

用雷射遙控果蠅



巧妙結合光學和遺傳學，神經科學家能以前所未有的準確度，描繪、甚至控制腦內的神經線路。

撰文／麥森伯克（Gero Miesenböck）

翻譯／涂可欣

1937年，英國牛津大學偉大的神經科學家薛林頓（Sir Charles

Scott Sherrington）對腦的運作提出了一段經典的描述。他想像腦內有些光點象徵著神經細胞的活性和細胞間的聯繫，人在熟睡時，整個腦部只有幾處零星散落的光點閃爍，看起來宛如星空；但清醒時，那畫面如同「銀河跳起了某種宇宙之舞，腦部立刻變成魔法織布機，百萬條閃亮的光束來回穿梭，編織著若隱若現的圖案，這些圖案有意義卻無法持久，是一些不斷和諧地轉變著的小圖案。」

薛林頓可能不知道，他詩意的比喻隱藏了一個重要的科學觀念：我們可以透過光來揭露腦部的運作。神經元之間如何互相合作進而產生思想和行為，一直是生物學最大的難題，主要就是因為科學家無法看到完整的神經線路運作。神經學的標準研究方法是利用電極去探測一、兩個神經元的活動，這只能揭露巨大拼圖的一角，我們還缺少太多拼圖片去拼湊出完整的面貌，如果我們能看見神經元間的溝通與聯

繫，或許就能夠推想腦部線路的排列和功能。這個誘人的想法鼓舞著神經科學家去嘗試落實薛林頓的先見。

他們的努力創造了一門新興領域：光學遺傳學（optogenetics），結合遺傳工程學和光學來研究特定細胞類型。研究人員已經成功揭示各種神經元群的功能，甚至只要打開光源，就可以遙控神經元，這些進展讓人對光學遺傳學寄予厚望，或許有朝一日，它能協助神經科學家看清楚腦部的線路，甚至幫助醫生治療特定疾病。

