

オプトジェネティクスと精神医学

田中 謙二, 高田 則雄, 三村 将

2002年に生物物理学者によって古細菌に存在する光感受性タンパク質、チャンネルロドプシンが発見された。そのユニークな特徴に目をつけた精神科医がチャンネルロドプシンの遺伝子導入と光照射を組み合わせて神経細胞の発火を操作する手法を開発した。発見から約10年経過した現在、オプトジェネティクスという造語が定着し、オプトジェネティクスは神経科学研究のパラダイムシフトを起こした。本稿ではオプトジェネティクス入門としてこの技法の原理について詳しく述べる。最後に脳機能画像とオプトジェネティクスを組み合わせた筆者らの取り組みを紹介する。

<索引用語：オプトジェネティクス，相関関係，因果関係，光，電気刺激>

はじめに

オプトジェネティクス (optogenetics) はスタンフォード大学の精神科医 Karl Deisseroth らによって作られた造語である⁴⁾。Opto は光を表す接頭語、genetics は遺伝学であるので optogenetics を日本語に訳すと光遺伝学となる。しかしこの日本語訳からその意味をうかがい知るのは困難であろう。

オプトジェネティクスは光感受性タンパク質を使用し、それに光を照射することによって細胞の機能を操作する手法そのものである。この手法が神経科学研究のパラダイムシフトを起こした。今では毎週のようにハイインパクトな雑誌に optogenetics を用いた研究結果が掲載されている。このような情勢から精神医学研究への応用、展開が期待されている。まずは光感受性タンパク質について説明したい。

I. 光感受性タンパク質

地球に住む生物は、光子を受容し、それを化学シグナルに変換するしかけを上手に利用している。植物の光合成はそのしかけの1つであるし、

私達の網膜で行われている光の受容もそのしかけの1つである。

網膜の桿体視細胞がもつ光感受性タンパク質がロドプシン (rhodopsin) である。私達ほ乳類はロドプシンをはじめ、5種類のオプシン (opsin) をもつ。一方で、細菌には数百種類のオプシンが報告されており、総称してバクテリア型ロドプシンと呼ばれる。ロドプシンは光受容後の分子構造の変化と機能変化の連関解明に興味をもつ研究者、すなわち生物物理学の研究者によって1970年ごろからよく研究されてきた。2002年にフンボルト大学の Peter Hegemann (長年ロドプシン業界で生きてきた生物物理学のトップランナーである) が光を受容し Na を通す新しいタイプの分子を発見し、それをチャンネルロドプシン (channelrhodopsin: ChR) と名付けた⁷⁾。ここまでは単にロドプシン業界の話である。

これを神経科学に応用したのがスタンフォード大学の Karl Deisseroth である¹⁾。彼はスタンフォード大学で MD, PhD を取得した後、精神科でレジデントを修了した精神科医でもある。彼は培養神経細胞に ChR を発現させておき、光照射を

加えると神経細胞から活動電位が得られることを報告した。光で神経細胞の興奮を操作した初めての例である。神経細胞の興奮、発火を恣意的に行わせるには、電気刺激、高濃度カリウム溶液の添加、グルタミン酸の添加などの手法があるので、それ自体は新しくない。この手法のすばらしいところは、ChR を発現している細胞だけに発火を導くことができる点であり、ChR を発現していない細胞にはまったく影響を与えないという従来の方法にないものであった。

ChR の神経科学への応用に成功したため、これまで神経科学への応用が考えられていなかった他のオプシントタンパク、たとえば光を受容してクロライドイオンを通すタンパク〔ハロロドプシン (halorhodopsin)¹¹⁾〕や光を受容して水素イオンを通すタンパク〔アーキロドプシン (archaerhodopsin)²⁾〕も「使える」分子であることがわかってきた。

II. オプトジェネティクスは神経細胞の発火を操作する技術

ChR を用いた操作の限界を知るために、ChR による発火の原理を理解していただきたい。細胞は Na K ATPase によって細胞内の Na が外にくみ出され、細胞外から K を内に取り込んでいる。これにより細胞内 Na 濃度が低く、細胞外 K 濃度が高くなっている。そして、静止膜電位はマイナスに保持されている。神経細胞には電位依存性の Na チャネルが存在するので、静止膜電位が電位依存性 Na チャネルの閾値を超えるとチャネルが開き、細胞外から細胞内へ Na イオンが流れ込む。これが活動電位そのものである。閾値を超える刺激が神経細胞に入れば活動電位が生じるし、刺激が閾値を超えなければ発火しない。

ChR が発現した神経細胞に光を照射することを考えてみよう。ChR の発現そのものは静止膜電位に影響を与えない。普段は ChR が閉じているからである。この細胞に光を照射すると ChR が開口し、Na イオンが流れ込み、瞬時に発火閾値を超え、活動電位が発生する。活動電位を発生させる

