

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560424

研究課題名(和文) 個体内単一神経細胞を標的としたオプトジェネティクス

研究課題名(英文) optogenetic analysis of single neurons in vivo

研究代表者

高木 新 (Takagi, Shin)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90171420

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)：行動を制御する神経回路の特性を、回路を構成要素する個々の神経細胞に基づいて理解することを目指し、本研究では線虫*C. elegans*の摂食運動を調節するシンプルな咽頭神経回路の機能解析を試みた。従来、細胞焼却実験の結果から咽頭神経系ではMC運動神経以外の咽頭神経細胞は咽頭ポンピング運動の維持に必須ではないとされていた。しかし、本研究で光遺伝学を用いて自由運動中の神経細胞操作を行った結果、MC以外の咽頭神経細胞(たとえばM2)沈静化によってポンピングが停止することが明らかになった。また、活性化によってポンピングを負に制御する神経細胞の存在も示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand how a neural circuit regulates a certain behavior, we are focusing on the simple pharyngeal nervous system of *C. elegans* constituted by 20 neurons of 14 types. We have manipulated the activity of subsets of neurons in free-moving worms by using optogenetic tools. We have found that silencing of several types neurons including M2 neurons decreased the frequency of pumping, sometimes resulting in complete arrest of pumping. Our preliminary study also showed that activation of a certain neuron suppressed pumping. Although a previous cell ablation study showed that MCs are the only neurons in the pharynx controlling the frequency of the pharyngeal pumping movement, our results suggest that multiple cell types are involved in the regulation of pumping frequency.

研究分野：神経生物学

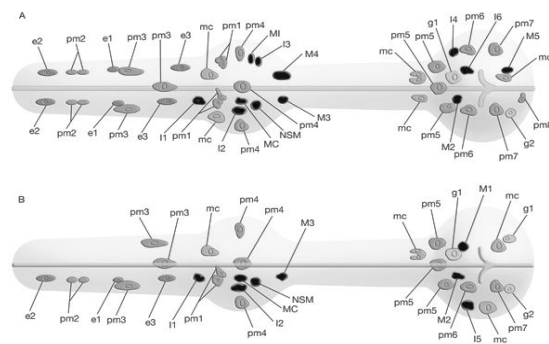
キーワード：光遺伝学 運動制御

## 1. 研究開始当初の背景

行動を制御する神経回路の特性を、回路の構成要素である個々の神経細胞に基づいて理解することは、神経科学の大きな目標である。*C. elegans* 神経系は、302個の全神経細胞が同定可能で、各神経細胞間の連絡が電顕レベルで記載済みという他に例のない特徴を具えている。

私たちは *C. elegans* 神経系の中でも、特に単純な咽頭神経系に着目している。咽頭は線虫頭部にあるヒョウタン型の器官で摂食運動を司る。咽頭では8種類の咽頭筋細胞の働きによって餌(バクテリア)が外界から取り込まれ腸へ送り込まれる。このうちヒョウタンの首にあたる isthmus は蠕動運動によって餌を前から後ろに運び、ヒョウタンの上下の球部にあたる corpus と terminal bulb はポンピングと呼ばれる運動を行い、それぞれ餌を吸い込み、餌をすりつぶす。また、咽頭には14種20個の神経細胞が存在するが、これらの神経細胞のほとんどすべてをレーザーによる細胞焼却実験によって破壊しても、ある程度咽頭運動が持続することから、咽頭筋の自律的な収縮・弛緩が基本的な咽頭運動を作り出し、環境変化などに応じて神経系がこれをされに調節すると考えられる(Avery and Thomas, *C. elegans* I CSHLpress 1989)。これまでレーザー焼却によりはっきりと機能が示されたのは3種の咽頭神経細胞のみで、MCはポンピングの頻度を調節、M4はisthmus蠕動運動に必須、M3はcorpusとterminal bulbの弛緩促進を受け持つとされる。しかしそれ以外の神経細胞の役割は全く不明である。

