

## バゾプレッシンニューロンの光制御による新たなナトリウム・水分調節解明の試み

上田 陽一, 橋本 弘史

産業医科大学医学部

**概要** 下垂体後葉ホルモンの一つであるバゾプレッシンは、腎臓に作用して水の再吸収を促進することから抗利尿ホルモンとも呼ばれている。バゾプレッシンは、視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から活動電位依存性に血中に分泌される。

最近、光遺伝学(オプトジェネティクス)技術の進展により、ニューロン活動を光操作することが可能となった。私たちは、遺伝子改変技術を用いて、ラットのバゾプレッシンニューロンを eGFP 緑色蛍光により可視化した経験のもと、バゾプレッシンニューロンに光感受性タンパクを強制発現させることによってバゾプレッシンニューロンの神経活動を光操作できるのではないかとの着想に至った。

本研究課題では、光興奮性タンパク(チャンネルロドプシン2(ChR2))を、遺伝子改変技術を用いて、ラットのバゾプレッシンニューロンに特異的に発現させることでその神経活動を光制御することを目的とした。

結果は以下の通りである。1)バゾプレッシン-ChR2-eGFP トランスジェニックラットを作出することができた、2) ChR2-eGFP 融合遺伝子が視床下部視索上核および室傍核に局在するバゾプレッシンニューロンに特異的に発現し、食塩水負荷により ChR2-eGFP 発現が視床下部-下垂体後葉系に著明に増加した、3) eGFP 緑色蛍光がバゾプレッシンニューロンの細胞膜に特異的に発現していた、および4) 青色光照射により脱分極および活動電位を誘発することができた。したがって、今回作出したバゾプレッシン ChR2-eGFP トランスジェニックラットでは、バゾプレッシンニューロンに ChR2 が特異的に発現しており、機能的にも働くことが確認された。今後、バゾプレッシンニューロンの神経活動を光操作することで新たなナトリウム・水分調節機構を見出すことが期待される。

今後の課題としては、脳スライス標本ひいては *in vivo* での光操作を行う研究へと発展していきたい。また、光操作によるバゾプレッシン分泌調節についても検討したい。

### 1. 研究目的

生体内のナトリウム・水分バランスは種々の液性・神経性調節によって一定の範囲内に保持されている。

下垂体後葉ホルモンの一つであるバゾプレッシンは、腎臓に作用して水の再吸収を促進することから抗利尿ホルモンとも呼ばれている。バゾプレッシンは、視床下部視索上核および室傍核に局在する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から活動電位依存性に血中に分泌される。

私たちは、バゾプレッシンニューロンを可視化するためにバゾプレッシン遺伝子に改変緑色蛍光タンパク(eGFP)

遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いてバゾプレッシン-eGFP トランスジェニックラットを作出した<sup>(1)</sup>。このトランスジェニックラットでは、脱水および食塩水の飲水負荷によりバゾプレッシンニューロンの eGFP 緑色蛍光が著明に増加することを報告した<sup>(1,2)</sup>。

最近、光遺伝学(オプトジェネティクス)技術の進展により、ニューロン活動を光操作することが可能となった<sup>(3,4)</sup>。私たちは、バゾプレッシンニューロンを eGFP 緑色蛍光により可視化することを可能にした経験のもとに、バゾプレッシンニューロンに光感受性タンパクを強制発現させることによってバゾプレッシンニューロンの神経活動を光操作で

きるのではないかとの着想に至った。

そこで、本研究課題では、光興奮性タンパク(チャネルロドプシン2(ChR2))をバゾプレッシンニューロンに特異的に発現させることでその神経活動を光制御することを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 バゾプレッシン-ChR2-eGFP トランスジェニックラットの作出

バゾプレッシン遺伝子にeGFP標識したChR2遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて、バゾプレッシン-ChR2-eGFPトランスジェニックラットを作出した。

得られたトランスジェニックラットでのこの融合遺伝子の発現量および発現の有無は、耳介組織より抽出したDNAを用いて、サザンプロット法およびPCR法により確認した。

### 2.2 バゾプレッシンニューロンにおけるChR2-eGFPの発現

実験には、成熟雄性および雌性トランスジェニックラットを用いた。水道水飲水(コントロール)もしくは2%食塩水の飲水負荷(5日間)後、深麻酔下で開胸して4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、脳および下垂体を取り出した。

2日間の後固定後、視床下部を含む薄切切片(30 μm)を作成し、蛍光顕微鏡下でeGFP緑色蛍光を観察した。下垂体後葉は切片にせず、そのまま蛍光顕微鏡下で観察した。

### 2.3 バゾプレッシンおよびオキシトシンとeGFP緑色蛍光の共存

視床下部視索上核および室傍核を含む切片を抗バゾプレッシン抗体(Lot.1004001, Immunostar Inc.)もしくは抗オキシトシン抗体(AB911, Merck Millipore Corp.)を用いて免疫組織化学的染色を行い、Alexa 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)により可視化した。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡でeGFP緑色蛍光とAlexa546赤色蛍光の共存の有無を観察した。

### 2.4 ホールセルパッチクランプ法を用いた青色光照射の検討

幼若トランスジェニックラットの頸椎脱臼後、すばやく脳をとりだし、視床下部を含むブロック標本作製した。さらに、マイクロスライサーを用いてスライス標本作成した後、

視索上核を含む部位をパンチアウトして酵素処理によりニューロンを単離した。

eGFP緑色蛍光を指標にしてニューロンを同定し、単離ニューロンからホールセルパッチクランプ法を用いて静止膜電位および神経活動を記録した。青色光照射前・後の膜電位および活動電位の変化について検討した。

## 3. 研究結果

### 3.1 バゾプレッシン-ChR2 トランスジェニックラットの作出

4匹のファウンダーが得られ、バゾプレッシン-ChR2-eGFP融合遺伝子のコピー数が10~30コピーであった。ファウンダーからF1個体を得て、PCR法により融合遺伝子の継代を確認することができた。

### 3.2 バゾプレッシンニューロンにおけるChR2-eGFPの発現

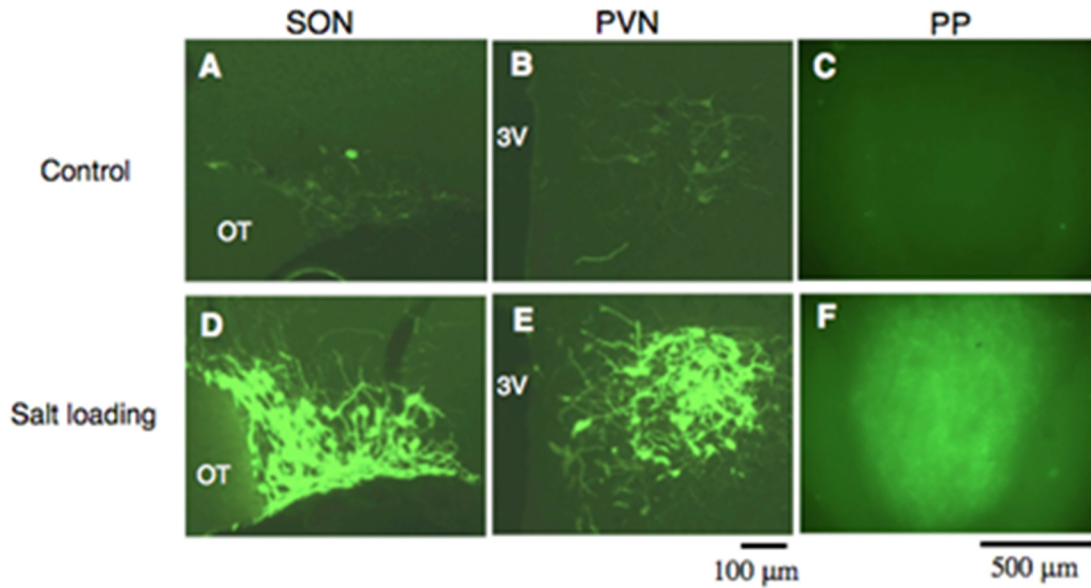
水道水飲水(コントロール)および2%食塩水の飲水負荷(5日間)後、視床下部視索状核、室傍核および下垂体後葉におけるeGFP緑色蛍光を観察した。コントロールでは、視索上核および視索上核に散在するeGFP陽性ニューロンが見られたが、下垂体後葉ではeGFP緑色蛍光はほとんど見られなかった(Fig. 1 A-C)。一方、2%食塩水の飲水負荷では、視索上核および室傍核の大細胞領域にeGFP緑色蛍光の増強したニューロンおよび神経線維が見られた(Fig. 1D, E)。また、下垂体後葉にもeGFP緑色蛍光が見られた(Fig. 1F)。

