

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19209

研究課題名（和文）光トランスフェクション法の開発

研究課題名（英文）Development of optical transfection methods

研究代表者

村岡 貴博（Muraoka, Takahiro）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：70509132

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）：本研究では、可視光にตอบสนองして脂質二分子膜を変形する分子機械を基盤とする、遺伝子光導入法の開発を行った。人工的に構築した光応答性リポソームと細胞を用いた物質導入実験を行った。可視光にตอบสนองして内側への膜陥入を誘導する、ジアゾシン骨格からなる光駆動分子機械を基盤に、生細胞に対するリポソームとの膜融合による核酸輸送を試みた。細胞種に依る差異はあるものの、総じて、細胞への核酸輸送が可能であり、細胞内での導入した核酸に由来するタンパク質の発現が確認された。従来のエレクトロポレーションなどの手法とは異なる光駆動物質導入技術の基盤を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子導入は細胞を操作するうえで基盤となる技術である。従来、エレクトロポレーションやポリアミンを用いる遺伝子導入法が確立されてきた。光による遺伝子導入は、時空間制御や細胞への影響を小さく抑えられる可能性があるため、有用性が高いと期待される。難病に対する次世代治療技術として、細胞治療が期待されるなど、細胞操作の重要性は高まっている。その基盤技術を構築する基礎研究として、本研究の社会的意義は大きい。新たな細胞導入法を提供する点で、化学および生物学における学術的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method of gene light transfection based on a molecular machine that transforms lipid bilayers in response to visible light. Material transfer experiments were performed using artificially constructed light-responsive liposomes and cells. Based on a light-driven molecular machine composed of a diazocine core skeleton that responds to visible light and induces inward membrane penetration, nucleic acid transport by membrane fusion with liposomes to living cells was attempted. Although there were some differences depending on the cell type, in general, nucleic acid transport into cells was possible, and expression of proteins derived from the introduced nucleic acids was confirmed in the cells. We were able to establish the basis for a light-driven substance delivery technology that is different from conventional methods such as electroporation.

研究分野：生体関連化学

キーワード：遺伝子導入

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内への遺伝子導入は、改変型タンパク質の合成や、RNAサイレンシングなどを行うための基盤技術であり、さらに細胞内へのゲノムスケールDNA導入は、細胞機能制御やゲノムが持つ機能の理解につながる。従って細胞内遺伝子導入は、基礎から応用に至る広い生物学研究に貢献する技術である。これまでに様々な手法が開発され、利用されている。代表的なものに、高電圧パルスを利用するエレクトロポレーション(物理的手法)、ウイルスを利用する生物学的手法、カチオン性高分子ポリマーを用いる化学的手法がある。いずれも様々な利点を有するが、細胞へのダメージ、安全性、細胞種に応じた条件最適化の必要性など課題も多い。最近では、パーティクルガン法などの工学的方法による、これらの欠点を克服する新たな導入技術の開発も行われている。幅広い細胞種への高効率導入が期待される反面、専用の装置と技術が必要とされるなど、核酸や細胞を扱う生物学研究者が利用する上での技術面や、専用装置の導入に関連して、困難が伴い得る。

2. 研究の目的

こうした背景のもと、簡便な光照射で核酸の細胞内導入を可能にする「光遺伝子導入法」を開発する本研究を着想した。蛍光顕微鏡を操作する技術のみで行うことができる簡便さを目指し、従来の遺伝子導入法には無い操作性を提供することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

応募者は、独自にデザインした光応答性の人工脂質分子オプトキャリアが、緑色光照射によって細胞サイズリボソームを膜陥入させ、エンドサイトーシスを起こすことを見出した。さらにこの光エンドサイトーシスを用いて、オプトキャリアと相互作用するアニオン性ポリスチレンビーズをベシクル内部へ輸送することにも成功した。エンドサイトーシスを光で起こす新技術であり、核酸などのアニオン性高分子の細胞内光導入を可能にする発展性を持つ。「混ぜて光を当てる」という操作性の良さと、非接触性、低光毒性が最大の利点であり、ここに他には無い独自性と進歩性がある。オプトキャリアの中心骨格である架橋型アゾベンゼンは、可視光に反応して*cis-trans*光異性化し、分子形状を変える。この運動による分子面積拡張によって、膜変形が誘起されていると考えられている。本研究においてOC1を構造修飾することにより、核酸と静電的に相互作用するシステムの構築を目指すこととした。

