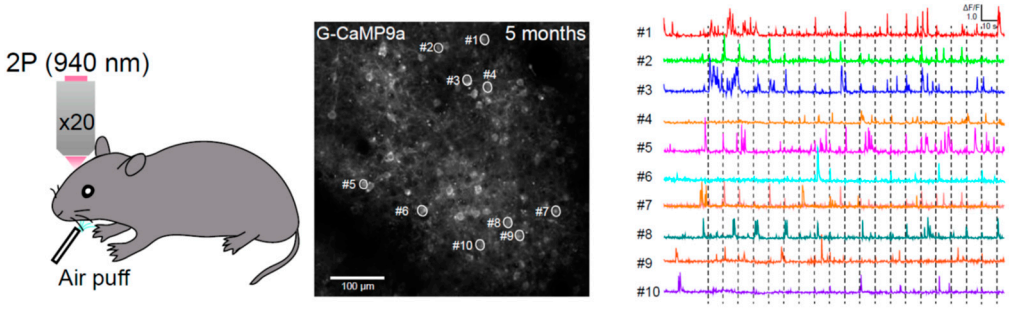
135　多色神経活動イメージングによる記憶メカニズムの解析	坂本　雅行

【目的】高次脳機能解明のためのアプローチとして、2 光子励起顕微鏡を用いた遺伝子にコードされたカルシウムセンサー（Genetically Encoded Calcium Indicator、GECI）による生体（*in vivo*）活動イメージングが急速な発展を遂げている。ところが、従来のカルシウムイメージング法では、主として興奮性ニューロンあるいは抑制性ニューロンの単色活動イメージングしかなされていなかった。また、記憶を制御する神経回路機構を解明するためには、長期間にわたって活動イメージングが可能な技術を確立する必要があった。本研究では、G-CaMP9a ノックインマウスが記憶メカニズムを解析する際に必要である長期的なイメージングに適用可能であるか、その評価を行った。次に、赤色カルシウムセンサーを一緒に用いることで 2 色（緑と赤）の同時カルシウムイメージングを行うための方法の確立を行った。

【方法、結果】本研究では、高速かつ高感度な緑色カルシウムセンサーG-CaMP9a を Rosa26 遺伝子座にノックインした遺伝子改変マウス（R26-pCAG-FSF-GCaMP9a）が、長期的なイメージングに適用可能であるか評価を行った。その結果、G-CaMP9a ノックインマウスは、5 ヶ月齢でもニューロンの自発発火ならびに感覚刺激（ヒゲ刺激）に対する神経活動をモニター可能であった。カルシウムセンサーの蛍光輝度、自発発火における蛍光変化の大きさ、蛍光減衰の時定数に 1～5 月齢で有意な差は見られなかったこと、さらに、2 光子レーザーで 30 分間励起を続けても、G-CaMP9a の蛍光の褪色は見られなかったことから、G-CaMP9a ノックインマウスは長期イメージングにも有用であることが分かった。次に、赤色カルシウムセンサーを一緒に用いることで 2 色（緑と赤）の同時カルシウムイメージングを行なうための方法の確立を行った。抑制性ニューロン選択的に G-CaMP9a を発現させたトランスジェニックマウス　（Dlx5/6-Flpe;G-CaMP-9a）に AAV を用いて赤色カルシウムセンサー（XCaMP-R）を興奮性ニューロンに発現させることで、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時イメージングに成功した。

G-CaMP9a ノックインマウスを用いた *in vivo* カルシウムイメージング



135. 多色神経活動イメージングによる記憶メカニズムの解析

坂本　雅行

*東京大学 大学院医学系研究科 神経生化学分野

Key words：カルシウムイメージング，2 光子励起顕微鏡，トランスジェニックマウス，多色イメージング

緒　言

我々の脳では数百～千億のニューロンが巨大な神経ネットワークを形成しており、複雑な情報処理を行うことで、認知や学習などの様々な高次脳機能を実現している。高次脳機能の仕組みは極めて複雑かつ難解ではあるが、その動作原理については解明が期待される現代科学の究極の課題の一つである。

