

## 要約

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

小鉢 健樹

# 目次

要旨 .....	3
略語一覧.....	4
序論 .....	5
二光子顕微鏡を用いた生体イメージング .....	5
生体イメージングに近赤外光を用いる有用性.....	5
近赤外蛍光タンパク質の開発と応用 .....	6
近赤外蛍光タンパク質の発色団要求性.....	7
細胞内 BV を上昇させる方法.....	8
材料と方法 .....	9
<i>Blvra</i> 遺伝子欠損マウスの作製 .....	9
ジェノタイピング PCR.....	9
プラスミド.....	9
試薬.....	10
細胞培養 .....	10
トランスフェクションと安定発現株の樹立 .....	10
共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング .....	11
二光子顕微鏡を用いた蛍光イメージング .....	11
フローサイトメトリー .....	12
画像解析 .....	13
バーズ迷路試験.....	13
結果 .....	14
1. CRISPR/Cas9 を用いた <i>Blvra</i> 遺伝子欠損マウスの作製 .....	14
2. <i>Blvra</i> 遺伝子欠損マウスを用いた近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度評価.....	15
2-1. MEF において <i>Blvra</i> 遺伝子欠損は iRFP 蛍光輝度を上昇させる .....	15

2-2. <i>Blvra</i> 遺伝子欠損による自家蛍光の変化は無視できる .....	16
2-3. 生体組織において <i>Blvra</i> 遺伝子欠損は iRFP713 蛍光輝度を上昇させる .....	17
2-4. MEF において <i>Blvra</i> 遺伝子欠損は NIR-GECO1 の蛍光輝度を上昇させる ..	20
3. <i>BLVRA</i> 遺伝子欠損による近赤外光感受性光遺伝学ツールの光応答性改善 ..	21
4. <i>Blvra</i> 遺伝子欠損マウスは野生型と比較し、記憶・学習能力に有意な差がない	23
考察 .....	24
細胞内 BV を上昇させる既存アプローチと <i>Blvra</i> ノックアウトの比較 .....	24
<i>Blvra</i> 遺伝子欠損による iRFP713 蛍光輝度上昇の組織間の違い .....	24
NIR-GECO1 の高輝度化 .....	24
<i>Blvra</i> 遺伝子欠損による毒性 .....	25
謝辞 .....	27
参考文献 .....	28

## 要旨

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  $\mu\text{m}$  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。本研究では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。

GFP などの  $\beta$ -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。私は、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 *Blvra* 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、*Blvra* 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 *Blvra* 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、*Blvra* 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。

## 略語一覽

AAV: Adeno-associated virus

BLVRA: Biliverdin reductase-A

BPB: Bromophenol blue

Bph: Bacterial phytochrome

BR: Bilirubin

BSA: Bovine serum albumin

BV: Biliverdin

BVMe<sub>2</sub>: Biliverdin dimethyl ester

BVR: Biliverdin reductase

cDNA: Complementary DNA

CRISPR/Cas9: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated protein 9

EGFP: Enhanced green fluorescent protein

FBS: Fetal bovine serum

FRET: Förster (fluorescence) resonance energy transfer

GFP: Green fluorescent protein

gRNA: Guide RNA

iRFP: Near-infrared fluorescent protein

MEF: Mouse embryonic fibroblast

miRFP: Monomeric near-infrared fluorescent protein

mRNA: Messenger RNA

PBS: Phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

PVDF: Polyvinylidene difluoride

SDS: Sodium lauryl sulfate

# 序論

## 二光子顕微鏡を用いた生体イメージング

生体イメージングは、組織や臓器の内部を生きのまま観察することのできる手法である。1990年代に開発された二光子顕微鏡（Denk et al., 1990）は、組織透過性の高い近赤外領域の波長を励起光に用いること、二光子励起が焦点面に限定されることから、単光子の共焦点顕微鏡よりもはるかに深部を観察することが可能である。このような特性から二光子顕微鏡は細胞解像度での生体イメージングに最も広く採用されている技術である。遺伝子にコードされた蛍光タンパク質およびバイオセンサーを発現するマウスを用いて、脳内の神経細胞やその分子活性を観察することで、各神経回路の機能や組織構造について新たな知見が得られている。

## 生体イメージングに近赤外光を用いる有用性

二光子顕微鏡は生体組織の深部を観察できるが、多くの研究においてイメージング深度は300~500  $\mu\text{m}$ 程度に留まっており、がん、神経などの分野でより深くを観ることが望まれている。イメージングの到達深度の限界は、主に光散乱と光吸収に依存する。更に、これらの散乱と吸収は各波長ごとに変化する。一般的な二光子顕微鏡で励起光として用いる800~1300 nmの波長領域において、生体組織における光の散乱は波長と逆相関する。図1はMillerらによって報告された生体組織の深さ1 mmに到達する相対的な光子の量と波長の関係を示したものである（青線）（Miller et al., 2017）。これは脳組織の光学特性の平均値を用いて計算されたものである。これによると、800 nmに対して1300 nmでは約15倍の光子が1 mmの深さに到達することが示されている。したがって、二光子顕微鏡で生体深部を観察する際はより長波長側の励起光を用いることでより深部のイメージングが可能となる。蛍光タンパク質を用いた一般的な生体イメージングでは、蛍光輝度が高いという理由でGFPやtdTomatoなどの可視光領域に蛍光極大を持つ蛍光タンパク質が用いられることが多い。これらの二光子励起はそれぞれ930、1050 nm付近の波長が用いられているため、吸収の影響は少なく、散乱の大きさが深部到達度を規定している。したがって、より散乱が小さく、かつ吸収も少ない1200~1300 nmの波長領域で二光子励起される明るい近赤外蛍光タンパク質の開発が期待されている。

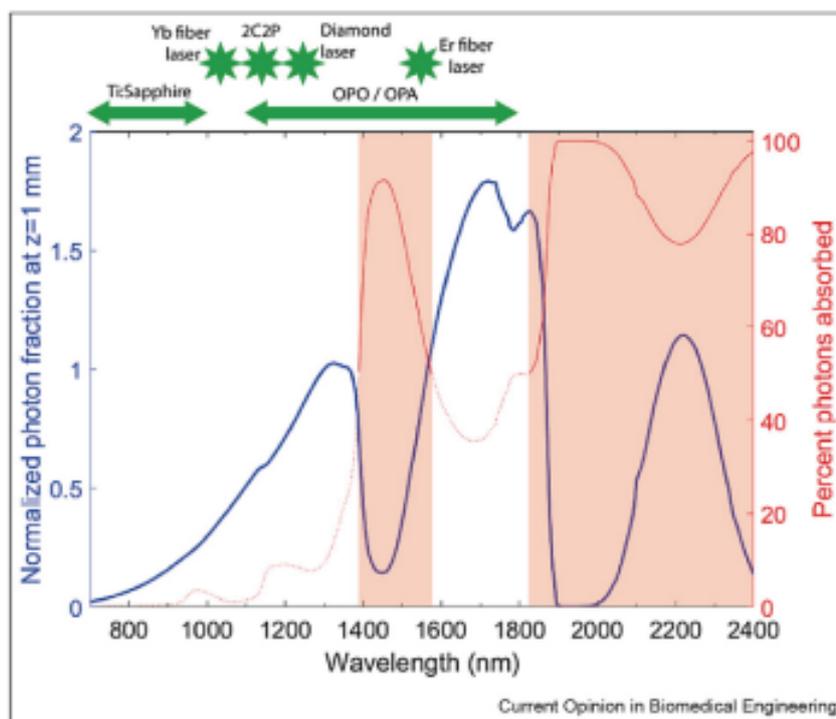


図 1. 生体組織における波長依存的な散乱と吸収の影響 (Miller ら、2017 年)  
 青線は平均的な脳の光学特性の深さ 1 mm に到達する相対的な光子の量を示す。赤線は組織による光の吸収を示し、赤い領域は吸収が 50%以上となる波長領域を示す。

### 近赤外蛍光タンパク質の開発と応用

これまで複数のグループから iRFP (Filonov et al., 2011; Shcherbakova and Verkhusha, 2013)、miRFP (Shcherbakova et al., 2016)、miRFPnano (Oliinyk et al., 2022; Oliinyk et al., 2019)、IFP (Shu et al., 2009; Yu et al., 2014)、mIFP (Yu et al., 2015) などの多くの近赤外蛍光タンパク質が開発されている。主に蛍光輝度の上昇、発色団との結合能の改善に加え、分子サイズの縮小、波長の多様化、単量体化などの特性を持つものが開発されている。現在、精製タンパク質における蛍光輝度、および細胞内蛍光輝度が最も高い近赤外蛍光タンパク質は 2013 年に報告された iRFP670 である (表 1) (Chernov et al., 2017)。ここでの精製タンパク質における蛍光輝度、および細胞内蛍光輝度の乖離は、後述する。

近赤外蛍光タンパク質を応用したバイオセンサーも多数開発されている。単量体である miRFP を応用した近赤外 FRET バイオセンサーである iGECI (Shemetov et al., 2021) や、mIFP を改変した近赤外蛍光カルシウムセンサーである NIR-GECO1 (Qian et al., 2019) が報告されている。これらは生体深部のカルシウム濃度をモニターすることや、可視光領域のバイオセンサーと組み合わせることで、カルシウムと他の分子活性とを同時観察することへの応用が期待される。

表 1. 代表的な近赤外蛍光タンパク質の性質 (Chernov ら、2017 年)

	モル吸光係数 ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	量子収率	精製タンパク質における 蛍光輝度 (相対値)	HeLa細胞内における 蛍光輝度(相対値)
iRFP713	98,000	0.06	1.0	1.00
IFP2.0	72,800	0.08	1.0	0.08
iRFP670	114,000	0.12	<b>2.3</b>	<b>1.19</b>
iRFP682	90,000	0.11	1.7	1.05
iRFP720	93,000	0.08	1.3	0.61
mIFP	82,000	0.08	1.1	0.15
miRFP670	87,400	0.14	2.1	0.72
miRFP670nano	95,000	0.11	1.8	0.72

