

機関番号：63904

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21680028

研究課題名 (和文) 光活性化型チャンネルとポンプを用いた神経回路-行動研究法の開発

研究課題名 (英文) Development of an novel method for studying relationships between neural circuits and behaviors using optogenetic approaches.

研究代表者

檜山 武史 (HIYAMA TAKESHI)

基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門・助教

研究者番号：90360338

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、光活性化型チャンネルやポンプをマウスの脳細胞に発現させ、光刺激によって神経活動を操作すると同時に行動を解析し、行動につながる脳内神経回路を明らかにする手法の開発を行なった。新たに自由行動中のマウスの脳内局所領域を光刺激する装置を作成した。また、この装置を KikGR (青～紫外光刺激により蛍光が緑から赤に変化するタンパク質) 発現マウスに適用し、自由行動中のマウスの脳内において光刺激される領域を調べられることを示した。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this research is development of a new method for studying the relationship of neural circuit and behaviors using light-activated channels and pumps. We developed a new system for optical stimulation of free-moving animals with optical fiber coupled to lasers. Using this system and a transgenic mice expressing KikGR, a photomodulatable fluorescent protein, we estimated the size of illuminated area in free-moving mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2010 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
総計	16,400,000	4,920,000	21,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：光活性化型チャンネル

## 1. 研究開始当初の背景

行動を担う神経回路を細胞レベルで明らかにすることは、脳研究の究極の課題の一つである。自由に行動している動物の脳内の特定のニューロンの活動を制御することが、その解決手段になると考えられるが、これまでいつ現していなかった。例えば電気刺激や薬理的刺激では電極挿入部や薬液注入部の周囲の細胞を非選択的に刺激してしまうため、神経回路の詳細な検討に用いるには限界があった。近年、光活性化型イオンチャンネルのチャンネルロドプシン 2 (ChR2) やポンプのハロロドプシン (NpHR) を用いて神経細胞の活動を制御

する手法が開発された。これらをとくていのニューロンに発現させて光制御を行なうことにより、*in vivo* における特定の神経回路の選択的制御が実現する可能性が出て来た。

*In vivo* での制御には、光照射のためのプローブを脳内に挿入する。我々は、この技術を実現するのに適した対象として塩分/水分摂取行動とその中枢である脳弓下器官に着目した。脳弓下器官は脳室に面し光照射に最も適した脳組織であり、これまでの我々の解析から、GABA 作働性ニューロンが自発的な発火活動を行っており、その活動が体液 Na レベルセンサー ( $Na_x$ ) の情報により制御されている

ことがわかっている。また、脳弓下器官には、GABA 作働性ニューロンとは別に脱水状態において活性化して Fos を発現するニューロンが存在しているが、それらも  $\text{Na}_x$  の制御を受けている。このように、脳弓下器官は、脳室からの照射が可能であるためプローブ挿入による活性化部位の損傷が無いこと、領域内の特定のニューロン集団と行動の関係を示唆する知見が揃っていること、という理由から光活性化型チャンネルを用いた *in vivo* 活性化の研究に非常に有効な実験系である。

そこで本研究では、光活性化型チャンネル及びポンプを脳弓下器官の特定の細胞集団に発現するマウスを作成し、光による神経制御と塩分/水分摂取行動測定を組み合わせる実験システムの開発を目指した。

## 2. 研究の目的

光活性化型チャンネル及びポンプを脳内の特定の神経細胞集団と組み合わせることにより、その行動を担う神経回路を解明する新しい技術の開発を目指す。さらに、これを応用して塩分/水分摂取行動の制御を担う神経回路の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

まず、自由行動中のマウスの脳内局所領域を光刺激し、行動を測定するシステムの開発を行なう。光刺激に必要な強力な光源とそれをパルス状に出力する制御装置、マウスの回転運動によりファイバーが振れることを防ぐための光学シーベル、塩分・水分摂取行動を自動測定する装置から構成されるシステムの開発と構築を行なう。

次に、本装置を用いた実験に用いるマウス作成を試みる。まず、GAD-ChR2/NpHR マウスを作成する。GABA 作働性ニューロンにおいて特異的にテトラサイクリン制御性トランス活性化因子(tTA2:大腸菌由来の Tet リプレッサータンパク質遺伝子と単純ヘルペスウイルス由来の VP16 活性化ドメイン配列との融合遺伝子)を発現するマウス(GAD67tTA ノックインマウス)と bi-cistronic Tet オペレーター配列(bi-tet0)の制御下に ChR2 と赤色蛍光タンパク質 mCherry の融合タンパク質及び MpHR と緑色蛍光タンパク質 EGFP の融合タンパク質を発現するトランスジェニックマウス(Bitet0-ChR2/NpHR マウス)を交配する。ChR2 は青色光照射により開口して陽イオンを通し、NpHR は黄色光照射により陰イオンを通すので、照射する光の波長を切り替えることにより GABA 作働性抑制性ニューロンの活動を活性化したり抑制することが可能になる。また、ドキシサイクリン(Dox, テトラサイクリンの誘

