

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 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790236

研究課題名（和文）GABA 作動性神経制御を用いた体温調節機構研究の新展開

研究課題名（英文）New approach for the study of body temperature regulation using activity control of GABAergic neurons

研究代表者

山中めぐみ（丸山めぐみ）（YAMANAKA MEGUMI, MARUYAMA MEGUMI）

生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力研究員

研究者番号：80346379

研究成果の概要（和文）：視床下部に存在する GABA 作動性神経は、体温調節神経機構において、中心的な役割を果たしている。本研究では、体温調節機構の動作原理を明らかにすることを目的とし、GABA 作動性神経特異的に光感受性タンパク質（チャンネルロドプシン 2 (ChR2)；ハロロドプシン (Halo)）を発現する遺伝子改変マウスを作成した。GABA 作動性神経特異的に発現し、GABA 合成に関わる遺伝子である GAD67 遺伝子座にテトラサイクリントランスアクティベーター (tTA) をノックインした GAD67-tTA マウスと Tet-0 ChR2 マウスを交配させて、GABA 作動性神経特異的に ChR2 を発現する遺伝子改変マウスを作成している。組織化学的解析の結果、GABA 作動性神経への ChR2 の発現が認められた。しかし、その発現率・発現量共に十分では無く、そのままでは電気生理学的解析に進むことが難しいと判断された。これは tTA の発現量に起因する可能性があったため、GAD67-tTA 遺伝子座に tTA と同時に挿入されたネオマイシンカセットの除去を試みた。これまでの経験からネオマイシンカセットの除去によって tTA の発現量が増加することが分かっている。PCR によって、ネオマイシンカセットの除去を確認し、再び Tet-0 ChR2 マウスと交配を行った。しかしながら、組織化学的解析の結果それでも ChR2 の十分な発現を得ることが出来なかった。今後は遺伝子改変マウスだけでなく、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の併用を検討していく。

研究成果の概要（英文）：

GABAergic neurons in the hypothalamus play an important role in the regulation of body temperature. In the present research, I generated new transgenic mice in which GABAergic neurons express light activated proteins, such as channelrhodopsin2 (ChR2) or Halorhodopsin (Halo) to control the activity of GABAergic neurons. Tetracycline transactivator (tTA) is inserted in the GAD67 gene allele, GAD67-tTA mice. These mice were crossed with Tet0 ChR2 mice to generate bi-genic mice. In these mice brain, ChR2 expression is observed in the GABA neurons. However, the expression level of ChR2 is too low to control the activity of GABA neurons. This might be caused by neomycin resistant gene cassette located near tTA gene in the GAD67-tTA mice interfered tTA expression. To remove Neo cassette, these mice were crossed with Cre mice. Then, these mice were crossed with Tet0 ChR2 mice again. However, expression level of ChR2 was not increased. In future, I will try virus vector instead of transgenic method to introduce ChR2 in GABAergic neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：GABA 作動性神経・オプトジェネティクス・チャンネルロドプシン・体温調節・ハロロドプシン・遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

近年開発されたオプトジェネティクスは、特定神経の活動を光で制御することを可能にする。オプトジェネティクスでは、光感受性タンパク質(チャンネルロドプシン2(ChR2);ハロロドプシン(Halo))を特定の神経細胞に発現させ、光を用いて神経活動の制御が可能になる。緑藻類クラミドモナス由来の光活性化タンパク質、ChR2は7回膜貫通型のバクテリオロドプシンの一種であり、単独で非選択的陽イオンチャンネルを内蔵する。ChR2は青色光(430-470 nm)により活性化されて、陽イオン非選択的チャンネルを開口させる。これによって、膜電位を脱分極させることが可能である。神経細胞では膜電位が電位作動性ナトリウムチャンネルの閾値を超えると、活動電位を発生させることが出来る(神経活動の亢進)。一方、古細菌由来の光活性化タンパク質、Haloはクロライドポンプを内蔵する。Haloは黄色光(540-580 nm)で瞬時に反応し、細胞外から細胞内へクロライドイオンを流入させ、膜電位を過分極させることによって、活動電位発生を抑制する(神経活動の抑制)。

