

幸せの形成・破綻に関わる脳内カルシウム活動をとらえる

稲生 大輔

大阪大学大学院医学系研究科統合薬理学

概要 オキシトシンは、別名”幸せホルモン”，“愛情ホルモン”と呼ばれる神経ペプチドであり，社会性，感情，食欲など多様な脳機能の制御に関わっている。オキシトシンは，Gq 共役型の GPCR であるオキシトシン受容体に作用し細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる。よって，オキシトシンにより惹起される Ca^{2+} 活動が脳内で幸せな感情を創り出す鍵となっておりと考えられる。しかしながら， Ca^{2+} 活動はオキシトシン以外の様々な刺激によっても引き起こされうる為，オキシトシン特異的な Ca^{2+} 活動を捉えることが，脳内での幸せの情報処理機構を理解する上で重要である。本命題を達成するにはまず，生きた脳内においてオキシトシンをリアルタイム計測する技術の開発が重要となってくるため，本研究では上記技術の新規開発に主に取り組んだ。

我々は今回，超高感度蛍光オキシトシンセンサー $MTRIA_{OT}$ の開発に以下のように取り組んだ。メダカ由来のオキシトシン受容体の細胞内第 3 ループに GFP を挿入したキメラタンパク質を作成し，センサーの感度調節に重要な 3 部位に対し変異を順に導入し，蛍光センサーの分子進化を培養細胞の系を用いて行った。最終的に得られた変異体， $MTRIA_{OT}$ はオキシトシン存在下で最大 735%ものダイナミックレンジを示した。

つづいて $MTRIA_{OT}$ が生きた動物の脳内において機能するか否かの検証を行った。アデノ随伴ウイルスを用いて $MTRIA_{OT}$ をマウス脳に発現させ，ファイバーフォトメトリー法により生きたマウスの脳内からの蛍光測定を行った。 $MTRIA_{OT}$ を用いた測定により，人為的に惹起された脳内オキシトシンシグナル（体外から導入したオキシトシンによる脳内オキシトシン濃度変化，光遺伝学刺激により惹起されたオキシトシン上昇）の他，内因性刺激による脳内オキシトシン濃度変化（ストレス刺激や社会的相互作用により惹起されるオキシトシン反応，日内オキシトシン変動など）を高い時間分解能を持って測定することを達成した。今回判明した重要なポイントは，刺激の種類や動物の行動の種類によりオキシトシン信号の時間的動態が大きく異なるという点である。さらに麻酔薬投与，絶食，老化などによってもオキシトシン動態が変動しうるという点は興味深い。今後， Ca^{2+} イメージングと組み合わせることで，オキシトシン依存的な Ca^{2+} 活動を捉えることが実現できると強く期待できる。

1. 研究目的

“嬉しい，楽しい，大好き”いわゆる”幸せな感覚”は，動物が社会集団の中で生きる上で重要な感覚である。たとえば，美味しい食事を摂ることは，多くの人間にとって至福の時間である。では，脳の中で”幸せ”という情報はどのように作りだされているのであろうか？ 本課題に切り込むには，脳内の”幸福感を測る”ことが必要不可欠となる。では脳内の幸福感の実体として何を捉えればよいか？

近年，別名”幸せホルモン”と呼ばれる神経ペプチド オキシトシン が幸福感の鍵となる可能性が明らかになりつつある。特に，オキシトシン受容体は脳内の広範囲にわたって発現している Gq 共役型 G タンパク質共役型受容体である。よって，脳内のオキシトシン動態と，オキシトシン受容体刺激により惹起される神経細胞内 Ca^{2+} シグナル動態が，脳内の”幸福感”を創り出す鍵となっておりと考えられる。われわれは，このオキシトシン受容体刺激により惹起

