

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	小鉢 健樹
論文題目	深部生体イメージングを目指したヘム代謝改変による近赤外蛍光タンパク質の高輝度化		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、二光子顕微鏡技術の発達によって生きたマウスの組織内で、細胞・分子の動態を観察することが可能となっている。しかし、一般的な可視光領域の蛍光タンパク質である緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いた二光子蛍光観察において、多くの組織では 300~500 μm ほどの表層しか観察することができない。これは蛍光観察に用いる励起光が生体内物質や水分子による吸収・散乱の影響を受けるためである。これらの影響が小さい近赤外領域の光を用い、より深部の生体組織を観察できることが期待されている。しかし、これまで多数の近赤外蛍光タンパク質が開発されてきたが、蛍光輝度の低さから依然として生体イメージングへの応用は限定的であった。申請者は本研究において近赤外蛍光タンパク質の 1 つである iRFP713 に代表されるバクテリアフィトクロム (BphP) 由来近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を増加させる手法の開発に挑戦した。</p> <p>第一章では細胞内ビリベルジン (BV) 濃度の上昇による蛍光輝度上昇に取り組んだ。GFP などの β-can 構造を持つ蛍光タンパク質とは異なり、BphP 由来近赤外蛍光タンパク質は発色団として BV を要求する。申請者は生体内における iRFP713 の蛍光輝度の低さの要因として、細胞内の BV 濃度の不足を考えた。哺乳類細胞において BV はヘムの代謝過程で生成されるが、biliverdin reductase (BVR) によってビリルビン (BR) へ還元される。そこで細胞内 BV 濃度の上昇を目的として、成体における BVR 産生の主たる遺伝子である <i>Blvra</i> の遺伝子欠損マウスを作製した。iRFP713 を全身発現するトランスジェニックマウスとの交配と二光子顕微鏡を用いた解析により、肝臓や脾臓をはじめとする様々な組織において、iRFP713 蛍光輝度が上昇していることを明らかにした。また、<i>Blvra</i> 欠損による BV 上昇のアプローチが、近赤外蛍光カルシウムセンサー NIR-GECO1 の高輝度化、近赤外光応答性光遺伝学ツール BphP1-PpsR2 の光応答性改善に応用できることを示した。本研究で作出した <i>Blvra</i> 欠損型マウスの妊孕能、奇形等について検討したところ、明らかな異常は認められなかった。さらに学習・記憶能力を行動解析により評価したが、野生型との有意な差は認められなかった。以上の結果により、<i>Blvra</i> 欠損型マウスは近赤外蛍光タンパク質を用いた生体イメージングや光遺伝学操作において有用なプラットフォームとなることが示された。</p> <p>第二章ではフィコシアノビルリン (PCB) の生合成による iRFP 蛍光輝度上昇に取り組んだ。BphP 由来近赤外蛍光タンパク質は BV だけでなく、PCB を発色団として用いることができる。PCB は植物やシアノバクテリアの BV 代謝過程で生じるテトラピロール分子であり、BV よりも量子収率が高いことから iRFP の高輝度化に寄与できると期待できる。そこで、哺乳類細胞で PCB 合成経路を再構成する SynPCB システムを用いて、PCB 存在下における近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を比較した。現在最も広く使われている近赤外蛍光タンパク質である iRFP670 と SynPCB を HeLa 細胞に共発現させたところ、約 4 倍に蛍光輝度が上昇した。また、SynPCB に加え、BLVRA のノックアウトおよび外部からの PCB 添加によって野生型の約 8 倍にまで蛍光輝度が上昇した。さらに、PCB 存在下における複数の変異体について蛍光輝度を検討したところ、iRFP713V256C 変異体が最も高い蛍光輝度を示し、HeLa 細胞に発現させた iRFP670 の約 9.3 倍の蛍光輝度を示した。また、近赤外蛍光カルシウムセンサーである NIR-GECO2 に変異を加え、PCB 存在下で高輝度を示すカルシウムセンサー (NIR-GECOHI) の開発にも成功した。さらに生体マウスでの PCB 合成を目的とし、SynPCB を Cre 依存的に発現する SynPCBflox トランスジェニックマウスを作出した。PCB 特異的に蛍光を発する PhyBY276H 変異体および Cre を AAV ベクターを用いて肝臓に発現させたところ、蛍光が観察されたことから、肝臓における PCB 産生を確認できた。さらに iRFP713V256C 変異体と Cre を <i>Blvra</i> 欠損型 SynPCBflox マウスに共発現させ、脳の生体イメージングを行ったところ、深さ 2.1 mm の iRFP 蛍光を観察することに成功した。</p> <p>以上のように、本研究では遺伝学的アプローチにより、近赤外蛍光タンパク質を顕著に高輝度化させることに成功した。これらのマウスは特に神経科学分野を中心とする生体深部観察へ有用なプラットフォームとなることが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

多光子顕微鏡法は、ヘモグロビンによる吸収およびレイリー散乱の少ない近赤外光を用いて蛍光分子を励起することで、組織深部のイメージングを可能とする顕微鏡法である。この顕微鏡法に用いる光近赤外蛍光タンパク質 iRFP には大きな期待が集まっているものの、実際にはあまり使われていない。iRFP は GFP 等の可視光領域の蛍光タンパク質とは異なり、ヘムの代謝産物であるビリベルジンを発色団として必要とするが、通常、細胞内ビリベルジンの量は十分ではなく、可視光領域の蛍光タンパク質と比較すると非常に暗いからである。

本論文著者は、上記の問題を鑑み、iRFP を明るくする 2 種の方法を提案した。

1 つはビリベルジンの量を増やすためにビリベルジン還元酵素のノックアウトマウスを使うという方法である。C57BL/6N マウス、もしくは、そのアルビノ系統である B6 Albino マウスでビリベルジン還元酵素 A (BlvrA) をノックアウトし、脳を始めとしたさまざまな組織で iRFP を多光子顕微鏡を使って観察したところ、BlvrA ノックアウトマウスでは iRFP の蛍光輝度が上昇することを見出した。

2 つめはビリベルジンよりも量子効率が高いフィコシアノビルリン (PCB) を発色団として使う方法である。PCB は植物の光吸収色素であり、動物では産生されない。本論文著者は、まず、PCB により強固に結合する iRFP 変異体を作成した。さらに、青木らが開発した PCB 産生系を発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスにおいて、PCB 親和性の高い iRFP を脳内に発現したところ、2 mm の深さまで神経細胞を観察することができた。

本論文著者は、以上、二つのヘム代謝系を改変する方法により、iRFP を顕著に明るくする方法を開発し、多光子顕微鏡法の用途拡大に大きく貢献した。神経科学を始めとしたさまざまな分野で今後の有用性が期待できる。

本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されており、生体マウス内での iRFP の高輝度化法を開発したものと見える。また、その内容は申請者の生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力を十分に示すものである。以上より、本論文を博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、令和 5 年 1 月 16 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 2023 年 6 月 15 日