

平成30年6月25日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14552

研究課題名(和文) 赤色の新規シナプスクロライドプローブの開発

研究課題名(英文) Development of novel synaptic red chloride probe

研究代表者

大倉 正道 (OHKURA, Masamichi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70369172

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)：神経細胞のシナプスへの抑制性入力による抑制性シナプス後電位(IPSP)は一過性に細胞内クロライド濃度上昇を起こすが、これまで生体レベルでIPSPによるクロライド上昇は可視化されていない。本研究では生体におけるIPSPの可視化を目指し、赤色の新規蛍光クロライドプローブのプロトタイプを遺伝子工学的に作製し、高感度で高い反応性を備えたプローブを選抜した。その結果、クロライド濃度変化での蛍光変化量が大きいプローブを見出した。蛍光変化量が大きいプローブは神経細胞に発現させ、抑制性入力での蛍光応答の大きさを指標として細胞での性能を評価した。

研究成果の概要(英文)：Increases in intracellular chloride ion concentrations of neurons following inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs) have not been visualized in vivo to date. In this study, aiming at detecting IPSPs in vivo, we developed a red fluorescent genetically encoded chloride probe with high responsivity. Then we expressed the probe in neuronal cells and assessed its functionalities, focusing on responses to inhibitory inputs.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経活動 抑制性シナプス クロライドプローブ 蛍光イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞の個々のシナプスへの興奮性入力による興奮性シナプス後電位 (EPSP) と抑制性入力による抑制性シナプス後電位 (IPSP) は時に可塑性を示しながら統合され、電気緊張電位として伝わり活動電位を発生させる。シナプスでの統合をより深く理解するためにはイオンの動きと膜電位の可視化が重要となる。IPSP は一過性に細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度上昇を起こすが、これまで生体レベルで IPSP による Cl<sup>-</sup> 上昇は可視化されていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、生体における IPSP の可視化を目指し、高感度で高い反応性を備えた赤色の新規蛍光 Cl<sup>-</sup> プローブを開発し、抑制性のシナプス可塑性を可視化により解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光 Cl<sup>-</sup> プローブの cDNA の作製 :

分子生物学的方法を用いて、我々が独自に改変を行った赤色蛍光タンパク質 RFP の cDNA と Cl<sup>-</sup> 結合タンパク質の cDNA を結合させ、大腸菌の発現ベクターに組み込んだ。また、PCR を用いた random mutagenesis により改変 RFP や Cl<sup>-</sup> 結合ドメインの cDNA にさらなる変異導入を行った。配列は制限酵素による解析および DNA シーケンスにより確認を行った。またタンパク質の精製を容易にするためプローブには His tag を付加した。

#### (2) 大腸菌での発現と in vitro 性能評価 :

作製した cDNA を大腸菌に発現させ、タンパク質発現を誘導した。目的のタンパク質は His tag を持っているため、His tag 用のアフィニティービーズを用いて精製した。Cl<sup>-</sup> 依存的な蛍光変化量の大きいプローブタンパク質については、蛍光分光光度計および分光光度計を用いて Cl<sup>-</sup> 濃度変化に対する蛍光変化量、Kd、ヒル係数、モル吸光係数、量子効率を測定した。

#### (3) 培養神経細胞での性能評価 :

In vitro 性能評価で選抜されたプローブを培養神経細胞に発現させ、微小な過分極での蛍光応答の大きさを指標として、これらの IPSP の検出に有望な Cl<sup>-</sup> プローブをさらに絞り込んだ。これにより、(2) から期待される性能が培養神経細胞レベルでも再現できるか確認した。具体的には、分子生物学的手法により有望な Cl<sup>-</sup> プローブのプロトタイプを動物細胞発現ベクターに組み込んだ。作製した DNA を培養神経細胞にリポフェクション法により導入した。Cl<sup>-</sup> プローブのプロトタイプと GABA<sub>A</sub> 受容体またはグリシン受容体を同時に発現させた培養神経細胞をアゴニスト溶液 (IPSP 程度の過分極を起こす濃度の GABA またはグリシンを含有する灌流液) で刺激し、その際の蛍光変化を蛍光顕微鏡を用い

