

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19092

研究課題名(和文)ランタニドナノ粒子の光特性を利用する膜タンパク質光操作分析法の創発

研究課題名(英文)Development of an analytical method for optical control of membrane proteins using the optical properties of lanthanide nanoparticles

研究代表者

小澤 岳昌(Ozawa, Takeaki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：40302806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：特定の細胞膜レセプターの活性を近赤外光により操作する新たな分析法を開発した。近赤外光を吸収し青色光を放出するアップコンバージョン粒子(LNP)をマウス肝臓に滞留させることに成功した。一方、青色光で操作可能な細胞膜レセプターを独自に開発し、マウス肝臓にアデノウィルスを用いて発現させた。マウス腹部に近赤外光を照射したところ、近赤外光を吸収したLNPが肝臓内で青色光を放出し、細胞膜レセプター活性を上昇させることができた。さらに細胞内シグナルのリン酸化活性の上昇が確認できたことから、マウス個体内の細胞膜レセプター活性を非侵襲的に近赤外光で操作する新たな基盤技術を確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
組織透過性の高い近赤外光をナノ粒子で青色光に組織内で変換することで、膜タンパク質の光操作が実現可能となることを実証できた学術的意義は大きい。ナノ粒子を肝臓に滞留させる新たな技術は高い汎用性が期待できる。既存の光操作ツール一般に応用展開が可能であり、生物学的な基礎研究を始め、創薬や医学分野など様々な波及効果が期待できる技術である。

研究成果の概要(英文)：A novel analytical method was developed to manipulate the activity of specific membrane receptors in living cells using near-infrared light. Upconversion particles (LNPs) that absorb near-infrared light and emit blue light were successfully targeted and retained in mouse liver. We also developed a new cell membrane receptor that can be manipulated by blue light, and expressed it in mouse liver using an adenovirus. When the abdomen of mice was irradiated with near-infrared light, LNPs that absorbed near-infrared light emitted blue light in the liver and increased the membrane receptor activity. Furthermore, we confirmed an increase in phosphorylation activity of intracellular signals.

研究分野：分析化学

キーワード：アップコンバージョン 光操作 ナノ粒子

## 1. 研究開始当初の背景

生物個体内の特定のタンパク質の機能を調べるには、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作製し、Gain-of-function や Loss-of-function を解析する手法が専ら用いられてきた。しかしヘテロな細胞集団から構成される組織内の分子間ネットワークを理解するには、組織内の特定の分子を時空間的に制御し解析する技術革新が必要である。2005年以降から、外部光によって神経細胞を操作する手法が台頭し、神経科学分野ではセレンディピティーが勃興した。即ち光により特定のイオンチャネルを制御することにより、1神経細胞の活動を時間的・空間的に人為制御し、そのアウトプットを生理応答として観察することが可能になった。この1細胞を光で制御する技術は、チャネルロドプシンのイオン流入制御が精力的に研究されているものの、生物組織の細胞機能解析一般に展開するには科学技術のイノベーションが待たれている。

このような背景のもと我々は、リン酸化酵素活性や膜タンパク質間相互作用を、光によって時空間制御する新たな方法を開発してきた(文献 1-3)。多様なキナーゼやタンパク質間相互作用は、生命現象の根幹をなすシグナル伝達をコントロールしており、組織内におけるシグナル経路の定量的記述は大きなインパクトが期待される。しかしこれまで国内外で開発された光操作ツールのほとんどは、フラビン誘導体をクロモフォアとするタンパク質であり、400~500 nm 付近に吸収極大を有する。青色光は細胞毒性が高いため長時間の光照射を行うことができない。さらにオプトジェネティクスの強みは動物実験への応用であるが、青色光は組織透過性が低いいため、皮下直下の組織でしか光操作実験ができない。この問題を解決するために、赤色光を吸収するクリプトクロムを用いた光操作技術が提案されている。赤色光を用いることにより動物組織の光透過性は大きく改善されるが、クリプトクロムのクロモフォアは動物には存在しないため、その不安定な化合物を目的の組織に安定的に供給するための難題を抱えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、特定の細胞膜レセプターの活性を近赤外光により操作する新たな分析法の開発を目的とした。具体的には、近赤外光を吸収し青色光を放出するアップコンバージョンナノ粒子(lanthanide nanoparticles: LNP)を作成する。このアップコンバージョン LNP をタンパク質で修飾し、粒子表面に機能を付与する。そしてこの LNP に光を照射し粒子表面の特性を変化させることで、特定細胞膜レセプターの活性を制御する革新的な技術を開発する。ヘテロな細胞集団から構成される組織内の特定の膜レセプターに光摂動を加え操作する、先導的なオプトジェネティクス技術を創出する。