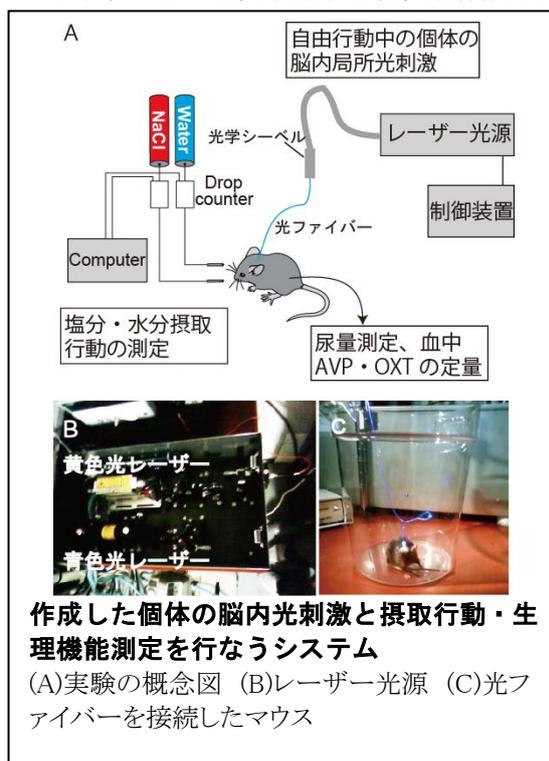
導体)の投与量を調節することにより光活性化型チャンネルの発現量を制御できる。

次に、Fos-ChR2/NpHR マウスを作成する。神経活動の指標となる最初期遺伝子の一つ *c-fos* のプロモーター制御下に tTA2 を発現するマウスと bi-tet0 制御下にテトラサイクリン非感受性 tTA2(tTA2\*)及び lacZ 遺伝子を発現するマウスを交配したダブルトランスジェニックマウス(TetTag マウス)と上述の bitet0-ChR2/NpHR マウスを交配する。このマウスでは、Dox の投与を中止した期間に活性化して Fos タンパク質を発現した神経細胞集団において tTA2 が発現し、その制御により tTA2\*が発現する。その後 Dox の投与を再開しても、tTA2\*の働きにより持続的に光活性化型チャンネルを発現する。一方、最初期遺伝子そのものの発現は一過性であることから、これに対する免疫染色と組み合わせることが可能である。

上記の Bitet0-ChR2/NpHR マウスがうまく機能しなかった場合を想定し、新たに Tet-ChR2 トランスジェニックマウス及び Tet-NpHR トランスジェニックマウスを作成する。また、光が照射された部位を特定するため、KikGR (光照射により緑色の蛍光が赤色に変化する)を全身に発現するトランスジェニックマウスを入手すると共に、新たに KikGR-Adeno ウィルスを作成する。

## 4. 研究成果

まず、マウスを光刺激する装置を作成した



(図 A)。3W 黄色レーザーと 750mW 青色レーザーを光源とし (図 B)、4 分岐光ファイバーにより光を 4 分割した後、それぞれの先端に回転機構を内蔵する光学シーベルを取りつけた。光学シーベルの先端にディスプレイのプラスチックファイバーを装着し、マウスにセットできるようにした (図 C)。KikGR トランスジェニックマウスに光プローブを装着し、青色光照射を行なった結果、光照射された部分の蛍光が赤色に変化し、脳内の正しい部位に光照射されたことが確認された。

次に、計画通り GAD-ChR2/NpHR マウス及び Fos-ChR2/NpHR マウスを作成し、ChR2 及び NpHR の発現を調べたが、脳のごく一部の領域における発現しか確認することができなかった。そこで、新たに Tet-ChR2 トランスジェニックマウス及び Tet-NpHR トランスジェニックマウスを作成し、それぞれ 5 ライン以上調べたが、いずれにおいても、脳のごく一部の領域における発現しか確認することができなかった。また、我々が研究を開始して以降、他の研究グループにおいても同様のマウス作成が試みられたが、それも上手く行っていない。Tet オペレーター側のプロモーター活性が十分では無く、通常の Tet システムを用いて ChR2 や NpHR を発現するトランスジェニックを作成するのが困難なのではないかと考えられた。

