

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19044

研究課題名（和文）色素の無輻射失活を駆動力とする万能型分子濃度制御システム

研究課題名（英文）A universal platform to control the spatiotemporal concentration of biomolecules using non-fluorescent dyes

研究代表者

新井 敏 (Arai, Satoshi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授

研究者番号：70454056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ある閾値温度で相転移を起こす温度感受性の脂質膜に着目し、光を熱に変換できる光熱変換色素を膜に埋め込んだ脂質ナノ粒子を設計した。光照射で生じる局所熱を直接、脂質二分子膜に作用させ相転移を起こすことで膜を緩ませ、リポソームに内包した化合物を徐放する仕組みである。本課題では、様々な顕微鏡技術を用いて、そのメカニズム解明に注力し、結果、この膜が緩んで内包物を徐放する際、局所熱が効率よく相転移に消費されるため、周囲の温度変化を引き起こさないこと、また、比較的大きい分子の徐放が可能であることが明らかになった。仮説通り作動するこの粒子は、生体分子濃度の時空間動態を光制御できるツールとしての応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内外の生体分子の局所濃度を自在に操作できる技術は、ダイナミックな細胞機能を理解するための基礎生物学分野での研究ツールとして活用が期待できる。また、生体組織に親和性の高い近赤外レーザーを用いることから、薬剤を封入した粒子を調製し、光刺激を用いる新規なドラッグデリバリーシステムへも展開可能である。特に、従来の類似技術である光ケージド化合物を用いた方法と比べて、適用できる化合物の多様性（多くの水溶性の化合物を内包できる）、時空間分解能などの点で優位であるのも特徴である。

研究成果の概要（英文）：In this grant proposal, we focused on the temperature-sensitive lipid membranes that undergo a phase transition at a certain threshold temperature, and designed lipid nanoparticles where a photothermal dye was embedded in the membrane. We expected that very local heat generated by light irradiation directly affects the lipid bilayer membrane efficiently, causing a phase transition and releasing a biomolecule encapsulated in the liposomes. As expected, the encapsulated biomolecules could be released upon the light illumination. Furthermore, we found that the temperature increment nearby the liposomal membrane was scarce because the local heat was efficiently consumed in the phase transition. It should also be noted that relatively large molecules could be encapsulated and released by the light illumination. Our proposed system is assumed to be applied as a new tool for optical control of the spatiotemporal dynamics of concentrations of various biomolecules.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：蛍光温度センサー リポソーム 無輻射失活 光ケージド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞システムは、シグナル経路や代謝を巧みに制御するために、生体分子の濃度を時々刻々と変化させている。そして、このことが、細胞が特定のタイミングで機能を発揮する仕組みと深く関係している。従って、細胞を顕微観察中に、好きなタイミングと場所で、細胞機能に関わる生体分子(主に小分子)の局所濃度を自在に変化させる技術があれば、直接的にその生体分子が細胞機能に与える役割を解明する一助となる。現在、光ケージド化合物がこれを達成するための有力な方法の1つである。標的の分子を、光感受性の分子でマスクして生理活性を不活化(ケージング)、必要なときに光照射して光感受性分子を除去、元の活性をオンにする手法である。これまでに、神経伝達物質や ATP を始め、幅広く報告されてきたが、この手法には根本的な問題点がある。例えば、標的とする分子のケージド化の設計・合成の煩わしさがあり、未だに使用できる化合物の種類は制限されている。実際、最初に見つかった神経伝達物質のアセチルコリンですら、申請者らの研究によって、2023 年ようやく達成したばかりである(図 1: 京都大の大宮研究室との共同研究。 *J. Am. Chem. Soc.*, 145 (19), 10651–10658 (2023))。また、2 光子レーザーの使用で回避できることもあるが、低波長の光照射に伴う光毒性も、懸念材料である。

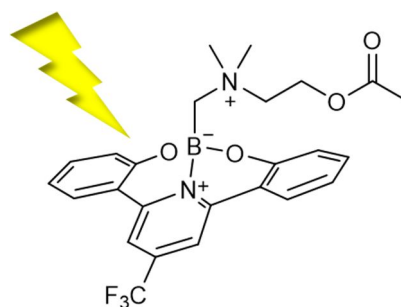


図 1 光ケージド化アセチルコリン

2. 研究の目的

本研究課題では、これらの欠点を抜本的に解決するための万能型の生体分子の濃度制御システムを提案する。特に、その作動原理を様々な顕微技術で明らかにしながら、一部、その応用にも取り組む。具体的には、ある閾値温度で相転移を起こす温度感受性の脂質膜に注目し、光を熱に変換できる光熱変換色素を膜に埋め込んだリポソームを設計する。光照射(特に、今回は近赤外線レーザー)で生じる局所熱を直接、脂質二分子膜に作用させ相転移を起こすことで膜を緩ませ、リポソーム内の内包した物質を徐放する仕組みを提案する。本技術の最大の特徴は、光熱変換色素から取り出される熱のほとんどが、脂質膜の相転移に直接消費されるため、周囲の温度上昇自体がほとんど起きないという仮説にある(図 2)。従って、バルクの温度がある閾値に達して徐放が可能になる従来の「温度感受性リポソーム」と似て非なるものである。

