

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640041

研究課題名(和文)多重選択を用いた投射経路別遺伝子発現による次世代光遺伝学ツールの開発

研究課題名(英文)Development of the next generation optogenetics tools by projection specific labeling using multiple selection

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

研究成果の概要(和文)：特定領域の神経細胞にアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いてCre-TTCを発現させ、その領域に投射している領域の神経細胞にCre依存的に遺伝子発現を生じるAAVを感染させた。既に投射が確認されている黒質から線条体へ投射するドーパミン神経を用いた。線条体領域にCre-TTCを発現するAAV-CMV-Cre-TTC-2A-mCherryを発現するAAVを感染させ、黒質領域にCre依存的にGFPを発現するAAV-CMV-FLEX-GFPを感染させた。その結果、黒質から線条体に投射する神経特異的に緑色蛍光が観察された。このことから、経シナプス逆行性に移行して機能することが確認出来た。

研究成果の概要(英文)：Adeno-associated virus (AAV) which express retrogradely transsynaptic Cre recombinase, Cre-TTC (Cre recombinase fused with tetanus toxin C terminal fragment), was infected targeted brain area. Then, AAV which express fluorescent protein in the presence of Cre recombinase was infected. To test this, dopaminergic neurons in the Substance Niger were applied. Neurons in the striatum was infected AAV-CMV-Cre-TTC-2A-mCherry. Neurons in the substantia niger was injected AAV-CMV-FLEX-GFP. As a result, GFP fluorescent was observed in the neurons in the substantia niger suggested that Cre-TTC was retrogradely transsynaptically transported and worked in the neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：アデノ随伴ウイルスベクター Creリコンビナーゼ 経シナプス逆行性

1. 研究開始当初の背景

光遺伝学は、特定の波長の光によって活性化される光電位変換膜タンパク質分子(チャネルロドプシン2(ChR2)、もしくはハロロドプシン(HaloR))などを、特異的プロモーターなどを用いて、特定の性質を持つ神経細胞だけに発現させ、組織透過性の高い光を照射することによって、それらの神経活動を極めて高い時間精度で操作する新しい技術である。光遺伝学は2005年に開発され、急速に発展・普及し神経科学分野の研究手法を一変させた。この技術を用いると、脳内に無数に存在する神経細胞の中から狙った神経細胞の活動だけを操作することが可能となる。その操作の結果、表出する行動を解析することによって、その神経が担う生理的役割を明らかにすることができる。これまでに多くの神経回路の同定と、その回路機能解明に絶大な威力を発揮してきた。このとき、光電位変換膜タンパク質分子の特異的発現を実現するには、狙った神経細胞が発現する特定の分子のプロモーターが用いられる。例えば、アセチルコリン作動性神経細胞特異的に発現させるために、アセチルコリン合成に関わるコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)のプロモーターがよく用いられている。しかし、この方法では全てのアセチルコリン作動性神経細胞において光電位変換膜タンパク質分子を発現してしまうため、光を照射した領域に存在するアセチルコリン作動性神経細胞全てを活性化させてしまう。言わずもがなであるが、これまでの研究から脳内におけるアセチルコリン作動性神経の生理的役割は単一なものではなく、経路別に異なる様々な生理機能を担っていることが知られている。しかし、これらの経路別に遺伝子発現出来るプロモーターはほとんど知られておらず、特異的プロモーターではこれらの経路別に遺伝子発現させることは不可能であった。そこで、本研究提案では、Cre リコンビナーゼやフリップパーゼ(FLPe)などの組換え酵素を経シナプ的に順行性トレーサー、もしくは逆行性トレーサー分子との融合タンパク質として発現させることで、多重選択による投射経路特異的な遺伝子発現を達成し、複数領域から入出力を受ける神経細胞に対して光遺伝学の適用を可能にする。そこで、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて経路選択的遺伝子発現を実現し、特定の神経回路機能を操作したときに発現する行動を解析することによって、その神経回路が担う生理的役割について明らかにする。

