

# Generation and optogenetic characterization of mice in which QRFP-containing neurons selectively express Cre recombinase

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Takahashi, Tohru メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00052713">https://doi.org/10.24517/00052713</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【要約】

修士課程優秀論文

QRFP ニューロン特異的 Cre 発現マウスの作製と光遺伝学的解析

Generation and optogenetic characterization of mice in which QRFP-containing neurons selectively express Cre recombinase

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 分子神経科学・統合生理学  
高 橋 徹

はじめに

QRFP (pyroglutamylated arginine-phenylalanine-amide peptide) はオーファン GPCR (G 蛋白共役型受容体) の一つである GPR103 の内在性リガンドとして 2003 年に発見、2006 年にラット脳より単離・精製された新規神経ペプチドである<sup>1)2)3)</sup>。QRFP を発現する神経細胞 (QRFP ニューロン) は視床下部に限局して分布しており、その脳領域には視床下部外側野 (lateral hypothalamus : LH) や脳室周囲核、灰白隆起 (tuber cinereum : TC) が含まれる<sup>1)3)</sup>。

齧歯類の研究において、QRFP の脳室内投与により摂食量・運動量、身づくろい行動の増加及び代謝率、血圧、心拍数等の上昇が観察される<sup>3)</sup>。QRFP 欠損マウスは少食で痩せ型を呈し、行動実験においては不安様行動の増加および運動量の減少が観察される<sup>4)</sup>。これらの報告は QRFP が摂食行動やエネルギー代謝、気分などの調節に関わっていることを示唆している。しかしながら、QRFP の生理的条件下での役割および QRFP ニューロンが軸索を投射し標的とする脳部位については不明である。

そこで本研究では、QRFP ニューロンの生理的機能および標的脳部位を明らかにすべく、QRFP ニューロン特異的に Cre 酵素 (Cre) を発現するマウス (QRFP-iCre マウス) を作製した。この新規マウス系統と種々の Cre 依存的な技術を併用し、視床下部 QRFP ニューロンの軸索投射を同定した。さらに光遺伝学的手法を用いて QRFP ニューロンの活動を特異的に操作し、マウスの行動に与える影響を検証した。

結 果

はじめに QRFP-iCre マウスと Cre 依存的にレポータータンパク質 (tdTomato) を発現するマウス (Rosa26-CAG-flox-STOP-tdTomato (Ai9)) を交配させ Ai9:QRFP-iCre マウスを作製し、QRFP ニューロンにおける Cre の発現を確認した。Ai9:QRFP-iCre における tdTomato は視床下部に発現しており、発現分布パターンは QRFP 発現を示すこれまでの報告と一致していた<sup>3)4)</sup>。

視床下部 QRFP ニューロンの軸索投射先の同定

次に、QRFP ニューロンの軸索投射を同定するために、光受容膜タンパク質であるチャンネルロドプシン 2

(channelrhodopsin-2 : ChR2) を発現させる組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) を作製した。この AAV (AAV-ChR2) では ChR2 遺伝子が loxP 配列に挟まれて導入されており、Cre-loxP システム依存的に ChR2 が発現する仕組みである (図1)。また本研究で用いた ChR2 は enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) との融合蛋白であるため、ニューロンの細胞膜に発現する ChR2 を蛍光標識することにより神経軸索の検出が可能となる。脳定位手術により上記 AAV を QRFP-iCre マウスの視床下部に投与した (図1)。ウイルス形質導入のため手術から 4 週間経過した後、QRFP ニューロン細胞体および様々な脳領域において EYFP 発現を観察した。EYFP 陽性ニューロンは視床下部の LH および TC において確認された。一方、EYFP 陽性神経線維は線条体、前脳基底部、視床、視床下部、中脳、後脳を含む脳の広範囲において観察された (図2)。その中には、報酬や情動に関連する側坐核 (nucleus accumbens : Acb) や分界条床核 (bed nucleus of stria terminalis : BST)、ストレス応答や自律神経系を調節する機能をもつ視床下部室傍核 (the paraventricular hypothalamus : PVN)、視床室傍核 (paraventricular thalamus : PVT)、孤束核 (nucleus of the solitary tract : NTS) 吻側延髄腹外側部 (rostral ventrolateral medulla : RVLM) が含まれていた。覚醒系を司る神経核の一つである青斑核 (locus coeruleus : LC)、体液量を調節する視索上核 (supraoptic nucleus : SON) においても EYFP 陽性神経線維が検出された。また記憶形成や恐怖記憶に関わる部位である海馬や扁桃体では EYFP は検出されなかった (図2)。これらの観察は、QRFP ニューロンが脳の広範囲に軸索を投射しており、これらの部位を介して QRFP が摂食行動、自律神経系、ストレス応答などを調節し動物の行動を制御する可能性を示唆している。