従来、*C. elegans*の神経細胞機能同定は細胞焼却実験が主流であった。しかし光による神経細胞の活性調節を可能とした光遺伝学の近年の進歩は著しく、*C. elegans*でも光遺伝学が普遍的な実験法となってきた。また、IR-LEGOは、生体内の特定の単一細胞を標的



咽頭新駅細胞 模式図。WormAtlas

<http://www.wormatlas.org/>の図を改変

にして任意の時期に遺伝子発現誘導を行うために開発された実験システムである。顕微鏡下で赤外レーザー照射により細胞を加熱して熱ショックプロモーター制御下のトランスジーンを発現を誘導することがIR-LEGOの原理である。以前に可視光レーザーを利用した同様の実験系が提唱されたが、照射された細胞に対するダメージの大きさと遺伝子発現の効率の悪さから、まったく実用に供されなかった。これに対して細胞にやさしい赤外光を利用することでIR-LEGOでは高効率での遺伝子発現が可能となった。私達はIR-LEGO開発者の弓場博士と共同で研究を行い、IR-LEGOの初の生体応用としてモデル動物線虫 *C. elegans* での実験を推進し、幼虫の表皮細胞、筋細胞や分散した神経細胞を標的とした遺伝子発現誘導に成功した。さらに、パルス照射法を取り入れることで、細胞体が密集した部位でも単一細胞で選択的に遺伝子発現誘導を引き起こせるようになった。神経回路の解析には単一標的神経細胞操作が可能なIR-LEGOの活用が特に期待できる。

## 2. 研究の目的

*C. elegans* 咽頭神経系を構成する神経細胞の摂食運動(咽頭ポンピング運動)調節における役割を、光遺伝学を使用した神経細胞活性制御を通じて明らかにすることが本研究の目的である。さらに、パルス照射 IR-LEGO

と新規光遺伝学ツールを組み合わせること  
で、単一標的神経細胞の活性調節を行うこと  
も目指した。

### 3. 研究の方法

IR-LEGO : 従来の IR-LEGO にオプティカルチ  
ョッパーを取り付け、風車状回転ブレードに  
よってレーザー光を不連続に通過させること  
により照射をパルス化する。 介在神経細胞  
を標的とした場合 0.8msec 60Hz のパルス照  
射をおこなった。

咽頭運動の解析 : 寒天培地上で自由運動中し  
ている虫のポンピング運動を実体顕微鏡下  
で観察、民生用ビデオカメラで録画し、ポン  
ピング頻度を測定した。

光遺伝学 : 光作動性カチオンチャネル ChR2  
発現細胞に対する青色光照射による神経活  
動活性化と、光駆動型プロトンポンプ Arch  
発現細胞に対する緑色光照射による神経活  
動沈静化、それぞれが自由運動中の虫に於い  
てポンピングに及ぼす効果を検討する。まず、  
神経活性化と抑制の効果を網羅的に検討す  
る。Gateway システムを利用して神経細胞サ  
ブセット特異的プロモーター下流に Arch,  
ChR2(H134R), ChR2(C128S) 各 cDNA を結合し、  
これらを線虫に導入して形質転換体を作製  
し、光照射が各系統の咽頭運動に与える影響  
を調べた。

### 4. 研究成果

#### i) IR-LEGO パルス照射条件

0.8msec 60Hz のパルス照射条件を用いて、  
細胞体が密集した Nerve ring 内に存在する  
複数種の単一神経細胞において選択的遺伝  
子発現誘導が可能であることを確認した。3  
0 ~ 50 % 程度の確率で単一細胞遺伝子発  
現が誘導された。パルス頻度を 40Hz ~ 70Hz  
で変化させても、誘導頻度に顕著な向上はみ  
られなかったため、神経活性制御実験では  
60Hz パルス照射条件を用いることにした。