## 3. 研究の方法

アップコンバージョンナノ粒子およびその表面化学修飾は、南洋工科大学(シンガポール)の Bengng XING 教授との共同研究により開発した。培養細胞を用いたアップコンバージョン粒子による光操作では、観察用ガラスボトムディッシュ表面にアップコンバージョン粒子を含むコーラゲンを塗布し、その上で細胞を培養した。細胞観察は共焦点顕微鏡観察下で行い、観察面上側から近赤外光レーザー(976 nm, CW)を照射し、青色光駆動光制御システムの駆動させた。

アップコンバージョンナノ粒子のマウス肝臓へのターゲティングでは、アップコンバージョンナノ粒子の表面をポリエチレンイミンで修飾(UCNP)、およびさらにグリチルレチン酸で修飾したナノ粒子(GA-UCNP)を作成した。いずれもマウスの尾静脈から粒子を一定量導入し、標的臓器への滞留を二光子励起蛍光顕微鏡および SPIM を用いて観察した。

マウス肝臓内のシグナル活性は、光操作膜タンパク質をアデノウイルスでマウスに導入した後、麻酔下で開腹し露出した肝臓表面に青色 LED 光を一定時間照射、または直接近赤外光で肝臓近辺に一樣に照射し、肝臓の破砕サンプルを調製した。破砕サンプルの抽出液を特定タンパク質のリン酸化抗体を用いて Western blotting で解析した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 培養細胞を用いたアップコンバージョンナノ粒子による光操作の検証

近赤外光を照射したアップコンバージョン粒子により青色光を放出する現象を用いて、独自に開発した青色光照射により駆動する光制御システムが利用可能であるかどうかを検証した。まずアップコンバージョン粒子を含むコーラゲン基板上で光制御システムを導入した細胞を培養した。共焦点顕微鏡観察下で近赤外光レーザー(976 nm, CW)を照射し、青色光駆動光制御システムの駆動を検証した。検証した光制御システムとしては、細胞膜移行システム(iLID/Sspp, CRY2/CIBN)、核内移行システム(LINuS)、細胞膜移行システム(CRY2/CIBN)、タンパク質クラスター化システム(CRY2olig)を使用した。その結果、アップコンバージョン粒子を含むコーラゲン基板上で培養した細胞において、青色光駆動光制御システムが近赤外光レーザー照射により駆動することを確認した。さらに近赤外光ファイバーレーザーシステムを利用することで、最大約 4 W の近赤外光(976 nm)を直径約 1 cm の範囲に照射するシステムを新たに構築し、光制御

システムによる細胞内シグナル制御を試行した。具体的には、当研究室で開発した Akt 光活性化システム (optoAkt), および遺伝子発現制御システム (GAVPO) を用いて検証実験を行った。結果、光制御に伴う Akt の活性化, および遺伝子発現を確認することができた。以上から、アップコンバージョンナノ粒子に近赤外光を照射し発光する青色光で、様々な青色光駆動光制御システムを動作できることが立証された。

#### 4-2. アップコンバージョン粒子のマウス肝臓へのターゲティング

マウス肝臓はインスリンリセプターなど代謝調節に関与するタンパク質が多く存在するため、光操作の興味深いターゲット臓器の一つである。しかし血液が可視光を吸収するため、青色光駆動光制御システムの活用は極めて難しい。そこでアップコンバージョン粒子をマウス肝臓にターゲットさせれば、近赤外光で光制御システムを動作できることが期待される。アップコンバージョンナノ粒子をマウス肝臓に滞留させるため、アップコンバージョンナノ粒子の表面を化学修飾し、その生体内分布動態への影響を検証した。具体的には、ポリエチレンイミンで修飾 (UCNP), およびさらにグリチルレチン酸で修飾したナノ粒子 (GA-UCNP) を作成した。作成したナノ粒子を実験用マウス (BALB/cCrSlc 10 週齢♀, 約 18g) に尾静脈注射し、数時間おきにマウス肝臓、および肺を摘出し、観察用切片を作成した。976 nm レーザー光励起による 440 nm 付近の蛍光像を確認したところ、GA-UCNP では肝臓のみに蓄積が確認され、肺には蓄積しないことが明らかとなった。また、GA-UCNP は注射後 24 時間安定に肝臓に蓄積していた。次に、アップコンバージョンナノ粒子の肝臓内分布を詳細に確認するため、GA-UCNP をさらに有機蛍光色素 Cy5 で修飾した。Cy5 による蛍光をもとに共焦点顕微鏡で深部観察を実施したところ、表面から深さ約 3.5mm まで肝臓内のアップコンバージョンナノ粒子分布像を取得することに成功した。取得した像を三次元構築したところ、肝臓全体にドット状に蓄積していることが確認された。また、核染色像の三次元構築により得られる血管構造と比較したところ、ナノ粒子の分布像は血管構造と相関がないことが明らかとなり、尾静脈注射による導入で肝臓全体に様にナノ粒子を導入可能であることを実証した。