て測定した。

### 4. 研究成果

Cl<sup>-</sup> 結合タンパク質を Cl<sup>-</sup> 感受性素子として活用しながら、我々が独自に改変を行った赤色蛍光タンパク質 RFP の cDNA を基に Cl<sup>-</sup> プローブのプロトタイプ群を遺伝子工学的に作製した。その結果、Cl<sup>-</sup> 濃度変化での蛍光変化量が大きいプローブを見出した (図1)。

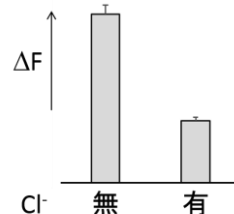


図1 精製した Cl<sup>-</sup> プローブの蛍光変化

蛍光変化量が大きいプローブは神経細胞に発現させ、GABA 受容体やグリシン受容体の刺激での蛍光応答を指標として細胞での性能を評価した結果、受容体刺激に伴って一過性に蛍光変化を示すことを見出した (図2)。

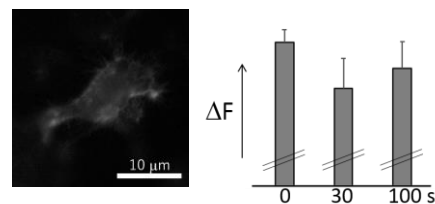


図2 細胞膜にプローブを発現させた神経細胞 (左) へのグリシン投与による蛍光変化 (右)

この有望なプローブは、これまで作製したプローブの変異部分を種々の組み合わせでシャッフルすることにより、また PCR を用いた random mutagenesis を行うことにより、さらなる改良を進めている。

### 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9件)

- ① Sato M, Motegi Y, Yagi S, Gengyo-Ando K, Ohkura M, Nakai J: Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain. *Biomed Opt Express* **8**, 4049-4060 (2017). 査読有 doi: 10.1364/BOE.8.004049
- ② Kondo M, Kobayashi K, Ohkura M, Nakai J, Matsuzaki M: Two-photon calcium imaging of the medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion. *eLife* **6**:e26839, 1-20 (2017). 査読有 doi: 10.7554/eLife.26839.001
- ③ Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Ohkura M, Fei X, Chen M, Hashimoto K,

