

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19429

研究課題名（和文）多光子励起による生体多色活動計測・操作技術の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of multiphoton excitation for simultaneous multi-color measurement and manipulation of neural activity

研究代表者

坂本 雅行（Sakamoto, Masayuki）

京都大学・生命科学研究科・特定准教授

研究者番号：00777865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体脳で多色イメージングと光遺伝学的操作が同時にクロストークフリーで実現可能な方法を確立するため、新規光遺伝学ツールならびにカルシウムプローブの開発をおこなった。スクリーニングの結果、既存のプローブよりもコンダクタンスの大きな光遺伝学ツールを新たに開発することに成功した。また、カルシウムセンサーについては、従来のセンサーよりも蛍光輝度ならびに蛍光変化率が上昇した新規赤色カルシウムセンサー（RCaMP3）を創出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高次脳機能を制御する神経ネットワークを理解するためには、1細胞レベルの解像度で神経活動計測と神経活動操作を同時におこなう技術が必要である。本研究で開発した新規プローブを用いることで、神経活動計測と活動操作がクロストークフリーに生体脳で実現できるだけでなく、旧来の生理学の枠を超えた神経科学の問題に取り組みことも可能となる。

研究成果の概要（英文）：We developed a new optogenetic tool and novel calcium indicator to establish a method for simultaneous calcium imaging and optogenetic manipulation in vivo. Through screening, we successfully developed a mutant with larger conductance than existing optogenetic tools. Furthermore, we obtained a new red calcium sensor, RCaMP3, that exhibited increased fluorescence brightness and fluorescence change rate compared to conventional red calcium indicators.

研究分野：イメージング

キーワード：カルシウムセンサー 光遺伝学ツール タンパク質工学 多色イメージング 多光子励起

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高次脳機能を理解するためには、脳を構成する細胞が織りなす高度に制御されたネットワークダイナミクスについて、正確に計測・操作する技術が必要不可欠である。近年、GCaMP6 などの緑色蛍光タンパク質 (GFP) を骨格としたカルシウムセンサーと、ChRmine や ChromE などの赤色偏移型光遺伝学ツールを用いることで、全光学的 (All-Optical) に神経活動計測と活動操作が生体においても 1 細胞レベルの解像度で同時に可能となった。ところが、現在使用されている赤色偏移型光遺伝学ツールは活性化スペクトルの幅が広く、上記組み合わせではイメージングの励起光で光遺伝学ツールが活性化されてしまい、大きな光電流が誘導されていた。そのため、実際の生理条件下と比較しても、脳が興奮した状態が誘導されている状態にあるという問題があった。また、これまで使用されてきたカルシウムセンサーは GCaMP (緑色) のみであった。緑色以外のカルシウムセンサーについては、蛍光輝度や活動電位に対する蛍光変化率が低いなど、高次脳機能研究に向けての実用的な使用に向けては多くの課題が残っていた。

### 2. 研究の目的

本研究では上記問題を解決するため、生体においても多色イメージングと光遺伝学的操作が同時に可能な新規光遺伝学ツールや活動イメージング用プローブのデザインをおこなった。神経活動計測については緑色光によって励起可能な赤色蛍光タンパク質 (RFP) を骨格としたカルシウムセンサーについて、神経活動操作については青色光によって活性化可能な光遺伝学ツールについて、それぞれデザインと評価をおこなった。

