

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659128

研究課題名(和文)メラノプシンを用いた長時間の神経活動制御法の開発

研究課題名(英文)Development of method for neural activity manipulation using melanopsin

研究代表者

山中 章弘(YAMANAKA, Akihiro)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：60323292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：メラノプシンは、一部の網膜神経節細胞に発現する光感受性膜タンパク分子で有り、470nm近辺の青色光によって活性化される。活性化されるとGqタンパク質を介して細胞内情報伝達系を駆動し、細胞内に情報を伝達することが出来る。メラノプシンは、チャネルロドプシン等と比較して高い光感受性能を持ち、長時間作用が続くことから、メラノプシンを異所性に神経細胞に発現させ、光を用いて神経活動を長時間操作することを試みた。現在用いられている光遺伝学よりも、弱い光強度で長時間の活動操作できる手法を確立できた。

研究成果の概要(英文)：Melanopsin is a light-activated membrane protein which is expressed in the part of ganglion cell in the retina. Melanopsin is activated by the blue light around 470 nm. Melanopsin send signal to intracellular via Gq protein. Melanopsin has higher light sensitivity compare with Channelrhodopsin. And the effect is lasted for long time. In this study, we tried to control specific type of neurons for long time by expressing melanopsin. We succeeded with establishing control method of neural activity by using weaker light.

研究分野：環境生理学

科研費の分科・細目：含体力医学・栄養生理学

キーワード：光遺伝学 トランスジェニックマウス スライスパッチクランプ オレキシン

### 1. 研究開始当初の背景

チャンネルロドプシン 2(ChR2)やハロロドプシンなどの光活性化タンパク質が光遺伝学において主に用いられている。これら分子は緑藻類や古細菌といった哺乳類からは遠い生物種から単離された分子であるため、哺乳類の神経細胞への応用において、タンパク質翻訳時におけるコドンの違いや、細胞膜への移行シグナルの違いなどの問題などから、細胞膜において十分な発現量を得ることが難しく、それが神経活動の光操作の成否に大きく影響を与えていた。

### 2. 研究の目的

光遺伝学は、光によって活性化されるタンパク質(チャンネルロドプシン 2(ChR2)やハロロドプシンなど)を特定の神経に発現させ、その神経活動を光によって操作し、個体の行動を制御する技術である。しかし、これらの分子は長時間の光刺激では脱感作するため、発現から完了までに時間がかかる行動(摂食、睡眠覚醒、性行動などの本能行動)の制御は難しかった。そこで、本研究では、哺乳類の網膜神経節細胞に発現する光感受性色素である「メラノプシン」に着目し、特定の神経細胞への異所性発現によって、長時間神経活動を制御する方法を開発し、本能などの行動を調節する神経機構を解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

メラノプシンは元来哺乳類の網膜神経節細胞に発現する分子であるため、哺乳類の神経細胞における異所性発現においても高い発現率が期待できる。また、ChR2やハロロドプシンは分子自体がチャンネルやポンプを形成しているのに対し、メラノプシンは光を受容すると、発現した細胞自身が有する二次伝達系やチャンネルを活性化して脱分極を引き起こすために、極めて生理的で持続的な膜電位変化を導くことが可能となる。メラノプシンの光感受性はChR2の約1,000倍高いこと、また短い光刺激(1秒)によって数分の持続的な神経活動の活性化を確認しており、メラノプシンがオプトジェネティクスに有用な分子であることを見いだしている。また、ChR2やハロロドプシンは活性化に強い光が必要であり、インビボにおける光刺激では強力なレーザー光源が必要となることや、強い光による細胞障害などが問題となっている。一方、メラノプシンはその高い光感受性によって弱い光でもメラノプシン発現神経細胞を光刺激することが可能となるため、特にインビボにおける光刺激において有利に働き、光刺激装置の小型化やLEDを用いた光刺激が可能となる。

### 4. 研究成果

メラノプシンを視床下部のオレキシン産

生神経細胞特異的に発現する遺伝子改変マウスの作成に成功し、オレキシン神経活動を持続的に操作することに成功した。スライスパッチクランプを用いた解析で、非常に弱い光によってオレキシン神経細胞が活性化すること、また持続的に活性化することを見いだした。インビボにおいてオレキシン神経細胞を活性化することで、覚醒が持続することを確認した。これらのことからメラノプシンを持って特定神経の神経活動操作が可能であることを示し、光を用いた神経活動の長時間操作方法を確立した。

### 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11件)

1. Tsunematsu T, Ueno T, Tabuchi S, Inutsuka A, Tanaka KF, Hasuwa H, Kilduff TS, Terao A, Yamanaka A: Optogenetic manipulation of activity and temporally-controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. J Neurosci (2014 in press)
2. Tabuchi S, Tsunematsu T, Black SW, Tominaga M, Maruyama M, Takagi K, Minokoshi Y, Sakurai T, Kilduff TS, Yamanaka A: Conditional ablation of orexin/hypocretin neurons: A new mouse model for the study of narcolepsy and orexin system function. J Neurosci (2014 in press)
3. Black SW, Morairty SR, Chen TM, Leung AK, Wisor JP, Yamanaka A, Kilduff TS: GABAB agonism promotes sleep and reduces cataplexy in murine narcolepsy. J Neurosci (2014 in press)
4. Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, Yamanaka A, Yoshioka M: Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behavior in mice. Int J Neuropsychopharmacology (2014 in press)
5. Takayama Y, Shibasaki K, Suzuki Y, Yamanaka A, Tominaga M: Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. FASEB J (2014 in press)
6. Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K: Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. Neuron 81(2): 314-20 (2014)
7. John J, Thannickal TC, McGregor R, Ramanathan L, Ohtsu H, Nishino S, Sakai N, Yamanaka A, Stone C,

