

題名	脳の秘密を照らす光遺伝学—単細胞藻類のタンパク質の研究から
Title	Optogenetics: Studying Proteins from Single-celled Algae to Illuminate the Mysteries of the Brain
著者名	カール・ダイセロス
Author(s)	Karl Deisseroth
言語 Language	日本語・英語 Japanese, English
書名	稲盛財団：京都賞と助成金
Book title	The Inamori Foundation：Kyoto Prize & Inamori Grants
受賞回	34
受賞年度	2018
出版者	公益財団法人 稲盛財団
Publisher	Inamori Foundation
発行日 Issue Date	8/31/2019
開 始 ペ ー ジ Start page	100
終了ページ End page	141
ISBN	978-4-900663-34-3

脳の秘密を照らす光遺伝学 —単細胞藻類のタンパク質研究から カール・ダイセロス

このような大変に名誉ある賞をいただき、また、このたびは生物学の視点から、この研究の喜びを皆さんにお伝えする機会を与えてくださいましたことに、心より御礼を申し上げます。実のところ、私がこの講演でお伝えしたいと思っていることは、科学という名の旅の最初の第一歩には、ある意味での単純さがあるということです。もちろん、あらゆる分野が複雑で費用のかかるものになっていますが、最初の段階では非常に単純であり、やりがいにあふれている場合もあるのです。

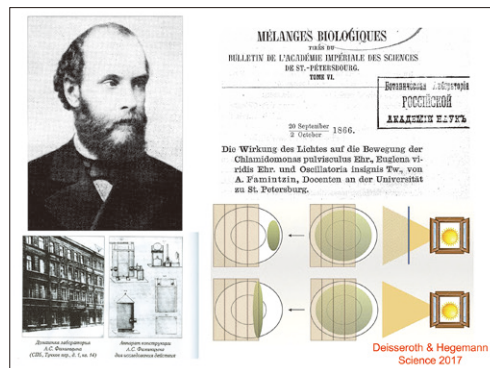


Fig. 1

この分野の歴史をひもとくと、最も古い知見は、動物での研究ではなく、植物学で見出されます(Fig. 1)。こちらは、ロシアの植物学者、Andrei Famintsynです。1866年、Famintsynは植物の挙動について記述した論文を発表しました。クラミドモナス属の淡水藻を集め、藻が入ったシャーレの側面から適度な光を当てると、藻が光に向かって急速に集まることを発見したのです。光を強くすると、藻は中間地点まで戻ります。論文はドイツ語で書かれましたが、フランス語の名称のロシアの学術誌に投稿されました。つまり、当時から非常に国際的な科学分野だったのです。これは植物学での発見でした。

それから長い時を経て、(ワトソンとクリックのDNA構造で有名な)Francis Crickは脳について考え始めました。そして解決策は見つからなかったものの、常にそうしていたように、非常に巧みにこの問題を体系化し、提起しました。クリックは、神経科学で必要なことは、警戒している動物において一種類以上の神経細胞の発火を迅速にオン・オフする能力であり、理想的な信号は光であろうと述べました(Fig. 2)。彼は、これをどうやって行えばよいのかはわからず(しかし、うまくこの問題を体系化しました)、実際、どちらかといえば無理な話だろうと思っていました。

Optogenetics: Studying Proteins from Single-celled Algae to Illuminate the Mysteries of the Brain Karl Deisseroth

Thank you very much for this incredible honor, and for the opportunity to share some of the joy of this work, and this time in biology, with all of you. In fact, what I hope to do is convey some of the simplicity of the very early steps in a scientific journey. Of course, all fields become intricate and complicated and expensive, but sometimes the very early moments are very simple, and rich in being rewarding.

The deepest history of this field can be found even in botany, rather than in the study of animals (Fig. 1). This gentleman here is Andrei Famintsyn, a Russian botanist. In 1866, he published a paper describing the behavior of plants. He collected algae, freshwater algae of the Chlamydomonas species, and in a dish he found that when he illuminated with moderate light from the side, that algae would accumulate on the side toward the light very quickly. More intense light would cause the algae to back off to an intermediate location. He wrote in German, but in a Russian journal with a French name. So, very international science even then. Now, this was botany.

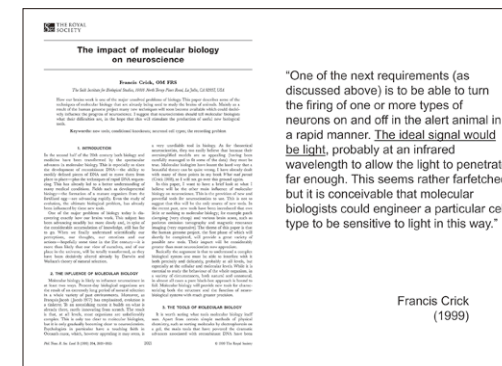


Fig. 2

A long stretch of time later, Francis Crick (of Watson and Crick DNA structure fame) had begun thinking about the brain, and although he did not come up with a solution, he—as he was wont to do—framed or posed the problem very well. He said, what we need in neuroscience is the ability to turn the firing of one or more types of neurons on and off in the alert animal in a rapid manner (Fig. 2). The ideal signal would be light. He didn't know how to do this (but he framed the problem well)—in fact, he thought it would be rather a far-fetched possibility.

But the reason this was a well-posed problem was that electrical and magnetic interventions cannot discriminate different kinds of neurons which may be right next to each other, but do completely different things, and that's because all neurons respond to electricity (Fig. 3A, B). The essence of optogenetics is introducing—by genetic or

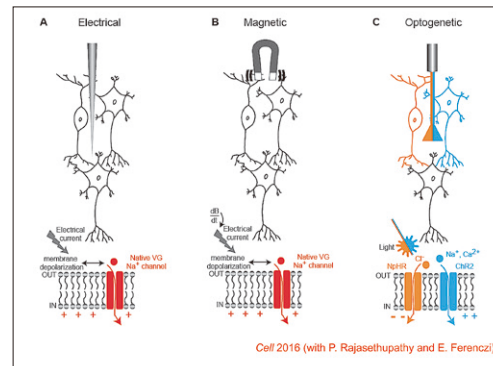


Fig. 3

なぜこれが巧みに提起された問題なのかと言うと、電氣的及び磁氣的介入では、隣接しながらまったく異なる働きをする別の種類の神経細胞を区別することができないからであり、これはすべての神経細胞が電気に反応するためです (Fig. 3 A, B)。光遺伝学の本質は、細胞膜に位置し、光に反応し、光を電気に変えるタンパク質をコードする遺伝子を、遺伝学的又は解剖学的手法によって導入することです。そして、通常、脳内の神経細胞は光に反応しないので、非常に強力なSN比 (signal-to-noise) がもたらされます (Fig. 3 C)。

初期段階の実験における単純性という今回のテーマについて、これがその実例となります。この実験ノートは2004年7月1日に、シャーレ中の哺乳類の神経細胞にチャネルロドプシン遺伝子を導入した最初の瞬間です。チャネルロドプシン遺伝子は、Famintsynが研究した単細胞藻類に由来するタンパク質をコードしています (Fig. 4)。これは当時私が書いたもので、これらはその実験から得られた細胞です (Fig. 4 a)。チャネルロドプシンには黄色の蛍光タンパク質を結合させていたので、細胞内のどこにあるのかを見ることができました。そしてそれは、私が望んでいた場所である細胞膜にありました。これは光を照射していないシャーレで、これは光を照射したシャーレです。細胞核のこの赤い標識はタンパク質の活性化を確認するためのもので、膜の活性化、電氣的な膜の脱分極を示すことがわかっていたシグナルです。このような状態は、光を照射していないシャーレよりも光を照射したシャーレで多く見られました。これで、感受性の高い哺乳類の神経細胞に藻類の遺伝子を導入し、活性化により光に反応させることが可能であるか、という基本的な問題のほとんどが解消されました。これは当時の私の小さなグループで、非常に才能のある学生、Feng

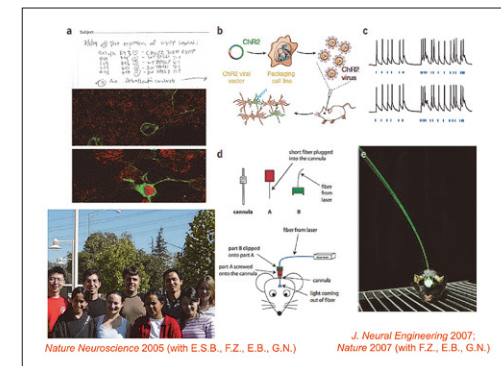


Fig. 4

anatomical means—genes encoding proteins, which sit in the membrane of the cell, respond to light, and turn light into electricity. And because no neurons respond to light in the brain normally, this creates a very powerful signal-to-noise (Fig. 3C).

This question of the simplicity of the earliest experiment, is exemplified here. This was the first moment, July 1st 2004 when I put a channelrhodopsin gene, this is the gene encoding the protein from the single-celled algae of the kind that Famintsyn studied, into mammalian neurons in a dish (Fig. 4). This is my writing from that time and these are the cells from that experiment (Fig. 4a). The channelrhodopsin was coupled to a yellow florescent protein so I could see where it went in the cell—and it went to the membrane of the cell, which is where I wanted it to be. This was a dish not illuminated with light, this was a dish that was illuminated with light, and this red label in the nucleus of the cell is for the activation of a protein, a signal that I knew was indicative of membrane activation, electrical membrane depolarization. I saw more of this in the dish that had been illuminated with light, than in a dish that had not been. So, this de-risked the bulk of the fundamental question, can you put an algal gene into sensitive mammalian neurons and get them to respond to light with activation? This was my small group at the time, very talented students Feng Zhang and Ed Boyden and others. And over the next couple of years we did a number of experiments. Feng designing viruses that allowed efficient delivery of the genes (Fig. 4b). Ed doing electrical recording showing these action potentials, these brief blips of depolarization of the membrane elicited by blue light (Fig. 4c). Feng and others working on designing fiber optics to get light into the brain... and over the next 4 or 5 years we developed the full set of components that allowed optogenetics to work (Fig. 4d). It was a difficult time, a challenging time. Many people doubted—and rightly so—that the whole concept would

る活性(特定のスパイクパターン)を制御できることがわかりました。

さて、1つのテーマについて(すぐに光遺伝学の興味深い応用の話に入りますが)、これらのタンパク質自体についてお話するためにちょっと時間を取りたいと思います。というのも、これらのタンパク質は一言で言えば美しいものだからです。また、光によって活性化されるチャネルは注目に値し、前例のないものであり、それ自体が研究するに値し、興味深く不思議なものです。

2011年になっても、チャネルロドプシンの構造と光駆動性チャネル孔について、実際にわかっていたことはこれだけでした(Fig. 6)。チャネルロドプシンはおそらく7回膜貫通タンパク質であり、ビタミンA様化合物であるオールトランスレチナール、つまり実際に光を受ける発色団と結合していることが相同性により判明しました。わかっていなかったことは、チャネル孔がどこにあるかということでした。

