

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13105

研究課題名(和文) 赤色シフトCa<sup>2+</sup>指示遺伝子を活用した高速多重Ca<sup>2+</sup>計測法の開発

研究課題名(英文) Fast multiplex calcium recording using a red-shift calcium indicator gene

研究代表者

尾藤 晴彦 (Bito, Haruhiko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：00291964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請研究者は、これまでのCa<sup>2+</sup>指示遺伝子や化学的なCa<sup>2+</sup>指示薬を上回る性能を持つGECIであるR-CaMP2の開発に成功した。これは、研究代表者のこれまでのカルシウム・カルモジュリン結合蛋白に関する生化学研究の蓄積に基づくR-CaMP2の合理的設計による画期的成果である。本研究では、既存の2色(緑・赤)を超える多色イメージング法をさらに拡張する合理的なタンパク工学的手法により実現した。多色の細胞活動計測は喫緊の課題であり、独創的GECI設計コンセプトに基づく、新たな生体高速多重Ca<sup>2+</sup>イメージングシステムを、本研究を通じて世界に先駆けて展開する端緒を築いた。

研究成果の概要(英文)：We previously developed a genetically encoded calcium indicator RCaMP2, which surpasses performance obtained with classical genetically encoded or chemical dye-based calcium indicators. Transformative insights for rational design of R-CaMP2 were gained from previous biochemical research on calcium-calmodulin-binding proteins pioneered by the investigator group. In this study, we expanded this strategy, and rationally pursued protein engineering-based iterative mutation processes to realize multiple color calcium recording that goes beyond the classical two colors, green and red. Multicolor cellular activity measurements represent an urgent technological problem to solve. Our approach opens a hitherto unexplored, brand-new, avenue for a novel fast multiplex calcium imaging platform through an original GECI design concept.

研究分野：神経生化学

キーワード：カルシウム シグナル伝達 脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

脳の情報表現は、神経回路網における神経発火の時空間的パターンにより表出されると考えられる。この神経活動の発火パターンを計測するため、ここ 10 年ばかり、活動電位発火のタイミングをカルシウムインディケータのシグナル上昇を用いて代用することが非常に一般化してきた。

多光子励起顕微鏡を用い、脳の微小領域における数百個の神経細胞の集団活動を細胞レベルで記録することはいまや標準的なテクノロジーといえる。特に、特定神経細胞種に発現可能な「遺伝子にコードされた  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータ (Genetically Encoded Calcium Indicator; 以下 GECI と略)」が広く用いられるようになってから、特定領域にて、くりかえし、かつ一回当たり数時間におよぶ長期観察が実現するようになった。

しかしながら、従来の GECI は、1997 年に宮脇らによって Cameleon が開発されて以来、すべて、骨格筋 myosin light chain kinase 由来の  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 結合配列 M13 をベースに構築されてきた。そのため、骨格筋特有の非線形的カルシウム応答が、GECI の性質に潜んでおり、神経活動計測にかならずしも最も適した性質を有しているとはいえなかった。特に、活動応答時の立ち上がり、あるいは活動終了後の減弱の時定数が遅く、個別の活動電位の検出でなく、強く連発する入力の有無もしくは強度の検出に優れていた。

このような理由から、入力発火頻度や発火回数を正確に読み取れる、線形的カルシウム応答を有する GECI の開発が長らく待たれていた。この問題点を解決するために、我々は、1) 立ち上がり・減弱の両者のキネティクスが早く、2) 発火回数と蛍光変化に線形的関係があり、3) 広範囲の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を検出可能な GECI を開発することを目標にした、合理的デザイン過程を経て、R-CaMP2 を開発した (Inoue et al. *Nature Methods* 2015)。

すなわち線形的カルシウム応答を実現するためには  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と蛍光強度の変化の関係である Hill 係数が 1 程度の GECI を作出することが必要である。そこで、これまでの CaMK 研究での生化学的知見に基づき、カルシウム応答が比較的線形的挙動を示し、神経活動に容易に応答することをすでに報告してきた CaMKK の  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 結合配列 ckkap をベースに新規の GECI を開発した次第である。

これにより、従来全ての色域の GECI において、Hill 係数が 2 付近もしくは GCaMP6 のように 2 をはるかに上回る値であったのに対し、Hill 係数 1 程度の赤色 GECI、R-CaMP2 を作出することに世界にさきがけて成功した。その結果、単一活動電位を検出する高感度、かつ発火回数に対して線形に変化することが確認され、従来的高速 GECI の 4 倍の 40Hz もの高周波数の発火に追従する高速 GECI であることを確認した (Inoue et al., *Nat. Methods*, 2015)。

しかしながら、これまで生きてきたマウス個体で計測可能な色域は緑 (GCaMP6、G-CaMP7 など)、赤色 (R-CaMP2) と限られているため、同時に 3 種類以上の細胞種の神経活動を測定した例は無かった。そのために、微小神経回路における異なる複数の神経細胞種同士の時空間制御の理解が遅れていた。

## 2. 研究の目的

多色の細胞活動計測は喫緊の課題であり、本研究では、既存の 2 色 (緑・赤) を超える多色イメージング法をさらに拡張する合理的なタンパク工学的手法により実現することを目的とした。

具体的には、新規 ckkp 配列を用いて *in vivo* において 2 つ以上の異なる神経細胞種の活動のモニターを可能にする、Hill 係数 1 程度で、かつダイナミックレンジが大きく、超高速の黄色  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータを開発し、その発現方法や多色カルシウムイメージン

