OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of a genetically encoded chemiluminescent voltage indicator and its application to biological research
Author(s)	稲垣, 成矩
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69663
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　稲垣　成矩　）	
論文題名	Development of a genetically encoded chemiluminescent voltage indicator and its application to biological research（化学発光膜電位指示薬の開発と生物学的研究における応用）

論文内容の要旨

Bioluminescence (chemiluminescence) imaging is attracting attention in the field of biology due to its superior signal-to-background ratio and capacity for long-tem measurement. Also, since it does not require excitation light unlike fluorescence imaging, unrestricted optogenetic manipulation using e.g. channelrhodopsin2 can be easily integrated with imaging. In this thesis, I report the world's first chemiluminescent voltage indicator, LOTUS-V enabling investigation of voltage dynamics without the limitations that are often problematic in current techniques. *In vitro* experiments with LOTUS-V enabled robust and sensitive drug evaluation, and long-term recording in cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells. Also, it successfully visualized the bidirectional changes in membrane voltage caused by simultaneous use of multiple optogenetic actuators. For *in vivo* experiments, I developed a novel fiber-free imaging system in conjunction with LOTUS-V, allowing detection of electrophysiological field potential dynamics in the brains of several unrestrained animals simultaneously. With this system, I identified a novel type of activation in the primary visual cortex, associated with the freely moving state and interaction with other mice, suggesting that it may investigate an unexplored activity in various brain regions relating to social or group behavior. Collectively, LOTUS-V offers the multiple advantages of chemiluminescence imaging, and thus expands the toolbox for voltage recording in cells and intact animals.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　　名　（　　稲垣　成矩　　）			
	（職）		氏　　名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授	永井　健治
	副 査	大阪大学教授	八木　健
	副 査	大阪大学教授	岡村　康司
	副 査	大阪大学教授	上田　昌宏

論文審査の結果の要旨

遺伝子にコードされた膜電位指示薬は、試料からの細胞種特異的な電気的活動を計測可能であることから、神経科学の分野で広く使用されている。しかしながら従来の全ての膜電位指示薬は光吸収量或いはそれに伴う蛍光放出量の変化を原理としており、強力な光照射を必要とするために細胞に対し障害を誘起し、或いは光操作により細胞機能を操作するオプトジェネティクスとの併用を困難にする等の問題があった。

そこで稲垣君は、発光基質の添加により発光を生じる化学発光タンパク質に着目し、光照射なしに膜電位を計測可能な"化学発光膜電位指示薬"の開発を試みた。しかしながら従来報告された蛍光膜電位指示薬は全て、電気生理機器を用いたスクリーニングが行われており、そのような設備を備えた研究室でなければ、指示薬の開発は困難であった。稲垣君が所属する研究室はそのような設備は無かったものの、多くの試行錯誤の末、溶液添加により膜電位を人為的に脱分極させる手法を取り入れたスクリーニング法を確立した。この方法は特別な装置は必要なく、かつ効率的にダイナミックレンジの大きな膜電位指示薬を選択可能であることから、非常に汎用性が高いことが特徴である。このスクリーニング法を利用することで、タンパク質エンジニアリングに基づく多くの試行錯誤を経た結果、世界初となる化学発光膜電位指示薬であるLOTUS-Vを開発するに至った。さらにLOTUS-Vが人工多能性幹細胞由来心筋細胞、光遺伝学ツールとの併用、自由行動中の複数マウスにおける脳活動計測に有用であることを証明した。特筆すべきは、指示薬の利点を活かした新たな脳活動計測手法を提案した点である。この手法により、マウス間の接触に伴った、第一次視覚野神経細胞における新規の活動の発見に繋がった。従来の指示薬・手法では成し得なかった結果が得られたことから、彼の成果は生命科学・神経科学の分野において重要な意義を有することは明らかである。

博士課程において稲垣君が成し得た成果は卓越しており、また研究能力や専門的知識も十分に有していることから、博士学位を授与するに相応しいと判断した。