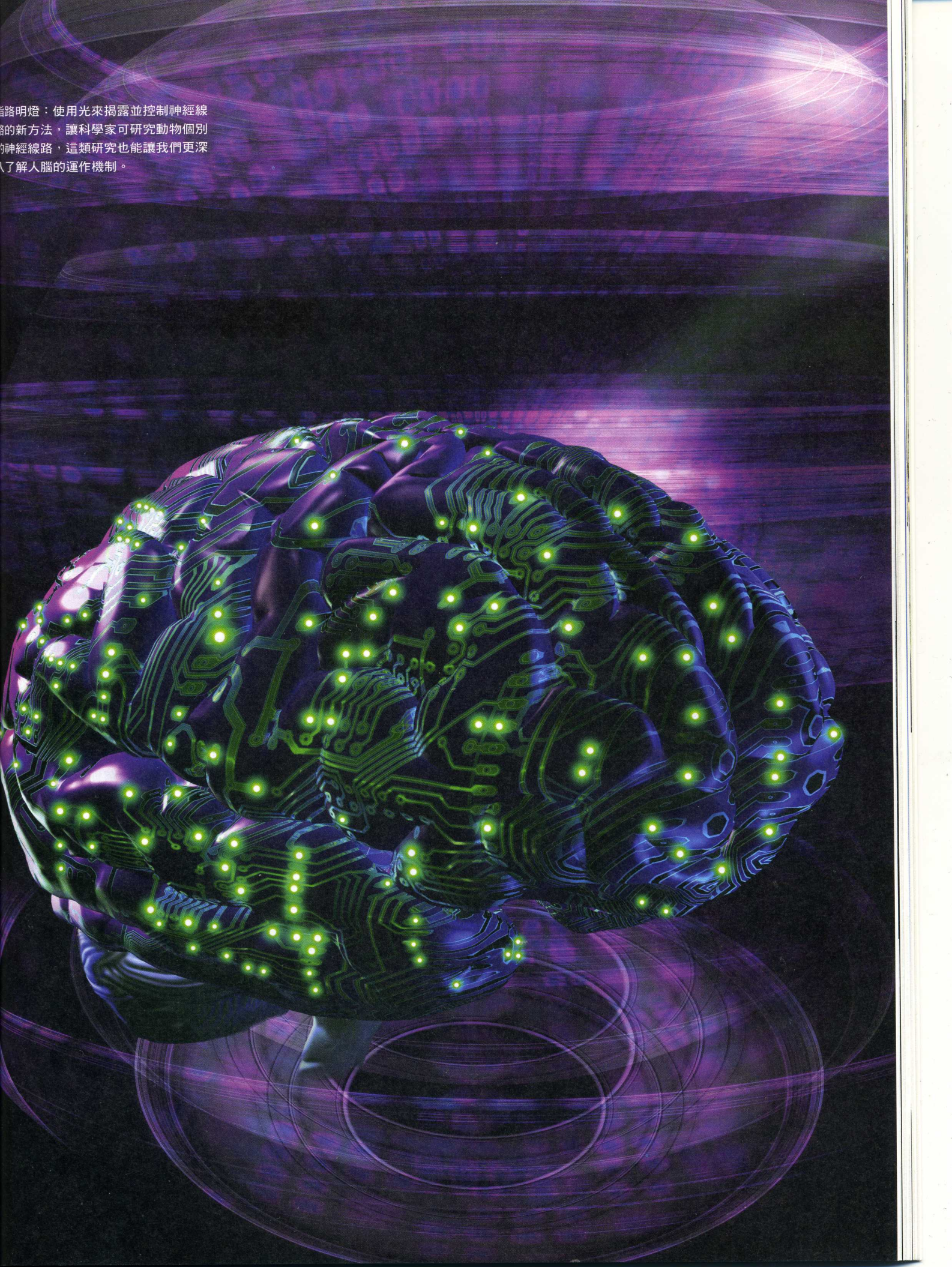
感應神經元電壓的染料

1970年代起，科學家開始認真希望實現薛林頓的想像。神經系統和電腦一樣，都是透過電來運作；神經元以電訊號，或稱動作電位（action potential）來傳遞資訊，這些電脈衝（電壓低於AA電池的1/10）會誘導神經細胞釋放神經傳遞物，能夠活化或抑制線路中相連的細胞。為了看見這些電訊號，美國耶魯大學的柯恩（Lawrence B. Cohen）測試了各式各樣的螢光染料，看它們是否會隨著電壓的增減

重點提要

- 神經科學家研究腦細胞功能的傳統方法，是刺激細胞然後以電極記錄它們的活性，但這種間接的方法很難用來分析特定神經元。
- 遺傳工程和光學結合而成的光學遺傳學，可以觀察並控制一群神經元，讓研究人員能夠詳查個別的神經線路，革新腦功能的研究。

腦路明燈：使用光來揭露並控制神經線
的新方法，讓科學家可研究動物個別
的神經線路，這類研究也能讓我們更深
入了解人腦的運作機制。



而變換顏色或亮度，結果他發現有些染料確實具有感測電壓的光學特性，將這些染料染上神經元後，就可在顯微鏡下觀察細胞的活動。

此外，有些染料能感測特定離子的流動，同樣也可顯示神經細胞的活動。當神經元產生動作電位時，細胞膜上的通道會打開，讓鈣離子流入細胞，湧入的鈣離子會刺激神經傳遞物的釋放。現任教於美國加州大學聖地牙哥分校的錢永健，在1980年開始合成可隨鈣離子濃度變化而增減亮度的螢光染料（請見《科學人》2008年12月號〈照亮細胞的綠色螢光蛋白〉），這些光學標記果然不同凡響，為科學開啟了一扇新的窗子，讓我們能窺見單一神經元和小型神經網絡的資訊處理。