のは ChR ではなく、神経細胞がもつ電位依存性 Na チャネルである。

それでは電位依存性 Na チャネルをもたない細胞に ChR を発現させ、光を照射するとどうなるのであろうか？ 光照射後、ChR を通じて Na イオンが流入し電流が流れる。膜電位が数ミリ V から数十ミリ V 脱分極側へ変化するが光の照射をやめるとまた元の膜電位に戻る。すなわち活動電位は発生しない。グリア細胞や血管内皮などには電位依存性 Na チャネルが存在しないので、これらに ChR を発現させて光を照射しても発火することは決してない。ChR を用いたオプトジェネティクスは、電位依存性 Na チャネルをもつ神経細胞に適応される手法であるとひとまず考えていただきたい。

III. オプトジェネティクスがもたらした神経科学研究のパラダイムシフト

オプトジェネティクスは神経科学研究を相関研究から因果研究へパラダイムシフトさせることに大きく貢献している。具体的にどういうことだろうか。

ヒトを用いた神経科学・精神医学の二大研究はゲノムとイメージングである。あるゲノムの SNP やコピー数が発症や治療反応性に関連があるという報告がある。これは遺伝子と表現型を結ぶ相関研究である。遺伝子変化が原因なのか、結果なのかを知る研究、すなわち因果研究に展開させるには、その遺伝子変化を人為的に模倣して、表現型がどうなるか調べる以外にない。一般にはマウスなどのモデル動物を用いて、たとえばある遺伝子のノックアウトや過剰発現を行い、それがどのような結果をもたらすか調べるわけである。遺伝子の操作はモデル動物を使って初めて可能になるが、これをヒトで行うことはできない。言い換えると、実験動物を使えば遺伝子と表現型の因果を問えるが、ヒトをサンプルとしてその因果を知ることにはできない。

それではイメージング研究はどうだろうか。functional MRI (fMRI) なり PET などの脳機能イ

メーキングは私たち人間の行動と脳局所の活動にどのような相関関係があるか情報を与えてくれる。サルやネズミなどのモデル動物を使えば、脳領域からさらに踏み込んで、領域を構成する特定の神経細胞の活動がどのような相関関係にあるのか調べることができる。問題はその後である。どうやって因果研究に展開すればよいのだろうか。相関研究で神経活動の変化を記載したわけだから、因果研究ではその神経活動を自在に操ることが必須となる。これまではモデル動物を使って、電気刺激だったり、ムシモール投与（GABA 受容体アゴニスト）による領域全体の抑制だったり、もっと激しくは領域をまるごと切り取る lesion だったり知恵をこらした方法で研究者が因果研究を目指してきた。残念ながらどの手法も別の解釈が可能になる結果しか生まなかった。

たとえば電気刺激を例にとってみよう。電気刺激を行えば神経細胞が発火するところまではよい。しかし、局所といえども興奮性神経と抑制性神経が密に絡み合い、電気刺激によって両方が発火する。興奮の興奮と抑制の興奮の足し算の結果が電気刺激の結果となる。興奮性神経の支配が強い領域では、電気刺激で興奮し、抑制性神経の支配が強い領域では電気刺激で抑制される。抑制性神経支配の強い領域を、電気を使って興奮させようとしても不可能なことがわかる。これでは神経活動を自在に操作して、因果に踏み込むことはできない。

そこに登場してきたのがオプトジェネティクスである。ChR を特定の細胞に発現させておいて、領域全体に光をあてる。光に応答する細胞はChRを発現する細胞だけで、その他の細胞は光には応答しない。特定の神経細胞だけを操作できる点が優れている。さらに優れている点は、光のオン、オフに素早く反応することである。素早い（ミリ秒）応答ができることから、1 Hz の発火も、40 Hz の発火も光で作りに出すことができているのである。

因果関係に迫る例としては以下のようなものがある。ラットに音刺激を与えて、数秒後に餌を与

えるという実験課題を行う。餌場に頭を突っ込んだ状態を維持して待っていれば餌を与えるが、我慢できなくなって餌場から頭を外すと餌を与えないという条件をさらに加える。辛抱強さをみるテストといえる。このときの背側縫線核のセロトニン神経の発火頻度を調べると、音刺激の直後からセロトニン神経の発火頻度が上がり、餌場に頭を突っ込んでいる間それが維持される。我慢できなくなったマウスは途中からセロトニン神経の発火頻度が元に戻ってしまう。この実験から、辛抱強さとセロトニン神経発火の持続に相関があるということがわかる⁵⁾。セロトニン神経発火が持続するせいで辛抱強いのかどうかは、セロトニン神経の発火頻度を操作して答えが出る。沖縄科学技術大学院大学の宮崎らは薬剤をつかってセロトニン神経が発火ないように操作したところ、辛抱強さがなくなってしまうことを証明した⁶⁾。一方で、セロトニン神経の発火を秒単位で増やしたり、タイミングを見計らって発火させたりする方法が薬剤や電気刺激では不可能であったため、セロトニン神経の発火頻度を上げると辛抱強くなるかどうかはわからないままであった。宮崎らはセロトニン神経細胞特異的にChRが発現するマウスを用い、光でセロトニン神経の発火頻度をタイミングよく増やしたところ、確かにマウスが辛抱強くなることを証明した（論文投稿中）。このように、オプトジェネティクスの登場によって、相関研究で明らかになった神経活動変化と行動変化にどのような関係性があるか、その因果関係を調べることができるようになった。これがパラダイムシフトである。

