

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05757

研究課題名（和文）光熱変換を利用した細胞操作技術の開発

研究課題名（英文）Development of cell manipulation technology using photothermal conversion

研究代表者

今村 博臣 (Imamura, Hiromi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20422545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 29,300,000 円

研究成果の概要（和文）：色素タンパク質へのレーザー照射によって発生する熱によって温度感受性チャネルの開口を誘導する技術の開発をおこなった。まず、色素タンパク質ShadowRが実際にナノサイズの分子ヒーターとして利用可能なことを、温度感受性の青色蛍光タンパク質Siriusを用いて確認した。温度感受性チャネルTRPV4にShadowRを挿入した融合タンパク質を培養細胞に発現させ、ShadowRが吸収する波長のレーザーを照射したところ、TRPV4チャネルの開口によるカルシウムイオンの流入が観察された。一方で、レーザーの照射を停止させてもカルシウムイオンの流入が止まらないなど、光熱変換による制御には課題が残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、光によって細胞機能を操作する「光遺伝学（オプトジェネティクス）」という手法が盛んに開発され、基礎研究分野で利用されている。従来の光遺伝学では光によって機能が変化するタンパク質を利用する。今回の研究では、色素タンパク質の光熱変換によって光を局所的な熱に変換し、その熱を熱感受性タンパク質に伝えることで細胞機能を制御できることを示した。このような細胞操作技術は従来にないものであり、色素タンパク質と熱感受性タンパク質の組み合わせを変えることで多様な細胞制御が可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：We have developed a technique to induce the opening of temperature-sensitive channels by heat generated by laser irradiation of dye proteins. First, the feasibility of using the dye protein ShadowR as a nano-sized molecular heater was confirmed using Sirius, a temperature-sensitive blue fluorescent protein. Next, ShadowR was inserted into the temperature-sensitive channel TRPV4. When the fusion protein was expressed in cultured cells and irradiated with a laser pulse at a wavelength absorbed by ShadowR, calcium ion influx was observed through the opening of the TRPV4 channel. On the other hand, the influx of calcium ions did not stop even after the laser irradiation was stopped, indicating that the control of calcium ion influx by photothermal conversion remains an issue.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：色素タンパク質 光熱変換 レーザー カルシウム TRPチャネル

1. 研究開始当初の背景

チャネルロドプシンなどの光に応答して機能するタンパク質を発現させた細胞を光で制御する「光遺伝学 optogenetics」の手法は、高い標的特異性と高い時間分解能での細胞制御を可能にし、神経科学分野を中心として生命科学研究に大きなインパクトを与えた。一方、これまで報告されている光遺伝学ツールはほぼ例外なく可視光領域に幅広い吸収スペクトルを有するため、干渉を起こすことなく同時に異なる光遺伝学ツールを用いることは難しい。また、可視光は生体透過性が低く、生体深部の細胞の操作には不向きである。さらに、光遺伝学では一般に非常に強い光が必要なため、光による生体への副次的な影響も懸念される。それに加えて、光遺伝学で用いる光によって広範囲にわたり温度上昇が生じ、その結果内在性イオンチャネルを介した神経の興奮抑制が起こることなども示されている (Owen, *Nat Neurosci* 2019)。光遺伝学のような標的特異性と時間分解能の高さを持ちながら、これらの問題点を克服した新しい細胞操作技術を生み出すことができれば、組織・個体レベルでの生物の理解が格段に進むだけでなく、将来的には医療分野にも大きく貢献できることが期待される。

