

令和 元年 7 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14326

研究課題名(和文) 情動におけるアストロサイトGPCRシグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Astrocytic control of behavior by optogenetic GPCR activation

研究代表者

岩井 陽一 (Iwai, Youichi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40332332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトはG蛋白質共役型受容体(GPCR)を発現し、集中時や新規環境下で放出される神経調節物質群に強く応答するが、アストロサイトのGPCRの生体内の機能はほとんど検証されていない。光感受型のGq-GPCRをアストロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを樹立し、覚醒時に光活性化したところ、ニューロン活動が一過的に低下した。自由行動下での光活性化は、アデノシンA1受容体依存的に運動性を低下させ、物体の長期記憶を増強した。これらの表現型は新規環境下で誘導される現象と似ていることから、アストロサイトのGq-GPCR活性化は新規環境への適応を誘導するシグナルに相当することが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集中時や新規環境下で放出されるノルアドレナリン等の神経調節物質はアストロサイトのGPCRを強く活性化することから、アストロサイトが情動や記憶を制御する可能性が示唆されている。しかしながら、これらのGPCR群はニューロンでも発現しているため、アストロサイト特異的な機能は不明であった。

本研究は高い時間・空間制御能をもつ光遺伝学的手法でこの課題に取り組み、アストロサイトのGq型GPCRシグナルが新規環境への適応を促進し、長期記憶を増強することを示唆した。アストロサイト内のGPCRシグナルは加齢や神経疾患で異常になることが示唆されており、本研究で得られた新知見は社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes exhibit prominent and synchronized Ca²⁺ elevations in wide cortical regions in response to salient stimulations. This Ca²⁺ elevation is Gq-type adrenergic receptor-dependent and represents a major astrocytic Ca²⁺ signal in awake conditions. However, its impact on animals' behavior remains unknown.

To directly address this issue, we generated transgenic mice in which an optically activatable Gq-GPCR is selectively expressed in astrocytes and confirmed that astrocytic Ca²⁺ elevation was triggered by brief light illumination. Transient astrocytic Gq-activation inhibited neuronal activity and reduced locomotor activity via adenosine A1 receptor. Optogenetic activation in anterior cortex enhanced long-term object recognition memory, whereas short-term memory was not affected. These phenotypes resemble effects induced by novel-experience. Thus, astrocytic Gq-activation may represent a novelty-driven signal that is sufficient to induce behavioral adaptation to novel events.

研究分野：神経科学

キーワード：グリア光遺伝学 記憶・学習 情動 Gタンパク質共役型受容体(GPCR) アストロサイト グリア-ニューロン相互作用 記
神経調節物質 新規環境

1. 研究開始当初の背景

(1) アストロサイトは最も数の多いグリア細胞であり、その突起でシナプスおよび血管を覆う。アストロサイトは電気的な活動をほとんど示さないが、多様な G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を介して外界の刺激に応答し、カルシウム等の細胞内シグナル分子を変動させる。近年、集中時や新規環境下で放出されるノルアドレナリンやアセチルコリンなどの神経調節物質がアストロサイトの GPCR を強く活性化することが示され (Takata et al. 2011 J Neurosci; Ding et al. 2013 Cell Calcium; Paukert et al. 2014 Neuron)、アストロサイトが情動や記憶を制御する可能性が示唆されている。しかしながら、これらの GPCR 群の多くはニューロンでも発現しているうえ、アストロサイト特異的な機能解析はこれまでにほぼ皆無であるため、アストロサイトの GPCR シグナルの生体内機能は不明であった。

(2) GPCR シグナルをアストロサイト特異的に操作するために、高い時間・空間制御をもつ光遺伝学的手法は有用である。光感受性を有する Gq 型の GPCR (OptoGq) はニューロンの活性化に使用されていた (Airan et al. 2009 Nature) が、アストロサイトへの適用は報告されていなかった。そこで本研究を開始するにあたり、OptoGq をアストロサイト特異的に発現するトランスジェニック (TG) マウスを複数系統樹立し (図 1)、光照射によって、OptoGq 陽性のアストロサイト内でカルシウム上昇を速やかに誘導できることを確認した (図 2)。