4. 研究成果

本研究では、可視光に反応して脂質二分子膜を変形する分子機械オプトキャリアを基盤とする、遺伝子光導入法の開発を行った。人工的に構築した光応答性リボソームと、細胞を用いた物質導入実験を行った。可視光に反応して内側への膜陥入を誘導する、ジアゾシンコア骨格からなる光駆動分子機械オプトキャリアを基盤に、生細胞に対するリボソームとの膜融合による核酸輸送を試みた。細胞種に依る差異はあるものの、総じて、細胞への核酸輸送が可能であり、細胞内での導入した核酸に由来するタンパク質の発現が確認された。膜表面の静電的な性質を制御することで分子機械と膜表面の接着を制御することができた。静電効果を利用して、膜接着状態で光照射を行うことによって、膜面積の変化で誘起される膜融合を効率的に起こすことができた。

図1に示すコア部分を示すオプトキャリアを開発した。オプトキャリアは、可視光応答性の架橋型アゾベンゼンをコアとする両親媒性化合物である。その八員環構造から、シス型コンフォメーションが安定であり、光刺激によってアゾ結合がトランス体へ異性化することが知られる。架橋部位に、アンチ型にアルキル鎖を結合することで、シス体からトランス体への異性化に反応して、アルキル鎖間の距離が角度が70度小さくなることが、単結晶X線構造解析、およびDFT計算による分子モデルから予測された(図1)。吸収スペクトル測定において、*cis*体のオプトキャリアに対して400nmの光を照射すると、照射時間に応じて400nmの吸収強度が減少し、470nmの吸収強度が増加した。このスペクトル変化は、オプトキャリアが*cis*体から*trans*体へ異性化したことを示す。¹H NMRスペクトル測定からも光異性化反応が示され、芳香族性プロトンに由来するシグナルの面積比による解析から、400nmの光照射によって、60%が*cis*体から*trans*体へ異性化することが示された。

細胞膜モデルとして、不飽和リン脂質であり、細胞膜を構成する脂質でもある1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DOPC)を用いて作成した細胞サイズベシクルを用いて、膜融合機能を評価した。DOPCに対して、オプトキャリアを10mol%混合し、静置水和方法によりベシクルを作成したところ、位相差顕微鏡観察から直径20~50 μ mのベシクルが得られたことが示された(図2)。複数個のベシクル同士が接触した部分に、オプトキャリアが*trans*体へ異性化する400nmの光を照射したところ、照射時間が300秒を過ぎたところで膜融合が進行し、3つのベシクルが1つに融合する変形が見られた。溶液中での光照射の場合でも、オプトキャリアが光定常状

態に達するまでにおよそ 300 秒要したことから、この顕微鏡観察によって示された膜融合現象は、脂質二分子膜中に挿入されたオプトキャリアの膜収縮運動によって促進されたことが示唆される。

細胞膜モデルでの光駆動膜融合が示されたことから、生細胞に対する膜融合と遺伝子導入を試みた。細胞を含む培地に対して、オプトキャリアを含むリン脂質ベシクルを加えた。リン脂質ベシクル中には、緑色蛍光を発するタンパク質 GFP の mRNA を内包した。細胞膜とリン脂質ベシクルが膜融合することで、ベシクル内に含まれる mRNA が細胞内へ導入され、GFP へ翻訳されることを期待した。従って、mRNA の細胞内導入を、緑色蛍光の発色で評価することができる。細胞を含む培地に対し、オプトキャリアを含むリン脂質ベシクルを加えた後、光照射するまでは、緑色蛍光を発する細胞はほとんど見られなかった。その後、光照射することで、強い緑色蛍光を発する細胞が複数個見られた。以上より、光照射が引き金となり、リン脂質ベシクルの膜収縮に伴う細胞膜との融合が促され、その結果、mRNA が細胞内へ輸送されたことが示唆された。細胞種に依る差異はあるものの、総じて、細胞への核酸輸送が可能であり、細胞内へ導入した核酸に由来するタンパク質の発現が確認された。従来の電圧ポレーションなどの手法とは異なる光駆動物質導入技術の基盤を構築することができた。