される神経細胞内 Ca^{2+} シグナル動態を捉えることを大きな目標としてかかっている。しかしながら、神経細胞内の Ca^{2+} シグナルはオキシトシン以外の刺激でも惹起されうるため、オキシトシン特異的な Ca^{2+} シグナルを計測することが重要となってくる。そこでまず、本研究では脳内オキシトシン動態を高感度に捉えることを目指すことにした。既存手法では生きた脳内において、脳内オキシトシン濃度変化を測定することは困難である。申請者はこれまでに、マイクロダイアリシス法と呼ばれる方法により生きた動物の細胞外情報伝達分子の測定に取り組んできた¹⁾が、本手法はデータ取得が非常に遅いため(1データ数10分程度)、行動下の動物において、特定の刺激を受けたときの脳内レスポンスを追跡することは困難である。また、本手法を用いて神経細胞内の Ca^{2+} シグナルを同時に計測することも非常に困難である。そこで本研究では、動物の脳内におけるオキシトシン濃度変化をリアルタイムで測定できる計測法の開発に取り組むことにした。近年、蛍光センサーを用いたバイオイメージングにより生きた動物の脳内の情報伝達が次々と明らかになってきている^{2), 3), 4)}。そのような先駆的研究からインスパイアを受け、申請者は、脳内オキシトシンを高感度に感知できる蛍光センサーを新規開発し、生きた動物の脳内からオキシトシン信号を計測することに挑戦することにした。特に細胞内 Ca^{2+} シグナルは蛍光イメージングにより高感度に測定する系が確立しているため^{5), 6)}、オキシトシンとの同時測定が可能なイメージング実験系の基盤を築くことを目指す。

2. 研究方法

2.1 指向性分子進化による超高感度蛍光オキシトシンセンサーの開発

本研究では、遺伝子コード型のタンパク質型蛍光センサーの開発に取り組んだ。まず、センサーの骨格となるタンパク質の選定を行った。6種類の脊椎動物由来のオキシトシン受容体をクローニングし、培養細胞における細胞膜への局在を評価した。結果に示すようにここではメダカ由来のオキシトシン受容体を選定した。続いて、メダカオキシトシン受容体の細胞内ループに円順列変異型緑色蛍光タンパク質 (circularly permutated green fluorescent protein: cpGFP) を挿入した。cpGFP 挿入部位の最適部位を見出し、プロトタイプ型オキシトシンセンサーを開発した。続いて、プロトタイプ型オキシトシンセンサーに変異を加

え、センサー分子に”進化”を施した。プロトタイプ型オキシトシンセンサーのリンカー部位、膜貫通ヘリックス、cpGFP 内部配列にそれぞれランダム変異を加え、作製した変異体センサーのスクリーニングを行った。スクリーニングは、培養細胞 (HEK293T 細胞) に変異体センサーを発現させ、オキシトシンに対する応答性を顕微鏡下で行うことで達成した。

2.2 蛍光オキシトシンセンサーのマウス脳への応用と計測

上記で開発した蛍光センサーをマウス脳に導入し、自由行動下の成体マウス(2ヵ月齢)における応答を計測した。センサーの遺伝子導入はアデノ随伴ウイルスを用いて行った。ウイルス注入部位に光ファイバーカニューレを留置し、注入部位における蛍光信号測定を行った(ファイバーフォトメトリー法)。自由給水・給餌条件下のケージ内においてマウスを自由行動させたときの脳内オキシトシン応答の計測を行ったほか、給餌器を除去して絶食させたときの脳内オキシトシン応答の計測も行った。

また、ホルモン動態は加齢により変化することがよく知られている。そこで様々な週令のマウス(2ヵ月, 6ヵ月, 1年, 2.5年齢)からの脳内オキシトシン応答の測定を行った。

3. 研究結果

3.1 超高感度蛍光オキシトシンセンサー-MTRIA_{OT}の開発(図1)

細胞外オキシトシンの結合により、明るさが大きく変化する蛍光センサーの開発を行った。センサーのデザインとしては、オキシトシン受容体の細胞内ループに cpGFP が挿入されたキメラタンパク質を採用することにした。高感度なオキシトシン感知を達成するには、センサータンパク質の細胞膜への強い局在が重要となってくる。まず6種の脊椎動物(ヒト, マウス, ニワトリ, ヘビ, カエル, メダカ)のオキシトシン受容体の細胞膜への局在を解析した。広く生物実験に用いられる培養細胞である HEK293T 細胞に発現させたところ、メダカのオキシトシン受容体ももっとも強い細胞膜局在を示すことが明らかとなった。そこでメダカのオキシトシン受容体をセンサーの骨格として、蛍光センサーの開発を進めることにした。まず最適な cpGFP 挿入部位の決定を行った。メダカのオキシトシン受容体の K240-I268 の間への cpGFP を挿入時に細胞膜局在を保

