

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570082

研究課題名（和文）

光活性化興奮能の移植による単一ニューロンの行動レベルでの機能探究

研究課題名（英文）

Study on functional roles of a single neuron in animal behaviors by functional transplant of channel rhodopsin 2

研究代表者

長濱 辰文（NAGAHAMA TATSUMI）

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：70145001

研究成果の概要（和文）：

海産動物アメフラシの口球神経節内の同定 MA ニューロンへクラミドモナス由来のチャンネルロドプシン2（ChR2）を機能移植し、MA の摂食神経回路網内での機能的役割を調べた。実験では MA 細胞体へ ChR2 発現ベクター（pNEX-ChR2）を導入後、20℃で3日間培養した。MA 細胞体領域を明るい青色光（100W キセノンランプ）で刺激すると、ほとんどのシナプス後ニューロンで脱分極応答が記録された。MA は多くのシナプス後ニューロンと電気シナプスに加えて抑制性結合をしていることから、今回の結果はこれまでの電気生理学的データと一致しない。ChR2 は細胞全体に発現するため明るい光刺激は細胞全体を脱分極させるであろう。すると、本来、細胞体近傍で発生した活動電位が軸索側の脱分極でその伝導が抑制されて末端まで伝わらず、電気シナプスによる脱分極応答のみが発現した可能性がある。そこで、青色レーザー光源を用いたビーム径（10 μm）の小さな光刺激を MA 細胞体の一部に与えて調べたところ、予想されるほとんどのニューロンで IPSP を記録することができた。さらに本実験では、MA 細胞体に長時間の強い光刺激やレーザービームを与えるとリズムカルな応答が MA やその他のニューロンに誘発されることがわかり、MA は潜在的にこのような能力があることが予想された。本研究の結果、この方法では適切な光刺激を行わないと本来の生理現象とは異なる応答が得られる危険性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present experiments we attempted functional transplant of a channel rhodopsin 2 (ChR2) isolated from *Chlamydomonas* into the identified MA neuron in *Aplysia* buccal ganglia, and explored the functional roles of the MA in the feeding neural circuit. The preparations were incubated at 20 °C for 3 days after injection of the ChR2 expression vector (pNEX-ChR2) into the cell body of MA. When the cell body region of the MA was illuminated with bright blue light (100W Xenon lamp), the depolarizing responses were recorded in most of the postsynaptic follower neurons. This result was inconsistent with the electrophysiological data where the MA connects many follower neurons with inhibitory chemical synapses in addition to the electrical synapses. ChR2 tends to be expressed over the whole cell membrane and the bright light stimulation will depolarize the whole cell. Then there may be a possibility that the conduction of action potentials produced near the cell body might be suppressed in the axonal region and we can observe the electrically coupled depolarization alone. We stimulated the small region on the MA cell body with the fine spotlight (10 μm diameter) produced by the blue laser beam and could record the IPSPs in most of the followers then. In addition, the rhythmic bursting responses were produced in the MA or the other buccal neurons when the MA cell body was illuminated with the long-lasting bright light or the fine spotlight, suggesting the potentiality of the MA to produce such rhythmic responses. The present study will propose that unsuitable light stimulation will produce the responses different from the living phenomena in the functional transplant of ChR2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、動物生理・行動

キーワード：神経行動

1. 研究開始当初の背景

(1) 単細胞藻類から単離されたチャンネルロドプシン 2 (ChR2) 遺伝子を哺乳動物中枢の特定のニューロン群に導入し、光刺激によりそれらニューロンを興奮させることに Nagel らのグループが成功していた。

(2) 私達の研究室では、長年、無脊椎動物アメフラシの食物嗜好性行動を発現させる中枢メカニズムを調べ、行動発現で重要な機能を果たすと思われるいくつかのニューロンを発見していた。

(3) 私達の研究室ではアメフラシニューロンへの遺伝子導入として、すでにK<sup>+</sup>チャンネルなどの発現に成功した発現ベクター、pNEX を用いることができた。

2. 研究の目的

哺乳動物では、ChR2 を特定のニューロン群に発現させ、光刺激によりそれらニューロンを興奮させることに成功した。この方法が将来的に臨床面で利用できる可能性があることから大規模に研究が進められているが、光刺激により神経回路網内で多数のニューロンを活動させるには、同時に多数のニューロンへの遺伝子導入が必要である。一方、細胞数が少なく単一ニューロンが重要な機能を果たす無脊椎動物では、1個、または少数のニューロンだけに遺伝子導入をすれば、それだけで光刺激による行動変化などが容易に発現し、この方法を用いてニューロンの行動レベルでの機能を容易に調べることができる。