チャネル孔はこれらの7カ所からなる膜貫通タンパク質の1つの中には存在せず、二量体の2つの単量体間の境界面にあると、他の研究者のほとんどが仮定していました。そして、このように「わからない」というレベルでは当然のことながら、チャネル孔を操作し、新たな種類の機能を加えるために再設計することは非常に難しいことでした。しかし、ここ7年ほどで大きな進歩を遂げたのです。ここに示したのは、私たちと仲間が長年かけて行ってきた構造モデリング、分子動力学、結晶構造の研究を組み合わせたものです。青い矢印で示したように、チャネル孔は実際にはこのタンパク質の内部にあります。この陽イオン伝導性チャネルロドプシンの場合、チャネル孔に沿って、多くの極性残基、それも陰性残基が並んでいます。レチナール結合ポケットが確認でき、色調特性を変化させる方法を考え出すこともできます。これらの灰色の球体は水分子です。

この研究では、長年にわたり非常に才能のある仲間と協働してきました。最初のチャネルロドプシン構造は、加藤英明(当時濡木研の学生)とFeng、そして東京大学の濡木理によるものであり、ここに示した最初の陽イオン伝導性チャネルロドプシンの構造だけでなく、負の荷電イオンを伝導する最初の陰イオン伝導性チャネルロドプシンの構造も得られました(Fig. 7)。

私たちが発見したものは、それ自体が興味深いだけでなく、大きな力となるものでした。構造を理解することは、神経科学の新たな種類の手法を生み出すための大きな力になります。その一例が、この最初の陽イオン伝導構造から始まったものなのです。

少し詳しく見てみると、先ほど触れましたが、ここで赤く示されているように、

It had been prominently hypothesized by others that pore would not even be within one of these seven transmembrane proteins—that it would instead lie at the interface between two monomers of a dimer. And that level of not-knowing of course posed severe challenges to engineering the pore, redesigning it to confer new kinds of function. But, we've come a long way in the last 7 years or so. What is represented here is a combination of structural modeling, molecular dynamics, and crystal structure work that we and our colleagues have carried out over the years. We now can see that the pore indeed lies within this protein, as shown by the blue arrows. We can see—for this cation-conducting channelrhodopsin—that the pore is largely lined with polar and even negative residues. We can see the retinal-binding pocket and come up with ideas on how to shift the color tuning properties. These gray spheres are the water molecules.

We've collaborated with a number of very talented colleagues over the years in this work. The initial channelrhodopsin structure was with Hideaki Kato and Feng, and Osamu Nureki at the University of Tokyo, and we've gotten the structures of not just the first cation-conducting channelrhodopsin as shown here, but first structures of anion-conducting channelrhodopsins that conduct negatively charged ions instead (Fig. 7).

What we found is, not only are they interesting in their own right, but they carry a lot of power—structural understanding brings a lot of power for creating new kinds of tools for neuroscience. An example of that, is starting from this initial cation-conducting structure.

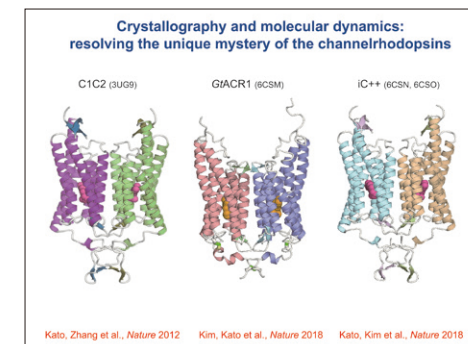


Fig. 7

In looking at it in some detail, we could see that the inner lining of the pore, as I mentioned and as symbolized here in red, the predicted surface electrostatics of the inner lining of the pore were largely negative—and that could play a role in deterring the flux of anions and allowing cations to flow (Fig. 8).

Andre Berndt and Soo Lee in my lab in 2014 thought if this is true we should be

チャネル孔の内側、予測される内側の表面静電気はほとんどが負であることがわかります。それが、陰イオンの流れを阻止し、陽イオンが流れるようにする役割を果たしていると思われました(Fig. 8)。

2014年、私の研究室にいたAndre BerndtとSoo Leeは、それが本当であれば変えることができるのではないかと考え、長い一連の分子修飾でチャネル孔を再構成し、青で示したようにチャネル孔の内側の予測表面静電気のほとんどが正となるようにしました。

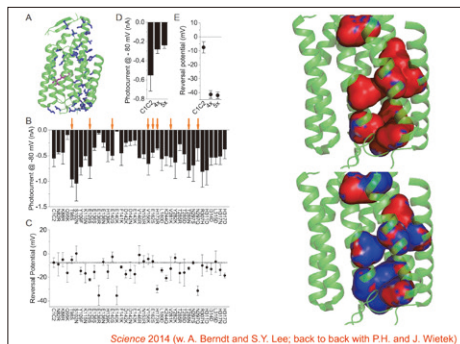


Fig. 8

そしてこれは確かに陰イオンチャネルの一種である塩素イオンチャネルであることが判明し、神経系ではこのチャネルは(塩素イオンの平衡を保つために)通常、抑制的です。そのため、青色光によって、活動電位を引き起こすのではなく、遮断することができます(Fig. 9)。このことから、タンパク質の理解がもたらす力とはどのようなものなのかが分かります。タンパク質を理解することにより、利用可能になった手法の性質を、極めて論理的な形で、完全に変えることができます。

私の長年の友人であり共同研究者でもあるPeter Hegemann(フンボルト大学)をはじめとするたくさんの仲間による他の研究があったことで、私たちはこれらの研究をさらに前進させることができました。Peterは、同様の戦略で、全体的な効果は同じですが、変異は異なる陰イオン伝導性チャネルロドプシンを発表し、私たちは共同でiC++と呼ばれる進化型塩素イオンチャネルを含む一連の新たな手法を生み出しました。

双安定動作モードも構築しました(Fig. 9)。ご覧の通り、ここでは活動電位の発火を持続的に抑制するために、光を継続的に照射しています。何回も照射することは、生物学への応用には望ましくありませんが、これを双安定動作モードに変換する

able to change it—and so they relined the pore with a long series of molecular modifications to create an inner lining of the channel pore that was largely positive, regarding its predicted surface electrostatics as shown in blue.

And this indeed turned out to be a chloride channel, an anion channel, and this in neural systems (because of the balance of chloride ions) is typically inhibitory. So, now we can shut off action potentials with blue light instead of driving them (Fig. 9). So this gives a flavor of the power: understanding proteins, one can totally change—and in a very consequential way—the nature of the tool that has become available.

With other work including from a number of our colleagues, including my longtime friend and collaborator, Peter Hegemann, we were able to advance these yet further. Peter published an anion-conducting channelrhodopsin with a similar strategy, different mutations with same overall effect, and we then joined forces to create a suite of new tools including an advanced chloride channel called iC++.

We also created bistable modes of operation (Fig. 9). Here as you can see, the light is delivered continuously to suppress action potential firing the entire time. Many times that's not desirable for biological applications, but we found ways of converting this into a bistable mode of operation. So, just a flash of light would create stable inhibition, and that in fact could be even reversed through a different color of light. And this as you might imagine is very useful, especially for long time-scale experiments.

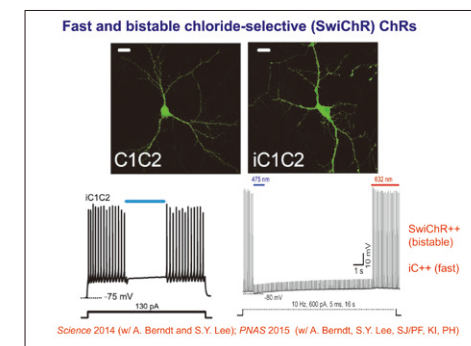


Fig. 9

The nature of the ion-conducting pore became particularly clear after completion of not just this study, but these studies just this year. We obtained the structure of iC++ (Fig. 7). This was the new anion channel that we had designed *de novo*, and we were able to verify that what we had hypothesized, we were doing with our modifications was in fact correct, and we had redesigned the pore in the way that we had planned.

About a year after our initial publication of the anion-conducting channelrhodopsin,

方法を見つけました。そのため、ほんの一瞬の光により安定した抑制が得られ、異なる色の光により反転させることもできます。ご想像のとおり、これは特に長時間の実験では非常に有用です。

イオンを通すチャネル孔の性質は、この研究だけでなく、今年になってこれらの研究が完了したことで一層明らかとなりました。iC++の構造を解明したのです (Fig. 7)。これが、私たちが新たに設計した新たな陰イオンチャネルで、仮説としていた内容と分子修飾の方向性が実際に正しいもので、計画していた通りにチャネル孔を再設計できていたことを確認することができました。

陰イオンを透過するチャネルロドプシンに関する最初の発表から約1年後、テキサス大学のJohn Spudichのグループは、GtACR1と名付けた天然に存在する塩素イオン伝導性チャネルロドプシンを発見しました。私たちもiC++と同時期にこの構造を解明し、これらのチャネルロドプシンについて共同で発表しました。このような天然に存在するチャネルロドプシンの興味深い特徴は、非常に大きな電流が流れることですが、動態が遅く、応用するにあたって問題となりそうでした。しかし、構造が解明されたことで研究の速度を上げることができました！

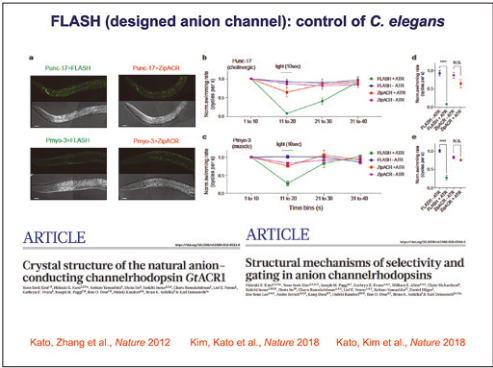


Fig. 10

構造を理解したことにより、私たちは同じ一連の論文の中で、FLASHと名付けた新たな陰イオンチャネルの作製を報告することができました (Fig. 10)。そして、安定した応用結果を線虫C. elegansを用いて示すことができました。設計したこの陰イオンチャネルを線虫の神経細胞または筋肉細胞のいずれかに挿入して、ご覧の通り、線虫の遊泳行動を可逆的に麻痺させることができたのです。もう一度強調しておきますが、ここに示されているように、神取秀樹 (名古屋工業大学) をはじめとする仲間や

John Spudich's group in Texas found a naturally-occurring chloride-conducting channelrhodopsin that they called GtACR1. We also obtained the structure of this one at the same time as iC++, and published these together. The interesting feature of this naturally-occurring channelrhodopsin was that it had very large currents, but was slow in its kinetics which can be a problem for some applications. But getting the structure allowed us to speed it up!

In that same set of papers we were able to create a new anion channel that we called FLASH, guided by our structural understanding (Fig. 10). And we were able to show a robust application of this in the worm C. elegans, delivering this designed anion channel either to neurons or muscle cells of the worm, we were able to paralyze the worm's swimming behavior in a reversible fashion as shown here. Just to emphasize again, we had a remarkable team of colleagues and collaborators including Hideki Kandori and others as indicated here. So, we are grateful for our outstanding colleagues and our international collaborators.

