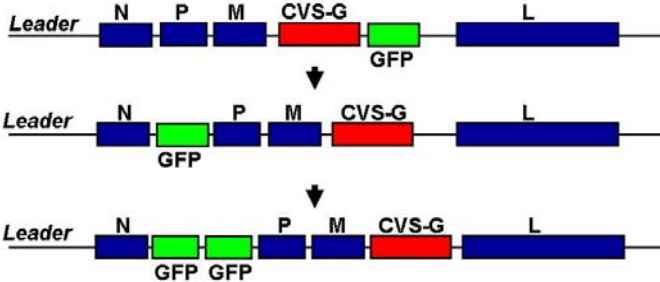


## 平成 17 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 18 年 3 月 6 日提出

ふりがな	いじま としお	所属・職	東北大学大学院生命科学研究所・ 教授
開発代表者名	飯島敏夫		
開発課題名	標的神経回路選択的な光学的神経活動計測用分子プローブシステムと測定機器の開発		
<p><b>開発経過及び成果</b> (開発目標に対する成果を計画書に記載した内容に対応させて記載すること)</p> <p>本研究では以下の項目を研究開発内容とし、標的神経回路選択的な光学的神経活動計測用分子プローブ技術の実用化を目指している。</p> <p>1) 膜電位感受性 FRET システムの実用化研究  2) 微弱蛍光現象の超高速イメージング装置の開発  3) 神経回路中の標的ニューロンに種々の機能分子を発現させるベクターシステムの開発  それぞれについての進捗状況を記す。</p> <p><b>1) 膜電位感受性 FRET システムの実用化研究</b>  <i>in vitro</i> 脳スライス実験ではほぼ十分なプローブタンパク発現量が得られたが、大脳皮質からの <i>in vivo</i> 光計測ではプローブタンパク発現量をさらに増やす必要があることが明らかになり、以下のようなウイルスベクターの遺伝子構造改変を行い、これまでより高いプローブタンパク産生量が得られるようになった。</p>  <p>左図のように順次、ベクターの遺伝子配列、数を変更し、最終段の組み合わせで、従来の数倍の GFP 産生量を得ることができた。現在、この改変ウイルスベクターを用いて <i>in vivo</i> 試験が進行中である。</p> <p><b>2) 微弱蛍光現象の超高速イメージング装置の開発</b>  背面照射型でかつ各素子が独立した増幅系を有する既存では最高感度、最高速の EMCCD カメラシステムの性能評価を我々の開発した膜電位感受性 FRET システムを用いて行った。その結果、現状の測定機器では 1 画面取得に約 4 ミリ秒の時間が必要であり、微弱光で高速に変異する生理現象を捉えるための機器開発が必要であることが再確認された。またこの実験から開発に必要な要素、すなわち受光素子サイズやノイズ軽減のための回路設計など、有用な知見が得られた。</p> <p><b>3) 神経回路中の標的ニューロンに種々の機能分子を発現させるベクターシステムの開発</b>  狂犬病ウイルスベクターは <math>\beta</math>-Gal 遺伝子などを組み込むことにより、神経回路トレーサーとして活用できる。またそれぞれ異なるレポータータンパク遺伝子を組み込んだウイルスベクターを用いると神経細胞の 2 重標識が可能であると考えられた。この実現にはウイルスの多重感染の問題をクリアする必要があったが、<i>in vitro</i> 実験等を経て、技術確立に成功した (2005 年、北米神経科学学会にて発表)。</p> <p>&lt;口頭発表&gt;  ・飯島敏夫: 脳の機能的構造を光・分子超高速イメージングでさぐる、統合脳サテライトシンポジウム (2005 年 8 月)  ・Ohara S, Inoue K, Yamada M, Iijima T: Double labeling of neurons by different marker proteins expressed by recombinant rabies virus. 35<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience (2005)</p> <p>&lt;発表論文&gt;  1. Koike Y, Hirose H, Sakurai Y, <u>Iijima T</u>: Prediction of arm trajectory from a small number of neuron activities in the primary motor cortex. <i>Neurosci. Res.</i>, in press (2006)  2. Inase M, Li B-M, Takashima I, <u>Iijima T</u>: Cue familiarity is represented in monkey medial prefrontal cortex during visuomotor association learning. <i>Exp Brain Res</i>, 168: 281-286 (2006)  3. Kondo Y, Suzuki M, Mugikura S, Abe N, Takahashi S, <u>Iijima T</u>, Fujii T: Changes in brain activation associated with use of a memory strategy: a functional MRI study. <i>NeuroImage</i> 24: 1154-1163 (2005)  4. Takashima I, Kajiwar R, <u>Iijima T</u>: Voltage-sensitive dye imaging of interwhisker-evoked activity in the rat somatosensory cortex. <i>Neuroscience Letters</i> 381, 258-263 (2005)</p> <p>&lt;成果発表会&gt; 平成 18 年 3 月 22 日にこれまでの成果を東北大学を会場として一般公開</p>			