然而合成的染料有嚴重的缺點。舉例來說，神經組織是由許多不同類型的細胞構成，小鼠的腦估計約含有數百種神經元和種類繁多的支持細胞，由於神經資訊處理倚靠的是不同種類神經元間的交互作用，想了解某一神經線路的運作，必須找出並監測線路中的各個成員，同時還要能掌握它們啟動（產生動作電位）和關閉的時機。但合成染料會毫無選擇地將所有細胞染色，因此無法用這些光信號來追蹤特定類型的細胞。

關於作者



麥森伯克是英國牛津大學生理學系的韋恩弗利特講座教授，這正是已故現代神經科學創始者薛林頓從1913年起到1935年退休前擔任的職位。

蛋白質螢光染料登場

光學遺傳學的誕生，是因為科學家了解到操控基因可能是解決染料一視同仁染上所有細胞的關鍵。一個個體的所有細胞都有相同的基因，兩個細胞之所以不同，是因為它們啟動和關閉的基因不同，例如有些神經元活化時會釋放神經傳遞物多巴胺（dopamine），因此這些細胞中製造和包裝多巴胺所需酵素的基因會啟動；在不會製造多巴胺的細胞內，這些基因則關閉。

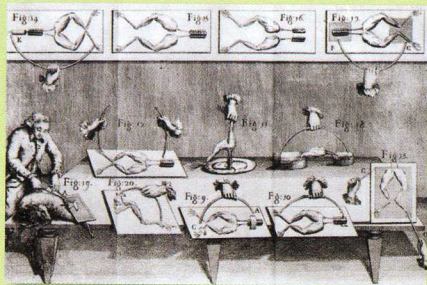
理論上，如果能將染料的基因與多巴胺基因的開關連接在一起，再將這開關-染料基因轉殖到動物體內，動物就只會是多巴胺生成細胞內合成染料。如果研究人員能窺看這些動物的腦部（事實上是可行的），就能在各式各樣的單獨細胞中看見多巴胺生成細胞的功能，還能觀察它們在完整、有生命的腦中如何活動。合成染料沒有這種神奇的表現，它們的製造不會受控於只在特定細胞中開啟的基因開關，唯有當染料是由基因製造的蛋白質時，才有辦法耍這種戲法。

大約13年前，當時錢永健和加州大學柏克萊分校的伊薩克夫（Ehud Y. Isacoff）團隊，以及耶魯大學的羅斯曼（James E. Rothman）和我的團隊，分別驗證了基因

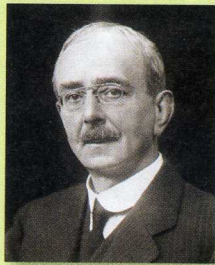
光學遺傳學的開拓史

解開腦密碼

科學家長久以來就致力研究神經系統是如何產生行為的，而早期對於刺激和揭示神經活動的努力，奠定了光學遺傳學的基礎。



1783年：義大利解剖學家伽伏尼（Luigi Galvani）以電流讓死青蛙的腿產生抽動



1937年：英國神經科學家薛林頓（Charles Sherrington）想像以光點來顯示神經活動



1963年：西班牙生理學家戴爾嘎多（Jose Delgado）利用無線電波讓一頭向前衝刺的公牛止步

1971年：可感應電場變化的螢光染料登場

1980年：科學家合成了可顯示細胞內鈣離子濃度變化的螢光染料

1700

1930

1940

1950

1960

1970

1980

FROM "VIDEO-RATE NONLINEAR MICROSCOPY OF NEURONAL MEMBRANE DYNAMICS WITH GENETICALLY ENCODED PROBES", BY ROBERT D. ROORDA, TIBIAS M. HOHL, RICARDO TOLEDO-CROW AND GERO MISENBÖCK, IN JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY, VOL. 92, MARCH 3, 2004. (fluorescence video sequence)

製造的染料蛋白可指出神經的活動。兩個團隊都借用了發光性海洋生物的螢光蛋白做為染料（通常使用水母的綠色螢光蛋白）。我們稍微調整螢光蛋白質的基因，讓螢光蛋白能偵測和顯示細胞在傳遞訊息時，電壓或鈣離子濃度變化，以及神經傳遞物的釋放。