高次脳機能解明のためのアプローチとして、2 光子励起顕微鏡を用いた遺伝子にコードされたカルシウムセンサー（Genetically Encoded Calcium Indicator、GECI）による生体（*in vivo*）活動イメージングが急速な発展を遂げている［1～3］。ところが、従来のカルシウムイメージング法では、主として興奮性ニューロン、あるいは抑制性ニューロンだけの単色活動イメージングしかなされていなかった。また、記憶を制御する神経回路機構を解明するためには、長期間にわたって活動イメージングが可能な技術を確立する必要があった。

我々のグループではこれまでにカルシウムセンサーの開発に取り組み、米国の Janelia Research Campus が作製したカルシウムセンサーよりも高速かつ高感度な緑色（GFP、G-CaMP9a）および赤色（mApple、XCaMP-R）のセンサーの開発に成功している［4］。GECI の生体への遺伝子導入法は、アデノ随伴ウイルス（AAV）による方法が最も一般的である。ところが AAV を用いた投与法では、GECI の発現レベルがニューロンによって heterogeneous であることや、長期間発現による細胞毒性などの問題が指摘されていた［3，5］。そこで我々のグループでは、AAV を用いた手法に加えて、遺伝子改変マウスを用いたイメージング法についても開発を行ってきた。これまでに、G-CaMP9a を Rosa26 遺伝子座にノックインし、組換え酵素 Flp 依存的に CAG プロモーター制御下で G-CaMP9a を発現誘導可能な遺伝子改変マウス（R26-pCAG-FSF-G-CaMP9a）を作製している。

本研究では、G-CaMP9a ノックインマウスが記憶メカニズムを解析する際に必要である長期間にわたるイメージングに適用可能であるか、評価を行った。次に、赤色カルシウムセンサーを一緒に用いることで 2 色（緑と赤）の同時カルシウムイメージングを行うための方法の確立を行った。

方法および結果

1. G-CaMP9a ノックインマウスの評価

まず、G-CaMP9a ノックインマウス（R26-pCAG-FSF-G-CaMP9a）が感覚刺激に対する応答を検出できるかどうかの検証を行った。G-CaMP9a を大脳皮質体性感覚野 2／3 層の錐体ニューロン特異的に発現させるため、R26-pCAG-FSF-G-CaMP9a ヘテロマウスの胎児（胎生 15.5 日（E15.5））にプラスミド（pCAG-Flpo、1.0 μg/μl）を用いて *in utero* electroporation を行った（図 1A、B）。遺伝子導入を行ったマウスを用いて、2 光子励起顕微鏡（励起光：940 nm）による頭部固定状態、無麻酔下での *in vivo* カルシウムイメージングを行った（図 1C）。1 ヶ月齢のマウスを用いてイメージングを行ったところ、ニューロンの自発発火ならびに感覚刺激（ヒゲ刺激）に応答する G-CaMP9a の応答が観察された（図 1D、E）。このことから、G-CaMP9a はシングルコピーにおいても、神経活動をモニター可能な十分な輝度と S／N 比を有していることが明らかとなった。

先行研究において、*in utero* electroporation 法やアデノ随伴ウイルス（AAV）によって、長期間発現させると、核での強い蛍光を伴うニューロンの形態ならびにセンサーの性質が変化することが報告されていた。そこで次に、5 ヶ月齢

