

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05726

研究課題名（和文）革新的多重イメージングによる組織複雑化過程の可視化

研究課題名（英文）Visualisation of tissue heterogenisation by innovative multiplex imaging

研究代表者

小幡 史明 (Obata, Fumiaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40748539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 24,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではショウジョウバエ遺伝学を駆使し、革新的ラマンイメージング技術の実用性を飛躍的に上昇させると共に、その生物学的有用性を実証した。その結果、神谷班が開発した複数の activatable ラマンプローブおよびラマンプローブ開発に資する蛍光プローブについて、ショウジョウバエの酵素発現領域のみを可視化することに成功した。また、小関班との共同研究により、メチオニンの取り込みを SRS イメージングによって可視化することに成功した。さらに、栄養や腸内細菌操作により、老化による組織複雑化過程を伸縮させた場合に見られる発現変動などを詳細に解析し、ラマンイメージングに資する基礎的記述を多数行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマンイメージングは、その特性から蛍光を用いた生体イメージングの原理的障壁を突破する可能性を秘めている。本計画研究が参画する領域「革新ラマン」内にて開発される新規機能性ラマンプローブは、生体分子を高感度にイメージングするための有用な新技術となる。本研究から得られた成果は、生命現象をより詳細に理解するための新規イメージング技術の創出につながり、医学・生物学を初め幅広い分野に影響を与えると期待される。また、老化過程を詳細に記述したことから、高齢化社会における新規創薬標的や食理学的な介入の可能性につながる成果が得られたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we utilised Drosophila genetics to dramatically increase the utility of an innovative Raman imaging technique and to demonstrate its biological usefulness. We succeeded in visualising the enzyme activity in Drosophila with several activatable Raman probes and fluorescent probes that contribute to the development of Raman probes which the Kamiya group developed. In collaboration with the Ozeki group, we also performed visualisation of methionine uptake by SRS imaging. Furthermore, we analysed in detail the transcription profile of animals with increased or decreased lifespan due to the manipulation of nutrition and microbiota in order to describe the heterogeneity of aged tissues. This made a number of basic descriptions that contribute to Raman imaging.

研究分野：栄養代謝生理学

キーワード：ラマンイメージング ラマンプローブ ショウジョウバエ遺伝学 アミノ酸 老化

## 1. 研究開始当初の背景

生物個体は、一つの細胞から形作られる。発生過程により複雑化した成熟個体は、細胞間・組織間・そして臓器間の高度に有機化された相互作用を介して保たれる。一方、さらに時間を進めると、このような生物組織を構成する秩序が崩壊し、個体が「老化」し、がんを始めとする様々な疾患を発症する。しかしながら、発生、老化、がん化を含め、組織の複雑化過程を可視化することは容易ではなく、その基本的なメカニズムは不明である。時間軸に沿った生物個体の複雑化は、究極的に個々のタンパク質・オルガネラ・細胞の振る舞いの総和により説明されると考えられる。その複雑化過程を理解するには、単一個体の中でこれらの構成要因を同時に視る必要がある。蛍光イメージングの発達によって、単一分子種の挙動を、生きた生物個体の中で観察する事は容易になった。波長の選択により、3 つ程度の生体分子の同時イメージングは現実的である。しかしながら、我々を構成する生体分子の数は、少なく見積もって数万、あるいはそれ以上である。また、生体分子同士の有機的な相互作用や、異質な細胞集団が混在する組織構造を鑑みれば、多数のタンパク質・オルガネラの挙動を同一組織内で観察する必要がある。このような超多重イメージングは、現状では技術的に困難である。

## 2. 研究の目的

ラマンイメージングは、その特性から蛍光を用いた生体イメージングの原理的障壁を突破する可能性を秘めている。本計画研究が参画する領域「革新ラマン」内にて開発される新規機能性ラマンプローブは、生体分子を高感度にイメージングするための有用な新技術となる。しかしその実用化においては、適切なプローブの設計、イメージングを可能とする顕微鏡システム、そして生物個体での精緻な検証を要する。本研究では、ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、当該イメージング技術の実用性を飛躍的に上昇させると共に、その生物学的有用性を実証する。次項実験計画にも基づき、①代謝酵素・消化酵素活性の組織内多重検出、②オルガネラ構造の動的イメージング、③多重・超解像イメージングの3点について確立する。個体発生・老化・がん化時にみられるヘテロジニアスな組織変容の構造基盤を明らかにし、ラマンイメージング技術の汎用性を大幅に拡大させる。