- Nakai J: A new platform for long-term tracking and recording of neural activity and simultaneous optogenetic control in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci Methods* **286**, 56-68 (2017). 査読有  
doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.05.017
- ④ Bethge P, Carta S, Lorenzo DA, Egolf L, Goniotaki D, Madisen L, Voigt FF, Chen JL, Schneider B, Ohkura M, Nakai J, Zeng H, Aguzzi A, Helmchen F: An R-CaMP1.07 reporter mouse for cell-type-specific expression of a sensitive red fluorescent calcium indicator. *PLoS One* **12**:e0179460, 1-19 (2017). 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0179460
- ⑤ 大倉 正道, 中井 淳一: Ca<sup>2+</sup>センサー G-CaMP の進歩. *生体の科学* **68**(5), 442-443 (2017). 査読有  
doi: 10.11477/mf.2425200685
- ⑥ Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U: Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* **538**, 388-391 (2016). 査読有  
doi: 10.1038/nature19815
- ⑦ Inutsuka A, Yamashita A, Chowdhury S, Nakai J, Ohkura M, Taguchi T, Yamanaka A: The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. *Scientific Reports* **6**:29480, 1-15 (2016). 査読有  
doi: 10.1038/srep29480
- ⑧ Yabuki Y, Koide T, Miyasaka N, Wakisaka N, Masuda M, Ohkura M, Nakai J, Tsuge K, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Yoshihara Y: Olfactory receptor for prostaglandin F<sub>2α</sub> mediates male fish courtship behavior. *Nature Neuroscience* **19**, 897-904 (2016). 査読有  
doi: 10.1038/nn.4314
- ⑨ 大倉 正道, 中井 淳一: 高性能な赤色蛍光 Ca<sup>2+</sup>プローブタンパク質. *化学工業* **67**, 13-20 (2016). 査読無  
ISSN:0451-2014
- [学会発表] (計39件)
- ① 中井 淳一, 大倉 正道, 佐藤 正晃, 安藤 恵子: タンパク質でできた蛍光センサーによる生体内カルシウムイメージング. レーザー学会技術講演会シンポジウム (招待講演), 2018年
- ② 真仁田 聡, 池添 貢司, 佐藤 正晃, 大倉 正道, 中井 淳一, 林 康紀, 喜多村 和郎: 小脳苔状線維活動のカルシウムイメージングによる解析. 第95回日本生理学会大会, 2018年
- ③ 大倉 正道: 遺伝子コード型プローブを用いた Ca<sup>2+</sup>イメージング. 滋賀医科大学 第123回実験実習支援センターセミナー (招待講演), 2017年
- ④ 大倉 正道: 遺伝子コード型プローブを用いた Ca<sup>2+</sup>イメージング. 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演), 2017年
- ⑤ 中井 淳一, 大倉 正道, 佐藤 正晃, 安藤 恵子: 新規電位センサー・カルシウムセンサーを用いた神経活動測定. 第40回日本神経科学大会シンポジウム (招待講演), 2017年
- ⑥ 大倉 正道: Ca<sup>2+</sup>指示タンパク質. 新学術領域研究「温度生物学」第2回若手の会 (招待講演), 2017年
- ⑦ 大倉 正道: G-CaMP/R-CaMP テクノロジー. 日本薬学会第137年会シンポジウム (招待講演), 2017年
- ⑧ Ghandour K, Ohkawa N, Fung CCA, Saitoh Y, Takekawa T, Asai H, Okubo-Suzuki R, Nomoto M, Soya S, Tsujimura S, Nishizono H, Matsuo M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Sakurai T, Osanai M, Fukai T, Inokuchi K: Unraveling the dynamism of engram cells during contextual memory processing. *Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting* (国際学会), 2017年
- ⑨ Kondo M, Kobayashi K, Nakai J, Ohkura M, Matsuzaki M: Two-photon calcium imaging of medial prefrontal cortex and hippocampus without cortical invasion. *Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting* (国際学会), 2017年
- ⑩ Takamura R, Mizuta K, Sekine Y, Islam T, Saito T, Takekawa T, Ohkura M, Fukai T, Nakai J, Saido TC, Hayashi Y: Functional breakdown processes of neural circuits in hippocampal CA1 region of Alzheimer's disease model mice. *Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting* (国際学会), 2017年
- ⑪ Sato M, Mizuta K, Islam T, Kawano M, Takekawa T, Gomez-Dominguez D, Yamakawa H, Ohkura M, Fukai T, Nakai J, Hayashi Y: Cellular mechanisms for the formation and plasticity of hippocampal cognitive maps. *Society for Neuroscience 2017 Annual Meeting* (国際学会), 2017年
- ⑫ 大川 奈菜子, 島井 光太郎, 大倉 正道, 中井 淳一, 堀江 健生, 久原 篤, 日下部 岳広: カルシウムイメージング法によるホヤ幼生 gnrh 発現細胞の活動記録. 第40回日本分子生物学会年会 (ConBio2017), 2017年
- ⑬ Osanai M, Ohkawa N, Kamiya A, Inami C, Sato M, Ohkura M, Kojima T, Kohmura Y, Hayashi Y, Yanagawa Y, Ohsawa M, Nakai J, Inokuchi K, Homma N, Mushiake H: Ultra-thin fluorescence endoscope imaging system for functional biological imaging. 計

