

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640017

研究課題名(和文) アストロサイトの光活性化による運動能の向上の試み

研究課題名(英文) Optogenetic study for astrocyte-dependent signaling and motor learning

研究代表者

岩井 陽一 (Youichi, Iwai)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40332332

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)：アストロサイトの周辺細胞への作用および脳学習における役割を直接的に検証するために、光感受型のG蛋白質共役型受容体(OptoXR)をアストロサイト選択的に発現するトランスジェニックマウスを樹立した。麻酔下で大脳皮質を短時間光照射すると、OptoXR陽性のアストロサイト内でカルシウムが上昇した。刺激条件によっては、OptoXR陽性アストロサイト内のカルシウム上昇に続いて周囲のOptoXR陰性アストロサイト内にもカルシウム上昇が生じる現象を見出した。さらに、周囲のニューロン活動が上昇することを示唆する結果も得た。現在、運動学習時のトランスジェニックマウスを複数の条件で光照射する実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：In order to directly examine astrocyte-dependent signaling and motor learning, we have generated transgenic mice in which OptoXR, an optically activatable Gq-coupled receptor (Airan et al. 2009), is selectively expressed in astrocytes. We successfully confirmed that Ca<sup>2+</sup> elevations were triggered in OptoXR-expressing astrocytes by brief illumination of blue light in anesthetized conditions. We found that astrocytic Ca<sup>2+</sup> propagation is induced depending on the stimulus condition, as naive astrocytes also exhibited Ca<sup>2+</sup> surges with a delay after the activation of the neighboring OptoXR-expressing astrocytes. We further observed that the surrounding neurons could be activated following the illumination. We are currently exploring these astrocyte-dependent signaling mechanisms, and conducting behavioral experiments in which motor cortex of the transgenic mice are illuminated during motor-learning.

研究分野：神経科学

キーワード：グリア光遺伝学、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)、アストロサイト、グリア-ニューロン相互作用、グリア由来可塑性因子、運動学習

### 1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは多様な G 蛋白質共役型受容体(GPCR)を介して神経伝達物質や神経調節物質に反応し、細胞内カルシウムを上昇させる。アストロサイトのカルシウム上昇がシナプス可塑性に關与することが脳スライスにおいて示唆されているが、この結論を否定する報告もある。また、アストロサイトがカルシウム上昇に依存して物質を放出するかどうかについても、論争が続いている。アストロサイトの周辺細胞への作用および脳学習における役割を追究するために、光感受型の GPCR (OptoXR; Airan et al. 2009) をアストロサイトで発現するトランスジェニックマウスを複数系統樹立した。

### 2. 研究の目的

アストロサイトに発現する GPCR はニューロンでも発現している。アストロサイトは神経回路形成に關与することも示唆されている。アストロサイトの脳学習における役割を直接的に検証するには、GPCR をアストロサイト特異的に学習期に限定して操作することが肝要である。本研究は時間・空間制御能が高い光遺伝学的手法を用いて、GPCR シグナルを生体内のアストロサイトで特異的に活性化できる系の確立を目指した。アストロサイトの GPCR シグナルに依存したシナプスメカニズムおよび分子メカニズムを追究し、運動学習の促進を試みている。

### 3. 研究の方法

(1)アストロサイト型のグルタミン酸トランスporter-1 の BAC DNA に OptoXR-YFP の cDNA を挿入したコンストラクトに由来するトランスジェニックマウス(OptoXR トランスジェニックマウス)を 11 系統樹立した。各々の系統において、YFP の発現パターンを抗体染色で調べた。  
(2)麻酔下の OptoXR トランスジェニックマウスの大脳皮質において、カルシウム感受性色素の Rhod-2 をアストロサイト選択的に取り込ませて、光照射時のアストロサイトのカルシウムイメージングを行った。  
(3)麻酔下の OptoXR トランスジェニックマウスの大脳皮質において局所電場電位記録を行い、光照射時のニューロン活動を計測した。カルシウム感受性色素(OGB-1)をニューロンに取り込ませて、光照射時のニューロンのカルシウムイメージングも行った。  
(4)OptoXR トランスジェニックマウスの運動野に無線 LED を装着し、加速式ロータロッド運動訓練時に LED を照射し、ロッドに留まる時間を計測した。

### 4. 研究成果

(1)樹立した OptoXR トランスジェニックマウスの 11 系統全てにおいて、YFP はアストロサイトで発現していた。ニューロンおよびグリ

ア細胞種のマーカーに対する抗体染色実験から、4 系統はアストロサイト選択的に YFP を発現していることを確認した(図 1)。各々の系統で YFP の発現量および陽性アストロサイトの割合が異なっていた。

(2)これらの 4 系統において、アストロサイト内の Rhod-2 シグナルは光照射 10 秒以内に顕著な上昇を示した。約半数のアストロサイトで OptoXR を発現する系統を詳細に調べたところ、OptoXR 陽性のアストロサイト内でカルシウムシグナルは上昇したが、OptoXR 陰性細胞内でカルシウム上昇を検出できなかった(図 2 上段)。また、刺激の条件によっては、OptoXR 陽性アストロサイト内のカルシウム上昇に続いて周囲の OptoXR 陰性アストロサイト内にもカルシウム上昇が生じる現象を見出した(図 2 下段)。このアストロサイト間のカルシウム上昇の伝搬は TTX で神経活動を阻害しても認められた。

