審査の結果の要旨

氏名　竹内　敦也

本研究は、生体内の神経活動を可視化するために非常に有用な手法であるカルシウムイメージングにおいて広く用いられている遺伝子にコードされた蛍光Ca^{2+}センサーを改良し、より高感度かつ高速な計測を可能にする多色の蛍光Ca^{2+}センサーの開発を試みたものであり、下記の結果を得ている。

１．従来の赤色蛍光Ca^{2+}センサーのひとつであるR-CaMP1.07を骨格として用い，R-CaMP1.07のCa^{2+}/カルモジュリン結合配列であるM13配列を、Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼのCa^{2+}/カルモジュリン結合配列であるckkap配列と置換することによりR-CaMP2を開発した。子宮内電気穿孔法により大脳皮質バレル野第2/3層にR-CaMP2あるいはR-CaMP1.07を強制発現させ、成体になったのち急性脳皮質切片を作成して性能の比較を行ったところ、R-CaMP2は神経活動をより高感度かつ高速に捉えることが可能であることを示した。次に、麻酔し頭部を固定したマウスの大脳皮質バレル野第2/3層のニューロンにおいてin vivoにおけるCa^{2+}イメージングを行った。R-CaMP2を用いることにより単一の活動電位を鋭敏に捉えることが可能であり、樹状突起スパインにおけるCa^{2+}変動をも観察することが可能であることを示した。これらにより、生きた動物の個体での神経活動の測定におけるR-CaMP2の有用性を示した。

２．R-CaMP2および、従来型の緑色Ca^{2+}センサーであるGCaMP6を組み合わせることにより、マウスの大脳皮質バレル野において２つの異なる種である興奮性ニューロンおよび抑制性ニューロンの１種であるSomatostatin(SST)ニューロンの神経活動を同時に計測することに成功した。SSTニューロンは活動パターンに強い同期性が示されたのに対して、近接している興奮性ニューロンは活動パターンの同期性に大きなばらつきがあることが示された。

３．ckkap配列を持つ多色の蛍光Ca^{2+}センサー群であるXCaMPシリーズを開発した。まず、緑色Ca^{2+}センサーであるXCaMP-GおよびXCaMP-GfとGCaMP6との性能の比較を行った。XCaMP-GおよびXCaMP-Gfは、*in vitro*，*in vivo*のいずれにおいてもGCaMP6と比べてより高感度・高速かつ線形性に優れていることを示した。また、初の黄色蛍光Ca^{2+}センサーであるXCaMP-Yは*in vivo*においてもXCaMP-Gと同等に神経活動を非常に鋭敏に捉えられる高性能なCa^{2+}センサーであることを示した。XCaMP-RはR-CaMP2を改良したものであり、より高速かつ更に線形性に優れた蛍光Ca^{2+}センサーであることを示した。XCaMP-Bは、他のXCaMPシリーズの蛍光Ca^{2+}センサーと比較して感度および速度で劣るものの、急性脳皮質切片においてニューロンのバースト発火を確実に捉えることが可能であることを示した。

４．マウス大脳皮質バレル野2/3層の興奮性ニューロンにXCaMP-Gを発現させ、覚醒状態の頭部固定マウスにおいて*in vivo*でのスパインへの感覚情報の入力および、それ以外の入力であるバックグラウンド入力の入力様式を観察した。感覚入力は覚醒下においても入力パターンがスパースであり、一部のスパインに入力が集中していることが示された。また、近傍のスパインには感覚入力およびバックグラウンド入力のいずれにおいても同期した入力が生じやすい傾向があることが示された。

以上、本論文は従来の遺伝子にコードされた蛍光Ca^{2+}センサーで用いられてきたM13配列をckkap配列に置換することにより、新規蛍光Ca^{2+}センサーであるR-CaMP2およびXCaMPシリーズの開発を行うとともに、*in vitro*、*in vivo*でのカルシウムイメージングにおけるこれらの有用性を明らかにした。本研究は、生体内でのカルシウムイメージングによる細胞レベル、更にはシナプスレベルでの神経回路ネットワークの動作原理の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。