私達の研究室では、長年、無脊椎動物アメフラシの食物嗜好性行動を発現させる中枢メカニズムを調べ、行動発現で重要な機能を果たすと思われるいくつかのニューロンを発見した。しかしこれらは単離した中枢-末梢系を用いた実験から類推するもので、実際の行動レベルにおける機能は推測の域を出ていない。そこ

で本研究では、まず ChR2 遺伝子を発現ベクターに組み込み、アメフラシニューロンに導入し、ChR2 をニューロン細胞膜に過剰発現させる。この時、光刺激によりニューロンを興奮させる最適な ChR2 の発現や光刺激の条件を決定する。その後、食物嗜好性行動の発現に貢献すると考えられているニューロンに ChR2 を発現させる。第一段階では単離した中枢系で光刺激を行ってターゲットニューロンの活動性をチェックし、最終的には手術による遺伝子導入を行い、自由行動下、光刺激に伴う動物の行動変化よりニューロンの機能を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

連携研究者の高橋グループが ChR2 遺伝子のアメフラシニューロン発現ベクター pNEX への組み込みを行い、長濱グループがアメフラシ神経節内のニューロン細胞体に pNEX-DNA (マーキング用色素含有) を微小電極から圧注入で導入した。イオン組成を海水に近付けた L15 培養液 (SL15) 中で神経節を暗条件下で数日間培養し、マーキングしたニューロンに赤色条件下、電極を再度刺入し、青色光刺激を適時与え、刺激に応じて脱分極応答が発現するかどうかを調べた。刺激には、光源としてキセノンランプを用い青色フィルターを介した既存の光刺激装置 (ビーム径は 1 mm 程度) を用いた。最初は単離したアメフラシ神経節で実験を行い、その後、動物の麻酔手術により特定ニューロンへ遺伝子を導入し、光刺激にともなう行動変化から特定ニューロンの行動レベルにおける機能を探索する予定であった。

4. 研究成果

まず 2009 年度は、ChR2 遺伝子導入により光刺激で興奮性応答が発現する最適な条件を探すことから実験を始めた。その

結果、次のようなことがわかった。

1) 遺伝子導入・培養の条件：pNEX-DNAの導入量と培養条件の検討を行った。導入DNA濃度は他の遺伝子導入時と同様、 $1 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ 程度で良かったが、培養日数が2日以内では外液へのレチナール添加が必要であった。一方、3日以上培養ではレチナール添加は不要であることもわかった。そこで実験は3日間培養で行うことにした。

2) 光刺激の条件：最適な興奮性が得られる刺激光の強度、波長特性を調べたところ青色光では非常に明るい光（キセノン100ワット光源）でのみ応答が見られ、培養後の赤色安全光での操作は不要であることが明らかとなった。また、熱フィルターを介した白色光の方が青色光よりも明らかに大きな応答が得られた（図1）。

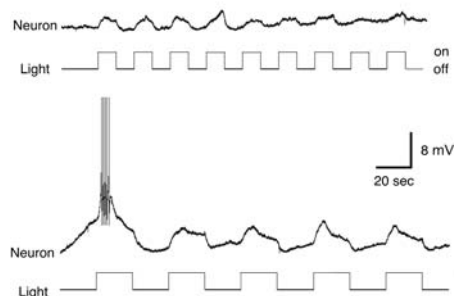


図1 ChR2遺伝子を導入したアメフラシ口球神経節ニューロンにおける光刺激応答

3) 外液条件：アメフラシニューロンの電気生理学実験は、通常、体液組成に近い人工海水中で行うが、これまでChR2が良く使われている哺乳動物に比べてイオン強度が極めて高い。そこでこのような条件におけるChR2の各種イオンに対する透過性を膜電位固定法を用いて調べた。この結果、ChR2の陽イオンチャンネルを透過するイオン種はナトリウムが主で、カルシウムはほとんど透過しないことがわかった（図2、図3）。この結果、ニューロン回路網の研究を目的としたカルシウム濃度を様々に変えた外液を用いてもChR2がほとんど影響を受けないことが明らかになった。

