

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650219

研究課題名(和文)細胞内カルシウムを光で操作できるマウスの開発

研究課題名(英文)Development of animal model enabling the manipulation of intracellular Ca level

研究代表者

田中 謙二 (Kenji, Tanaka)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30329700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内カルシウムを光で操作するために光感受性機能プローブ、メラノプシンを採用し、細胞種特異的にそれらを発現させるためにテトラサイクリン遺伝子発現誘導システムを採用した。tet0-メラノプシントランスジェニックマウスは、神経細胞tTAマウスとの組み合わせで十分なメラノプシンが誘導され、細胞内カルシウムを光で操作することが出来た。グリア細胞ではメラノプシンの発現誘導が不十分で、機能操作ができなかった。より高い発現を目指してメラノプシン遺伝子座を利用したSTOPtet0-メラノプシンノックインマウスも作成した。予想に反していかなる細胞種においてもメラノプシンの誘導がかからなかった。

研究成果の概要(英文)：To achieve the manipulation of intracellular Ca²⁺ levels in the cell-type specific manner, we established the transgenic animal in which melanopsin (human OPN4 gene) was expressed in cell-type specific manner. We generated tet0-melanopsin transgenic mice and crossed with neuronal tTA (orexin-tTA) mice. Orexin neurons expressed enough amount of melanopsin to evoke cell firing, demonstrating the successful manipulation. In case of crossing with glial tTA mice, there was no induction. To improve melanopsin induction in glial cells, we generated STOP tet0-melanopsin knockin mice using mouse melanopsin locus. Unlike previous tet0 knockin mice, none of glial tTA line induced melanopsin yet. We were able to express sufficient amount of melanopsin in neuronal cells and manipulate cell function by illumination, however, we failed to express melanopsin in glial cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：遺伝子改変マウス tet system メラノプシン チャネルロドプシン カルシウム

1. 研究開始当初の背景

光感受性タンパク質(たとえばチャネルロドプシン, ChR2)を細胞に発現させ、光を照射して細胞の機能を変化させる方法をオプトジェネティクスと呼ぶ。特に光を感知してナトリウムを細胞内に流入させることができる ChR2 は、膜電位の変化を通じて活動電位を光で制御できるために、これまで微小電極では不可能であった神経細胞操作を可能にし、複雑な神経回路を紐解く重要なツールとして確立された。

一方で、グリア細胞などの非興奮性細胞にナトリウム電流を流しても膜電位はほとんど変化しない。これらの非興奮性細胞への摂動は脳の活動を理解する上で必須の技術であるが、ChR2 は上述した理由で望ましくない。細胞内カルシウムは興奮性、非興奮性細胞いずれにおいても細胞内シグナル伝達の重要な因子であり、その増減は細胞の活性状態に深く関与する。光で細胞内カルシウム濃度を操作できるようになることが、今、まさに求められている。

細胞内カルシウム濃度を变化しうる光感受性タンパク質としてメラノプシンと Ca 透過性 ChR2 変異体の 2 つがある。メラノプシンは網膜神経節細胞に発現するオプシンで、光を受容すると TRP チャネルを介して細胞内へ Ca を流入させることが出来る (Hatter et al., Science 2002)。ChR2(L132C)変異体は光を受容すると Na と Ca の両方を細胞内へ流入させる (Kleinlogel et al., Nat Neurosci 2011)。これらを発現する遺伝子改変マウスの報告はない。

2. 研究の目的

細胞内カルシウムを光で操作しうる 2 種類の光感受性タンパク質、メラノプシンと Ca 透過型チャネルロドプシンを細胞種特異的に発現する遺伝子改変マウスを作成する。非興奮性細胞に光感受性タンパク質を発現したマウスに焦点を絞り、光照射後の細胞内カルシウム動態を調べ、どちらの光感受性タンパク質発現マウスが光による細胞内 Ca の摂動に優れているか明らかにする。

これにより、マウス個体に光を照射することで、特定の非興奮性細胞の細胞内カルシウム濃度を増加させて細胞活性を操作する新しいオプトジェネティクスの手法を提案し、コミュニティーに供する。

3. 研究の方法

(1) テトラサイクリン遺伝子誘導システムを用いて、グリア細胞各種(アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア)に光 Ca 摂動タンパク(メラノプシン、Ca 透過型 ChR2)を発現するマウスを作成する