2. 研究の目的

光遺伝学は特定神経の活動を光で操作する新しい技術であり、複雑な神経回路の機能と動作原理の解明に大きな進歩をもたらした。この技術をさらに進化させ、次世代の光遺伝学を達成するためには、投射経路選択的遺伝子発現制御が必要となってくる。本研

究提案では、Cre リコンビナーゼやフリップパーゼ(FLPe)などの組換え酵素を経シナプ的に順行性トレーサー、もしくは逆行性トレーサー分子との融合タンパク質として発現させることで、多重選択による投射経路特異的な遺伝子発現を達成し、複数領域から入出力を受ける神経細胞に対して光遺伝学の適用を可能にする。この多重選択を用いた投射経路特異的遺伝子発現制御が実現すれば、動物個体を用いた神経回路の同定と動作原理の解明に大きく貢献出来ると考えられる。

3. 研究の方法

経シナプ的トレーサー分子である WGA (順行性)もしくは TTC (逆行性)と、組換え酵素である Cre リコンビナーゼ(Cre)もしくはフリップパーゼ(FLPe)を融合させたタンパク質(WGA-Cre, WGA-FLPe, TTC-Cre, TTC-FLPe)を発現するアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-DJ)を作成し、経路選択的な遺伝子発現を試みる。Cre と FLPe 存在下において遺伝子発現が開始される AAV ベクターを用いて、経路選択的遺伝子発現を確認する。光遺伝学もしくは、薬理遺伝学を同神経細胞に適用し、経路選択的神経活動操作を試みる。

4. 研究成果

特定領域の神経細胞にアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて Cre-TTC を発現させ、その領域に投射している領域の神経細胞に Cre 依存的に遺伝子発現を生じる AAV を感染させた。既に投射が確認されている黒質から線条体へ投射するドーパミン神経を用いた。線条体領域に Cre-TTC を発現する AAV-CMV-Cre-TTC-2A-mCherry を発現する AAV を感染させ、黒質領域に Cre 依存的に緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する AAV-CMV-FLEX-GFP を感染させた。その結果、黒質から線条体に投射する神経特異的に緑色蛍光が観察された。このことから、経シナプ逆行性に移行して機能することが確認出来た。しかしながら、移行効率が十分とは言えず、ラベルされた神経細胞の数は比較的少数であった。そこで、移行効率を高めるために以下の取り組みを行った。Cre-TTC の経シナプ逆行性輸送の効率を高めるために、細胞外への分泌効率の上昇を図り、N 末への分泌シグナルを付加した。ポストシナプスからプレシナプスへの放出効率の上昇を図り、N 末への BDNF のプロドメインを付加した。細胞質内への endosomal escape の効率上昇を図り、N 末へ TAT 配列を付加した。これらの改善によって移行効率がどの程度向上したのかについて評価を継続している。

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26件)