上記の Owen らの研究結果は、温度によって神経活動を制御できるという非常に興味深い可能性を示唆している。生物は、温度感受性イオンチャネルをはじめ、熱に感受性を持つ様々なタンパク質を有しているが、細胞や組織を熱すると全ての熱感受性タンパク質に作用してしまうため、特定の熱感受性タンパク質の活性のみをコントロールすることはこれまで困難であった。他方、「色」をもつ色素タンパク質は、吸収した光のエネルギーを光熱変換によって熱に変化させる。フォトン吸収した色素タンパクの発色団は、励起状態から基底状態に戻る際に吸収したフォトンのもつエネルギーと同じ量の熱を放出する。例えば、波長 700 nm の光であれば、約 3×10^{-19} J に相当する。熱の拡散を無視すれば、計算上は色素タンパク質がただかた 14 回フォトン吸収し熱を放出するだけで周辺の 10^{-21} リットル (10 ナノメートル立方) の微小環境の温度を 1 °C 上昇させることが可能である。もし光を照射した際に色素タンパク質から生じる熱を近傍の熱感受性タンパク質にのみ伝えることができれば、温度を介した細胞制御が高い特異性で実現できる可能性がある (図 1)。

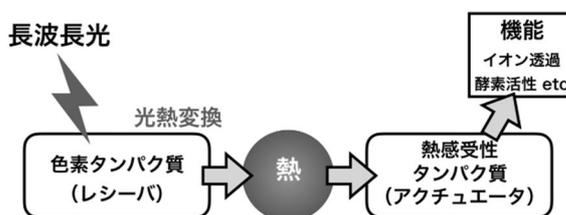


図 1. 光熱変換を利用した細胞操作の概念

2. 研究の目的

本研究では、吸収した長波長光を受け取り、光熱変換によって熱に変化させる色素タンパク質をナノサイズの分子ヒーターと見立て、細胞内の微小環境の温度変調を介することで、生体透過性が高い長波長の弱い光によって細胞を制御する、新しい手法を創出することを目指した。本研究では 3 つの目標を設定した。

- (1) 色素タンパク質が実際にナノサイズのヒーターとして機能することを示す。
- (2) 指向性進化によって高性能タンパク質ヒーターを創出する。
- (3) 光熱変換を利用した新しい細胞操作ツールを開発する。

3. 研究の方法

(1) 色素タンパク質の指向性進化

色素タンパク質 ShadowR (Murakoshi, *Sci Rep* 2019) の遺伝子を pRSET_B ベクターの XhoI-HindIII サイトにサブクローニングし、pRSET_B-ShadowR を得た。pRSET_B-ShadowR をテンプレートとし、ShadowR 遺伝子を挟むようなプライマーを用い、GeneMorphII キットでランダム変異導入 PCR をおこなった。増幅された DNA 断片を pRSET_B ベクターの XhoI-HindIII サイトにライゲーション後、大腸菌 JM109 (DE3) 株を形質転換し、アンピシリンを含む LB プレートに播種した。翌日、色が濃いコロニーを選抜して培養し、プラスミドを調製した。このサイクルを繰り返すことで、ShadowR の指向性進化を進めた。

(2) 色素タンパク質の大量発現と精製

色素タンパク質遺伝子を載せた pRSET_B ベクターで JM109 (DE3) 株を形質転換し、形成されたコロニーを 50 mL 2xYT 培地に植菌したのち、24 °C で二日間浸透培養をおこなった。培養液を遠心して集めた菌体をバッファで懸濁後、超音波破碎と遠心によって、細胞抽出液を得た。TALON セファロースカラムを用いて細胞抽出液から His タグが付いた色素タンパク質をアフィニティ精製した。続いてゲルろ過カラムを通すことで、色素タンパク質を高純度に精製した。

(3) 細胞培養と遺伝子導入

哺乳類細胞株は 10%ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用い、37 °Cにおいて5%二酸化炭素雰囲気下で培養した。遺伝子導入はPEI-Max を用いておこなった。

(4) 光刺激と蛍光イメージング

遺伝子導入 2 日後に細胞をトリプシン EDTA 処理して 35 mm ガラスボトムディッシュに播種し、その翌日に蛍光フィルターターレットを二段重ねにした蛍光倒立顕微鏡を用いて光刺激とイメージングをおこなった。刺激用の 594 nm レーザーは下段のターレットに入れたダイクロイックミラーを通して、蛍光イメージングのための励起光は上段のターレットに入れたダイクロイックミラーを通して、それぞれ対物レンズに導入した。蛍光画像は sCMOS カメラを用いて撮影した。