### 3.3 バゾプレッシンおよびオキシトシンとeGFP緑色蛍光の共存

視索上核および室傍核で見られたeGFP緑色蛍光は、ニューロンの細胞膜に局在していた(Fig. 2A)。さらに、細胞膜にeGFP緑色蛍光が観察されたニューロンのほとんどで細胞質にバゾプレッシン免疫陽性が見られ、オキシトシン免疫陽性を示すものはなかった(Fig. 2B)。

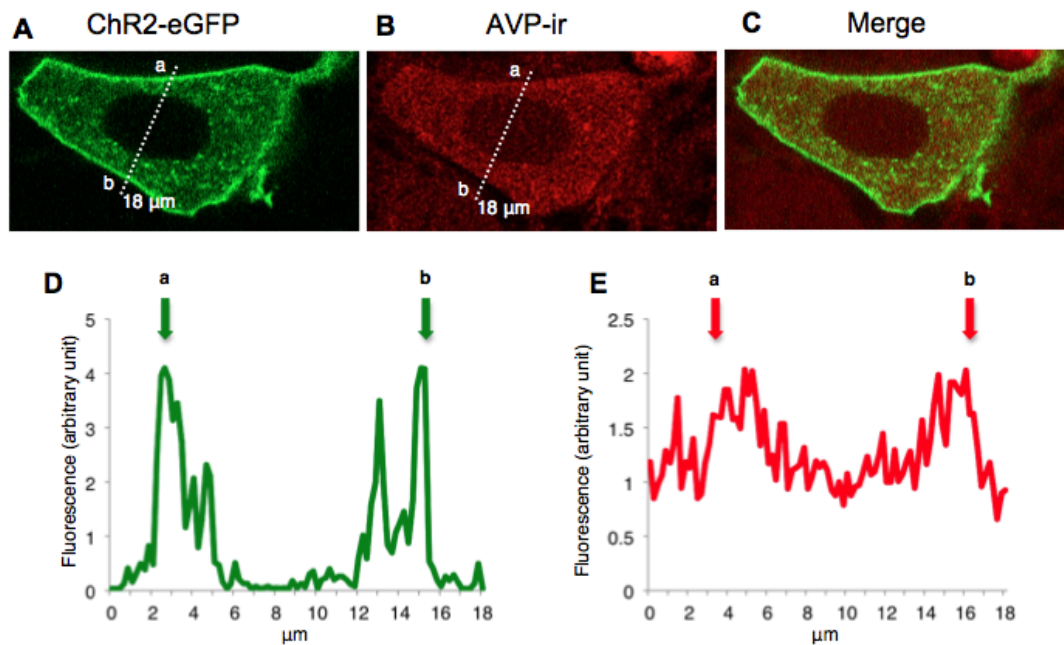
### 3.4 ホールセルパッチクランプ法を用いた青色光照射の検討

視索上核から単離したニューロンを、eGFP緑色蛍光を指標に同定し、ホールセルパッチクランプ法(電流固定モード)により活動電位を記録した。短時間および長時間の青色光照射のいずれにおいても膜電位の脱分極および活動電位が誘発された(Fig. 3)



