

平成23年 5月 27日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700441

研究課題名(和文)

蛍光タンパクセンサーを発現する遺伝子改変マウスを用いた匂い情報処理機構の解明

研究課題名(英文) Generation of transgenic mice expressing genetically-encoded fluorescent protein sensors for elucidation of odor information processing in the olfactory bulb

研究代表者

武藤 弘樹 (MUTOH HIROKI)

独立行政法人理化学研究所・神経回路ダイナミクス研究チーム・研究員

研究者番号： 60443040

研究成果の概要(和文)：本研究を遂行するため、VSFP2.3(膜電位感受性蛍光タンパク質)を嗅脳の僧帽細胞へ特異的に発現させた遺伝子改変マウス系統の作製を行った。現在、いくつかの系統を用い発現パターンと機能確認を行っている。平行して、VSFP2.3とVSFP2.42の生体脳における機能確認を胎仔期エレクトロポレーションを用いて行ったところ、VSFPが生体脳で機能し、外部からの感覚入力による神経活動を観察するのに十分な精度を持つことが実証された。

研究成果の概要(英文)：To carry out our project, we generated transgenic mice which are specifically expressed VSFPs in mitral/tufted cells. Current situation, we are screening transgenic mice lines by checking expression patten and function of VSFPs. In parallel, we demonstrated functional property of VSFPs in living animals by generating *in utero* electroporation. As a result, VSFPs is working in living mice and has sufficient sensitivity for monitoring neuronal activities to natural sensory input.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：嗅脳 膜電位センサー 脳機能光学測定 遺伝子改変マウス *in vivo* 匂いの記憶・学習

## 1. 研究開始当初の背景

動物は複雑な環境の中を生き抜くために、数多くの匂いやフェロモンなどを識別する必要がある。1991年 Ax1 と Buck により匂い受容体遺伝子の発見さ

れたことにより、臭覚における研究が飛躍的に進んだ。その後、匂い分子が特異的な受容体に結合することにより電気信号が生じ、直接嗅脳にある僧房細胞へ伝達される。それぞれの匂い受容体が特異的な僧房細胞

の糸球体を活性化するため、嗅脳において匂いに応じたマップが形成される。しかしながら、嗅脳内でどの様にして匂いの学習や記憶が行われているのか、まだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

近年、カルシウムや pH に感受性をもつ蛍光タンパク質センサーを用い匂いの地図が解明された。しかしながら、どのような情報処理により地図が形成され匂いの学習・記憶がなされているのかまでは解明されていない。そのためには時空間解像度の高いセンサーによる解析が必要である。我々の研究室により開発された膜電位感受性蛍光タンパク質 (VSFP) を用いることにより、リアルタイムで嗅脳内の匂いの情報処理過程を解明する。

## 3. 研究の方法

嗅球内での匂いの情報処理過程をリアルタイムで解析するため、高時空間解像度での観察を可能にする VSFP を僧帽細胞に特異的に発現する遺伝子改変マウスを作成する。その遺伝子改変マウスを作成のために Cre/loxP システムを用いた。Cre をプロモーター Pcdh21 によって僧帽細胞に発現させた遺伝子改変マウスを他の研究室より頂き、また逆向きに配列させた loxP の間に反転させた VSFPs の配列を持つ遺伝子改変マウスを我々の研究室で作製し、それらの遺伝子改変マウスを交配することで VSFPs が僧帽細胞に発現する遺伝子改変マウスの作製を行う。本研究課題で作成された遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* による実験を行い、匂いの情報処理がどのように行われているのか解明する。