すでにウイルスベクターを用いた発現に

よって動作確認されているヒトメラノプシン cDNA (Lin et al., PNAS 2008) を用いて tet0-メラノプシン cDNA マウスを作成する。

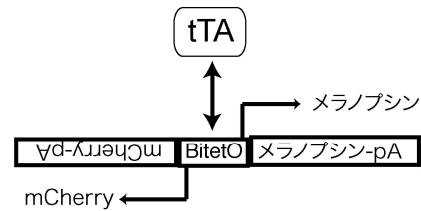


図1 tet0-メラノプシントランスジェニックマウス

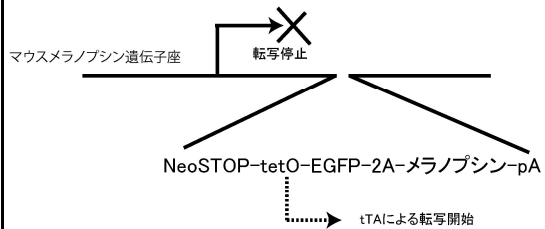


図2 tet0-メラノプシンノックインマウス

ChR2(L132C) よりも Ca 透過率が高い ChR2(L132C/T159C) 変異をフンボルト大学 Hegemann 博士より入手し、培養細胞発現系で光 Ca 透過性を調べる

Ca 透過型 ChR2 の動作確認後、tet0 ノックインマウスを作成する。

(2) 光 Ca 摂動タンパクが確かにグリア細胞特異的に発現していることを組織化学的に調べる。

(3) 細胞種特異的 tTA マウスと交配させ、どの細胞にどの光 Ca 摂動タンパク質を発現させると光応答が得られるのか明らかにする。

4. 研究成果

(1) tet0-メラノプシン遺伝子改変マウス

tet0-メラノプシントランスジェニックマウス(図1)を定法に則って作出した。この tet0 マウスは、tTA (テトラサイクリントランスアクチベーター) 存在下でメラノプシンと赤色蛍光蛋白 mCherry の両方が発現する。神経細胞特異的 tTA 発現マウスと交配させたところ、赤色蛍光とメラノプシン mRNA の発現が期待通り観察された。さまざまな神経細胞特異的 tTA と交配させた結果、オレキシン神経特異的 tTA との組み合わせによってのみ光応答可能なメラノプシンの発現が観察された。このことから細胞内 Ca レベルを操作するにはかなり高いメラノプシン発現レベルが必要であることが分かった(発表論文 3,4)。グリア細胞特異的 tTA マウスと交配させたところ、赤色蛍光もメラノプシン mRNA も誘導されなかった。

細胞内カルシウム濃度操作をグリア細胞をはじめとする非興奮性細胞で行うことが本研究課題の主要目的である。既存のテトラサイクリン遺伝子発現誘導システムをどの

ように改善すればグリア細胞に機能プロンプを発現させることが出来るか検討した。tet0 カセットを house keeping gene の近傍にノックインする、もしくは機能遺伝子そのものに tet0 カセットをノックインすることが有効であることを明らかにした(発表論文 1,2,5,6,7)。

メラノプシンをグリア細胞に発現させることを目的として tet0-メラノプシンノックインマウスを作出した(図2)。遺伝子座にはマウスメラノプシン遺伝子座を選び、メラノプシン遺伝子の翻訳開始部位の直前にカセットをノックインした。組換え ES 細胞の獲得、キメラマウスの作成をへて tet0-メラノプシンノックインマウスを得ることが出来た。

神経細胞特異的 tTA、グリア細胞特異的 tTA と交配させ、ダブルトランスジェニックマウスの脳サンプルを組織学的に解析した。予想に反して、いかなる tTA マウスとの組み合わせによっても GFP およびメラノプシン mRNA の誘導が得られなかった。NeoSTOP 配列の存在が tTA 依存的な誘導を阻害していると考え、NeoSTOP 配列を除去したノックインマウスを新たに作成してみたところ、それでも tTA による発現誘導は確認できなかった。メラノプシン遺伝子座を用いた tet0 ノックインマウスによるメラノプシンの異所性発現は達成不可能であると結論した。House keeping gene 近傍を用いた tet0 ノックインマウスを新規に作成すればグリア細胞特異的メラノプシン発現を達成できる可能性がある。