持しつオキシトシン応答を示すことがわかった。本タンパク質をプロトタイプセンサーとし、ランダム変異を加えることでセンサー感度の進化を試みた。HEK293T 細胞を用いた顕微鏡下でのスクリーニングにより、本スクリーニング

を通じ、オキシトシンに対し、最大約 8 倍もの蛍光強度変化を示す超高感度蛍光オキシトシンセンサー-MTRIA_{OT}の開発に成功した。

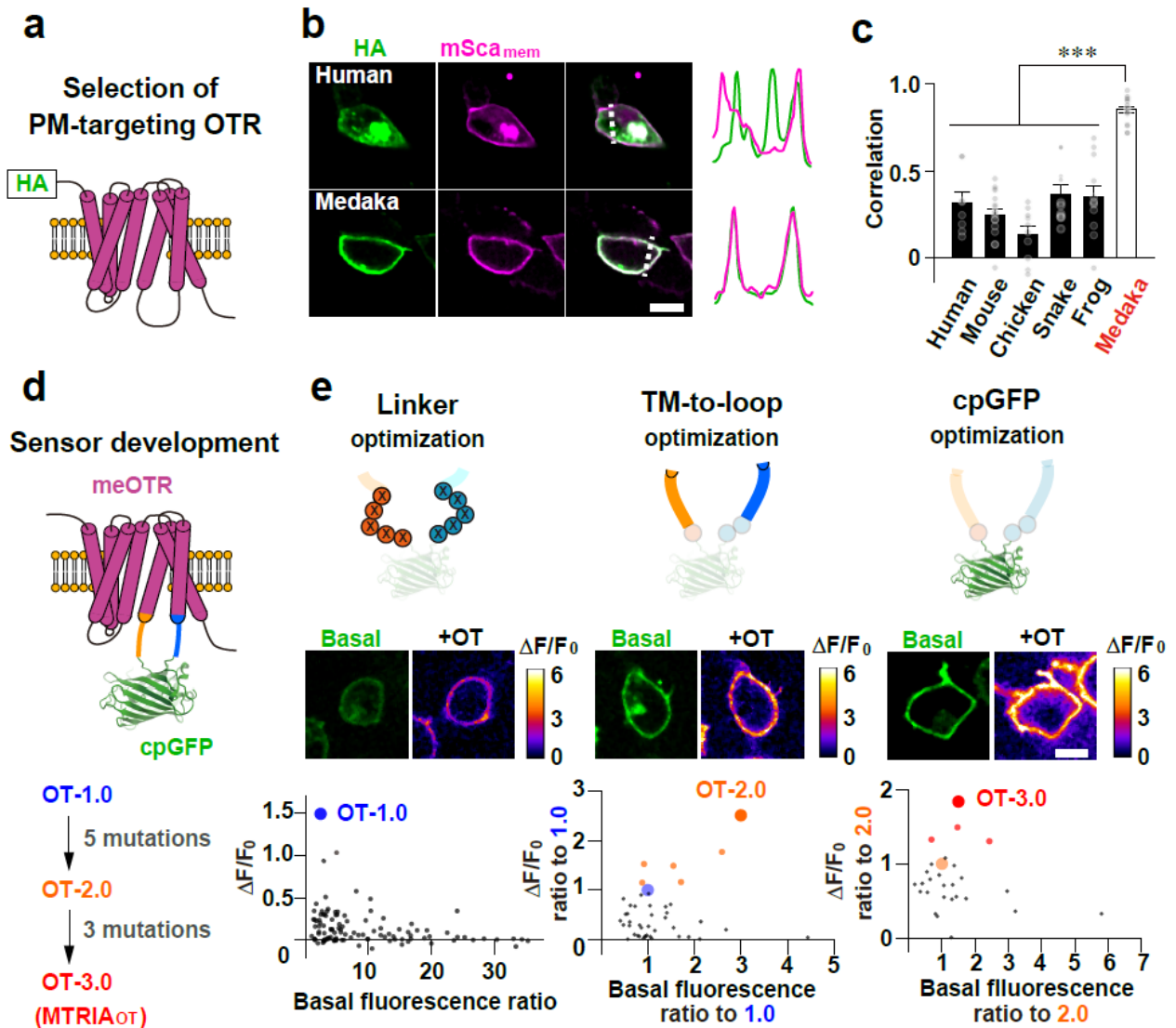


図1: 超高感度蛍光オキシトシンセンサー-MTRIA_{OT}の開発

a-c, 細胞膜に強く局在するオキシトシン受容体のスクリーニング

メダカ由来のオキシトシン受容体が最も強い細胞膜への局在を示した。

d-e, 3段階の変異導入によるセンサースクリーニング

リンカー部位、膜貫通ヘリックス、cpGFP 内部配列にそれぞれランダム変異を加え、作製した変異体センサーのスクリーニングを行った。最終産物を MTRIA_{OT}と名付けた。

