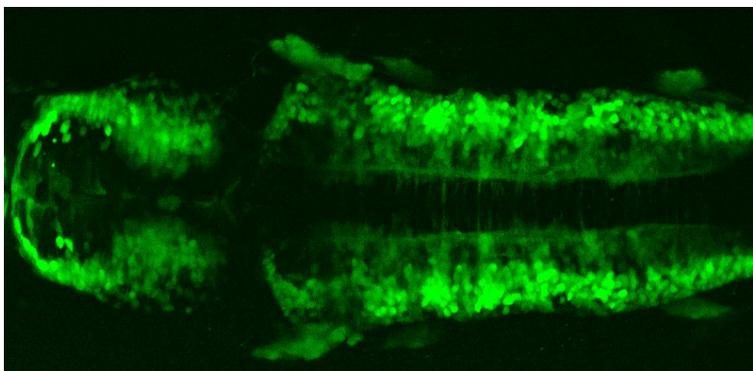


# ゼブラフィッシュを用いた 生体膜電位イメージング

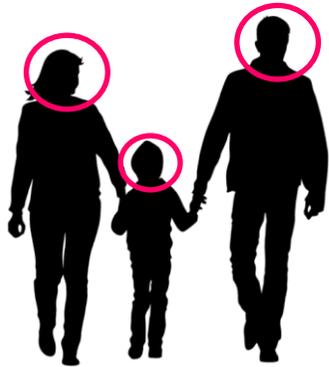
埼玉大学 大学院理工学研究科 生命科学部門  
准教授 津田 佐知子



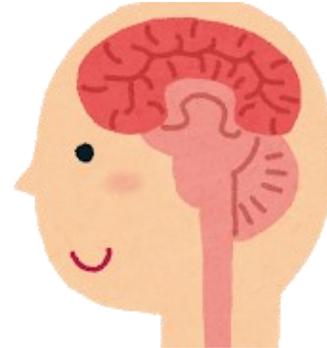
2024年10月22日



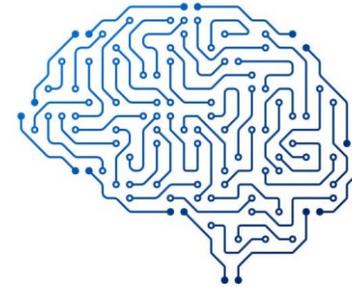
# 生物：多細胞からなる生き物



脳機能



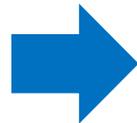
神経回路  
(脳機能の基盤)



ヒト大脳皮質：約200億個の神経細胞(ニューロン)

神経系では約1000億ニューロン

細胞集団の機能が破たんすると...



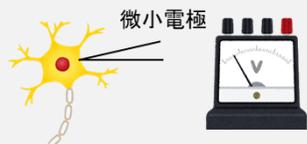
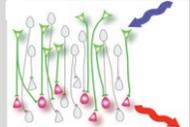
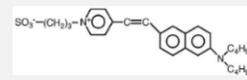
様々な疾患

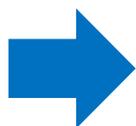
(脳： 認知症、うつ、自閉症  
循環器： 心筋梗塞、心不全...)

細胞集団の状態(健康状態)のモニタリングが重要

従来の技術課題①

# 従来技術とその問題点

アプローチ		メリット
		デメリット
電気生理学的記録		高速・高感度
		細胞種特異性なし, 侵襲
カルシウムイメージング		細胞種特異性, 非侵襲, 多細胞
		遅い, 膜電位検出できない
膜電位感受性色素イメージング		高速・高感度, 多細胞
		細胞種特異性なし・毒性

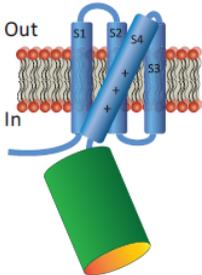
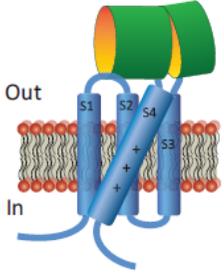
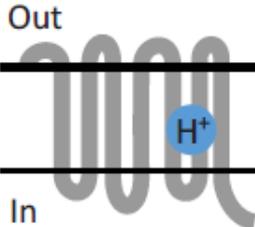