## 4. 研究成果

VSFPs を嗅脳の僧帽細胞へ特異的に発現させた遺伝子改変マウス系統の作製を行い、いくつかのマウス系統が確認された。現在、*in vivo* 実験に用いる系統をスルリーニングするため、VSFPs の発現パターンと機能確認を行っている。平行して、VSFPs の生体脳における機能確認を胎仔期エレクトロポレーションを用いて行ったところ、VSFP が生体脳で機能し、外部からの感覚入力による神経活動を観察するのに十分な精度を持つことが実証された。本研究で得られた成果は、嗅脳での情報処理過程の解明を導くだけでなく、VSFPs を用いることで高時空間解像度での観察を可能し、様々な脳部位での研究に役立つと期待される。

## 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 12 件)

- ① Mutoh, H., Perron, A., Akemann, W., Iwamoto, Y., Knöpfel, T. Optogenetic monitoring of membrane potentials. *Exp Physiol.* 96: 13-18 (2011) 査読有
- ② 武藤 弘樹., Akemann, W., Knöpfel, T. 膜電位感受性蛍光タンパク質による脳機能イメージング. *Medical Bio.* Vol. 8, No 1: 24-31 (2011) 査読無
- ③ 武藤 弘樹., Knöpfel, T. 膜電位感受性蛍光タンパク質の開発と神経活動観察. *BIO INDUSTRY.* Vol. 28, No 2: 18-25 (2011) 査読無
- ④ Akemann, W\*, Mutoh, H\*, Perron, A., Rossier, J., Knöpfel, T. Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat Methods.* 7: 643-649 (2010) 査読有  
\* These authors contributed equally to this work.
- ⑤ Perron, A., Mutoh, H., Akemann, W., Gautam, SG., Dimitrov, D., Iwamoto, Y., Knöpfel, T. Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins for monitoring membrane potential. *Front Mol Neurosci.* 2: Epub (2009) 査読有
- ⑥ Mutoh, H\*, Perron, A\*, Dimitrov, D., Iwamoto, Y., Akemann, W., Chudakov, DM., Knöpfel, T. Spectrally-resolved response properties of the three most advanced FRET based fluorescent Protein voltage probes. *PLoS ONE.* 4: e4555 (2009) 査読有  
\* These authors contributed equally to this work.
- ⑦ Perron, A\*, Mutoh, H\*, Launey, T., Knöpfel, T. Red-shifted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Chem Biol.* 24: 1268-1277 (2009) 査読有  
\* These authors contributed equally to this work.
- ⑧ Akemann, W., Lundby, A., Mutoh, H., Knöpfel, T. Effect of voltage sensitive fluorescent proteins on neuronal excitability. *Biophys J.* 96: 3959-3976 (2009) 査読有
- ⑨ Villalba-Galea, CA., Sandtner, W., Dimitrov, D., Mutoh, H., Knöpfel, T., Bezanilla, E. Charge

movement of a voltage-sensitive fluorescent protein. *Biophys J.* 96: L19-21 (2009) 査読有

- ⑩ Gautam, SG., Perron, A., Mutoh, H., Knöpfel, T. Exploration of fluorescent protein voltage probes based on circularly permuted fluorescent proteins. *Front Neuroengineering.* 2: Epub (2009) 査読有
- ⑪ Marcaggi, P., Mutoh, H., Dimitrov, D., Knöpfel, T. Optical measurement of mGluR1 conformational changes reveals fast activation, slow deactivation and sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 11388-11393 (2009) 査読有
- ⑫ Fletcher, ML., Masurkar, AV., Xing, J., Imamura, F., Xiong, W., Nagayama, S., Mutoh, H., Greer, CA., Knöpfel, T., Chen, W. Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 102: 817-830 (2009) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Chang Liao M., Mutoh H., Iwamoto Y., Raad N., Nikolaev V., Luther S., Lehnart S., Wagner S., Maier L., Stuhmer W., Knöpfel T., Zimmerman W. Voltage sensitive protein 2.3: a novel tool to study sarcolemmal structure and electrical activity in mouse hearts. *Biophysics 55<sup>nd</sup>* (2011 年 3 月 9 日) Baltimore, Maryland, USA
- ② Akemann W., Mutoh H., Perron A., Dimitrov D., Knöpfel T. Characterization of second generation voltage-sensitive fluorescent proteins as genetically-encoded probes of membrane voltage of neurons in vitro. *Soc. Neurosci 40<sup>th</sup>* (2010 年 11 月 17 日) San Diego, CA, USA
- ③ Mutoh H., Akemann W., Perron A., Dimitrov D., Knöpfel T. Characterization of second

