

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19442

研究課題名（和文）E-SAREと次世代GECIを活用した神経活動可視化操作ツールキットの創成と応用

研究課題名（英文）Development and application of a toolkit to visualize/manipulate neural activity using E-SARE and next-generation GECIs

研究代表者

尾藤 晴彦（BITO, Haruhiko）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：00291964

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞種特異的に多色の次世代GECIプローブを同時に発現する実験システム構築に向けた開発を行い、特に青色GECI（XCaMP-B）、並びに黄色GECI（XCaMP-Y）を創出し、赤/緑GECIなどと共計測する条件を定め、シナプスプレポストに発現するシステムの構築を試みた。一方、活動応答性人工プロモーターE-SAREの原理に基づき、記憶痕跡細胞ネットワークにのみ発現誘導させる遺伝子改変マウスを用い、長期記憶操作実験を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子生物学・生化学・解剖学・生理学・神経細胞生物学等の手法を結集して、長期記憶の想起を制御する神経細胞ネットワークを同定し、個々の細胞活動を*in vivo*脳で計測・操作することは、脳神経科学の大きなチャレンジのひとつである。本研究により、従来のシナプス可塑性シグナル解析と遺伝子改変動物の行動学的長期記憶解析との間の大きな溝を埋め、覚醒非拘束動物において記憶想起に必要なかつ十分な細胞集団の神経活動動態計測が実現する端緒となる成果が得られた。

研究成果の概要（英文）：We constructed an experimental system that simultaneously expresses multi-color next-generation GECI probes in a cell type-specific manner, through creating novel blue GECI (XCaMP-B) and yellow GECI (XCaMP-Y). We then defined conditions to co-express and co-measure multi-color GECIs *in vivo*, and succeeded in recording neuronal activity in synaptic pre- and postsynaptic pairs. Furthermore, based on the principle of the synthetic activity-responsive promoter E-SARE, we created a transgenic mouse line in which long-term memory manipulation experiments could be performed in a genetically tagged memory trace network.

研究分野：神経生化学

キーワード：神経科学 脳・神経 シグナル伝達 神経活動

1. 研究開始当初の背景

長期記憶に関わる、ごく少数の分散した神経細胞からなる「神経ネットワーク」に関わる細胞は、大脳皮質表層のみならず、皮質下深部にも散在するため電極のみや2光子顕微鏡のみではアプローチできない。このためこの神経ネットワークを構成する細胞の神経活動を、記憶想起時に記録することはこれまで不可能であった。そこで本研究に先立ち、①この少数の細胞を「遺伝子発現亢進」を指標に選択的に標識する技術を申請者は世界に先駆け確立してきた（Kawashima et al. *Nature Met* 2013; Vousden et al. *Brain Struc Func* 2015）。また、②これらの活性化した少数細胞集団における神経活動動態を光学的に正確に、かつ脳内深部で記録するため、線形的に神経活動に応じて蛍光シグナルが出力される第2世代赤色カルシウム指示蛋白質R-CaMP2を合理的デザインにより創製し（Inoue et al. *Nature Met* 2015; Kim et al. *Nature Met* 2016）、さらに③これを上回る次世代赤色カルシウム指示蛋白質XCaMP-R（Inoue et al. 投稿準備中）の設計が完成している。本研究では、このような少数精鋭の神経細胞ネットワークの神経活動動態を選択的に計測・操作可能にする神経活動可視化操作ツールキットの創出と応用を実現する。

2. 研究の目的

分子生物学・生化学・解剖学・生理学・神経細胞生物学等の手法を結集して、長期記憶想起を制御する細胞ネットワークと、これを構成する細胞集団の集団的活動を、自由行動下の *in vivo* 脳で計測し、操作することは、脳神経科学の大きなチャレンジのひとつである。本研究では、記憶細胞集団を標識可能な人工プロモータ E-SARE と、次世代カルシウム指示タンパク質とをベースに、電極フリーで全光学的な神経活動計測・操作を実現する革新的な光遺伝学ベクターを開発し、長期記憶固定と想起に関与する細胞ネットワークの *in vivo* 活動動態を解明するための基盤ツールキットを創出する。