2. 研究の目的

(1) これまでのアストロサイトの研究は主に脳スライスを用いて行われてきた。アストロサイト内のカルシウム上昇がシナプス伝達を調節することが脳スライスにおいて示唆されている (Henneberger et al. 2010 Nature) が、この結論を否定する報告もあり (Agulhon et al. 2010 Science)、論争が続いている。アストロサイトは損傷に敏感に反応し、性質を変えてしまうこと、さらに、脳スライスではアストロサイトと血管との相互作用も失われることから、本研究は生体内でアストロサイトの GPCR を活性化し、その機能を追究した。

(2) アストロサイトの GPCR シグナルの行動への影響はほとんど検証されていないので、本研究は自由行動下で光活性化し、アストロサイト GPCR シグナルの情動や記憶における役割を追究した。

(3) アストロサイトは Gq 型だけでなく、Gs 型や Gi/o 型の GPCR も発現する。アストロサイトの Gs 型および Gi/o 型の GPCR シグナルの研究は少ないので、本研究はこれらの GPCR を光遺伝学的に活性化できる系の確立もすすめた。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトで選択的に発現するグルタミン酸トランスポーター1 の BAC DNA に OptoGq-EYFP あるいは OptoGs-EYFP の cDNA を挿入したコンストラクトを構築し、各々の TG マウスを複数系統樹立した。各系統で EYFP の発現強度および細胞種特異性を抗体染色で調べた。

(2) 麻酔下の OptoGq TG マウスおよび OptoGs TG マウスの大脳皮質において、カルシウム感受性色素の Rhod-2 をアストロサイトに取り込ませて、光照射時のアストロサイトのカルシウムイメージングを二光子顕微鏡下で行った。

(3) OptoGq TG マウスの大脳皮質において、カルシウムセンサーの R-GECO をニューロン特異的に発現させ、覚醒時ニューロンのカルシウムイメージングを二光子顕微鏡下で行った。

(4) OptoGq TG マウスの前頭野上の頭蓋骨に無線 LED 装置 (Iwai et al. 2011 Neurosci Res) を装着した後、自由行動下で LED 照射し、オープンフィールド試験、Y 迷路試験、および、物体認識試験を行った。

4. 研究成果

(1) ニューロンおよびグリア細胞種のマーカーを免疫標識する実験から、アストロサイト特異的に OptoGq を発現する TG マウスを複数系統選別した (図 1)。同様の実験で OptoGs をアストロサイト特異的に発現する TG マウス系統も選別した。各々の系統で EYFP の発現量および陽性アストロサイトの割合が異なっていた。

(2) OptoGq TG マウスにおいて、アストロサイト内の Rhod-2 シグナルは光照射後数秒以内に顕著な上昇を示した (図 2 上段)。光照射強度を高めると、OptoGq 陽性のアストロサイト内のカルシウム上昇に続いて、周囲の OptoGq 陰性のアストロサイト内にもカルシウム上昇が生じた (図 2 下段)。このアストロサイト間のカルシウム上昇の伝搬は TTX で神経活動を阻害しても認められた。

OptoGs TG マウスにおいても光照射にともないアストロサイト内で Rhod-2 シグナルが上昇した。このカルシウム上昇は OptoGq TG マウスで光誘発されるカルシウム上昇より遅れることから、それぞれ TG マウスで異なるシグナル経路を光活性化していることを支持する。

(3) 覚醒時の OptoGq TG マウスにおいて、ニューロン内の R-GECO のシグナルが光照射後一過的に減少することを観測した。このニューロン活動の抑制はアデノシンの A1 受容体に依存することを薬理的に示した (図 3)。

(4) 3 分おきに LED を経頭蓋照射し、オープンフィールド試験を行ったところ、OptoGq TG マウスで移動距離が徐々に短くなった。この運動性の低下もアデノシンの A1 受容体に依存することを薬理的に示した。物体の記憶

