

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19493

研究課題名（和文）広域・多色イメージングを実現する遺伝子改変マウスの作製と応用

研究課題名（英文）Generation and application of transgenic mice for wide-field and multi-color calcium imaging

研究代表者

坂本 雅行（Sakamoto, Masayuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：00777865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：高速・高感度カルシウムプローブを用いた広域・多色イメージングを実現に向けて、大脳皮質の興奮性ニューロンに赤色のカルシウムセンサーを、抑制性ニューロンに緑色のカルシウムセンサーをそれぞれ発現する新規トランスジェニックマウスの作製と評価をおこなった。スクリーニングの結果、2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングにおいて、自発発火や感覚刺激に対する蛍光変化を検出可能なマウスラインを樹立することができた。

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、一細胞レベルの解像度を保ちつつ、広域から多数のニューロンの活動を同時に計測する必要がある。本研究で樹立した新規遺伝子改変マウスを応用することで、興奮性ニューロンと抑制性ニューロン活動を計測することが可能となった。これらマウスを用いることで、興奮性ニューロンと抑制性ニューロン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理解できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：To achieve wide-field and multi-color calcium imaging with high-speed and high-sensitive calcium indicators, we generated and evaluated novel transgenic mice that express red calcium indicator and green calcium indicator in excitatory neurons inhibitory neurons, respectively. As a result, we succeeded to establish new transgenic lines that can detect fluorescent signals in response to spontaneous and sensory-evoked activity in vivo with two-photon microscopy.

研究分野：イメージング

キーワード：カルシウムイメージング 遺伝子改変マウス 2光子励起顕微鏡 多色イメージング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

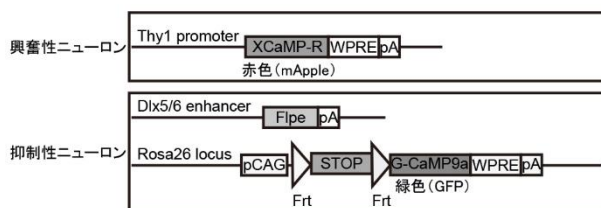
近年、高次脳機能解明のためのアプローチとして、2光子励起顕微鏡を用いた遺伝子にコードされたカルシウムセンサー (Genetically Encoded Calcium Indicator, GECI) による生体 (*in vivo*) 活動イメージングが急速な発展を遂げている。現在、GECI の生体への遺伝子導入法はアデノ随伴ウイルス (AAV) による方法が最も一般的であるが、ウイルスを用いた投与方法では、GECI の発現レベルがニューロンによって heterogeneous であることや細胞毒性などの問題があった。そのため、イメージングのデータより正確なニューロンの活動測定やスパイクの検出ができないでいた。また、AAV では、GECI の発現領域が局所的になるため、領野を広域からの活動イメージングのための導入法としても限界があった。高次脳機能を理解するためには、ニューロン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、広域から神経活動パターンを正確に計測する方法が今後必要不可欠ある。そのためには、ウイルスを用いた遺伝子発現誘導とは異なる方法を確立・応用する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入が持つ問題を解決するため、新規遺伝子改変マウスの作製ならびにその評価をおこなう。これまでの活動イメージングは、興奮性ニューロンのみにカルシウムセンサーを発現させた単色イメージングが主としておこなわれてきた。本研究では、緑色と赤色のカルシウムセンサーを用いることで、異なるポピュレーション (興奮性ニューロンと抑制性ニューロン) を異なる色で同時にイメージングが可能なマウスラインの作製をおこなう。

### 3. 研究の方法

興奮性ニューロンに赤色カルシウムセンサー (XCaMP-R)、抑制性ニューロンに緑色カルシウムセンサー (G-CaMP9a) をそれぞれ発現誘導可能なトランスジェニックマウスの作製をおこなった。作製したマウスについて、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に適用可能かの評価をおこなった。



### 4. 研究成果

(1) 赤色カルシウムセンサー (XCaMP-R) を興奮性ニューロンに発現する新規トランスジェニックマウスの作製と得られたラインのスクリーニングをおこなった。トランスジーンは、Thy1 プロモーター制御下で XCaMP-R を発現するようにデザインした。ファウンダーマウスのスクリーニングをおこなった結果、大脳皮質広域の興奮性ニューロンにおいて XCaMP-R の蛍光を観察可能なラインを獲得することができた。また、このマウスを用いて2光子励起顕微鏡下で生体活動イメージングをおこなった結果、自発発火に対する XCaMP-R の蛍光変化を観察することができた。

(2) 本研究グループでは、緑色カルシウムセンサー (G-CaMP9a) を Rosa26 遺伝子座にノックインし、Flp/FRT システムを用いて特定の細胞種をターゲット可能な遺伝子改変マウスの作製していた。抑制性ニューロン選択的に G-CaMP9a を発現させるため、このノックインマウスに抑制性ニューロン特異的に Flp 組み換え酵素を発現するトランスジェニックマウス (Dlx5/6-Flpe) を交配した。2光子励起顕微鏡を用いて生体カルシウムイメージングをおこなった結果、大脳皮質の抑制性ニューロン選択的な G-CaMP9a の発現が確認できた。さらに、自発発火ならびに感覚刺激に対する G-CaMP9a の蛍光変化を観察することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 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.	4. 巻 177
2. 論文標題 Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1360.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bando Y, Sakamoto M, Kim S, Ayzenshtat I, Yuste R	4. 巻 26
2. 論文標題 Comparative Evaluation of Genetically Encoded Voltage Indicators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 802 ~ 813.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.12.088	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masayuki Sakamoto, Masatoshi Inoue, Kazuki Sakai, Shigetaka Kobari, SayakaTakemoto-Kimura, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Haruhiko Bito.
2. 発表標題 Widefield sensory-evoked calcium imaging in excitatory and inhibitory neurons using a G-CaMP9a transgenic mouse
3. 学会等名 Sculpted Light in the Brain (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 個性創発メカニズム解明のための神経活動イメージング
3. 学会等名 新学術領域「個性」創発脳 第4 回若手の会・技術支援講習会（招待講演）
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 坂本雅行
2. 発表標題 膜電位感受性蛍光プローブを用いた神経活動イメージング
3. 学会等名 名古屋大学創薬科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Masayuki Saskamoto, Masatoshi Inoue, Kazuki Sakai, Shigetaka Kobari, SayakaTakemoto-Kimura, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Haruhiko Bito.
2. 発表標題 Widefield sensory-evoked calcium imaging in excitatory and inhibitory neurons using a G-CaMP9a transgenic mouse
3. 学会等名 Japan-UK Neuroscience Symposium 2019（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019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