

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18372

研究課題名(和文) 回路ロジックに迫る新規配列に基づく超高速多色Ca<sup>2+</sup>インディケータの開発研究課題名(英文) Rational design of ultrafast multicolor Ca<sup>2+</sup> indicator

研究代表者

井上 昌俊 (Inoue, Masatoshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・客員研究員

研究者番号：60750065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：複数の神経細胞の種類から構成されて、初めて正常な脳機能を発揮する脳神経回路原理を理解するためには、生きた動物個体内において特定の神経細胞種の活動を長期間測定できるセンサーの要求が高まっていた。しかしながらこれまで高速に発火する神経細胞の活動を計測するのは困難であった。また、これまで同時に3種類以上の神経細胞種の活動を計測方法が無かった。そこで、本研究課題ではこれらの問題を克服するべく、生体内で神経活動モニターできる、高速かつ複数の色域の神経活動センサーの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate how information is encoded and processed at the circuit, single neuron, and subcellular resolution in vivo, it is necessary to measure the activity of a specific neuronal cell type in a living animal. However, it has been difficult to resolve high frequency spiking of neurons, which is essential for deciphering the information code represented by individual neurons. Furthermore, there have been no methods for measuring the activities of more than 3 cell types simultaneously in vivo. Therefore, to overcome these problems, I succeeded in developing a series of neural activity sensors of ultrafast and multiple color palettes in vivo.

研究分野：神経生化学

キーワード：カルシウムセンサー

## 1. 研究開始当初の背景

脳は回路網における神経発火パターンにより情報を表現すると考えられる。近年、この発火パターンを読み取るために、神経発火の代用としてカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) インディケーターを用いて、数百-数千個の神経細胞の活動を同時記録する方法が取られつつある。特定の神経細胞種に発現させることができ、長期観察可能であるため、遺伝子にコードされた  $\text{Ca}^{2+}$  インディケーター (Genetically Encoded Calcium Indicator; 以下 GECI と略) が広く用いられている。しかしながら、従来の GECI は入力の有無もしくは強度のみを検出しており、どのような入力 (発火頻度、回数) であるかを読み取るには不十分であった。この問題点を解決するために、キネティクスが早く、  
発火回数と蛍光変化に線形の関係があり、  
広範囲の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を検出する GECI を開発することが望まれていた。、  
の条件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』の GECI を作出することが必要である。しかしながら、従来の全ての色域の GECI において、Hill 係数が 2 付近であったことから、複数の活動電位に対し非線形的に蛍光強度が変化し、また、広範囲の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を検出するのが困難であった。  
申請者は *in vivo* において単一活動電位を検出困難な従来の赤色 GECI である R-CaMP1.07 (Ohkura *et al.*, *Plos One*, 2012) の MLCK の  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 結合領域 (M13 配列) を CaMKK の  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 結合領域 (ckkap 配列) に置換した (R-CaMP2 と命名)。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 Hill 係数 1 付近の赤色 GECI を作出し、従来の高速 GECI の 4 倍の 40Hz もの高周波数の発火に追従する高速 GECI の作出に成功した (Inoue *et al.*, *Nat. Methods*, 2015)。  
しかしながら、赤色及び緑色 GECI のいずれ

においてもパルアルブミン (PV) 神経のようなバースト発火する、より発火回数及び頻度が大きい細胞の活動を読み取ることが課題として残されている。また、これまで生きたマウス個体で計測可能な色域は緑、赤色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

本研究では新規 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 かつダイナミックレンジが大きく、超高速の緑色、黄色、青色  $\text{Ca}^{2+}$  インディケーターを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、緑色、黄色、青色  $\text{Ca}^{2+}$  インディケーターを開発するために、以下の順にスクリーニングを行い、結果が基準に達していない場合、前のステップに戻る。

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

急性皮質スライスを用いたスクリーニング

*In vivo* における pyramidal 細胞細胞に発現させた候補プローブの性能評価

PV 神経細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング

## 4. 研究成果

緑色 GECI において、上記の - のスクリーニングの過程において、絞り込んだ複数の Hill 係数 1 付近の候補プローブについて、マウス感染実験をするためのウイルスベクターへパッケージし、産生・精製した。これを新潟大学崎村らとの共同研究にて作出された PV-Cre マウスの大脳皮質バレル野へ感

