オプトジェネティクスを用いた覚醒マウス用無線小型光刺激装置の開発

橋本 光広

福島県立医科大学 神経解剖・発生学講座(〒960-1295 福島市光が丘1番地)

New Small Wireless Optical Stimulator for Controlling a Movement of a Conscious Mouse

Mitsuhiro HASHIMOTO

Fukushima Med. Univ., 1 Hikarigaoka, Fukushima 960-1295

(Received December 14, 2015)

I produced a miniaturized, multicode, multiband, and programmable light-emitting diode (LED)-stimulator for the wireless control of optogenetic experiments. The LED-stimulator can drive three independent LEDs upon reception of an infrared (IR) signal from a newly developed IR-transmitter. Individual LED photopulse patterns are assigned to as many as 256 different codes of IR signals generated by the IR-transmitter. Using these devices, I remotely controlled the moving direction of a Thy1-ChR2-YFP transgenic mouse by transcranially illuminating the corresponding hemisphere of the primary motor cortex. The IR-transmitter and LED-stimulator will be particularly useful in experiments where free movements or patterned concurrent stimulations are desired, such as testing the social communication of rodents. I summarized optogenetics and available wireless photo-stimulators in this review.

Key Words: Optogenetics, Channelrhodopsin-2, LED, Infrared, Wireless

1. オプトジェネティクス

神経細胞の内側と外側では、イオン濃度が不均一に保たれている (Fig. 1A: Na^+ や Ca^{2+} は、細胞内よりも細胞外の方が、10倍以上濃度が高く、逆に、 Cl^- や K^+ は、細胞内の方が、濃度が高く保たれている)。そのため、定常時の神経細胞の内側と外側の間には電位差が生じており (神経細胞の静止膜電位と言う)、一般的な神経細胞の内側は、細胞外よりも約-70mVに保たれている (Fig. 1B)。神経細胞の細胞膜には、チャンネルが存在しており (Fig. 1A)、神経細胞に外部から刺激 (生理機能分子による刺激・電氣的刺激・薬剤投与など) が入るとチャンネルが開口し、細胞外から神経細胞内に陽イオンが流れ込み、これによって、神経細胞の膜電位は、増加し、大きく正に反転する (神経細胞の活動電位と言う)。活動電位が発生することによって、神経細胞は、その生理機能を発揮する。活動電位発生時の神経細胞の膜電位変化を Fig. 1B に示した。このように、神経細胞は、経時的に膜電位が変化するという電氣的特性を持っている。ここで、神経細胞・チャンネルを電子部品に例えるならば、静止膜電位を持った神経細胞は電気を貯めたコンデンサー、チャンネルは電気の流れをオン・オフするスイッチと見ることができ、また、神経細胞の活動電位の発生を可視化するために、LEDに置き換えると、神経細胞の活動は、Fig. 1C のような簡単な電子回路で表すことができる (実際の神経

細胞はもっと複雑である)。この回路では、スイッチ (チャンネル) がオンにされると、コンデンサーに蓄えられた電気 (静止膜電位) が放出され、LED が光る (活動電位の発生)。

Fig. 1 Electrical properties of neurons.

