

生体内酸素を操作するオプトジェネティクスツールの開発と 酸素応答研究への応用

Development of new optogenetic tool to control *in vivo* oxygen tension and its application for investigating cellular response to oxygen *in vivo*.

(日本生化学学会推薦)

代表研究者 同志社大学 西川恵三 Doshisha University Keizo Nishikawa

Quantitative approaches are widely used in physics and chemistry to mathematically comprehend natural phenomena by employing precisely measured physical quantities. The successful retrieval of samples from the Ryugu asteroid in 2020 by the Hayabusa2 spacecraft is still fresh in our memory. This remarkable achievement would not have been possible without high-resolution quantitative data. However, in biology, there has been a trend towards qualitative analysis, such as molecular biology, and quantitative thinking and methodology are not adequately employed. In this report, we present advancements in the development of a novel two-photon excitation microscopy technique to quantitatively measure the concentration of oxygen in living organisms, along with progress made in the technology to manipulate oxygen concentration in living organisms.

研究目的

酸素は、生体内のすべての細胞にとっての生命活動の源である。酸素が制限された生体内環境において、細胞の恒常性維持に欠かせないのが低酸素応答である。低酸素応答の研究は、従来から精力的に取り組まれており、かなり理解が進んでいる感覚に陥る。しかしながら、「生体内の個々の細胞がどの程度の酸素濃度に晒されているか」の実に基本的な情報すら不明な現状にある。即ち、生体組織において細胞の恒常性に影響を及ぼす酸素濃度がどの程度であるかは未だ曖昧なままである。このために、非生理的な酸素濃度条件(正常 21%、低酸素 10% *p* 酸素等)で行われている従来の細胞生物学研究では、酸素の働きを見誤る可能性がある。実際、培養細胞を主たる研究手段として用いてきた従来知見には、近年、*in vivo*の現象との整合性が取れない問題が散見され始

めている(1)。従って、黎明期を経て過渡期へ移行しつつある現代の低酸素研究において、真偽を伴う膨大な従来知見を改めて再考し、酸素に対する真の生体応答を解き明かすための新規アプローチが今必要である。二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング技術の長足の進歩は、生きた動物個体のなかの細胞をありのままに観察することを可能にした。さらに、様々な生体分子を可視化する蛍光プローブ技術の進歩も相まって、細胞の状態(細胞分化・形質など)の変化をリアルタイムに観察することも可能になってきた。この一方で、生体ガスのイメージング研究は大きく立ち遅れている。とりわけ、酸素は反応性が高い分子であるために、*in vivo*での顕微鏡観察は困難と考えられてきた。この現状に対して、申請者は、近年、生体内の酸素の変動をリアルタイムに観察する二光子励起顕微鏡法の確立に成功した。そ

ここで、本研究では、二光子励起顕微鏡法を主たる方法として用いることで、「酸素を見る・測る・操作する」新規の要素技術を開発し、さらにはこれらの要素技術を糾合することで、従来では見られない酸素に対する生体応答研究を展開することを目的とする。これによって、本研究のねらいは、酸素生物学研究の観点では、酸素に対する細胞応答を実際に生体内で観察することで、非生理的な酸素条件で行われてきた従来の *in vitro* 解析では見出されない細胞応答の実態解明につなげることである。一方、イメージング研究の観点では、酸素を対象としたオプトジェネティクスと生体イメージングの融合研究が、発生工学(遺伝子改変マウスの作出)などに次いで、生命科学研究にパラダイムシフトを生み出す新しいツールとして発展させることにある。

研究経過

(1) 酸素を見る・測る技術の開発

研究代表者らは、生きた状態にあるマウスの骨組織の中に存在する破骨細胞の酸素環境の実態を1細胞レベルで明らかにするために、二光子励起顕微鏡を用いた酸素イメージング法の確立に取り組んだ。本方法では、イリジウム錯体の光励起に伴って発せられるりん光を用いて、生体骨組織内の酸素を観察する。光励起されたイリジウム錯体は、周囲の酸素と衝突することでエネルギー移動消光を受ける性質がある。このために、イリジウム錯体を取り込ませた細胞の中の酸素濃度が高くなるにつれて、りん光が減弱することになる。さらに、本研究では、時間相関単一光子係数法を用いてりん光寿命(りん光が消光するまでの平均時間)を測定することで、酸素濃度の定量計測も可能にした。一般的にイメージング研究で用いられる発光(蛍光やりん光)の強度情報は、