(5) 光刺激とパッチクランプ

遺伝子導入 2 日後に細胞をトリプシン EDTA 処理して 35 mm ガラスボトムディッシュに播種し、その翌日に蛍光正立顕微鏡を用いて光刺激とパッチクランプをおこなった。パッチクランプは、whole-cell 法を用いた。刺激には 575 nm の高出力 LED を用いた。

4. 研究成果

(1) タンパク質ヒーターの性能の検証

色素タンパク質が実際にナノサイズの分子ヒーターとして利用可能かどうかを検証するため、色素タンパク質を青色蛍光タンパク質 Sirius と融合させたコンストラクトを作製した。Sirius は温度が上昇すると量子収率が大きく低下することが知られており (Nakano, *PLoS ONE* 2017)、色素タンパク質から発せられた局所的な熱が Sirius に伝わった場合、Sirius の蛍光強度が低下すると期待される。この計測をおこなうため、Sirius の蛍光をイメージングしながら色素タンパク質が吸収する波長のレーザーを局所的に照射するための顕微鏡システムを構築した。Sirius と赤色蛍光タンパク質由来の色素タンパク質である ShadowR (Murakoshi, *Sci Rep* 2019) の融合タンパク質を精製してポリアクリルアミドゲルに包埋し、上記の顕微鏡システムを用いて ShadowR の吸収ピーク近傍の 594 nm のレーザーを照射したところ、明らかな Sirius の蛍光強度の減少が観察された。次に、Sirius と色素タンパク質の融合タンパク質を哺乳類細胞に発現させ、同様の実験をおこなった。色素タンパク質としては、GFP ファミリータンパク質である ShadowR に加え、バクテリアのフィトクロムから開発された miRFP720 (Shcherbakova, *Nat Chem Biol* 2018) を用いた。精製タンパク質を用いた実験と同様に、Sirius と ShadowR の融合タンパク質を発現させた場合は、594 nm レーザーの照射によって明瞭な Sirius 蛍光の低下が見られた (図 2)。これらの結果は、Sirius に光を照射した際の光熱変換によって生じる熱によって、融合された Sirius の温度を上昇させたことを示している。一方、色素タンパク質として miRFP720 を用いた場合、685 nm レーザーを照射しても Sirius 蛍光シグナルの減少は見られなかった。他の観察からこの原因のひとつは miRFP720 が極めて速やかに光褪色するためだと考えられた。これらの結果をふまえ、以後の実験では、色素タンパク質として主に ShadowR を用いることとした。

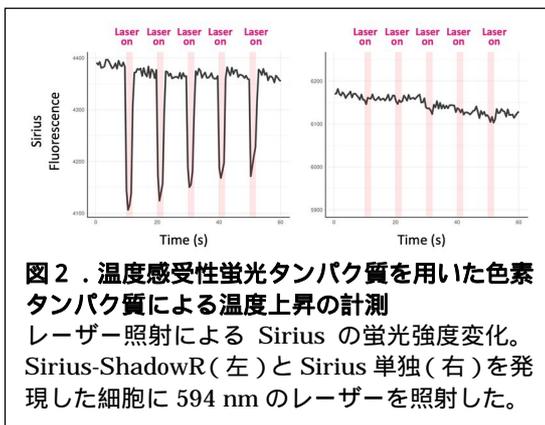


図 2 . 温度感受性蛍光タンパク質を用いた色素タンパク質による温度上昇の計測
レーザー照射による Sirius の蛍光強度変化。Sirius-ShadowR (左) と Sirius 単独 (右) を発現した細胞に 594 nm のレーザーを照射した。

(2) 指向性進化による新規高性能タンパク質ヒーターの開発

ShadowR は成熟に極めて時間がかかるタンパク質であり、発現・精製後も数日にわたり吸収スペクトルが変化する (図 3)。より早く成熟し、より強く光を吸収する色素タンパク質を作り出すために、ShadowR の試験管内指向性進化をおこなった。ランダム変異導入 PCR をおこなうことで変異が入った ShadowR 遺伝子のライブラリを作ったのち、形質転換をおこない大腸菌のコロニーの色をプレート上で評価した。色の濃いコロニーから得られたクローンをテンプレートとして、上記のプロセスを繰り返した。指向性進化で得られた最終的な変異体は 4 つのアミノ酸置換を生じており、精製直後から大きな吸収をもち、精製後もほとんど吸収スペクトルの変化は見られなかった。このことは、得られた変異体が ShadowR と比較して、成熟にかかる時間が大きく改善していることを示してい

