたが、ここ 10

年あまりの間で、樹状突起にも能動的なプロセスが存在し、積極的に情報の統合処理を行っていることが明らかになっている。とくに、多くの神経システムの内部で神経機能の調整を行っている介在神経では、樹状突起と樹状突起が直接シナプスをつくり複雑な神経

回路を構築しており、樹状突起がシナプス統合や神経回路における機能発現に積極的に関与していることが分かってきた。とくに網膜での視覚情報処理においてはアマクリン細胞という樹状突起しか持たない介在神経が数十～数百本はある樹状突起でのシナプス入出力を通じて積極的に視覚情報処理の修飾を行っている。アマクリン細胞は、視細胞—双極細胞—網膜神経節細胞の視覚情報のプロセスのうち、双極細胞と網膜神経節細胞の間で樹状突起による複雑な神経回路を作り、動きや方向選択性などの視覚情報抽出を担っている (Watanabe, [Koizumi](#), et al. 2000 など)。このように樹状突起間シナプスが視覚情報の抽出において大きな意味を持っているが、どのように視覚情報処理に寄与しているのか、分かっていない。

一方、[Nagel](#) らがチャネロドプシン (ChR) と呼ばれる光で神経細胞の電気現象を操作できるイオンチャネルを発見し (2002)、にわかにより光による神経細胞の操作 (光操作) が着目を集め積極的に研究が進められている。[Deisseroth](#) らの研究によって光操作が実践的に精力的に行われている。ChR と同様に光によって神経細胞を脱分極させることができるメラノプシンの遺伝子導入を研究代表者は行い、哺乳類動物の網膜神経節細胞を *in vivo* で光操作することに成功している ([Lin](#), [Koizumi](#), et al, PNAS, 2008)。

本研究では、これまでの研究を発展させ、メラノプシンを用いた光操作技術を用いる基盤的研究手法を開発し、これによって網膜神経細胞を光操作、そして、さらに細かい細胞局所である樹状突起を刺激し、視覚情報処理におけるその役割を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、一部の網膜神経節細胞に発現している光分子センサーであるメラノプシンを網膜の介在神経であるアマクリン細胞等に遺伝子導入させ、その神経細胞を光で操作し、樹状突起におけるシナプス統合と視覚情報処理の神経回路機構を明らかにすることを目的とした研究である。網膜には、視細胞におけるロドプシンと呼ばれる光感受性タンパク質のほか、一部の網膜神経節細胞にメラノプシンと呼ばれる7回膜貫通型の光受容センサーが発現している。このメラノプシンはGタンパク質と共役し、細胞内のシグナル伝達系を介して、神経細胞を脱分極させることが知られている。このメラノプシンを他の網膜介在神経細胞に異所性に発現させれば、その神経細胞の機能や樹状突起・シナプス機能を光によって操作することができる。

3. 研究の方法

(1) メラノプシンをラット網膜培養組織標本で遺伝子発現させる方法を確立する

眼球から剥離したげっ歯類 (マウスやラット) 成熟網膜の組織培養法とそれに対する遺伝子導入法 (メラノプシン遺伝子) を確立させる。

研究代表者がこれまでに確立したウサギ成熟網膜培養法を応用する ([Koizumi](#) et al, PLoS One, 2007)。すなわち、インターフェース・チェンバーを用いて、エネルギー代謝の高い網膜視細胞の要求に答えるため大量の培養液を動揺させながら培養するという基本デザインは変更の必要がないと考えられる。ただし、ウサギ成熟網膜とは異なり、げっ歯類の網膜は、厚く、血管をもっているため、培養液が浸透しづらいものと考えられる。これまでに研究代表者はラット網膜を用いた予備実験で、培養液中の血清の濃度を上げることで、ラット網膜のバイアビリティが高まり剥離網膜を長く維持できることを確認している。血清濃度など培養液の成分について、さらなる工夫が必要であると思われる。