様々な観察条件(光を発するプローブの濃度や退色など)による影響を受けるために定量解析の用途に適さない。とりわけ、二光子励起顕微鏡による生体深部観察においては、生体組織そのものが光吸収・散乱を生じるために、深度の違いだけで強度が変化する。このため、生体組織深部からのりん光を通常の二光子励起顕微鏡を用いて観察した場合、りん光強度の変動が酸素濃度に起因したものであるかを判断することが難しい。これに対して、寿命情報は、光を発するプローブ種固有のパラメータであり、観察条件による影響を受けないバイアスフリーなリードアウトとされている。そこで、成熟破骨細胞特異的に発現するプロトンポンプの遺伝子座へGFP遺伝子を組み込んだマウスヘイリジウム錯体を投与することで、緑色蛍光を指標とした成熟破骨細胞の観察に加えて、りん光寿命計測による酸素濃度の定量計測のためのデュアルイメージングを行なった。その結果、生きた状態にあるマウスの頭蓋骨内の成熟破骨細胞の酸素濃度は、17.4 mmHg(2.3%)~36.4 mmHg(4.8%)の範囲内で維持されていることが明らかとなった。さらに、筆者らは、同方法を用いることで、生体骨組織における破骨細胞の前駆細胞の酸素濃度も明らかにした。破骨細胞の前駆細胞で発現する *CXCR1* 遺伝子座へGFP遺伝子を組み込んだマウスヘイリジウム錯体を投与し、緑色蛍光を指標とした単球系細胞の観察に加えて、りん光寿命計測による酸素濃度の定量計測を行なった。その結果、生体骨組織内の単球系細胞の酸素濃度は、18.2 mmHg(2.4%)~40.2mm Hg(5.3%)の範囲で維持されていることが明らかとなった。

(2) 酸素を操作する技術の開発

本研究では、生体内の酸素運搬にかかわる赤血球内のヘモグロビンの量を光操作できる新規ツールを開発することで、酸素の運搬・貯蔵システムを局所的

に操作し、生体内局所の酸素濃度を変化させるための方法論の開発を目指した。本助成期間においては、タンパク質の分解を光照射によって誘導することで、タンパク質の発現量を光操作できる基盤技術の確立に取り組んだ。光感受性タンパク質分解ドメインは、Taxis 博士らによって開発された generic photosensitive degron (PSD)ドメインと Wandless 博士らが作製した blue-light inducible degradation (B-LID)ドメインがこれまでに報告されている(2-4)。PSDドメインは、光感受性ドメイン LOV2 とユビキチン非依存的にプロテアソームを介して分解されるオルニチンデカルボキシラーゼ由来の分解ドメイン(ODC)から構成されており、青色光照射により ODCドメインが露出することで、PSDドメインと融合したタンパク質の分解が誘導される。一方、B-LIDドメインは、タンパク質分解モジュール RRRG ペプチドと LOV2 より構成され、PSDドメインと比べて小さなタンパク質構造である。PSDドメイン同様に、青色光照射により RRRGモチーフが露出することで、B-LIDドメインと融合したタンパク質の分解が誘導される。そこで、本研究では、PSDおよびB-LIDドメインを用いて、光照射によるタンパク質分解の是非について緑色蛍光タンパク質 EGFP を用いて検討した。PSD、B-LID、並びに PSDの改変型 PSDK121MN128YG138A、K92RE132AE155GドメインのN末端領域にEGFPを融合したタンパク質を発現誘導できる発現ベクターを作製した。当該ベクターをHEK293T並びにMEL細胞に導入し、それぞれの光感受性タンパク質分解ドメインと融合したEGFPを一過性に発現させた後、470nmの青色光を照射した。4時間の照射後、フローサイトメトリーによってEGFP発現細胞の定量解析を試みた。その結果、NIH3T3細胞では、B-LIDが55%、PSDが5%、PSDK121MN128YG138Aが4%、K92RE132AE155G