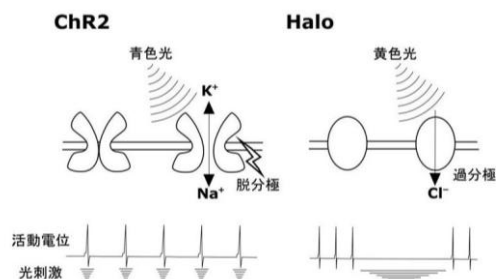


図1. 光活性化タンパク質 ChR2 および Halo の光調節

オプトジェネティクスを適用すれば、個体の中で、特定の神経活動を光で制御し、その結果生じる表現型を解析することによって、その神経細胞が担う生理機能を明らかにすることが出来る。オプトジェネティクスは、個体でのみ生じる現象の解析に大変有効な手法で有り、これまでに、睡眠覚醒調節、摂食行動、攻撃行動、記憶・学習などの神経機構の解明に寄与してきている。我々はオプトジェネティクスを体温調節の神経機構に応用して、その動作原理を明らかにすることを試みる。視床下部に存在する GABA 作動性神経は、体温調節に関与していることが知られているものの、どのように体温を調節に関与

しているのかなど動作の原理についてはよく分かっていなかった。そこで GABA 作動性神経特異的な機能操作を行うための技術確立を行う。

2. 研究の目的

視床下部に存在する GABA 作動性神経は、体温調節神経機構において、中心的な役割を果たしている。本研究は、GABA 作動性神経特異的に光活性化タンパク質(チャンネルロドプシン2(ChR2);ハロロドプシン(Halo))を発現する遺伝子改変マウスを用いて体温調節機構の動作原理を明らかにすることを目的としている。

そこで、視床下部の GABA 作動性神経活動のみを光によって制御したときに表出する体温調節反応を観察し、体温調節に関わる神経回路網の機能的同定を試みる。多くの調節中枢が複雑に影響しあう視床下部ネットワークにおいて、意識下の自由行動下で特定の神経活動のみを操作し、極めて生理的な条件下において解析を可能することで、より正確な体温調節様式や、他の行動との機能連関が明らかになると考えられる。

近年、特定神経活動の空間および時間依存的な活動制御を可能とする手法が開発されてきた。一方、マウスを用いた体温研究は未だ発展途上であり、関与する神経伝達物質が明らかになりつつある今、早急にその基盤が確立されるべき課題である。さらに、本研究により特定神経活動の光制御という新システムが確立すれば、他の研究分野での個体を用いた検証にも広く流用され、有意義な知見が得られる。

3. 研究の方法

(1) GABA 作動性神経特異的に光感受性タンパク質を発現する遺伝子改変マウスの作成

GABA 作動性神経特異的に光感受性タンパク質を発現させるために、GABA 合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、GAD67 遺伝子座にテトラサイクリントランスアクチベーター(tTA)をノックインしたマウス(GAD67/tTAマウス)と tTA タンパク質依存的に ChR2 と Halo の発現を誘導する Bidirectional Tet-0 ChR2;Halo トランスジェニックマウス(Bitet-0/ChR2;Haloマウス)を交配させ、ノックイントランスジェニックマウス(GAD67/tTA;Bitet-0 ChR2/Haloマウス)を作成する。このマウスでは GABA 作動性

神経特異的に tTA タンパク質が発現するため、ChR2 と Halo が GABA 作動性神経のみに発現誘導される。

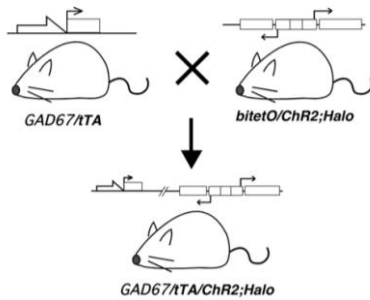


図2. GAD67/tTA;Bitet-0 ChR2/Halo マウスの作成

(2) 免疫組織化学的解析を用いた GABA 作動性神経特異的光感受性タンパク質発現の確認

抗 GAD67 抗体を用いた免疫染色によって、光感受性タンパク質が GABA 作動性神経特異的に発現していることを確認する。光感受性タンパク質は GFP 等の蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現しているため、抗 GFP 抗体を用いて発現を確認する。