## 3. 研究の方法

新規プローブの生体実証試験を行う上で、ショウジョウバエの高度な遺伝学は極めて有効である。ショウジョウバエは発生から老化までの様々な生命現象を、生きた個体の中で解析出来る優れたモデル生物である。遺伝学的ツールが豊富であり、新規プローブの生体応用可能性を迅速に解析するのに長けている。特定の遺伝子を異所発現させて、その機能を解析することも容易である。生体組織内で特定の細胞集団のみの遺伝型クローンを導出することで、本領域で創出する多重イメージングの生体実証試験を行う。

また組織複雑化過程を可視化する際に、どのような酵素・タンパク質を標的とするかを知ることが重要である。本研究では、既存の **RNAseq** や単一細胞 **RNAseq** 等のオミクス解析、遺伝学的解析を通して、発生や老化などの組織複雑化過程を記述し、その過程に影響する因子を特定していく。特に栄養や腸内細菌操作を通して、発生や老化の速度を変容させることでその因子特定に貢献する。

ラマンイメージングによるタンパク質動態の解析のため、重水素標識したアミノ酸をショウジョウバエに非侵襲的に摂食させる。合成培地を用いて、アミノ酸を標識体に置換し、生体組織のイメージングに資するショウジョウバエ組織を準備する。

#### 4. 研究成果

神谷班が開発した複数の **activatable** ラマンプローブおよびラマンプローブ開発に資する蛍光プローブについて、ショウジョウバエ組織を用いた生体応用を行った(**Kashima et al., Chem Commun, 2021, Fujioka et al., J. Am. Chem. Soc. 2023**)。ショウジョウバエの **wing disc** 及び脂肪組織を材料とし、**lacZ** や **Ggt-1** などの標的酵素を組織の一部に過剰発現させ、複数のプローブの選択的可視化が可能であることを確認する実験を行った。特筆すべき成果として、**9CN-JCR** ベースの凝集性ラマンプローブについて、生体組織において酵素発現領域を特異的に可視化出来るかどうかの検証実験を行い、ショウジョウバエの酵素発現領域のみを可視化することに成功した。本成果については、東京工業大学、東京大学、理化学研究所の共同プレスリリースを行った。また、これらのプローブ以外にも、様々なショウジョウバエ生体飼料を準備し、領域内に開発されたプローブ(未発表のものを含む)の染色可否を検討した。

小関班との共同研究により、メチオニンの取り込みを **SRS** イメージングによって可視化することに成功した(**Spencer et al., J Phys Chem B, 2022, Spencer et al., Front Chem, 2023**)。メチオニンを重水素標識したメチオニンに置換するため、細胞用の培地、及びショウジョウバエ個体用の合成培地を開発し、これを用いて **SRS** イメージングを行った。ショウジョウバエ個体用の合成培地については、幼虫の発生過程に影響が少ないように最適化し、実際にその合成培地を用いて新規アミノ酸応答経路の存在を証明した(**Kosakamoto et al., Nat Metab, 2022**)。発生期の幼虫の脂肪組織においては、非必須アミノ酸チロシンが特に重要な栄養情報として認識されていること、それが転写因子 **ATF4** によるタンパク質合成、摂食量調整に重要であることを明らかにした。

新たに開発した合成培地を用いて、メチオニン制限による寿命延長モデルを確立した(未発表)。メチオニン制限により寿命が延長した個体との比較により、老化した腸において組織が複雑化していく際のマーカーとなる遺伝子を **RNAseq, scRNAseq** により同定した。また同解析から、メチオニン制限によって寿命が延長する際には **Methionine sulfoxide reductase A** が誘導されることが重要であること、成虫早期のメチオニン制限のみで寿命が延長することを発見した。単一アミノ酸制限による寿命延長機構の一端をになう経路の同定と、ライフステージ特異的な栄養応答の変化についての発見であり、論文を投稿中である。

老化による組織複雑化過程に寄与する要因として腸内細菌について解析し、特定の腸内細菌種が自然免疫を介して腸の老化を促進し個体寿命を短縮するメカニズムを発見した(**Yamashita et al., Dis Model Mech, 2021, Onuma et al., PLoS Genet, 2023**)。 **Acetobacter** 属細菌のペプチドグリカンが、腸上皮に発現するペプチドグリカン認識タンパク質 **PGRP-LC** を介して **Imd** 経路を刺激することが老化促進に重要であることを発見した。この経路は幹細胞の老化にともなう過増殖にも寄与していた。また、発生期に **Imd** 経路を活性化すると、生涯にわたって **Gluconobacter** 属細菌が増加し、これが **Imd** 経路を持続的に活性化させることで寿命を短縮することも明らかとなった。本研究結果は、老化に伴って臓器が障害を受ける機構の一端を解明するものである。