別プロジェクトにて、開始時には既に予備データが得られており、この設計に従って水溶性の色素を内包しておく、近赤外線レーザー照射によって内放物が漏れ出す現象は確認していた。従って、本萌芽課題では、この提案するシステムの二分子膜近傍の温度勾配をナノレベルで解明し、細胞への熱的ダメージが無視できるか詳細に調べる。また、内包物として、水溶性の低分子は無論、その他の比較的大きい分子が可能かどうか、その方法

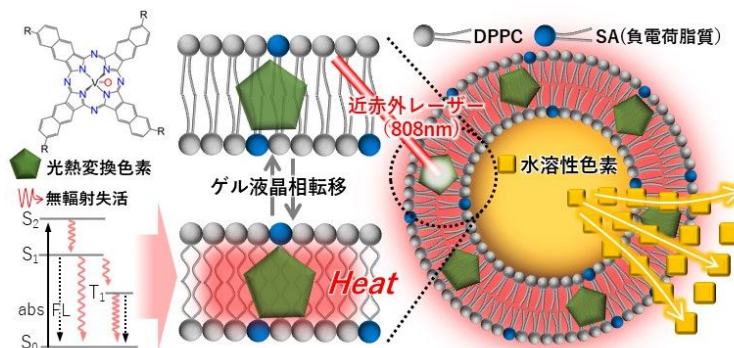


図 2 色素の無輻射失活を利用した光応答リポソーム

論も開拓する。更に、応用先として一部、神経伝達物質や ATP などを用いて、その適用可能性を検証する。

本申請は、無輻射失活エネルギーで生体分子集合の構造変化を惹起できるか、という普遍的な原理の提案の側面を持つ、幅広い将来展開を見据えた萌芽的課題である。

3. 研究の方法

3-1) リポソーム表面の分子レベルでの温度測定

明確な相転移温度を持つ温度感受性の脂質 DPPC (41)を主成分として、安定分散するために若干の負電荷脂質を加えたリポソームを調製した。なお、クライオ電顕で、一枚膜であることを確認した(図3)。脂質二分子膜に埋め込む光熱変換色素は、今までに申請者の研究で構築した色素ライブラリーから採用した(808nm に極大吸収を持つ近赤外吸収の有機色素)。ある色素を膜に埋め込み、更に、内放物として水溶性の色素を高濃度で封入したリポソームを調製した(過去の別の研究課題で確立

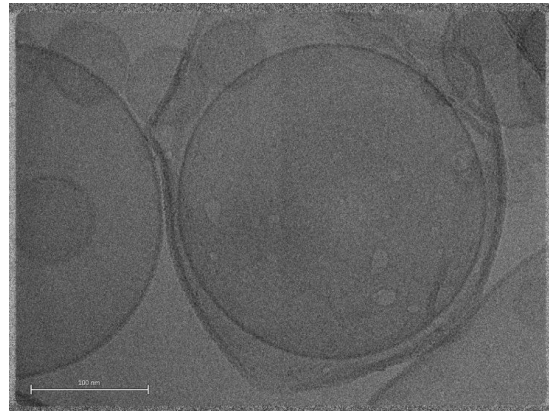


図3 リポソームの電顕画像

済の手法)。このリポソームをガラス基板上に吸着させて、リアルタイムの顕微鏡観察下で、近赤外レーザー照射したところ、内包された水溶性の色素の漏れ出しを確認した。

続いて、膜近傍での温度を計測するため、ポリエチレングリコール(PEG)の末端に、温度変化を蛍光寿命の変化として検出できる蛍光温度センサーを結合させた PEG 脂質を、脂質膜上に埋め込んだ。蛍光温度センサーと脂質膜の距離を 10 ナノ以下で制御し、精密な温度勾配を測定したところ、温度上昇値にバラつきはあるものの、概ね、0.5 (検出限界以下)~1.5 程度の温度上昇であることが分かった。実験系は、全て室温付近(25)で行っていることから、膜近傍は相転移温度の 41 からは大きく離れており、非常に急峻な温度勾配が出来ていることが示唆された。また、今までに開発してきた細胞膜蛍光温度センサーを活用して、このリポソームを細胞表面に接着させ、細胞膜側の感じている温度変化を計測したところ、更に小さい温度変化であることがわかった。蛍光温度センサーによる温度計測の精度には、若干の問題はあるが、少なくとも、光熱変換された熱エネルギーは効率よく相転移に消費されていることを示すことが出来たと考えられる。