Genetically encoded voltage indicator (GEVI)  
タンパク質型膜電位センサーの開発

# Genetically encoded voltage indicator (GEVI) タンパク質型膜電位センサー

**非侵襲・細胞種特異的・個体レベル**での膜電位イメージングが可能

➡ 従来の技術課題を解決できる

膜電位感受性ドメイン型		ロドプシン型
 <p>通常型 蛍光タンパク質</p>	 <p>変異型 蛍光タンパク質</p>	
ArcLight ArcLight-MT	ASAP1, ASAP2b ASAP3, ASAP5	QuasAr, Voltron Ace-mNeon

Storage et al., 2016より改変

個体レベルへの適用はあまり進んでいない

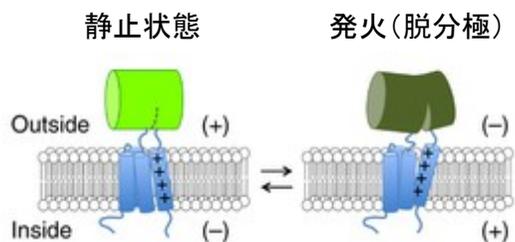
神経・心臓など：個体・器官などマクロな環境で機能を発揮  
培養細胞では、正確な評価が難しい

➡ 個体レベル計測の必要

# 技術概要 ゼブラフィッシュを用いたGEVI膜電位イメージング

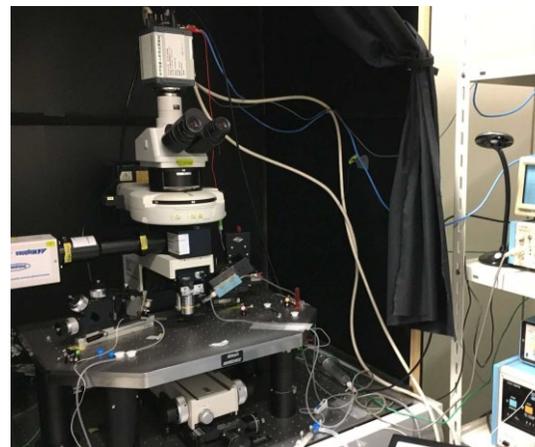
## GEVI

改良型膜電位センサー



St-Pierre et al., 2014

## 独自の高速イメージング観察系



ゼブラフィッシュ

生きたまま(非侵襲)、  
個体レベルでの膜電位光測定へ

世界に先駆けてゼブラフィッシュ脳ニューロンに  
新規GEVIが正常に発現できることを示した。

# 小型魚類 ゼブラフィッシュ

・脳などの組織構造や機能が哺乳類と類似

・体(胚・稚魚)が小さく透明・体外受精

⇒ **生きたまま体内の観察が容易**  
**光技術に適する**

・多産、飼育コストが低い

・解析用ツールが充実(ゲノム情報、トランスジェニック系統など)

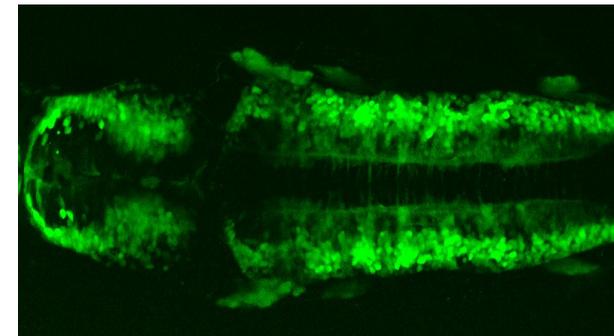


発生・神経科学研究に適したモデル脊椎動物  
医学・創薬研究

ゼブラフィッシュ成魚



1日胚



神経細胞(ニューロン)

