チャネルロドプシンを発現させた培養神経回路の光制御

Optical Control of Channelrhodopsin-2-expressing Cultured Neuronal Network

酒井　秀夫　　指導教員　高橋 宏知 講師

Hideo SAKAI　　(Lecturer Hirokazu TAKAHASHI)

Keywords: Brain, culturing neurons, gene engineering, bioinstrumentation, microelectrode array

1. はじめに

生物の記憶・学習の仕組みの解明や，生体センサーの開発のため，神経細胞の分散型培養系を用いた研究が古くから行われてきた．しかし，その刺激・計測に 用いられる従来の微小電極配列 (Microelectrode array, MEA) は，電極の形状や数に空間分解能が制限される欠点があった．近年，青色光に反応して数ミリ秒オーダーで細胞に脱分極を引き起こすチャネルロドプシン[1] (Channelrhodopsin-2, ChR2) と呼ばれるタンパク質が発見され，注目を浴びている．本研究では，チャネルロドプシンを培養神経細胞に遺伝子導入し，MEA ではできなかった細胞単位の刺激を光によって行う系を構築し，その回路の制御性能を検証する．

2. 手法

2.1 培養

妊娠 18 日目のウィスターラットを安楽死させ, 子宮から胎児を取りだした．胎児の脳から皮質を切り出し，トリプシンとピペッティングによって細胞を単離し，ポリリジンとラミニンでコーティング済みの培養皿に，細胞数 1 万個になるように播種した. 播種後 30 分後に培地を培養皿の容量の半分だけ加え，翌日に残りの半分を加えた．播種後 6 日目 (6 DIV, 6 Days in vitro) に培地を新しいものに交換し，7 DIV に LipofectAmine2000 を用いて DNA プラスミドを遺伝子導入し，細胞にタンパクを発現させた．本実験で用いた DNA プラスミドは, Stanford 大学 の Karl Deisseroth 准教授の寄与を受けた pLenti-EF1a-ChR2-EYFP-WPRE, pLenti-EF1a-ChR2(H134R)- EYFP-WPRE ，及び神戸大学の森田光洋准教授の pcEF-EGFP と pLenti-EF1a-ChR2-EYFP-WPRE を基に作成した pcEF-EYFP の 3 種である．図 1 は ChR2-EYFP を遺伝子導入した細胞の蛍光である．ChR2(H134R) は ChR2 の改変タンパク質で励起時に大きい電流を発生させると言われている．

2.2. Ca^{2+} imaging

ChR2 細胞の活動を調べるため， ChR2-EYFP , ChR2(H134R)–EYFP 及び EYFP のみを遺伝子導入した培養細胞と遺伝子導入を行わなかった培養神経細胞にカルシウム感受性色素 X-rhod-1 を 導入し，光刺激に対する応答を調べた. 培地を 4 μM の X-rhod-1, AM を溶かした人工脳髄液に変えて 20 分インキュベートし，1μM の all-trans retinal を加えた人工脳髄液でさらに 20 分インキュベートした. 39 mW / mm^2 のアルゴンレーザーで 1 Hz 20 ms のパルス状刺激を 20 秒間与え，X-rhod-1 の蛍光の変化を CCD カメラで 16 Hz で撮影した．レーザーの制御には Digital Mirror Device を用いた.

2.3 MEA

MEA 上の培養神経細胞に ChR2(H134R)-EYFP を遺伝子導

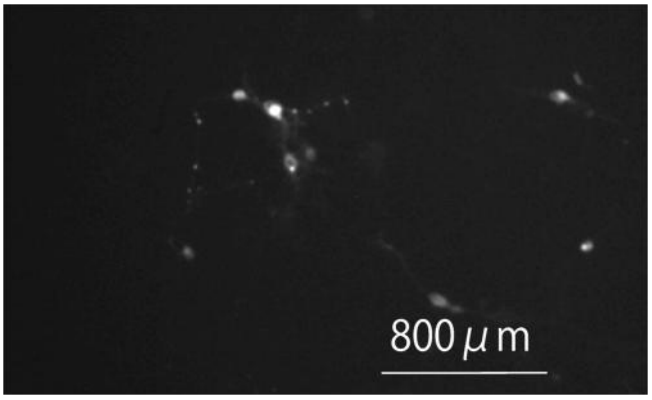

Fig. 1 The fluorescence of ChR2-EYFP expressing cells

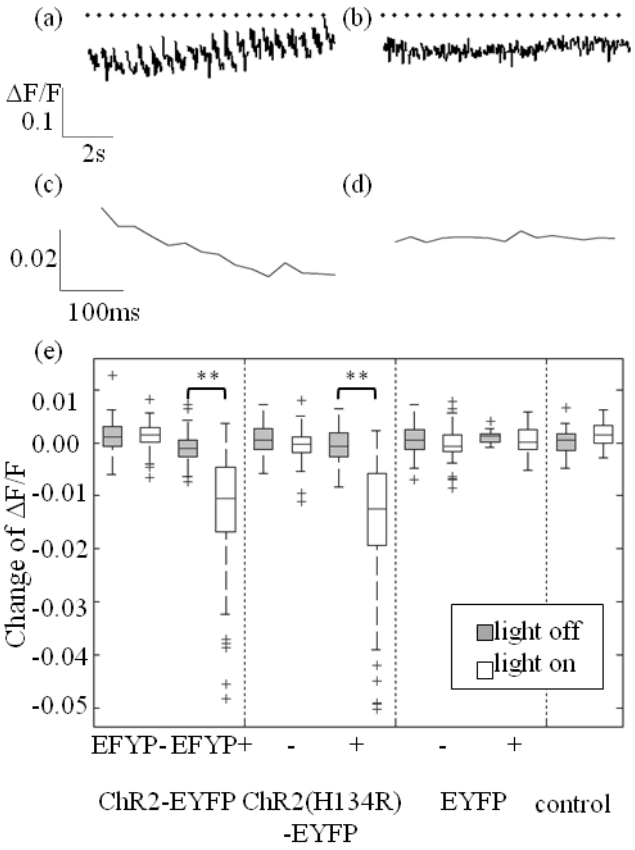

Fig. 2 Ca^{2+} Response.

(a) (b) Example time courses of Calcium response to 1Hz, 20ms duration blue laser stimuli expressed as dots. (a) is ChR2-EYFP cell. (b) is control cell. (c) (d) Average of calcium response after each stimulus in (a) and (b). (e) Boxplot of the average calcium response difference between after stimulus and before next stimulus. **: $P < 0.01$ (t –test)

入した．回路の自発発火によるバーストが観測できるようになってから (25 DIV～40 DIV), 実験を行った．測定は 5 分間連続して行い，そのうち 60 s ~ 120 s と 180 s ~ 240 s の間にパルス状の光刺激を与え，応答を計測した．

3. 結果とその検討

3.1 Ca^{2+} imaging

ChR2-EYFP を遺伝子導入した培養皿で，EYFP の蛍光が確認できた細胞は，図 2 (a) のように光刺激に同期したカルシウム感受性色素の蛍光変化が確認された．刺激ごとに加算平均すると，図 2 (c) のように刺激直後では蛍光が強く，時間とともに蛍光が下がっていくことがわかった．これは, 光刺激で ChR2 が励起されて細胞内に Ca^{2+}が流入し，その後外へ流出しているからだと考えられる． 1 つの刺激の直後と次の刺激の直前の蛍光との差をとると，ChR2–EYFP と ChR2(H134R)–EYFP を遺伝子導入した条件下で，EYFP 蛍光が確認できる細胞において光照射時に有意な蛍光の低下が見られた (図 2 (e)) ．この反応は EYFP のみを遺伝子導入した条件や刺激を与えない場合には見られなかったため, ChR2 の活動によるものであると言える．

3.2 MEA

ChR2(H134R)–EYFP を導入し，EYFP 蛍光細胞に対して 1Hz で刺激を行ったところ，回路全体の活動の変化が見られた(図 3 (a)). この刺激周波数を変化させ，各電極で計測された発火頻度とその変動係数の平均を図 3 (b) 上段に示した．この図から，自発発火と比較して刺激によって発火頻度が上昇し，変動係数が低下することが読み取れる．光刺激によって，自発発火よりも安定した状態で回路全体の発火頻度を上昇させることができると言える．しかし，刺激の周波数を上げても発火頻度は横ばいであり，刺激周波数による発火頻度の制御はできていない．

次に，4 個及び 10 個の EYFP 蛍光細胞に対して，順番に刺激を行った (図 3 (b) 中・下段). 4 個の刺激では周波数が上がるにつれて発火頻度が上昇し，変動係数も低いまま安定していた．一方，10 個の刺激ではおよそ 10 Hz 近辺をピークにして高周波数で発火頻度の低下が確認された．また，変動係数の上昇も確認された．刺激を複数個所に分散させた実験では，分散させた場所の数で応答に大きな差があることがわかった．刺激パターンと周波数の最適化によって, 安定して発火頻度を制御することができると言える．

4. 結論

光による培養神経の制御を可能にするため，ChR2 を神経細胞に遺伝子導入した．Ca^{2+}イメージングによって青色光に対する応答を調べたところ，ChR2 が発現している細胞で光照射に同期して 2%程度のカルシウム感受性色素の蛍光強度変化が見られ，ChR2 の活動が確認できた．

微小電極配列上で培養した細胞に ChR2 を導入して光刺激を試みたところ，刺激に同期して回路全体の活動に変化が起き，発火頻度の上昇と変動係数の低下が確認できた．また，数か所に刺激を分散させた場合，その数によって反応が大きく異なることがわかった．特に 4 か所に刺激を分散させた条件では，変動係数を低く保ったまま，周波数に応じて発火頻度を上昇させることができた．

これらのことより，ChR2 を遺伝子導入した分散型培養系において，光による制御が可能であることを示した．

参考文献

[1] E. S. Boyden *el al*., “Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity”, Nature Neuroscience, Vol. 8, (2005), pp. 1263 – 1268.

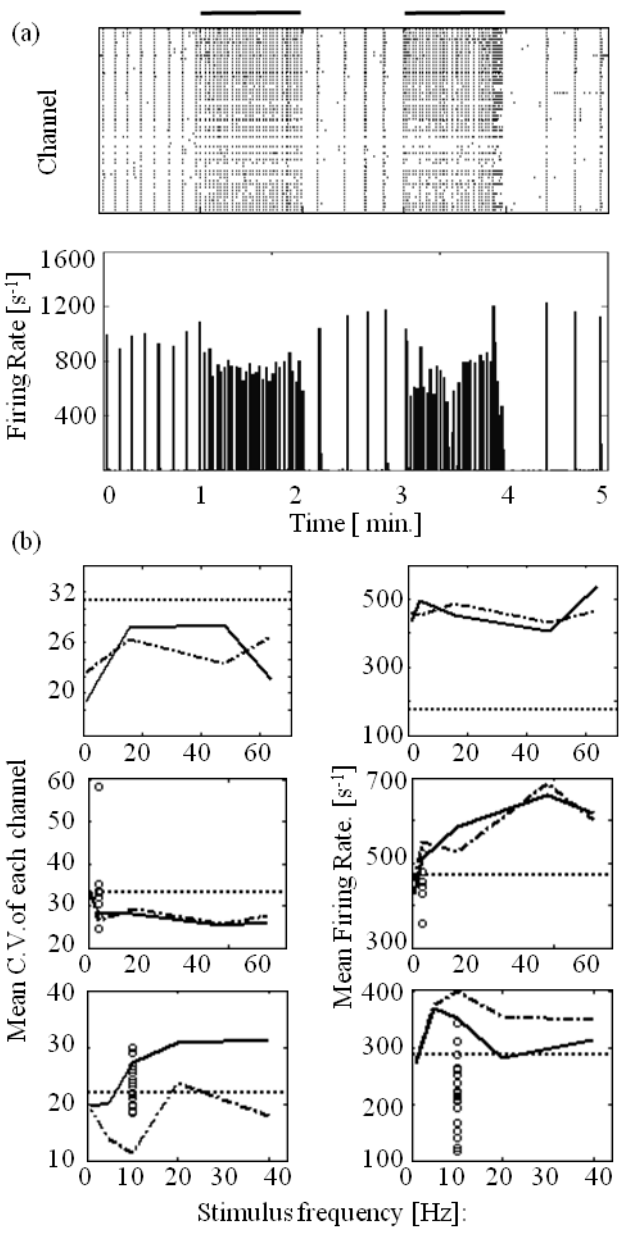

Fig. 3 MEA Response.

(a) upper : Raster plot of MEA response. Vertical bars are train of stimuli, 1Hz 20ms duration. lower : Post-Stimulus Spike Histogram. bin = 1s. (b) upper : 1 spot stimuli. middle:4 spots stimuli. lower : 10 spots stimuli. left : Mean C.V. of each electrode. right : Mean firing rate. Solid lines indicate the first stimuli interval, and dash lines indicate the second one. Vertical lines are C.V. or firing rate of spontaneous activity. Circles indicate the response of single spot stimuli.