有了這些由基因製造的活動感測分子，我們和其他團隊開始培育只在特定神經元內啟動感測基因的動物。許多遺傳學家常用的模式動物，像是線蟲、斑馬魚和小鼠，都曾以這種方法分析研究過，不過最合適在光學和遺傳學雙管齊下時揭露秘密的，還是果蠅。果蠅的腦小而俱全，可用顯微鏡觀察，同一個視野下即可看到完整線路。此外，果蠅基因也很容易操控，再加上一個世紀以來的研究，科學家找到了許多控制特定神經元表現的基因開關。事實上，當時在紐約市史隆凱特靈癌症中心的吳（Minna Ng）、路亞達（Robert D. Roorda）和我，就是利用果蠅，首次記錄到在完整腦部裡特定神經元叢集間資訊傳遞的影像。之後，我們又發現了新的神經線路和運作機制。舉例來說，2007年，我們發現果蠅嗅覺神經線路的神經元，似乎會注入一些「背景雜訊」到系統中，我們推測，這添加的雜訊可放大微弱的輸入

訊號，提高動物對氣味的靈敏度，而更容易找到食物。

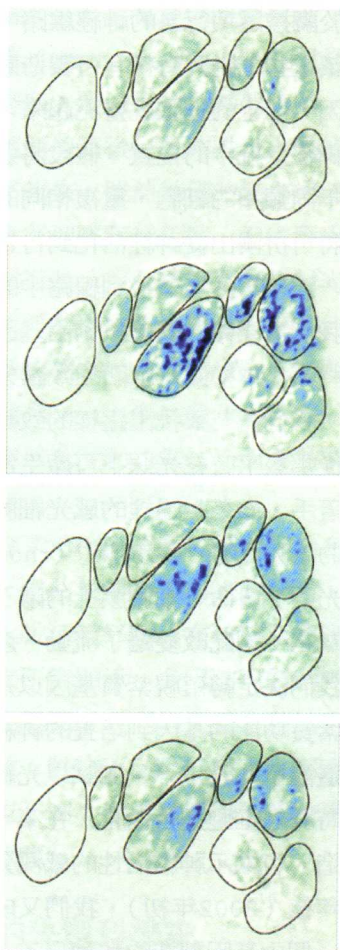
感測分子是觀察神經元傳訊的有效工具，但在1990年代末，我們仍面臨了一個問題，大部份探索神經系統功能的實驗，採用的都是較為間接的方法，研究人員以影像、音調或氣味刺激動物，將電極插入下游腦區，測量該區域收到的電訊號，企圖找出訊號傳遞路徑，然而輸入的感覺訊號在傳遞過程中經歷了大幅的修改重整，結果在離眼睛、耳朵或鼻子等感覺器官越遠的部位，所記錄到的訊號也越難判定是由哪些反應引起的。當然，腦部還有許多與感覺訊號處理無關的神經線路，像是動作、思想或情緒，這類方法就完全無用武之地，我們沒有辦法利用感覺刺激直接活化這些線路。

用光控制細胞活動

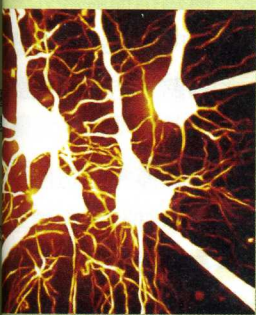
如果能夠不靠感覺器官輸入信號、直接刺激這些神經元，就可以解決一些問題。我們希望能夠發展出一套工具，不僅可做為監測神經細胞活動的感測器，同時還能活化選定的神經元類型。

我的第一個博士後研究員賽梅曼（Boris V. Zemelman，現任職於德州大學奧斯丁分校）和我決定挑戰這個問題。如果能植入一個由基因製造、受光控制的致動分子到神經元中，就能排除以電極研究神經線路所遭遇的幾個障礙。傳統的電極實驗一次能植入動物腦部的電極數量有限，因此研究人員只能探測或刺激少數細胞；此外，要將電極對準特定細胞類型也不容易，而且動物在實驗期間必須被固定住。

如果我們能藉由基因開關找出所有相關的神經元（例如能製造多巴胺的細胞），又能用光來自動遙控這些細胞，就不需事先知道要研究的神經元究竟位於腦部何處，而且即使動物跑來跑去也無關緊要。如果刺激這些帶有致動分子的細胞會改變動物的行為，我們即可得知這些細胞位



光學窺視法：神經科學家利用神經元帶有可感應細胞活化而發出螢光的感測分子，來追蹤資訊在神經線路傳遞的過程。上方連續影像就是活化嗅覺神經元後，對果蠅腦部特定區域（圖中圈起來的區域）的影響，神經元的活化讓螢光增強（藍點），當細胞平靜下來時，螢光則變弱。



○2002年：科學家研發出第一個由基因製造出的致動分子（受光照時會刺激神經活化的蛋白質）

○2005年：研究人員使用光來控制帶有致動分子的果蠅

○1997年：科學家證明由基因製造的蛋白質染料可顯示神經活性

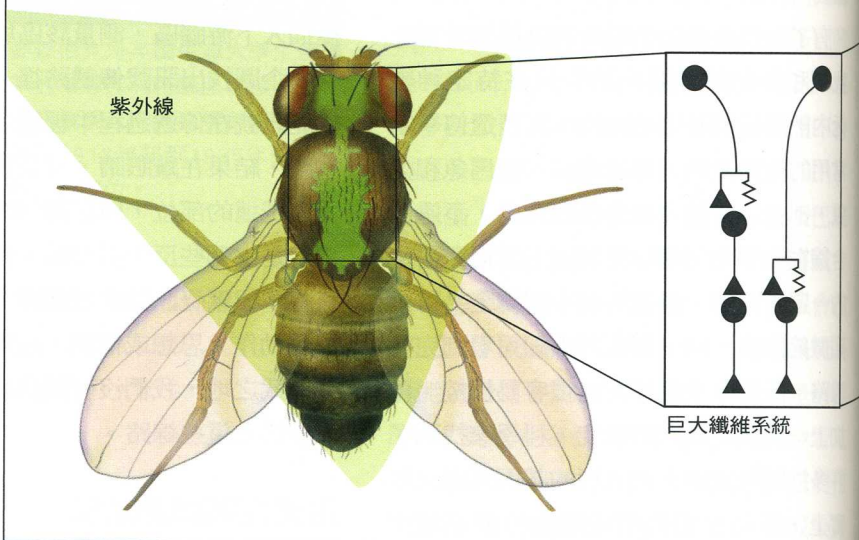
1990

2000

驗證觀念

遙控果蠅

利用果蠅為實驗模型，科學家證明感光蛋白可做為致動分子，活化動物體內的神經元。這些基因改造果蠅只在巨大纖維系統 (giant fiber system) 的神經元內合成致動分子。下圖實驗顯示，以紫外線照射果蠅的神經系統，會誘發逃生反應，顯示致動分子確實發揮作用。



於調控這項行為的神經線路中；如果我們讓這些細胞同時帶有可製造感測分子的基因，活化的細胞就會亮起來，顯示它們在神經系統中的位置。假設將致動分子植入不同類型的細胞，重複相同的實驗，我們將可拼湊出從神經活化到行為表現之間的一連串事件，並找到線路中的所有成員。我們需要做的就是找到由基因製造、能夠將亮光轉換為電脈衝的致動分子。

