

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：37116

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659127

研究課題名（和文）光遺伝学を応用した脳内バゾプレッシン・オキシトシン神経の新たな役割解明への挑戦

研究課題名（英文）Challenge to reveal a novel role of central vasopressin and oxytocin neurons by optogenetic approach

研究代表者

上田 陽一 (UETA YOICHI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10232745

研究成果の概要（和文）：下垂体後葉ホルモンは、視床下部に限局する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、循環血中のみならず脳内にも分泌される。本研究課題では、大細胞性神経分泌ニューロンに光感受性タンパクを特異的に発現させて光照射による神経活動の制御を可能とすることを試みた。得られたトランスジェニックラットの系統において光感受性タンパクの発現が確認できた。光照射に対する反応性などの機能評価については今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：Neurohypophysial hormones are synthesized in the magnocellular neurosecretory cells (MNCs) localized in the hypothalamus, and they are secreted not only in the systemic circulation but also in the central nervous system. This study tried the optogenetic approaches to express the light-sensitive proteins in the MNCs to control neuronal activity by light exposure. The light-sensitive proteins were expressed in the transgenic rats. The functional evaluation should be performed by further study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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・栄養医学）

キーワード：光遺伝学・バゾプレッシン・オキシトシン・トランスジェニック動物・ニューロン

1. 研究開始当初の背景

下垂体後葉ホルモンのバゾプレッシンおよびオキシトシンは、視床下部室傍核および視索上核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から循環血中に分泌される。一方、下垂体後葉ホルモンを産生する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体および樹状突起からも開口放出され、脳内に広く分布する下垂体後葉ホルモン受容体に作用して、愛情、母性、信頼感などの情動を伴う高次脳機能や自閉症などの精神・神経疾患にも関与している可能性が示唆されている。

最近、光感受性タンパク（光興奮性タンパ

ク（チャンネルロドプシン2）や光抑制性タンパク（ハロロドプシン）を目的とするニューロンに特異的に発現させることにより光照射によってそのニューロン活動を制御する技術（Optogenetics：オプトジェネティクス）が開発された。光照射によるニューロン活動の制御には、光感受性タンパクを発現しているニューロンが散在していても特異的に神経活動を制御できる、オン・オフを明確にできる、ニューロン活動と行動との関連を検討できるなどの利点がある。

私たちは、これまでにバゾプレッシンおよびオキシトシン遺伝子にそれぞれ異なった蛍光タンパク（eGFP および mRFP1）遺伝子を

挿入した融合遺伝子を用いてバズプレッシンニューロンおよびオキシトシンニューロン特異的に蛍光タンパクが発現することを観察してきた。

そこで、eGFP や mRFP1 蛍光タンパクの場合と同様にバズプレッシンニューロンおよびオキシトシンニューロンに光感受性タンパクを発現させることができるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

下垂体後葉ホルモンを産生する大細胞性神経分泌ニューロンに光感受性タンパク（光興奮性タンパク（チャンネルロドプシン2）および光抑制性タンパク（ハロロドプシン））を発現させることにより、光照射による神経活動の制御を行いたい。

3. 研究の方法

(1) バズプレッシン-光興奮性タンパク（チャンネルロドプシン2）-eGFP 融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットの作出を試みた。eGFP 蛍光を指標に視床下部における特異的な上記融合遺伝子の発現の有無を蛍光顕微鏡で確認した。さらに、トランスジェニックラットの視索上核より単離した細胞からホールセルパッチクランプ法を用いて光照射による電流（もしくは膜電位）変化を記録した。

(2) バズプレッシン-光興奮性タンパク（チャンネルロドプシン2）-eGFP-光抑制性タンパク（ハロロドプシン）-YFP 融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットの作出を試みた。eGFP および YFP 蛍光を指標に視床下部における特異的な上記融合遺伝子の発現の有無を蛍光顕微鏡で確認した。さらに、トランスジェニックラットの視索上核より単離した細胞からホールセルパッチクランプ法を用いて光照射による電流（もしくは膜電位）変化を記録した。

4. 研究成果

(1) バズプレッシン-光興奮性タンパク（チャンネルロドプシン2）-eGFP トランスジェニックラットの4系統についてその発現の有無を検討した。その結果、蛍光顕微鏡下でeGFP 蛍光陽性ニューロンが視床下部室傍核および視索上核に観察することができた。また、脱水刺激後に eGFP 蛍光が増加することを確認した。これらのトランスジェニックラットの視索上核から酵素処理により単離したニューロンからホールセルパッチクランプ法により電気記録をしながら青色光照射を行ったところ、わずかではあるが膜電位変化を引き起こすニューロンがあった。今後、更なる検討が必要である。

(2) バズプレッシン-光興奮性タンパク（チ

ヤネルロドプシン2）-eGFP-光抑制性タンパク（ハロロドプシン）-YFP トランスジェニックラットの4系統について eGFP 蛍光および YFP 蛍光の発現の有無を検討した。1系統のみで eGFP 蛍光（図1）および YFP 蛍光（図2）を観察することができたが、微弱であった。