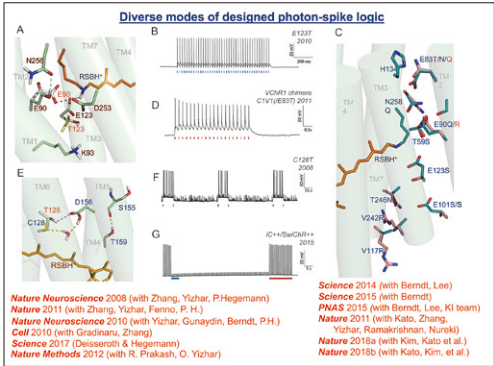


Fig. 11

Now, it's not just the ion-conduction properties that are different. We've been able to create diverse forms of what you might call photon-spike logic, by getting an atomic-level structural understanding of these beautiful proteins (Fig. 11). As I mentioned, we can get both fast and bistable modes of operation, and bistable not just for inhibition but also for excitation—we can flip cells into and out of excitable states in stable fashion. But what I would like to focus on a little bit more is this possibility here—which is changing the color that the channelrhodopsin responds to (Fig. 11B, D, F, G). You can see here red flashes of light (Fig. 11D). This we achieved, beginning in 2008, culminating in 2011 creating red light driven spiking. This like all our other work was with an outstanding team of colleagues and collaborators, many papers together over the years. What we did

共同研究者からなる素晴らしいチームがありました。優秀な仲間と各国の共同研究者に感謝しています。

ところで、違っているのはイオン透過だけではありません。これらの美しいタンパク質の構造を原子レベルで理解することで、さまざまな形のフォトンスパイクロジック (photon-spike logic) と呼ばれるものを作り出すことができました (Fig. 11)。先ほど述べたように、高速であり双安定な動作モードが得られ、抑制だけでなく興奮も双安定にすることができます。安定した方法で細胞の興奮状態を切り替えることができます。しかし、もう少し注目したいのは、この可能性、つまりチャンネルロドプシンが反応する色を変えることです (Fig. 11 B, D, F, G)。ここに赤い光の点滅があります (Fig. 11 D)。この成果が得られたのは2008年からで、赤色光によるスパイク発生は2011年に完成しました。これは、他のすべての研究と同様、長年にわたって多くの論文を共同執筆した優秀な仲間と共同研究者からなる素晴らしいチームの成果でした。私たちが行ったことは、すでに赤色側にシフトしている VChR1 (ボルボックス (*Volvox*) と呼ばれる生物なので V) と呼ばれる天然に存在するチャンネルロドプシンを発見したことでしたが、レチナール結合ポケットの一端にこの変異を追加することによりさらにシフトしたのです。

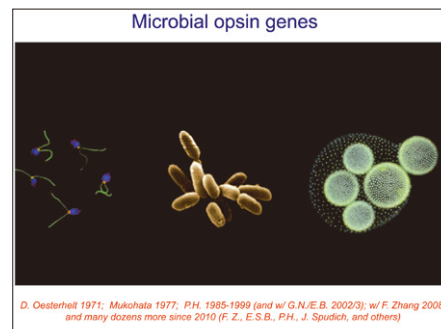


Fig. 12

ボルボックスはこのような姿をしています (Fig. 12)。美しい多細胞緑藻類です。研究室のFengは、2008年にボルボックス遺伝子を特定しました。それがこの研究の出発点となる最初の赤色光駆動性チャンネルロドプシンでした。それ以来、多くの世界中の仲間や共同研究者が、そのような別のオプシンを数多く発見しました。

ボルボックス由来のオプシンは、生きている動物での1細胞の制御に最初の可能性をもたらし、これは大きな前進でした。私たちは、1細胞解像度での制御が可能

was find a naturally occurring channelrhodopsin called (an organism called *Volvox* hence the V) VChR 1, that was already red-shifted, but this additional mutation on one end of the retinal-binding pocket further shifted it.

This is what *Volvox* looks like (Fig. 12). It's a beautiful multicellular green algae. Feng in my lab identified the *Volvox* gene in 2008, and that was the starting point for this work, the first red light-driven channelrhodopsin. Many others, of our colleagues and collaborators around the world, have since found many additional such opsins.

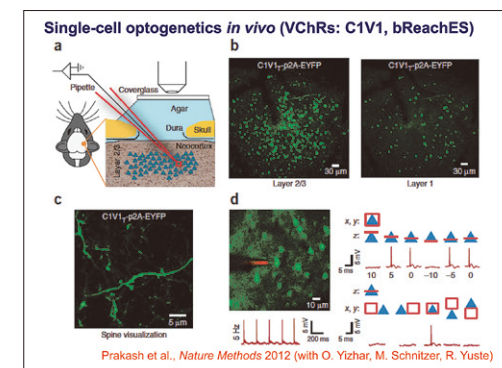


Fig. 13

The *Volvox*-derived opsins gave the first capability for single-cell control in a living animal, and this was a huge step. We think the properties of the channel, and the ability to be activated by certain kinds of light that allow single-cell resolution control, are crucial—and that we achieved in 2012 (Fig. 13). Rohit Prakash in my lab and other colleagues used a *Volvox* derived channelrhodopsin, called C1V1 that was, as we found, uniquely responsive to two-photon illumination. Two-photon microscopy allows single-cell resolution, exchange of optical information with cells even in scattering adult mammalian brain tissue (Fig. 13a).

This allowed this sort of experiment—where we brought in a patch pipette and electrode to record from cells in the surface (superficial layers 2/3 of the mouse brain) of a living mouse—and here is the pipette with a loose-patch recording on the cell. And if we just did raster scanning of our two-photon illumination just above the cell there was no action potential—within the cell there was—and just below the cell it went away (Fig. 13d). So, single-cell in 2012.

Now that was with a relatively low-throughput readout, which is an electrode apposed to the cell. Now an advantage we didn't fully appreciate at the time, has become clear: these red shifted channelrhodopsins allow all-optical exchange of

な特定の種類の光によって活性化されるという、チャンネルの特性と性能が非常に重要であると考えており、2012年に成果が得られました(Fig. 13)。私の研究室にいた Rohit Prakash たちの仲間は、二光子照射に独特の反応を示すことを私たちが発見した C1 V1 と呼ばれるボルボックス由来のチャンネルロドプシンを使用しました。二光子顕微鏡を用いることで、1細胞解像度での観察が可能になり、成体哺乳動物のまばらな脳組織の細胞とでも光学的情報を交換することができます(Fig. 13 a)。

これにより、生きたマウスの体表面(マウスの脳の第2、3層)にある細胞にパッチピペットと電極を刺入して記録するという種類の実験が可能になり、これが細胞上で記録するルーズパッチを備えたピペットです。細胞の上端で二光子照射のラスタ走査を行っても活動電位は発生せず、細胞の内部で行うと発生し、下端で行うと消失しました(Fig. 13 d)。このように、2012年には1細胞解像度での観察が可能となりました。

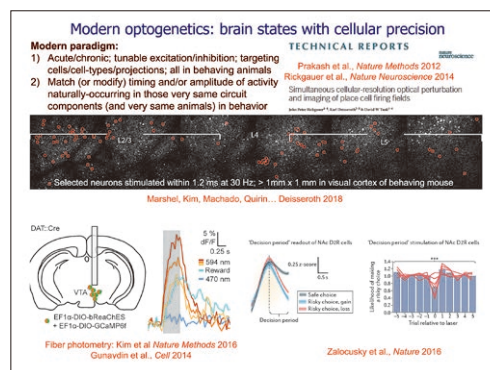


Fig. 14

ここまでは比較的スループットが低い読み出しによるもので、細胞に取り付けた電極を用いていました。今では、私たちが当時、十分に理解していなかった利点が明らかになっています。これらの赤色シフトチャンネルロドプシンにより、組織とのやりとりをすべて光学的な情報に変換することができます(Fig. 14)。活性情報の読み取りが優れたものの中には青色光駆動型も含まれ、その一例が、ここ日本、そしてカナダ(アルバータ大学)やバージニア州(ハワード・ヒューズ医学研究所)で数多くの革新が成し遂げられた GCaMP カルシウムセンサーです。赤色光による情報の送達と青色光による読み出しは非常に強力です。私たちは2014年に David Tank (プリンストン大学) と共同でこの可能性を示しました。今やそれは、実際に実施可能な非常に注目に値する種類の実験です。このように小さな赤い丸で示しているように、行動中に自

information with tissue (Fig. 14). Some of the best readouts of activity information are blue light-driven, for example the GCaMP calcium sensors which many here in Japan have innovated on, as well as in Canada and Virginia. Having red light play-in of information and blue light read-out is very potent; we showed this possibility in 2014 along with David Tank, and now it's actually quite remarkable the sorts of experiments that can be done. We can even play in hundreds of spots of light, as indicated by these little red circles, to cells that we pre-selected by their naturally-occurring activity patterns during behavior. This allows us to truly mimic the naturally-occurring patterns at cellular resolution—of hundreds of neurons across millimeter swaths of the brain, and play in natural patterns of activity, or modify them if we wish, to determine which aspects of those patterns are useful. That's the single-cell resolution aspect.

One can also collect information from an entire population of cells. Like here, the dopamine neurons, deep in the brain. And by having both the *Volvox* opsin to play in red light, and a GCaMP to collect information from blue light excitation, you can do things like match a naturally-occurring pattern. Here a reward is being given to the animal—a water reward to a slightly thirsty mouse triggers a signal in these dopamine neurons, as shown in light blue, and we can now tune our optogenetic signal to match that naturally-occurring pattern in that same animal by adjusting light intensity.

It seems like a simple thing, but to all of the quantitatively minded folks here, you will appreciate the importance of that and of course the speed of the tool is such that you can match the timing as well as the magnitude of the intervention as we showed in these papers in 2016, Christina Kim and Kelly Zalocusky in my lab.

Now, this is a brief summary of where things stand for optogenetics, what you might call modern optogenetics. We can now work on any time scale, acute or chronic, long or short. We can tune excitation, or inhibition. We can target cells (individual cells), or cell types, or connections in behaving animals—and crucially we can match or modify the naturally occurring patterns—as we like—to determine what actually matters for behavior, sensation, cognition and action.

Now, what we are seeing now is an exciting convergence of this work with other domains of biology, other sorts of tools. One thing you might think, as you look at these patterns, you might say, here are cells that are clearly interesting, but I'd like to know more about them. I don't want to stop, just seeing a flashing spot of light. I want to know that cell in more detail. If I see it has a naturally-occurring pattern of interest, and if that's causal in a behavior, I want to know that cell's molecular identity, and I want to know its transcriptome, because that gives deep understanding and great leverage.

然に発生する活動パターンから事前に選択した細胞に向けて、何百もの光点を送ることもできます。これにより、細胞レベルの解像度で、脳にミリメートル幅で広がる何百もの神経細胞で自然発生するパターンを忠実に模倣し、自然な活動パターンに介入し、必要であれば改変して、そうしたパターンのどんな点が有用であるかを決定することができます。それが1細胞解像度の特徴です。

細胞集団全体から情報を収集することもできます。このように、ドーパミンニューロンは脳の深部にあります。ボルボックスのオプシンを用いて赤色光を送り、GCaMPを用いて青色光の励起から情報を収集することで、自然に発生するパターンと一致した反応を引き起こすことができます。ここでは動物に報酬が与えられています。水色で示されているように、のどが少し渴いているマウスへの水の報酬がこれらのドーパミンニューロンのシグナルを引き起こしているのですが、光強度を調整することによって、同じ動物での自然発生パターンと一致するように光遺伝学的シグナルを調整することができます。

ここにいる定量的志向の皆さん以外にとっては簡単なことのように思えるでしょうが、その重要性はわかってもらえることでしょう。そして、私の研究室のChristina KimとKelly Zalocuskyが2016年にこれらの論文で報告したとおり、この手法は反応が早いので、当然のことながら、介入のタイミングと程度を一致させることができます。

これまでの話が、現代の光遺伝学とも呼ばれる、光遺伝学を象徴するものを簡単に要約したものです。今では、急性又は慢性、長期間又は短期間というように、あらゆる時間スケールで研究することができ、興奮や抑制を調整することができます。行動中の動物の細胞(個々の細胞)、細胞の種類または結合を標的にすることができ、極めて重要なこととして、行動、感覚、認識、行為には何が実際に重要なのかを判断するために、好きなように自然発生パターンに一致させたりパターンを改変したりすることができます。

現在検討していることは、この研究と他の生物学の領域、他の種類の手法との興味深い融合です。このようなパターンを見て、こう思われるかもしれません。これらの細胞はもう十分に面白いではないかと。ですが私は、それについてもっと知りたいのです。私は、ただ光の点を見ただけで立ち止まっていたくはありません。その細胞についてもっと詳しく知りたいのです。興味のある自然発生パターンがあり、それが行動の原因であることがわかれば、その細胞の分子的身份、そしてトランスクリプトームについて知りたいです。それにより理解が深まり、大きな影響

One convergence that's happening is a convergence of optogenetics with hydrogel-tissue chemistry (Fig. 15). This is a method that we've developed in my lab beginning in 2013, and now many other labs have worked on and developed beautiful variants of this, reviewed recently here. The essence of this is to take intact tissue, cells and tissue which have many important biomolecules, RNAs and proteins (Fig. 15a)—and to build everywhere within the tissue at once, a scaffold shown by these wavy green lines, a hydrogel matrix.