#### ii) 咽頭運動の解析

##### 1) 咽頭神経細胞種の同定

*unc-4* (I5), *ric-19* (M2), *mnm-2* (M3),  
*flp-21* (M2, M4, MC), *glr-2*(M1), *zag-1* (I1),  
*rig-3* (M4, I1, I4, NSM), *tph-1* (NSM),  
*flp-13* (M3, M5, I5) 各遺伝子プロモーター  
をもつ Gateway システム destination  
vector を作製し、これを用いて遺伝子発現が  
可能なことを確認した。 *glr-4*(NSM, I5, I6),  
*glr-5*, *glr-7*, *flp-5* (M4, I4) *flp-2* (MC, I5)  
各遺伝子プロモーターをもつ destination  
vector も作製したが、下流遺伝子の発現は引  
き起こせなかった。

##### 2) 咽頭運動の解析

手動で培養皿の位置を調節することによ  
って虫を追尾し terminal bulb のグラインダー  
の動きを指標としてポンピング運動を数分  
間に渡って記録する実験系を立ち上げた。

##### 3) 通常時の咽頭運動に対する神経細胞活 動活性化・抑制の影響

###### 神経活性抑制実験

まず、汎神経細胞プロモーターの下流で光駆  
動型プロトンポンプ Arch::GFP を発現する形  
質転換システムを作成し、緑色光照射によ  
って Arch を活性化して細胞の沈静化を行  
ったところ、咽頭ポンピング運動は停止  
した。光照射を終了するとポンピングは  
再開した。咽頭神経細胞をすべて焼却し  
ても低頻度ながらポンピングが持続す  
るという過去の報告から、従来、神経  
細胞はポンピングに不要と考えられて  
きた。一過性の神経系不活性化が  
ポンピングを停止させるとことは  
予想外の結果である。

次に、Gateway システムを用いて *unc-4*,  
*flp-21*, *glr-2*, *mnm-2*, *ric-19*, *zag-1*, *rig-3*,  
*tph-1*, *flp-13* 各遺伝子プロモーター下流  
で Arch::GFP を発現するプラスミドを  
作成、野生型線虫背景で形質転換  
システムを樹立した。

緑色光照射による細胞の沈静化を行ったところ、いくつかの系統でポンピング運動頻度の低下を見出した。

運動神経細胞：*flp-21p*は M2, M4, MC 咽頭運動神経細胞での transgene 発現を引き起こす。*flp-21p::Arch::GFP* 系統では個体間で Transgene 発現にばらつきがあるが、上記3種の運動神経細胞中 M2 のみで GFP が発現する個体でもポンプ運動が完全に停止した。また、*ric-19*は M1, M2 運動神経細胞で transgene 発現を引き起こすが、*ric-19p::Arch::GFP* 系統中で3種中 M2 のみで GFP が発現する個体でポンプ運動が完全に停止した。以上の結果から、M2 単独の抑制でポンピングが停止すると考えられる。また、*rig-3p*は M4, と介在 I1, I4 で transgene 発現を引き起こす。

介在神経細胞：*zag-1p*は咽頭中では介在神経細胞 I1 のみ transgene 発現を引き起こす。*zag-1p::Arch::GFP* 系統では I1 に GFP 発現が認められた個体でポンプ運動頻度が低下し、強く GFP を発現する個体ではポンピングは完全に停止した。また、*unc-4p*は咽頭中では介在神経細胞 I5 で transgene 発現を引き起こす。*unc-4p::Arch::GFP* 系統では I5 に GFP 発現が認められた個体でポンプ運動頻度が低下し、強く GFP を発現する個体ではポンピングは完全に停止した。

IR-LEGO を利用していくつかの両側性の咽頭神経細胞に Arch::GFP 発現誘導し、緑色光照射を行った。発現誘導には成功したがポンピング運動に顕著な変化は見られなかった。神経細胞の冗長性が問題である可能性が高く、今後ユニークな咽頭神経細胞での発現誘導を試みる予定である。