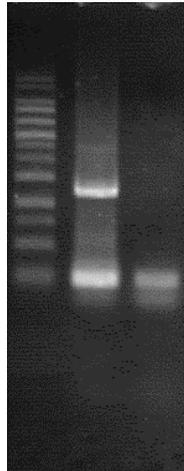
成果①

# ASAP1を特定の細胞種(ニューロン)に発現するゼブラフィッシュ遺伝子組換えシステムを作製

*Tg(elavl3:gal4;UAS:ASAP1)*

(ASAP1 is expressed in neurons)

pTol2-UAS-ASAP1

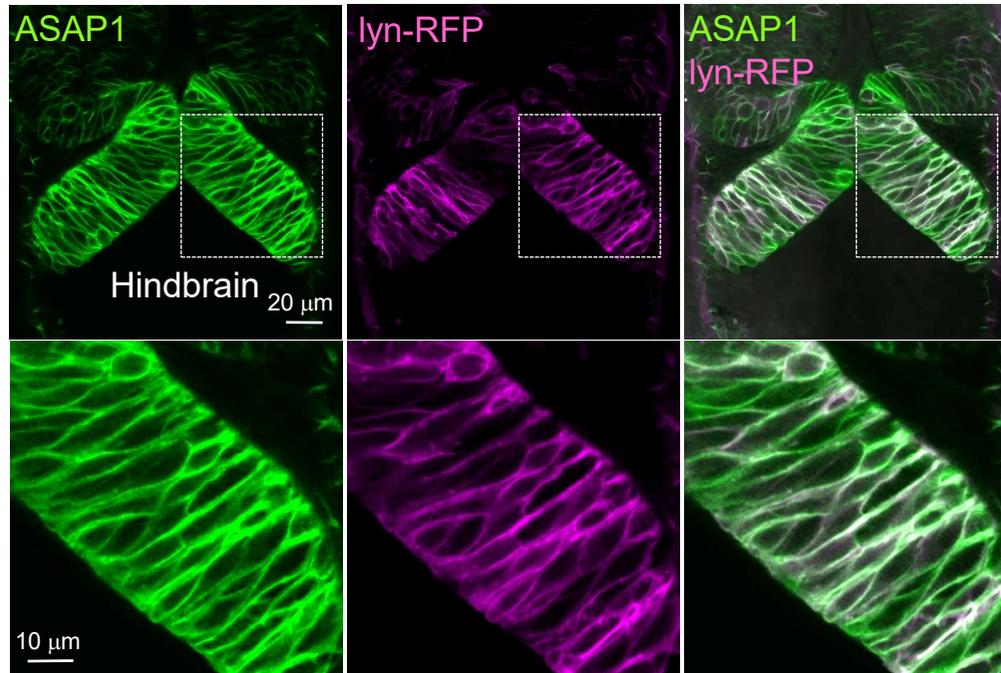
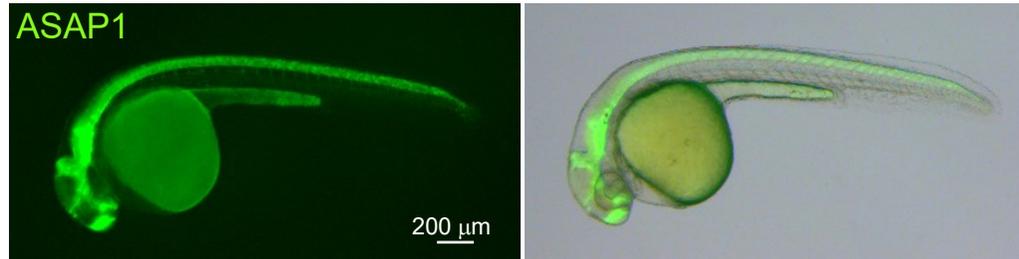