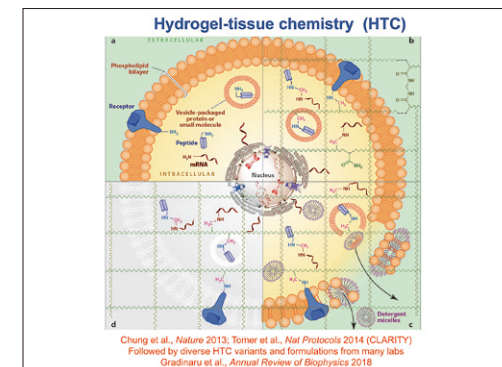


Fig. 15

Then anchor the molecules of interest, the RNAs and the proteins, through interfaces to this scaffold (Fig. 15b). This then allows one to remove lipids, solubilize, digest—remove elements that are not desired or that impede optical access to the tissue (Fig. 15c)—and one ends up with a new sort of construct, a hydrogel-tissue hybrid where you have all the molecules of interest including RNAs that are linked stably to this new coordinate system, re-plotted if you will, onto this new graph (Fig. 15d).

And you can work with this in diverse ways. It's a robust structure, so you can do many rounds of labeling and get rich molecular information with antibodies or nucleic acid probes (Fig. 16). Crucially the native fluorescence is preserved, so the native fluorescent calcium indicators, for example, remain in place—unquenched—and that helps in registering the activity pattern seen during life with the molecular information that's accessible after life.

We have these reversible size changes as things become transparent, as we showed in 2014, that can be useful or not. But crucially as we've shown, in this sort of context one can even do sequencing of the RNA, a deep sequencing of the transcriptome at cellular resolution.

We recently described that this year in a paper from Xiao Wang and Will Allen in

力が生まれるのですから。

融合の一環として行っていることが、光遺伝学とハイドロゲル組織化学の融合です (Fig. 15)。これは私の研究室で2013年から開発している方法であり、現在は他の多くの研究室で研究が行われ、さまざまな美しい改良法が開発され、最近この論文で総説が発表されました。この本質は、インタクトな組織や、多くの重要な生体分子、RNA、タンパク質を保持する細胞や組織を取り出し (Fig. 15 a)、すぐにこの波状の緑色の線で示される骨格、ハイドロゲルマトリックスを組織内の至る所に構築することです。

次に、この骨格を足場として、関心のある分子、RNA、タンパク質を固定します (Fig. 15 b)。こうすることにより、脂質を除去し、可溶化し、分解して、不要な成分や、組織への光学的アクセスを妨げる成分を除去することができ (Fig. 15 c)、最終的に、ハイドロゲルと組織のハイブリッドという今までなかった種類の構成体が得られます。この新たな座標系にRNAなどの関心のあるすべての分子が安定して結合しており、必要であれば新規のグラフ上に再プロットすることもできます (Fig. 15 d)。

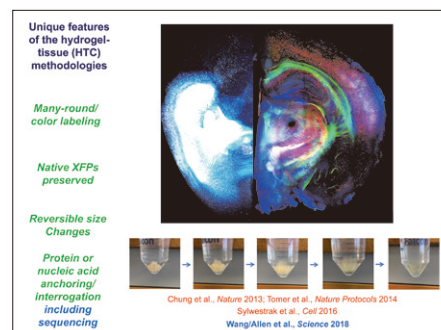


Fig. 16

これを用いてさまざまな方法で研究を行うことができます。頑強な構造なので、抗体や核酸プローブを使って何回も標識を行い、分子に関する情報を豊富に得ることができます (Fig. 16)。重要なことは、固有の蛍光は保存されているので、例えば、固有の蛍光カルシウムインジケーターは消光されずにそのまま残るので、生存中に認められる活性パターンを、死亡後にアクセス可能な分子情報と並べて記録するのに役立ちます。

2014年に報告したとおり、透明性が高くなるにつれてこのように大きさが可逆的に変化し、このことが有用である場合とそうでない場合があります。しかし重要なことは、報告したとおり、このような状況において、細胞解像度で、RNAの、しかも

my lab, it's a new kind of hydrogel-tissue chemistry, but the same basic concept of locking the nucleic acids in place into the scaffold in a stable way (Fig. 17). That allows one to do multi-round optical sequencing, an optical sequencing method that relies on these nano-balls of DNA, these amplicons not moving at all between different rounds (so, an important application of hydrogel-tissue chemistry). And that lets one turn these constellations of spots of light into richly-informed and detailed cell type maps, where you have hundreds or even 1000 or more genes per cell identified in that same tissue, and the goal then being—as we are working on and others—is to take this sort of information and register that together with activity patterns during life—naturally-occurring and causal activity patterns at cellular resolution! Clearly a very exciting opportunity.

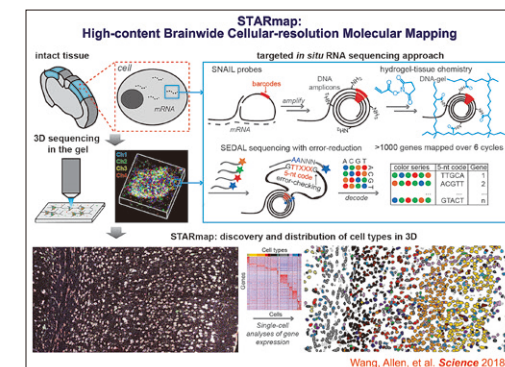


Fig. 17

What I want to spend the second part of my talk on, is very exciting advances in getting to not just information on our little patch of cells, but brain-wide information—playing-in and reading-out information across the entire brain, but maintaining cellular resolution.

The first approach we've taken to do this, is in the larval zebrafish (Fig. 18). This beautiful little vertebrate affords many opportunities because of the small size and transparency of its brain. We have preparations where we've delivered these fluorescent calcium indicators to the nuclei of all of its cells and you can see in this animal all these flashing spots of light are individual cells which we can unequivocally resolve at cellular resolution, across the brain—many tens of thousands of neurons per animal.

This can be during behavior—we have a head-fixed but tail-free preparation. The animal can flick its tail and report to us on what it's trying to do, but because its head is immobilized on agarose, we can use two-photon imaging and collect tens of thousands

トランスクリプトームで詳細に配列決定を行うこともできるということです。

これは、私の研究室にいるXiao WangとWill Allenが今年報告した論文で、新たな種類のハイドロゲル組織化学なのですが、安定した方法で骨格に核酸を固定するという同じ基本概念に基づいたものです(Fig. 17)。それにより、このようなDNAナノボールを利用した光学的配列決定法である、複数ラウンド光学シーケンスの実施が可能になりました。これらの増幅されたDNAは異なるラウンド間で全く動きません(ですので、ハイドロゲル組織化学の重要な応用となります)。そしてそのことが、このような光点の集まりを情報量に富んだ詳細な細胞種マップに変換することを可能にし、同一組織中で1細胞あたり数百から1000以上もの遺伝子が識別されます。目標は、私たちや他のグループが研究しているように、この種の情報を入手し、それを生存中の活性パターン—細胞解像度での自然発生的活性パターン及び因果関係のある活性パターンと共に登録することです！絶好の機会であることは明らかです。

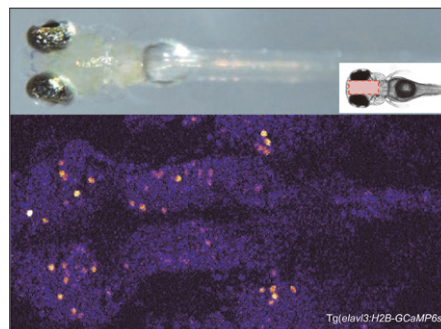


Fig. 18

話の後半で取り上げたいことは、私たちが研究していた小さな細胞パッチの情報にとどまらず、細胞解像度を維持したまま脳全体にわたる情報の送達と読み出しの情報を得るという、心躍る進歩です。

これを行うために最初にとった手法は、ゼブラフィッシュ幼生を用いる方法です(Fig. 18)。この美しい小さな脊椎動物は、サイズが小さく脳が透明であるため、多くの機会を与えてくれます。これらの蛍光カルシウムインジケーターをすべての細胞の核に導入した標本があります。この魚の内部に見られるこれらの点滅する光点がすべて、脳全体にわたって細胞解像度で明確に分解できる個々の細胞で、1匹あたり何万個も存在している神経細胞です。

これは行動中に見ることができます。頭は固定されていますが、尾は自由に動く標

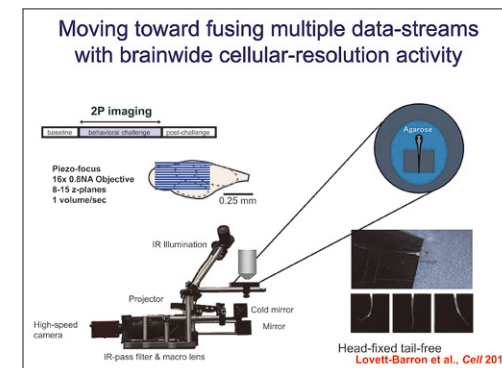


Fig. 19

of neurons across the brain per second, and get a brain-wide representation of activity (Fig. 19).

Now, we have applied this preparation to many questions. What I want to spend a moment on is an application that has some relation to my own clinical interest. I focus on depression in my psychiatry practice, particularly severe and treatment-resistant depression.

Depression is a complex disease. It has many qualities to it, many symptoms which may seem disparate. One unifying theme is a profound hopelessness, which manifests as a passivity, a transition from active coping with challenges, to passive coping—and we can conceptualize this as a discounting of the value of one's own efforts in a situation, of fundamental discounting of the worth of actively addressing a challenge. This is (although of course we don't study depression per se in animals) very straightforward to study, this fundamental basic concept—of the transition from an active coping to a passive coping with a stressor.

We and others use, for example, this very simple and tractable model, a swim test—where a rat or mouse can be put into a cylinder of water (Fig. 20). There is an early active-coping phase where the animal kicks actively to escape. But that transitions to a passive-coping state where it simply floats in the water—and that's there. Here over time you can see that happening before your eyes—very simple and robust. But this is an adaptive, a valuable and reasonable thing you might say, for an animal to do. And it's important for the animal to detect the duration of the stressor, how long it's been going on and the worth or value of its own actions in addressing the stressor. And then transitioning to a passive-coping state can be valuable.