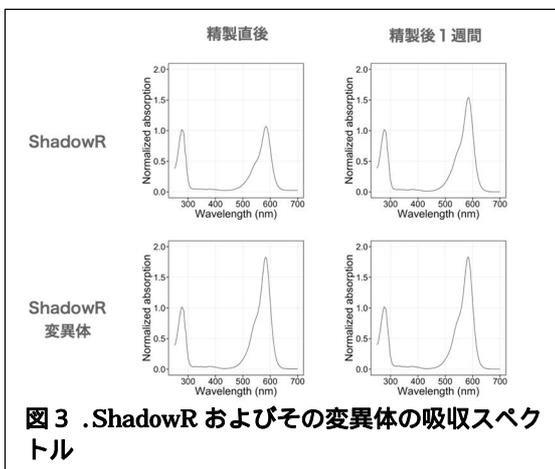


図 3 . ShadowR およびその変異体の吸収スペクトル

得られた変異体が ShadowR と比較して、成熟にかかる時間が大きく改善していることを示してい

る。

(3) 光熱変換を利用した新しい細胞操作ツールの開発

色素タンパク質の光熱変換によって生じた熱を熱感受性タンパク質に伝えて細胞機能进行操作する系の開発に取り組んだ。まず、ラット由来 TRPV4 チャンネル(rTRPV4)のN末端にシアン色蛍光タンパク質である mTurquoise2 を融合させた。次に、天然変性領域である rTRPV4 のC末端領域を欠失させた変異体を作成した。これらを哺乳類細胞株に発現させたところ、全長の rTRPV4 は細胞膜に局在したものの、C末端領域を欠失させた変異体は細胞膜へは移行できなかった。次に、全長 rTRPV4 のループ部分に ShadowR を融合したコンストラクトを多数作製した。この融合タンパク質の哺乳類細胞での局在を調べたところ、細胞膜への局在が確認できたのは rTRPV1 のC末端の disorder された部分へ ShadowR を挿入したコンストラクトのみであった。このコンストラクトとカルシウムバイオセンサーである GCaMP6s を発現する細胞へ ShadowR が吸収する 594 nm

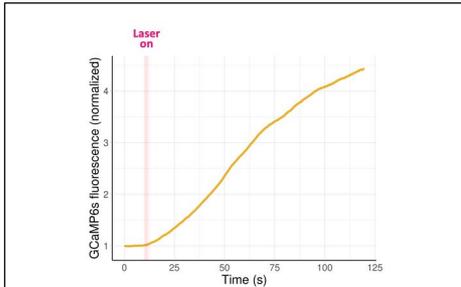


図4 .rTRPV4-ShadowR 融合タンパク質を発現する細胞へのレーザー照射によるカルシウム上昇

のレーザーを照射したところ、rTRPV4 チャンネルの開口によるとみられるカルシウムイオンの流入が観察された。また、ShadowR と rTRPV4 を別々に発現した場合においても、レーザー照射によるカルシウムイオンの流入が観察された。その一方で、レーザーの照射を停止させてもカルシウムイオンの流入が止まらず、光熱変換によるイオンの制御には課題が残された。