これにより、従来のシナプス可塑性シグナル解析と遺伝子改変動物の行動学的長期記憶解析との間の大きな溝を埋め、覚醒非拘束動物における細胞レベルの神経活動動態計測が初めて実現する端緒となると期待される。

3. 研究の方法

平成 29 年度研究計画

全光学的探索（all-optical interrogation）を実現するため、アデノ随伴ウイルス骨格ベースに光ベクターを作出し、少量生産する。具体的には、長期記憶に関わる脳領域へ、遺伝子コードされた神経活動インディケータ（4色の次世代カルシウムインディケータXCaMP など）ならびに光依存的な神経活動活性化・抑制因子（ChR2 など）を導入するため、アデノ随伴ウイルスベクターを設計する。一波長刺激（黄色でチャンネルロドプシン等を刺激）/ 一波長記録（緑色蛍光インディケータ記録）を選択的に実現するため、長期記憶関連細胞ネットワークにのみ特異的に発現させるベクターにおいては E-SARE の下流で、薬剤依存的 DNA 組換え酵素 FLP を誘導し、この酵素によって、遺伝子の向きが逆転するような仕掛け（fDIO など）でベクター構築を行う。

平成 30 年度研究計画

平成 29 年度の計画に引き続き、少数精鋭細胞ネットワークの集団的活動を統合し、制御する活動アルゴリズムを抽出するため、光学的データ記録・解析法のパイプラインを構築する。具体的には、前年度に構築したウィルスベクター各種を大量に生産し、in vivo マウス海馬に投与し、長期記憶課題遂行中の神経ネットワーク活動を光学的に記録し、その途中での光操作の可能性を検討する。特に、黄色（あるいは青色）レーザーを用い、光遺伝学的刺激・抑制を実施、神経ネットワーク活動の擾乱を起こし、その際の神経活動と、記憶パフォーマンスへの行動学的影響を計測する。行動学的効果と相関を示す細胞集団の活動原理を抽出するアルゴリズムを作成する。

4. 研究成果

本研究では、これまでの開発してきた多様な神経活動の細胞種特異的光学的計測・操作手法を結集し、長期記憶想起を制御する細胞ネットワークの活動の解明に資するツールの改良と実証と試みた。特に、細胞種特異的に多色の次世代 GECI プローブを同時に発現する実験システム構築に向けた開発を行い、青色 GECI (XCaMP-B)、並びに黄色 GECI (XCaMP-Y) を創出し、赤/緑 GECI などと共計測する条件を定め、シナプスプレポストに発現するシステムの構築を試みた。さらに、活動応答性人工プロモーターE-SARE の原理に基づき、記憶痕跡細胞ネットワークにのみ発現誘導させる遺伝子改変マウスを用い、長期記憶操作実験を実施した。

これらの成果に基づき、今後、覚醒非拘束動物において記憶想起に必要かつ十分な細胞集団の神経活動動態計測を実現する基盤が樹立されたと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S-i, 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**. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell*, 177: 1346-1360, 2019. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.007. 査読有り
2. Kikuchi K, Ihara D, Fukuchi M, Tanabe H, Ishibashi Y, Tsujii J, Tsuda M, Kaneda M, Sakagami H, Okuno H, **Bito H**, Yamazaki Y, Ishikawa M, Tabuchi A. Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the Arc gene. *J Neurochem*. 148: 204-218, 2019. doi: 10.1111/jnc.14596. 査読有り
3. Attardo A, Lu J, Kawashima T, Okuno H, Fitzgerald JE, **Bito H**, Schnitzer MJ. Long-term consolidation of ensemble neural plasticity patterns in hippocampal area CA1. *Cell Reports*, 25: 640-650, 2018. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.064. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. **Bito H**. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Brain Science

Institute Seminar, Korean Institute of Science and Technology, Seoul, Korea. (招待講演)
2017年

2. **Bito H.** CREB-Arc signaling in long-term memory formation. Department of Neuroscience Seminar, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. (招待講演) 2017年

〔産業財産権〕

○取得状況 (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：科学技術振興機構

種類：特許

番号：第 6462684 号

取得年：2019年

国内外の別：国内

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。