

平成 18 年度 研究リソース開発 成果報告書

平成 19 年 2 月 28 日提出

| | | | |
|---|--|------|-----------------------|
| ふりがな | いいじま としお | 所属・職 | 東北大学大学院生命科学研究科 ・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>開発経過及び成果（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><膜電位感受性 FRET システムの実用化研究></p> <p>我々は観測したい神経回路に含まれるニューロン集団だけの活動を選択的に検出できる分子プローブ技術を発案した。この技術の基本構成は膜電位感受性 FRET と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から成る。FRET ドナーとして GFP を、アクセプターとして oxonol を用いている。ウイルスベクターを用いて神経回路にそって経シナプスの GFP 遺伝子を輸送し、標的ニューロンに発現させる。これによって標的神経回路選択的な光学的神経活動計測を実現するという、世界的にも初めての試みである。これまで研究で我々は GFP とオキシノールを用いた膜電位感受性 FRET と、開発した狂犬病ウイルスベクターを組み合わせることで初代神経培養細胞において活動電位に応じた早い蛍光変化を捉えることに成功した。しかし、同プローブを効率的に神経細胞に適用するにはシグナル/ノイズ比など幾つかの点で改良すべき点が見出された。このシグナル/ノイズ比の問題を解決する上で FRET 効率の増大が求められた。そこで平成 18 年度の開発研究では、FRET 効率の増大を目的に GFP の細胞膜移行シグナルを Lyn から、より高効率に細胞膜へのタンパク質の移行タグとして知られている CAAX-BOX に組み替えた狂犬病ウイルスベクターの作成を試みた。現在までに、目指したベクターはほぼ完成したので、今後、培養細胞での評価試験を経て、最終的に、in vivo 実験での評価を行う予定である。</p> <p><狂犬病ウイルスベクターを用いた神経回路トレーシング法の開発></p> <p>神経回路の 2 重標識法の開発・実用化研究を行った。ウイルスベクターを用いた神経回路解析法は、それぞれ異なるマーカータンパク質を発現させる異種のウイルスベクターを用いて、複数の神経回路を個別に標識するものである。それら神経回路が同一神経細胞から派生する場合、その起源細胞は異なるマーカータンパク質を同時発現することになり、GFP や RFP などの蛍光タンパク質をマーカーとして用いると、異なる蛍光色として容易に検出可能となる。これによって神経回路の発散や収斂の様子を容易に明らかにすることができる。このような 2 重標識法はヘルペスウイルスを用いて既に幾つか報告されているが、どれも抹消注入によるもので脳内局所注入による 2 重標識法は報告されていない。そこで本研究ではヘルペスウイルスより神経細胞への感染特異性が高く、細胞毒性が低い狂犬病ウイルスベクターを用いた 2 重標識法の開発を行った。これまでの研究で、ウイルス同士の干渉作用による問題を解決し、中枢神経における 2 重標識技術の開発に成功した。具体的な成果として、大脳半球の両側の嗅内皮質に出力する海馬 CA3 錐体細胞の実態が明らかになった（ウイルスベクターの作成・性状解析とあわせ、2 編の論文を投稿中）。</p> <p><発表論文></p> <ul style="list-style-type: none"> ・Narumi T. et al. Neurosci Res. In press (2007) PMID: 17313984 ・Choi K. et al. IEEE Eng Med Biol Soc. 5820-5823 (2007) PMID: 17281582 ・Ishikawa T. et al. J. Neurophysiol. 670-679 (2007) PMID: 16870834 ・Koike Y. et al. Neurosci Res. 55:146-53 (2006) PMID: 16563542 ・Takayama-Ito M. et al. Virus Res. 119:208-215 (2006) PMID: 16473429 ・Inase M. et al. Exp Brain Res. 168:281-286 (2006) | | | |

開発成果を踏まえた今後の展開

<膜電位感受性 FRET システムの実用化研究>

これまで研究で我々は GFP とオキソノールを用いた膜電位感受性 FRET と、開発した狂犬病ウイルスベクターを組み合わせることで初代神経培養細胞において活動電位に応じた早い蛍光変化を捉えることに世界に先駆けて初めて成功した。しかし、同プローブを効率的に *in vivo* 実験などに適用するにはシグナル/ノイズ比など、幾つかの改善すべき点が見出された。シグナル/ノイズ比の問題を解決する上では FRET 効率の増大が求められた。そこで平成 18 年度の開発研究で、FRET 効率の増大を目的に GFP の細胞膜移行シグナルを Lyn から、より高効率に細胞膜へのタンパク質の移行タグとして知られている CAAX-BOX に組み替えた狂犬病ウイルスベクターの作成を試みた。現在までに、目指したベクターはほぼ完成し、今後は培養細胞での評価試験を経て、最終的に、*in vivo* 実験での評価を行う予定である。この FRET 効率の増加により、大量投与では細胞毒性を示す FRET アクセプターの oxonol の投与量を減らすことが可能となり、毒性をほとんど無視できる膜電位感受性 FRET イメージングの実現が期待できる。さらに、蛍光量の増加により樹状突起からの大きな膜電位感受性シグナルの計測が期待でき、樹状突起における神経演算を直接観測する手段の確立が期待される。

<狂犬病ウイルスベクターを用いた神経回路トレーシング法の開発>

これまでの開発研究から、ウイルスの多重感染を阻害する、細胞のウイルス干渉の問題を克服して、狂犬病ウイルスベクターを用いた神経回路の 2 重（多重）標識技術の実用化にめどが立った。現在までに開発した 2 重標識法では GFP と β -gal を標識として用いており、その検出には抗体染色を必要とする。GFP と RFP を用いた蛍光 2 重標識が可能になれば染色の手間を省くことができる。しかし、これまでに開発したベクターは、蛍光タンパク質の自身のシグナルを検出するには発現量が必ずしも十分ではない。そこで高発現型狂犬病ウイルスベクターを開発することが必要である。発現量の増大は偽陰性の問題の解決にも繋がると考えられる。

トレーシングをする上で、樹状突起も強く標識する狂犬病ウイルスベクターでは、蛍光顕微鏡観察では異種マーカーを発現した 2 つの樹状突起の重なりが細胞体の多重染色のように観察され、神経細胞（細胞体）を特定するのにかえって不都合を生じる。そこで容易に標識細胞（細胞体）を検出することを目的として、核局在化シグナルを付加したレポータータンパク質を発現する狂犬病ウイルスの開発に最近、着手した。

<In vivo 光計測用、光ファイバー落射顕微鏡の開発>

課題遂行中のマウス、ラット、サルにおける *in vivo* 光計測は、測定には不都合な動物の自発運動による物理的振動が大きな障害となっており、初心者でも容易に良い結果を得る事ができるという状況にない現実である。この問題の大部分は脳表面とイメージセンサーの受光面が動物の動きのために、ずれてしまうことに起因している。この問題を解決し、課題遂行中の脳活動の光計測が誰にでも容易にできるよう、脳表とイメージセンサーの間の光路に光ファイバーを設置した、光ファイバー落射顕微鏡を開発したい。目標とするシステムは、マウスからサルの脳活動光計測にも対応できる 1X1 mm から 10X10 mm の視野までをカバーできるものとした。