

光感受性色素メラノプシンを用いた光操作法による局所神経回路の電気生理学的機能解明

Electrophysiological dissection of local neural circuits by optically manipulating neuronal activity with photosensitive melanopsin expression

代表研究者 自然科学研究機構生理学研究所 小泉 周

National Institute for Physiological Sciences, Amane KOIZUMI

共同研究者 自然科学研究機構生理学研究所 田中 謙二

National Institute for Physiological Sciences, Kenji F. TANAKA

英文サマリー (200 語ダブルスペース)

Melanopsin (OPN4) is a photosensitive pigment, originally from a certain type of retinal ganglion cells, that is a 7-transmembrane G-protein coupled receptor (GPCR). Several previous reports showed that ectopic expression of OPN4 can be used as a tool for optogenetics to control neural activity in retina and various nervous tissues. As compared with other optogenetical pigments, OPN4 is more sensitive to light and shows long-lasting activation, and it also can control Ca^{2+} influx. In this present study, we established novel transgenic mice by using tetracycline-regulated inducible gene expression system that successfully enabled us to control neural activity of specific

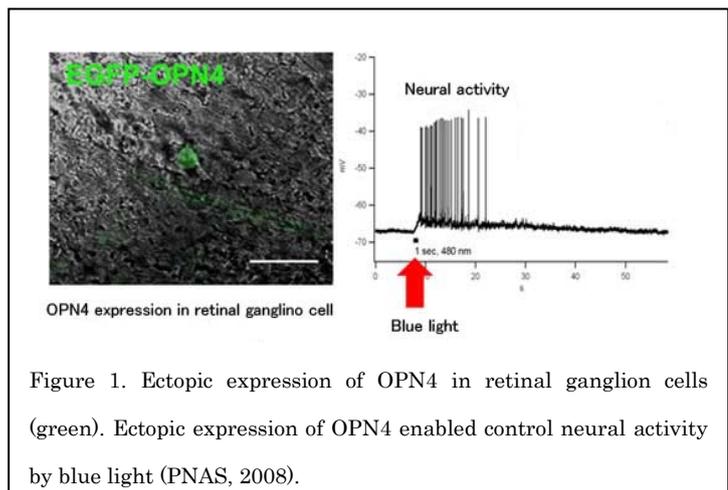
neurons such as hypothalamic orexin neurons and retinal neurons by blue light *in vitro* and *in vivo*.

(研究目的・経過・考察)

1. はじめに

<メラノプシンを用いた神経機能の光操作法の確立>

光を感じて電気信号に変換する光感受性色素メラノプシン (OPN4) は、もともと哺乳類網膜の神経節細胞 (RGC) の一種、約 1% において見つかったものである (Hatter et al, Science, 2002)。そもそも網膜では視細胞にロドプシンがあり、これによって光を感じて視覚を生み出す源となっているが、この OPN4 は、視細胞ではなく網膜から高次神経への出力を担っている RGC で発現しているところが特徴的である。OPN4 を発現するメラノプシン含有 RGC は、周囲の明るさや暗さを感じ視交叉上核の体内時計にその明るさの情報を送ったり、光を感じて瞳孔反射を起こす起点になったりしている。



OPN4 は、非哺乳類で見出された光感受性色素であるチャンネルロドプシン (ChR2) やハロロドプシン (HaloR) とは異なり、7回膜貫通型の G タンパク質共役受容体 (GPCR) のため、イオンチャンネルとは直結していない。G タンパク質の活性化を介して、TRPC チャンネルを活性化させ、Ca²⁺などの陽イオンの流入をおこし、神経細胞を脱分極させる。こうした細胞内メカニズムによる増幅作用もあり、ChR2 や HaloR と比して OPN4 は光感受性が高い。このことから、OPN4 をさまざまな神経細胞群へ遺伝子強制導入し、必要に応じて共役するイオンチャンネルも共導入することで、光によって *in vivo* で脳神経機能を制御することが考えられる。

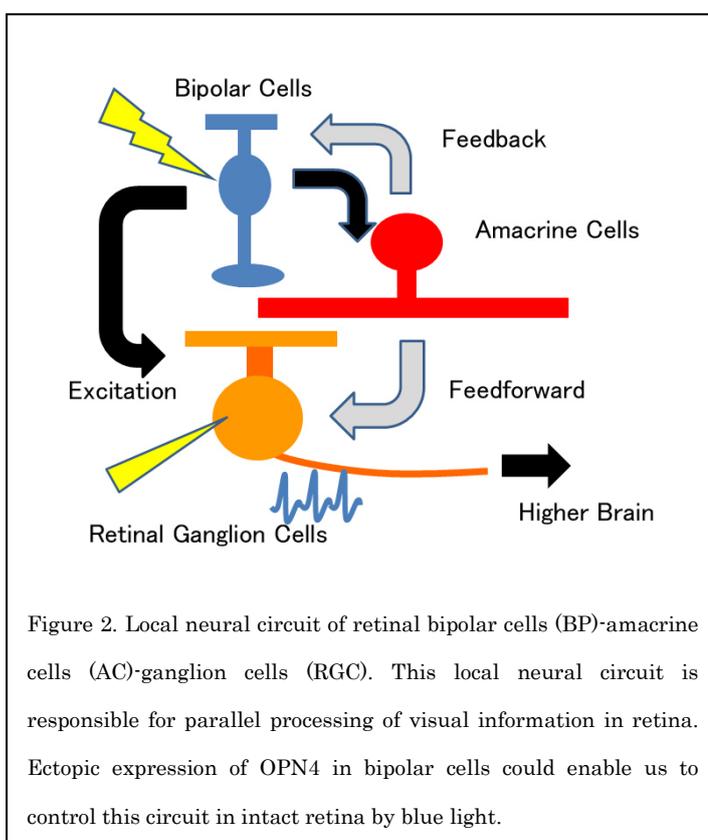
これまでの代表研究者の研究によって、OPN4 を外部から遺伝子導入した網膜の非メラノプシン含有 RGC が、光感受性を獲得し、光の照射に応じて膜電位

を上昇させ活動電位を発生させること（神経活動の光操作）、そして、*in vivo* では目が見えなくなった網膜色素変性症マウスの光に対する反応性を獲得させることに成功している（Figure 1; Lin, Koizumi et al, PNAS, 2008）。

こうした OPN4 による光操作の手法を、RGC だけでなく他の神経細胞にも応用することができれば、光による長期の神経活動の操作が実現できるものと考えられる。

<網膜内の視覚情報処理を担う局所神経回路の光操作法による解明>

最近の様々な分子解剖生物学的な手法により、網膜には多種多様なサブタイプにわけられる双極細胞（BP）や、アマクリン細胞（AC）、RGC の神経細胞があり、それぞれ異なる視覚情報を担っていることが分かってきた。網膜の視覚情報は、この局所神経回路（Figure 2）で作られる興奮と修飾のバランスとタイミングによる RGC の活動電位の発火パターンであり、「動き」や「境界」「形」「色」など異なる視覚情報によって異なる RGC が異なる発火パターンで反応する。この発火パターンを生み出す複雑な局所神経回路の働きを、光操作法を応用して視覚情報の種類ごとに切り分けて解析することができれば、それぞれの視覚情報処理における局所神経回路の働きを解明できるものと考えられる。



2. 研究目的

本研究の実施にあたっては、2つの目的を研究目標にたてて、同時並行で行った。

(1) OPN4 を用いた神経細胞の活動の *in vitro* および *in vivo* 光操作手法の確立

RGC 以外の神経細胞において OPN4 を異所性に発現させ、神経細胞の機能を光によって *in vitro* および *in vivo* で操作する方法の確立を目的とした。そのた

めに、テトラサイクリン遺伝子誘導系を用いた遺伝子改変動物（マウス）の開発と、そのマウスに対する *in vitro* および *in vivo* での光操作方法の確立を行った。

（２）OPN4 を用いて網膜内の視覚情報処理を担う局所神経回路を光操作する手法の開発

網膜内の局所神経回路は網膜内部にあり、平面的な広がりを持つ AC や RGC の樹状突起を介して複雑に修飾をうけている。従来の電気生理学的手法では、この局所神経回路にアプローチするためには網膜スライスをつくり平面的な広がりを持つ神経回路の一部を破壊する必要があった。そこで、本研究では、非侵襲的に OPN4 を用いた光操作により網膜内部の BP や AC を操作する手法を開発することを目的とした。これによって、網膜をスライスせず、AC の平面的な樹状突起構造などの局所神経回路を傷つけることなく、局所神経回路を光で活性化させ、その働きを解明することができる。

3. 研究結果と考察

（１）OPN4 を orexin 神経細胞に異所性発現させ、*in vitro* および *in vivo* での光操作法に成功

テトラサイクリン遺伝子誘導系を用いて、異所性に OPN4 を発現させる遺伝子改変動物 (BitetO-hOPN4-mCherry 遺伝子改変マウス) を開発した。これは、特定のプロモーター活性下で発現するテトラサイクリン・アクティベーター (tTA) 存在下に特定の神経細胞で OPN4 を発現できるものである。この BitetO-hOPN4-mCherry 遺伝子改変マウスと、視床下部の orexin 神経細胞特異的なプロモーター活性の見られる orexin-tTA マウスとを掛け合わせることで、orexin 神経細胞に特異的に OPN4 を発現するダブル遺伝子改変マウスの開発に成功した。このダブル遺伝子改変マウスの脳スライス標本上で、青色光による

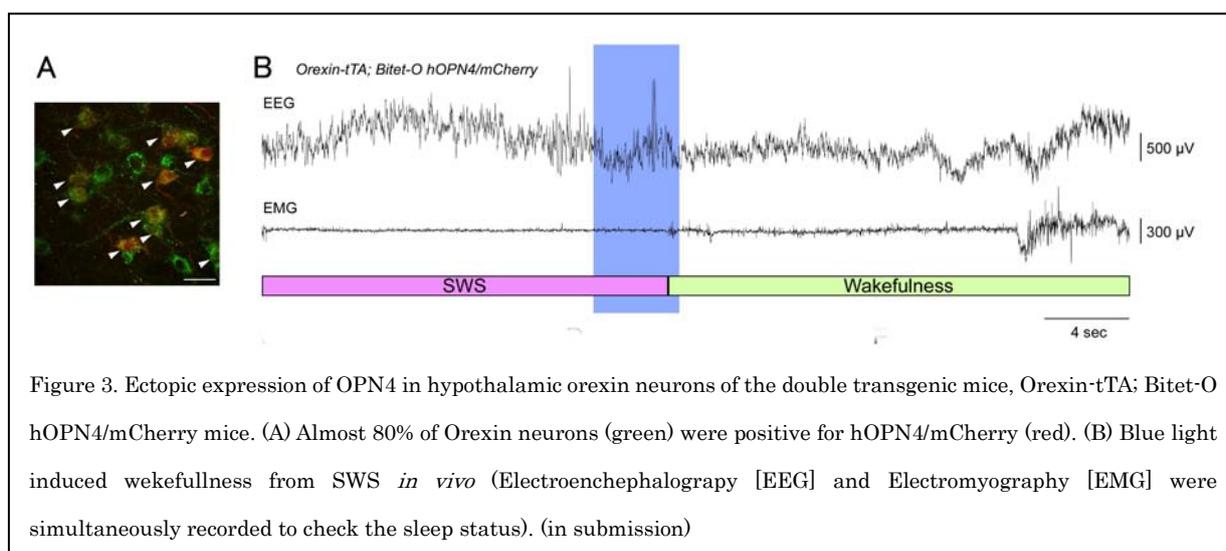


Figure 3. Ectopic expression of OPN4 in hypothalamic orexin neurons of the double transgenic mice, Orexin-tTA; Bitet-O hOPN4/mCherry mice. (A) Almost 80% of Orexin neurons (green) were positive for hOPN4/mCherry (red). (B) Blue light induced wakefulness from SWS *in vivo* (Electroencephalography [EEG] and Electromyography [EMG] were simultaneously recorded to check the sleep status). (in submission)

光刺激を行ったところ、OPN4 の電気応答として特徴的な数十秒持続する活動電位の頻度の上昇がみられた。また、このダブル遺伝子改変マウスの視床下部に対して、光ファイバーによる *in vivo* 光刺激を行ったところ、徐波睡眠 (SWS) 中のマウスを覚醒させることに成功した (Figure 3; 論文投稿中)。

(2) 網膜双極細胞 (BP) へのOPN4 遺伝子導入に成功

網膜内で双極細胞に特異的に発現するプロモーター活性を用いて、双極細胞に OPN4 を特異的に発現させ、光操作することが可能である。上記 (1) で開発した BitetO-hOPN4-mCherry 遺伝子改変マウスと、双極細胞特異的プロモーター下に tTA を発現するマウスを掛け合わせることで、特定の数種類の双極細胞に OPN4 を発現させることに成功した (論文投稿準備中)。今後、このマウス網膜に対して、*in vitro* および *in vivo* での光操作法を適用し、網膜局所神経回路の機能解明を目指す予定である。

4. 研究発表

<口頭発表>

田中謙二、山中章弘、小泉周。メラノプシンの特性を生かした神経機能操作。第34回神経科学大会 (シンポジウム招待講演)、2011年9月、横浜。

<誌上発表>

1. Amane Koizumi, Kenji F. Tanaka, Akihiro Yamanaka. Manipulation of neuronal and cellular activity by ectopic expression of melanopsin. Neuroscience Research (in submission).

2. Tomomi Tsunematsu, Kenji F. Tanaka, Akihiro Yamanka, Amane Koizumi. Ectopic expression of melanopsin in orexin neurons enables control of wakefulness of mice in vivo by blue light. Neuroscience Research (in submission).