が9%、一方、MEL細胞では、B-LIDが92%、PSDが73%、PSDK121MN128YG138Aが84%、K92RE132AE155Gが85%まで細胞内のEGFP発現の減少が誘導された。さらに、MEL細胞においてEGFP-B-LIDを安定発現する細胞株3クローンを樹立し、青色光の照射を行ったところ、79%、91%、87%まで細胞内のEGFP発現の減少がそれぞれのクローンで観察された。

考察

本研究では、新たに開発した二光子りん光寿命イメージング法を活用することで、生きた状態にあるマウスの骨組織の中の酸素濃度の定量計測に成功した。測定の結果、破骨細胞ならびに破骨前駆細胞の中の酸素濃度は、約2~5%の範囲にあることが明らかとなった。先行研究によると、骨表面から40 μ m離れた骨髓内の酸素濃度は1.3%、骨内膜付近の領域では1.8%と報告されている(5)。この先行研究で用いられたりん光プローブは、細胞内への浸透性が低いために、細胞外環境の酸素濃度が測定されたものであると考えられる。生体内の酸素の多くは、グロビン系のタンパク質を介して細胞内で運搬・貯蔵されているために、細胞外環境に存在する溶解酸素は少ない。このために、先行研究によって明らかにされた骨髓内の酸素濃度は、実際に細胞が晒されている酸素濃度を過小評価する傾向にあると考えられる。

続いて、本研究では、酸素を光操作するツール開発のための基盤技術として、光感受性タンパク質分解ドメインの検討を行った。その結果、赤血球系の細胞株で利用可能な光感受性タンパク質分解ドメインとしてB-LIDドメインの有用性を見出した。今後は、B-LIDドメインと誘導したグロビン遺伝子を発現するマウスを作出し、生体組織内でのヘモグロビタンパク質の分解誘導ならびに酸素濃度の操作の

実現可能性について検討する予定である。

参考文献

1. Ast T and Mootha V. Oxygen and mammalian cell culture: are we repeating the experiment of Dr.Ox? *Nature Metabolism* 1, 858-60, 2019.
2. Renicke C. et al., A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chemistry&Biology* 20, 619-26, 2013.
3. Bongler KM. et al., General method for regulating protein stability with light. *ACS chemical biology* 9, 111-5, 2013.
4. Usherenko S. et al., Photo-sensitive degron variants for tuning protein stability by light. *BMC Systems Biology* 8, 128, 2014.
5. Spencer JA. et al., Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508, 269-73, 2014.

研究の発表

口頭発表

1. 西川恵三、生体骨組織の正しい酸素濃度情報に基づいた新たな低酸素応答の研究、第7回日本CKD-MBD学会学術集会 シンポジウム招待講演 名古屋 2023年3月5日
2. 西川恵三、破骨細胞のエピジェネティクス研究～細胞を取り巻く代謝環境との新たなクロストーク～、第37回日本整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム招待講演 宮崎 2022年10月14日
3. 西川恵三、破骨細胞の代謝とエピジェネティクス、第40回日本骨代謝学会年会 教育研究招待講演 岐阜 2022年7月22日
4. 西川恵三、二光子りん光寿命イメージング法を用いた酸素生物学研究、第44回日本光医学・光生物学会年会 シンポジウム招待講演 東京 2022年6月25日
5. 西川恵三、骨の Physioxia 生物学、第94回日本生化学会年会 シンポジウム招待講演 横浜 2021年11月3日
6. 西川恵三、生体イメージングによる in vivo 代謝研究の最前線、第39回日本骨代謝学会学術集会 シンポジウム招待講演 大阪 2021年10月8日
7. 西川恵三、酸素の in vivo イメージング法の開発

と骨代謝研究への応用、第39回日本骨代謝学会学術集会 あり方委員会企画招待講演 大阪 2021年10月8日

誌上発表

1. Nishikawa K*, Takegami H and Sesaki H, Opa1-mediated mitochondrial dynamics is important for osteoclast differentiation. *microPublication Biology* 2022 10.17912/micropub.biology.000650. *責任著者
2. Narazaki A, Shimizu R, Yoshihara T, Kikuta J, Sakaguchi I, Tobita S, Mori M, Ishii M and Nishikawa K*, Determination of the physiological range of oxygen tension in bone marrow monocytes using two-photon phosphorescence lifetime imaging microscopy, *Scientific Reports* 12, 3497, 2022. *責任著者