IV. オプトジェネティクスを脳機能画像に応用する

私達は、オプトジェネティクスを用いたマウス海馬錐体細胞の興奮によって、興奮の開始から数十秒経過してからマウスが激しく探索行動を行うことを報告した⁸⁾。海馬を興奮させることで脳のどの部位が興奮するのか、なぜ数十秒の遅延をもって探索行動が始まるのかが未解決であり、こ

れを知るために全脳の活動を評価したいと考えた。マウスの fMRI が実験中央動物研究所と慶應義塾大学医学部生理学教室とで運用されていたので、これにオプトジェネティクスを組み合わせたことにした。狙いどおり、光によって駆動される海馬の興奮を fMRI でとらえることができた。それと同時に、脳の様々な部位で fMRI 信号の変化が観察された。海馬と機能的な連絡のある部位を描出できたと喜んだが、同時に疑問が残った。fMRI 信号の変化が、どこまで神経発火と関連するのかわかっていないからである。MRI で得られる物理信号は真実であるが、これをどうやって神経発火情報に置換すればよいか知りたくなった。

オプトジェネティクスを用いれば、神経細胞だけではなくグリア細胞や血管をも選択的に操作できる⁸⁾。光電流を与えるこの操作は非生理的ではあるが、特定細胞の「興奮」が fMRI 信号のどのような変化をもたらすのか調べることができる。神経細胞の興奮によって、グリア細胞も血管も何らかの応答をし、その集合が fMRI 信号になるので、fMRI 信号における各細胞の寄与率を求めることができるのではないかと考えている。実際に大脳皮質アストロサイトだけを「興奮」させて fMRI 信号を解析してみたところ、思いもよらない結果がえられた。fMRI 信号の本質はまだ未知のことが多く、これをオプトジェネティクスを利用して明らかにすることで、ヒト脳機能画像で得られる情報とモデル動物を用いた神経生物学的情報の橋渡しができるのではないかと考えている。

おわりに

オプトジェネティクスは、遺伝子導入を必須とする技術であること、光ファイバーを刺入する必要があることの2点の理由で、ヒトに応用されることは考えにくい。言い換えるとモデル動物に限定して用いられる技術である。特定の神経活動を操作することを初めて可能にした技術であり、これによって行動と神経活動の因果性が明らかになる。モデル動物を用いた生物学的精神医学研究を

さらに発展させる技術基盤であることに疑いがない。

参考文献として Deisseroth による総説^{3,9,10)}を紹介しておく。

なお、本論文に関して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., et al. : Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 8 (9) ; 1263-1268, 2005
- 2) Chow, B. Y., Han, X., Dobry, A. S., et al. : High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature*, 463 (7277) ; 98-102, 2010
- 3) Fenno, L., Yizhar, O., Deisseroth, K. : The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci*, 34 ; 389-412, 2011
- 4) Miller, G. : Optogenetics. Shining new light on neural circuits. *Science*, 314 (5806) ; 1674-1676, 2006
- 5) Miyazaki, K., Miyazaki, K. W., Doya, K. : Activation of dorsal raphe serotonin neurons underlies waiting for delayed rewards. *J Neurosci*, 31 (2) ; 469-479, 2011
- 6) Miyazaki, K. W., Miyazaki, K., Doya, K. : Activation of dorsal raphe serotonin neurons is necessary for waiting for delayed rewards. *J Neurosci*, 32 (31) ; 10451-10457, 2012
- 7) Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., et al. : Channelrhodopsin-1 : a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296 (5577) ; 2395-2398, 2002
- 8) Tanaka, K. F., Matsui, K., Sasaki, T., et al. : Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep*, 2 (2) ; 397-406, 2012.
- 9) Tye, K. M., Deisseroth, K. : Optogenetic investigation of neural circuits underlying brain disease in animal models. *Nat Rev Neurosci*, 13 ; 251-266, 2012
- 10) Yizhar, O., Fenno, L., Davidson, T. J., et al. : Optogenetics in neural systems. *Neuron*, 71 ; 9-34, 2011
- 11) Zhang, F., Wang, L. P., Brauner, M., et al. : Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446 (7136) ; 633-639, 2007

Optogenetics In Biological Psychiatry

Kenji F. TANAKA, Norio TAKATA, Masaru MIMURA

*Keio University School of Medicine, Department of Neuropsychiatry
Laboratory of Emotional Control and Therapy*

Optogenetics, the use of channelrhodopsin : genetically-encodable light-activated proteins, allows the manipulation of specific neural circuit elements with millisecond precision. It has been 10 years since the discovery of channelrhodopsin, and optogenetics is now widely accepted as a powerful tool for addressing causal relationships between neural activity and behavior.

<Authors' abstract>

<**Keywords** : optogenetics, correlation, causality, illumination, electrical stimulation >