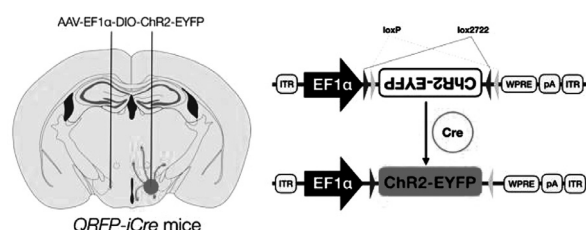


図1. AAV ベクター投与による ChR2 の発現

### 光遺伝学的手法によるQRFPニューロン特異的な活性化

QRFPニューロンの機能を調べるために、光遺伝学(optogenetics)を用いてQRFPニューロン特異的な操作を行い、マウス個体にもたらす影響を観察した。QRFP*iCre*マウスの視床下部にAAV-ChR2を投与、さらにその部位のすぐ上方に光ファイバーを留置した。光ファイバーを通じてレーザー光源による青色光を照射することにより、光感受性膜蛋白質であるChR2を刺激し、ChR2が発現するニューロン特異的に脱分極(活性化)させることができる。本研究では、QRFPニューロンの活性化が運動量や不安様行動に影響をもたらすかどうかを観察すべく、オープンフィールド試験(OFT)を実行した。OFTでの自由行動下のマウスに光照射しその影響を観察した。その結果、ChR2陽性QRFPニューロンを要するマウス群は対照群に比べて、運動量の増加および不安様行動の低下を有意に示した。光照射をする前の時間帯では両マウス群の行動に違いが見られなかったことから、これらの行動変容は光照射つまりQRFPニューロンの興奮に起因すると考えられる。これらの結果は、QRFPニューロンが活動性および気分の調節に関わることを示唆している。

### 考 察

本研究では、QRFP*iCre*マウスおよびCre依存性AAV-ChR2を用いて視床下部QRFPニューロンの順行性軸索投射先(出力系)を同定した(図2)。その投射先にはAcbや尾状核被殻(caudate putamen: CPu)、PVN、水道周囲灰白質(periaqueductal gray: PAG)が含まれ、これらは齧歯類におけるGPR103受容体分布を示した先行研究の結果と一致している<sup>3)</sup>。本研究により同定された神経核であるPVN、NTS、SON、LC、腕傍核(parabrachial nucleus: PB)、RVLMは、自律神経系や心臓血管系、ストレス応答等を制御する中枢だと知られており<sup>5)</sup>、QRFPはこれらの神経核を介して動物の生理機能の制御をしている可能性がある。しかしながら、本研究で同定された脳部位であるSON、LC、PBにおけるGPR103受容体の発現はこれまでのところ報告されていない<sup>3)</sup>。AAV-ChR2の代わりにシナプトファイジン(軸索末端に発現するタンパク質)をCre依存的に発現させるAAVを用いて同様のトレース実験を行うことにより、標的神経核における

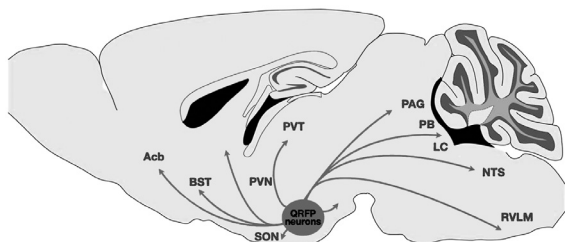


図2. 視床下部QRFPニューロンは報酬系、情動系、ストレス応答系制御に関わる領域に軸索投射している

QRFPニューロンのシナプス局在を検証する必要がある。また、狂犬病ウイルスなどの逆行性軸索トレーサーを用いることにより、視床下部QRFPニューロンへの入力系を明らかにすることも今後の課題である。

QRFP欠損マウスは行動実験において、低い活動性と不安様行動を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。光遺伝学的手法を用いた本研究では、QRFPニューロン特異的な興奮が運動量の上昇および不安様行動の減弱をもたらすことを示している。この結果はQRFP欠損マウスの研究結果<sup>4)</sup>を支持しつつ、QRFPニューロンが動物の活動性および気分を制御する生理的機能をもつ可能性を示している。しかし、QRFPニューロンの生理機能のさらなる理解のために、他の行動実験(例えば高架式十字迷路や明暗ボックス試験、条件づけ場所嗜好性試験など)を網羅的に行う必要がある。また、抑制性オプシンを用いてQRFPニューロン特異的に抑制することや、薬理遺伝学的手法によりQRFPニューロンの活動を变化させた上で行動を検証することも今後の課題の一つである。

### 結 語

本研究により、視床下部QRFPニューロンの順行性神経軸索投射は脳の広範囲に及ぶこと、ならびに視床下部QRFPニューロンの特異的な活性化は運動量上昇および抗不安作用をもたらすことが示唆された。

### 参 考 文 献

- 1) Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S et al. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15247–15252.
- 2) Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y et al. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 278: 46387–46395.
- 3) Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC et al. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7438–7443.
- 4) Okamoto K, Yamasaki M, Takao K, Soya S, Iwasaki M, Sasaki K et al. (2016). QRFP-deficient mice are hypophagic, lean, hypoactive and exhibit increased anxiety-like behavior. *PLoS One* 11 e0164716.
- 5) Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397–409



#### Profile

2016年3月 鳥取大学医学部生命科学科卒業  
 2018年3月 金沢大学医薬保健学総合研究科修士課程修了  
 2018年4月～ 筑波大学人間総合科学研究科博士課程在籍中