#### 4-3. マウス肝臓へ青色光駆動光制御システムを強発現する方法の検証

青色光駆動型光操作ツールをマウス肝臓で動作させるためには、その光操作ツールを肝臓に強発現する必要がある。本研究では、アデノウイルスを用いて光操作ツールを強発現することとした。まず、アデノウイルスによる導入方法を検討した。プロモーター領域とともに光操作膜タンパク質をコードする遺伝子をアデノウイルス発現ベクターに移し替え、ヒト由来 HEK293 細胞に遺伝子導入した。小スケールから遺伝子導入した細胞の培養を開始し、すべての細胞で細胞変性効果が確認された時点で回収した細胞破砕液を一段階上のスケールで培養した細胞に添加することを繰り返し、十分量のウイルス含有溶液を得た。ウイルスを精製したところ、1011 VP/mL スケールでウイルスを得ることに成功した。精製したウイルス溶液を培養細胞に添加し共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、光操作膜タンパク質の発現が確認された。

次に、ウイルス溶液を尾静脈注射でマウスに導入し、数日後に肝臓断片を回収・破砕することで作成したサンプルを Western blotting で解析したところ、光操作膜タンパク質の発現が確認された。また、アデノウイルスで遺伝子導入した肝臓から凍結切片を作成し、共焦点蛍光顕微鏡で光操作膜タンパク質の発現分布を確認した。結果、局所的に光操作膜タンパク質を発現した細胞群が肝臓全体にわたって散在する様子が確認された。次に、光操作膜タンパク質をアデノウイルスで導入したマウスについて、麻酔下で開腹し露出した肝臓表面に青色 LED 光を一定時間照射し、肝臓の破砕サンプルを調製した。サンプルを Western blotting で解析したところ、照射に伴う光操作膜タンパク質の活性化、および下流分子のリン酸化が確認された。以上より、アデノウイルスを用いることで、肝臓に光操作膜タンパク質を発現させ、外部光により内在のシグナル伝達経路を活性化可能であることが確認された。

#### 4-4. 近赤外光によるマウス肝臓での青色光駆動光制御システムの操作

グリチルレチン酸で修飾したナノ粒子 (GA-UCNP), LNP をマウス肝臓に滞留させ、青色光駆動光制御ツールをマウス肝臓に強発現させた後、非侵襲的にマウス肝臓に近赤外光を照射した。一定時間光照射した後、マウス肝臓を摘出して肝臓のキナーゼ活性を Western blotting により解析した。その結果、近赤外光照射にともない、特定のレセプターの下流シグナルが活性化していることが解った。本結果は、アップコンバージョン粒子非存在化ではシグナル活性が観られなかったことから、GA-UCNP による近赤外光から青色光へのコンバージョンによる結果であることが強く示唆される。以上より、アップコンバージョンナノ粒子により特定細胞膜レセプターの活性を制御する革新的な技術開発に成功した。

#### <引用文献>

1. An optogenetic system for interrogating the temporal dynamics of Akt. Y. Katsura, H. Kubota, K. Kunida, A. Kanno, S. Kuroda, T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **5**, 14589 (2015).
2. Optogenetic activation of axon guidance receptors controls direction of neurite outgrowth. M. Endo, M. Hattori, H. Toriyabe, H. Ohno, H. Kamiguchi, Y. Iino, T. Ozawa, *Sci. Rep.*, **6**, 23976 (2016).

- 3 . Optogenetic interrogation reveals separable G-protein-dependent and -independent signalling linking G-protein-coupled receptors to the circadian oscillator. H. J. Bailes, N. Milosavljevic, L. Y. Zhuang, E. J. Gerrard, T. Nishiguchi, T. Ozawa and R. J. Lucas, *BMC Biol.*, **15**, 40 (2017).
- 4 . Photo-activatable Akt probe - A new tool to study Akt-dependent physiopathology of cancer cells. S. Haga, T. Ozawa, N. Morita, M. Asano, S. Jin, Y. Min and M. Ozaki, *Oncol. Res.*, 26, 467-472 (2018).