我們認為要找出這樣的致動分子，可以從那些平時在光照下可產生電訊號的細胞著手，像是眼睛裡的感光細胞，這些細胞的感光天線「視紫質」(rhodopsin)，在光照下會命令細胞膜上的離子通道打開或關閉，因此改變離子流動，產生電訊號。我們決定轉殖視紫質基因以及其他輔助視紫質功能的基因到培養的神經細胞中，在這簡單的設定下，測試以光線照射培養基時神經細胞是否活化。在第一個由基因製造、可顯示神經活性的感測分子誕生的四年後(2002年初)，我們又成功完成了第一個由基因製造的致動分子。

以紫外光遙控基因改造果蠅

接下來，研究人員又使用了其他的感光蛋白質做為致動分子，像是黑視蛋白(melanopsin)，這是一種在特化視網膜細胞上發現的蛋白質，讓動物能配合日照長短來調整生理時鐘。此外，德國馬克士普朗克生物物理研究所的納格爾(Georg Nagel)、美國史丹佛大學的戴塞羅斯(Karl Deisseroth)和凱斯西儲大學的赫理茲(Stefan Herlitze)，證明了另一種稱為「第二型離子通道視紫質」(channel-rhodopsin 2)的光敏蛋白也可以擔任致動器，藻類細胞的光敏蛋白能夠協助藻類游動時確定方位。我們和加州大學柏克萊分校的伊薩克夫、克雷默(Richard Kramer)和特勞納(Dirk Trauner)還合成了一些能夠感光的化合物，可控制其他種類的基因編碼致動分子。

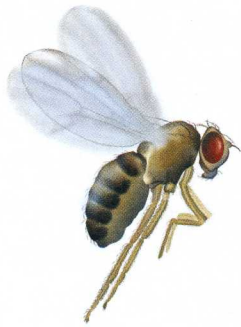
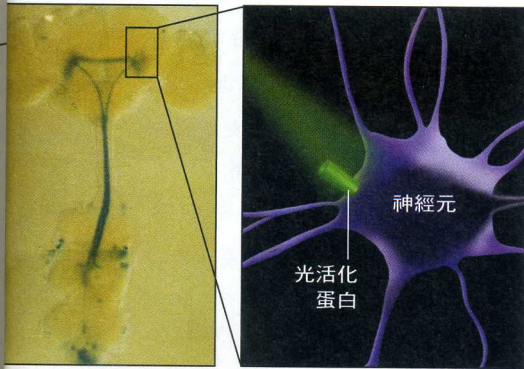
接下來的工作是證明致動分子在活的動物身上能作用。這個任務交由我的第一個研究生利馬(Susana Q. Lima)負責。要驗證致動器原理可行，我們使用了果蠅中一個格外簡單、僅由幾個細胞構成的神經線路，這個線路可控制一種非常明顯的行為：緊急逃生反射反應，果蠅會一蹬升空，展翅飛走。啟動這一連串動作序列的電脈衝信號，是發自果蠅腦中15萬個神經元中的兩個神經元，稱為指揮神經元，而指揮神經元又會活化下層模式運轉器(pattern generator)的線路，指揮果蠅腳和翅翼肌肉的動作。

我們發現有一個基因開關僅會在這兩個指揮神經元中開啟，在其他細胞內永遠呈關閉狀態，另外還有一個基因開關會在模式運轉器神經元中開啟，但在兩個指揮神經元中關閉。利用這些基因開關，我們可以遺傳工程方法來培育會在指揮神經元或模式運轉器神經元中製造感光致動分子的果蠅。我們高興地發現，這兩種果蠅在紫

我們高興地發現，
這兩種果蠅在
紫外光束的照射下
都會彈跳飛起來。

①讓果蠅的巨大纖維系統神經元內帶有感光致動分子，再以紫外線照射。

②光線照射在神經元表面的光驅動蛋白質後，會使細胞膜上的離子通道打開，湧入細胞內的離子造成神經元活化。



③巨大纖維系統活化後，果蠅跳起並拍動翅翼。



④在後續實驗中，切除頭部的果蠅受到光照時仍有相同的反應，排除了由視覺效應引發反應的可能性，證明果蠅行為是由紫外光控制巨大纖維系統所造成。

外線雷射光照射下（因為雷射光的強度足以穿透動物肌肉，照到神經系統）都會彈跳飛起，證實指揮細胞和模式運轉器細胞都參與了逃生反射，而我們轉殖的致動分子也如預期發揮作用。由於只有帶有基因編碼致動分子的神經元，才會「知道」要對光刺激產生反應，因此我們無須將光束對準特定區域，這就好比對著有15萬戶的城市廣播，但只有擁有接收器的幾戶人家可以解碼，其他人是聽不到廣播的。