## 開発成果を踏まえた今後の展開

### 1) 膜電位感受性 FRET システムの実用化研究

我々が開発を進めている技術の基本構成はa) 膜電位依存性FRET現象をタンパク分子プローブを発現した神経細胞に実現し膜電位変化を蛍光強度変化として光学的に捉える技術と、b) 標的神経細胞のみに分子プローブを発現させるための、狂犬病ウイルスを用いた分子プローブ遺伝子の多段シナプス輸送と発現制御とから成る。このシステムではFRETドナーとして蛍光タンパク分子を用いているため、そのタンパク遺伝子をウイルスベクターを用いて神経回路にそって輸送し、標的ニューロンに発現させることにより、標的ニューロンのみから膜電位変化を膜電位感受性FRETシグナルとして取り出すことが可能である。一方、FRETアクセプターとして、オキソノール系色素であるDiSBAC6(5)などを用いている。

これまでの研究から得られた結論として、*in vivo*計測における本技術の改良点は、十分なドナータンパクの蛍光量を得ること、およびアクセプターの神経組織親和性を高める事の2点である。そこで平成18年度の研究では以下の2点に主眼を置き、研究を進める。

#### ・ FRET ドナーの改良

平成17年度の研究でウイルスベクターの遺伝子構造改変を行い、これまでより高いプローブタンパク産生量が得られるようになった。しかしこの改良だけでは必ずしも十分なドナー効率を得られない場合も認められたので、プローブタンパク (FRET ドナー) を構造から抜本的に変更する試みを行う。従来は GFP (例えば Venus) を細胞膜に結合するタグとして Lyn を用い、Lyn-Venus を FRET ドナーとして用い、その遺伝子を組み込んだウイルスベクターを作成してプローブタンパクを神経細胞に発現させていた。

より特異的な細胞膜局在化、それによる FRET シグナルの増強また、Venus の C 末に繋げるため (Lyn は内側) の発色団形成効率の上昇などの効果を見込んで、これまで開発した高発現ベクター (伝播能保持) に、ミスチリン化細胞膜以降シグナルである Lyn でなく、ファルネシル・ゲラニル化シグナルである CAAX Box を付加した Venus を組み込んだプラスミドを作成し、Lyn-Venus より優れたプローブドナーを神経細胞に発現させる。

#### ・ FRET アクセプターの改良

アクセプターとして DiSBAC4(5) などの、神経組織へのより高い親和性が期待できるプローブを合成し、現在、抱えている低い染色性の問題を解決して、*in vivo* 実験に、より適した膜電位感受性 FRET システムを構築する。

### 2) 微弱蛍光現象の超高速イメージング装置の開発

平成17年度に行った実験から得られた知見をもとに、新しい撮像素子と回路の設計にかかる。

### 3) 神経回路中の標的ニューロンに種々の機能分子を発現させるベクターシステムの開発

平成17年度には2つ、あるいはそれ以上の神経回路がある部分で結合しているのか、それとも近傍に配位はするが実はそれぞれが独立しているのか、などを検証するため、狂犬病ウイルスの神経回路に沿った経シナプス的なレポータータンパク遺伝子輸送を利用した神経細胞の2重標識技術を開発した。開発したベクターは  $\beta$ -Gal 遺伝子、あるいは RFP 遺伝子などを組み込んだものである。平成18年度はさらに新規ベクターを作成するとともに、それらベクターを利用して神経回路の構造解析を進める。平成17年度の研究については現在、論文作成中であり、その発表により技術を広く公開する。また、ベクターは必要とされる研究者に配布する。