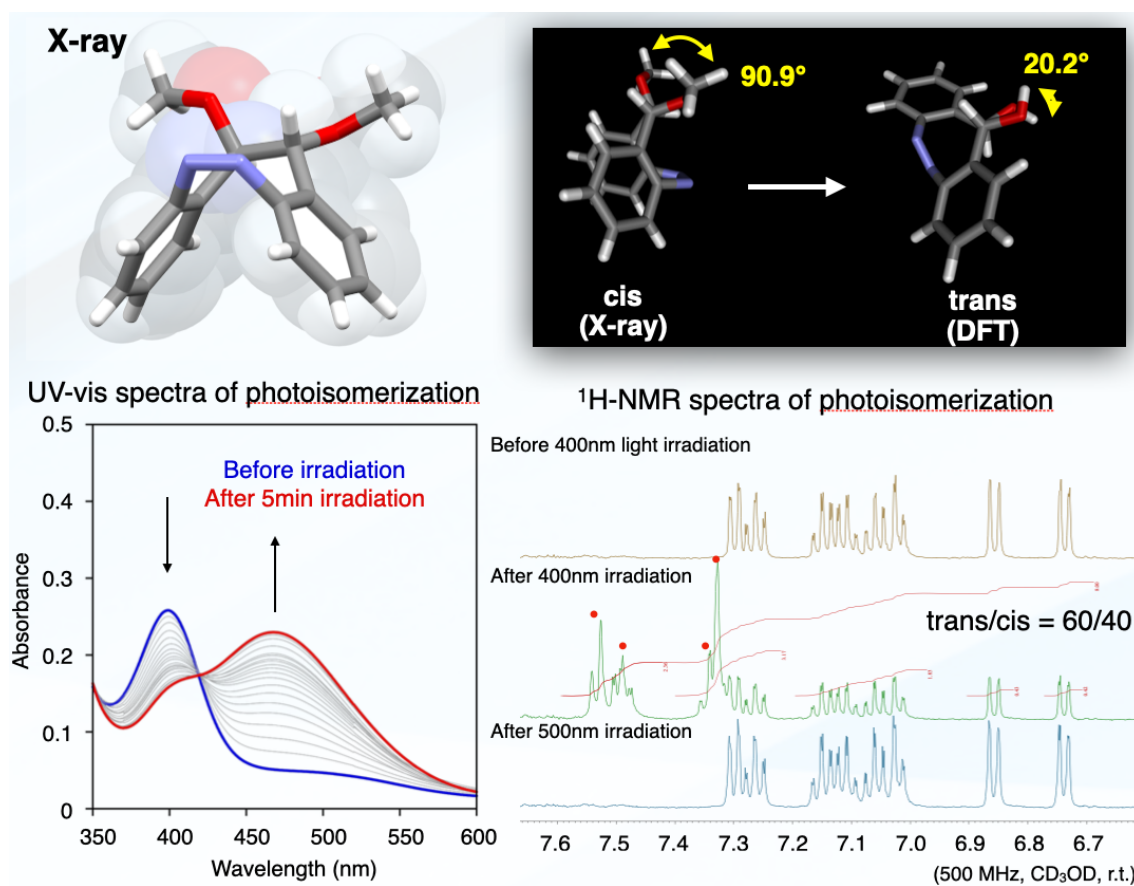


図1 オプトキャリアコア部分 cis 体の単結晶構造解析、cis 体の結晶構造と trans 体の DFT 計算から導出された構造の比較とねじれ角運動、メタノール溶液中で測定されたオプトキャリアの光照射による UV 吸収スペクトル変化・オプトキャリアの重メタノール溶液 ¹H NMR スペクトルの光照射による変化とシグナルの面積比の比較。