Tg wt

*Tg: Tg(UAS:ASAP1)*

*wt: Wild-type*

1日胚



ASAP1は脳の細胞膜に局在

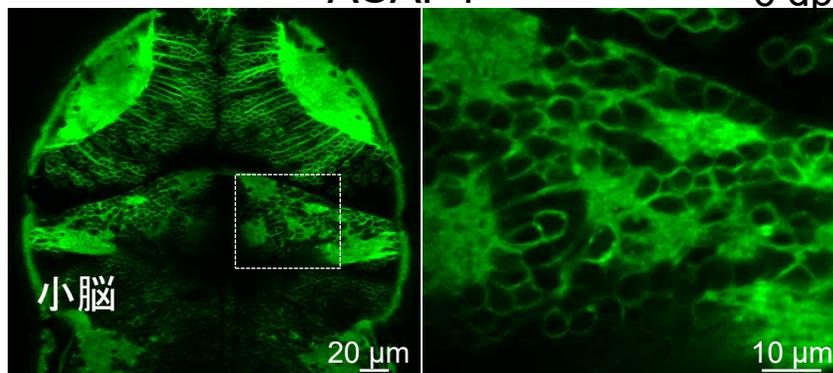
lyn-RFP: 膜局在型RFP(赤色蛍光タンパク質)

成果②

# ASAP1膜電位イメージングにより検出された ゼブラフィッシュ脳の神経活動（世界初）

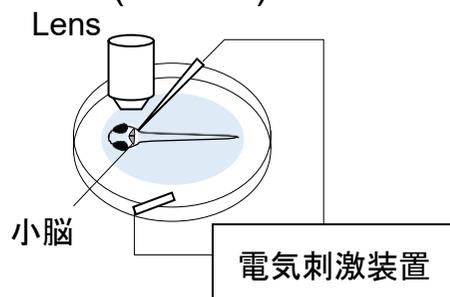
*Tg(elavl3:gal4;UAS:ASAP1)* ASAP1 in all neurons

ASAP1 6 dpf



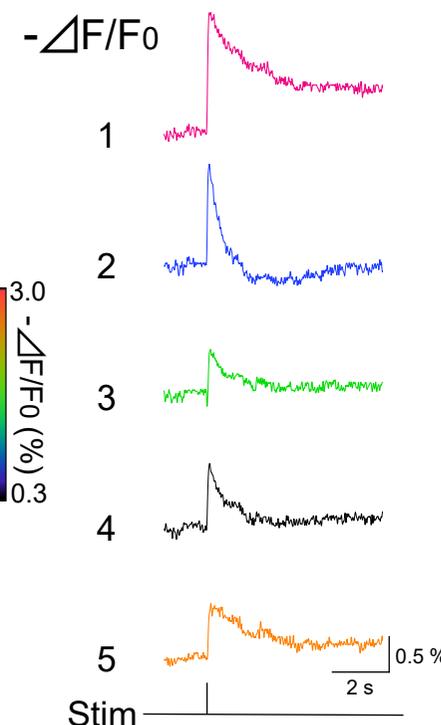
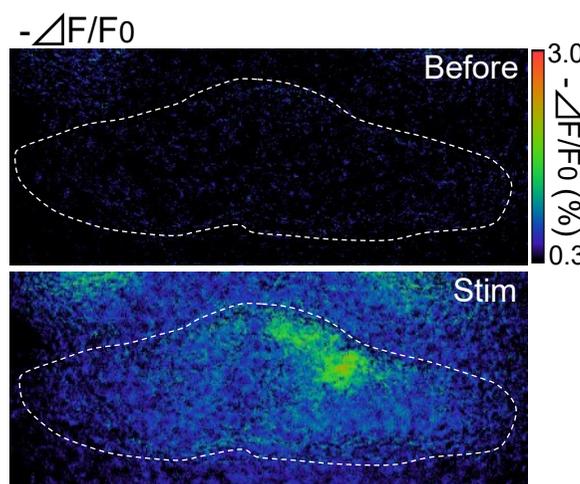
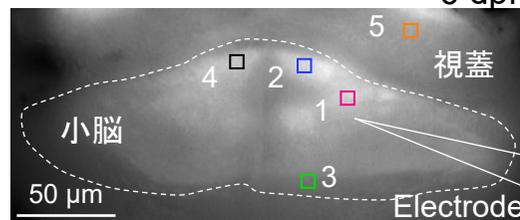
前  
左 + 右  
後