1. Yamashita T,* Yamanaka A, Lateral hypothalamic circuits for sleep-wake control, *Curr Opin Neurobiol*, 査読有, 44, 2017, 94-100
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095943881730051X>
2. Miyamoto D, Hirai D, Fung CC, Inutsuka A, Odagawa M, Suzuki T, Boehringer R, Adaikkan C, Matsubara C, Matsuki N, Fukai T, McHugh TJ, Yamanaka A, *Murayama M, Top-down cortical input during nrem sleep consolidates perceptual memory, *Science*, 査読有, 352, 2016, 1315-1318
doi: 10.1126/science.aaf0902.
3. Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, *Yamanaka A. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation, *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 29480
doi: 10.1038/srep29480.
4. *Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D, Direct projections from hypothalamic orexin neurons to brainstem cardiac vagal neurons. *Neuroscience*, 査読有, 339, 2016, 47-53
doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.09.038.
5. *Dergacheva O, Yamanaka A, Schwartz AR, Polotsky VY, Mendelowitz D, Hypoxia and hypercapnia inhibit hypothalamic orexin neurons in rats, *J Neurophysiol*, 査読有, 116(5), 2016, 2250-2259
doi: 10.1152/jn.00196.2016.
6. Chowdhury S, *Yamanaka A, Optogenetic activation of serotonergic terminals facilitates gabaergic inhibitory input to orexin/hypocretin neurons, *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 36039
doi: 10.1038/srep36039.
7. Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, Kuzumaki N, Yamanaka A, Morisaki H, *Narita M, Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with gi-dreadd in mice, *Mol Pain*, 査読有, 12, 2016, 1-11
doi: 10.1177/1744806916681567.
8. Branch AF, Navidi W, Tabuchi S, Terao A, Yamanaka A, Scammell TE, *Diniz Behn C, Progressive loss of the orexin neurons reveals dual effects on wakefulness, *Sleep*, 査読有, 39, 2016, 369-377
doi: 10.5665/sleep.5446.
9. Kato HE, Kamiya M, Sugo S, Ito J, Taniguchi R, Orito A, Hirata K, Inutsuka A, Yamanaka A, Maturana AD, Ishitani R, Sudo Y, *Hayashi S, *Nureki O, Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. *Nat Commun*, 査読有, 6, 2015, 7177
doi: 10.1038/ncomms8177.
10. Manita S, Suzuki T, Homma C, Matsumoto T, Odagawa M, Yamada K, Ota K, Matsubara C, Inutsuka A, Sato M, Ohkura M, Yamanaka A, Yanagawa Y, Nakai J, Hayashi Y, Larkum ME, *Murayama M, A Top-Down Cortical Circuit for Accurate Sensory Perception, *Neuron*, 査読有, 86, 2015, 1304-1316.
doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.006.
11. Mizoguchi H, Katahira K, Inutsuka A, Fukumoto K, Nakamura A, Wang T, Nagai T, Sato J, Sawada M, Ohira H, Yamanaka A, *Yamada K, Insular neural system controls decision-making in healthy and methamphetamine-treated rats, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 112, 2015, E3930-3939.
doi: 10.1073/pnas.1418014112.
12. Hososhima S, Yuasa H, Ishizuka T, Hoque MR, Yamashita T, Yamanaka A, Sugano E, Tomita H, *Yawo H, Near-infrared (NIR) up-conversion optogenetics, *Sci Rep*, 査読有, 5, 2015, 16533
doi: 10.1038/srep16533.
13. *Fuller PM, *Yamanaka A, *Lazarus M, How genetically engineered systems are helping to define, and in some cases redefine, the neurobiological basis of sleep and wake, *Temperature*, 査読有, 2, 2015, 406-417
doi: 10.1080/23328940.2015.1075095
14. Black SW, Yamanaka A,* Kilduff TS, Challenges in the development of therapeutics for narcolepsy, *Prog Neurobiol*, 2015. in press
doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.002.
15. Black SW, Morairty SR, Chen TM, Leung AK, Wisor JP, *Yamanaka A, *Kilduff TS, KILDUFF Thomas S, GABAB agonism promotes sleep and reduces cataplexy in murine

- narcolepsy, *J Neurosci*, 査読有, 34(19), 2014, 6485-6494
doi:
10.1523/JNEUROSCI.0080-14.2014
16. 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*, 査読有, 34(19), 2014, 6495-6509
doi:
10.1523/JNEUROSCI.0073-14.2014
 17. 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*, 査読有, 34(20), 2014, 6896-6909
doi:
10.1523/JNEUROSCI.5344-13.2014
 18. Miyazaki KW, Miyazaki K, Tanaka KF, Yamanaka A, Takahashi A, Tabuchi S, Doya K, Optogenetic activation of dorsal raphe serotonin neurons enhances patience for future rewards. *Curr Biol*, 査読有, 24(17), 2014, 2033-2040
doi: 10.1016/j.cub.2014.07.041.
 19. Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Lazarus M, Yamanaka A, Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons, *Neuropharmacology*, 査読有, 85, 2014, 451-460
doi:
10.1016/j.neuropharm.2014.06.0159.
 20. *Ohmura Y, Tanaka KF, Tsunematsu T, *Yamanaka A, Yoshioka M, Optogenetic activation of serotonergic neurons enhances anxiety-like behavior in mice, *Int J Neuropsychopharmacology*, 査読有, 17(11), 2014, 1777-1783
doi:
<http://dx.doi.org/10.1017/S1461145714000637>
- [学会発表](計 59 件)
1. 山中章弘, 視床下部神経活動の記録と操作による睡眠覚醒と記憶の制御機構の解明, 第 94 回日本生理学会大会, 2017.3.28, 浜松アクトシティ (浜松)
 2. 山中章弘, 視床下部神経細胞の活動記録と活動操作, 第 90 回日本薬理学会年会 2017.3.17, 長崎ブリックホール, 長崎新聞文化ホール (長崎).
 3. Yamanaka A, Hypothalamic neurons regulate sleep/wakefulness and memory, The 5th Annual IIS Symposium, 2016.12.12, Tokyo Conference Center Shinagawa (Tokyo, Japan)
 4. 山中章弘, 床下部神経細胞による睡眠覚醒、睡眠関連機能の調節メカニズム, 第 23 回日本時間生物学会学術大会, 2016.11.13, 名古屋大学 (名古屋)
 5. Yamanaka A, Hypothalamic melanin concentrating hormone (MCH) neurons inhibiting memory formation during sleep, Neuroscience 2016 Satellite Meeting, 2016.11.8, University of California, San Diego (San Diego, California, U.S.A)
 6. 犬束 歩, 山下 哲, スリカント チョドリ, 田口 徹, 山中章弘, オレキシン神経による鎮痛作用. 第 36 回鎮痛薬・オピオイドペプチシンポジウム, 2016.8.19, 北海道大学 (札幌)
 7. 山中章弘, 犬束 歩, 山下 哲, 田口 徹, ファイバーフォトメトリを用いた視床下部オレキシン神経活動の記録. 第 39 回日本神経科学大会, 2016.7.22, パシフィコ横浜 (横浜)
 8. Yamanaka A, The role of hypothalamic peptidergic neurons in the regulation of brain states, 10th FENS Forum of Neuroscience 2016, 2016.7.3, Bella Center, Copenhagen, (Denmark)
 9. 山中章弘, 視床下部神経細胞による睡眠覚醒調節と記憶の制御, 日本薬学会第 136 年会, 2016.3.29, パシフィコ横浜 (横浜)
 10. 山中章弘, 視床下部ペプチド作動性神経細胞による睡眠覚醒と記憶の制御, 第 93 回日本生理学会大会, 2016.3.24, 札幌コンベンションセンター (札幌)
 11. 山中章弘, 犬束 歩, 山下 哲, オレキシン神経の活動操作と運命制御による痛み知覚における役割, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016.3.10, パシフィコ横浜 (横浜)
 12. 山中章弘, 睡眠覚醒調節と睡眠関連脳機能の制御メカニズムについて, 千里ライフサイエンスセミナー, 2016.2.26, 千里ライフサイエンスセンター (豊中)
 13. Yamanaka A, Hypothalamic peptidergic neurons regulates sleep/wakefulness and memory. International Symposium Optogenetics 2015, 2015.12.4, 東京医科歯科大学 (東京)
 14. 山中章弘, 犬束 歩, 山下 哲, 丸ごと動物を用いた特定神経の活動操作と活動記録, 第 42 回日本神経内分泌学会,