(2) tet0-Ca 透過型 ChR2 遺伝子改変マウス

まず、HEK293 細胞に ChR2(L132C/T159C)変異体を発現させ、パッチクランプ法を用いて電流変化を記録した。青色光照射によって内向き電流が観察されたことから、陽イオンが細胞内へ流入していることが確認できた。次に、Fura2 を用いた細胞内カルシウムイメージングを青色光照射と組み合わせて行った。青色光照射に関連するカルシウム濃度の増加はほんの僅かであった。培養細胞の発現系では、ChR2(L132C/T159C)を極めて大量に発現させることが出来る。にもかかわらず、わずかなカルシウム濃度変化しか得られないようでは、ChR2 の発現量に制限のあるマウス個体で細胞機能を変化させるだけのカルシウム流入を行うことは不可能であると推論した。これらの理由によって、現時点でベストと思われるカルシウム透過型 ChR2 を遺伝子改変によって発現させ、in vivo で用いて細胞内機能振動に使用することは出来ないと結論し、ターゲティングベクター作成で実験を中止した。

(3) メラノプシン遺伝子発現操作

副次的な成果として、以下を挙げることが出

来る。

神経細胞特異的 tTA マウスで、かつ一細胞あたりの tTA の発現が高い場合(前述したオレキシン神経など)、tet0-メラノプシントランスジェニックマウスで細胞機能进行操作するだけの十分なメラノプシン発現が期待できる。tet0-メラノプシントランスジェニックマウスを理化学研究所バイオリソースセンターに寄託し、どの研究者も使用できるようにした。

tet0-メラノプシンノックインマウスは、tet0 の直前に STOP 配列が組み込まれているため、内因性のマウスメラノプシンの発現がブロックされている。このため、ホモ接合体はメラノプシンノックアウトマウスとして振る舞う。tet0-メラノプシンノックインマウスも理化学研究所バイオリソースセンターに寄託した。

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 23 件)

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*. 査読有り. Vol. 81(2), 2014, pp.314-320.

doi: 10.1016/j.neuron.2013.11.011.

Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有り, Vol. 109(50), 2012, pp.20705-20720.

doi: 10.1073/pnas.1213458109.

Koizumi A, Tanaka KF, Yamanaka A. The manipulation of neural and cellular activities by ectopic expression of melanopsin. *Neurosci Res*. 査読有り, Vol. 75(1), 2012, pp.3-5.

doi: 10.1016/j.neures.2012.07.010.

Tsunematsu T, Tanaka KF, Yamanaka A, Koizumi A. Ectopic expression of melanopsin in orexin/hypocretin neurons enables control of wakefulness of mice in vivo by blue light. *Neurosci Res*. 査読有り, Vol. 75(1), 2012, pp.23-28.

doi: 10.1016/j.neures.2012.07.005.

Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene

expression system. Cell Rep. 査読有り, Vol. 2(2), 2012, pp.397-406.
doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.011.
Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, Tanaka KF, Matsuki N, Ikegaya Y. Preinspiratory calcium rise in putative pre-Botzinger complex astrocytes. J Physiol. 査読有り, Vol. 590 (Pt 19), 2012, pp.4933-4944.
doi: 10.1113/jphysiol.2012.231464.
Inamura N, Sugio S, Macklin WB, Tomita K, Tanaka KF, Ikenaka K. Gene induction in mature oligodendrocytes with a PLP-tTA mouse line. Genesis. 査読有り, Vol. 50(5), 2012, pp. 424-428
doi: 10.1002/dvg.20808.

〔学会発表〕(計 18 件)

田中 謙二、グリア細胞の光操作、第 24 回マイクロダイアリシス研究会、2013 年 12 月 14 日、東京

田中 謙二、グリアが起点となる脳内環境変化、Neuro2013、2013 年 6 月 20 日、京都

Kenji Tanaka. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. OPTOGENETICS-2013 Theme Conference, May 1- 2, 2013, Boston, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 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
http://keioect.web.fc2.com/keioect/Top_Page.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 謙二 (TANAKA, Kenji)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：30329700

(2)研究分担者

松井 広 (MATSUI, Ko)
生理学研究所・大学共同利用機関等の部
局・准教授
研究者番号：20435530

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：