- Cornford M, Siegel JM: Greatly increased numbers of histamine cells in human narcolepsy with cataplexy. *Ann Neurol* 74(6): 786-93 (2013)
8. Tsujino N, Tsunematsu T, Uchigashima M, Konno K, Yamanaka A, Kobayashi K, Watanabe M, Koyama Y, Sakurai T: Chronic alterations in monoaminergic cells in the locus coeruleus in orexin neuron-ablated narcoleptic mice. *PLoS ONE* 8(7): e70012 (2013)
  9. Tsunematsu T, Tabuchi S, Tanaka KF, Boyden Edward S, Tominaga M, Yamanaka A: Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res* 255: 64-74 (2013)
  10. Tabuchi S, Tsunematsu T, Kilduff Thomas S, Sugio S, Xu M, Tanaka KF, Takahashi S, Tominaga M, Yamanaka A: Influence of inhibitory serotonergic inputs to orexin/hypocretin neurons on the diurnal rhythm of sleep and wakefulness. *Sleep* 36 (9): 1391-404 (2013)
  11. Taguchi T, Yasui M, Kubo A, Abe M, Kiyama H, Yamanaka A, Mizumura K: Nociception originating from the crural fascia in rats. *Pain* 154(7): 1103-14 (2013)

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 山中章弘: 神経活動操作を用いた睡眠覚醒調節に関わる神経回路の動作原理. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014.3. (仙台)
2. 山中章弘: 光遺伝学・薬理遺伝学を用いた神経活動操作と行動制御. 第 91 回日本生理学会大会, 2014.3. (鹿児島)
3. 山中章弘: 光遺伝学を用いた視床下部神経活動の操作による睡眠覚醒の制御. International Workshop on Animal Instinctive and Intelligent Behaviors, 2014.2. (札幌)
4. 山中章弘, 常松友美, 田淵紗和子, 犬束歩: The physiological role of orexin/hypocretin neurons on sleep/wakefulness regulation. 2014 Meeting of the Australasian Neuroscience Society, 2014.1. (Adelaide, Australia)
5. 山中章弘: オプトジェネティクスを用いた神経活動操作による本能行動制御メカニズムの解明. 第 16 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, 2013.12. (名古屋)
6. 山中章弘: ノンレム睡眠とレム睡眠の調節メカニズム. 第 20 回日本時間生物学

- 会学術大会, 2013.11. (東大阪)
7. 山中章弘, 田淵紗和子, 常松友美: New model mice for narcolepsy. International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 2013.10. (Seoul, Korea)
  8. 山中章弘: 睡眠 - 覚醒を調節する神経回路. 創薬薬理フォーラム第 21 回シンポジウム, 2013.9. (東京)
  9. 山中章弘, 常松友美: Optogenetical approach to reveal the regulatory mechanism of instinctive behaviors by the hypothalamic neurons. IUPS 2013, 2013.7. (Birmingham, UK)
  10. 山中章弘, 田淵紗和子, 常松友美: 睡眠覚醒調節における視床下部オレキシン神経の役割 ~ 加齢に伴う睡眠覚醒調節障害との関係 ~. 第 13 回日本抗加齢医学会総会, 2013.6. (横浜)
  11. 山中章弘: オレキシンの基礎研究の手法と成果. 日本睡眠学会第 17 回睡眠科学研究講座, 2013.6. (秋田)
  12. 山中章弘, 田口紗和子, 常松友美: オレキシン神経の時期特異的除去を用いた新規ナルコレプシーモデルマウス. 日本睡眠学会第 38 回定期学術集会, 2013.6. (秋田)
  13. 山中章弘: New model mice for narcolepsy revealed the mechanism of symptoms. 11th World Congress of Biological Psychiatry, 2013.6. (京都)
  14. 山中章弘: 光遺伝学はじめての一步. *Neuro* 2013, 2013.6. (京都)
  15. 山中章弘, 常松友美: オプトジェネティクスを用いた本能行動調節機構の解明. *Neuro* 2013, 2013.6. (京都)

〔図書〕(計 3 件)

1. 山中章弘: オプトジェネティクス-光工学と遺伝学による行動制御技術の最前線-, 株式会社エヌ・ティー・エス, P171-176, P216-226 (2013)
2. 山中章弘: アンチ・エイジング医学 9(2), メディカルレビュー社, P41-46 (2013)
3. 山中章弘: 細胞工学 Vol.33 オプトジェネティクスを用いた神経機能操作の現在地-光で行動をコントロールする, 学研メディカル秀潤社, P238-242, P264-269 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムにおける発現量を増幅させる遺伝子座とノックインによる増幅の効果  
 発明者: 山中章弘, 田中謙二  
 権利者: 山中章弘, 田中謙二

種類：  
番号：特願 2011-193680  
出願年月日：平成 26 年 3 月 25 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山中章弘（名古屋大学環境医学研究所・教授）

研究者番号：60323292

##### (2) 研究分担者

小泉周（生理学研究所・准教授）

研究者番号：10296551

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：