## 高速膜電位イメージング (100 Hz)



## 脳の電気刺激

ASAP1 6 dpf



小脳

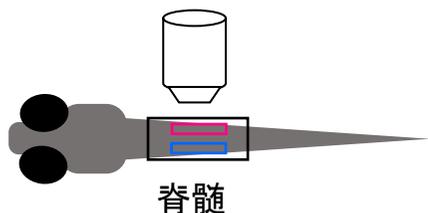
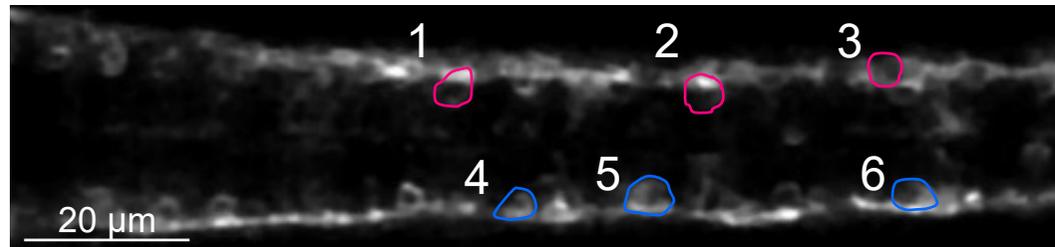
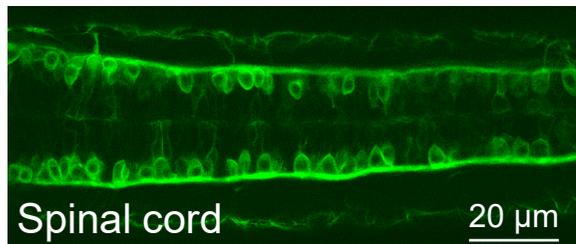
視蓋

(3.1 mA, 1 ms x 20)

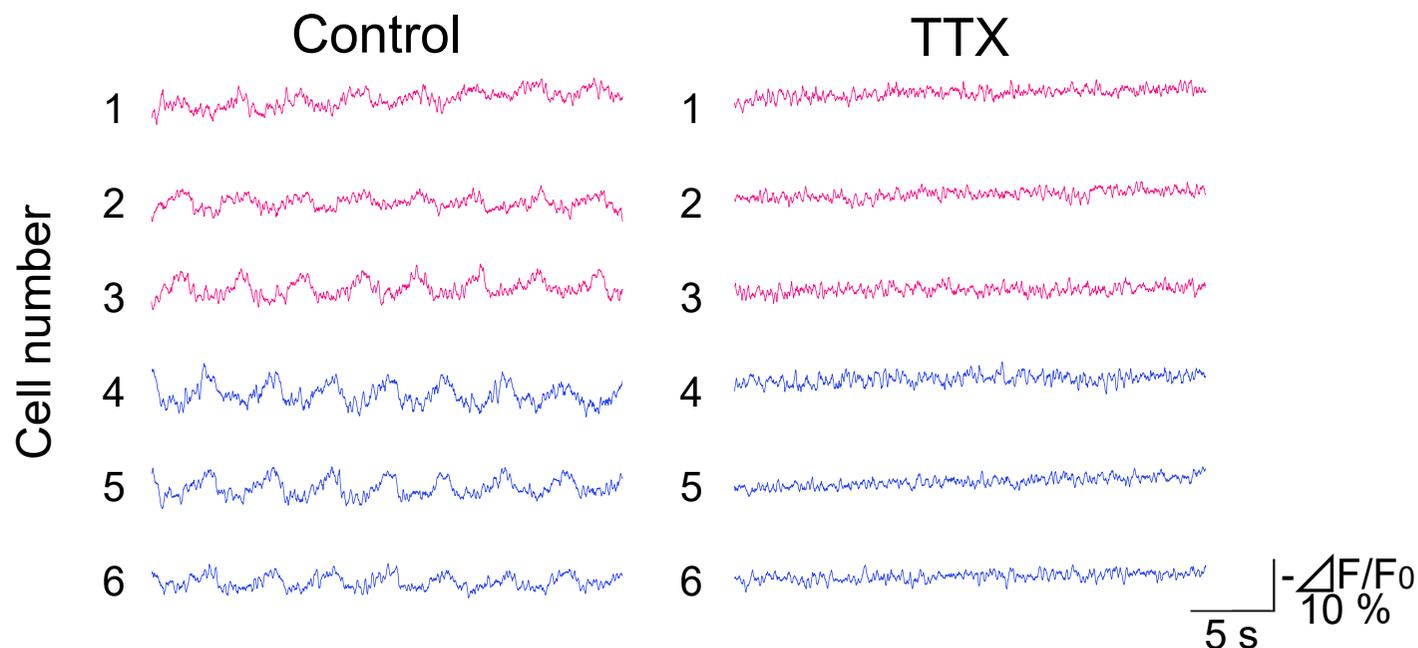
成果③

# 1細胞レベルでの活動リアルタイムモニタリングが可能(個体・細胞レベルを同時に実現)

*Tg(elavl3:gal4;UAS:ASAP1)*



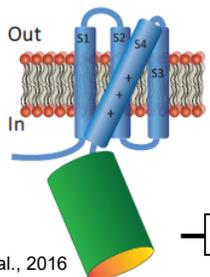
ニューロンの自発活動  
(Warp et al., 2012)



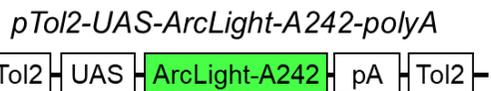
生きたまま、個体レベル、1細胞・集団レベルでの膜電位光測定に成功

成果④

# 高い時空間解度での膜電位光記録を実現

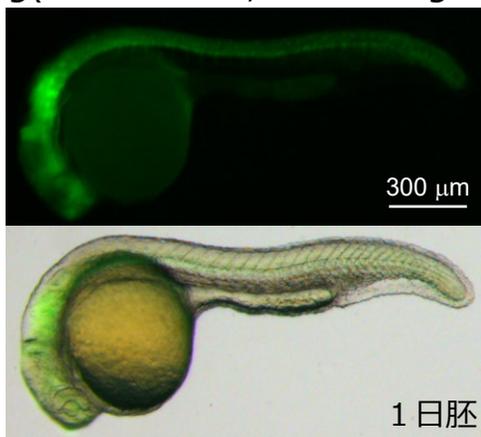


**ArcLight:**  
高感度の膜電位センサー

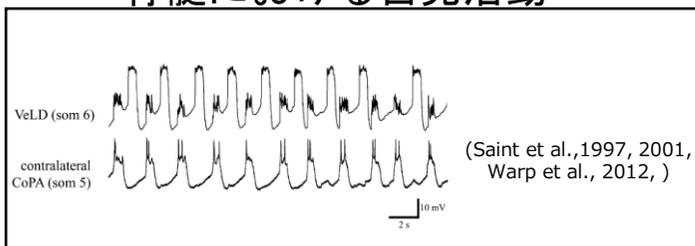


Storace et al., 2016

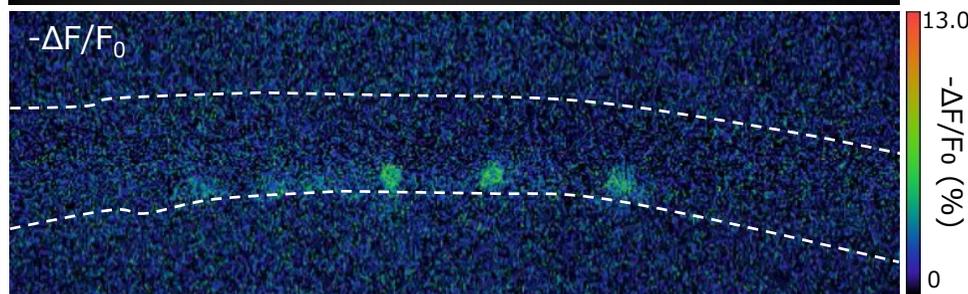
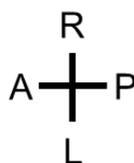
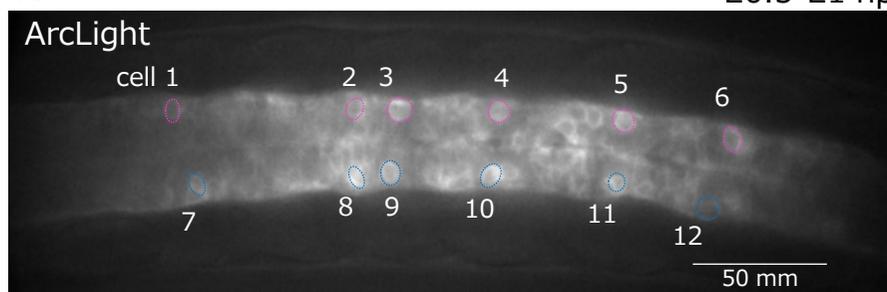
*Tg(elavl3:GAL4;UAS:ArcLight)*