染させ、プローブ発現確認後、PV 神経における活動測定を試みた。

その結果、少なくとも一つの候補プローブについては、麻酔に伴う PV 神経の自発発火活動の状態変化のトラッキングに成功した。

多色（黄色及び青色）の GECI 作成においては上記の緑色 GECI を鋳型として、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、青色化したインディケータを単離した。これらを元にさらなる変異を導入し、最適化した黄色及び青色 GECI を作出する点変異部位を見出した。培養細胞を用いて、これらの 2 種類の GECI との緑色 GECI 及び赤色 GECI を用いて、同時に 4 種類の細胞グループの Ca<sup>2+</sup>イメージングに世界で初めて成功した。

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 3 件)

#### 英文論文

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.

#### 和文論文

3. 井上昌俊、尾藤晴彦 (2015). 神経活動を可視化する超高感度かつ超高速の赤色 Ca<sup>2+</sup>センサー「R-CaMP2」の開発. カレントトピックス. 実験医学 33 (8).

〔学会発表〕(計 16 件)

#### 招待講演

1. 中井淳一, 大倉正道, 永村ゆう子, 武藤彩, 井上昌俊, 尾藤晴彦, 川上浩一, 安藤恵子. ゼブラフィッシュおよび線虫の脳活動のリアルタイムイメージング. 第 38 回日本神経科学大会, 神戸国際会議場・神戸国際展示場(神戸), 2015 年 7 月 28-31 日.

2. Bito H, Kim R, Inoue M, Nonaka M, Ishii Y, Sakai K, Kawashima T, Yagishita-Kyo N, Matsushima A, Kamijo S, Okamura M, Goto M, Endo T, Horigane S, Okuno H, Takemoto-Kimura S, Fujii H. Postsynaptic mechanisms underlying activity-dependent adaptation of glutamatergic synapses. 第 93 回日本生理学会大会シンポジウム、札幌コンベンションセンター、2016 年 3 月 22-24 日

3. 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ブ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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

#### 学会発表（海外）

##### ポスター発表

8. **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 red calcium indicator for monitoring neuronal activity. The 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, USA, 2015年10月

17-21日

9. 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

10. **井上昌俊**, 竹内敦也, 堀金慎一郎, 大倉正道, 安藤恵子, 藤井哉, 上條諭志, 竹本-木村 さやか, 狩野方伸, 中井淳一, 喜多村和郎, 尾藤晴彦. 高感度、超高速赤色カルシウムインディケータの合理的設計による開発. 第38回日本神経科学大会, 神戸国際会議場・神戸国際展示場(神戸), 2015年7月28-31日.

11. **Inoue M**, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2. 第58回日本神経化学会大会, 大宮ソニックシティ(大宮), 2015年9月11-13日.

12. 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

## ポスタ 発表

13 Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H. Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII and Calcineurin., 第 7 回「光塾」, 広島大学 東広島キャンパス, 2015 年 9 月 5 日-6 日

14. 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

15. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamijo 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.

16. Koizumi K. Inoue M. Bito H. Yawo H. “All-optical analysis of mesoscopic circuit function in the primary somatosensory cortex of mice” 94<sup>th</sup> Annual meeting of the Physiological Society of Japan, Hamamatsu, Japan, 2017, 3. 30.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : カルシウム指示遺伝子

発明者 : 尾藤晴彦、井上昌俊、竹内敦也、中井淳一、大倉正道

権利者 : 国立研究開発法人 科学技術振興機構

種類 :

番号 : 2015JP002869 (PCT/JP2015/002869)

出願年月日 : 2015/6/8

国内外の別 : 日本、米国他

取得状況 (計 1 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  
[https://www.researchgate.net/profile/Masatoshi\\_Inoue](https://www.researchgate.net/profile/Masatoshi_Inoue)

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
井上 昌俊 (INOUE, MASATOSHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・客員研究員

研究者番号： 60750065

(2)研究分担者  
無し

(3)連携研究者  
無し

(4)研究協力者  
無し