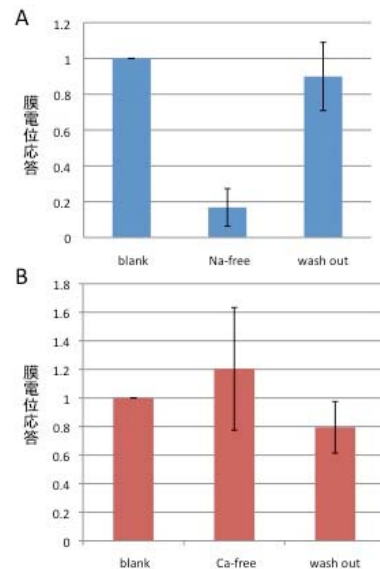


図2 外液 (blank) からナトリウムイオン (A)、カルシウムイオン (B) を除去した時の光刺激による膜電位応答の変化

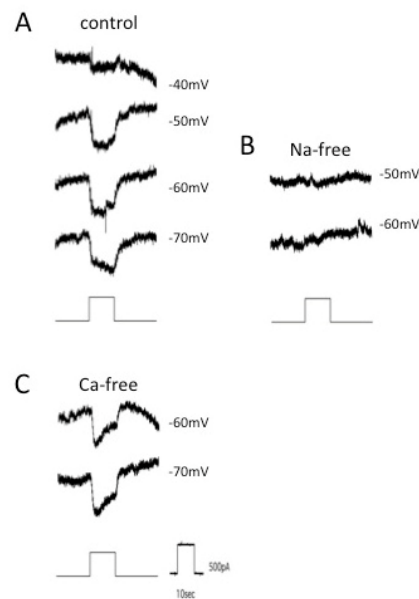


図3 Control, Na-free, Ca-free条件において様々な膜電位固定下、光刺激により得られた電流応答

2010年度は、すでに私達が同定しているMAニューロン細胞体にChR2遺伝子を導入した。このニューロンは口球神経節内の様々なニューロンにシナプス結合をしており、光刺激によりシナプス後ニューロンでMA由来のシナプス応答が期待できた。その結果、

4) 口球神経節のMAニューロン細胞体を

中心とする光刺激により、口球神経節内の様々なニューロンに MA ニューロン由来と考えられるシナプス応答が発現した。しかしながら、その応答はほとんどが脱分極応答であり、電気生理学的に調べた MA のシナプス後ニューロンがほとんど抑制性入力を受けていることと大きな食い違いが見られた。MA が抑制するニューロンへは、化学シナプスによる IPSP に加えて、電気的カプリングが存在することが多い。そこで今回の結果は、ChR2 が MA の細胞全体に発現することにより、光刺激により軸索部も同時に脱分極し、細胞体部からの活動電位により発現する IPSP を遮蔽している可能性を示唆した。

5) そこで、MA 細胞体への光刺激で抑制性応答がうまく発現したニューロンで、MA の細胞体を破壊して再度応答を調べたところ、過分極成分が減少して脱分極成分が多くなった (図 4)。

このような結果は、細胞体が欠落することにより軸索末端部のみが刺激されて脱分極し、電気的カプリングが主に観察されるように変化したものと考えられた。そこで、細胞体部分のみを局所的に刺激するため、次年度は光照射にビーム径の小さなレーザー光を用いることにした。

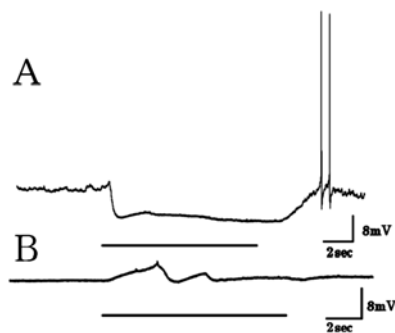


図 4 MA ニューロン細胞体破壊前 (A)、破壊後 (B) における同一の神経節ニューロンの光刺激応答

6) MA ニューロン細胞体を中心とする領域に数十秒間の長い光刺激を行うと、その間、MA および他のニューロンにリズムカルな活動が誘発されることがわかった (図 5)。このような応答は、MA に刺入した微小電極から電流を流して長時間 MA を発火させても普段は発現しない。そこでこの応答が、ChR2 の細胞全体にわたる脱分極効果によっている可能性がある。そこで、次年度は 5) と同様にビーム径の小さな光刺激を MA 細胞体部のみを与えて更に詳しく調べてみることにした。