組織培養した網膜に対して、遺伝子銃 (Bio-Rad 社製) を用いてメラノプシンの遺伝子導入を行う。必要に応じて、その他改良型チャネロドプシンの遺伝子導入も合わせて行う。

(2) 遺伝子改変マウスの開発

研究代表者らはメラノプシンを異所性に発現する遺伝子改変マウスを作成し、これを用いて、異所性にメラノプシンを網膜介在神経への発現を試みる。このメラノプシンを網膜介在神経細胞に異所性に発現させれば、その神経細胞の機能や樹状突起・シナプス機能を光によって操作することができる。

4. 研究成果

(1) ラット網膜組織培養法の確立

眼球から剥離したげっ歯類 (マウスやラット) 成熟網膜の組織培養法とそれに対して遺伝子銃を用いて遺伝子導入する方法 (メラノプシン遺伝子) を確立した。

(2) Bitet0-OPN4-mCherry 遺伝子改変マウスの開発

メラノプシンを異所性に発現するために、特定のプロモーター存在下でテトラサイクリンアクティベーターを発現する tTA マウスと掛け合わせることで、メラノプシン (OPN4) と、赤色素 (mCherry) を同時に開発する Bitet0-OPN4-mCherry 遺伝子改変マウスを開発した。

(3) AVP を発現する網膜介在神経を発見

網膜介在神経アマクリン細胞の一種類で、抗利尿ホルモン AVP (バソプレシン) を発現

する新しい種類のアマクリン細胞を発見した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① AMANE KOIZUMI, TATJANA C JAKOBS, RICHARD H. MASLAND, Regular mosaic of synaptic contacts among three retinal neurons, (2011) Journal of Comparative Neurology 519(2), 341-357. (査読有)

② AMANE KOIZUMI, MISAKO TAKAYASU, HIDEKI TAKAYASU, ASYMMETRIC INHIBITORY CONNECTIONS ENHANCE DIRECTIONAL SELECTIVITY IN A THREE-LAYER SIMULATION MODEL OF RETINAL NETWORKS (2011) Journal of Integrative Neuroscience, 9, 337-350 (査読有)

③ Satoru Moritoh, Kaori Sato, Yasunobu Okada, and Amane Koizumi. Endogenous arginine vasopressin-positive retinal cells in arginine vasopressin-eGFP transgenic rats identified by immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (2011) Molecular Vision, 17, 3254-3261 (査読有)

④ Satoru Moritoh, Kenji F Tanaka, Hiroshi Jouhou, Kazuhiro Ikenaka, Amane Koizumi. Organotypic tissue culture of adult rodent retina followed by particle-mediated acute gene transfer in vitro. (2010) PLoS One, 5(9), e12917 (査読有)

[学会発表] (計4件)

① Kenji F Tanaka, Akihiro Yamanka, Amane Koizumi, Manipulation of neuronal activity by ectopic expression of melanopsin, 第34回日本神経科学会, 2011年9月16日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)

② Satoru Moritoh, Kenji F Tanaka, Hiroshi Jouhou, Kazuyuki Ikenaka, Amane Koizumi, MANIPULATING GENE EXPRESSION IN ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE OF ADULT RODENT RETINA, 7th Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, 2011年9月12日, Taipei, Taiwan

③ AMANE KOIZUMI, Spatial Regularity in the Arrangement of Excitatory Synapses Within the Inner Plexiform Layer. Manipulating gene expression in organotypic tissue culture of adult rat retina. Neuroscience 2010 (40th Neuroscience Meeting 第40回北米神経科学大会) 2010年11月17日 San Diego Convention Center(USA)

④ AMANE KOIZUMI, Spatial Regularity in the Arrangement of Excitatory Synapses Within the Inner Plexiform Layer. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2010 Annual Meeting, 2010年5月2日, Greater Fort Lauderdale /Broward County Convention Center (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 周 (KOIZUMI AMANE)

生理学研究所・細胞器官研究系・准教授

研究者番号：10296551