### 3. 研究の方法

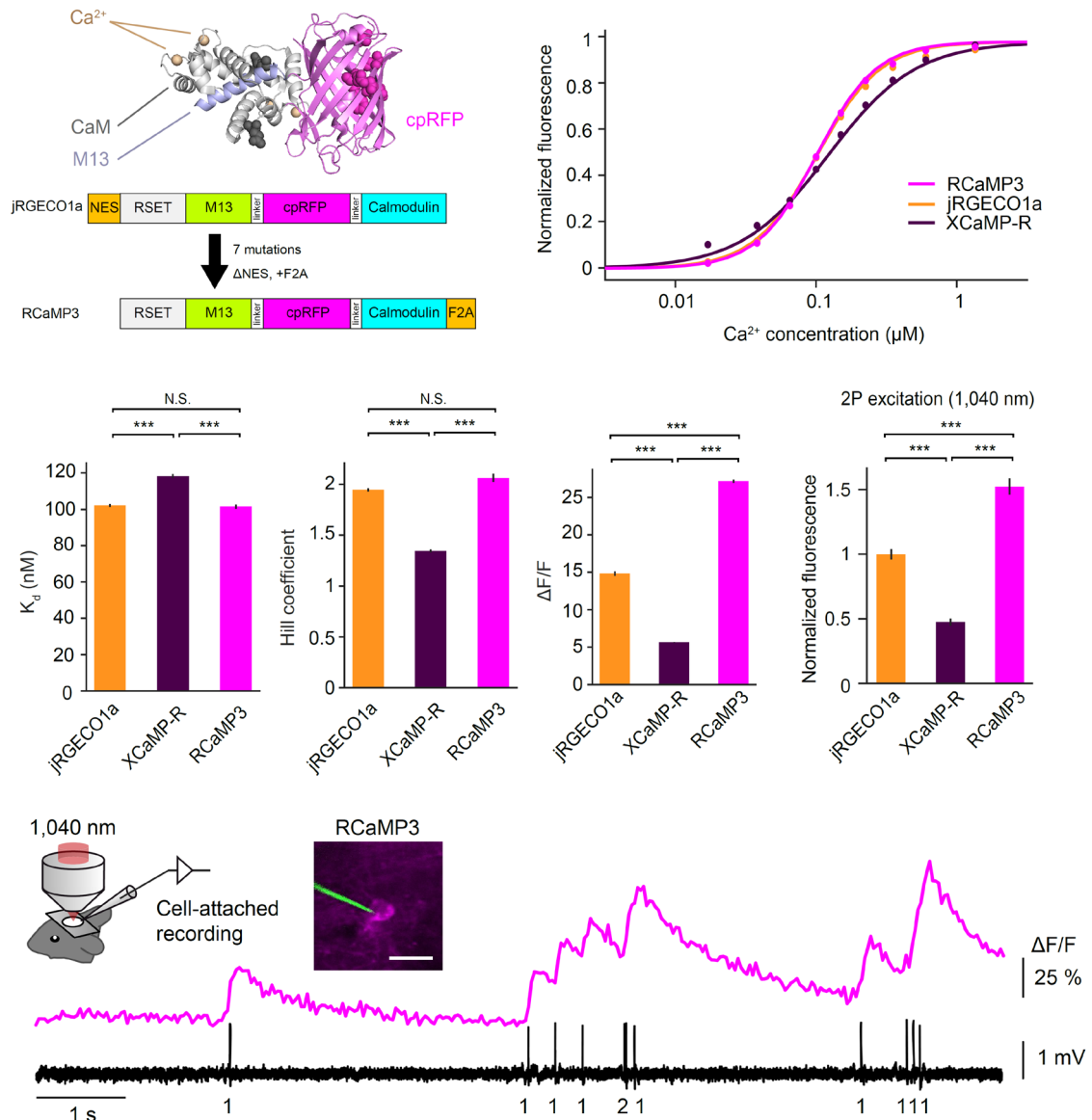
赤色蛍光タンパク質を骨格とする新規カルシウムセンサーについて、作製したプローブを培養細胞 (HEK293T 細胞) に発現させ、プレートリーダーを用いて、センサーの蛍光輝度、カルシウムイオンに対する親和性、ならびにカルシウムイオン結合に対する蛍光変化率の定量をおこなった。培養細胞を用いたスクリーニングで高輝度かつ高い蛍光変化率を示したセンサーについては、2 光子励起顕微鏡を用いた生体カルシウムイメージングをおこなうことで生体ニューロンでの評価をおこなった。また、光遺伝学ツールについては、作製した新規プローブを培養神経細胞に発現させ、青色光を照射したときに流れる光電流の大きさについて、Whole-cell patch clamp 法を用いて評価をおこなった。