### 近赤外蛍光タンパク質の発色団要求性

近赤外蛍光タンパク質は生体深部観察に有利な波長特性を持っているにも関わらず、生体内における蛍光輝度の低さから依然として生体深部イメージングには用いられていない。それどころか、近赤外蛍光タンパク質やそれを応用したバイオセンサーの生体マウスでの応用は限定的である。私は、生体内における蛍光輝度不足を、発色団の不足と考えた。

バクテリアフィトクロム (Bph) 由来の近赤外蛍光タンパク質は発色団として、ビリベルジン (BV) を要求する。哺乳類細胞において BV はヘムの代謝産物であり、全組織中に存在する。BV はビリベルジン還元酵素 (BLVRA) によって速やかに還元され、ビリルビン (BR) となる (図 2)。私は、BLVRA の機能阻害によって、細胞内 BV 濃度の上昇を期待した。

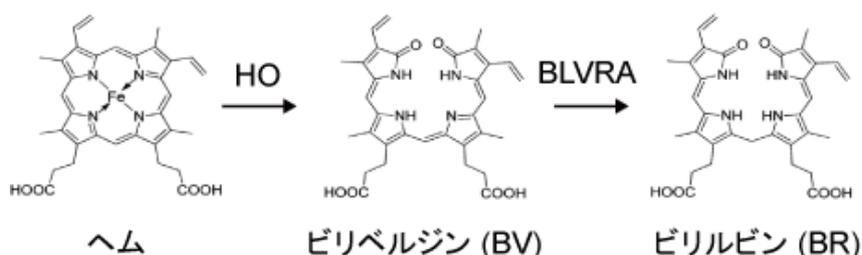


図 2. 哺乳類におけるヘム代謝経路

Heme oxygenase (HO) はヘムを BV へ開環する。BV は BLVRA によって BR へ還元される。

## 細胞内 BV を上昇させる方法

哺乳類細胞中で BV を上昇させる試みは既にいくつか報告されている。BV は脂溶性であり、高濃度の添加は難しいことから、BV の細胞膜透過性を上昇させたビリベルジンジエチルエステル (BVMe<sub>2</sub>) が開発された (Rodriguez et al., 2016)。BVMe<sub>2</sub> の培地中への添加はいくつかの近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を上昇させたが、iRFP713 などの BphP 由来の近赤外蛍光タンパク質との相互作用が弱いことから、発色団としての利用は限定的である (Shemetov et al., 2017)。また、生体マウスでの iRFP 蛍光輝度上昇を目的とした BV の静脈投与も未だ懐疑的である。BV の静脈投与によって肝臓に発現させた IFP1.4 の蛍光輝度上昇が報告されている一方で、smURFP を発現した腫瘍担癌モデルでは蛍光輝度に変化は見られていない (Rodriguez et al., 2016)。BVMe<sub>2</sub> は血清中でエステラーゼによって速やかに分解され、その結果生じる BV も緩やかに分解されることから、安定して蛍光輝度を上昇させるのは困難であると想定される。細胞内の BV 濃度を上昇させる他のアプローチとして、ヘムオキシゲナーゼ (HO) の過剰発現法が報告されている。HO はヘムを BV へと酸化する酵素であり (図 2)、その過剰発現はいくつかの近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を上昇させるが、25%程度の上昇に留まっている (Rodriguez et al., 2016; Shemetov et al., 2017; Yu et al., 2015; Yu et al., 2014)。

本研究では細胞内 BV の蓄積とそれに伴う iRFP 蛍光輝度の上昇を目的として *Blvra* 欠損マウスを作製した。また、二光子顕微鏡を用いた生体イメージングによって、いくつかの組織での iRFP713 蛍光輝度が上昇していることを示した。また、*BLVRA* 遺伝子欠損が BV を要求する光遺伝学ツールへ応用可能であることを示した。

## 材料と方法

### *Blvra* 遺伝子欠損マウスの作製

マウス *Blvra* 遺伝子 (NM\_026678.4) を標的にした CRISPR/Cas9 システムを用いて *Blvra* 遺伝子欠損マウスを作製した。二種類の gRNA (ACCTGGACACATATCCAATC、CGAGAAATGCCACTGAACGC)、Cas9 タンパク質をコードする mRNA とともに、C57BL/6N マウス由来の受精卵にインジェクションした。F0 世代のマウスにおいて標的遺伝子付近に塩基配列の挿入、欠失、逆位を生じたマウスを得た。その中から *Blvra* 遺伝子のエクソン 3 とエクソン 7 の間で逆位を起こしたマウスの系統を今後の実験に用いた。このマウスの系統を B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCrI (B6 Albino) マウス (Japan SLC) と 2 世代以上交配させた。NuCyM を発現するトランスジェニックマウスは以前報告されたものを使用した (Imanishi et al., 2018)。マウスは specific- pathogen-free 施設内で 14 時間明/10 時間暗サイクル、自由給水、自由給餌下で飼育した。生体イメージングの実験は 7~9 週齢のオス、メスマウスを用いた。

### ジェノタイピング PCR

マウスのゲノム DNA はマウス尻尾サンプルより SimplePrep (Takara Bio) を用いて精製した。*Blvra* 遺伝子の野生型、欠損型アレルを検出するプライマーは下記の通りである。それぞれの PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって検出した。

- *Blvra* 遺伝子の野生型アレル
  - Forward: 5'-TGGTAGTGGTTGGTGGTGGCC-3'
  - Reverse: 5'-CCACTACTCGGCATGGTTCT-3'
  - PCR 産物サイズ 216 bp
- *Blvra* 遺伝子の欠損型アレル
  - Forward: 5'-TCATATATTGATCTTCTTTTCGGTT-3'
  - Reverse: 5'-CCACTACTCGGCATGGTTCT-3'
  - PCR 産物サイズ 226 bp

### プラスミド

iRFP 蛍光輝度を発現量で標準化する目的で iRFP713 または iRFP670 の cDNA を EGFP の cDNA と自己切断ペプチド P2A (Kim et al., 2011) の cDNA によって連結し、pCSIIbleo-iRFP713-P2A-EGFP と pCSIIbleo-iRFP670-P2A-EGFP を作製した。RpBphP1-mCherry、PpsR2-mVenus-CAAX、NIR-GECO1 をコードする cDNA は Addgene (#79832、#79835、#113680) で購入し、サブクローニングによって pCSIIbsr-RpBphP1-mCherry、pCSIIhyg-PpsR2-mVenus-CAAX、pCSIIbsr-NIR-GECO1-P2A-EGFP を作製した。レンチウイルスの作製に用いた psPAX2 は Addgene (#12260) で購入した。エンベロープタンパク質をコード

する pCMV-VSV-G-RSV-Rev は三好浩之博士 (RIKEN BioResource Center) より分与頂いた (Miyoshi et al., 1998)。MEF の不死化に用いた pMSCV-pac-LT は SV40 large T antigen (Suzuki et al., 2004) をコードする cDNA を pMSCV-pac (Hawley et al., 1994) ベクターにサブクローニングすることで作製した。レトロウイルスの作製に用いた pMD2.G は Addgene (#12259) で購入した。pGP は赤城剛博士 (Osaka Bioscience Institute) より分与頂いた。

## 試薬

Biliverdin IX $\alpha$  (Cayman Chemical) は 25 mM の濃度で DMSO に溶かし、-20°C で保存した。Ionomycin (Calbiochem) は 20 mM の濃度で DMSO に溶かし、-20°C で保存した。

## 細胞培養

HEK293T 細胞は Lenti-X 293 細胞として Invitrogen より購入した。HeLa 細胞は Human Science Research Resources Bank より購入した。BLVRA 遺伝子欠損 HeLa 細胞は青木一洋博士 (基礎生物学研究所) より供与頂いた。マウス胚性線維芽細胞 (MEF) は E14.5 のマウス胎児より一般的な手法に倣い単離した。HEK293T 細胞、HeLa 細胞および MEF は 10% FBS (Sigma-Aldrich)、1% penicillin/streptomycin (Nacalai Tesque) を含む DMEM 培地 (Wako Pure Chemical Industries) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

## トランスフェクションと安定発現株の樹立

MEF は SV40 large T antigen を発現するレトロウイルスを感染させることによって不死化し、2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  puromycin (InvivoGen) によって選別した。iRFP713-P2A-EGFP、iRFP670-P2A-EGFP、NIR-GECO1-P2A-EGFP の MEF への安定発現はレンチウイルスシステムを用いた。pCSII レンチウイルスベクター、psPAX2、pCMV-VSV-G-RSV-Rev を 2:1:1 の DNA 重量比で混合し、polyethylenimine (Polyscience Inc.) を用いて Lenti-X 293T 細胞へトランスフェクションした。レンチウイルスを含む培地上清を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過して MEF へ添加することで目的の遺伝子を MEF へ導入した。必要に応じて下記の抗生物質によって安定発現の MEF を選択した。MEF/iRFP670-P2A-EGFP、100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Zeocin (InvivoGen) ; MEF/iRFP713-P2A-EGFP、100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Zeocin; MEF/NIR-GECO1-P2A-EGFP、10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  blasticidin S (FUJIFILM Wako Pure Chemical)。HeLa 細胞への BphP1-mCherry、および PpsR2-mVenus-CAAX の一過性発現は 293fectin (Invitrogen) を説明書に従い利用した。

## 共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング

MEF あるいは HeLa 細胞をコラーゲンタイプ I (Nitta Gelatin) でコートした 24 well ガラスボトムプレート (AGC テクノガラス) に播種した。イメージングには観察用培地として 1% Gluta-MAX (LifeTechnologies)、0.1% bovine serum albumin (BSA)、20 mM HEPES、10% FBS を含む FluoroBrite D-MEM (LifeTechnologies) を使用した。

共焦点蛍光イメージングには倒立型顕微鏡 IX81 (Evident) に FV1000 confocal imaging system (Evident) を施した装置を用いて取得した。対物レンズは 20×/0.75 NA dry objective lens UPLSAPO (Evident) を使用した。ダイクロイックビームスプリッターは 405/488/559/635 を用いた。以下の励起波長、取得波長範囲を用いて蛍光画像を取得した。

蛍光タンパク質	励起波長 (nm)	取得波長範囲 (nm)
EGFP	488	510-560
iRFP670	635	660-760
iRFP713	635	680-780
NIR-GECO1	635	655-755
mVenus	488	510-610
mCherry	559	575-650