以前の神経細胞焼却実験の結果から、MC 運動神経以外の咽頭神経細胞はポンピングの維持に必須ではないといわれてきた。しかし今回、特定の咽頭神経細胞の急性の沈静化でポンピングが完全に停止することが明らか

になった。これは本分野で特筆すべき結果だと思われる。

#### 神経活性昂進実験

光駆動型カチオンチャンネル ChR2::YFP の活性化には青色光照射を用いる。しかし、コントロール実験である野生型線虫に対する青色光照射によってポンピングは大きく抑制され、この効果は照射終了後もしばらく持続することがわかった。（なお、青色光のポンピング抑制に関する詳細な解析が、本研究実施期間の終了間際である本年2月に他グループから報告された。）このため、線虫内在性の光感受性を低下させる *lite-1* 変異を用いる必要が生じ、実験は予定より遅れている。短時間の青色光照射によってチャンネルの長期開口が引き起こされる変異型 ChR2 (C128S) を発現させることとし、予備実験として、野生型に対する青色光照射よりも強いポンピング抑制効果を示す形質転換体系統が存在するかどうか調べた。その結果、*rig-3::ChR2 (C128S)* 発現個体に対する青色光照射がポンピングを完全に停止させることを見出した。このことは、ポンピング抑制機能を持つ咽頭神経細胞が存在することを示唆しており、大変興味深く、今後さらに追及する。

#### 4) 生理的刺激による咽頭運動の調節

線虫の移動運動を駆動する体壁筋細胞に特異的なプロモーター *myo-3p* 下流で Arch を発現させ緑色光を照射すると虫の移動は停止する。このとき咽頭のポンピングも停止することを偶然見出した。これは体壁筋弛緩にともなう自己受容感覚の変化が咽頭運動に影響することを示唆する新規な結果であり、今後、この現象におけるポンピング停止機構の詳細について追及する価値が大いにありと期待している。

#### 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 2件)

Optical silencing of *C. elegans* cells with light-driven proton pumps  
, Ayako Okazaki, Megumi Takahashi, Naoya Toyoda, Shin Takagi,  
Methods S1046-2023(14) 00085-1 doi:  
10.1016/j.ymeth.2014.02.030 (2014)

Japanese studies on neural circuits and behavior of *Caenorhabditis elegans*,  
Hiroyuki Sasakura, Yuki Tsukada, Shin Takagi, Ikuo Mori,  
Frontiers in Neural Circuits (2013) 7: 187 doi:  
10.3389/fncir.2013.00187

〔学会発表〕(計 4件)

高橋めぐみ、岡崎史子、須藤雄気、塚本卓、  
高木新  
線虫を用いた新規オプトジェネティックツールの機能評価  
光操作研究会 仙台、2014年8月

高橋めぐみ、岡崎史子、須藤雄気、塚本卓、  
高木新  
Novel optogenetic tools for silencing neural activity in *C. elegans*  
*C. elegans* Topic Meeting 2014: Neuronal Development, Synaptic Function & Behavior, アメリカ、マディソン、2014年7月

高橋めぐみ、岡崎史子、須藤雄気、塚本卓、  
高木新  
Optical neural silencing by novel light-driven proton pumps in *C. elegans*  
*C. elegans* Development Topic Meeting / Asia-Pacific *C. elegans* Meeting 奈良 2014年7月

高橋めぐみ、岡崎史子、須藤雄気、塚本卓、  
高木新  
Behavioral analysis of *C. elegans* is useful for estimating availability of novel optogenetic tools  
16th International Conference on Retinal Protein (ICRP2014) 長浜 2014年10月

〔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  
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻  
M7研究室  
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~m7home/>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
高木 新(Shin Takagi)

研究者番号：90171420

(2)研究分担者  
該当無し

研究者番号：

(3)連携研究者  
該当無し

研究者番号：