(3) スライスパッチクランプを用いた光感受性タンパク質の遺伝子改変マウスにおける機能確認

このマウスから脳スライス標本作製し、ChR2 もしくは Halo と融合タンパク質として発現させた GFP などの蛍光タンパク質によって GABA 作動性神経を蛍光顕微鏡下において同定し、GABA 作動性神経にパッチクランプを行う。このことによって、*in vitro*において光活性化タンパク質が正しく機能することを確認する。

パッチクランプ記録によって、最適の光刺激条件を決定する。パッチクランプによって決定した光刺激の条件設定を用いて、意識下自由行動マウスの局所 GABA 作動性神経活動の光制御を行う。暗期および明期において、神経活動を活性化もしくは抑制させた時の体温変化を観察し、体温調節神経機構への GABA 作動性神経の関与とその調節機構について検討する。

(4) オプトジェネティクスを用いた GABA 作動性神経細胞の光操作と体温の同時測定

GABA 作動性神経活動を制御したときの熱放散および、熱産生反応の指標として、腹腔温 (T_{ab})、BAT 温 (T_{bat})、尾部皮膚温 (T_{tail}) 測定用の熱電対を背部の皮下を通して腹腔内、肩

甲骨間、尾部にそれぞれ留置する。さらに、環境温度やエネルギー状態を変化させた時の体温調節反応に対する GABA 作動性神経の制御様式を明らかにする。

視床下部に存在する GABA 作動性神経に光を照射するために、脳に光ファイバーを刺入する。光源としてレーザー光源もしくは LED 光源を用いて、石英ファイバーおよび、プラスチックファイバーを介して脳内に光を照射する。照射のタイミングはパルスジェネレーターを用いて制御する。光の強度、照射時間などの条件は、スライスパッチクランプを用いて電気生理学的に決定し、その条件を用いてインビボにおける神経活動制御を行う。

4. 研究成果

(1) GABA 作動性神経特異的光感受性タンパク質の発現とその機能

GABA 作動性神経特異的に光感受性タンパク質(チャンネルロドプシン 2(ChR2);ハロロドプシン(Halo))を発現する遺伝子改変マウスを作成した。GAD67 遺伝子座にテトラサイクリン抗生物質阻害剤(tTA)をノックインした GAD67-tTA マウスと Tet-0 ChR2 マウスを交配させて、GABA 作動性神経特異的に ChR2 を発現する遺伝子改変マウスを作成している。抗 GAD67 抗体と抗 GFP 抗体を用いた免疫組織化学的解析の結果、GABA 作動性神経への ChR2 の発現が認められた。しかし、その発現率・発現量共に十分では無く、そのままでは電気生理学的解析に進むことが難しいと判断された。

(2) 光感受性タンパク質の GABA 作動性神経における発現量の改善の試み

これまでの経験から、GFP を抗 GFP 染色これは GAD67-tT マウスの tTA の発現量に起因する可能性が考えられたため、GAD67-tTA 遺伝子座に tTA の後ろに挿入されたネオマイシンカセットの除去を試みた。これまでの経験からネオマイシンカセットの除去によって tTA の発現量が大幅に増加することが分かっている。GAD67-tTA マウスを卵細胞で Cre リコンビナーゼを発現する EIIICre マウスと交配させることによって、loxP 配列で挟まれたネオマイシンカセットの除去を試みた。PCR によって、ネオマイシンカセットの除去を確認し、再び Tet-0 ChR2 マウスと交配を行った。しかしながら、組織化学的解析の結果、ChR2 の十分な発現を得ることが出来なかった。

(3) 今後の改善点

今後は遺伝子改変マウスだけでなく、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法の併用

を検討していく。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中めぐみ (丸山めぐみ)

(YAMANAKA MEGUMI, MARUYAMA MEGUMI)

生理学研究所・発達生理学研究室・特別協力
研究員

研究者番号：80346379