不過，還有一個擾人的問題需要解決。逃生反射動作的指揮神經元在正常時會接受來自眼睛的訊息，當果蠅的眼睛感到掠食者的陰影靠近時，就會立刻刺激逃生反射，我們在打蒼蠅時都曾遇過這樣的情形，手一靠近，蒼蠅立刻振翅高飛。我們擔心在實驗時果蠅是因為視覺引發逃生反射，而不是因為雷射光束直接控制指揮神經元或模式運轉器線路。

要排除這項顧慮，我們進行了一項殘酷卻簡單的實驗：我們切除果蠅的頭部。無



多巴胺生成細胞會使得對光敏感基因改造果蠅，在光照下活動模式大變，這可由果蠅在培養皿中的活動軌跡看出。原本幾乎動也不動的果蠅（上圖），照光後會積極探索所處的環境（下圖），這項結果支持多巴胺會增加探索行為的學說。

頭果蠅可存活1~2天，而且仍完整保留了位於腹神經節（thoracic ganglia，相當於脊椎動物的脊髓）內的模式運轉器線路。以光束活化這個線路後，原本動也不動的無頭果蠅飛了起來，雖然牠們的動作搖搖擺擺，最後會猛烈墜落或相撞，但表現出來的逃生反射行為，證明確實是因雷射光束活化了模式運轉器線路，因為沒有其他途徑會讓無頭果蠅感光並做出反應。無頭果蠅笨拙的動作，也生動地顯示出萊特兄弟偉大的發明是控制動力飛行，而不是單純的動力飛行。

我們也培育了可用光開關控制而製造多巴胺的果蠅，這些果蠅在雷射光照射下，會突然變得比較活潑好動，在培養瓶裡爬來爬去。過去研究顯示，多巴胺可幫助動物預測獎勵和懲罰，我們的果蠅實驗結果和這學說一致：動物不僅變得好動，探索環境的方式也不同，像是預期得失的改變時所產生的反應。

意料之外的先驅科學家

這項實驗結果預定發表於《細胞》，出刊前三天，我飛往洛杉磯發表一場演說，帶著朋友送我的沃爾夫（Tom Wolfe）剛出版的小說《我是夏綠蒂·賽門斯》（I am Charlotte Simmons），他覺得我會喜歡書中所描繪的神經科學家，更別提這本小說贏得了《文學評論》的「最差性愛小說獎」。我在飛機上讀到其中一個章節，描述夏綠蒂參加了戴爾嘎多（Jose Delgado）的演講，戴爾嘎多可以遙控動物的行為，不是透過光驅動的致動分子，而是利用無線電波傳訊到他植入動物腦中的電極。

西班牙裔的戴爾嘎多用自己生命做賭注，來證明他可以讓激怒衝刺的鬥牛頓時消氣止步，沃爾夫在小說中借由戴爾嘎多的演講宣示，這是神經科學的轉捩點，是對腦心二元論的致命一擊（二元論認為心智是獨立於腦之外的實體），如果戴爾嘎多以物理方法操控動物的腦部，進而改變