### 4. 研究成果

カルシウムセンサーについて、赤色カルシウムセンサー (jRGECO1a) を骨格として、蛍光タンパク部分を中心に合計 7 箇所変異を導入した。さらに、センサーの N 末端に付加していた核外搬出シグナル (NES) を取り除き、代わりに自己切断ペプチド (F2A) の一部を核外搬出シグナルとしてセンサーの C 末端に付加するように改変した。その結果、既存の赤色カルシウムセンサーである jRGECO1a や XCaMP-R の持つ高いカルシウム親和性や線形性を保ちつつ、蛍光輝度ならびにカルシウムイオン結合に対する蛍光変化率が有意に上昇した新規赤色カルシウムセンサー

RCaMP3 の創出に成功した (下図)。また、1 光子励起条件下だけでなく、2 光子励起条件下 (励起波長:1,040 nm) においても RCaMP3 は既存のセンサーよりも高い蛍光輝度を有することが明らかとなった。さらに、マウス生体脳でカルシウムイメージングとパッチクランプを同時におこない、活動電位に対する応答を調べたところ、RCaMP3 は既存のセンサーよりも非常に高い蛍光変化を示すことが明らかとなった。2 光子励起顕微鏡を用いた生体脳における神経活動イメージングにおいても、既存のセンサーと比較して高輝度かつ高感度に活動電位を検出可能であることが確認できた。

光遺伝学ツールについては、青色光で励起可能な微生物型ロドプシンのスクリーニングをおこない、活動電位を誘導可能オプシンの候補を新たに獲得することができた。さらに、オプシンと蛍光タンパク質間のリンカー部分を改変しオプシンのアミノ酸に変異を導入することで、コンダクタンスが増大した変異体を新たに獲得することに成功した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zhang Xiao Min, Yokoyama Tatsushi, Sakamoto Masayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Imaging Voltage with Microbial Rhodopsins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2021.738829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakamoto Masayuki, Inoue Masatoshi, Takeuchi Atsuya, Kobari Shigetaka, Yokoyama Tatsushi, Horigane Shin-ichiro, Takemoto-Kimura Sayaka, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Kano Masanobu, Kitamura Kazuo, Fujii Hajime, Bito Haruhiko	4. 巻 2
2. 論文標題 A Flp-dependent G-CaMP9a transgenic mouse for neuronal imaging in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100168 ~ 100168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crmeth.2022.100168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakamoto Masayuki, Ota Keisuke, Kondo Yayoi, Okamura Michiko, Fujii Hajime, Bito Haruhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 In utero electroporation and cranial window implantation for in vivo wide-field two-photon calcium imaging using G-CaMP9a transgenic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101421 ~ 101421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Tatsushi, Manita Satoshi, Uwamori Hiroyuki, Tajiri Mio, Imayoshi Itaru, Yagishita Sho, Murayama Masanori, Kitamura Kazuo, Sakamoto Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A multicolor suite for deciphering population coding in calcium and cAMP in vivo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.01.06.522686	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Engineering microbial rhodopsins for genetically encoded voltage indicators
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会JNS-CAN合同シンポジウム「Understanding of synaptic and neural circuits through advanced optical technologies.」（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 膜電位感受性プローブを用いた神経活動計測
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会シンポジウム「先端的イメージング技術で読み解く高次脳機能の仕組み」（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 膜電位感受性プローブを用いた神経活動計測
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Imaging voltage and biochemical signaling in vivo
3. 学会等名 Merocyanine 540/Flash meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Fluorescent biosensors for probing neuronal activity and biochemical signaling
3. 学会等名 Cell Biology, Developmental Biology, and Systems Biology Course Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 神経活動可視化のための蛍光プローブの開発と応用
3. 学会等名 第11回パラレル脳研究部門勉強会・セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto
2. 発表標題 Fluorescent biosensors for probing neuronal activity and biochemical signaling
3. 学会等名 Hamburg University - Kyoto University Joint Symposium "Cellular mechanisms of learning and memory" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 神経活動可視化のための蛍光プローブの開発と応用
3. 学会等名 第5回これからの神経回路研究の会 (招待講演)
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
デンマーク	University of Copenhagen			
イタリア	Istituto Italiano di Tecnologia			
米国	Yale University	Columbia University	University of Washington	
中国	Beijing Normal University			