BphP1-PpsR2 システムの光刺激は LED-41IR735 (Optocode) を用い、光照射操作は手動で行った。顕微鏡制御と画像取得は FluoView software (Evident) を用いた。取得した画像の処理と解析は MetaMorph (Molecular Devices) を用いた。

## 二光子顕微鏡を用いた蛍光イメージング

生体イメージングには正立型顕微鏡 BX61WI (Evident) を以下のレンズ等の周辺機器と用いた。mCherry は 1040 nm、iRFP713 は 1300 nm の波長の光で励起した。DM552 (Evident)、DM649 (Evident) の 2 つのダイクロイックミラー、BA495-540 (Evident)、FF01-593/46 (Semrock)、FF01-708/75 (Semrock) の 3 つの蛍光フィルターを用いて図 3 のような光路を使用した。

レンズ: XLPlan N 25x (Evident)

励起レーザー: InSight DeepSee Ultrafast laser (Spectra Physics)

検出器: GaAsP、マルチアルカリ (RXD)

顕微鏡制御: Fluoview software

マウスは 1.5% のイソフルラン (Abbot Japan) で吸入麻酔下におき、37°C で維持された顕微鏡電動ステージ上に固定した。耳の皮膚はイメージングの 24 時間前に除毛クリームによって除毛した。腎臓、肝臓、膵臓は開腹したのち、吸引装置付きの観察窓 (Olympus Engineering) によって吸引固定しイメージングを行った。

脳への観察窓取付手術は Yang らの手法 (Yang et al., 2010) を参考に、下記のように行った。手術中、マウスは 1.5% のイソフルランで吸入麻酔下におき、ヒーティングパッドを用いて 37°C に維持した。頭皮を剃毛した後、1% リドカイン (AstraZeneca) 溶液 100  $\mu$ L を頭部皮下に注入し、局所麻酔を行った。頭皮を切開し、髄膜を綿棒で取り除いた後、丸い穴を開けた Head plate をシアノアクリレート接着剤 (東亜合成) で頭蓋骨に接着した。直径 0.7 mm 丸鋼バリ (GC Corporation) を装着した高速マイクロドリル (Argofile) により、撮影領域上部の頭蓋骨 3 万回転で薄層化した。手術中は冷却した Saline (Otsuka Pharmaceutical Factory) の添加によって手術部位の温度上昇を防いだ。また、出血が最小限になるように細心の注意を払い、出血した際はスポンゼル (LTL Pharma) を用いて止血を行った。このようにして作製した穴を円形の直径 3 mm のカバーガラス (Matsunami) で塞ぎ、ロイコサン アドヒーズブ (Terumo) で頭蓋骨に接着した。

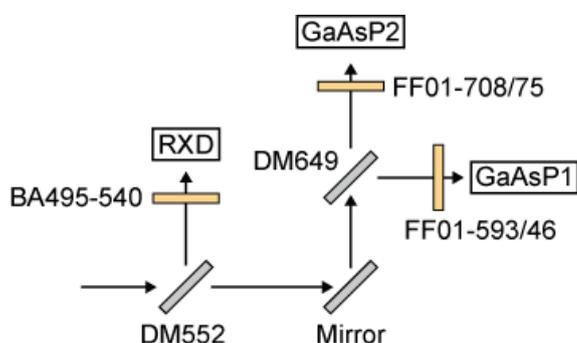


図 3. 正立型二光子顕微鏡光路

### フローサイトメトリー

脾臓をはさみでミンチ状にし、 $\phi 40 \mu\text{m}$  のセルストレーナーを通過させることにより単細胞懸濁液を調整した。赤血球は、ACK 溶解バッファー (Thermo Fisher Scientific) を用いた溶解と 500 $\times$ g、4°C での 5 分間の遠心分離により除去した。3% FBS を含む PBS に懸濁した細胞を、FACS Aria IIIu セルソーター (Becton Dickinson) で分析した。蛍光の検出には、以下のレーザーと蛍光フィルターの組み合わせを使用した。細胞はまずサイズと粒度についてゲーティングを行い、細胞デブリと凝集体を除外し、死細胞は 7-AAD (BD Pharmingen) により除外した。データ解析は FlowJo software (Tree Star) を用いて行った。

蛍光タンパク質、蛍光色素	励起波長 (nm)	蛍光フィルター
mCherry	561	610DF20 (Omega Optical)
iRFP713	633	730AF45 (Omega Optical)
7-amino-actinomycin D (7-AAD)	488	DF695/40 (Omega Optical)

## 画像解析

顕微鏡で取得した画像の解析は MetaMorph と Fiji (<https://imagej.net/Fiji>) を使用した。

### MEF における iRFP の蛍光輝度解析

EGFP 蛍光画像を元に細胞のない部分に領域を設定し、EGFP、iRFP 蛍光画像それぞれの領域内の平均輝度をバックグラウンドシグナルとして減算した。EGFP 蛍光画像に対して、3×3 pixels ローパスフィルター、3×3 pixels メディアンフィルターをかけた後、蛍光輝度値、サイズを元にマスクを設定し、細胞に領域を作製した。バックグラウンド減算後の EGFP、iRFP 蛍光画像に細胞の領域を移し、各領域内の平均値を取得した。

### MEF における NIR-GECO1 の蛍光輝度解析

EGFP 蛍光画像を元に細胞のない部分に領域を設定し、EGFP、iRFP 蛍光画像それぞれの領域内の平均輝度をバックグラウンドシグナルとして減算した。EGFP 蛍光画像を元に手動で細胞に領域を設定し、バックグラウンド減算後の EGFP、iRFP 蛍光画像の各領域内の平均値を取得した。

### HeLa 細胞における BphP1-mCherry の蛍光輝度解析

mCherry 蛍光画像に対し、細胞質に手動で領域を設定し、mCherry 蛍光輝度値を取得した。撮影開始 1 枚目の平均値が 1 となるように標準化した。

### 生体マウス組織における mCherry、iRFP713 の蛍光輝度解析

mCherry、iRFP713 蛍光画像に対して、それぞれ核、細胞質に手動で領域を設定し、各領域内の平均値を取得した。

## バーンズ迷路試験

周囲に 12 個の穴が等間隔に配置された直径 1.0 m の円盤 (O'Hara & Co.) を床から 75 cm の高さに設置した。穴の 1 つの下には、紙製のケージの敷料を入れた黒いプレキシグラスの 17×13×7 cm 大の逃避箱を設置した。ゴール穴の位置は 1 匹のマウスでは固定し、マウス間ではランダムとした。空間記憶の手がかりとするために、円盤を取り囲む壁の 4 隅にそれぞれ異なるオブジェクトを設置した。迷路内の嗅覚や近接した手がかりによる偏りを防ぐため、標的の空間的位置を変えずに円盤を毎日回転させた。トレーニング試行回数は 2 回目までは 1 日 1 回、3 回目以降は 1 日 2 回とした。目標穴に到達するまでの時間、各穴の周囲に滞在した時間を TimeBCM software (O' Hara & Co.) で記録した。12 回目のトレーニングの 24 時間後にゴール穴なしのプロープテストを行い、各穴周辺の滞在時間を評価した。長期的な記憶保持を評価するため、追加のトレーニングを 1 回を行い、1 週間後に 2 回目のプロープテストを行った。野生型、*Blvra* 欠損型それぞれ 10 匹ずつ、11~12 週齢のオスマウスを用いた。

# 結果

## 1. CRISPR/Cas9 を用いた *Blvra* 遺伝子欠損マウスの作製

生体深部イメージングの需要の増加により、近赤外蛍光タンパク質の開発が進められている。しかし、これらは BV を発色団として要求し、哺乳類細胞中において、内在性 BV は近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を最大化するのに不十分である (Filonov et al., 2011; Piatkevich et al., 2017; Shemetov et al., 2017; Vasavda et al., 2019)。BV は主に BLVRA によって BR へ還元されることから (図 2) (McDonagh, 2010)、内在性 BV の蓄積とそれに伴う iRFP 蛍光輝度の上昇を目的として、*Blvra* 遺伝子欠損マウスの作製に取り組んだ。

*Blvra* 遺伝子欠損マウスの作製には CRISPR/Cas9 システムを用いた (Sunagawa et al., 2016)。*Blvra* 遺伝子のエクソン 3、7 を標的とする gRNA を混合し、Cas9 mRNA とともにマウスの受精卵に共注入した。14 匹の F0 マウスのうち 3 匹が *Blvra* に変異を有していた。エクソン 3、7 間の DNA 配列の逆位により BLVRA の触媒ドメインを欠損したマウスを選択し、今後の実験に用いた (図 4A)。数回の戻し交配と近親交配を経て、F4 の子孫を PCR 法で遺伝子型判定した。野生型、欠損型のアレルをそれぞれ認識するプライマーペアを用いて、野生型で 216 bp、*Blvra* ホモ欠損型で 226 bp、ヘテロ欠損型で両方の PCR 増幅産物を検出した (図 4B)。*Blvra* 欠損型マウスは *Blvra* ホモ欠損型同士の交配で系統を維持し、少なくとも 13 世代まで目立った異常は検出されていない。さらに BLVRA の機能的な欠損を確認するために胆嚢の色を調べたところ、*Blvra* 欠損型マウスにおいて、色が緑色に変化していた (図 4C)。この表現型は *Blvra* 欠損型マウスの既報 (Chen et al., 2018; Vasavda et al., 2019) と一致し、BV の蓄積および BLVRA の機能的欠損を示している。