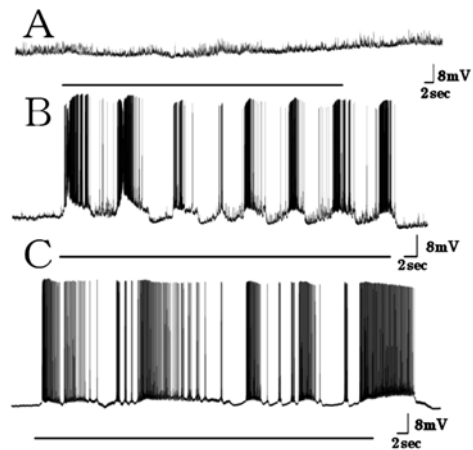


図 5 ChR2 未発現 (A)、発現 (B) MA ニューロンにおける長時間の光刺激応答。(C) は ChR2 発現 MA ニューロンの隣で電気的カプリングがある別の MA ニューロンの応答 ((A)、(B) とは別の動物からの結果)

2011 年度も MA ニューロン細胞体に ChR2 遺伝子を導入し、光刺激に伴う様々なニューロンからの応答を調べたが、今年度は光刺激用にビーム径の小さな (約  $10 \mu\text{m}$ ) レーザー刺激装置を作成し、MA ニューロン細胞体部への局所刺激を行った。7) 前年度の実験で、たとえ MA ニューロン細胞体を中心として照射してもビーム径の太い光刺激では軸索部も同時に刺激してしまい、結果としてシナプス後ニューロンで MA からの本来の IPSP 応答が観察されないことがわかった。そこで、ビーム径の小さなレーザー刺激装置を用いて、MA ニューロン細胞体部のみへの局所刺激を行った。その結果、光刺激により明確な抑制性応答が得られることがわかった。また神経線維部への刺激ではほとんど応答が発現しなくなった。(図 6)。

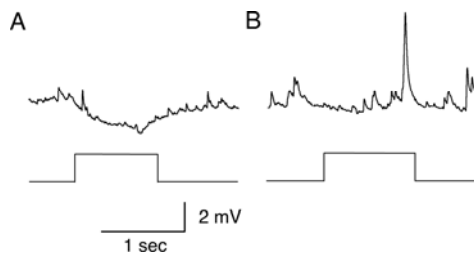


図 6 ビーム径の小さな光刺激を MA ニューロンの細胞体部、および神経線維部へ与えた時の同一神経節ニューロンの応答

8) 前年度見いだされた、MA ニューロン細胞体領域への数十秒の長い光刺激により MA および他のニューロンに誘発されるリズムカルな活動についてさらに調べた。7) と同様に、レーザー刺激装置で細胞体部のみへ局所光刺激を行ってもニューロンにはや

はりリズムカルな応答が誘発され、MAニューロンは潜在的にリズムカルな応答を形成する能力があることが示唆された。しかしながら、この能力が普段の行動発現で実際に発揮されているかはさらに詳細に調べる必要がある。

本研究の結果、ChR2 遺伝子の特定単一ニューロンへの導入により光刺激でそのニューロンを興奮させた場合、光刺激の方法によりシナプス後ニューロンの応答に差が見られることがあり、またこれまでの電気刺激を用いた実験では得られなかった応答がでる可能性も示唆された。そこで、最近の脊椎動物での ChR2 法の広範な使用にあたり、その光刺激法や応答の解釈では十分な注意が必要であると考えられる。

本研究の後半では、光刺激を局所的に行うため、青色レーザーを光源とするビーム径の細い(約 10  $\mu$ m) 刺激装置を作成した。特注であったため、設計から完成までに長時間を費やして研究の遂行が遅れる結果を招いてしまったが、一応、疑問点を明らかにすることができた。当初、MAニューロン以外のニューロンにも遺伝子導入を行ってそれら機能を調べたり、手術による遺伝子導入を行い、自由行動下、光刺激に伴う動物の行動変化よりニューロンの機能を探索したりする予定でいたが、時間の制約上でできなかった。予想外の問題点が見つかったため、未だ本研究の成果報告は行っていないが、今後も ChR2 発現ニューロンの光刺激法についての問題点、注意点を単純な中枢神経系であるアメフラシを用いて詳しく調べ、適当な時点で報告するつもりである。