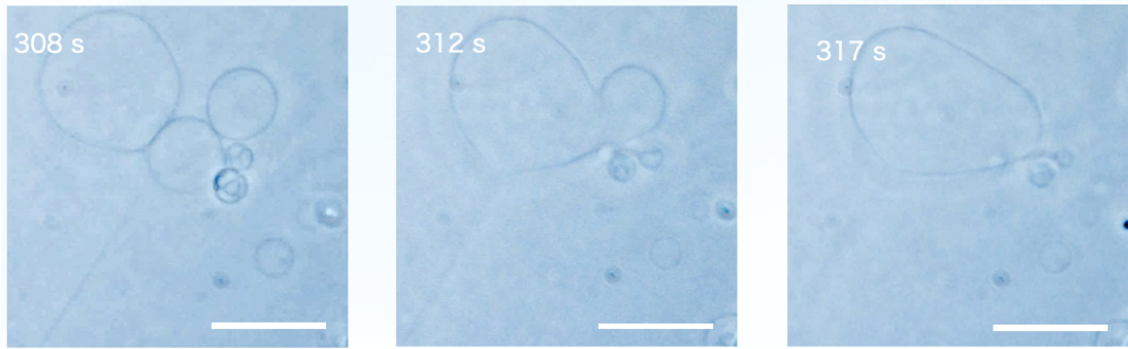


図2 DOPC とオプトキャリアから作られたベシクルが 400 nm の光照射に应答して膜融合する様子を示す位相差顕微鏡画像、照射光：400–440 nm、[DOPC]/[オプトキャリア] = 90/10。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagi Yuichiro, Uchida Noriyuki, Anraku Yasutaka, Muraoka Takahiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Stabilization of bicelles using metal-binding peptide for extended blood circulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5164 ~ 5167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CC01058E	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 Nishino Hayato, Kitamura Mai, Okada Shunsuke, Miyake Ryosuke, Okumura Masaki, Muraoka Takahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Cysteine-based protein folding modulators for trapping intermediates and misfolded forms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 26658 ~ 26664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2RA04044A	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 Okada Shunsuke, Matsumoto Yosuke, Okumura Masaki, Muraoka Takahiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Oxidative Protein Folding Promotion by Imidazolyl-conjugated Thiol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 202 ~ 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220537	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 Hara Yoshika, Yaguchi Atsuya, Hiramatsu Hirotsugu, Muraoka Takahiro	4. 巻 24
2. 論文標題 ROS Triggered Gel Sol Transition and Kinetics Controlled Cargo Release by Methionine Containing Peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202200798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202200798	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 該当する

1. 著者名 Uchida Noriyuki, Ryu Yunosuke, Takagi Yuichiro, Yoshizawa Ken, Suzuki Kotono, Anraku Yasutaka, Ajioka Itsuki, Shimokawa Naofumi, Takagi Masahiro, Hoshino Norihisa, Akutagawa Tomoyuki, Matsubara Teruhiko, Sato Toshinori, Higuchi Yuji, Ito Hiroaki, Morita Masamune, Muraoka Takahiro	4. 巻 145
2. 論文標題 Endocytosis-Like Vesicle Fission Mediated by a Membrane-Expanding Molecular Machine Enables Virus Encapsulation for In Vivo Delivery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 6210 ~ 6220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c12348	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 村岡貴博
2. 発表標題 膜変形分子機械の開発と生体内輸送への応用
3. 学会等名 令和4年度東北地区先端高分子セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉澤憲、内田紀之、村岡貴博
2. 発表標題 リポソーム膜の融合を誘導する膜収縮分子機械の開発と細胞内送達技術への応用
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriyuki Uchida, Yunosuke Ryu, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, Yasutaka Anraku, Takahiro Muraoka
2. 発表標題 Endocytosis-like Vesicle Fission by Membrane Expanding Molecular Machine
3. 学会等名 第13回日本生物物理学会 中国四国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内田紀之・笠勇之助・松原輝彦・佐藤智典・安楽泰孝・村岡貴博
2. 発表標題 Photoresponsive Membrane Deformation for Highly Efficient Encapsulation of Biomacromolecules and Its Application to in vivo Phage Display Method
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriyuki Uchida, Yuichiro Takagi, Takahiro Muraoka
2. 発表標題 Design of Phospholipid Nanosheet Using Self-assembly of Peptide-based Surfactant
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村岡貴博
2. 発表標題 Self-assembly of Amphiphilic Peptide in Phospholipid Membrane
3. 学会等名 第38回国際フォトポリマーコンファレンス (ICPST-38 (2021)) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村岡貴博
2. 発表標題 Glycine Substitution Effects on Supramolecular Morphology and Thermal Response of Self-Assembling Peptides
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村岡貴博
2. 発表標題 生きた細胞膜で機能する人工イオンチャネル
3. 学会等名 第6回ABC-InFO (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村岡貴博
2. 発表標題 合成化学アプローチによるジスルフィド結合異性化酵素の模倣
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村岡貴博
2. 発表標題 自己集合性ペプチドを用いた神経組織再生
3. 学会等名 第3回タタバイオ分子クラブ (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 両親媒性化合物、リン脂質構造体、およびリン脂質構造体の製造方法	発明者 内田紀之、村岡貴博、石坂龍	権利者 国立大学法人東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-28328	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 リン脂質構造体の形態制御方法およびリン脂質構造体	発明者 内田紀之、村岡貴博、石坂龍	権利者 国立大学法人東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-28329	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アゾベンゼン構造を有する化合物、ベシクル及びベシクルの構造制御方法	発明者 村岡貴博、内田紀之、笠勇之介	権利者 東京農工大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-077870	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

村岡研究室ホームページ
<https://www.muraoka-lab.com>

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		
その他の国・地域(台湾)	台湾国立交通大学		