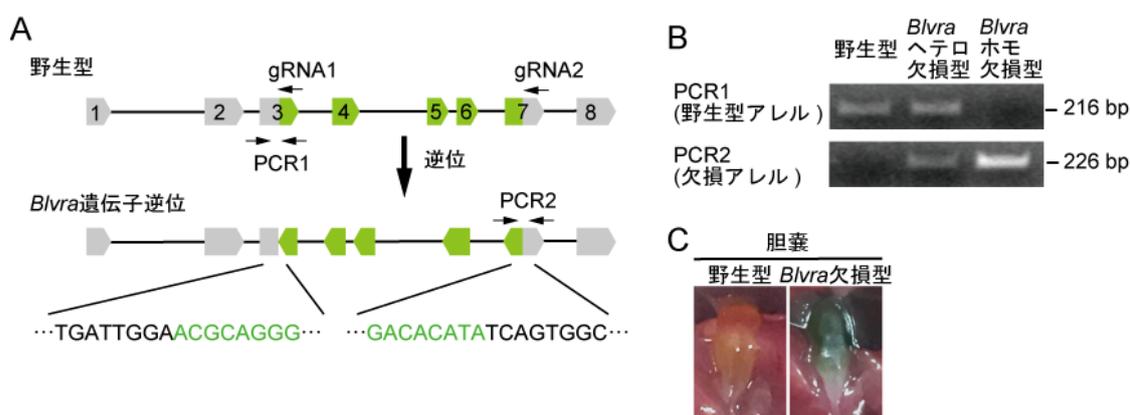


図 4. *Blvra* 遺伝子欠損マウスの作製

- (A) CRISPR/Cas9 システムを用いた *Blvra* 遺伝子の欠損。エクソン 3、7 に gRNA をデザインし、2 箇所間の逆位によって BLVRA が機能的に欠損したマウスを得た。
- (B) *Blvra* 遺伝子判別のジェノタイピング PCR。(A) に示した箇所にプライマーをデザインし、*Blvra* 遺伝子の野生型、欠損型アレルを PCR によって判別した。
- (C) 野生型、*Blvra* 欠損型マウスの胆嚢の写真

## 2. *Blvra* 遺伝子欠損マウスを用いた近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度評価

### 2-1. MEF において *Blvra* 遺伝子欠損は iRFP 蛍光輝度を上昇させる

野生型、*Blvra* 欠損型マウス由来の MEF を用いて、*Blvra* 遺伝子欠損が iRFP 蛍光輝度を与える影響を評価した。初めに野生型、*Blvra* 欠損型マウスから MEF を単離し、SV40 large T antigen を発現させることにより不死化した (Suzuki et al., 2004)。次にレンチウイルスによって iRFP670-P2A-EGFP または iRFP713-P2A-EGFP を導入し、共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した (図 5A、C)。

*Blvra* 欠損型 MEF は野生型と比較して iRFP670 蛍光輝度が 1.7 倍高かった (図 5B)。*Blvra* 欠損型 MEF における iRFP670 蛍光輝度は BV 添加によって上昇しなかったことから、この細胞において iRFP670 に対する BV 濃度は飽和していることを示唆している (図 5B)。iRFP713 の場合も *Blvra* 遺伝子欠損は蛍光輝度を上昇させた (図 5D)。興味深いことに、*Blvra* 欠損型 MEF の iRFP713 は BV の添加によって、さらに蛍光輝度が上昇した (図 5D)。また、*Blvra* 欠損による効果は、野生型 MEF に 25  $\mu$ M の BV を添加するより大きかった。これらの結果により *Blvra* 遺伝子欠損は培地中への BV 添加よりも、効果的に細胞内 BV 濃度を増加させることが示唆された。

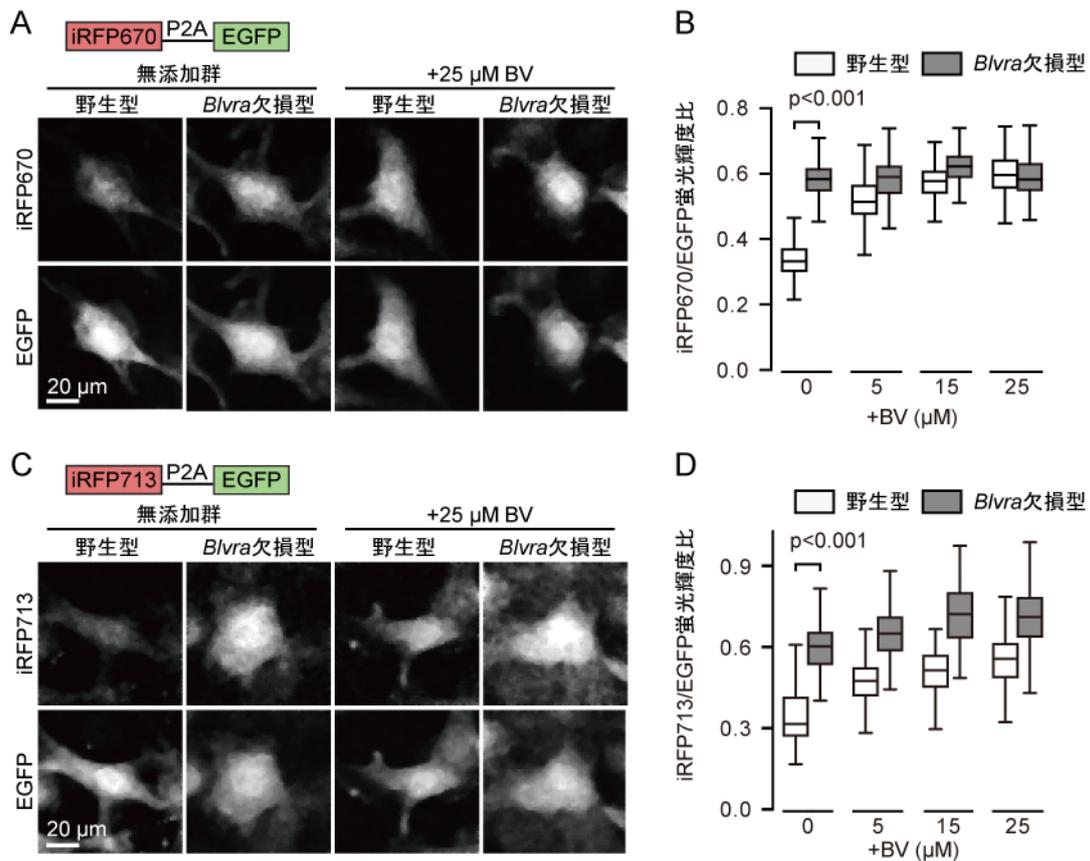


図 5. *Blvra* 欠損型 MEF における iRFP の蛍光輝度比較

(A, C) iRFP-P2A-EGFP を発現する MEF の蛍光画像。BV 添加群では示された濃度の BV を含む培地で 36 時間以上培養し、PBS で 2 回洗浄したのち、蛍光画像を取得した。

(B, D) iRFP 蛍光輝度値を EGFP 蛍光輝度値で標準化した定量結果。箱ひげ図の箱の端は第 1 四分位数、第 3 四分位数を示し、中央の線は中央値を示す。ひげは四分位範囲の 1.5 倍の範囲内の最大値、最小値を示す。それぞれの条件で 150 細胞以上の蛍光輝度値を測定し、定量に用いた。統計解析は student の t 検定を用いた。

## 2-2. *Blvra* 遺伝子欠損による自家蛍光の変化は無視できる

*Blvra* 欠損による内在性 BV の上昇によって自家蛍光が増大する可能性について検証した。野生型、*Blvra* 欠損型それぞれの MEF において、iRFP713-P2A-EGFP の発現ありなしで蛍光輝度を比較したところ、発現なしコントロール群では無視できるほど小さかった (図 6)。この結果により、*Blvra* 欠損による自家蛍光の上昇は無視できることが示された。

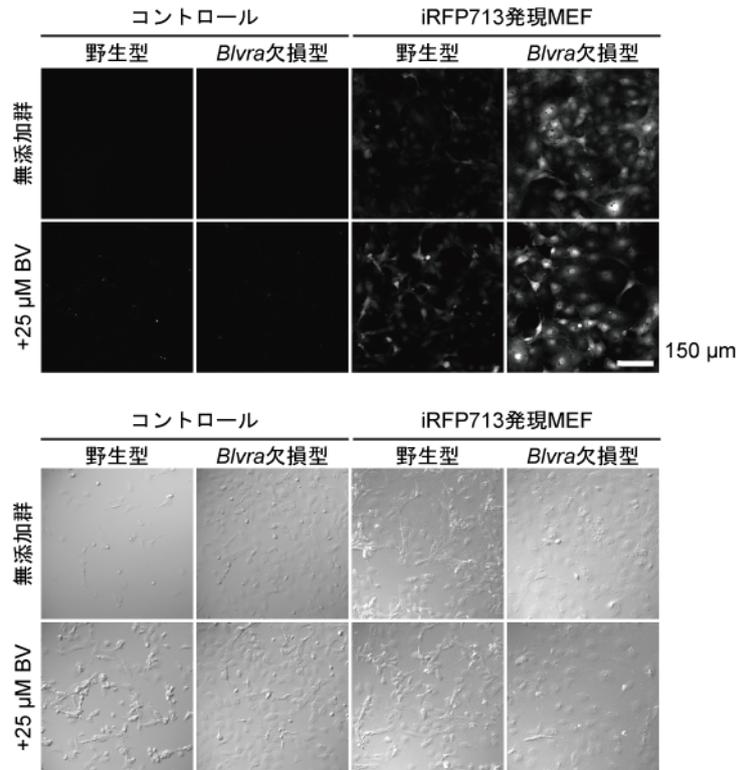


図 6. *Blvra* 欠損型 MEF における自家蛍光の評価

蛍光タンパク質を発現しないコントロール MEF と iRFP713 を発現する MEF の蛍光画像。上段は iRFP713 を検出する撮影条件、下段は微分干渉観察像。BV 添加群では示された濃度の BV を含む培地で 36 時間以上培養し、PBS で 2 回洗浄したのち、蛍光画像を取得した。

### 2-3. 生体組織において *Blvra* 遺伝子欠損は iRFP713 蛍光輝度を上昇させる

*Blvra* 欠損型 MEF において iRFP 蛍光輝度が上昇したことから、生体マウスにおける *Blvra* 遺伝子欠損の効果を調べた。この目的のため、全身に iRFP713-NES、Histone H1-mCherry、mCherry-CAAX を発現する NuCyM マウス (図 7A) (Imanishi et al., 2018) を *Blvra* 欠損型マウスと交配させ、*Blvra* 欠損型 NuCyM マウス系統を確立した。