そこで、比較的成功例の多いウイルスを用いた遺伝子導入に切り替えた。アデノウイルスベクターを用いると主にグリア細胞に遺伝子が導入されるので、これを用いてグリア細胞に ChR2 を発現させ、グリア細胞における  $\text{Na}^+$  イオン流入が摂食行動制御に及ぼす影響を調べることにした。我々のこれまでの知見から、脳弓下器官のグリア細胞において  $\text{Na}_x$  を介して  $\text{Na}^+$  が流入すると、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の活性化により解糖系の活動が亢進し、それにより産生された乳酸によって GABA 作働性ニューロンの発火頻度が制御されることがわかっている。また、この機構においては、 $\text{Na}_x$  の C 末端が  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase と結合していることが重要であった。そこで、脳弓下器官のグリア細胞において ChR2 を用いて  $\text{Na}_x$  に似た持続性の  $\text{Na}^+$  電流を発生させることを試みた。ChR2 は、光刺激後の不活性化が早く、持続的なイオン流入を誘発する必要があるグリアの刺激には向いていない。そこで、青色光刺激によって開口した後、黄色光刺激するまで開口し続ける性質を持っている ChR2 の C128S 変異体を用いる。ChR2 (C128S) に赤色蛍光タンパク質 mCherry と  $\text{Na}_x$  の C 末端領域を結合した融合蛋白質 (ChR2-mCherry-NaxCterm) を発現させる

ためのアデノウイルスベクターを作成した。GABA 作働性ニューロンに GFP を発現する GAD67-GFP マウスにウイルスベクターを投与した後、脳弓下器官を含む急性スライスを作成し、スライスパッチレコーディング法によって神経活動を記録した。これらの研究は、現在継続して行っており、学術論文にまとめて報告する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Hiyama TY, Matsuda S, Fujikawa A, Matsumoto M, Watanabe E, Kajiwara H, Niimura F, Noda M. Autoimmunity to the sodium-level sensor in the brain causes essential hypernatremia. *Neuron* 66: 508-522, 2010 査読あり
- 2) 檜山武史, 野田昌晴,  $\text{Na}_x$  に対する自己抗体の産生が本態性高 Na 血症の原因となる, *細胞工学* 29(11) : 1132-1138, 2010 査読なし
- 3) Nagakura A, Hiyama TY, Noda M.  $\text{Na}_x$ -deficient mice show normal vasopressin response to dehydration. *Neuroscience Letters* 472:161-5, 2010 査読あり
- 4) 檜山武史, 渡辺英治, 野田昌晴, 化学受容から行動までの情報ハイウェイ 4 脳のナトリウムセンサー, *日本味と匂学会誌* 16:133-140, 2009 査読なし

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 檜山武史, 体液塩濃度の恒常性: 脳で感じる Na 濃度, 第 7 回コンビナトリアル・バイオエンジニアリング会議「感覚の不思議をはかるために」千里阪急ホテル (吹田市) 2010 年 11 月 12 日
- 2) Hiyama TY, Matsuda S, Fujikawa A, Matsumoto M, Watanabe E, Kajiwara H, Niimura F, Noda M. Autoimmunity to the sodium-level sensor in the brain causes essential hypernatremia, BMB2010, 神戸コンベンションセンター (神戸市) 2010 年 12 月 10 日
- 3) Hiyama TY, Matsuda S, Fujikawa A, Matsumoto M, Watanabe E, Kajiwara H, Niimura F, Noda M. Autoimmunity to the sodium-level sensor in the brain causes essential hypernatremia, Neuro2010, 神戸コンベンションセンター (神戸市) 2010 年 9 月 4 日

[図書] (計 1 件)

檜山武史, 野田昌晴 その他の生体内センサーチャネル, 『トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—』(金井好克, 竹島浩, 森泰生, 久保義弘編), 京都廣川書

店, 95-103, 2010

〔その他〕

新聞報道等

- 1) 2010/05/27 日経産業新聞 「原因不明  
「高ナトリウム血症」 免疫異常が関与  
基礎生物研など解明」
- 2) 2010/05/27 日経プレスリリース 「基  
礎生物学研究所、高ナトリウム血症の発  
症機構を解明 原因不明だった高ナトリ  
ウム血症の発症機構を解明 ～脳の体液  
Na<sup>+</sup>レベルセンサーに対する抗体が産生  
される自己免疫疾患だった～」

Web 報道

- 1) 2010/06/17 *Faculty of 1000* “Must  
Read Paper” by Angela Vincent  
(University of Oxford, UK)
- 2) 2010/05/27 *Neuron* 誌 トップページ  
“Featured Case Study”

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檜山 武史 (HIYAMA TAKESHI)  
基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部  
門・助教  
研究者番号：90360338