*現在の所属：京都大学 大学院生命科学研究科 光神経分子生理学分野

の G-CaMP9a ノックインマウスを用いて、*in vivo* カルシウムイメージングを行った。その結果、1 ヶ月齢マウスのときと同様、ニューロンの自発発火ならびに感覚刺激に対する G-CaMP9a の応答が観察された（図 1F、G）。また、1 ヶ月齢、3 ヶ月齢、5 ヶ月齢のカルシウムセンサーの蛍光輝度、自発発火における蛍光変化の大きさならびに蛍光減衰の時定数について比較したところ、有意な差は見られなかった（図 1H～J）。さらに、2 光子レーザーで 30 分間励起を続けても、G-CaMP9a の蛍光の褪色は見られなかった（図 1K）。以上の結果から、G-CaMP9a ノックインマウスは長期的なイメージングに有用であることが分かった。

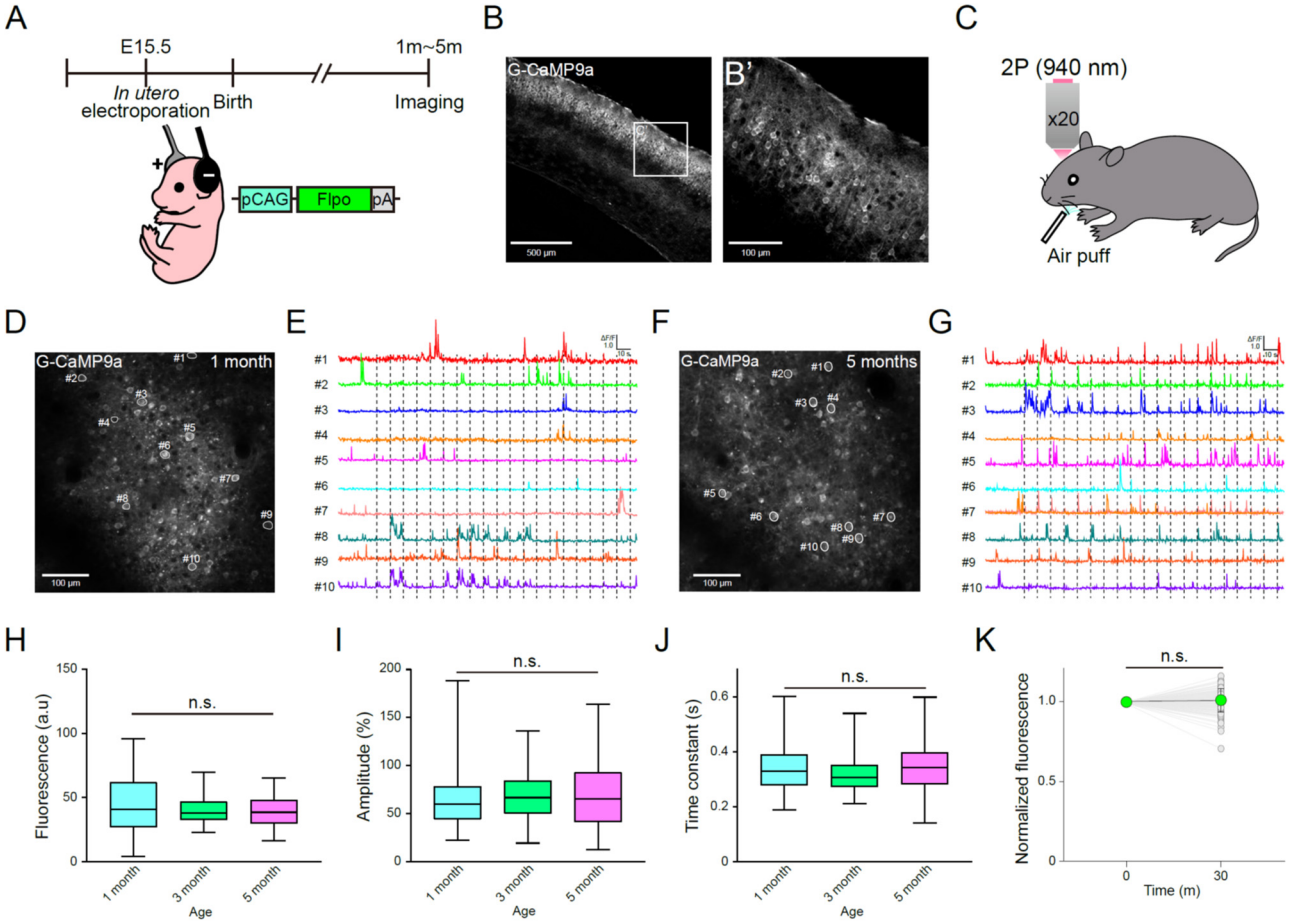


図 1. G-CaMP9a ノックインマウスによる生体カルシウムイメージング

(A) *In utero* electroporation 法を用いて G-CaMP9a を発現誘導するための実験デザイン。

(B) *In utero* electroporation 後の脳スライスでの G-CaMP9a の発現パターン。
スケールバー：500 μm（B）and 100 μm（B'）。

(C) 2 光子励起顕微鏡を用いた *in vivo* カルシウムイメージングの実験デザイン。

(D) 1 ヶ月齢マウスの体性感覚野 2/3 層のカルシウムイメージングで得られた G-CaMP9a の蛍光画像。
スケールバー：100 μm。

(E) （D）のニューロン（#1～10）のトレース。点線はヒゲ刺激を行ったタイミングを示す。

(F) 5 ヶ月齢マウスの体性感覚野 2/3 層の生体カルシウムイメージングで得られた G-CaMP9a の蛍光画像。
スケールバー：100 μm。

(G) （F）のニューロン（#1～10）のトレース。点線はヒゲ刺激を行ったタイミングを示す。