3-2) 内包物の透過メカニズムの解明と制御

光熱変換色素から取り出される無輻射失活エネルギーを膜に直接注入した際、膜に生じる物理的な攪乱について、その詳細を以下検証した。具体的には、相転移が起きる際、脂質の分子レベルでの位置は大きくは変わらず、揺らぎだけが起きる場合と、比較的サイズの大きな小孔が生じる場合と 2 つのケースが想定される。これを検証するために、分子量の異なる蛍光標識したデキストランをリポソーム内部に包埋して、その漏れ出しの分子量依存性を評価した。結果、比較的分子量の大きい 40K のデキストランまで漏れ出すことが分かった(図4)。このことから、相転移に伴いクラッキングも起きていることが考察できる。これを更に詳細に解析するために、

近赤外レーザーを搭載した高速AFMを研究分担者のClemens准教授がセットアップした。このリポソームの挙動を高速AFMで観察しながら、観察途中にレーザー刺激を行い、膜動態の変化を評価した。当初、近赤外レーザー照射がカンチレバーと干渉する問題があったが、研究後半でこれを解決し、観察できるようになってきた。研究期間内では、明確な差は確認できてないが、今後も、分子レベルでの解明に注力していく。

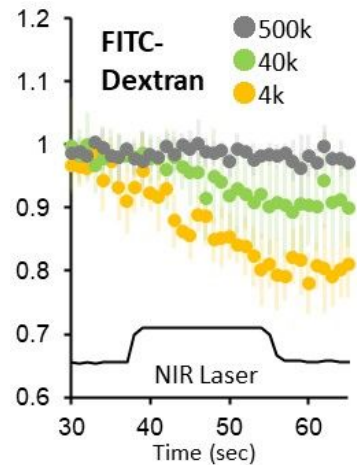


図 4 分子量の違うデキストランの徐放

3.3) 生体分子濃度制御システムの応用

様々な水溶性の小分子の内包が可能であり、期間内にアセチルコリン、ATP、cAMPなどの内包を試みた。様々な可視化技術と組み合わせて、これらの分子がリポソームから漏れ出すことを予備実験レベルではあるが確認できた。特に、分担者らの研究対象である天井の無い De-roofed 細胞を用いて、ATP を内包したリポソームから、光刺激でこれを徐放し、アクチンの構造が変化することを顕微鏡観察下でイメージング解析できた。

4 . 研究成果

上記の結果を踏まえて、従来の光ケージド化合物との比較を右表に示した。検討した化合物の種類は、まだ少ないが、水溶性の分子を内包できるため、光ケージド以上の多様な応用可能性を示すことが出来た。また、空間分解能も粒子径で制御できることも1つの利点である。更に、光ケージド化合物の場合、アンケーシングに時間

		光ケージド	本萌芽研究
化合物多様性	低分子	神経伝達物質などに限定	水溶性分子は網羅
	高分子	難	40K程度まで
空間制御		レーザー径に依存	粒子径に依存(ナノサイズ)
時間分解能		化合物依存	50ミリ秒
細胞ダメージ		低波長の光毒性(2光子で対応)	熱的影響はほとんどない

がかかることあるが、本システムでは、ミリ秒オーダーの時間分解能を実証できており、この点でも優位である。唯一の懸念点であった、光の毒性、このシステムの場合は熱によるダメージになるが、これも極めて小さいことが、本萌芽研究を通じて明らかになった。以上、未だ、光照射時の膜動態に未解明の部分あるものの、当初目標としていた、新しい万能型生体分子濃度システムの作動原理のメカニズム解明と、その応用可能性は示せたものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 新井 敏, 山崎 健, サルケア サティア
2. 発表標題 機能性色素を用いた脂質膜の局所温度計測と熱的制御
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Arai
2. 発表標題 Thermodynamic Cell Engineering
3. 学会等名 International Chemical Biology & Molecular Imaging Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Arai, Satya R. Sarker
2. 発表標題 NIR-triggered nanovesicle enabling local release of signalling molecules toward single-cell functional analysis
3. 学会等名 Pacifichem 2021 International Chemical Congress（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 敏
2. 発表標題 生体分子濃度の時空間動態を定量可視化・自在制御するケミカルバイオロジー
3. 学会等名 第6回ソフトマター工学分科会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新井 敏, Sarker Satya
2. 発表標題 生体分子濃度の時空間動態制御を可能にする光駆動型ナノベシクルの創出
3. 学会等名 第70回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 新井敏（監修：永島 計）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 384
3. 書名 温度ストレスによる生体応答ダイナミクス	

〔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
研究 分担 者	C L E M E N S ・ M A R T I N F R A N Z (Franz Clemens) (50837664)	金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授 (13301)	

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
---------	---------