

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650171

研究課題名（和文） リモコン光操作による運動学習の促進と運動障害の改善への試み

研究課題名（英文） Application of a remotely triggered opto-stimulation device to facilitate motor-learning and rehabilitation

研究代表者

岩井 陽一 (Iwai Youichi)

独立行政法人理化学研究所・神経グリア回路研究チーム・研究員

研究者番号：40332332

研究成果の概要（和文）：

自由行動中の光遺伝学実験に適した無線 LED 装置を開発した。錐体細胞でチャネル型ロドプシンを発現するマウスの運動野を自由行動下で LED 照射したところ、筋収縮を誘発した。運動学習期にアストロサイトの活動を操作する目的で、光感受性の G 蛋白質共役型受容体を発現するトランスジェニックマウスを複数系統樹立した。いずれにおいても光感受性分子はアストロサイトで選択的に発現しており、発現量および陽性アストロサイトの割合は系統によって異なっていた。トランスジェニックマウスを麻酔下で光照射したところ、アストロサイト内のカルシウム上昇を誘発した。

研究成果の概要（英文）：

We developed a small, remotely triggerable LED device for wireless control of transcranial optical stimulation, for use in freely moving mice. Using the Thy1-ChR2-YFP transgenic mice, we demonstrate that the device is capable of remotely triggering muscle twitches upon activation of the primary motor cortex in freely moving conditions.

In order to directly manipulate astrocytic Ca^{2+} signaling *in vivo*, we have generated transgenic mice in which the expression of OptoXR-YFP, an optically activated Gq-coupled receptor (Airan et al., 2009), is driven by a BAC-GLT1 promoter. Among them, there were lines that expressed high or medium level of YFP fluorescence selectively in astrocytes. In the high lines a majority of astrocytes (~80%) expressed YFP, while the proportions of YFP positive astrocytes were 50~70% in the medium lines. Using two-photon laser scanning microscopy, we demonstrate that calcium surges were triggered in OptoXR-YFP positive astrocytes by blue light illumination in urethane anesthetized high or medium transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) 光遺伝学、(2) 運動学習、(3) アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

運動学習の成立には長期の訓練を要する。運動野の経頭蓋電気刺激によって運動学習が促進することがヒトで報告されているが、どの細胞種に作用しているかは不明である。光遺伝学の進展によって、学習における特定の神経細胞の機能が近年解明されているが、グリア細胞の役割はほとんど検証されていない。

2. 研究の目的

これまでの光遺伝学実験では光ファイバー等の有線が使われていた。長期におよぶ運動訓練時に低苦痛の光照射を行う目的で、無線のLED装置の開発を進めた。アストロサイトはG蛋白質共役型受容体を介して多様な神経伝達物質に応答し、細胞内カルシウムを上昇させる。アストロサイトの活動を特異的に操作する目的で、光感受性のG蛋白質共役型受容体(OptoXR; Airan et al. 2009)をアストロサイトで選択的に発現するトランスジェニックマウスの作製を進めた。

3. 研究の方法

錐体細胞でチャンネル型ロドプシンを発現するマウスの運動野上の頭蓋骨に無線LEDを装着し、麻酔下および自由行動下で光照射し、筋活動を計測した。OptoXR-YFPをコードするDNAをアストロサイト特異的なGLT1のプロモーターの下流、あるいは、LoxPの間に挿入し、各々のコンストラクトのトランスジェニックマウスを複数系統作製した。各系統について、YFPの発現パターンを解析し、光照射に対するカルシウム応答を計測した。

4. 研究成果

錐体細胞でチャンネル型ロドプシンを発現するマウスの運動野の経頭蓋LED照射によって、筋活動電位および筋収縮を誘発できた(図1)。また、野生型マウスを運動訓練時に光照射する実験から、無線LEDの装着および照射自体が運動学習に影響を与えないことを確認した。

GLT1-OptoXR-YFP トランスジェニックマウスを5系統樹立した。いずれの系統もOptoXR-YFPをアストロサイトで選択的に発現しており、YFPの発現量および陽性のアストロサイトの割合は系統によって異なっていた(図2)。OptoXR-YFPを強く発現する系統では、約80%のアストロサイトでYFPを検出した。OptoXR-YFPを中程度に発現する系統では、約半数のアストロサイトでYFPを検出した。