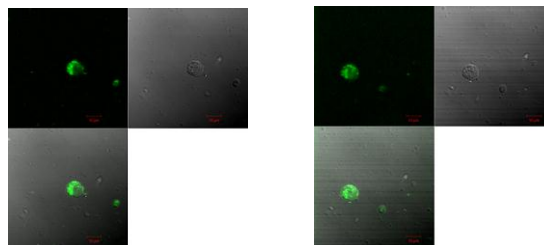


図1 チャンネルロドプシン2-eGFP の発現

図2 ハロロドプシン-YFP の発現

これらのトランスジェニックラットの視索上核から酵素処理により単離したニューロンからホールセルパッチクランプ法により電気記録をしながら青色および黄色光照射を行ったが、明らかな電気的変化を引き起こすものは観察できなかった。

(1)、(2)ともに光感受性タンパクの十分な発現が得られたとは言い難く、今後更なる検討が必要である。また、今後オキシトシンニューロンへの光感受性タンパクの発現にも着手する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計10件）

1. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohno, M. Ishikura, T. Kakuma, T. Yoshimatsu, H. Murphy, D. & Ueta, Y. (2013) A c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgene is differentially expressed in rat forebrain and brainstem after chronic dehydration and rehydration. *Journal of Neuroendocrinology* 25(5): 478-487. (査読有)
DOI: 10.1111/jne.12022
2. Ishikura, T. Suzuki, H. Matsuura, T. Ohnishi, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2012) Visualization of the response in the central nervous system after nociceptive stimulation using transgenic animals. *Journal of UOEH* 34(4): 315-321. (査読有)
DOI: なし
3. Hashimoto, H. Uezono, Y. & Ueta, Y. (2012) Pathophysiological function of oxytocin secreted by neuropeptides: A mini review. *Pathophysiology* 19: 283-298. (査読有)

- DOI: 10.1016/j.pathophys.2012.07.005
4. Ishikura, T. Suzuki, H. Yoshimura, M. Ohkubo, J. Katoh, A. Ohbuchi, T. Ohno, M. Fujihara, H. Kawasaki, M. Ohnishi, H. Nakamura, T. & Ueta, Y. (2012) Expression of the c-fos-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the spinal cord and the hypothalamic paraventricular nucleus in transgenic rats after nociceptive stimulation. *Brain Research* 1479: 52-61. (査読有)
DOI: 10.1016/j.brainres.2012.08.033
 5. Murphy, D. Konopacka, A. Hindmarch, C. Paton, J. F. Sweedler, J. V. Gillette, M. U. Ueta, Y. Grinevich, V. Lozic M. & Japundzic-Zigon, N. (2012) The Hypothalamic-Neurohypophyseal System: From Genome to Physiology. *Journal of Neuroendocrinology* 24(4): 539-553. (査読有)
DOI:10.1111/j.1365-2826.2011.02241.x
 6. Ohno, M. Fujihara, H. Iwanaga, M. Todoroki, M. Katoh, A. Ohbuchi, T. Ishikura, T. Hamamura, A. Hachisuka, K. & Ueta, Y. (2012) Induction of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein expression in the locus coeruleus following kainic acid-induced seizures in rats. *Stress* 15(4): 435-442. (査読有)
DOI: 10.3109/10253890.2011.637185
 7. Iwanaga, M. Ohno, M. Katoh, A. Ohbuchi, T. Ishikura, T. Fujihara, H. Nomura, M. Hachisuka, K. & Ueta, Y. (2011) Upregulation of arginine vasopressin synthesis in the rat hypothalamus after kainic acid-induced seizures. *Brain Research* 1424:1-8. (査読有)
DOI: 10.1016/j.brainres.2011.09.030
 8. Katoh, A. Fujihara, H. Ohbuchi, T. Onaka, T. Hashimoto, T. Kawata, M. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2011) Highly visible expression of an oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats. *Endocrinology* 152(7): 2768-2774. (Cover article of the issue) (査読有)
DOI: 10.1210/en.2011-0006
 9. Ohbuchi, T. Yokoyama, T. Saito, T. Ohkubo, J. Suzuki, H. Ishikura, T. Katoh, A. Fujihara, H. Hashimoto, H. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2011) Possible contribution of pannexin channel to ATP-induced currents *in vitro* in vasopressin neurons isolated from the rat supraoptic nucleus. *Brain Research* 1394: 71-78. (査読有)
DOI: 10.1016/j.brainres.2011.04.017
 10. Ueta, Y. Dayanithi, G. Fujihara, H. (2011) Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: Visualization in transgenic animal models. *Hormones and Behavior* 59(2): 221-226. (査読有)
DOI: 10.1016/j.yhbeh.2010.12.007
- [学会発表] (計 17 件)
1. 大久保 淳一、大淵 豊明、吉村 充弘、丸山 崇、石倉 透、松浦 孝紀、加藤 明子、鈴木 秀明、上田 陽一 (2013 年 3 月 27 日-29 日) ラット視索上核バゾプレッシンおよびオキシトシンの蛍光タンパク遺伝子導入による同定とカイニン酸応答の検討: 第 90 回日本生理学会大会、タワーホール船堀 (東京都)
 2. 上田 陽一 (2013 年 3 月 23 日) 蛍光イメージングによる HPA 軸の可視化への挑戦: 第 24 回間脳・下垂体・副腎系研究会、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社本社 (東京都)
 3. 上田 陽一、大野 素子、岩永 勝、吉村 充弘、丸山 崇、石倉 透 (2012 年 10 月 25-26 日) カイニン酸誘発けいれんモデルラットにおける視床下部および青斑核におけるバゾプレッシン遺伝子発現: 第 65 回日本自律神経学会総会、都市センタービル (東京都)
 4. Ueta, Y. Katoh, A. (2012 年 10 月 13-17 日) Florescent visualization of oxytocin neurons activated by systemic administration of CCK-8 in transgenic rats expressing a c-fos-eGFP and an oxytocin-mRFP1 fusion gene. *Neuroscience 2012, New Orleans Morial Convention Center, (New Orleans, USA)*
 5. Ueta, Y. Iwanaga, M. Ohkubo, J. (2012 年 10 月 12 日) Effects of kainic acid on arginine vasopressin (AVP) synthesis *in vivo* and an isolated AVP neuron *in vitro*. *Neurophysiology of Neurosecretory Neurons Workshop, Tulane University (New Orleans, USA)*
 6. 上田 陽一 (2012 年 9 月 13-15 日) 蛍光タンパクを用いたラット下垂体後葉ホルモンおよびニューロン活動の可視化: 第 83 回日本動物学会大会、大阪大学豊中キャンパス (大阪府)
 7. Ueta, Y. (2012 年 8 月 26-29 日) Fluorescent visualization of vasopressin and oxytocin neurons in the hypothalamus and their terminals in the hypothalamus in transgenic rats.