## 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 1件）

1. 著者名 Yamada Mayumi, Nagasaki Shinji C., Ozawa Takeaki, Imayoshi Itaru	4. 巻 152
2. 論文標題 Light-mediated control of Gene expression in mammalian cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 66~77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.12.018	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 Endo Mizuki, Iwawaki Takumi, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Photocleavable Cadherin Inhibits Cell-to-Cell Mechanotransduction by Light	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2206-2214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.9b00460	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 H. Yoshimura and T. Ozawa	4. 巻 119
2. 論文標題 Optical control of G protein-coupled receptor activities in living cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Progress in Photon Science	6. 最初と最後の頁 129-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Takenouchi Osamu, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Unique Roles of $\beta$ -Arrestin in GPCR Trafficking Revealed by Photoinducible Dimerizers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-19130-y	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 Yang Lingzhi, Ozawa Takeaki, Dong Haifeng, Zhang Xueji	4. 巻 39
2. 論文標題 Optogenetic Control of Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphate Production by <scp>Light Sensitive</scp> Cryptochrome Proteins on the Plasma Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chinese Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 1240 ~ 1246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cjoc.202000648	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

[学会発表] 計23件 (うち招待講演 22件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 小澤岳昌
2. 発表標題 細胞膜レセプター機能解析のための新たなイメージングと光操作法
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Ozawa
2. 発表標題 Protein-based Luminescent Sensors and Optical Switches for Cell Analysis
3. 学会等名 PITTCON2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤岳昌
2. 発表標題 2. 光で操作し観察する新たな細胞膜レセプターの機能解析法
3. 学会等名 イスマートセルイノベーション研究センター講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ozawa
2. 発表標題 Optical Sensors and Switches for Live Cell Analysis: Opto-bioanalysis
3. 学会等名 3rd Asian Conference on Chemosensors & Imaging Probes (AsianChIP-2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ozawa
2. 発表標題 Imaging and controlling membrane receptor activities in living cells
3. 学会等名 Hwasun Optical & Molecular Imaging Workshop and Symposium (HOWS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ozawa
2. 発表標題 Optical Switches of Membrane Receptor Activities Using CRY2
3. 学会等名 生物物理学会第57回年会 (宮崎) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Ozawa
2. 発表標題 Imaging and controlling membrane receptor activities in living cells
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging (Tokyo) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤岳昌
2. 発表標題 生細胞解析を目指した改変型発光タンパク質の開発
3. 学会等名 生化学会大会（横浜）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤岳昌
2. 発表標題 光で操作し観察する新たな細胞機能解析技術
3. 学会等名 イメージングブートキャンプ2019（札幌）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤岳昌
2. 発表標題 細胞膜リセプターの機能を観る・操作する新たな技術
3. 学会等名 生命化学研究会ポストコンファレンス（女満別）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Protein-based luminescent sensors for single cell analysis
3. 学会等名 JSPS-NTS Bilateral Symposium on Functional Materials Chemistry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 光で生体分子を操作し観察する新たな細胞解析技術
3. 学会等名 日本分光学会年次講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Opto-bioanalysis: Imaging and controlling GPCR activities in living cells
3. 学会等名 IUBMB（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 生細胞内GPCR動態の可視化と制御
3. 学会等名 生理研研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Imaging and Controlling GPCR activities in live cells
3. 学会等名 The 5th Asian Chemical Biology Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 光でタンパク質を操作し観察する細胞解析技術 オプトバイオアナリシス
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Imaging and Controlling Protein Activities in Living Cells: Opto-bioanalysis
3. 学会等名 6th UT-UDS Joint Symposium on "Symmetry and Asymmetry in Science" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Imaging and Manipulating Intracellular signals in Single Live Cells with External Light.
3. 学会等名 the 10th International Forum on Post-Genomic Technology (IFPT ' 10) and the 11th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Novel Design of Luminescent Sensors and Optical Switches for Single Cell Analysis.
3. 学会等名 4th International Symposium on Molecular Imaging and Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Novel Optical Techniques to Explore the Functions of G Protein-coupled Receptors (GPCRs)
3. 学会等名 5th International Conference on Innovative Biology Medicine and Engineering (ICIBME) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Novel design of luminescent sensors and optical switches for cellular analysis-Opto-bioanalysis-
3. 学会等名 Hwasun Optical & Molecular Imaging Workshop and Symposium (HOWS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Imaging and Manipulating GPCRs in Live Cells with External Light.
3. 学会等名 10th Singapore International Chemistry Conference (SICC10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeaki Ozawa
2. 発表標題 生命の神秘を光で探る オプトバイオアナリシス
3. 学会等名 東京大学理学部公開講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
---------	---------