牠的心智，則顯示腦和心智必為一體。

讀到此處，我差點從椅子上跌下來。戴爾嘎多是虛構的角色？還是真有其人？飛機一降落，我立刻上網搜尋，找到一張手持遙控器的鬥牛士和鬥牛的合照，我還得知戴爾嘎多是耶魯大學和我同一研究所的教授，曾在1969年出版《物理控制心智：邁向心理文明的社會》。他在這本書中概述了他控制運動、喚起記憶和幻覺、並誘發快感或痛覺的嘗試（參見《科學人》2005年12月號〈腦晶片X檔案〉），書末討論了掌握控制腦功能的能力，以及可能對醫學、倫理、社會、甚至戰爭造成的影響。在這樣的背景下，我毫不驚訝在那期《細胞》出刊的日子，我的電話會響起，美國記者問我：「我們什麼時候可以用遙控蒼蠅來入侵其他國家？」

媒體的關注並沒有到此為止，第二天《德魯吉報導》(Drudge Report)的標題是「科學家創造了遙控蠅」，還壓過麥可傑克森出庭的新聞。我猜想一個星期後電視節目「今夜」中的短劇，靈感可能就是從這則新聞來的：主持人雷諾(Jay Leno)遙控一隻蒼蠅飛進美國總統布希的

嘴巴裡。這可是我們新科技的第一個實際應用！

在那之後，研究人員使用了光驅動開關來控制動物的其他行為。2007年10月，美國史丹佛大學的戴塞羅斯和里斯亞(Luis de Lecea)宣佈以光纖將光線直接送到小鼠腦內負責製造下視丘分泌素(hypocretin, 一種胜肽類神經傳遞物)的神經元，看看這些神經元是否會調節睡眠。研究人員懷疑下視丘分泌素可能與睡眠調控有關，有某些品系的狗因為缺乏下視丘分泌素受體，會突然昏睡，他們發現，刺激熟睡小鼠的腦中合成下視丘分泌素的神經元，會讓牠們清醒過來，進而支持了這個學說。

我在耶魯大學實驗室的博士後研究員克萊尼(J. Dylan Clyne)利用基因編碼致動分子來研究兩性的行為差異。許多動物的雄性都會花相當長的時間來追求異性，以果蠅為例，雄果蠅會震動翅翼，發出讓雌果蠅難以抗拒的「情歌」。為了研究這項純粹雄性行為的神經機制，克萊尼以光活化讓果蠅彈唱求偶之歌的模式運轉神經元。他發現雌果蠅的腦內也擁有相同的情歌神經線路，但在正常情況下，雌果蠅缺乏可啟動線路的神經刺激。這項發現顯示雄果蠅和雌果蠅的腦部神經線路大致是相同的，性別行為的差異來自控制線路的總開關，看開關調成雄性還是雌性的模式。

其他光學遺傳學實驗

了解神經線路

利用光學遺傳學技術的最新研究，讓神經科學家得知神經線路的位置，還能進一步操縱這些神經線路而控制果蠅、線蟲、魚和小鼠的行為。

	動物	研究行為	研究成果
顯像實驗	果蠅	嗅覺記憶	背內側成對神經元會形成反饋迴路來穩固與嗅覺相關的記憶
	線蟲	覓食	在移除食物時會造成名為AWC的神經元持續活化，而改變線蟲搜尋食物的策略
	小鼠	性別辨識	辨識性別的能力來自雄性和雌性專一的費洛蒙感測細胞
	動物	研究行為	研究成果
遙控實驗	果蠅	逃避逆境	遭受壓力的果蠅所釋出的二氧化碳會引發其他果蠅的逃避反應
	斑馬魚	逃生	感官輸入可啟動或關閉觸摸引起的逃生反應
	小鼠	決定	感知的決定受到少於300個皮質神經元電活動的影響

治療神經疾病的新曙光

目前研究人員的做法通常是以遺傳工程讓動物體內的特定神經元帶有感測分子或致動分子，但我們也可讓細胞同時配備兩者。我們希望未來可以培育出帶有多個感測分子或致動分子的動物，來研究動物體內的多種神經細胞。

我們對神經線路新的操控能力，除了開啟許多基礎研究的機會，是否也有實用價值呢？或許吧，但我覺得其中多少有些渲染。戴爾嘎多點出了幾個直接控制神經功