樹立したLoxP-OptoXR-YFP トランスジェニックマウスにおいては、Creをウイルス感染させたアストロサイトでYFPが発現することを確認した。

OptoXR-YFP トランスジェニックマウスを麻酔下で光照射したところ、アストロサイト内のカルシウム上昇を誘発できた(図2D)。

現在、運動学習の各段階でOptoXR-YFP トランスジェニックマウスの運動野を無線LEDで照射し、運動能の変化を調べている。

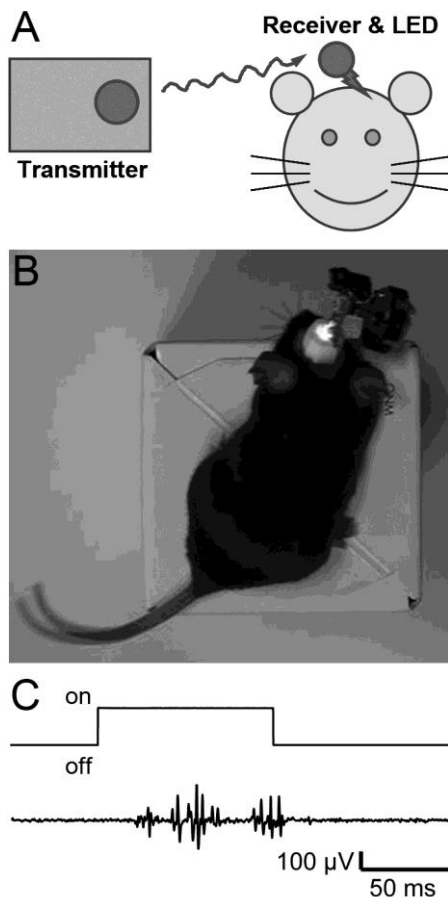


図 1. 無線 LED による自由行動下の光感受性分子の活性化

(A) Transmitter から Receiver に信号を送り、LED を照射する。

(B、C) チャンネル型ロドプシンを神経細胞で発現するトランスジェニックマウスの運動野頭蓋骨上に Receiver と LED を装着した。LED 照射 (on) によって尻尾を含む筋収縮 (B) と後肢筋活動電位 (C) が誘発される (Iwai et al. 2011)。

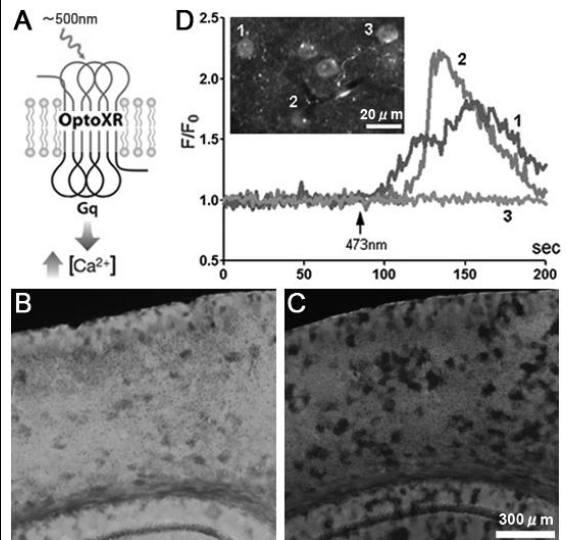


図 2. GLT1-OptoXR-YFP トランスジェニックマウス

(A) ロドプシンと Gq 型の G タンパク質共役型受容体からなるキメラ分子の OptoXR は 500nm 付近の光に反応して、Gq 型の G タンパク質を活性化し、細胞内のカルシウムを上昇させる (Airan et al. 2009)。

(B、C) GLT1-OptoXR-YFP トランスジェニックマウスの脳の蛍光像。約 80% のアストロサイトで OptoXR-EYFP を強く発現する系統 (B) と、約半数のアストロサイトで中程度に OptoXR-EYFP を発現する系統 (C)。

(D) B のマウスの生体内カルシウムイメージング。カルシウム感受性色素の Rhod2 を取り込んだ 1 および 2 のアストロサイト (挿入図) に 3 秒間 473nm 光を照射 (矢印) すると、Rhod2 の蛍光強度が上昇した。照射部位から離れた 3 のアストロサイトでは Rhod2 の蛍光強度は変化しない。

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1件)

A simple head-mountable LED device for chronic stimulation of optogenetic molecules in freely moving mice.

Iwai, Y., Honda, S., Ozeki, H., Hashimoto, M., and Hirase, H.

Neurosci Res. 2011 70 124-127.

査読有

[学会発表] (計1件)

Transgenic mouse lines for optical activation of Gq-coupled receptors in astrocytes.

Iwai, Y., Ozawa, K., Yahagi, K., Nagai, T., Yaguchi K., Tanaka M., Itohara S., and Hirase, H.

Gordon Research Conference on Glial Biology. 2013 March3-8, Ventura, CA, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 陽一 (IWAI YOUICHI)

独立行政法人理化学研究所・神経グリア回路
研究チーム・研究員

研究者番号：4 0 3 3 2 3 3 2

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者