Melissa Warden in my laboratory studied this with optogenetics back in 2012. She

本があります。魚は尾を振り、私たちは魚が何をしようとしているのかがわかりますが、魚の頭はアガロースに固定されているため、二光子撮影法を使用して1秒間に脳全体の何万もの神経細胞の情報を収集し、脳全体での活性について把握することができます(Fig. 19)。

このように、数多くの疑問に対してこの標本を使用してきました。少しお話ししたのは、私自身の臨床的興味に関係する応用についてです。私は精神科の診療でのうつ病、特に重度の治療抵抗性うつ病に注目しています。

うつ病は複雑な病気です。さまざまな性質があり、バラバラにも見える多くの症状があります。統一的な特徴の一つは、困難に対する能動的対処から受動的対処への移行という、消極性として現れる深刻な絶望です。これは、ある状況下における自分自身の努力の価値の軽視、もしくは積極的に困難に立ち向かう行為の価値の根本的な軽視として概念化することができます。ストレス要因に対する能動的対処から受動的対処への移行というこの根本的な基本概念は(もちろん、動物ではうつ病そのものを研究することはありませんが)、非常に研究に向いています。

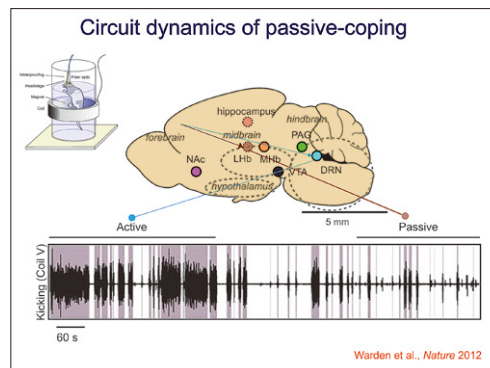


Fig. 20

私たちや他の研究者は、例えば、この非常に単純で扱いやすいモデルである水泳試験を使用します。この試験では、ラットまたはマウスが水の入ったシリンダーに入れます(Fig. 20)。脱出するために動物が積極的に蹴るという初期の能動的対処段階があります。しかし、やがて水に浮かんでいるだけという受動的対処状態に移行します。時間の経過とともにそうした変化が起こるのを目の前で見ることができる、とても簡単で確実な方法です。しかし、この動物の行為は適応的で価値があり合理的であると言えます。また、動物がストレス要因の持続時間、それがどのくらい続いてい

found a projection of neurons from the prefrontal cortex—that controls planning, and movements, and action-plan generation—a projection to the dorsal raphe nucleus that is a source of the most of the serotonin in the brain (Fig. 20). That projection favored the active-coping phase. A different projection from the same spot but to the lateral habenula favored the passive-coping state. Very interesting results, but two very focal spots within the complexity of an entire brain. The opportunity with the fish is we could maybe see the entire brain, and get a complete understanding of this fundamental behavioral state transition.

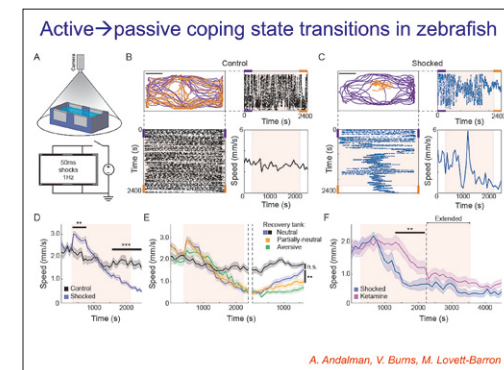


Fig. 21

The first challenge though if you go to the fish is you can't do a swim stress, because they really like swimming! We had to change fundamentally what we were doing. Aaron Andalman and Vanessa Burns, along with Matt Lovett-Barron, in the lab sorted out how to do this. Instead of a swim test, it's a mild intermittent shock that's delivered into the tank (Fig. 21). It doesn't hurt the fish, but it causes an early active-coping response, where they swim around more—and then it transitions to a passive-coping state where they swim around less, as they cannot escape the mild stressor (Fig. 21B).

This—with a lot of validation—we found had the key properties that we required in this test. For example, the animals recovered fully back to control swimming speeds if they were put into a new tank with new water, but not if they were left in the same tank with the same water, as shown in green here (Fig. 21E). So, this was a context-dependent, experience-dependent passivity, and it was slowed and reversed by the human putative anti-depressant ketamine—in other control experiments which I don't have time to go into. So it had the key properties we were interested in.

So, what happens across the brain as this is happening? Well, it's happening right

るか、そしてストレス要因に対処する自身の行動の価値を把握することは重要です。つまり、受動的対処状態に移行することは有益にもなり得るのです。

私の研究室のMelissa Wardenは、2012年にこれを光遺伝学に用いて研究しました。彼女は、計画、行動及び行動計画の作成を制御する前頭前野から、脳内のセロトニンの大部分の供給源である背側縫線核へ至る、神経細胞の投射路を発見しました(Fig. 20)。その投射路は能動的対処段階を促進していました。同じ部位から外側手綱核へ至る別の投射路は、受動的対処状態を促進しました。非常に興味深い結果がいくつか得られましたが、脳全体の複雑さの中で非常に注目すべき2つの箇所がありました。私たちは魚を用いたことで、脳全体を見ることができ、この基本的な行動状態の移行について完全に理解することができました。

魚を用いる場合、最初に問題となることは、泳ぐストレスというものを与えられないということです。魚は本当に泳ぐのが好きですから！自分たちが行っていたことを根本的に変える必要がありました。研究室のAaron AndalmanとVanessa BurnsがMatt Lovett-Barronと共に、その方法を編み出しました。その方法とは、水泳試験の代わりに、水槽に軽度の断続的な電気ショックを与えることです(Fig. 21)。魚を傷つけることはありませんが、より激しく泳ぎ回る初期の能動的対処行動を引き起こします。そして、魚は軽度のストレス要因から逃れることができないため、その後あまり泳ぎ回らない受動的対処状態に移行します(Fig. 21 B)。

多くの検証を経て、この試験には必要とされる重要な特性が備わっていることがわかりました。例えば、新しい水を入れた新たな水槽に魚を入れた場合は、対照の水泳速度まで完全に戻りましたが、同じ水が入った同じ水槽のままの場合は、ここに緑色で示されているように、完全には戻りませんでした(Fig. 21 E)。ですから、これは状況依存的、経験依存的な受動性であり、ご紹介する時間はありませんが、他の対照実験で、ヒトの抗うつ薬とされるケタミンによって遅くなったり回復したりしました。このように、興味深い重要な特性がありました。

さて、このようなことが起こっている間、脳では何が起きているのでしょうか？それは今まさに、ご覧いただいているこの魚で起こっています。前にもご覧いただいた映像ですが、バイアスはなく、すべてを見ることができます(Fig. 18)。これら2つの外側領域を見れば、そこに活性が蓄積していくのが見え始めます。

動画はしばらくすると再び最初に戻りますが、このパターンがどれほど鮮烈であるかがわかります。この構造は何でしょう？これは魚の外側手綱核の相同領域です。で

before your eyes to this fish. And again this is unbiased, we can see everything (Fig. 18). If you look at these two regions, these two lateral regions, you might start to see activity accumulating in those two lateral structures.

The movie will loop around to the beginning again in a moment, but just reflect on how striking this pattern is. What is this structure? This is the fish homolog of the lateral habenula. So, this was an amazing observation for us. It's looped around to begin again. So, you can see how distinct that pattern is from the initial pattern.

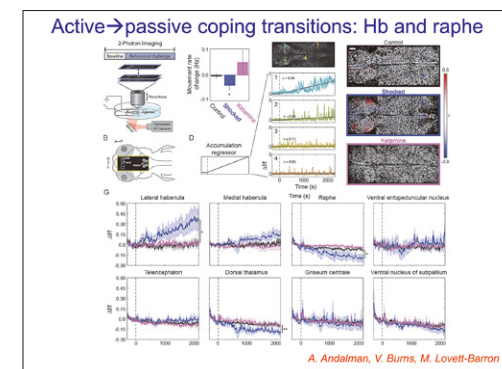


Fig. 22

This is how it progresses over time (Fig. 22). It steadily increases. We saw the opposite direction effect in the raphe, a decrease!—and so that also corresponded to those two spots we've looked at in the rodent. So, very much interesting in terms of validating this approach. Both of those effects were blocked with ketamine, as shown in magenta.

Now even more interesting, was what we got from our cellular resolution in this experiment (Fig. 23). It's not as if all the cells ramp up together. In fact some individual cells do nothing at all for much of the stressor, and then turn on after several minutes. Others start earlier. Others start almost right away (Fig. 23B). So, we were very interested in this. Are there some cells that report that the stress has been going on for a short time, and then another population that describes a longer time?

But that's not the case (Fig. 24). In fact, it's more of a completely smooth temporal-tiling of the duration of the stressor. The habenula encodes and represents this crucial statistic of the stressor—crucial for guiding the behavioral state transition. This statistic is represented by steady recruitment of individual habenula neurons into the active ensemble. That's not seen in the raphe; it's something that habenula is doing specifically—fascinating!

すので、この観察結果は驚くべきものでした。繰り返し再生するようになっていますので、そのパターンが初期のパターンとどれほど違うのかがわかります。

これは、時間経過とともにどのように進行するかを示したものです(Fig. 22)。着実に増加しています。縫線核では反対方向の作用、つまり減少が見られました！つまり、げっ歯類で見られた2カ所にも対応しているのです。ですので、この手法を検証するという点で非常に興味深いものです。マゼンタ色に示したとおり、これらの作用はいずれもケタミンで阻害されました。

さらに興味深いのは、今回の実験において細胞解像度での観察から得られた結果です(Fig. 23)。すべての細胞で一斉に増加するようなことはありません。実際、個々の細胞の中には、ストレス要因の大部分に対して何も反応せず、数分後にスイッチが入るものもあります。もっと早く始まる細胞もあれば、ほとんどすぐ始まる細胞もあります(Fig. 23 B)。それで、このことに非常に興味を持ちました。ストレスが短期間継続していることを知らせる細胞があり、その後でより長期間継続していることを知らせる別の細胞集団があるのでしょうか？

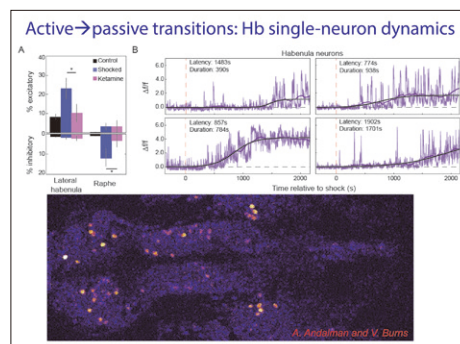


Fig. 23

実は、そうではありません(Fig. 24)。実際には、それはむしろストレス要因の持続時間に対応した完全に滑らかな時間依存的現象です。手綱核は、ストレス要因の持続時間という、行動状態の移行を左右する重要な統計量を、記号化して提示しているのです。この統計量は、個々の手綱核神経細胞が活性化アンサンブルに着実に加わることで意味を成すものです。それは縫線核では見られません。手綱核で特に見られることで、興味深い現象です！