(3)アストロサイトの活性化が神経活動に及ぼす影響を評価する為に、麻酔下の OptoXR トランスジェニックマウスの大脳皮質から局所電場電位記録を行った。LED 照射後の局所電場電位には数  $\mu\text{V}$  程度の微弱な応答しか検出できなかったが、生体内ニューロンのカルシウムイメージングを行ったところ、一部のニューロン内でカルシウムが上昇する結果が得られた。現在、光活性化したアストロサイトが周囲のアストロサイトやニューロンの活動を制御するメカニズムを調べている。

(4)LED を装着した OptoXR トランスジェニックマウスにロータロッド試験を行った。ロッド加速直後に LED 照射したが、ロッドから落下する時間に変化は認められない(図 3)。現在、照射時間および照射のタイミングを変えた実験を行っている。

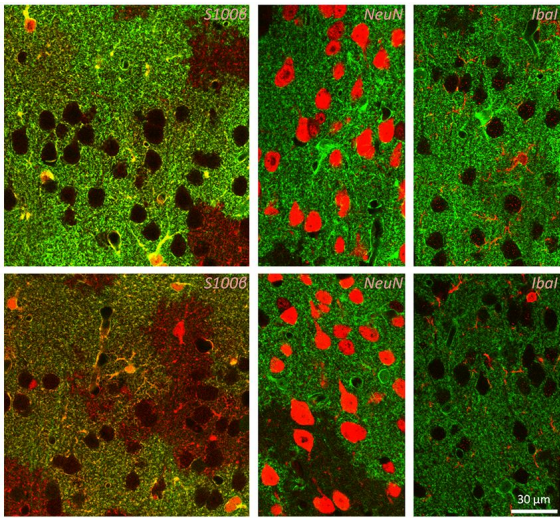


図1. OptoXR をアストロサイトで選択的に発現するトランスジェニックマウス  
OptoXR-YFP を約 80%のアストロサイトで強く発現する系統(上段)と約 70%のアストロサイトで弱く発現する系統(下段)。YFP 蛍光シグナル(緑)はアストロサイトマーカーの S100β の免疫シグナル(赤)と重なるが、ニューロンマーカーの NeuN およびミクログリアマーカーの Iba1 の免疫シグナル(赤)と重ならない。

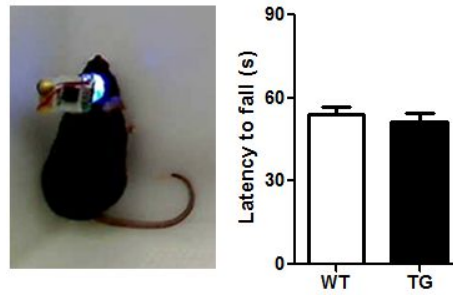


図3. OptoXR トランスジェニックマウスの運動学習  
無線 LED を装着した OptoXR トランスジェニックマウス(左)にロータロッド試験を行った。ロッド加速直後に LED を照射したが、トランスジェニックマウス(TG)のロッド上の滞在時間は野生型マウス(WT)と比べて有意に変化しなかった(右)。

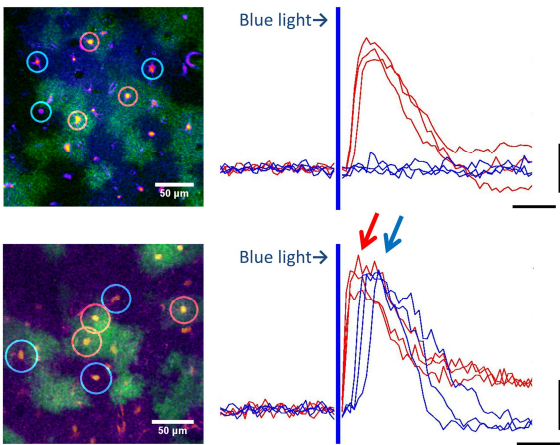


図2. OptoXR トランスジェニックマウスにおける生体内アストロサイトのカルシウムイメージング  
麻酔下で青色光を照射すると、OptoXR-YFP 陽性のアストロサイト(赤丸)内で Rhod-2 の蛍光シグナルが上昇したが、OptoXR-YFP 陰性のアストロサイト(青丸)内の Rhod-2 シグナルは変化しない(上段)。刺激条件によっては、OptoXR 陽性アストロサイト内の Rhod-2 シグナルの上昇に続いて、周囲の OptoXR 陰性アストロサイトにおいても Rhod-2 シグナルが上昇した(下段)。スケールは 10 秒(横)と 50%(縦)。

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 1件)

Volume transmission signalling via astrocytes.

Hirase H, Iwai Y, Takata T, Shinohara Y and Mishima T.

Phil. Trans. R. Soc. B 369 (2014)

査読有、DOI: 10.1098/rstb.2013.0604

〔学会発表〕(計 2件)

Transgenic mouse lines for optical activation of Gq-coupled receptors in astrocytes.

Iwai Y, Ozawa K, Yahagi K, Nagai T, Yaguchi K, Tanaka M, Itohara S and Hirase H.

Society for Neuroscience meeting, San Diego (2013 Nov 12)

Transgenic mouse lines for optical activation of Gq-coupled receptors in astrocytes.

Iwai Y, Ozawa K, Yahagi K, Nagai T, Yaguchi K, Tanaka M, Itohara S and Hirase H.

International Symposium Optogenetics, Keio University (2013 Sep 26)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩井 陽一 (Iwai Youichi)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：40332332

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：