(H～J) 月齢（1 ヶ月、3 ヶ月、5 ヶ月）ごとの G-CaMP9a の蛍光輝度（H）、自発発火の Amplitude（I）、ならびに時定数（J）の定量結果。$p = 0.1392$ for （H）、$p = 0.1794$ for （I）、$p = 0.1069$ for （J）、Kruskal-Wallis test。

(K) 30 分間連続でイメージングを行ったときの G-CaMP9a の蛍光輝度の変化。灰色の線は個々のニューロン、緑色の線は平均値の変化を示す。$p = 0.1342$、Wilcoxon matched signed-rank test。

2. 多色イメージング法の確立

次に、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時イメージングの実験系の確立を行った。抑制性ニューロン選択的にG-CaMP9aを発現誘導するため、R26-pCAG-FSF-G-CaMP9aマウスに前脳の抑制性ニューロンに組換え酵素Flpeを発現しているDlx5/6-Flpeマウス［6］をかけ合わせたダブルトランスジェニックマウス（Dlx5/6-Flpe；G-CaMP9a）を作製した。さらに、興奮性ニューロンに赤色カルシウムセンサーを発現させるため、このダブルトランスジェニックマウスにAAV（AAV2/1-eSyn-XCaMP-R、1.0×10^{13} GC/ml、800 nl）を体性感覚野2／3層に注入した（図2A）。*in vivo*イメージングを行った結果、波長990 nmを選択することで2色のカルシウムプローブを同時に励起して各々の蛍光を取得することができ、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時活動計測に成功した（図2B、C）。さらに、頭部固定状下で実施可能な視覚刺激をcueとしたGo/No-Go課題ならびに逆転学習課題を立ち上げ、学習課題中おける視覚刺激に対する前頭前皮質内側部（Medial Prefrontal Cortex）の興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時イメージングに成功した。