老化にともなう **Imd** 経路活性化による寿命短縮機構を解析する目的で、**Imd** 経路活性化個体の臓器傷害に着目した(未発表)。**Imd** 経路を尿細管にて活性化した場合、臓器障害が起こることが明らかとなった。この臓器障害について、神谷班により開発された蛍光プローブを用いて可視化を行ったところ、通常個体に比べて組織の複雑さが増加する様子が観察できた。また、この障害に必須の **Imd** 標的遺伝子をスクリーニングにより同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamashita Kyoko, Oi Ayano, Kosakamoto Hina, Yamauchi Toshitaka, Kadoguchi Hibiki, Kuraishi Takayuki, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of innate immunity during development induces unresolved dysbiotic inflammatory gut and shortens lifespan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm049103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dmm.049103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Spratt Spencer J., Oguchi Kenichi, Miura Keisuke, Asanuma Masato, Kosakamoto Hina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 126
2. 論文標題 Probing Methionine Uptake in Live Cells by Deuterium Labeling and Stimulated Raman Scattering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.1c08343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kashima Hiroki, Kamiya Mako, Obata Fumiaki, Kojima Ryosuke, Nakano Shotaro, Miura Masayuki, Urano Yasuteru	4. 巻 57
2. 論文標題 Photoactivatable fluorophores for durable labelling of individual cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5802 ~ 5805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CC01488A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Akaboshi Hikaru, Kosakamoto Hina, Okada Rina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Imaging the uptake of deuterated methionine in Drosophila with stimulated Raman scattering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 1141920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fchem.2023.1141920	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujioka Hiroyoshi, Kawatani Minoru, Spratt Spencer John, Komazawa Ayumi, Misawa Yoshihiro, Shou Jingwen, Mizuguchi Takaha, Kosakamoto Hina, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako	4. 巻 145
2. 論文標題 Activatable Raman Probes Utilizing Enzyme-Induced Aggregate Formation for Selective <i>in vivo</i> Imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 8871 ~ 8881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c12381	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onuma Taro, Yamauchi Toshitaka, Kosakamoto Hina, Kadoguchi Hibiki, Kuraishi Takayuki, Murakami Takumi, Mori Hiroshi, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 19
2. 論文標題 Recognition of commensal bacterial peptidoglycans defines <i>Drosophila</i> gut homeostasis and lifespan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010709	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosakamoto Hina, Okamoto Naoki, Aikawa Hide, Sugiura Yuki, Suematsu Makoto, Niwa Ryusuke, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to protein restriction in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 944 ~ 959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-022-00608-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小幡史明、三浦正幸
2. 発表標題 腸内細菌によるショウジョウバエ寿命制御基盤
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小幡史明
2. 発表標題 ショウジョウバエ遺伝学で明らかになる栄養応答基盤
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiaki Obata
2. 発表標題 Specific sensing of dietary amino acids in Drosophila ageing and metabolism
3. 学会等名 Symposium for Sensory and Circadian Biology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumiaki Obata
2. 発表標題 The function of Gmmt and dietary methionine in ageing
3. 学会等名 Special Symposium on GNMT and anti-aging（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumiaki Obata, Hina Kosakamoto
2. 発表標題 Specific responses to amino acid restriction in Drosophila
3. 学会等名 19th International Congress of Developmental Biology（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小幡史明
2. 発表標題 アミノ酸が支配する個体栄養応答
3. 学会等名 名古屋市立大学若手イブニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小幡史明
2. 発表標題 ショウジョウバエで解く早期ストレスに対する適用とその長期的影響
3. 学会等名 放射線影響学会第65回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大井綾乃, 三浦正幸, 小幡史明
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた炎症性細胞死メカニズムの探索
3. 学会等名 第30回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayano Oi, Fumiaki Obata
2. 発表標題 Developmental immune activation alters adult fitness and lifespan in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 55th Annual Meeting of the JSDB
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumiaki Obata
2. 発表標題 Early-life experiences impact Drosophila lifespan via gut microbiota
3. 学会等名 New Voices in Infection Biology at Max Planck Institute for Infection Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関