3. 2 MTRIA_{OT} を用いた食事と関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定 (図 2)

アデノ随伴ウイルスを用いてマウス脳内に MTRIA_{OT} を導入し、ファイバーフォトメトリー法により行動化のマウスにおける脳内オキシトシン応答を測定した。成体マウスを給餌・給水条件下でケージ内を自由行動させたところ、オキシトシンの一過性情報が約 2 時間周期で振動様に発生することが判明した。われわれはこの現象を”オキシトシン振動(oxytocin oscillation)”と名付けた。興味深いことにオキシトシン振動は、マウスが食事を行うタイミングと同期していることが明らかとなった。では、オキシトシン振動の発生に食事は必要なのであろうか？本命題を検証するために、絶食時にオキシトシン振動への影響が観察されるか

否かを解析した。驚くべきことに、絶食後約半日において、脳内オキシトシン応答は消失せず、振動の振幅が大きく変動した。この乱れたオキシトシン応答をわれわれは”オキシトシン乱流(oxytocin turbulence)”と名付けた。オキシトシン乱流は、再び給餌を行うことで消失し、再び正常なオキシトシン振動が発生することから、オキシトシン乱流は絶食時特異的な脳内信号であることが確認された。興味深いことにオキシトシン乱流発生中のマウスの行動は、心が乱されたようにケージ内を暴れまわることも明らかとなった。すなわち、脳内のオキシトシン振動の乱れは、空腹による心の乱れをコードする信号となっている可能性が推測される。