generation voltage-sensitive fluorescent proteins as genetically-encoded probes of membrane voltage of neurons in vivo. *Soc. Neurosci 40<sup>th</sup>* (2010 年 11 月 17 日) San Diego, CA, USA

- ④ Perron A., Mutoh H., Launey T., Knöpfel T. Red-shifted fluorescent reporter proteins for membrane potential. *2010 Canadian Neuroscience Meeting* (2010 年 5 月 16 日) Ottawa, Canada
- ⑤ Akemann W., Mutoh H., Perron A., Gautam S., Dimitrov D., Yoshida R., Shimogori T., Launey T., Knöpfel T. Optical recording of electrical activity of pyramidal neurons using a genetically-encoded voltage probe. *Francis Crick Neuroscience Symposium* (2010 年 4 月 14 日) Suzhou, China
- ⑥ Akemann W., Mutoh H., Yoshida R., Shimogori T., Knöpfel T. Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins. *Biophysics 54<sup>nd</sup>* (2010 年 2 月 2 日) San Francisco, USA
- ⑦ Knöpfel T., Mutoh H., Perron A., Gautam S., Dimitrov D., Akemann W. Engineering of a genetically encodable fluorescent voltage sensor exploiting fast Ci-VSP voltage-sensing movements. *Soc. Neurosci 39<sup>th</sup>* (2009 年 10 月 17-21 日) Chicago, USA
- ⑧ Perron A., Dimitrov D., Mutoh H., Yokoyama J., Knöpfel T. Second and third generation voltage-sensitive fluorescent proteins. *Fluorescence 2009, Fluorescence in Biology An International Conference* (2009 年 3 月 16-19 日) Mumbai, India.

[図書] (計 2 件)

- ① Jin, L., Mutoh, H., Knöpfel, T., Cohen, LB., Hughes, T., Pieribone, VA., Isacoff, EY., Salzberg, BM., Baker, BJ. Genetically encoded protein sensors of membrane potential. *Springer. Membrane Potential Imaging in the Nervous System.* Chapter 14: 157-163 (2011)

② Jin, L., Baker, B.J., Cohen, L.B., Mutoh, H.,  
Dimitrov, D., Perron, A., Iwamoto, Y.,  
Isacoff, EY., Pieribone, VA., Hughes, T.,  
Knöpfel, T., Akemann, W. Fluorescent  
sensors of membrane potential that are  
genetically encoded. *Springer*. Imaging the  
Brain with Optical Methods. Chapter 2:  
27-44 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

独立行政法人 理化学研究所 プレスリリース

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2010/100712/detail.html>

独立行政法人 理化学研究所 2010年 理研ニュース 9月号

[http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/news/2010/sep/spo\\_03.html](http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/news/2010/sep/spo_03.html)

ライフサイエンス 新着論文レビュー

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/616>

日刊工業新聞

<http://www.nikkan.co.jp/newrls/rls20100712i-04.html>

Science News 最先端の科学技術情報

<http://sc-smn.jst.go.jp/sciencenews/frontier.html>

Flash version: <http://sc-smn.jst.go.jp/sciencenews/flash/M100003/003/M100003-003.swf>

Windows Media Player version:

[http://sc-smn.jst.go.jp/sciencenews/wmv\\_meta/vM100003-003.asx](http://sc-smn.jst.go.jp/sciencenews/wmv_meta/vM100003-003.asx)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武藤 弘樹 (MUTOH HIROKI)

独立行政法人理化学研究所・神経回路ダイナミクス研究チーム・研究員

60443040

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者