- 2015.9.18、仙台市戦災復興記念館（仙台）
15. 山中章弘、常松友美、伊澤俊太郎、上野貴文、大村 優、寺尾 晶、睡眠と記憶の調節に関わる視床下部神経の役割、第38回日本神経科学大会、2015.7.29、神戸国際会議場、国際展示場（神戸）
 16. 山中章弘、How does the brain regulate sleep/wakefulness? RIKEN BSI Summer Program Lecture Course, 2015.7.22, RIKEN BSI（和光）
 17. 山中章弘、犬束 歩、山下 哲、神経活動操作と運命制御を用いた睡眠関連機能の解析、日本睡眠学会第40回定期学術集会、2015.7.3、栃木県総合文化センター、宇都宮東武ホテルグランデ（宇都宮）
 18. 山中章弘、Manipulation of specific neurons using optogenetics or pharmacogenetics、第56回日本神経学会学術大会 2015.5.22、朱鷺メッセ、ホテル日航新潟（新潟）
 19. Yamanaka A、Study of neuroendocrine system in hypothalamus using optogenetics and pharmacogenetics, Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism, 2015.5.1, Sheraton Grand Walkerhill Hotel (Seoul, Korea)
 20. 山中章弘、犬束 歩、常松友美、山下 哲、光遺伝学・薬理遺伝学を用いた内分泌研究、第88回日本内分泌学会学術総会、2015.4.24、ホテルニューオータニ（東京）
 21. 山中章弘、オレキシンの基礎的なメカニズム、第88回日本薬理学会年会、2015.3.19、名古屋国際会議場（名古屋）
 22. 山中章弘、リズムと本能行動調節のメカニズム、第92回日本生理学会大会、2015.3.22、神戸国際会議場（神戸）
 23. 山中章弘、犬束 歩、山下 哲、特定神経活動操作による神経回路機能の解明、第88回日本薬理学会年会、2015.3.18、名古屋国際会議場（名古屋）
 24. 山中章弘、光遺伝学を用いた行動発現制御、大阪大学蛋白質研究所セミナー「光運動反応・光センサー蛋白質・光遺伝学」、2015.3.11、大阪大学（吹田）
 25. 山中章弘、光遺伝学を組み合わせた多角的解析による本能行動調節機構の解明、第6回日本安全性薬理研究会学術年会、2015.2.21、東京大学（東京）
 26. 山中章弘、光遺伝学、薬理遺伝学を用いた神経活動操作による行動発現機序解明、第58回「脳の医学・生物学研究会」、2015.1.10、名古屋大学（名古屋）
 27. 山中章弘、光遺伝学、薬理遺伝学を用いた行動発現メカニズムの解明、第2回包括的神経グリア研究会、2015.1.11、オースプラザ（名古屋）
 28. 山中章弘、オプトジェネティクスを用いた覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠の制御、第35回日本レーザー医学会総会、2014.11.30、京王プラザホテル（東京）
 29. 山中章弘、光遺伝学を用いた精神神経薬理研究、第44回日本神経精神薬理学会、2014.11.21、名古屋国際会議場（名古屋）
 30. 山中章弘、機能的コネクトームによる本能行動制御に関わる神経機構の解明、第37回日本神経科学大会、2014.9.12、パシフィコ横浜（横浜）
 31. 山中章弘、犬束 歩、常松 友美：覚醒-ノンレム睡眠-レム睡眠調節における視床下部メラニン凝集ホルモン産生神経の役割、第37回日本神経科学大会、2014.9.12、パシフィコ横浜（横浜）
 32. 山中章弘、Manipulation of neural activity and behavior control、第37回内藤コンファレンス、2014.7.16、ヒルトンニセコビレッジ（ニセコ）
 33. 山中章弘、睡眠覚醒調節におけるオレキシン神経の役割、日本睡眠学会第39回定期学術集会、2014.7.4、あわぎんホール（徳島）
- 〔図書〕(計8件)
1. 山中章弘、睡眠科学 最新の基礎研究から医療・社会への応用まで、2016（112-123）
 2. 山中章弘、田淵紗和子、コメディカル専門基礎科目シリーズ 生理学、2016（45-64）
 3. 山中章弘、朝倉書店、光と生命の事典、2016（136-137）
 4. 犬束歩、山中章弘、化学同人、分子脳科学 分子から脳機能と心に迫る、2015（171-180）
 5. Yamanaka A、他、Orexin and Sleep. Springer, 2015（81-92）
 6. Yamanaka A、他、Springer Japan, Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications, 2015(241-248)
 7. Yamanaka A、他、Springer Japan, Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications, 2015(249-264)
 8. 犬束歩、山中章弘、南山堂、プロGRESS生命科学、2014（116-118）
- 〔産業財産権〕
- 出願状況（計1件）
- 名称：投射経路選択的な遺伝子発現制御
 発明者：山中章弘、犬束歩
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願 2014- 93463
 出願年月日：平成 26 年 4 月 30 日
 国内外の別：国内

取得状況（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：同上

種類：特許

番号：特許第 5871304 号

取得年月日：平成 28 年 1 月 22 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/drof1/nr/index.html>

6 . 研究組織

(1) 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