しかし、この時点では単に観察に基づくものです。つまり、まだこの件に関する光遺伝学をお見せしていません。自然発生パターンは非常に興味深いものです。し

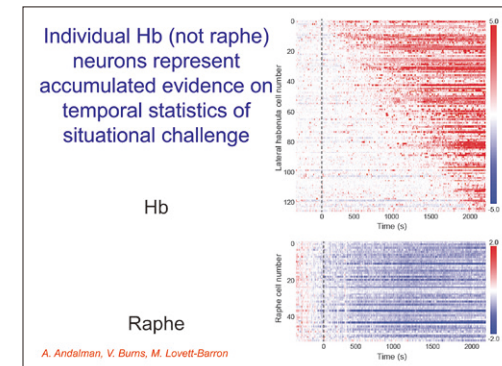


Fig. 24

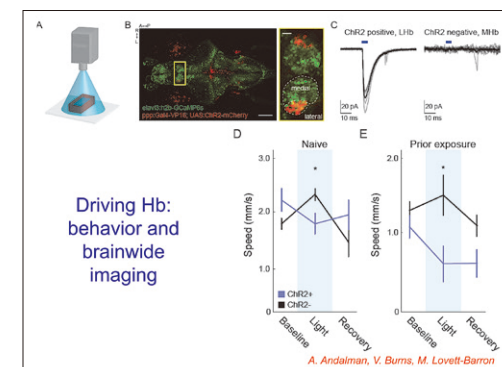


Fig. 25

But at this point, purely observational. So, I haven't shown you any optogenetics with this yet. So, naturally-occurring patterns, very interesting—but do they matter? And this has been the fundamental question in systems neuroscience. So, what we do then is bring in optogenetics (Fig. 25). And we can deliver channelrhodopsin here using a fish line from Okamoto's group (generously provided) targeting channelrhodopsin to these lateral habenula-homologous structures, ventral habenula in the fish. We showed with a flash of light that we could get excitatory currents in these fish neurons, as expected, and then we could ask what happens to behavior.

The fish that have no channelrhodopsin, as shown in black, do respond to light—you can see natural behavioral response to blue light (Fig. 25D). They swim around a little more, and that reverses. So, that's just a light response in the fish. But the fish that had channelrhodopsin in their lateral habenula-homologous structure show instead a slight decrease, that's reversible. That's a small effect, but that's in naïve fish that had

かし、それらは重要でしょうか？そしてこのことはシステム神経科学における根本的な問題です。そこで次に私たちが行っていることは、光遺伝学を取り入れることです(Fig. 25)。このように岡本仁(理化学研究所提供)の魚類系統を用いて、ゼブラフィッシュの腹側手綱核であるこれらの外側手綱核相同構造を標的として、チャンネルロドプシンを導入することができます。予想通り、これらの魚の神経細胞に興奮性電流が流れていることが光で示され、どのような行動が見られるかを検討することができました。

黒で示されているように、チャンネルロドプシンを持たない魚は光に反応します。青い光に対する自然な行動反応が見られます(Fig. 25 D)。少し激しく泳ぎ回ってから元に戻ります。ですので、それは魚における軽い反応にすぎません。しかし、その外側手綱核相同構造にチャンネルロドプシンを有する魚はそうではなく、泳ぐ速度がわずかに減少しており、それは可逆的です。小さな作用ですが、それはストレス要因にさらされていなかった未処理の魚に認められます。避けられないストレス要因にさらされた魚は—ここでもまた、チャンネルロドプシンのない魚には軽い反応が見られたにすぎませんでしたが—チャンネルロドプシンがある場合では、深く持続的な受動性が認められます(Fig. 25 E)。このように、経験依存的な手綱核の活性は、この受動的な行動状態への移行の原因となります。

…ここまで、手綱核の興奮についてでした。

それでは、手綱核の抑制についてはどうでしょうか？もちろんこれらの自然発生パターンについて、必要性和十分性の試験をしたいと考えています。これは、抑制的な光遺伝学的手法を用いて手綱核の活性を抑制またはサイレンシングしたものです。これが泳いでいる魚で、このピンク色はストレス要因にさらされている期間です(Fig. 26)。魚が激しく泳ぎ回っている能動的対処段階があり、その後ストレス要因期間が終了しても持続している受動的状态に移行しています。そしてこの黄色い光は手綱核の光遺伝学的手法によるサイレンシングを示しており、能動的対処段階—本来可逆的なのですが—に戻っていることがわかります。この動画にそのパターンが示されています。ここに小さな魚がいます。このように小さな点に見え、隅で震えています。この段階では、ちょっとした動きが見られますが、黄色の光を照射するまでは、この能動的対処段階に戻ってくることはありません。

自然発生パターンについて分かったとしても、そこに留まる必要はありません。必要性和十分性について確認し、生理機能や行動にとって実際に何が重要かを確定する

not been exposed to the stressor. Fish that had been through the inescapable stressor—again, with no channelrhodopsin just the light response—but with channelrhodopsin there is a profound and lasting passivity (Fig. 25E). So, experience-dependent habenula activity is causal in this passive behavioral state transition.

...That's excitation of the habenula.

What about inhibition of the habenula? We like to test, of course necessity, and sufficiency as well, for these naturally-occurring patterns, and here is a suppression or silencing of habenula activity using an inhibitory optogenetic tool. Here is a fish swimming and in pink here is the duration of the stressor (Fig. 26). You can see the active-coping phase as the fish swims around more, then transitioning to the passive state which is outlasting the end of the stressor. And here the yellow light indicates optogenetic silencing of the habenula, and you can see a reversion back to the active coping state—that in itself is reversible as well. This movie demonstrates that pattern. This is a little fish here, represented as this little dot, quivering in the corner. It's in this phase right here you will see some little zips around, but it's not until the yellow light comes on that you see this active coping phase return.

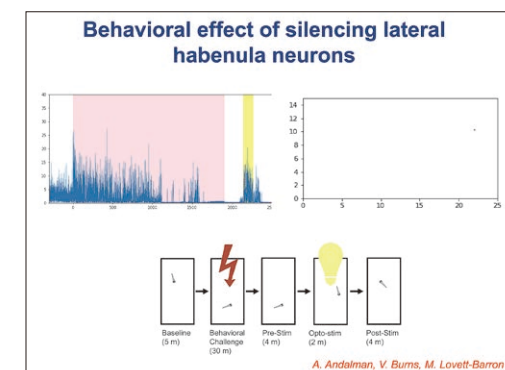


Fig. 26

We have a naturally-occurring pattern, but we don't have to stop there. We can see the necessity and sufficiency—and determine what actually matters, for physiology or behavior. Now of course this is just the beginning.

These datasets are really remarkable; this is the sort of opportunity we have (Fig. 27). You can see this is a little movie of the fish—you can see the little tail flicks here. This is what the raw data look like—these are all the computationally-segmented individual cells (red showing more activity, blue showing less activity). Each little white spot is a cell—these are enormous datasets. The signal that we see in the habenula,

ことができます。もちろん、これは今始まったばかりです。

こちらのデータセットは本当に優れたもので、私たちにとってチャンスとなり得るものです (Fig. 27)。これは魚の短い動画で、小さく尾を振っているのがここに見えます。生データはこのように見えます。これらはすべてコンピュータによりセグメント化された個々の細胞です (活性が高い箇所は赤、活性が低い箇所は青で示されています)。小さな白い点はそれぞれ細胞です。これらは膨大なデータセットです。手網核で認められるシグナルはここに見えます。ここでは小さく尾を振っているのが見え、そしてこのように半分すぎた頃に魚は受動的になります。この時点で、ちょうどこのあたりで尾を振ることはなくなりますが、それが、この外側手網核の活性パターンが現れ始めたときです。これは驚くべきことですが、このデータセットの複雑さを考えてみてください。何万もの個々の神経細胞の時系列データがあります。データに関しては取り損なったものはありませんが、これらのプロセスに対する計算上及び動力学的な洞察に関しては多くのことを見逃しています。しかし今では、脳全体のデータと言えるものがあり、長い間夢見てきた、アンサンブルやパターンが重要であるかどうかの試験を行うことができます。

最後に、これは非常に面白いことなのですが、皆さんにお話したいことは、マウスを用いて脳全体を記録するという試みです (Fig. 28)。哺乳類の脳では光散乱が大きいためゼブラフィッシュでは可能であった光学的手法をとることができませんが、私たちはNeuropixelプローブと呼ばれるシャंकの長い記録電極を使用しており、そのプローブには別々のマウスにこれらの電極を設置するための多数の記録部位とさまざまな軌跡取得装置が備わっています。動物全体でのデータの統合が可能な行動タスクを用いて、さまざまな軌跡取得装置により脳全体の高速な記録を効果的に行うこ

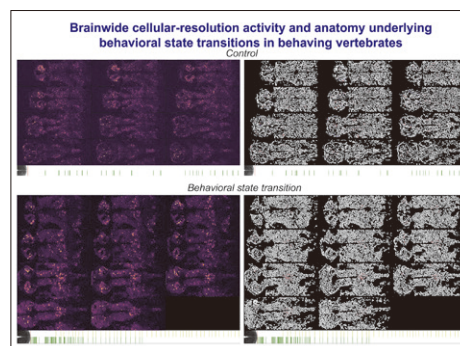


Fig. 27

you'll see here. Here is a little tail flick, and here the fish is going to go into passivity about halfway through. Right as we get to this point, the tail flicks will stop, right about here—and that's when you start to see this lateral habenula activity pattern appearing. This leaps out to us, but think of the complexity of this dataset. We have time series for many tens of thousands of individual neurons—we're missing nothing in terms of data but a great deal in terms of computational and dynamical insight into these processes. But now we have the sort of brain-wide data, and the ability to test if ensembles or patterns matter, that we have long dreamed of.

The last opportunity, that's very exciting, that I want to share with you, is our attempt to do brain-wide recording in mice (Fig. 28). Although the mammalian brain is too light-scattering to allow an optical strategy that the zebrafish allow, we are using these long-shank recording electrodes called Neuropixels probes, with many recording sites and many different trajectories, for placement of these electrodes in different mice. We can effectively do high-speed recording across the brain with different trajectories, using behavioral tasks that allow us to integrate data across animals. One electrode per animal, different trajectories in different animals, and linking the datasets together.

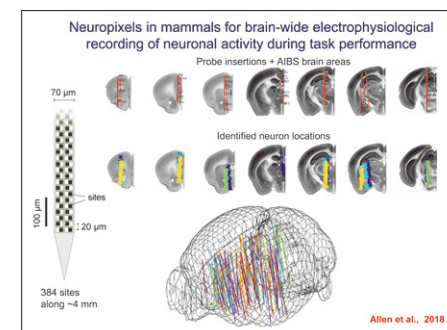


Fig. 28

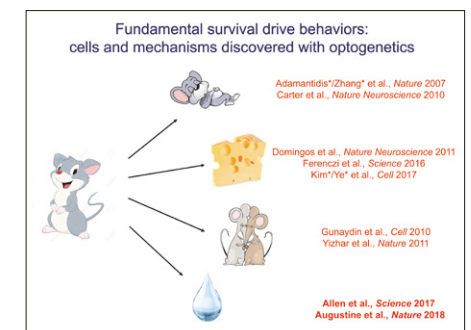


Fig. 29

We have done in the past a number of different types of experiments on motivated behaviors, survival-drive behaviors (Fig. 29). We have looked at sleep, we have looked at feeding behavior, social behavior... but what I would like to focus on for this question is thirst. Thirst is a powerful and obviously fundamentally important to survival drive.