- 測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2017, 2017 年
- ⑭ 中井 淳一, 大倉 正道, 橋本 浩一, 安藤 恵子: 線虫自動追尾装置による神経活動の可視化. 生理研研究会「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」, 2017 年
  - ⑮ 茂木 優貴, 佐藤 正晃, 安藤 恵子, 沖 篤志, 岩井 陽一, 毛内 拓, 平瀬 肇, 大倉 正道, 中井 淳一: 複数の空間スケールのカルシウムイメージングにより明らかにされる感覚誘発大脳皮質ダイナミクス. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ⑯ 蝦名 鉄平, 正水 芳人, 平川 玲子, 渡我部 昭哉, 大倉 正道, 小林 憲太, 額 大輔, 南部 篤, 彦坂 和雄, 佐々木 えりか, 中井 淳一, 山森 哲雄, 松崎 政紀: 頭部固定コモンマーマセット一次運動野における前肢運動課題実行中の2光子イメージング. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ⑰ 水田 恒太郎, 佐藤 正晃, 関根 友紀子, 河野 真子, イスラム タンビル, 高村 理沙, 竹川 高志, 大倉 正道, 深井 朋樹, 中井 淳一, 林 康紀: 海馬 CA1 セルアセンブリによる報酬事象表現. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ⑱ 近藤 将史, 大倉 正道, 中井 淳一, 小林 憲太, 松崎 政紀: 内側前頭野における皮質内非侵襲的な二光子カルシウムイメージング法の開発. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ⑲ 寺田 晋一郎, 大倉 正道, 中井 淳一, 小林 憲太, 松崎 政紀: 超視野 2 光子励起顕微鏡による単一細胞解像度での複数視野同時イメージング法の開発. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ⑳ 吉田 恵梨子, 寺田 晋一郎, 大倉 正道, 中井 淳一, 小林 憲太, 松崎 政紀: 大脳皮質に投射した視床軸索の広視野カルシウムイメージング. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ㉑ 小山内 実, 大川 宜昭, 坂本 一寛, 三輪 秀樹, 菊田 里美, 田村 篤史, 佐藤 正晃, 大倉 正道, 小島 太郎, 幸村 裕治, 中井 淳一, 林 康紀, 柳川 右千夫, 井ノ口 馨, 本間 経康, 虫明 元: 脳機能イメージングのための極微細蛍光内視鏡イメージングシステム. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ㉒ Ghandour K, Ohkawa N, Fung CCA, Saitoh Y, Takekawa T, Asai H, Okubo-Suzuki R, Nomoto M, Tsujimura S, Nishizono H, Matsuo M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Fukai T, Inokuchi K: Identification of characteristic dynamism of engram cells during learning. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ㉓ 佐藤 正晃, 水田 恒太郎, Islam T, 河野 真子, 竹川 高志, Gomez-Dominguez D, 山川 宏, 大倉 正道, 深井 朋樹, 中井 淳一, 林 康紀: 海馬認知地図形成の神経細胞ダイナミクス. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ㉔ 高村 理沙, 水田 恒太郎, 関根 友紀子, Islam T, 齊藤 貴志, 竹川 高志, 大倉 正道, 深井 朋樹, 中井 淳一, 西道 隆臣, 林 康紀: アルツハイマー病モデルマウス海馬 CA1 領域における神経機能回路の破綻過程. 第40回日本神経科学大会, 2017 年
  - ㉕ 高村 理沙, 水田 恒太郎, 関根 友紀子, イスラム タンビル, 齊藤 貴志, 大倉 正道, 中井 淳一, 西道 隆臣, 林 康紀: アルツハイマー病モデルマウス海馬 CA1 領域における神経回路破綻過程の可視化. 第94回日本生理学会大会, 2017 年
  - ㉖ 佐藤 正晃, 茂木 優貴, 安藤 恵子, 大倉 正道, 中井 淳一: 高速可変焦点機能を備えた新型内視鏡による超深部脳二光子イメージング. 第90回日本薬理学会年会, 2017 年
  - ㉗ Takeo Horie, Masamichi Ohkura, Kotaro Shimai, Ryoko Horie, Yasunori Sasakura, Takehiro G. Kusakabe, Junichi Nakai, Michael S. Levine, Masashi Nakagawa: Calcium imaging and single cell optogenetic analysis of a neural circuit for generate swimming locomotion of the *Ciona intestinalis* larva. *The 22nd International Zoological Meeting Symposium (招待講演) (国際学会)*, 2016 年
  - ㉘ Masatoshi Inoue, Atsuya Takeuchi, Shin-ichiro Horigane, Hajime Fujii, Satoshi Kamijo, Sayaka Takemoto-Kimura, Masamichi Ohkura, Keiko Gengyo-Ando, Masanobu Kano, Junichi Nakai, Kazuo Kitamura, Haruhiko Bito: Rational design of ultrafast, high-affinity calcium indicators for monitoring neuronal activity. *The 7th International Neural Microcircuit Conference (国際学会)*, 2016 年
  - ㉙ S.-I. Terada, M. Ohkura, J. Nakai, M. Matsuzaki: Super-field two-photon microscopy for simultaneous imaging of multiple cortical areas at cellular resolution. *Society for Neuroscience 2016 Annual Meeting (国際学会)*, 2016 年
  - ㉚ K. Mizuta, M. Sato, Y. Sekine, M. Kawano, T. Islam, R. Takamura, T. Masumoto, T. Takekawa, M. Ohkura, T. Fukai, J. Nakai, Y. Hayashi: Temporal coding of reward event by subpopulations of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Society for Neuroscience 2016 Annual Meeting (国際学会)*, 2016 年
  - ㉛ M. Sato, K. Mizuta, T. Islam, M. Kawano, T. Takekawa, D. Gomez-Dominguez, H. Yamakawa, M. Ohkura, T. Fukai, J. Nakai,

