

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2年 5月 29日現在

機関番号：12601
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00438
研究課題名：Ca²⁺センサーの AAV ベクターでの共発現と最適化

研究代表者
岡村 理子 (OKAMURA, Michiko)
東京大学・大学院医学系研究科・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000 円

研究成果の概要：複数色の蛋白質性蛍光 Ca²⁺センサーを多種の血清型アデノ随伴ウイルスベクターで作製し、作製方法の条件検討、発現を試みた。同時に、特定神経細胞での発現を可能にするため、細胞種特異的プロモーターや誘導調節可能な構造を持つベクターの構築を試みた。続いて、マウス脳に、これらを利用することにより、同一領域で複数色の Ca²⁺センサーを発現させる系の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経発火が細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させることから、近年、蛋白質性蛍光 Ca²⁺センサーを用いて、脳の神経活動を計測する手法が利用されている。そこで、本研究で検討した複数色の Ca²⁺センサーを同一部位のそれぞれ異なる特定の神経細胞で発現させる系を利用し、同時計測することができれば、各神経細胞の活動、ネットワークを、高感度で検出、可視化することが可能になると考えられる。さらに、このことは、行動、記憶のメカニズムを解明するのに、非常に有用なツールとなることが期待される。

研究分野：神経生化学

キーワード：アデノ随伴ウイルス カルシウムセンサー

1. 研究の目的

本研究では、アデノ随伴ウイルス (AAV: adeno-associated virus) ベクターを用い、特定神経細胞で発現する各色の Ca²⁺センサーを作製し、複数色の Ca²⁺センサーを同一領域に発現させる系を開発することを目的とした。

2. 研究成果

(1) Ca²⁺センサーを発現する AAV ベクターの構築

同一領域に、同一血清型の AAV を複数種導入しても、細胞の同一血清型に対する受容体数に限りがあるため、高タイターでの感染を試みても、発現量が期待されるほどは得られなかった。そこで多種の血清型の Ca²⁺センサー作製を試みた。これまで確立した Sf9 細胞で作製する系を複数の血清型に適用し、各血清型 AAV ベクターに必要なコンポーネントを発現させるバキュロウイルス、および Ca²⁺センサー遺伝子をもつバキュロウイルスを作製し、共感染させることにより、異なる血清型の AAV ベクターを作製した。引き続き、各血清型における①精製方法、②二つのバキュロウイルスの感染割合について検討し、高い力価ウイルスを作製するための最適化を試みた。また Sf9 細胞システムに平行して、HEK293 細胞システムの作製法でも、各血清型の精製方法を検討した。さらに、特定神経細胞での発現を可能にするため、細胞種特異的プロモーターや誘導調節可能な構造を持つベクターの構築を試みた。

(2) In vivo への適用

トランスジェニックマウスと子宮内電気穿孔法を組み合わせ、作製した Ca²⁺センサー発現 AAV ベクターをマウス脳にインジェクションすることによって、複数色の Ca²⁺センサーを発現させることに成功した。これら成果の一部を活用し、Ca²⁺センサーの in vivo 脳発現に実用化した。

(Inoue et al. Cell 2019)

3. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕（計1件）

1. Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane SI, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, Takemoto-Kimura S, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell*, 177: 1346-1360, 2019.
doi:10.1016/j.cell.2019.04.007. 査読有り

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。