We have been studying the cells, which represent (in their activity) thirst, and that cause and control thirst-related behaviors—like seeking water, and drinking.

Together with Will Allen, a graduate student in my lab—and colleagues including Liqun Luo at Stanford—we developed a way to deliver this inhibitory channelrhodopsin that I mentioned (iC++, this is the one that we had designed based on our crystal

とができます。1匹あたり1つの電極、動物ごとに別の軌跡取得装置を用いてデータセットを一つにまとめます。

これまで動機付け行動、生存に必要な行動に関してさまざまな種類の実験を数多く行ってきました。睡眠を観察し、摂食行動、社会的行動を観察しました(Fig. 30)。しかし、この問題のために注目したいのはのどの渇きです。のどの渇きは強力であり、生存に必要な行動を取るのに本質的に重要であることは明らかです。

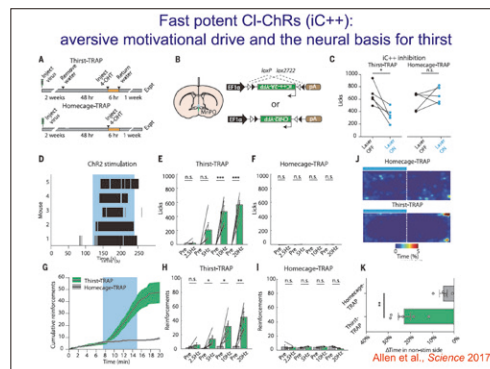


Fig. 30

私たちは(活性において)のどの渇きを示す細胞を研究してきました。そしてそれは水を求めたり飲んだりするのどの渇きに関連する行動を引き起こし制御します。

私の研究室の大学院生であるWill、スタンフォード大学のLiquan Luoらの仲間と共に、これまでに述べたこの抑制性チャンネルロドプシンを導入する方法を開発しました(iC++、これはチャンネルロドプシンの結晶構造の理解に基づいて設計したものであり、その構造に基づいて初めて陽イオン伝導を陰イオン伝導に変換し、抑制的な光遺伝学的手法を構築することができました)。

それまで動物ののどが渇いていたときに強く活性化していた細胞に対してのみ、遺伝的手法を用いてiC++を導入しました(Fig. 30 A及びB)。これはTRAPと呼ばれる手法であり、この論文で報告されています。こう言えばもう十分お分かりでしょうが、iC++はそれまでのエピソードでのどが渇いていた期間に強く活性化していた細胞、特にこの深部構造、正中視索前核(MnPO)、視床下部複合体の内部及びその周辺において発現しており、これらの細胞はのどの渇きに関与していると仮定した細胞でした。

のどの渇きに関する神経細胞を抑制するとどうなるでしょう？驚くべき結果になり

structure understanding of channelrhodopsin, and we were able to use our structure to convert that initial cation-conduction to anion-conduction and create an inhibitory optogenetic tool).

We delivered iC++ using a genetic trick, just to those cells that had been strongly active when the animal had been thirsty before (Fig. 30A, B). This is a strategy called TRAP; it's described here in this paper. Suffice it to say now, iC++ is expressed in the cells that were strongly active during thirst in a prior episode— and particularly in this deep structure, in the MnPO in and around the hypothalamic complex, these cells are the cells that we hypothesized were involved in thirst.

What happens when you suppress the thirst neurons? Well, it's quite striking! You can have an animal that's quite thirsty and it's licking—drinking for water—hundreds of times in the epoch... and you powerfully suppress, when you turn on the light, that seeking-of-water in a thirsty animal (Fig. 30D-K). A very powerful effect, and that's seen by targeting those thirst neurons, deep in the brain. That's silencing—but you can also do the opposite, you can drive, excite, those thirst neurons. You can have non-thirsty animals—here are five separate animals that are not drinking—you can turn them into voracious consumers of water instantaneously and reversibly by exciting these thirst neurons. And it's not just water seeking behavior. In other experiments, we showed that this was an aversive state, as we know thirst to be (we don't like being thirsty). So, it wasn't just water acquisition, it was capturing many features of a thirsty state.

Now, having this handle on the cells that control the thirsty state, that represented thirst, we then wanted to see if we could get a brain-wide cellular resolution understanding of the thirsty state—what it really is, to be thirsty.

To compare different animals with different Neuropixels probe trajectories and to leverage the speed of optogenetics, we needed a fast behavioral task—so we set up a what's called a go/no-go task, where you have mice that are trained to know that one odor predicts there will be water available at a little spout, and they will get water (Fig. 31). Another odor called the no-go odor predicts there will not be water coming. The mice learn this behavior very quickly. These three lines here (and you will see these three lines again and again) this is the onset and offset of the odor and then the onset of the reward (if it happens): 0, 1 and 2 seconds. Very robust behavior: here the mice are licking to the go cue until they become satiated for water, and then they stop licking even for the go cue. But even when they are thirsty, very little licking for the no-go cue. So, very good performance on this very temporally precise task.

Okay, now what is the brain-wide representation of the thirsty state? Are there just

ました！非常にのどが渇いている動物を用意します。何百回も水を飲むために舐めています。そして光を照射すると、のどが渇いている動物の水を求める行動が強力に抑制されます(Fig. 30 D-K)。非常に強力な作用であり、それは、脳の深部にあるこれらののどの渇きに関する神経細胞を標的とすることにより認められます。それがサイレンシングですが、逆を行うこともできます。それらののどの渇きに関する神経細胞を亢進させ、興奮させることができます。のどが渇いていない動物を用意します。これが飲んでいない別々の5匹です。これらののどの渇きに関する神経細胞を興奮させることによって、瞬時にそして可逆的にこれら5匹を、水を飲むことに貪欲な動物に変えることができます。そしてそれは単に水を求める行動ではありません。他の実験で、これは嫌悪状態であることを示しました。私たちが、のどが渇いたときに感じるのと同じようにです(のどが渇いているのは嫌ですよ)。ですので、単なる水を得る行動ではなく、のどが渇いた状態で見られる多くの特徴が捉えられていました。

このように、のどの渇きの状態を制御する細胞を操り、のどの渇きを実現することができましたので、次に、のどの渇きの状態を脳全体にわたり細胞解像度で解明できるかどうかを確かめたいと思いました。のどが渇くとは、実はどういうことなのかを。

異なるNeuropixelsプローブ軌跡取得装置を付けたさまざまな動物を比較し、光遺伝学のスPEEDを活用するには、簡便な行動課題が必要でした。そこで、ゴー・ノーゴー(go/no-go)課題と呼ばれるものを用意しました。マウスを訓練して、ある匂いがするときには小さな吐水口に水があって飲むことができると教えてやります(Fig. 31)。ノーゴーの匂いと呼ばれる別の匂いがするときは、水を得ることができません。マウスはこの行動を非常に素早く学習します。ここに3本の線があり(何度もこれら3本の線を見るでしょう)、これは匂いの始まりと終わり、その後の(あるとすれば)報酬の始まりです。0、1、2秒です。マウスは非常に安定した行動を取り、ここではゴーの合図に対して十分に満足するまで水を舐め、その後は、ゴーの合図が出てても舐めようとしなくなります。また、のどが渇いていたとしても、ノーゴーの合図で舐めることはほとんどありません。このように、時間的な正確さが必要なこの課題において、大変優れたパフォーマンスを示します。

さて、のどが渇いている状態は脳全体ではどのように示されているのでしょうか？視床下部にほんの数個の神経細胞があるのでしょうか、それとも舐めることを制御する運動領域があるのでしょうか。のどが渇いた状態とは一体どういうものなのでしょうか？非常に驚いたことに、それには基本的に脳全体、そして脳内の神経細胞のほとん

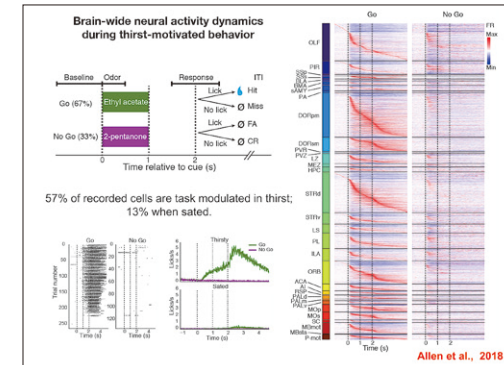


Fig. 31

a few neurons in the hypothalamus or maybe with some motor areas controlling licking? What really is the thirsty state? The big surprise was that it's essentially the entire brain, and most of the neurons in the brain. So, contrary to what you might have heard, it's not that half or 10% of the neurons are involved—in even a simple behavioral state, like seeking water when thirsty. The entire brain, virtually the entire brain is mobilized. All these are different regions, color coded across the brain. Each little horizontal very, very thin line is recording from an individual neuron. We have many tens of thousands of neurons. Red is more active, blue is less active, and here are these three lines: 1, 2, 3 corresponding to these three points here—and you can see this brain-wide representation of this acquisition of water when thirsty, that's seen with the go cue, not with the no-go cue. So, it's a very specific state in the animal.

Now, look at the complexity of this, and the fact that not only all these regions, but more than half of all recorded cells across the brain are modulated by this thirst behavior. We then asked the seemingly almost impossible question, what happens when we drive optogenetically just this tiny population of thirst neurons, the input to those thirst neurons, deep in the brain? Do we cause anything like that naturally-occurring state? So, we thought we should test that... and we did.

The behavior as you will know by now is here (Fig. 32). The animals lick for water until they are sated. We can optogenetically stimulate the input to the thirst neurons and trigger active seeking—but still cue-elicited seeking—of water in these sated animals that are no longer deficient in water. What is the brain-wide state that's recruited? And stunningly this is the thirsty brain-wide state... This is the sated state, very different and then this is the sated but optogenetically stimulated state and it's nearly identical to the naturally-occurring thirst state, and it's very complex temporal complexity of the brain-

どが関与していました。ですので、皆さんの考えとは反対かもしれませんが、のどが渇いているときに水を求めるような単純な行動状態でさえ、神経細胞の半分か10 % が関与しているわけではないのです。実際には脳全体が関与しています。これらはすべて異なる領域で、脳全体で色分けが行われました。それぞれの水平方向の非常に細かい線が個々の神経細胞から記録されたものです。何万もの神経細胞があります。赤は活性が高く、青は活性が低いことを示し、ここにこれら3本の線があり、これら3つの時点に対応する1、2、3の線です。のどが渇いている場合、この水の獲得はこのように脳全体にわたって示されているのがわかります。それはゴーの合図では認められますが、ノーゴーの合図では認められません。ですので、動物において非常に特殊な状態です。

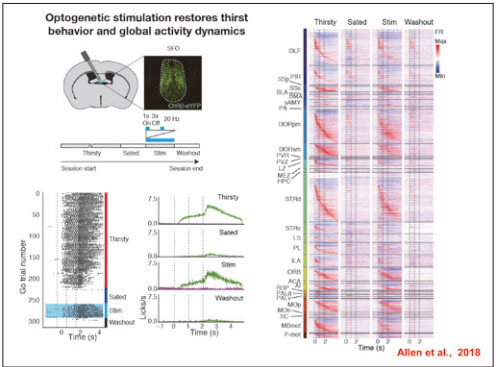


Fig. 32

さて、この複雑さ、そしてこれらすべての領域だけでなく、脳全体で記録された細胞の半分以上がこの渇きの行動によって変化しているという事実に注目してください。それから、私たちは答えがないように思われる問いかけをしました。のどの渇きに関する神経細胞のほんの一部の集団、脳の深部にあるこれらののどの渇きに関する神経細胞を光遺伝学的に亢進させるとどうなるのでしょうか？ あのような自然発生的な状態に似た状態になるのでしょうか？ 私たちはそれを試験する必要があると考え、実際に行いました。

これまでわかっている行動がここに示されています (Fig. 32)。動物は満足するまで水を舐めます。のどの渇きに関する神経細胞への入力を光遺伝学的手法により刺激し、水が不足していない満足したこれらの動物に積極的に、ただし、合図を使って水を求めさせることができます。刺激されている脳全体の状態はどのようなもので

wide dynamics. Clear and brain-wide manifestation and cellular resolution of this thirst state is recapitulated, and then that once you turn off the optogenetic stimulus, that reverses. So, this shows that if you target correctly that optogenetics gives you the power to recruit brain-wide states of incredible complexity and beauty.