このトランスジェニックマウスを用いて、いくつかの組織における mCherry、iRFP713 の蛍光画像を二光子顕微鏡で取得した (図 7B)。その結果、*Blvra* 欠損型 NuCyM マウスは耳の皮膚、腎臓、肝臓、膵臓においてそれぞれ野生型 NuCyM の 2.8、2.2、1.3、2.3 倍の iRFP713/mCherry 値を示した (図 7C)。これらの結果は観察を行った組織において、野生型マウスの細胞内 BV が iRFP713 に対して十分でないことを示している。iRFP713 の細胞内局在が臓器間で異なるのは、P2A ペプチドの切断が不完全であるためと考えられる

(Imanishi et al., 2018)。さらに、脳における iRFP713 蛍光輝度を評価したところ、*Blvra* 欠

損型 NuCyM マウスの大脳皮質ニューロンにおいて iRFP713 蛍光輝度が顕著に上昇していた (図 7D)。また、硬膜から 650 nm の深さの iRFP713 蛍光シグナルを検出することができた。

さらに白血球での *Blvra* 欠損の効果を調べるため、*Blvra* 欠損型 NuCyM マウス脾臓から白血球を取り出し、フローサイトメトリーを行った。その結果、固形組織と同様に、解析を行ったすべての細胞集団で iRFP713 蛍光輝度の顕著な増強が見られた (図 8)。また、生体組織においても、*Blvra* 欠損による内在性 BV に上昇によって自家蛍光が増大する可能性について検証するため、NuCyM を発現しない野生型、*Blvra* 欠損型マウスの白血球のフローサイトメトリーを行った (図 8B)。その結果、*Blvra* の有無によって iRFP チャンネルに差が見られなかったことから、*Blvra* 欠損による自家蛍光の上昇は無視できることが示された。

これらの結果から、*Blvra* 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に有用なプラットフォームとなることが示唆される。

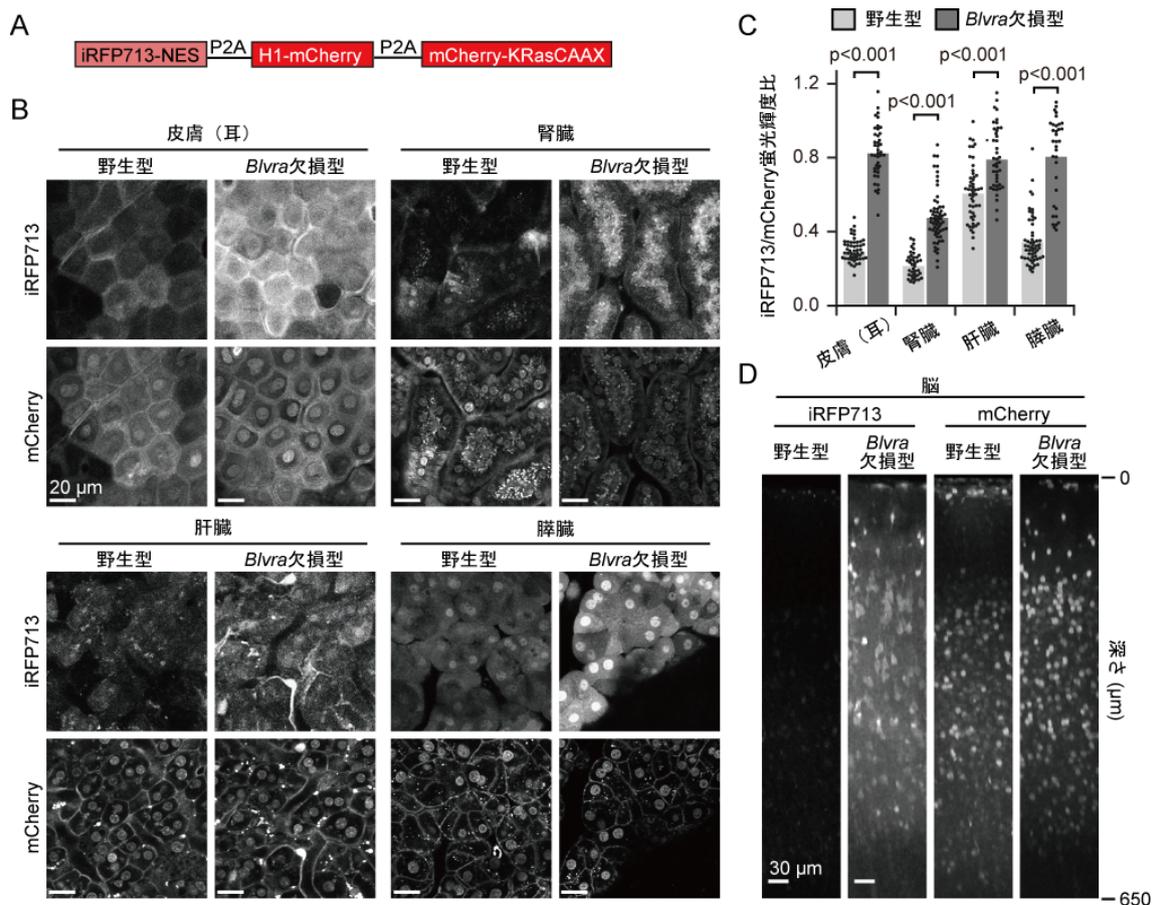


図 7. *Blvra* 欠損型マウスにおける iRFP713 の蛍光輝度比較

(A) NuCyM の構造

(B) NuCyM マウス、*Blvra* 欠損型 NuCyM マウスにおける皮膚 (耳)、腎臓、肝臓、脾臓の蛍光画像。二光子励起顕微鏡を用いて iRFP713、mCherry の蛍光画像を取得した。

(C) iRFP713 蛍光輝度値を mCherry 蛍光輝度値で標準化した解析結果。平均値と各細胞を示す。各条件で 3~4 匹のマウスを解析に用いた。統計解析は student の t 検定を用いた。

(D) NuCyM マウス、*Blvra* 欠損型 NuCyM おける大脳皮質の蛍光画像 (XZ 軸)。

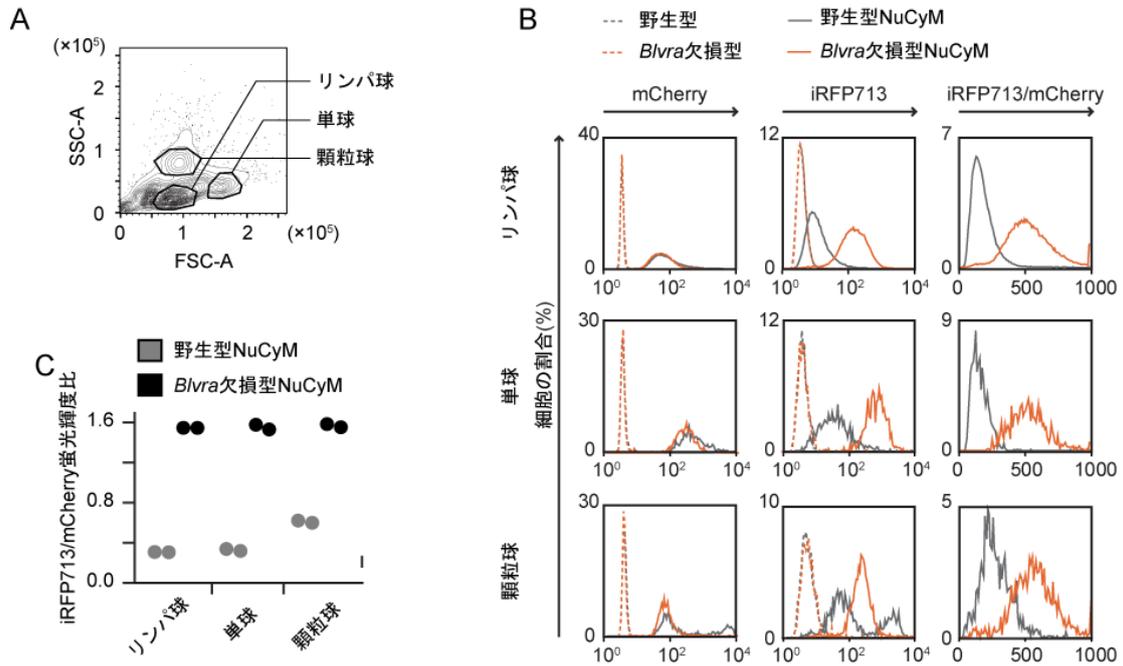


図 8. *Blvra* 欠損型マウス白血球における iRFP713 の蛍光輝度比較

- (A) *Blvra* 欠損型マウスの白血球のカウンタープロット。細胞集団を前方散乱 (FSC)、側方散乱 (SSC) によって分離した。
- (B) 各細胞集団における mCherry 蛍光輝度、iRFP713 蛍光輝度、iRFP713/mCherry 蛍光輝度比のヒストグラム。
- (C) 各細胞集団の iRFP713/mCherry 蛍光輝度比の平均値。各条件下で 2 匹のマウスを解析に用いた。

#### 2-4. MEF において *Blvra* 遺伝子欠損は NIR-GECO1 の蛍光輝度を上昇させる

次に、*Blvra* 欠損型マウスのカルシウムイメージングへの応用を検討した。mIFP (Qian et al., 2019) を基に開発された NIR-GECO1 (Qian et al., 2019) は、近赤外波長領域に吸収、蛍光の極大を持つカルシウムセンサーであり、BV を発色団として用いる (図 9A)。まず、*Blvra* 欠損型 MEF へ NIR-GECO1 を発現させ、蛍光観察したところ、野生型と比べて約 4.3 倍明るい蛍光輝度を示した (図 9B、C)。次にカルシウム応答性を評価する目的で、培地中への ionomycin 添加による蛍光輝度の変化を定量した。その結果、野生型、*Blvra* 欠損型ともに NIR-GECO1 の蛍光輝度は約 50%減少した (図 9B、C)。これらの結果から、*Blvra* 欠損はカルシウムセンサーとしての蛍光輝度減少率を損なうことなく、NIR-GECO1 蛍光輝度を増加させることが示された。