#### 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 6 件)

- ① Narusuye, K. and Nagahama, T.  
Activity changes of buccal motor neurons induced by egg laying hormone contribute to the feeding suppression in *Aplysia kurodai*. *Comp. Physiol. Biochem.* 査読無 28, 2011, S175  
DOI:10.3330/hikakuseiriseika.28.S31
- ② Narusuye, K. and Nagahama, T.  
Activity changes of jaw-closing motor neurons induced by egg laying hormone contribute to the feeding suppression during reproductive periods. *Neurosci. Res.* 査読無 68 S1, 2010, e391  
DOI:10.1016/j.neures.2010.07.1734
- ③ Hamaguchi, A., Fukuzawa, S.,

Ishigami, A., Narusuye, K., Takahashi, R., Nagahama, T.  
Accumulation of amyloid  $\beta$ -like substances in aging *Aplysia kurodai* CNS. *Neurosci. Res.* 査読無 68 S1, 2010, e302-303  
DOI:10.1016/j.neures.2010.07.1343

- ④ Narusuye, K. and Nagahama, T. Effects of egg laying hormone on identified feeding neural elements of buccal ganglion in *Aplysia kurodai*. *J. Physiol. Sci.* 査読無 59 Suppl.1, 2009, 482
- ⑤ Nagahama, T., Fujimoto, K., Takami, S., Kinugawa, A., Narusuye, K. Search for amino acid components of seaweeds inducing *Aplysia* food preference. *Neurosci. Res.* 査読無 65, 2009, S210  
DOI: 10.1016/j.neures.2009.09.1162
- ⑥ Nagahama, T., Fujimoto, K., Takami, S., Kinugawa, A., Narusuye, K. Effective amino acid composition of seaweeds inducing food preference behaviors in *Aplysia kurodai*. *Neurosci. Res.* 査読有 64(3), 2009, 243-250  
DOI: 10.1016/j.neures.2009.03.007

[学会発表] (計 8 件)

- ① Narusuye, K. and Nagahama, T.  
Activity changes of buccal motor neurons induced by egg laying hormone contribute to the feeding suppression in *Aplysia kurodai*. 8<sup>th</sup> International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (ICCPB2011) June 3, 2011, Nagoya.
- ② 浜口亜也、福澤翔太、石神昭人、成末憲治、高橋良哉、長濱辰文 アメフラシ中枢において老化とともに蓄積するアミロイド  $\beta$  様物質 第 33 回日本神経科学大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 3 日、神戸
- ③ 成末憲治、長濱辰文 産卵期の摂食量減少に関わる産卵ホルモンによる閉口運動ニューロンの活動変化 第 33 回日本神経科学大会 (Neuro2010)、2010 年 9 月 4 日、神戸
- ④ 福澤翔太、成末憲治、長濱辰文 老化アメフラシで見られる摂食障害へのアミロイドベータ関与の可能性 第 32 回日本比較生理生化学会大会、2010 年 7 月 19 日、福岡
- ⑤ 浜口亜也、福澤翔太、石神昭人、成末憲治、高橋良哉、長濱辰文 アメフラシ中枢への老化に伴うアミロイドベータ ( $A\beta$ ) 様物質の蓄積 第 31 回日本比較生理生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、大阪

- ⑥ 加藤啓文・成末憲治・長濱辰文 電気穿孔法によるアメフラシ口球神経節sクラスターの機能解明 第31回日本比較生理生化学会大会、2009年10月23日、大阪
- ⑦ 長濱辰文、藤本季世、高見重美、衣川亜衣子、成末憲治 アメフラシの食物嗜好性行動を誘発する海藻アミノ酸成分の探索 第32回日本神経科学大会、2009年9月18日、名古屋
- ⑧ Narusuye, K. and Nagahama, T.  
Effects of egg laying hormone on identified feeding neural elements of buccal ganglion in *Aplysia kurodai*. 36<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences. July 31, 2009, Kyoto.

[図書] (計1件)

- ① 和田義親、瀧澤誠、中川弘一、長濱辰文、溝口規幸著、培風館、基礎物理学 (薬学生のための基礎シリーズ3)、2011、234

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長濱 辰文 (NAGAHAMA TATSUMI)  
東邦大学・薬学部・教授  
研究者番号：70145001

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

高橋 哲男 (TAKAHASHI TETSUO)  
東邦大学・薬学部・教授  
研究者番号：90133769

黒田 潤 (KURODA JUN)  
東邦大学・薬学部・助教  
研究者番号：70287548