を評価する物体認識試験を行ったところ、OptoGq TG マウスは LED 照射時に提示した物体を長期間記憶していることを示唆する結果を得た(図 4)。その一方、Y 迷路で評価される作業記憶は TG マウスで変化しなかった。以上の結果は、アストロサイトの Gq 型 GPCR シグナルの活性化は A1 受容体依存的に周囲のニューロンの活動を抑制し、記憶の長期化に寄与することを示唆している。新規環境の提示はノルアドレナリンを放出させ、同様の神経活動の抑制、新規環境への慣れ行動および記憶の長期化を促進することが示唆されている。従って、新規環境下で活性化されるアストロサイトの Gq 型 GPCR シグナルは、新規環境への適応を誘導するシグナルに相当することが示唆される。

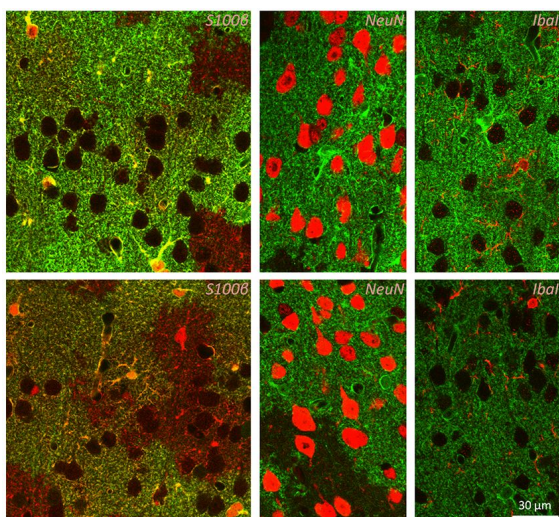


図 1. OptoGq をアストロサイトで選択的に発現する TG マウス
OptoGq-EYFP を約 80%のアストロサイトで強く発現する系統(上段)と約 50%のアストロサイトで弱く発現する系統(下段)。
EYFP の蛍光シグナル(緑)はアストロサイトマーカーの S100β の免疫シグナル(赤)と重なるが、ニューロンマーカーの NeuN およびミクログリアマーカーの Iba1 の免疫シグナル(赤)とは重ならない。

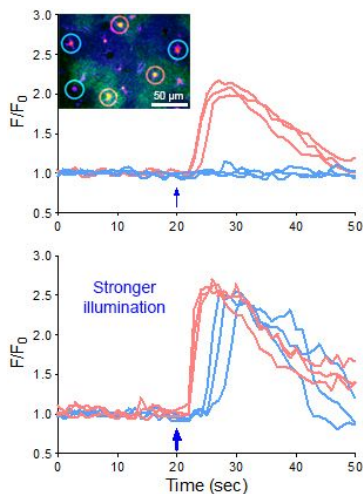


図 2. OptoGq TG マウスの光照射によるアストロサイトの活性化

(上段) 麻酔下で青色光を 1 秒間照射する()と、挿入図の OptoGq-EYFP 陽性のアストロサイト(赤丸)内で、カルシウム感受性色素 Rhod-2 の蛍光シグナルが上昇したが、OptoGq-EYFP 陰性のアストロサイト(青丸)内の Rhod-2 シグナルは変化しなかった。
(下段) 光照射強度を高くすると、OptoGq 陽性アストロサイト内での Rhod-2 シグナルの上昇に続いて、周囲の OptoGq 陰性アストロサイト内でも Rhod-2 シグナルが上昇した。