次に、パッチクランプを用いて膜を介したイオンの流れを調べたが、光照射に伴うイオンの流れを検出することはできなかった。ただし、セットアップの関係上カルシウムイメージングの場合と比べて弱い光で照射したことによって rTRPV4 チャンネルが開口しなかった可能性もあり、今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Choi Jungmi, Matoba Naoki, Setoyama Daiki, Watanabe Daiki, Ohnishi Yuichiro, Yasui Ryuto, Kitai Yuichirou, Oomachi Aki, Kotobuki Yutaro, Nishiya Yoichi, Pieper Michael Paul, Imamura Hiromi, Yanagita Motoko, Yamamoto Masamichi | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves cardiac energy status via mitochondrial ATP production in diabetic mice | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 278 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04663-y | 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 Takaine Masak, Imamura Hiromi, Yoshida Satoshi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 High and stable ATP levels prevent aberrant intracellular protein aggregation in yeast | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e67659 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.67659 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Karagiannis Anastassios, Gallopin Thierry, Lacroix Alexandre, Plaisier Fabrice, Piquet Juliette, Geoffroy Helene, Hepp Regine, Naude Jeremie, Le Gac Benjamin, Egger Richard, Lambolez Bertrand, Li Dongdong, Rossier Jean, Staiger Jochen F, Imamura Hiromi, Seino Susumu, Roeper Jochen, Cauli Bruno | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Lactate is an energy substrate for rodent cortical neurons and enhances their firing activity | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e71424 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.71424 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Kimiko, Nogimori Yoshitsugu, Imamura Hiromi, Ando Joji | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Shear stress activates mitochondrial oxidative phosphorylation by reducing plasma membrane cholesterol in vascular endothelial cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 33660 ~ 33667 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2014029117 | 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 Imamura Hiromi, Sakamoto Shuichiro, Yoshida Tomoki, Matsui Yusuke, Penuela Silvia, Laird Dale W, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya, Kakizuka Akira | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e61960 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61960 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Shinya, Yamamoto Masamichi, Nakamura Jin, Mii Akiko, Yamamoto Shigenori, Takahashi Masahiro, Kaneko Keiichi, Uchino Eiichiro, Sato Yuki, Fukuma Shingo, Imamura Hiromi, Matsuda Michiyuki, Yanagita Motoko | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Spatiotemporal ATP Dynamics during AKI Predict Renal Prognosis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology | 6. 最初と最後の頁 2855 ~ 2869 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2020050580 | 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 - |

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 今村博臣 |
| 2. 発表標題 光熱変換を利用した細胞操作に向けた試み |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大坪史歩、今村博臣、竹川宣宏、今田勝巳 |
| 2. 発表標題 赤色蛍光タンパク質の単一復帰変異による赤色蛍光消失の構造基盤 |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、竹川宣宏、今田勝巳 |
| 2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質由来赤色蛍光タンパク質の創出 |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大坪史歩、竹川宣宏、今村博臣、今田勝巳 |
| 2. 発表標題 緑色蛍光蛋白質AzamiGreen変異体における赤色蛍光発生の構造基盤 |
| 3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今村博臣 |
| 2. 発表標題 単一細胞ATP濃度イメージングによって明らかとなったアポトーシス細胞内ATP濃度のダイナミクスとその制御 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大坪史歩、今村博臣、竹川宣宏、今田勝巳 |
| 2. 発表標題 緑色蛍光蛋白質AzamiGreen由来赤色蛍光蛋白質の結晶構造解析に基づく赤色蛍光団形成の構造基盤 |
| 3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、西田水穂、竹川宣宏、今田勝巳 |
| 2. 発表標題 緑色蛍光蛋白質由来赤色蛍光蛋白質の開発 |
| 3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 今村博臣 |
| 2. 発表標題 Imaging of ATP dynamics inside living and dying cells |
| 3. 学会等名 第5回日本循環器学会基礎研究フォーラム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、西田水穂、竹川宣宏、今田勝巳 |
| 2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質から赤色蛍光タンパク質を創り出す |
| 3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第47回討論会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 今村博臣 |
| 2. 発表標題 アポトーシスにおいてパネキシン 1 によって駆動されるプログラムされたATP減少の単一細胞イメージング |
| 3. 学会等名 光塾2020 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今村博臣、坂本修一朗、垣塚彰 |
| 2. 発表標題 単一細胞ATP濃度イメージングによって明らかにされたアポトーシスの細胞内ATP減少におけるパネキシン1の役割 |
| 3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第46回討論会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
| | |