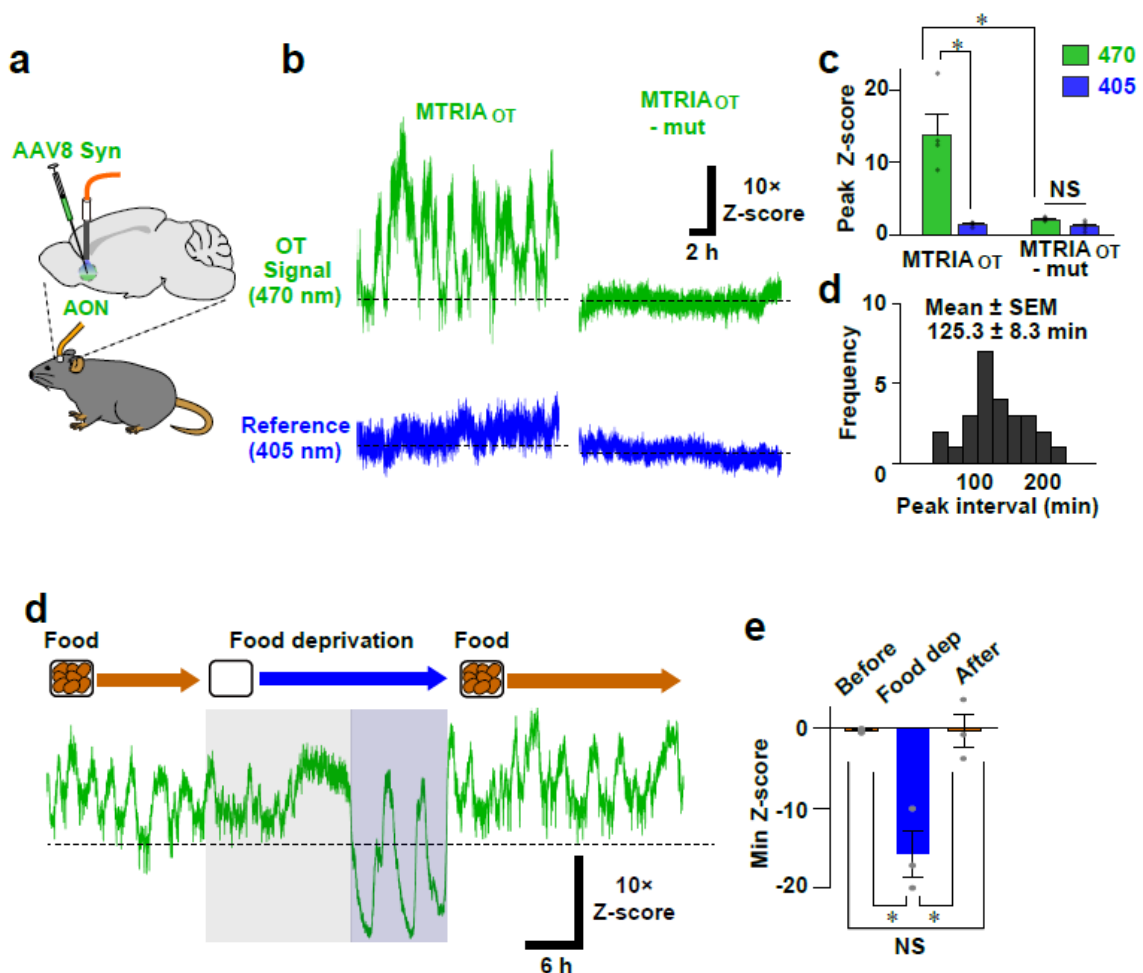


図 2: 食事と関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定

a-c, MTRIA_{OT}を用いた *in vivo* 脳内オキシトシン動態測定

脳内でオキシトシンが約 2 時間周期で振動していること (オキシトシン振動))を発見した。

d-e, 絶食による脳内オキシトシン動態の変動

絶食中にオキシトシン振動の波形が乱れること (オキシトシン乱流))を発見した。

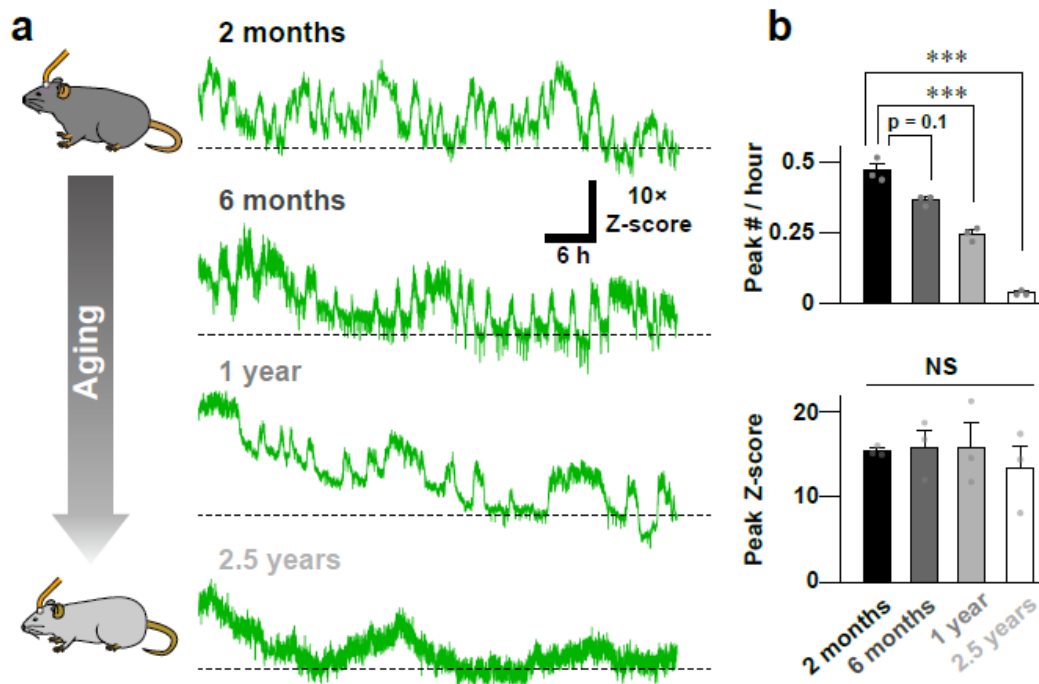


図 3: 老化に関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定

a-b, 様々な週令・月齢のマウス脳からのオキシトシン動態測定を行うことで、老化により脳内のオキシトシン振動の周期が減少していくことを発見した。

3. 3 MTRIA_{OT} を用いた老化に関連したマウス脳内におけるオキシトシン応答測定 (図 3)