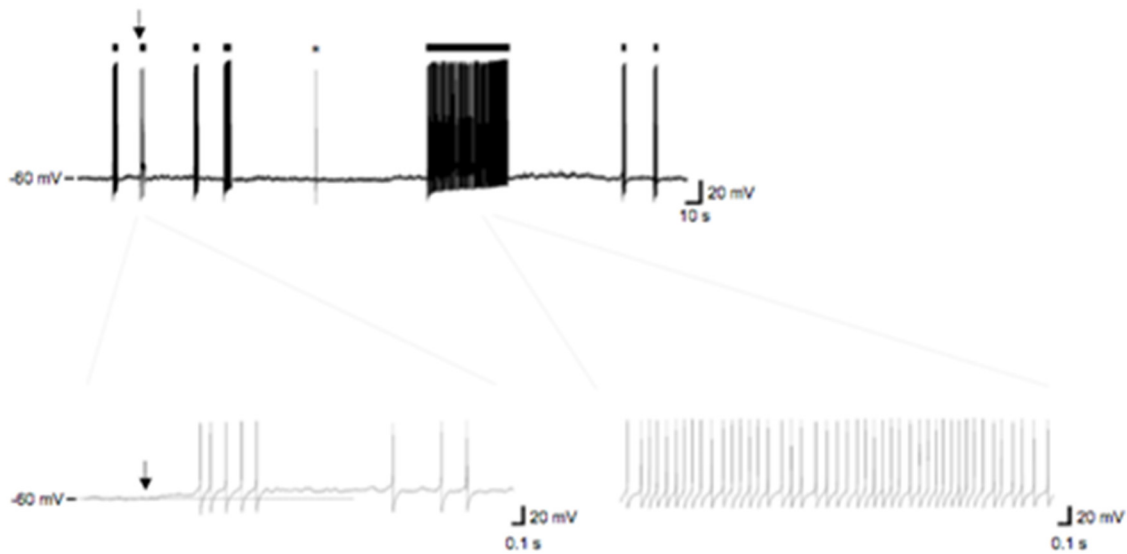
**Fig. 1.** Expression of AVP-ChR2-eGFP transgene in euhydrated and salt loaded transgenic rats

Euhydrated rats drink tap water (Control, A-C) and salt loaded rats drink 2% NaCl for 5 days (Salt loading, D-F). eGFP fluorescence in the supraoptic nucleus (SON), the paraventricular nucleus (PVN) and posterior pituitary (PP) was observed by fluorescent microscopy. OT, optic chiasm; 3V, third ventricle. Scale bar represents 100 μm in panels A, B, D and E, and 500 μm in panels C and F.



**Fig. 2.** Expression of ChR2-eGFP and AVP-like immunoreactivity (ir) in an SON neuron

The eGFP was located mainly in the membrane (A) and AVP-ir (red fluorescence) was distributed diffusely in the cytoplasm (B). Merged image were obtained from eGFP and AVP-ir (C). The fluorescence intensity profiles of ChR2-eGFP and AVP-ir were measured at the location of dashed line (a-b), respectively (D and E).



**Fig. 3.** Effects of blue light on SON neurons were examined by using whole-cell patch-clamp recordings in current clamp conditions. Blue light with short duration (shorter than 3 sec) evoked several action potentials with depolarization in current clamp condition. Black bars indicate the time when blue light was on. Asterisk indicates spontaneous action potential. Arrows indicate the start of blue light stimulation. Blue light with long duration (longer than 60 sec) evoked repetitive action potentials.