緑藻類のクラミドモナスは、眼点という構造で光を感じ、光への走光性を示す。近年、クラミドモナスの眼点から、チャンネルロドプシン(チャンネルロドプシン-1と-2がある)が発見され、チャンネルロドプシン-2(Fig. 2A)は、光感受性の非選択的陽イオンチャンネルであることが明らかとなった。チャンネルロドプシン-2に青色光(400~500 nm)を照射すると、チャンネルロドプシン-2に結合しているオール・トランスレチナールが13-シスレチナールに光異性化することによって、細胞外から陽イオン(Na^+ , K^+ , Ca^{2+})が細胞内に流入する。青色光の照射を止めると、13-シスレチナールが定常状態のオール・トランスレチナールへ遷移するのに伴い、細胞外からの陽イオン流入は停止する。ここで、Fig. 1C同様に、神経細胞に発現させたチャンネルロドプシン-2を電子部品に例えるならば、チャンネルロドプシン-2は、光によって電気の流れをオン・オフできるフォトトランジスタと見なすことができ、Fig. 2Bのような簡単な電子回路で示すことができる。この回路では、フォトトランジスタ(チャンネルロドプシン-2)に光を当てると、回路がオンになり、コンデンサーに蓄えられた電気(静止膜電位)が放出され、LEDが光る(活動電位の発生)。通常の神経細胞では、特殊な装置による電気刺激や薬剤投与によって、強制的に神経細胞のスイッチをオン(Fig. 1C参照)にしなければ、活動電位を発生させることはできないが、チャンネルロドプシン-2を発現させた神経細胞では、外部から青色光を照射するだけで神経細胞のスイッチをオンにし(Fig. 2B参照)、活動電位を発生させることができる(Fig. 1Bの「チャンネルが開く」が、「青色光照射」に置き換わることになる)。電気刺激の場合、電気刺激を行った周囲の神経細胞すべてに活動電位を発生させてしまい、特定の神経細胞のみに活動電位を発生させることが難しく(選択性が低い)、また、薬剤投与の場合、薬剤投与時の薬剤濃度上昇時間と薬剤投与を止めたときの薬剤滞留時間が影響し、矩形波状に神経細胞を刺激することが困難であった(刺激のオン・オフの切れが悪い)。それに対して、チャンネルロドプシン-2を発現させた神経細胞を使用すれば、多くの神経細胞の内、チャンネルロドプシン-2を発現した細胞のみに、光照射によって活動電位を発生させることが可能であり(選択性が高い)、また、チャンネルロドプシン-2の光に対する早い反応性(光照射に対して約一ミリ秒でオンになり、光照射停止に対し約十数ミリ秒でオフになる)によって、矩形波状に神経細胞を刺激することが可能となった(刺激のオン・オフの切れが良

Fig. 2 Channelrhodopsin-2.

い)。このように、光学と分子生物学・遺伝学を融合して生命機能を解明する研究分野をオプトジェネティクス(光遺伝学)と呼び、オプトジェネティクスの誕生によって、脳の特定領域における神経細胞の活性を、光によってスイッチングすることができるようになり、脳の生理機能をより詳細に解析できるようになった¹⁻³⁾。

2. 光刺激装置の開発

分子生物学・遺伝学の発展によって、脳内の神経細胞にチャンネルロドプシン-2を発現する遺伝子改変マウスを開発することが可能となった。この遺伝子改変マウスを用いれば、脳の局所に外部から青色光を照射することによって、特定領域の神経細胞の生理活性を制御することができる^{4,5)}。チャンネルロドプシン-2が神経細胞に発現している遺伝子改変マウスを用い、覚醒・自由行動下で神経細胞の活性を光刺激によってスイッチングするための光刺激装置の開発を行った⁶⁾。光刺激装置の開発目標として、覚醒マウスの行動を妨げない(無線・小型・バッテリー駆動)、小型軽量光源(高輝度チップLED使用)、複数部位を光刺激できる(複数のLEDを制御)、プログラムの変更によって仕様を自由に変更できる(マイクロコントローラ使用)、非侵襲(頭蓋を開けない)を掲げ、無線小型光刺激装置の開発を行った。開発した装置は、光刺激装置を赤外線通信によってコントロールする赤外線送信機とマウスの頭部に設置する小型無線光刺激装置の構成になっている(Fig. 3: 小型無線光刺激装置の仕様概要は、Table 1参照)Fig. 4は、赤外線送信機と小型無線光刺激装置の回路図を示す。

赤外線送信機・小型無線光刺激装置は、マイクロコントローラを搭載しており、プログラムを書き込むことによって仕様を自由に変更できる。赤外線送信機は、4チャンネルのBNCポートを有しており(Fig. 3のCh.1~Ch.4)、それぞれにTTL信号を入力することによって、異なる命令をコードする赤外線信号を送信する。その赤外線信号に含まれるコードによって光刺激装置を個別に制御することができる。光刺激装置は、リチウムポリマー電池で駆動しており、赤外線送信機から受信したコードを、光刺激装置に書き込まれたプログラムによ

Fig. 3 System of new small wireless optical stimulator.

Table 1 Available wireless photo-stimulators.