ホルモンの動態は加齢により変動する可能性が示唆されているが、脳内のオキシトシン動態がどのように変化するかについては、まだ知見が限られている。そこで、様々な週令のマウス(2 ヶ月, 6 ヶ月, 1 年, 2.5 年)からの脳内オキシトシン応答の測定を fiber photometry により行った。すると 2 ヶ月齢において、約 2 時間周期であったオキシトシン振動が、加齢とともに頻度が減少していき、2.5 年齢では約 1 日周期まで減少することが明らかとなった。すなわち、オキシトシン振動の減少は脳の加齢と何らかの形でリンクしている可能性が推測される。

4. 考察

今回われわれは、生きた動物の脳内からオキシトシン動態をリアルタイムで計測することを実現する世界初の手法開発に成功した。本手法を用いた計測により、脳内のオキシトシン信号は FM ラジオのように振動していることが明らかとなった。また詳細な解析から、脳内の振動様のオキシトシン信号は食と深くかかわる可能性が示唆された。

すなわち、正常な給餌状態では脳内では、オキシトシンは一定(2時間周期)の規則的な信号を刻んでいるのに対し、飢餓状態では信号の波形が大きく乱れるという新規現象が見えてきた。また、われわれは加齢によりオキシトシン振動の周期が減少していくことも明らかにした。これは脳の老化となんらかの関連が推測される。詳細の解明はこれからということである。なお、これらの結果をまとめた論文は、学会等で高評を得ているほか、最近 Nature Methods 誌に採択される⁷⁾など、生命科学分野に大きな反響を与えている。

5. 今後の課題

本研究により、幸せの素 オキシトシンの脳内動態を生きた動物から捉えることが可能となった。前述のように脳内の情報処理の根幹は神経細胞における活動、すなわち神経細胞内 Ca²⁺シグナルである。オキシトシンの受容体は Gq 共役型 GPCR であり、活性化により神経細胞内に Ca²⁺シグナルを惹起する。すなわち、今回発見した複雑な脳内オキシトシン動態は神経細胞の Ca²⁺シグナル動態を劇的に調節している可能性が強く推測される。今回緑

色蛍光を発するオキシトシンセンサーを開発したが、jRGECO1⁵⁾や XCaMP-R⁶⁾といった赤色蛍光を発するCa²⁺蛍光センサーを同時に発現させて計測を行えば、今後オキシトシン動態と神経細胞のCa²⁺活動を同時にとらえることが原理的には可能である。このような測定を進めていくことで、脳内の幸せをコードする神経細胞のCa²⁺活動の実態に迫っていきたい。