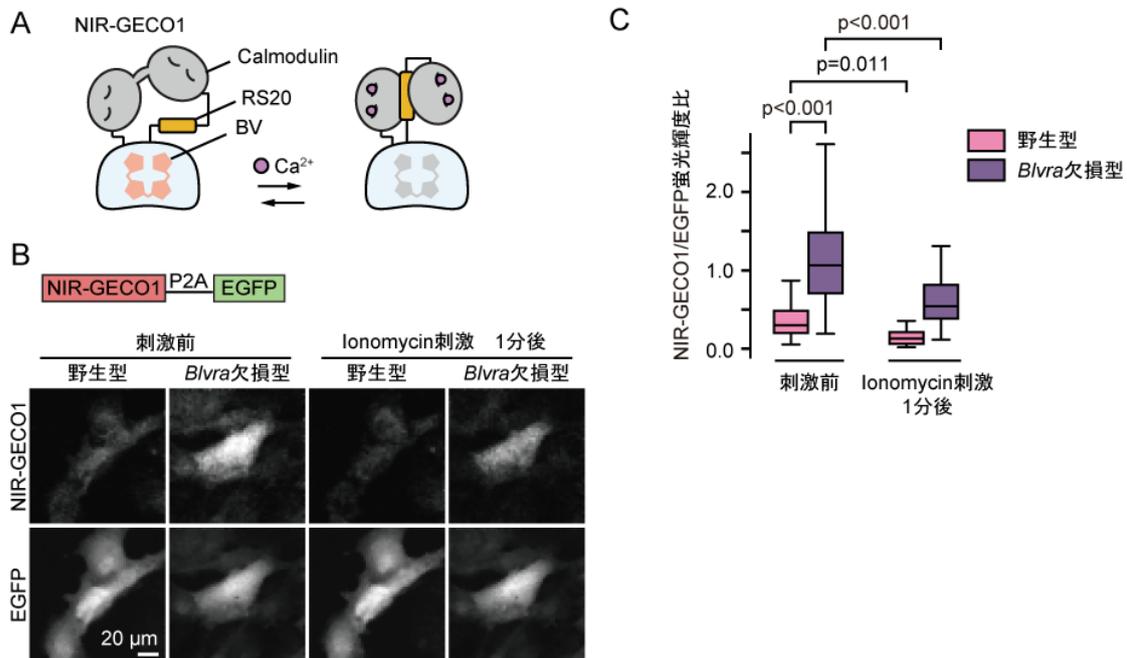


図 9. *Blvra* 欠損型 MEF における NIR-GECO1 の蛍光輝度比較

- (A) NIR-GECO1 の模式図。カルシウムの結合により蛍光が減弱する。RS20 は平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼの Calmodulin 結合ペプチド。
- (B) NIR-GECO1-P2A-EGFP を発現する MEF の蛍光画像。Ionomycin 添加の前、添加 1 分後に蛍光画像を取得した。
- (C) NIR-GECO1 蛍光輝度値を EGFP 蛍光輝度値で標準化した定量結果。箱ひげ図の箱の端は第 1 四分位数、第 3 四分位数を示し、中央の線は中央値を示す。ひげは四分位範囲の 1.5 倍の範囲内の最大値、最小値を示す。それぞれの条件で 55 細胞以上の蛍光輝度値を測定し、定量に用いた。統計解析は student の t 検定を用いた。

### 3. *BLVRA* 遺伝子欠損による近赤外光感受性光遺伝学ツールの光応答性改善

BV は近赤外蛍光タンパク質だけでなく、BphP 由来の光遺伝学ツールの発色団としても用いられる。そこで、*BLVRA* 遺伝子欠損の光遺伝学ツールへの応用を試みた。BphP1-PpsR2 システム (Kaberniuk et al., 2016) は近赤外光に反応する光遺伝学ツールで、BV を発色団として用いる。このシステムは近赤外光下でヘテロ二量体を形成し、暗条件下で解離する。哺乳類細胞において BV はヘム代謝によって産生されるため、このシステムは外部からの BV の添加を必ずしも必要としない。しかしながら、細胞内の BV 濃度は細胞種に大きく依存するうえ、BV の不足は BphP1-PpsR2 の光非依存的な結合を誘導してしまう (Fixen et al., 2014) ことから、細胞内 BV の不足がこのツールの大きな課題である。そこで *BLVRA* 欠損型 HeLa 細胞を用いて、BphP1-PpsR2 system の光応答、暗条件応答が改善するかを評価した。

BphP1-mCherry と PpsR2-mVenus-CAAX を HeLa 細胞へ共発現させた。この系では、近赤外光照射下において BphP1-PpsR2 のヘテロ二量体化が誘導され、細胞質に局在している BphP1-mCherry が細胞膜へと移行する (図 10A)。近赤外光照射下および暗条件下における mCherry 蛍光画像を撮影したところ、野生型の HeLa 細胞では暗条件下においても BphP1-mCherry が細胞膜へと局在していた (図 10B)。また、細胞質の mCherry 蛍光輝度を定量したところ、光依存的な変化は見られなかった。一方で *BLVRA* 欠損型 HeLa 細胞では近赤外光依存的な BphP1-mCherry の膜移行と暗条件下における効率的な解離が観察された (図 10C)。これらの結果により、*BLVRA* 遺伝子欠損とそれに伴う細胞内 BV の蓄積は、BphP1-PpsR2 システムによる効率的な光操作を可能にすることが示唆された。

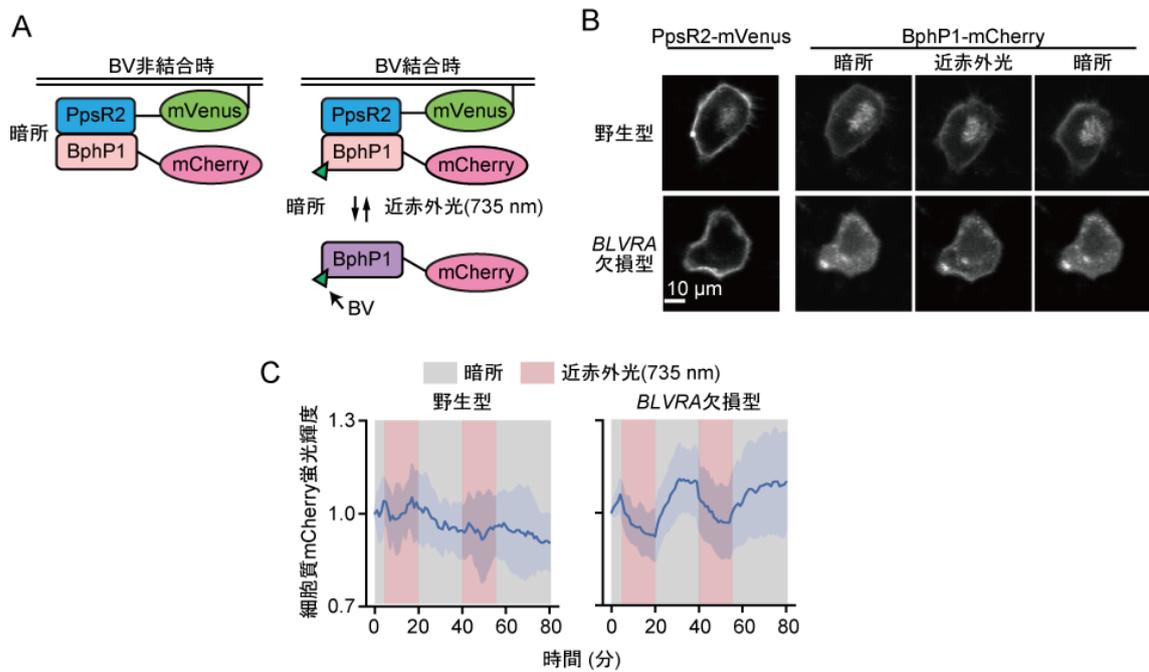


図 10. *BLVRA* 欠損型 HeLa 細胞における BphP1-PpsR2 システムの光非依存的結合の評価

- (A) BphP1-PpsR2 システムの概要。PpsR2-mVenus は CAAX シグナルを介して細胞膜へ局在する。BphP1-mCherry は暗条件下で細胞質に局在し、近赤外光照射において、細胞質から細胞膜へ移行する。
- (B) PpsR2-mVenus-CAAX および BphP1-mCherry を共発現させた HeLa 細胞の蛍光画像。撮影開始前に細胞を 10 分間の暗条件下に置き、撮影中は 15 分間の LED 光 (735 nm、14 mW cm<sup>-2</sup>) 照射と 20 分間の暗条件を 2 回繰り返した。
- (C) 細胞質の mCherry の蛍光輝度値を撮影開始 1 枚目の平均値で標準化した定量結果。野生型 HeLa 細胞は 5 細胞、*BLVRA* 欠損型 HeLa 細胞は 10 細胞を定量し、平均値を太線、標準誤差を薄い青色領域で示した。赤色領域は 735 nm 光の照射期間を示す。

#### 4. *Blvra* 遺伝子欠損マウスは野生型と比較し、記憶・学習能力に有意な差がない

*Blvra* 遺伝子欠損マウスの使用にあたり、*Blvra* 遺伝子の欠損が生理状態に及ぼす影響が懸念される。いくつかのグループが部分的、または全身での *Blvra* 遺伝子欠損マウスを報告している。Vasavda らのグループは *Blvra* 遺伝子欠損マウスの行動解析を行い、モリス水路試験において学習・記憶能力に障害があることを報告している (Vasavda et al., 2022)。そこで、我々のグループで作製した *Blvra* 遺伝子欠損マウスについても学習・記憶能力に障害が見られるかを検証する目的で、バーンズ迷路試験を行った。

トレーニング期では、マウスが円盤上の複数の穴から逃避箱が設置された穴に入るまでの時間を測定した。野生型および *Blvra* 欠損型マウス共に、トレーニングの試行回数を重ねるにつれ、逃避箱へ到達する時間が短縮された (図 11A)。最後のトレーニングから 24 時間後、1 週間後にプローブテストを行った。プローブテストでは逃避箱なしの円盤上で各穴周辺の滞在時間を記録した。両プローブテストにおいて、野生型、*Blvra* 欠損型マウスは、逃避箱の設置してあった穴と両隣の穴 (Z1) に最も長く滞在した (図 11C)。また、遺伝子型間で Z1 穴周辺の滞在時間に統計学的な差は検出できなかった。これらの結果は、*Blvra* 欠損型マウスにおける正常な学習と記憶を獲得、保持を示すものである。このように本研究では *Blvra* 欠損型マウスにおける学習・記憶能力の障害を検出することができなかった。

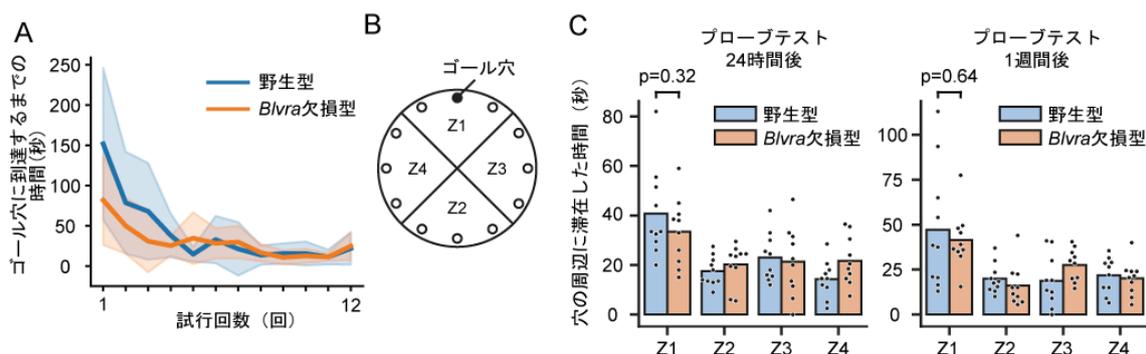


図 11. バーンズ迷路試験による *Blvra* 欠損型マウスの学習・記憶能力の評価

- (A) トレーニング期におけるゴール穴に到達するまでの時間。野生型、*Blvra* 欠損型それぞれ 10 匹ずつを解析した。各色の実線は平均値を、薄い領域は標準偏差を示す。
- (B) 試験に用いた板の 12 穴を Z1~4 の 4 つグループへ分類し、定量に用いた。
- (C) プローブテスト期における各穴の周辺に滞在した時間。野生型、*Blvra* 欠損型それぞれ 10 匹ずつを解析した。平均値と各マウスの結果を示す。統計解析はウェルチの t 検定を用いた。

## 考察

### 細胞内 BV を上昇させる既存アプローチと *Blvra* ノックアウトの比較

本研究では *Blvra* 遺伝子の欠損により内在性 BV を上昇させ、iRFP、NIR-GECO1 の蛍光輝度上昇、BV を要求する光遺伝学ツールの改善に成功した。また、全身で *Blvra* を欠損するマウスを作製し、生体マウスにおける iRFP713 蛍光輝度が上昇することを示した。

本研究で作製した *Blvra* 欠損マウスは MEF において iRFP670、iRFP713 の蛍光輝度を約 2 倍に上昇させた (図 5)。また生体内においても耳の皮膚、腎臓、肝臓、膵臓で iRFP713 蛍光輝度が 2.8、2.2、1.3、2.3 倍に上昇した (図 7C)。これらの結果は *Blvra* 遺伝子欠損が HO1 過剰発現よりも大幅に iRFP713 の蛍光輝度を上昇させることを示している。

### *Blvra* 遺伝子欠損による iRFP713 蛍光輝度上昇の組織間の違い

*Blvra* 遺伝子欠損による iRFP713 蛍光輝度の上昇は組織間で違いが見られた (図 7C)。組織間の BV の濃度は HO 活性、BLVRA 活性、ヘム合成の 3 つの要素に依存すると考えられる。本研究では、脳において *Blvra* 遺伝子欠損によって顕著な iRFP713 蛍光輝度の上昇を示した。脳では HO2、BLVRA の発現量が高く (Komuro et al., 1996; Vasavda et al., 2019; Zhao et al., 2006)、野生型では盛んな BV の産生と分解が起きていることが報告されている。これは *Blvra* 遺伝子欠損によってより多くの BV が細胞内に蓄積しやすいことを示唆しており、本研究の結果と矛盾しない。*Blvra* 遺伝子欠損による iRFP713 蛍光輝度への効果が薄かった肝臓では、ヘムの濃度、HO 活性は高いが (Ingi et al., 1996; Maines, 1988)、BLVRA の発現が他の組織に比べて低いことが報告されている (Komuro et al., 1996; Vasavda et al., 2019)。今回、肝臓では野生型マウスにおいても iRFP713/mCherry 値が他の組織よりも高く、これは細胞内 BV および BV 結合型 iRFP713 の割合が多かったことが示唆される。そのため、*Blvra* 遺伝子欠損による蛍光輝度の上昇が小さかったと想定される。

### NIR-GECO1 の高輝度化

NIR-GECO1 は近赤外の波長領域で観察できることから、生体深部のカルシウム応答の観察に有用であると期待されている。カルシウムの結合により蛍光輝度が減少するという性質上、高いシグナル/ノイズ比を得るには十分な蛍光輝度値が必要である。NIR-GECO1、および改良版として開発された NIR-GECO2 はマウス脳スライス、線虫およびアフリカツメガエルの生体イメージングに応用できることが示されているが (Qian et al., 2020; Qian et al., 2019)、蛍光輝度の低さからマウス脳での生体イメージングは未だ報告されていない。

本研究では *Blvra* 欠損型 MEF を用いることで NIR-GECO1 の蛍光輝度を野生型の約 4.3 倍に高輝度化することに成功した。また、カルシウム応答性は野生型と同等であった (図 9)。このことから、近赤外蛍光カルシウムセンサーの生体マウスへの応用に *Blvra* 欠損マ

ウスが有用なプラットフォームとなることが期待できる。

### **Blvra 遺伝子欠損による毒性**

*Blvra* 欠損型マウスの使用に関わる最大の懸念は、それに伴う生理機能の障害である。しかし、現在のところ本研究で作製した *Blvra* 欠損型マウスは正常な妊孕能、成長、寿命を示しており、明らかな異常は見られていない。

*Blvra* ノックアウトマウスに関する報告は 5 件ある (表 2)。Hinds らは肝細胞に特異的に *Blvra* を欠損するマウスを作製し、このマウスは空腹時高血糖と高インスリン血症の増強を示したが、体重、身体組成、血漿ビリルビン値に変化をもたらさなかった (Hinds et al., 2016)。Bisht らは骨髄系細胞で *Blvra* を欠失させ、いくつかのケモカインが増加することを見出した (Bisht et al., 2019)。全身で *Blvra* を欠損させたマウスは 2 系統報告されている。Chen らは、*Blvra* 欠損型マウスは肉眼的な異常はなく、10 週齢における脳、心臓、胚、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓の重量について正常であること、血液学検査により肝および腎機能に障害は見られないことを報告した (Chen et al., 2018)。しかしこのマウスは血漿中のコレステロールエステルヒドロペルオキシドの上昇を認め、内因性酸化ストレスの亢進が示唆された。Vasavda らは、*Blvra* 欠損型マウスがスーパーオキシドに過敏に反応することを報告している (Vasavda et al., 2019)。

最近、Vasavda らは *Blvra* 欠損マウスを用いて行動解析を行い、モリス水迷路試験において学習・記憶能力の障害が認められることを報告した (Vasavda et al., 2022)。本研究では *Blvra* 欠損型マウスの学習・記憶能力を評価する目的でバーンズ迷路試験を行ったが、野生型との間に統計学的有意な差は見られなかった (図 11)。Vasavda らの報告と結果に違いが見られた要因として、試験の違いが考えられる。モリス水迷路試験はバーンズ迷路試験に比べ、マウスにより高いストレスを与えていることが報告されている (Harrison et al., 2009)。また、両試験ともにストレスレベルや不安、鬱指標などの混合要因が試験結果に影響を与えることも知られているため、学習・記憶能力の評価には複数の試験を用いた複合的な解釈が必要である。

さらに、ヒトの *BLVRA* 遺伝子変異を有する家系も報告されているが、肝機能障害時における高ビリルビン血症とそれに起因する緑色黄疸を示すこと以外の症状は表れていないことが報告されている (Nytofte et al., 2011)。

以上の先行研究と本研究結果を総合すると、*Blvra* 欠損マウスは体重、成長、寿命に影響を与えず、明らかな異常は見られないが、いくつかのシグナル伝達経路に緩やかな異常を引き起こす可能性がある。しかしながら、いかなる蛍光タンパク質やバイオセンサーの発現、あるいは顕微鏡で観察すること自体による細胞内のシグナル伝達経路に与える摂動を回避することはできない。*Blvra* 欠損マウスの使用により、近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を上昇させることで、蛍光タンパク質の発現レベルを低下させることができ、また、観察時の励起光を抑えることができる。したがって *Blvra* 欠損によるシグナル伝達経路の攪

乱というデメリットと蛍光輝度の増加というメリットを比較検討する必要がある。

組織	表現型	マウス系統 / 標的	文献
肝臓	高脂肪食下での肝脂質蓄積 空腹時高血糖および高インスリン血症の増強	C57BL/6J エクソン2欠失	Hinds et al., 2016
骨髄系細胞	骨髄系細胞におけるケモカイン発現と走化性の亢進	129S / C57BL/6J エクソン4,5欠失	Bisht et al., 2019
全身欠損	内因性酸化ストレスの亢進： コレステロールエステルヒドロペルオキシドおよび 酸化ペルオキシレドキシニン2の高濃度化	C57BL/6J エクソン3欠失	Chen et al., 2018
全身欠損	神経細胞における酸化ストレスに対する感受性の増強 学習・空間記憶の障害	C57BL/6J エクソン3欠失	Vasavda et al., 2019 Vasavda et al., 2022

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました松田道行教授、寺井健太准教授、並びに京都大学生体制御学分野の皆様にご心より感謝申し上げます。

ノックアウトマウスを作製していただいた名古屋大学・隅山健太教授、行動解析の実験手技、解析をサポートしていただいた京都大学・吉原亨特定講師ならびにマウス行動解析室の皆様、プラスミドの提供や多くの議論を交わしてくださいました基礎生物学研究所・青木一洋教授、宇田耀一博士、京都大学・今吉格教授、Albert Einstein College of Medicine・Dr. Vladislav Verkhusha に心より感謝申し上げます。

研究遂行にあたり、日本学術振興会特別研究員制度のご支援を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。最後に、これまで私を支えてくださいました家族、友人の皆様にご感謝申し上げます。

小鉢 健樹

連絡先: [kobachi.kenju.22z@st.kyoto-u.ac.jp](mailto:kobachi.kenju.22z@st.kyoto-u.ac.jp)

本学位論文は以下の学術論文に基づいて書かれたものである。

Kenju Kobachi, Sota Kuno, Shinya Sato, Kenta Sumiyama, Michiyuki Matsuda, and Kenta Terai  
Biliverdin Reductase-A Deficiency Brighten and Sensitize Biliverdin-binding Chromoproteins  
Cell Structure and Function, 45(2), 131-141, 2020

## 参考文献

- Bisht, K., Canesin, G., Cheytan, T., Li, M., Nemeth, Z., Csizmadia, E., Woodruff, T.M., Stec, D.E., Bulmer, A.C., Otterbein, L.E., *et al.* (2019). Deletion of Biliverdin Reductase A in Myeloid Cells Promotes Chemokine Expression and Chemotaxis in Part via a Complement C5a--C5aR1 Pathway. *J Immunol* *202*, 2982-2990.
- Chen, W., Maghzal, G.J., Ayer, A., Suarna, C., Dunn, L.L., and Stocker, R. (2018). Absence of the biliverdin reductase-a gene is associated with increased endogenous oxidative stress. *Free radical biology & medicine* *115*, 156-165.
- Chernov, K.G., Redchuk, T.A., Omelina, E.S., and Verkhusha, V.V. (2017). Near-Infrared Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools Engineered from Phytochromes. *Chemical reviews* *117*, 6423-6446.
- Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* *248*, 73-76.
- Filonov, G.S., Piatkevich, K.D., Ting, L.M., Zhang, J., Kim, K., and Verkhusha, V.V. (2011). Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. *Nature biotechnology* *29*, 757-761.
- Fixen, K.R., Baker, A.W., Stojkovic, E.A., Beatty, J.T., and Harwood, C.S. (2014). Apo-bacteriophytochromes modulate bacterial photosynthesis in response to low light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E237-244.
- Harrison, F.E., Hosseini, A.H., and McDonald, M.P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural brain research* *198*, 247-251.
- Hawley, R.G., Lieu, F.H., Fong, A.Z., and Hawley, T.S. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene therapy* *1*, 136-138.
- Hinds, T.D., Jr., Burns, K.A., Hosick, P.A., McBeth, L., Nestor-Kalinoski, A., Drummond, H.A., AlAmodi, A.A., Hankins, M.W., Vanden Heuvel, J.P., and Stec, D.E. (2016). Biliverdin Reductase A Attenuates Hepatic Steatosis by Inhibition of Glycogen Synthase Kinase (GSK) 3beta Phosphorylation of Serine 73 of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) alpha. *The Journal of biological chemistry* *291*, 25179-25191.
- Imanishi, A., Murata, T., Sato, M., Hotta, K., Imayoshi, I., Matsuda, M., and Terai, K. (2018). A Novel Morphological Marker for the Analysis of Molecular Activities at the Single-cell Level. *Cell structure and function* *43*, 129-140.
- Ingi, T., Chiang, G., and Ronnett, G.V. (1996). The regulation of heme turnover and carbon monoxide biosynthesis in cultured primary rat olfactory receptor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *16*, 5621-5628.
- Kaberniuk, A.A., Shemetov, A.A., and Verkhusha, V.V. (2016). A bacterial phytochrome-based

optogenetic system controllable with near-infrared light. *Nature methods* *13*, 591-597.

Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, M.K., Shin, B.A., and Choi, S.Y. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PloS one* *6*, e18556.

Komuro, A., Tobe, T., Nakano, Y., Yamaguchi, T., and Tomita, M. (1996). Cloning and characterization of the cDNA encoding human biliverdin-IX alpha reductase. *Biochimica et biophysica acta* *1309*, 89-99.

Maines, M.D. (1988). Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *2*, 2557-2568.

McDonagh, A.F. (2010). The biliverdin-bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel? *Free radical biology & medicine* *49*, 814-820.

Miller, D.R., Jarrett, J.W., Hassan, A.M., and Dunn, A.K. (2017). Deep Tissue Imaging with Multiphoton Fluorescence Microscopy. *Current opinion in biomedical engineering* *4*, 32-39.

Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *Journal of virology* *72*, 8150-8157.

Nytofte, N.S., Serrano, M.A., Monte, M.J., Gonzalez-Sanchez, E., Tumer, Z., Ladefoged, K., Briz, O., and Marin, J.J. (2011). A homozygous nonsense mutation (c.214C->A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *Journal of medical genetics* *48*, 219-225.

Oliinyk, O.S., Balaban, M., Clark, C.L., Carey, E., Pletnev, S., Nimmerjahn, A., and Verkhusha, V.V. (2022). Single-domain near-infrared protein provides a scaffold for antigen-dependent fluorescent nanobodies. *Nature methods* *19*, 740-750.

Oliinyk, O.S., Shemetov, A.A., Pletnev, S., Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V.V. (2019). Smallest near-infrared fluorescent protein evolved from cyanobacteriochrome as versatile tag for spectral multiplexing. *Nature communications* *10*, 279.

Piatkevich, K.D., Suk, H.J., Kodandaramaiah, S.B., Yoshida, F., DeGennaro, E.M., Drobizhev, M., Hughes, T.E., Desimone, R., Boyden, E.S., and Verkhusha, V.V. (2017). Near-Infrared Fluorescent Proteins Engineered from Bacterial Phytochromes in Neuroimaging. *Biophysical journal* *113*, 2299-2309.

Qian, Y., Cosio, D.M.O., Piatkevich, K.D., Aufmkolk, S., Su, W.C., Celiker, O.T., Schohl, A., Murdock, M.H., Aggarwal, A., Chang, Y.F., *et al.* (2020). Improved genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicators for in vivo imaging. *PLoS biology* *18*, e3000965.

Qian, Y., Piatkevich, K.D., Mc Larney, B., Abdelfattah, A.S., Mehta, S., Murdock, M.H., Gottschalk, S., Molina, R.S., Zhang, W., Chen, Y., *et al.* (2019). A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator. *Nature methods* *16*, 171-174.

Rodriguez, E.A., Tran, G.N., Gross, L.A., Crisp, J.L., Shu, X., Lin, J.Y., and Tsien, R.Y. (2016). A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein. *Nature methods* *13*, 763-769.

Shcherbakova, D.M., Baloban, M., Emelyanov, A.V., Brenowitz, M., Guo, P., and Verkhusha, V.V. (2016). Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging. *Nature communications* *7*, 12405.

Shcherbakova, D.M., and Verkhusha, V.V. (2013). Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging. *Nature methods* *10*, 751-754.

Shemetov, A.A., Monakhov, M.V., Zhang, Q., Canton-Josh, J.E., Kumar, M., Chen, M., Matlashov, M.E., Li, X., Yang, W., Nie, L., *et al.* (2021). A near-infrared genetically encoded calcium indicator for in vivo imaging. *Nature biotechnology* *39*, 368-377.

Shemetov, A.A., Oliinyk, O.S., and Verkhusha, V.V. (2017). How to Increase Brightness of Near-Infrared Fluorescent Proteins in Mammalian Cells. *Cell chemical biology* *24*, 758-766 e753.

Shu, X., Royant, A., Lin, M.Z., Aguilera, T.A., Lev-Ram, V., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science* *324*, 804-807.

Sunagawa, G.A., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Fujishima, H., Ukai, H., Nishimura, O., Shi, S., Ohno, R.I., Narumi, R., *et al.* (2016). Mammalian Reverse Genetics without Crossing Reveals Nr3a as a Short-Sleeper Gene. *Cell reports* *14*, 662-677.

Suzuki, J., Sukezane, T., Akagi, T., Georgescu, M.M., Ohtani, M., Inoue, H., Jat, P.S., Goff, S.P., Hanafusa, H., and Shishido, T. (2004). Loss of c-abl facilitates anchorage-independent growth of p53- and RB- deficient primary mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* *23*, 8527-8534.

Takeda, I., Yoshihara, K., Cheung, D.L., Kobayashi, T., Agetsuma, M., Tsuda, M., Eto, K., Koizumi, S., Wake, H., Moorhouse, A.J., *et al.* (2022). Controlled activation of cortical astrocytes modulates neuropathic pain-like behaviour. *Nature communications* *13*, 4100.

Vasavda, C., Kothari, R., Malla, A.P., Tokhunts, R., Lin, A., Ji, M., Ricco, C., Xu, R., Saavedra, H.G., Sbodio, J.I., *et al.* (2019). Bilirubin Links Heme Metabolism to Neuroprotection by Scavenging Superoxide. *Cell chemical biology* *26*, 1450-1460 e1457.

Vasavda, C., Semenza, E.R., Liew, J., Kothari, R., Dhindsa, R.S., Shanmukha, S., Lin, A., Tokhunts, R., Ricco, C., Snowman, A.M., *et al.* (2022). Biliverdin reductase bridges focal adhesion kinase to Src to modulate synaptic signaling. *Science signaling* *15*, eabh3066.

Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C.N., Grutzendler, J., and Gan, W.B. (2010). Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nature protocols* *5*, 201-208.

Yu, D., Baird, M.A., Allen, J.R., Howe, E.S., Klassen, M.P., Reade, A., Makhijani, K., Song, Y., Liu, S., Murthy, Z., *et al.* (2015). A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling in vivo. *Nature methods* *12*, 763-765.

Yu, D., Gustafson, W.C., Han, C., Lafaye, C., Noirclerc-Savoie, M., Ge, W.P., Thayer, D.A., Huang, H., Kornberg, T.B., Royant, A., *et al.* (2014). An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. *Nature communications* 5, 3626.

Zhao, H., Wong, R.J., Nguyen, X., Kalish, F., Mizobuchi, M., Vreman, H.J., Stevenson, D.K., and Contag, C.H. (2006). Expression and regulation of heme oxygenase isozymes in the developing mouse cortex. *Pediatric research* 60, 518-523.