グのためのデータ解析法を確立することを試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、これまでに確立した合理的タンパク工学的手法や、ckkap 配列に関する経験に基づき、以下のような変異体スクリーニングを行った。

1) 大腸菌あるいは哺乳類細胞より精製したリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* スクリーニング

2) マウス皮質の急性スライスを用いたスクリーニング

3) *In vivo* 2 光子イメージングによる大脳皮質第 2/3 層神経細胞に発現させたプローブの蛍光シグナル評価

### 4. 研究成果

これまで赤色 GECI で成功した変異導入戦略では、緑色 GECI の構築が進まなかったため、より大規模なスクリーニング過程を経て、Hill 係数が付近の緑色 GECI 候補プローブを取得した (Inoue et al. 準備中)。

この緑色プローブをベースに、さらなる変異を加えることにより蛍光波長のシフトを試みた。その結果、精製タンパク質レベルでカルシウム応答性が線形的に変化する黄色化 GECI を得ることに成功した。これらを元にさらなる変異を導入し、最適化した黄色 GECI を作出した。さらに、この GECI を用いて、生きた脳で単一活動電位測定が十分可能であることを実証した。

引き続き、培養細胞を用いて、緑・黄・赤の 3 種類の GECI を、同時に 3 種類の細胞グループに発現し、1 光子および 2 光子ライブイメージングを実現するスペクトルイメージング解析を実施した。

以上より、独創的 GECI 設計コンセプトに基づく、新たな生体高速多重 Ca<sup>2+</sup>イメ

ージングシステムを、本研究を通じて世界に先駆けて展開する端緒を築いた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, Young NP, Kauvar I, Jennings JH, Lerner TN, Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Davidson TJ, Inoue M, Bito H, Deisseroth K. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods*. 2016(4), 325-328

2. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane SI, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, Bito H. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem*. 2017 Mar 15. doi: 10.1111/jnc.14020. [Epub ahead of print] Review.

[学会発表](計 17 件)

#### 招待講演

1 Bito H. Labeling, monitoring and manipulating active ensembles. Conferences Jacques Monod, Roscoff (Brittany), France, 2016/6/13-17.

2. Bito H. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Frontiers in Neurophotonics Summer School, Quebec, Canada, 2016/6/20-22

3. Bito H. Illuminating activity-dependent signaling and circuits. Gordon Research Conference (Synaptic Transmission), New Hampshire, USA, 2016/8/14-19.

4. Sakamoto M, Bando Y, Kwon T, Kim S, Peterka D, Inoue M, **Bito H**, Yuste R. 膜電位感受性蛍光タンパク質を用いた生体活動イメージング. 生理学研究所 研究会「生体多元シグナルダイナミクスの計測と操作」, 岡崎、2016年9月15日

5. **Bito H**, Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Institute of Neurosciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China, 2016/10/17.

6. **Bito H**. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Cold Spring Harbor Asia (Probing Neural Networks with Light: Imaging Structure & Function in the Living Brain), Suzhou, China, 2016/10/17-21

7. **Bito H**. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Janelia Conferences - Fall 2016 "Fluorescent Proteins and Biological Sciences V". Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm Research Campus, 2016/11/6-11/9

8. 藤井哉、井上昌俊、**尾藤晴彦**. Ca<sup>2+</sup>シグナリングの可視化プローブの開発と多重イメージング. 生理学研究所 研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」, 岡崎、2016年11月21日

9. 藤井哉、井上昌俊、**尾藤晴彦**. Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達のプロープ開発と多重イメージング 第11回NIBBバイオイメージングフォーラム、岡崎、2017年2月14日

## 学会発表 (海外)

### ポスター発表

10. Fujii H, Inoue M, **Bito H**. Rational

engineering of sensors for hierarchical and orthogonal Ca<sup>2+</sup> signaling. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2016年11月13日

## 学会発表 (国内)

### 口頭発表

11. **Bito H**. Activity-dependent Arc expression: mechanism and applications. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年7月20-22日.シンポジウム

12. Fujii H, Inoue M, **Bito H**. Development and imaging of new color indicators for Ca<sup>2+</sup> signaling in living neurons. 第39回日本神経科学大会シンポジウム、横浜、2016年7月20日. シンポジウム

13. Sakamoto M, Bando Y, Kwon T, Kim S, Peterka D, Inoue M, **Bito H**, Yuste R. Imaging voltage in neurons with genetically encoded indicators. 第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会合同年会、福岡、2016年9月8日

14. **尾藤晴彦**. 光技術を駆使した細胞活動の計測と操作. 第8回光操作研究会 慶應義塾大学三田キャンパス (2016.9.29-30)

15. Fujii H, Inoue M, **Bito H**. Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII and Calcineurin. 第54回日本生物物理学会年会シンポジウム、つくば、2016年11月26日

## ポスタ 発表

16. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M,

Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, **Bito H**. "Rational design of ultrafast, high-affinity calcium indicators for monitoring neuronal activity" The 7th International Neural Microcircuit Conference, Okazaki, Japan, 2016, 12.8.

17. 藤井哉、井上昌俊、**尾藤晴彦**. Rational engineering of sensors for hierarchical and orthogonal Ca<sup>2+</sup> signaling. 第8回イメージング若手の会「光塾」、東京工業大学 すすかけ台キャンパス、2016年12月17日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾藤 晴彦 (BITO, HARUHIKO )  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00291964

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )