

脳に第三の眼は存在するのか：マウス小脳における光受容能の解析

須藤 裕子（筑波大学 生物学類） 指導教員：櫻井 啓輔（筑波大学 生命環境系）

1. 導入

動物は周囲の空間的情報を得るための視覚情報として光を利用するだけでなく、概日リズムの光同調などの非視覚的情報として光を利用している。光受容を担うセンサータンパク質として知られる G タンパク質共役型受容体 (GPCR) オプシンは、その補因子レチナールのシス型からトランス型への光異性化が引き金となり、G タンパク質を介した細胞内シグナル伝達系の活性を引き起こす。オプシンは大きく 7 つのサブファミリーに分類されるが、視覚情報の受容を担うオプシン類と非視覚情報の受容を担うオプシン類に分類される。視覚情報の受容を担う桿体オプシンや錐体オプシンは、網膜の桿体および錐体視細胞の外節に存在し光受容を行うのに対して、非視覚情報の受容を担うオプシン類は網膜視細胞以外の組織において発現が認められる。哺乳類以外の脊椎動物においては、第三の目といわれる松果体などの脳部位が光受容能をもつことが知られているが、哺乳類の松果体は光受容を失っており脳組織の光受容能の有無はよく分かっていない。

非視覚型オプシンファミリーの一つであるオプシン 3 (Opn3、別名エンセファロプシン) はマウスの脳に発現するオプシンとして 1999 年に発見された(*1)。それ以降、他の動物でもオプシン 3 のホモログが見つかっており、オプシン 3 は多くの動物において眼だけでなく脳などといった他の組織でも発現することから、非視覚型の光情報処理と関わるオプシンの一つと考えられる。しかし、マウス脳においてオプシン 3 の mRNA の発現が報告されているものの、生体における光受容能の有無やその役割に関してはよく分かっていない。

眼に比べ物理的に光情報が制限されるマウスの脳は、果たして光受容能をもつのであろうか。本研究ではマウス小脳の神経細胞の光受容能を調べる目的で、急性脳スライス標本を作製しカルシウムイメージングで光依存的な活動を調べた。また、マウス小脳におけるオプシン 3 タンパク質の発現パターンを調べた。

2. 材料と方法

カルシウムイメージング

雌雄区別なく生後 7~21 日の野生型 ICR 系統マウスを一晩暗順応させた。その後赤色光下でマウスを頸椎脱臼し脳の急性スライス標本の作製を行った。摘出した脳は 95%酸素/5%二酸化炭素でバブリングした 4°C の Modified Ringer 溶液 (Choline Chloride 120 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 8 mM, NaHCO₃ 28 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 25 mM) で満たされたチャンバーへ移した。振動刃マイクロトームで厚さ 250 μm の冠状断の脳切片を作製し、95%酸素/5%二酸化炭素でバブリングした 30°C の Normal Ringer 溶液 (NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1.25 mM, Glucose 11 mM) で切片を 30 分間インキュベートした。その後、暗所でカルシウム指示薬 CaSiR-1-AM (終濃度 10 μM) および全トランスレチナール (終濃度 10 μM) 含む溶液で 30 分間浸漬した。これ以降は赤外光下で実験を行った。脳切片を顕微鏡のチャンバーに置き、青色 (極

大波長; 488nm) の LED 光を 1/100 倍、1/10 倍、1 倍の光強度の順で 5 秒間照射した際の蛍光輝度を CMOS カメラで記録した。取得画像の解析は、Icy ソフトウェアを使用して 1 画像あたり 20~30 個の細胞における蛍光輝度の相対値を求めた。蛍光強度の相対値は、光刺激の蛍光輝度 (ΔF) を光刺激前の蛍光輝度 (F) で割った $\Delta F/F$ を計算した。

免疫組織化学法

野生型 ICR 系統と野生型 C57BL/6J 系統の成体メスマウスを麻酔下 4%パラホルムアルデヒド(PFA)/リン酸緩衝液(PB)で灌流固定後、摘出した脳と眼球を 4%PFA/PB に 4°C で一晩固定した。30%スクロース/リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に 4°C で一晩漬け、包埋容器に標本を移して Tissue-Tek を流し込み凍結した。クライオスタットで脳と眼球どちらも厚さ 20 μm で脳は冠状断、眼球は横断の切片を作成した。

凍結切片は 100%メタノールで 30 分間処理し、10%ヤギ血清を含む PBS に室温で 2 時間ブロッキングし、抗オプシン 3 抗体 (1:500) と抗トランスデュシン抗体 (1:1000) を用いて 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し Alexa568 蛍光標識二次抗体 (1:1000) と Alexa488 蛍光標識二次抗体 (1:1000) を用いて室温で 2 時間インキュベートした。核 DNA は DAPI で染色した。倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察、イメージングソフトウェア (Olympus cellSense) を用いて画像を取得した。

3. 結果と考察

生後 7~21 日のマウス小脳のスライス標本において、カルシウム蛍光指示薬の効率的な細胞内への取り込みが観察された。蛍光色素の取り込みが確認された細胞について光刺激による蛍光輝度の変化を測定した。これまで 317 個の細胞を調べたところ、6 つの細胞において光刺激依存的な蛍光輝度の上昇が確認された。その内 1 つの細胞において光強度依存的な輝度変化を示す細胞が確認された。この結果は、マウス小脳において光受容能を持つ細胞が存在する可能性を示唆している。記録を行った細胞のうち光依存的な応答を示した細胞の割合はわずかであったが、今回実験で用いた若齢のマウスにおいてはオプシン 3 を発現する細胞の割合が少ないという報告と一致する(*1)。小脳におけるオプシン 3 の発現は週齢が上がるにつれてより広範囲で認められるため、現在成熟個体の小脳においても同様にカルシウムイメージングの測定を行うべく実験条件の検討を行っており、その結果を発表会で報告したい。また、マウス脳においてオプシン 3 のタンパク質が発現している部位について免疫組織化学を用いて調べた結果も合わせて報告する。

4. 参考文献

*1 Blackshaw S and Snyder H, *The Journal of Neuroscience* 19, 3681-3690 (1999)