Information source	Protocol of wireless transmission	Size (head-mounted device)	Weight (head-mounted device)	Power source	Channels for LED	Programmability (head-mounted device)	Availability of multicode transmission
Hashimoto, <i>et al.</i> (2014) ⁶⁾	IR	14 mm × 14 mm × 10 mm	2.4 g (include a battery)	Li Po battery (10mAh)	3 (chip LED, 6.07mW/mm ² bubble LED)	○	Multicode (256 codes)
Iwai, <i>et al.</i> (2011) ⁷⁾	IR	?	3.1 g	Coin cells	1	×	×
Wentz, <i>et al.</i> (2011) ⁸⁾	Wi-Fi	less than 1 cm ³	Basic module, 2 or 3 g	Wireless energy transfer	8	○	Multicode
McCall, <i>et al.</i> (2013) ⁹⁾	Switching of wireless energy transfer	?	?	Wireless energy transfer	4	×	×
Yeh, <i>et al.</i> (2013) ¹⁰⁾	Switching of wireless energy transfer	Coil size of wireless energy transmission 27 mm ³	?	Wireless energy transfer	1	×	○
Teleopto ⁷² (BRC, Nagoya)	IR	?	1.3-3.3 g	Li Po battery	1	×	Multicode (2 codes)
S-series system ⁷³ (Triangle BioSystems International, Durham, U.S.A.)	IR	14 mm × 17 mm × 5 mm	4 g	Li Po battery (60mAh)	2	×	Multicode (2 codes)

IR-transmitter

Fig. 4 Circuit diagrams of IR-transmitter and LED-stimulator.

て認識・解析し、そのコードに従って、3つのLEDを個別にパルス発光する(赤外線通信の詳細なデータフォーマットは、参考文献6を参照)。

3. 光刺激装置を用いた動物の行動制御

開発した装置は、マウスの行動を妨げないほど小型・軽量で、遺伝子改変マウスの頭部に設置可能である(Fig. 5A)。この装置を、チャンネルドプシン-2を脳内に発現している遺伝子改変マウス(Thy1.2-ChR2-YFP)^{4, 5)}の頭部に設置し(Fig. 5A)、左脳と右脳の運動を制御し

ている部位(第一運動野)にそれぞれ、超小型青色LEDを頭蓋上に設置した(Fig. 5Bの左側LEDと右側LED)。使用した超小型青色LEDは、6.07 mW/mm²の輝度を持ち、頭蓋を透過して脳内に十分な光を照射することが出来る。そのため、マウスの頭蓋は開いていない(非侵襲)。無線光刺激装置によって、覚醒・自由行動下のマウス脳に対して、青色光照射を10ヘルツ・2秒間、右側LED→左側LED→右側LEDの順(Fig. 6の1, 2, 3に相当)に行った。その様子を、30フレーム/秒で動画撮影し、3フレームおきに画像を抜き出し、抜き出した画像を合成したものがFig. 6である(実際の動画は、ネット上で確認できる^{†1)})。右側LEDで右の運動野を光刺激した場合(Fig. 6の1)、マウスの首は、左側に大きく曲がり、首の向いた方向へマウスは歩行する。次に、左側LEDで左の運動野を光刺激した場合(Fig. 6の2)、マウスの首は、右側に大きく曲がり、同様に首の方向へマウスは歩行する。さらに、右の運動野を光刺激すると(Fig. 6の3)、マウスは、左へと歩行の方向を変える。マウスの首は、1回の光刺激で大きく曲がるわけではなく、1回の光刺激で少し曲がり、連続光刺激によって首の曲がり方が積算されていくところが動画で確認できる^{†1)}。右脳は左半身を、左脳は右半身を制御しており、このように、左右の運動野を光刺激する

Fig. 5 Thy1.2-ChR2-YFP mouse mounted with LED-stimulator.

^{†1} URL: <https://vimeo.com/97285497>

^{†2} URL: <http://w.w.teleopto.com>

^{†3} URL: <http://w.w.trianglebiosystems.com/s-series-systems.html>

Merged

Fig. 6 Control of mouse movement by the head-mounted LED-stimulator.

ことによって、マウスの歩行方向を自由にコントロールすることが出来る。

4. おわりに

無線小型光刺激装置は、それぞれ異なる仕様で開発されており、代表例を、Table 1にまとめた。小型無線光刺激装置を開発する上で一番問題となるのが、電源である。バッテリーを電源にした場合^{6, 7, 12, 13}、装置を小型化するためには、小さいバッテリーを使用しなければならず、必然的にバッテリー容量も小さくなってしまい、駆動時間が短くなってしまふ(当方が開発した装置は、10 mAhのバッテリーで3.5時間駆動する)。また、無線装置自体の消費電力を小さくするために、消費電力が高いWiFiを用いた無線通信は不利になる⁸。それが、装置開発・実験計画上の制限事項となってしまう。多くの装置は、消費電力の少ない赤外線通信を採用している^{6, 7, 12, 13}。しかし、赤外線通信は、遮蔽物によって通信が途絶えてしまう欠点がある。赤外線送信機から送信される赤外線のパルスパターンが、そのまま光刺激装置のLED発光のパルスパターンである場合、遮蔽物で赤外線通信が遮断されてしまうと、光刺激装置のLED発光も止まってしまう。そこで、当方の装置は、LEDの発光パターンを光刺激装置のマイクロコントローラにプログラムすることに

よって、赤外線送信機から送られるコード(コード長約27ミリ秒)を受信すれば、その後赤外線通信を行わなくとも、光刺激装置のみで、LEDをパルス発光できるようにした。これによって、遮蔽物に対する耐性を持たせてある。また、別のアプローチで電源問題を解決しようとしたのが、無線給電を用いた装置⁸⁻¹⁰である。しかし、無線給電用コイルならびにスーパーキャパシタによる装置の重量増加・無線給電の生態への影響・パルス発光制御の不確実性など、現時点ではまだ制限が多い。非侵襲光刺激の試みとして、生体外より近赤外光(可視光よりも波長が長く、生体内への透過性が高いため、脳のより深い部分に光を到達させることができる)をランタニド・ナノ粒子(近赤外光を励起光として吸収し、アップコンバージョンによりエネルギーの高い可視光を放出する)に照射し、ランタニド・ナノ粒子から放出される可視光を、チャンネルロドプシンの励起光として利用する試みがなされている¹¹。これによって、青色光では届かない脳深部を近赤外光によって光刺激することができる。オプトジェネティクスを用いた研究は、急激な早さで発展・普及している。オプトジェネティクスを用いた研究を計画する際には、最新の情報を収集し(実際に使用している人に聞くのが一番良い)、自らの実験系に最も適した分子・光刺激装置・解析機器を見極める必要がある。

参考文献

- 1) K. M. Tye and K. Deisseroth: *Nat. Rev. Neurosci.* **13** (2012) 251.
- 2) H. Yawo, T. Asano, S. Sakai, and T. Ishizuka: *Dev. Growth Differ.* **55** (2013) 474.
- 3) J. Y. Lin: *Exp. Physiol.* **96** (2011) 19.
- 4) B. R. Arenkiel, J. Peca, I. G. Davison, C. Feliciano, K. Deisseroth, G. J. Augustine, M. D. Ehlers, and G. Feng: *Neuron* **54** (2007) 205.
- 5) H. Wang, J. Peca, M. Matsuzaki, K. Matsuzaki, J. Noguchi, L. Qiu, D. Wang, F. Zheng, E. Boyden, K. Deisseroth, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007) 8143.
- 6) M. Hashimoto, A. Hata, T. Miyata, and H. Hirase: *Neurophotonics* **1** (2014) 011002.
- 7) Y. Iwai, S. Honda, H. Ozeki, M. Hashimoto, and H. Hirase: *Neurosci. Res.* **70** (2011) 124.
- 8) C. T. Wentz, J. G. Bernstein, P. Monahan, A. Guerra, A. Rodriguez, and E. S. Boyden: *J. Neural Eng.* **8** (2011) 046021.
- 9) J. G. McCall, T. Kim, G. Shin, X. Huang, Y. H. Jung, R. Al-Hasani, F. G. Omenetto, M. R. Bruchas, and J. A. Rogers: *Nat. Protoc.* **8** (2013) 2413.
- 10) A. J. Yeh, J. S. Ho, Y. Tanabe, E. Neofytou, R. E. Beygui, and A. S. Y. Poon: *Appl. Phys. Lett.* **103** (2013) 163701.
- 11) S. Hososhima, H. Yuasa, T. Ishizuka, M. R. Hoque, T. Yamashita, A. Yamanaka, E. Sugano, H. Tomita, and H. Yawo: *Scientific Reports* **5** (2015) 16533.

レーザーワード

オプトジェネティクス(optogenetics)

光によって活性化されるタンパク質(チャンネルロドプシン-2など)を、遺伝子工学を用いて特定の細胞に発現させ、そのタンパク質が発現した細胞の機能を、外部から照射する光によって制御しようという技術。光を用いているため、高い空間ならびに時間解像度で、細胞の

機能を制御することが可能である。この技術の登場により、今まで技術的に解析困難であった脳の機能を解析することが可能となった。オプトジェネティクスに使用する光学機器に関しては、http://www.openoptogenetics.org/index.php?title=Main_Pageに詳しい。(橋本 光広)