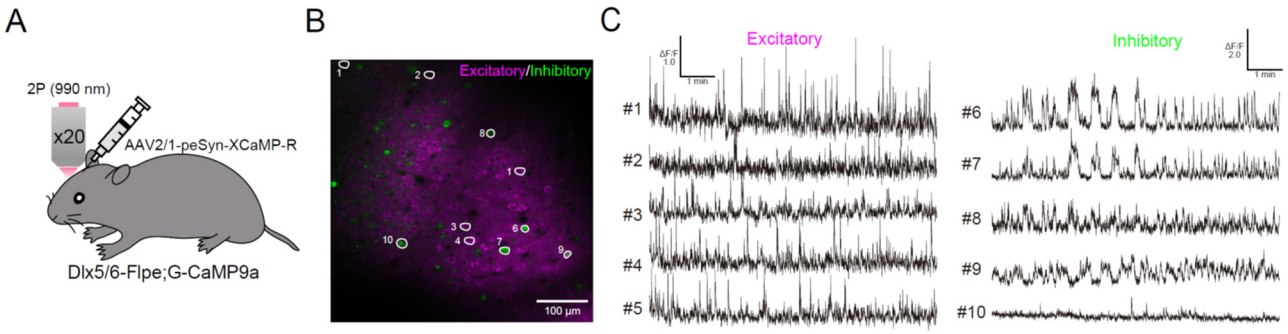


図2. 興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの2色同時イメージング

(A) 実験デザイン。

(B) 2色同時イメージングの実験デザイン。

(C) 興奮性ニューロン（XCaMP-R、#1～5）および抑制性ニューロン（G-CaMP9a、#6～10）の自発発火のトレース。

考　察

カルシウム感受性蛍光タンパク質のならびに 2 光子励起顕微鏡技術の発展により、生体活動イメージング技術が飛躍的に進歩した。ところが、脳機能や神経回路を調べる研究では、緑色カルシウムセンサーあるいは赤色カルシウムセンサーによる興奮性ニューロン（あるいは抑制性ニューロン）の単色活動イメージングが中心であった。異なる色（緑色と赤色）のセンサーを用いた興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時イメージングはなされていなかった。本研究では、長期イメージングが可能な新たな遺伝子改変マウスの樹立、ならびに異なるポピュレーションの 2 色同時イメージングを確立することができた。本研究で得られた成果は、これら上記の問題を解決可能にする新たなイメージング技術になるものと期待できる。記憶獲得や固定化、ならびに想起過程における興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時イメージングを行うことは、これまで不可能であった正確な神経活動の読み出しおよび神経ネットワークの解析を可能し、システム神経科学分野の新たな方法論を創出できる。本研究で開発したニューロンの活動イメージング技術および行動解析を応用することで、記憶や認知といった複雑な高次脳機能の基盤となる神経ネットワークの理解が大きく進展すると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京大学大学院医学系研究科神経生化学研究室の尾藤晴彦博士、井上昌俊博士ならびに研究室の皆様に感謝いたします。

文　献

1) Grienberger C, Konnerth A. Imaging calcium in neurons. Neuron. 2012;73(5):862-85. Epub 2012/03/13. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.011. PubMed PMID: 22405199.

2) Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. Nat Biotechnol. 2001;19(2):137-41. Epub 2001/02/15. doi: 10.1038/84397. PubMed PMID: 11175727.

3) Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. Nature. 2013;499(7458):295-300. Epub 2013/07/23. doi: 10.1038/nature12354. PubMed PMID: 23868258.

4) Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane SI, Sakamoto M, Kawakami R, et al. Rational Engineering of XCaMPs, a Multicolor GECI Suite for In Vivo Imaging of Complex Brain Circuit Dynamics. Cell. 2019;177(5):1346-60 e24. Epub 2019/05/14. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.007. PubMed PMID: 31080068

5) Dana H, Mohar B, Sun Y, Narayan S, Gordus A, Hasseman JP, et al. Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. Elife. 2016;5. Epub 2016/03/25. doi: 10.7554/eLife.12727. PubMed PMID: 27011354.

6) Miyoshi G, Hjerling-Leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt SJ, Battiste J, et al. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. J Neurosci. 2010;30(5):1582-94. Epub 2010/02/05. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010. PubMed PMID: 20130169.