- Y. Hayashi: Preferential stabilization of behaviorally relevant spatial representations in the hippocampal place map. *Society for Neuroscience 2016 Annual Meeting (国際学会)*, 2016年
- ③② P. Bethge, L. Eglolf, D.A. Lorenzo, D. Goniotaki, L. Madisen, F.F. Voigt, M. Ohkura, J. Nakai, H. Zeng, A. Aguzzi, F. Helmchen: A TIGRE reporter mouse line driving Cre- and tTA-dependent expression of the red calcium indicator R-CaMP1.07. *Society for Neuroscience 2016 Annual Meeting (国際学会)*, 2016年
- ③③ Kotaro Mizuta, Masaaki Sato, Yukiko Sekine, Masako Kawano, Tanvir Islam, Risa Takamura, Takashi Takekawa, Masamichi Ohkura, Tomoki Fukai, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi: Representation of reward event by hippocampal CA1 pyramidal neurons. 第13回日韓脳科学・心筋・平滑筋合同シンポジウム (国際学会), 2016年
- ③④ Yoichi Yabuki, Tetsuya Koide, Nobuhiko Miyasaka, Noriko Wakisaka, Miwa Masuda, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Kyoshiro Tsuge, Soken Tsuchiya, Yukihiko Sugimoto, Yoshihiro Yoshihara: Olfactory receptor for prostaglandin F2 $\alpha$  mediates courtship behavior of male zebrafish. *The 17th International Symposium on Olfaction and Taste (国際学会)*, 2016年
- ③⑤ 安藤 恵子, 永村 ゆう子, 大倉 正道, 橋本 浩一, 中井 淳一: チラミンによる線虫運動ニューロン活動の制御. 第39回日本神経科学大会, 2016年
- ③⑥ 小泉 協, 佐藤 正晃, 中井 淳一, 大倉 正道, 林 康紀, 八尾 寛: マウス大脳皮質メゾスコピック回路機能研究のオール光アプローチ. 第39回日本神経科学大会, 2016年
- ③⑦ 佐藤 正晃, 水田 恒太郎, Tanvir Islam, 河野 真子, 竹川 高志, Daniel Gomez-Dominguez, 山川 宏, 大倉 正道, 深井 朋樹, 中井 淳一, 林 康紀: 行動上重要な場所の表象は海馬 CA1 場所地図において優先的に安定化される. 第39回日本神経科学大会, 2016年
- ③⑧ 毛内 拡, 大倉 正道, 田中 三佳, 大江 佑樹, 今野 歩, 平井 宏和, 御子柴 克彦, 糸原 重美, 中井 淳一, 岩井 陽一, 平瀬 肇: 経頭蓋直流電気刺激が誘起する可塑性におけるグリア細胞の関与. 第39回日本神経科学大会, 2016年
- ③⑨ 三輪 佳子, 李 鍾國, 安河内 絢, 大倉 正道, 中井 淳一, 坂田 泰史, 宮川 繁, 澤 芳樹: Ca 感受性蛍光プローブ蛋白発現による iPS 細胞由来心筋細胞興奮特性の長期観察技術の開発. 第37回日本炎症・再生医学会, 2016年

〔図書〕 (計1件)

- ① 浅沼 幹人, 荒木 敏之, 五十嵐 道弘, 井川 正道, 上村 紀仁, 碓井 理夫, 内山 安男, 漆谷 真, 大海 雄介, 大倉 正道, 大西 浩史, 岡沢 秀彦, 岡野 ジェイムス 洋尚, 岡村 均, 岡村 康司, 小川 優樹, 貝塚 剛志, 柿澤 昌, 河西 春郎, 加藤 英政, 他79名: (株)メディカルドウ, 脳内環境辞典, 2017年, 156

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 高輝度な緑色蛍光カルシウムセンサー蛋白質  
 発明者: 大倉 正道, 中井 淳一  
 権利者: 国立大学法人埼玉大学  
 種類: 特許  
 番号: 特許願 2017- 80368 号  
 出願年月日: 平成 29 年 4 月 14 日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等  
 埼玉大学 研究機構 脳末梢科学研究センター  
<http://subsai.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 正道 (OHKURA, Masamichi)  
 埼玉大学・理工学研究科・准教授  
 研究者番号: 70369172