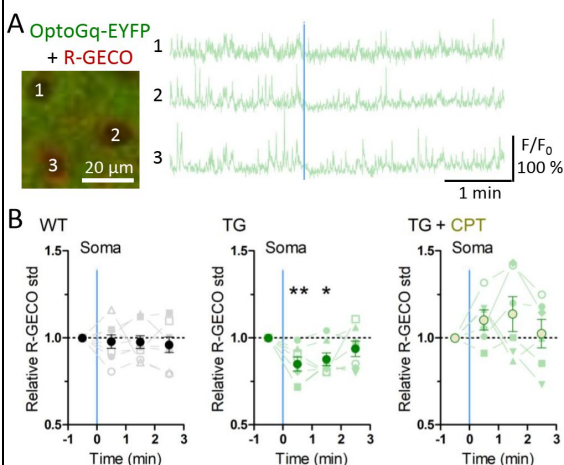


図 3. OptoGq TG マウスの光活性化によるニューロン活動の抑制

(A) OptoGq TG マウス的大脑皮質を覚醒時に 1 秒間青色光で照射すると、1、2 および 3 のニューロン内で、カルシウムセンサー R-GECO のシグナルの強度と標準偏差が減少した。
(B) 野生型 (WT) マウスでは光照射によって細胞体の R-GECO の標準偏差 (std) は変化しないが、OptoGq TG マウスでは光照射後 0-1 分および 1-2 分に R-GECO std が低下した。アデノシン A1 受容体の阻害剤 (CPT) を投与した TG マウスでは、光照射による R-GECO std の低下が認められない。グレーおよび薄緑のシンボルは WT マウスおよび TG マウスの各個体を示し、黒、緑および金色のシンボルとエラーバーは個体の平均値と標準誤差を示す。

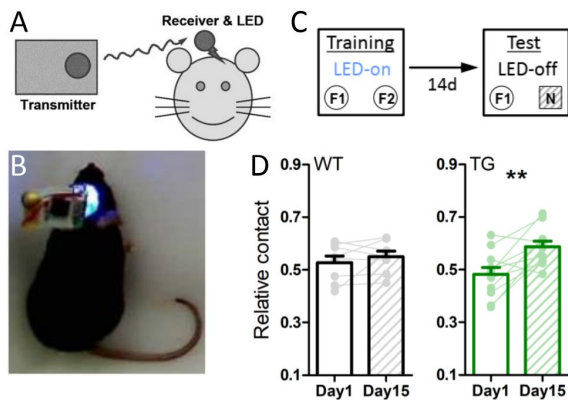


図 4. OptoGq TG マウスの光活性化による物体認識記憶の長期化。

(A) 開発した無線 LED 装置のデザイン。

(B) 無線 LED を前頭野の頭蓋骨に装着した OptoGq TG マウス。

(C) 初日 (Day1) に 2 つの同一物体 (F_1 と F_2) を置いたチャンバーに野生型 (WT) マウスあるいは OptoGq TG マウスを 10 分間入れ、3 分おきに LED を経頭蓋照射した。14 日後 (Day15) に右側の物体 F_2 を新規の物体 N に換えて、LED 照射をせずにマウスを 10 分間チャンバーに入れた。

(D) WT マウスでは、新規物体 N への相対接触時間に有意な増加はなく、Day15 には物体 F_1 の記憶がなくなっていると解釈できる。TG マウスでは、新規物体 N への相対接触時間が長くなっており、Day15 まで物体 F_1 の記憶が保持されていると解釈できる。グレーおよび薄緑のシンボルは WT マウスおよび TG マウスの各個体を示し、黒および緑のバーとエラーは個体の平均値と標準誤差を示す。

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 2 件)

Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain.

Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H.

Nat Commun. 7, 11100. (2016).

査読有. DOI: 10.1038/ncomms11100.

拡散性伝達によるアストロサイトの活性化。

岩井 陽一, 平瀬

生体の科学. 66, 551-554 グリア研究の最先端. (2015).

査読無.

〔学会発表〕(計 1 件)

Rapid astrocytic control of neural

activity by optogenetic Gq-coupled receptor activation *in vivo*.

Iwai Y, Ozawa K, Yahagi K, Sato S, Hirase H.

Society for Neuroscience meeting, San Diego (2016 Nov)

〔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：
出願年月日：
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

岩井 陽一 (Iwai Youichi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：4 0 3 3 2 3 3 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：