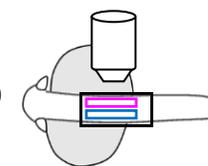
脊髄における自発活動



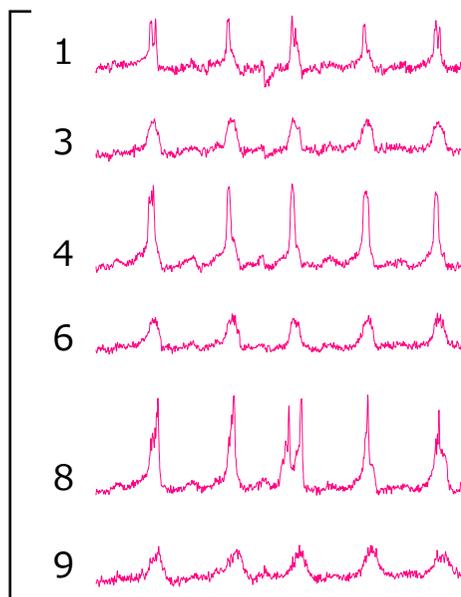
脊髄 20.5-21 hpf



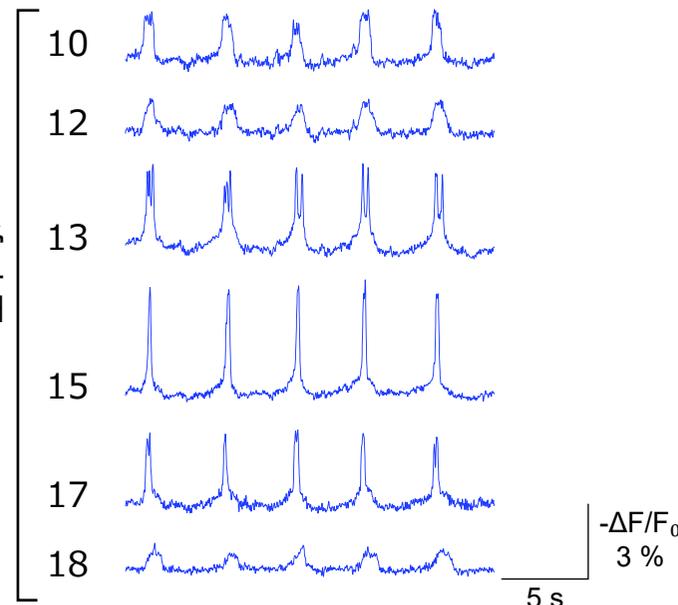
100 Hz



細胞  
右半球



左半球



## 活用例

# 想定される用途

- 個体レベルで、特定の細胞種・組織から信頼性の高い膜電位測定がリアルタイムで可能
- 高解像度解析が低コストで可能、哺乳類動物実験の回避



- 創薬スクリーニング  うつ、記憶障害、自閉症、神経変性、心臓病など  
(ゼブラフィッシュ疾患モデル)
- 病気の症状把握・治療  
様々な細胞集団機能の理解 (脳の作動メカニズム) 
- 漁業、環境分野、農業への展開
  - 魚の養殖、美味しい魚の育種開発
  - 環境毒性評価  ストレス検知など
  - 農業生産の効率アップ 

活用例  
(補足)

# 地球の環境変動や水質汚染が進み、水環境の保全、 そのための環境・水質評価が重要課題

## ■ 背景

- ✓ 地球の環境変動や水質汚染
- ✓ 従来の水質評価では、化学物質や微生物などの直接検出が主流

## ■ 現状課題

- ✓ 水質評価、また多種製品の毒性評価において、バイオモニタリングが必須
- ✓ 個体レベルかつ高精度のモニタリング技術の必要性



- ・現在のバイオモニタリングの多くは、個体の生存、行動・形態観察が主
- ・計測感度・精度が低い

## 活用例(補足)

# 水環境の保全・管理の向上に貢献し、持続可能な地球環境を実現



### ゼブラフィッシュ

(稚魚の体が透明 ⇒ 体内の光観察が容易)

#### ■ わかること・できること

生きてそのまま細胞を傷つけずに、個体・細胞の健康状態がみえる

#### ■ 実現方法①

- ✓ 魚類に膜電位イメージングを用いて、水質を高精度、低コスト、ハイスループットでモニタリング

#### ■ 実現方法②

- ✓ 水環境のより詳細・迅速な分析  
⇒ 水質汚染などの早期検知・迅速対応

# 実用化に向けた課題

- 細胞レベルで膜電位のリアルタイムモニタリングを実現した。しかし、十分な精度での膜電位解析のためには、膜電位検出感度up、速度upが必要
  - ⇒ センサー開発、薬剤/環境スクリーニングなどの技術を持つ企業との共同研究を希望
- 今後、以下を実施予定
  - ①ゼブラフィッシュで十分な蛍光強度をもち、かつ高感度・高速の膜電位センサーのスクリーニング
  - ②特定の細胞種における膜電位イメージング系の改良を実施予定

## 企業への期待

- 未解決の更なる検出感度の向上、速度向上については、最新のセンサー技術の導入により克服できる
- センサー開発、薬剤/環境スクリーニングなどの技術を持つ企業との共同研究を希望
- また、様々な薬剤スクリーニング系、毒性・水質評価を開発中の企業、製薬・環境・農水産分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効

## 企業への貢献可能性など

- 本技術では、世界的なモデル動物ゼブラフィッシュを用いた高精度の個体活性スクリーニングが可能  
⇒ 哺乳類での動物実験の回避、低コスト化などを実現できる
- 本技術の導入にあたり必要な追加実験を行うことで科学的な裏付けが可能
- 本格導入にあたっての技術指導等

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ゼブラフィッシュ個体の膜  
電位イメージング法
- 出願番号 : 特願2024-083706
- 出願人 : 埼玉大学
- 発明者 : 津田佐知子、林彩音

# 産学連携の経歴

- 2021年-2023年 JST A-STEPに採択
- 2023年-2025年 NEDO若サポに採択  
(一部企業とマッチング中)

# お問い合わせ先

埼玉大学

研究機構オープンイノベーションセンター

TEL : 048-858-3489

E-mail : [oiic-info@gr.saitama-u.ac.jp](mailto:oiic-info@gr.saitama-u.ac.jp)