I think it's also further remarkable just to consider again that our ability to address these questions, these fundamental questions of what it means to be in a behavioral state, to act in a particular way, our ability to ask and answer these questions—has become rooted in the atomic level understanding of these elegant single proteins, the channelrhodopsins (Fig. 6).

Now, I am often asked about clinical applications of optogenetics. This is not something that my lab works on, but we think about it all the time... and what we're seeing is, I think, a paradigm which is that optogenetics-guided clinical trials are already starting, and are showing success. And this does not mean—as it never has to mean—putting algal genes and fiber optics into the brains of people. That's not necessary—understanding is what's necessary, and causal understanding is what is necessary.

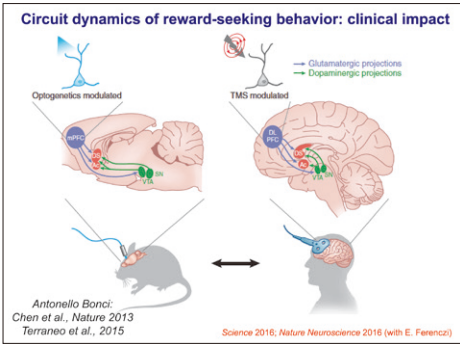


Fig. 33

An example of this: Antonello Bonci's group has made this very clear, with some beautiful work in 2013 (Fig. 33). They were looking at cocaine addiction in rats, and they found that they could powerfully suppress cocaine-seeking behavior and cocaine consumption even in the most severely cocaine addicted rats, with an optogenetic stimulus of the medial prefrontal cortex. And this was such a powerful effect, that it immediately went to a clinical trial using an existing intervention, a non-invasive transcranial magnetic stimulation intervention. This is something that can be done in awake, alert patients—but if you don't have causal understanding of where to target, it's almost impossible to use. It creates a tiny little patch of excitation, centimeter scale—but

しょうか？驚くべきことですが、脳全体がのどの渇きの状態になります。これは満足した状態でかなり異なっています。それからこれが満足しているけれども光遺伝学的手法により刺激された状態で、自然発生的なのどの渇きの状態とほぼ同じであり、非常に複雑な脳全体の経時的な動態が認められます。こののどの渇きの状態の明確かつ脳全体にわたる発現が細胞解像度レベルで再現されており、光遺伝学的手法による刺激を止めると、元に戻ります。ですので、このことは、適切に標的を設定すれば、光遺伝学的手法には非常に複雑で美しい脳全体の状態を再現する能力があることを示しています。

これらの疑問、つまり行動状態にあり、特定の方法で活動することが何を意味するのかというこれらの基本的な疑問に取り組むことができるのは、このようなエレガントな単一タンパク質であるチャネルロドプシンを原子レベルで理解したことから始まっていることを思い出していただくと嬉しく思います(Fig. 6)。

ところで、私はよく光遺伝学の臨床応用について尋ねられます。これは私の研究室が取り組むものではありませんが、私たちは常にそれについて考えています。そして私たちが注目しているのは、光遺伝学的手法を用いた臨床試験はすでに始まっていて成功を示しているというパラダイムです。そしてこれは決して藻類の遺伝子と光ファイバーを人間の脳に入れることを意味するものではありません。そうする必要はありません。理解することが必要なものであり、因果関係の理解が必要なのです。

このことの例を挙げましょう。NIHのAntonello Bonciのグループはこのことを極めて明確に示した例で、2013年に素晴らしい成果を発表しました(Fig. 33)。ラットのコカイン中毒について研究していたところ、内側前頭前皮質を光遺伝学的手法で刺激することにより、コカイン探索行動やコカインの摂取が強力に抑制されることを確認しました。そしてこれは非常に強力な作用であったため、既存の介入、すなわち非侵襲的経頭蓋磁気刺激介入を用いた臨床試験に直ちに進みました。これは覚醒時の警戒している患者さんに行うことができます。しかし、どこを標的にするべきかについての因果関係の理解がなければ、使用するのはほとんど不可能です。センチメートル規模の興奮用の小さなパッチを作成しますが、人間の脳には対象となる場所が多くあり、因果関係に関する知識を持っていなければ、このような方法を用いて成功する可能性のある臨床試験をデザインすることができません。

しかし、彼らはこの因果関係に関する知識を備え、コカイン中毒者—試験群と対照群—を対象として試験を行い、これらのコカイン中毒者においてコカイン探索行

there is a lot of real estate to cover in the human brain, and unless you are armed with causal knowledge, you'll never be able to design a clinical trial using a method like this with any chance of succeeding.

But armed with this causal knowledge, they did a study in cocaine-addicted human beings—an experimental group and a control group—and they found a powerful suppression of cocaine-seeking behavior and cocaine consumption, in these human beings with cocaine addiction. That was an early pilot study; it's being followed up, and data are looking promising so far. But that's only one example.

The general point being: understanding is what we need, and particularly in psychiatry where we lack—and had lacked for so long—an understanding of the fundamentals. That basic advance and direction, is in my view most important, and that's where optogenetics is most powerful—as a discovery tool.

A final point to reflect on, I think, is not just that the wonder of these elegant proteins—and getting to understanding them at the atomic level—has been so powerful, but I think there is another powerful point here as well, that's operative on the societal level—which is to underscore this point: That the advances that we've been able to make in understanding our own brains as vertebrates, as mammals with drives and conflicts... all of this has been made possible by very basic research, even in botany (Fig. 1)... and I think this is a good, a useful, story for people. If you are pressed for an example of the value of basic science, I think one can find many others but this is a good one—and you can use it, I think, to convey the value of starting small, and encouraging that basic joy, and wonder, of studying simple and beautiful systems for their own sake.

In the last minute, I would just like to express my deep gratitude to the students and post-doctoral fellows, laboratory staff, and wonderful collaborators and colleagues all over the world who have made all this possible. I have the great fortune to be able to work with an amazingly talented and creative group of students and post-doctoral fellows over the years, but also many collaborators and colleagues whose names I have mentioned and others. And as we all know, science is not just a team effort, it's an effort of society, of humanity—and this, I think, is something that is represented fully in the story of optogenetics as well (Fig. 34).

I'll conclude there and thank you very much.

動やコカイン摂取が強力に抑制されることを確認しました。それは初期のパイロット試験であり、追跡調査が行われているところで、データはこれまでのところ有望に見えます。しかし、それはほんの一例です。

全体的に重要な点は、理解することが私たちに必要なものであり、原理についての理解が長年にわたり不十分である精神医学では特にそれが必要であるということです。そのような基礎の進歩と方向性が、私の考えでは最も重要であり、そこでは光遺伝学が発見のための手法として最も強力なものなのです。

最後に考えるべき点は、これらのエレガントなタンパク質の驚異、そして原子レベルでそれらを理解することが非常に強力であったということだけではなく、社会的レベルで有用であるというもう一つの有力な点があるのではないかと思います。それは次のことを際立たせます。脊椎動物として、衝動と葛藤を有する哺乳類として、私たちが自分自身の脳を理解できるようになったという進歩、そのすべてが、植物学も用いて行われた非常に基礎的な研究によって可能になったということです(Fig. 1)。そしてこれは人々にとって役に立つ話だと思います。もし基礎科学の価値についての例を求めているならば、他にも多くの例がありますが、これは良い例になると思います。そして、それを使って小さく始めることの価値を伝え、基礎科学での喜びと驚きに触れ、自分自身のために単純で美しいシステムを学ぶことの素晴らしさを感じさせることができます。

最後に、今日お話したことすべてを可能にしてくれた学生や博士研究員、研究室のスタッフ、そして世界中の素晴らしい共同研究者や仲間たちに深く感謝したいと思います。長年にわたり素晴らしく才能があり創造的な学生や博士研究員のグループ、それだけではなく名前を挙げさせていただいた共同研究者や仲間たち、それ以外の方々と一緒に研究することができるのは素晴らしい幸運です。そして周知の通り、科学は1つのチームだけの成果ではなく、社会、人類の成果であり、これは光遺伝学の話にも完全に当てはまることだと思います(Fig. 34)。

これで話を終わりにさせていただきます。ありがとうございました。

Antoine Adamantidis → McGill

Raag Airan → Stanford

Avishek Adhikari → UCLA

Will Allen

Aaron Andalman

Polina Anikeeva → MIT

Andre Berndt → U. Wash.

Ed Boyden → MIT

Kwanghun Chung → MIT

Inbal Goshen → Hebrew U.

Viviana Gradinaru → Caltech

Lisa Gunaydin → UCSF

Isaac Kauvar

Christina Kim

Sung-Yon Kim → Seoul NU

Yoon Kim

Jin Hyung Lee → Stanford

Matt Lovett-Barron

Talia Lerner → Northwestern

Conor Liston → Cornell

Jim Marshel

Priya Rajasethupathy → Rockefeller

Vikaas Sohal → UCSF

Emily Sylwestrak → Oregon

Raju Tomer → Columbia

Kay Tye → MIT

Xiao Wang

Ilana Witten → Princeton

Melissa Warden → Cornell

Li Ye → Scripps

Ofer Yizhar → Weizmann


Feng Zhang → MIT

Resources

optogenetics.org

clarityresourcecenter.org

Peter Hegemann; H. Kato; R. Dror; B. Kobilka; J. Friedman; O. Nureki; S. Delp; G. Nagel; K. Tanaka; E. Bamberg; A. Kreitzer; B. Roska; E. Nestler; M. Carlen; D. Meletis; T. Harkany; T. Hokfelt; P. Uhlen; S. Tonegawa; L. de Lecea; R. Malenka; A. Bonci; P. Janak; J. Henderson; M. Schnitzer; G. Augustine; J. Huguenard



Charu Ramakrishnan, Cynthia Delacruz, Maisie Lo, Sally Pak, Minsuk Hyun, Chelsey Perry, Joel Finkelstein and Julie Mirzabekov

Funding: HHMI, NIMH, NIDA, NINDS, NSF, Simons, DARPA, Gatsby, Coulter, Wiegers, Snyder, Grosfeld, Woo, Yu, NARSAD/BBRF.

Fig. 34

稲盛財団2018——第34回京都賞と助成金

発行 2019年 8 月31日

制作 公益財団法人 稲盛財団

〒600-8411 京都市下京区烏丸通四条下ル水銀屋町620番地

Tel: 075-353-7272 Fax: 075-353-7270

E-mail press@inamori-f.or.jp URL <https://www.inamori-f.or.jp>

ISBN978-4-900663-34-3 C0000