- 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)
8. 上田 陽一、加藤 明子、吉村 充弘、石倉 透、鈴木 秀明(2012年4月19-21日) ラットオキシトシン産生ニューロンの赤色蛍光タンパクによる可視化および生理学的刺激に対する反応性の検討: 第85回日本内分泌学会学術総会、名古屋国際会議場 (愛知県)
9. 大淵 豊明、佐藤 かつお里、岡田 泰伸、鈴木 秀明、上田 陽一 (2012年3月29-31日) 体液調節中枢における酸感受性イオンチャンネル: 第89回日本生理学会大会、長野県松本文化会館 (長野県)
10. 上田 陽一 (2012年2月17-18日) ストレスと神経内分泌: 第51回日本心身医学会九州地方会、産業医科大学 (福岡県)
11. 大久保 淳一、大淵 豊明、鈴木 秀明、上田 陽一 (2011年11月25-26日) バゾプレッシン産生ニューロンにおけるカイニン酸受容体サブタイプについての電気生理学的検討: 第38回日本神経内分泌学会、都道府県会館 (東京都)
12. 加藤 明子、吉村 充弘、石倉 透、鈴木 秀明、上田 陽一 (2011年9月23-24日) オキシトシン-mRFPトランスジェニックラットにおけるナトリウムおよび絶食負荷の検討: 第32回日本肥満学会、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)
13. 岩永 勝、大野 素子、大久保 淳一、加藤 明子、吉村 充弘、石倉 透、上田 陽一 (2011年8月27日) カイニン酸誘発モデルラットにおける視床下部バゾプレッシン遺伝子発現の亢進: 第11回日本内分泌学会九州地方会、福岡大学病院 (福岡県)
14. Katoh, A. Fujihara, H. Ohbuchi, T. Onaka, T. Hashimoto, T. Kawata, M. Suzuki, H. & Ueta, Y. (2011年7月27-30日) Highly visible expression of an oxytocin- monomeric red fluorescent protein 1 fusion gene in the hypothalamus and posterior pituitary of transgenic rats. 9th World Congress on Neurohypophysial Hormones. Northeastern University (Boston, USA)
15. Ueta, Y. (2011年7月27-30日) Fluorescent visualization of vasopressin- and oxytocin neurons under physiological and pathophysiological conditions. 9th World Congress on Neurohypophysial Hormones. Symposium. Northeastern University (Boston, USA)
16. 上田 陽一 (2011年5月16-18日) トランスジェニックラットを用いた下垂体後葉ホルモンの可視化: 日本顕微鏡学会第67回学術講演会シンポジウム、福岡国際会議場 (福岡県)
17. 加藤 明子、藤原 広明、石倉 透、大淵 豊明、鈴木 秀明、上田 陽一 (2011年4月21-23日) オキシトシン-mRFP トランスジェニックラットへの浸透圧負荷の検討: 第84回日本内分泌学会学術総会、神戸国際会議場 (兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 陽一 (UETA YOICHI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10232745

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし