

チャンネルロドプシンを発現させた光応答型培養神経回路

機械情報 4年 酒井秀夫

指導教員 高橋宏知 講師

1. はじめに

培養神経細胞を用いた研究では、従来、微小多点電極アレイ (Microelectrode Array, MEA) が用いられて来た。しかし、MEA を用いた実験は、微小電極の数や密度に制約を受けるため、目的の細胞を任意に刺激することができない。チャンネルロドプシン (ChR2) は青色光を照射されると細胞に脱分極を引き起こすタンパク質である[1]。ChR2 の培養細胞への導入の手法の多くは特別な技術の必要なウイルスベクター法によるものである。

2. 目的

本研究の目的は、ChR2 - MEA 実験系の簡単な構築法を探ることである。具体的には、以下を行う。(1) ChR2 をラット胎児皮質の培養神経細胞に発現させる。(2) 光刺激をし、神経活動を MEA で測定する。

3. 方法

トランスフェクションの条件探索

受精後 18 日目のラットの胚から摘出した皮質を培養し、1 週間後トランスフェクション法で遺伝子を導入した。予備実験として EGFP の発現を調べた後、ChR2-EYFP の発現を調べた。これらの遺伝子導入実験では、トランスフェクション試薬、細胞数、培地、プロモータをパラメータとした。EGFP の発現実験では、プロモータとして、EF1 α を用い、培地として異なる 4 種類の組成を用意した。ChR2-EYFP の発現実験では、プロモータとして、EF1 α と CaMKII の 2 種類を試みた。また、両実験では、試薬に NeuroMag (OBZ) と Lipofectamine2000 (Invitrogen) の 2 種類と、播種細胞数として、1.8 cm² の培地に、16 $\times 10^4$ 個、32 $\times 10^4$ 個、64 $\times 10^4$ 個の 3 条件を用いた。なお、EF1 α を用いた ChR2-EYFP のプラスミドは自作し、それ以外のプラスミドは外部から提供を受けた。

Ca²⁺イメージング

ChR2-EYFP の発現を確認し、X-rhod1 AM による Ca²⁺イメージングを行って 488nm レーザー照射による X-rhod1 の蛍光変化を EYFP の蛍光と比較した。

MEA による神経細胞活動の計測

MEA 上に神経細胞を培養し、488nm レーザー照射によるスパイク数の変化を調べた。

4. 結果

図 1 と図 2 に、それぞれ EGFP と ChR2-EYFP の遺伝子導入の結果を示した。この実験では試薬として Lipofectamine2000、プロモータとして EF1 α を用いると高効率な遺伝子導入が行えることがわかった。

図 3 に、EYFP と X-rhod1 の差分合成画像を示した。黄色い部分に EYFP の発現と、青色光照射時のカルシウム応答の両方が認められた。

図 4 に MEA による神経活動計測の様子を示す。枠線で囲まれた 302 s ~ 600 s の時間帯にレーザー照射したところ、神経活動の増加が認められた。

5. 結論

Lipofectamine2000 と本研究で作成した EF1 α プ

ロモータのプラスミドにより ChR2 - MEA 実験系を構築することができた。

参考文献

[1] Edward S. B. et al., "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity," *Nat. Neurosci.* Vol. 8, p. p. 1263 - 1268, 2005.

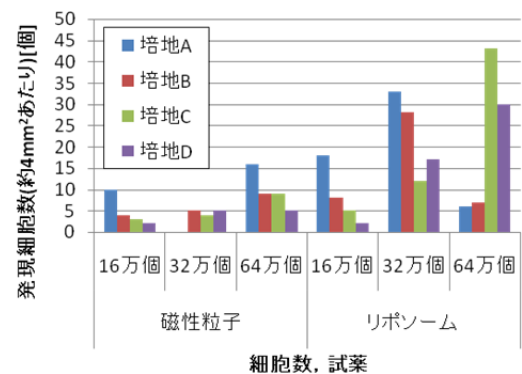


図1 EGFPの導入

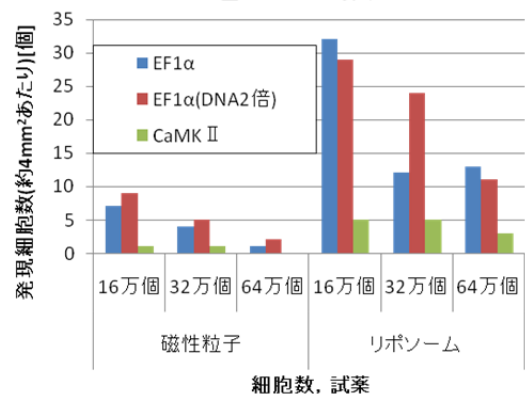


図2 ChR2-EYFPの導入

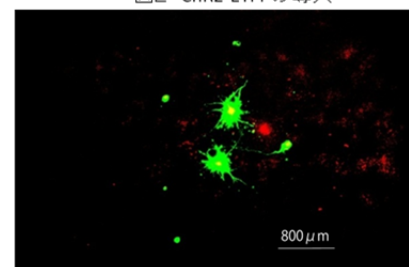


図3 EYFP蛍光 (緑), 青色光照射時のX-rhod1の蛍光増加 (赤) の合成画像。黄色の部分はChR2-EYFP発現細胞のCa²⁺応答

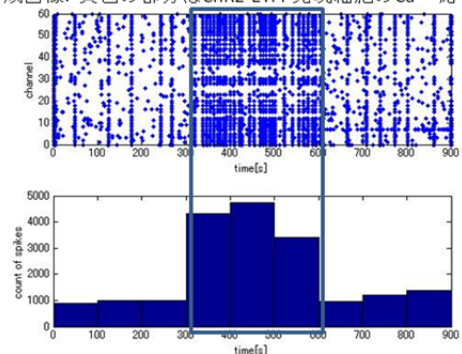


図4 MEAによる神経活動計測 (上)縦軸に電極のチャンネル、横軸に時間を取り、発火時刻をドットでプロットした。(下)縦軸に発火数、横軸に時間を取り、発火数の合計をヒストグラムで示した。