6. 文献

- 1) Daisuke Ino, Hiroshi Sagara, Junji Suzuki, Kazunori Kanemaru, Yohei Okubo, and Masamitsu Iino, Neuronal Regulation of Schwann Cell Mitochondrial Ca²⁺ Signaling during Myelination, *Cell Rep*, 12, 1951-9, 2015
- 2) Tsai-Wen Chen, Trevor J Wardill, Yi Sun, Stefan R Pulver, Sabine L Renninger, Amy Baohan, Eric R Schreiter, Rex A Kerr, Michael B Orger, Vivek Jayaraman, Loren L Looger, Karel Svoboda, and Douglas S Kim, Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity, *Nature*, 499, 295-300, 2013
- 3) Tommaso Patriarchi, Jounhong Ryan Cho, Katharina Merten, Mark W Howe, Aaron Marley, Wei-Hong Xiong, Robert W Folk, Gerard Joey Broussard, Ruqiang Liang, Min Jee Jang, Haining Zhong, Daniel Dombeck, Mark von Zastrow, Axel Nimmerjahn, Viviana Gradinaru, John T Williams, Lin Tian, Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors, *Science*, 360, eaat4422, 2018
- 4) Fangmiao Sun, Jianzhi Zeng, Miao Jing, Jingheng Zhou, Jiesi Feng, Scott F Owen, Yichen Luo, Funing Li, Huan Wang, Takashi Yamaguchi, Zihao Yong, Yijing Gao, Wanling Peng, Lizhao Wang, Siyu Zhang, Jiulin Du, Dayu Lin, Min Xu, Anatol C Kreitzer, Guohong Cui, Yulong Li, A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice, *Cell*, 174, 481-496, 2018
- 5) Hod Dana, Boaz Mohar, Yi Sun, Sujatha Narayan, Andrew Gordus, Jeremy P Hasseman, Getahun Tsegaye, Graham T Holt, Amy Hu, Deepika Walpita, Ronak Patel, John J Macklin, Cornelia I Bargmann, Misha B Ahrens, Eric R Schreiter, Vivek Jayaraman, Loren L Looger, Karel Svoboda, and Douglas S Kim, Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity, *eLife*, 5, e12727, 2016
- 6) Masatoshi Inoue, Atsuya Takeuchi, Satoshi Manita, Shin-Ichiro Horigane, Masayuki Sakamoto, Ryosuke Kawakami, Kazushi Yamaguchi, Kouhei Otomo, Hiroyuki Yokoyama, Ryang Kim, Tatsushi Yokoyama, Sayaka Takemoto-Kimura, Manabu Abe, Michiko Okamura, Yayoi Kondo, Sean Quirin, Charu Ramakrishnan, Takeshi Imamura, Kenji Sakimura, Tomomi Nemoto, Masanobu Kano, Hajime Fujii, Karl Deisseroth, Kazuo Kitamura, Haruhiko Bito, Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics, *Cell*, 177, 1346-1360, 2019
- 7) Daisuke Ino, Yudai Tanaka, Hiroshi Hibino, and Masaaki Nishiyama, A fluorescent sensor for the real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain, *Nature Methods*, in press
- 8) Livia Tomova, Kimberly L Wang, Todd Thompson, Gillian A Matthews, Atsushi Takahashi, Kay M Tye, Rebecca Saxe, Acute social isolation evokes midbrain craving responses similar to hunger, *Nature Neurosci*, 12, 1597-1605, 2020

Brain Ca²⁺ Activity Involved in Gain/Loss of Happiness

Daisuke Ino

Osaka University Graduate School of Medicine

Summary

Oxytocin (OT) is a neuropeptide that is also known as the “happy hormone” or “love hormone.” It regulates diverse brain function, from social cognition to emotion to appetite, and is a potential therapeutic agent for many mental illnesses. OT acts on its receptor named OT receptor, a Gq-coupled G protein coupled receptor (GPCR) that triggers intracellular Ca²⁺ signals upon stimulation. Therefore, OT-induced Ca²⁺ signaling is a key to understand how happy feelings are created in the brain. Because Ca²⁺ signaling is versatile, in other words that can be induced by a variety of stimulation molecules in our body; therefore, recording of OT specific-Ca²⁺ signals is necessary to advance our knowledge on Ca²⁺ signaling involved in happy feelings. To achieve that, development of a new technology to measure brain OT level in living animal is critical. Thus, we addressed to engineer a new OT sensor for *in vivo* real-time recording at first.

In this study, we developed an ultrasensitive fluorescent OT sensor, designated as MTRIA_{OT}, which was a chimera protein composed of medaka OT receptor, and an engineered green fluorescent protein (GFP)-based module. We obtained MTRIA_{OT} through the three-step screening of mutant sensors in cultured cells; where amino acid residues in three important regions of the chimera protein were sequentially optimized. MTRIA_{OT} shows robust fluorescence responses upon agonist binding, likely because of optimal coupling between the conformational change of an intracellular loop of the OT receptor and the environmental change of the GFP chromophore.

Having validated the basic properties of MTRIA_{OT} in cultured cell, we performed *in vivo* recordings brain OT dynamics in living mice by using fiber photometry-mediated fluorescence measurements. We demonstrated that MTRIA_{OT}-mediated *in vivo* fluorescence recording can report artificially-evoked OT responses as well as endogenously-controlled OT signals with a fast temporal resolution. Importantly, our analysis revealed that the temporal profiles of OT signals are highly variable depending on the behavioral context of the animal, and that the dynamics can be altered by perturbations, such as administration of anesthetic drugs, food deprivation, and aging. Overall, our new tool, MTRIA_{OT}, opened the door to detect OT dynamics in the living brain in real-time.