#### 4. 考察

本研究課題では、光遺伝学(オプトジェネティクス)技術を用いてバゾプレッシンニューロンの神経活動を光制御することを目的とした。具体的には、ChR2 をバゾプレッシンニューロンに特異的に発現させることでその神経活動を光制御することであった。

その結果、1)バゾプレッシン-ChR2-eGFPトランスジェニックラットを作出することができた、2)ChR2-eGFP 融合遺伝子が視索上核および室傍核に局在するバゾプレッシンニューロンに特異的に発現し、2%食塩水の飲水負荷によりChR2-eGFP 発現が視床下部 - 下垂体後葉系において著明に増加した、3) eGFP 緑色蛍光がバゾプレッシンニューロンの細胞膜に特異的に発現していた、および4)青色光照射により脱分極および活動電位を誘発することができた。

したがって、今回作出したバゾプレッシン ChR2-eGFPトランスジェニックラットではバゾプレッシンニューロンに、ChR2 が特異的に発現しており機能的にも働くことが確認された。今後、バゾプレッシンニューロンの神経活動を光操作することで新たなナトリウム・水分調節機構を見出す

ことが期待される。

#### 5. 今後の課題

バゾプレッシン-ChR2-eGFP トランスジェニックラットを作出することにより、バゾプレッシンニューロンの神経活動を光操作することが可能となった。

今回、単離ニューロンの神経活動を光操作することができたが、今後の課題としては、脳スライス標本ひいては *in vivo* での光操作を行う研究へと発展していきたい。また、光操作によるバゾプレッシン分泌調節についても検討したい。

#### 6. 文献

1. Ueta Y, Fujihara H, Serino R, Dayanithi G, Ozawa H, Matsuda K, Kawata M, Yamada J, Ueno S, Fukuda A, Murphy D, Transgenic expression of enhanced green fluorescent protein enables direct visualization for physiological studies of vasopressin neurons and isolated nerve terminals of the rat, *Endocrinology*. 146 (2005) 406-413.

2. Fujio T, Fujihara H, Shibata M, Yamada S, Onaka T, Tanaka K, Morita H, Dayanithi G, Kawata M, Murphy D, Ueta Y, Exaggerated response of arginine vasopressin-enhanced green fluorescent protein fusion gene to salt loading without disturbance of body fluid homeostasis in rats, *J. Neuroendocrinol.* 18 (2006) 776-785.
3. Boyden ES, Optogenetics and the future of neuroscience, *Nat. Neurosci.* 18 (2015) 1200-1201.
4. Deisseroth K, Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nat. Neurosci.* 18 (2015) 1213-1225.

## Optogenetic Approach to Regulate Vasopressin Neuron for Breakthrough of a Novel Sodium • Water Balance Mechanism

Yoichi Ueta, Hirofumi Hashimoto

University of Occupational and Environmental Health

### Summary

Arginine vasopressin (AVP) is synthesized in the magnocellular neurosecretory cells (MNCs) in the supraoptic (SON) and the paraventricular nuclei (PVN) of the hypothalamus. The MNCs project their axon terminals in the posterior pituitary and secrete AVP in the systemic circulation. Plasma AVP acts on the kidney as an anti-diuretic hormone. Recently, optogenetics provides a powerful tool to regulate neuronal activity by light-sensitive ion channels such as channelrhodopsin 2 (ChR2). In the present study, we have generated a transgenic rat that expresses an AVP-ChR2-enhanced green fluorescent protein (eGFP) fusion gene in the MNCs of the hypothalamus and the posterior pituitary. The eGFP fluorescence that indicates the expression of ChR2-eGFP was observed in the SON and in the magnocellular division of PVN that are known to contain AVP-secreting neurons. The eGFP fluorescent MNCs and fibers were scattered in the SON and the PVN and few in the posterior pituitary under normal condition. On the other hand, the eGFP fluorescent intensities in the SON, the PVN and the posterior pituitary were markedly increased after chronic salt loading (2% NaCl in drinking water for 5 days). ChR2-eGFP was localized mainly in the membrane of AVP-positive MNCs in the SON and the PVN in salt-loaded transgenic rats. Whole-cell patch-clamp recordings were performed from single MNCs isolated from the SON of the transgenic rats. In current clamp mode blue light evoked membrane depolarization and repetitive action potentials.

Our work provides for the first time an optogenetic approach to selectively activate AVP neurons in the rat. This novel transgenic rat gives us a new tool to study the physiological relationships between activated AVP neurons and sodium/water balance mechanisms.