

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト
(英語) Brain Mapping by Integrated Neurotechnologies for Disease Studies
(Brain/MINDS)

研究開発課題名： (日本語) 革新的プロービングによる神経活動の高速3D測定と活動痕跡の長期可視化
(英語) Fast 3D recording of neuronal activity and long-term imaging of activity traces through development of innovative probing technologies

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 東京大学 大学院医学系研究科 教授 尾藤晴彦

所属 役職 氏名： (英語) Haruhiko Bito, Professor, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

脳の情報処理は、電氣的活動(興奮性/抑制性ポストシナプス電位発生や活動電位発火など)ならびに化学的シグナル伝達(例えば酵素カスケード、転写、遺伝子発現の活性化など)からなる。細胞レベルの機能的脳活動マッピングを飛躍的に効率化するために、これまでに比較的低頻度な発火活動を有する、浅層の大脳皮質感覚野興奮性神経細胞に主として実施されてきたカルシウムインディケータを用いた神経活動測定を、より高速発火する抑制性神経細胞や、皮質下領域細胞へまで拡張していく必要があり、これを実現する技術開発が必要となる。

そこで、代表機関である国立大学法人 東京大学において、神経活動の高速3D測定と活動痕跡の長期可視化に資する新規プローブ並びにその発現手法の創出と改良を担当し、高シグナルノイズ比を有し、多色高速3次元イメージングが可能な改良型カルシウムプローブ候補を開発し、さらに活性化細胞集団における長期活動痕跡を検出可能な革新的プローブの開発を進めてきた。また分担機関の喜多村和郎 教

授（山梨大学大学院総合研究部）とともに、前年度までに最適化したこれらセンサー遺伝子を活用し、神経活動およびその痕跡の高速3D測定を実現するイメージング技術の創出・改良を行った。

平成28年度には、平成27年度までに開発した神経活動の高速測定に資するXCaMP-Gf（緑色）を用い、高速発火活動が顕著なparvalbumin陽性抑制神経細胞への発現システムを構築した。これを用いて麻酔下、および覚醒下の大脳皮質活動中の、活性化細胞集団の高速可視化の条件最適化を実施し、in vivoキネティックスの実証測定を実現する実験条件を確定した。一方、これまでに開発したXCaMP-R（赤色）を用いて、深部脳組織における活動イメージングへのプロトコルを完成した。さらにXCaMP-R（赤色）、XCaMP-Gf（緑色）の発現量を調節可能なアデノ随伴ウィルスベクターシステムを構築した。

一方、活動痕跡マッピングについては、改良型E-SAREを用い、アデノ随伴ウィルスベクターにより活動痕跡を細胞種特異的に標識する実験システムを開発した。

今後は、このような新規の技術的基盤を活用し、脳における種々の情報表現に係わる活性化細胞集団のダイナミクスと安定性を、生きた脳にて実測可能な手法を開発していく。

Information processing in the brain is based on neuronal electrical activity (such as excitatory / inhibitory postsynaptic potential generation and action potential firing) as well as chemical signal transduction (e.g. enzyme cascades, transcription, or activation of gene expression). In order to dramatically improve functional brain activity mapping at the cellular level, we need new technologies to expand the use of Ca^{2+} sensors from neurons with relatively low frequency activity to those with fast spiking activity and distributed in subcortical brain areas.

In this project, we thus undertook to create and develop novel probes that contributes to high-speed 3D recording of neuronal activity and long-term visualization of activity traces. At the University of Tokyo, the Principal Investigative Institution, we aimed to develop an improved calcium probe candidate capable of color high-speed three-dimensional imaging and to further ameliorate innovative probes that can detect long-term activity traces in activated cell populations. Furthermore, together with Professor Kazuo Kitamura (Graduate School Department of Interdisciplinary Research, University of Yamanashi), we participated in developing new imaging technology to realize high-speed 3D measurement of fast neuronal activity as well as long-term activity traces.

During the fiscal year 2016, we specifically engineered a new green Ca^{2+} indicator, XCaMP-Gf (green), with ability to perform in vivo ultrafast Ca^{2+} imaging. Using this, we constructed an expression system for parvalbumin-positive interneurons with fast spiking activity. Optimization of recording conditions enabled fast imaging active ensembles consisting of both of fast spiking and non-fast spiking neurons. Furthermore, we used another new red Ca^{2+} indicator, XCaMP-R (red) to carry out deep cellular activity imaging in the living brain.

To monitor and map activity traces, we created a further enhanced version of the synthetic promoter E-SARE (E-SARE2), and developed an adeno-associated virus-based experimental system to label traces of activities in a cell type-specific manner.

In the future, these new sets of powerful tools will prove to be invaluable for further

attempts to measure the dynamics and stability of information representation within active neuronal ensembles in the living brain.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌2件）

1. Rapanelli M, Frick L, Pogorelov P, Ohtsu H, **Bito H**, Pittenger C. Histamine H3R receptor activation in the dorsal striatum triggers stereotypies in a mouse model of tic disorders. **Transl Psychiatry**. 2017. 7, e1013
2. Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, Young NP, Kauvar I, Jennings JH, Lerner TN, Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Davidson TJ, Inoue M, **Bito H**, Deisseroth K. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. **Nature Methods**. 2016 13:325-328.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **Bito H**. Labeling, monitoring and manipulating active ensembles. Conferences Jacques Monod, Roscoff (Brittany), France, 2016/6/14, 国外.
2. **Bito H**. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Frontiers in Neurophotonics Summer School, Quebec, Canada, 2016/6/21, 国外
3. **Bito H**. Illuminating activity-dependent signaling and circuits. Gordon Research Conference (Synaptic Transmission), New Hampshire, USA, 2016/8/17, 国外.
4. **Bito H**. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Cold Spring Harbor Asia (Probing Neural Networks with Light: Imaging Structure & Function in the Living Brain), Suzhou, China, 2016/10/20, 国外
5. **Bito H**. Multiplex imaging of neural activity and signaling dynamics. Janelia Conferences - Fall 2016“Fluorescent Proteins and Biological Sciences V”. Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm Research Campus, 2016/11/7, 国外.
6. Fujii H, Inoue M, **Bito H**. Development and imaging of new color indicators for Ca²⁺ signaling in living neurons. 第39回日本神経科学大会シンポジウム、横浜、2016年7月20日。シンポジウム, 国内
7. Fujii H, Inoue M, **Bito H**. Rational engineering of sensors for hierarchical and orthogonal Ca²⁺ signaling. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2016年11月13日、国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし