

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H00900

研究課題名(和文) 生体分子の量と活性を測るオプトバイオ分析の創発

研究課題名(英文) Development of opto-bioanalysis to measure the amount and activity of biomolecules

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) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：特定の一細胞内のRNAと酵素活性を定量する革新的な技術開発を目的とした。課題1では、光不活化ルシフェラーゼ(PI-Luc)を用いて、酵素活性を定量化する標準添加法の開発を行った。PI-Lucを大腸菌発現系を用いて大量合成し、その精製物を用いて青色光照射による発光活性測定を行った。光毒性を抑えるため、アップコンバージョン粒子を利用した近赤外光による光操作系を確立した。課題2では、ルシフェラーゼを二分割したRNA発光プローブを開発した。アクチンmRNAやテロメアRNAなどを発光検出することに成功した。これら発光プローブは検出のダイナミックレンジが広く定量分析に優れている特性を有する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生細胞内の特定分子や酵素を可視化するためのプローブは、蛍光プローブをはじめ様々開発され、その細胞内の時空間ダイナミクスを解明する重要な基盤分析技術となった。一方、蛍光プローブには定量性に問題があり大きな課題となっている。本研究成果は、応答のダイナミックレンジが広いルシフェラーゼの発光検出の利点を活かすことで、細胞内のRNAや酵素活性を定量しかつ時空間動態を解析できる分析法を新たに創出した点に分析化学の学術的インパクトがある。基礎生物学研究や細胞センサーの開発など広範な応用展開が期待され、検出機器の進歩とともに今後の大きな発展が見込まれる技術である。

研究成果の概要(英文)：The research objective was to develop an innovative technique for quantifying RNA and enzyme activity in a specific single cell. In the first project, we developed a standard addition method for quantifying enzyme activity using photo-inactivated luciferase (PI-Luc). PI-Luc was synthesized in large quantities using an Escherichia coli expression system, and the purified product was used to measure luminescent activity under blue light irradiation. To suppress phototoxicity, we established a light-controlling system using near-infrared light with upconversion nano particles. In the second project, we developed RNA luminescence probes with luciferase-fragment complementation and succeeded in bioluminescence detection of α -actin mRNA and telomere RNA. These bioluminescent probes have a wide dynamic range of detection and are excellent for quantitative analysis.

研究分野：分析化学

キーワード：光操作 RNA 酵素 標準添加法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学的視点から生命に対する理解を深化させることは、生命現象に対する我々の知的欲求を満たすとともに、医療・診断技術の開発や疾患の原因解明に直結する、極めて重要な課題である。中でも生体組織や臓器に代表される多細胞生物には、細胞同士のコミュニケーションが細胞内シグナルを惹起し、細胞固有の機能を発揮するシステムが存在する。培養細胞を用いた研究では、特定のリガンドを細胞外に添加し、細胞内シグナル変動を経時的に解析することで、細胞の機能理解を深化させてきた。こうした背景には、1970~1980年代に台頭したDNAを化学的に操作する技術や、1990年代から急速に発展した遺伝子のDNA配列を解析する技術、また生体分子を標的とした質量分析器の長足の進歩や蛍光イメージングによる生細胞の可視化技術などがある。一方、生命の本質は生体分子間のシグナルネットワークの理解であり、その定量的な記述にある。シグナルの担い手の代表はキナーゼなどの酵素であるが、組織はおろか培養細胞でさえも、生きた状態でその酵素分子数を絶対定量する技術は存在しない。研究開始当初において、細胞内の生体分子の数および濃度・活性を測るための新たな定量分析技術が熱望されていた。

2. 研究の目的

本研究では、特定の一細胞内の分子数あるいは酵素活性を絶対定量する革新的な技術開発を目的とした。RNAのような1細胞内の分子数が1000分子未満の生体分子については、分子数を計測(カウント)する新たな技術開発を目的とした。一方、1000分子以上存在する標的に対しては、その濃度あるいは活性を定量する技術開発を目的とした。開発する方法の一般性を単一細胞を用いた実験系を用いて実証することとした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* 標準添加法—我々はこれまでに発酵酵素ルシフェラーゼ活性が光照射に伴い可逆的に失活する photo-inactivatable luciferase (PI-Luc) を開発している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110, 9332-9337 (2013)). PI-Luc は、2分割したルシフェラーゼに、植物由来の光受容タンパク質 LOV2 を挿入することにより、光吸収にともなう LOV2 構造変化が、ルシフェラーゼの不活化を惹起する。大腸菌発現系により PI-Luc を大量合成する。カラムクロマトグラフィーなどにより PA-Luc を精製し、純粋なサンプルを作製する。分光光度計を用いて、規定の光量を照射したときに、何%のルシフェラーゼ活性が回復するかを定量的に評価する。なおタンパク質の量は、ビュレット法により定量評価する。さらに、既知濃度の野生型ルシフェラーゼをサンプルに加えた状態で同様の発光測定を行い、標準添加法により野生型のルシフェラーゼ濃度が推定可能であることを検証する。

(2) 生細胞内 RNA 分子計測技術の開発—蛍光1分子を観察するための home-build 型全反射蛍光顕微鏡を有している。本研究では、この全反射蛍光顕微鏡にさらに改良を加え、感度と位置精度を向上させることとした。具体的には、レーザー照射を構造照明とすること、また観察ステージの熱安定化などを図る。次に RNA プローブを開発する。RNA プローブは、ルシフェラーゼの二分割再構成法を利用した発光プローブを開発する。RNA 結合タンパク質の一つである Pumilio (PUM) にアミノ酸変位を加え、標的となる RNA 配列を特異的に認識するようにデザインする。この変異 PUM を2分子準備し、それぞれ二分割したルシフェラーゼ (NanoLuc) を連結する。NanoLuc の再構成によりルシフェラーゼ活性が回復するかどうかを、まずは蛍光プローブで実績のある β アクチン mRNA を標的として検証する。次に塩基くり返し構造を有する RNA を標的として、RNA の繰り返し配列が定量検出できることを実践する。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 標準添加法—PI-Luc の大量合成と精製に関する条件検討を行った。T7 Express lysY/Iq Competent E. coli (High Efficiency) 及び pColdI 発現ベクターを用い、かつタンパク質のフォールディングを助けるためのシャペロンタンパク質の共発現を試みた。その結果、可溶性画分における目的タンパク質の量を著しく増やすことができた。可溶性画分で取れた PI-Luc を、pColdI ベクターにより N 末端に融合した 6x His タグを用いて、アフィニティークロマトグラフィーによる精製及びゲルろ過クロマトグラフィーによる分画を行った。吸光度測定によるクロマトグラムから PI-Luc の溶出画分を特定し、純粋な全長 PI-Luc を得ることに成功した。次に発現及び精製規模をスケールアップし、大量の PI-Luc 精製を行った。

次に光照射による PI-Luc の不活化実験を *in vitro* で行った。精製した PI-Luc を pH7.4 の緩衝液に溶解し、外部から青色光照射前後の PI-Luc の発光活性を評価した。その結果、光照射による一過的な発光の減少は観測されたが、上記論文で観測されたような数分で発光が回復する現象は観測されなかった。これは、青色光照射による光ダメージ、および大腸菌発現系による PI-Luc の精製において、タンパク質のフォールディングが動物細胞内と異なるためと考えられる。不活性 PI-Luc の活性が数分で回復することを指標として、タンパク質精製の条件検討ならびに溶液 pH の最適化が更に必要であると判断した。一方、直接青色光照射せず、アップコンバージョン

オン粒子を用いて、近赤外光照射により LOV2 活性を制御する系の構築を試みた。原理検証実験として、LOV2 によりダイマー形成する膜リセプターを用いて細胞に発現させ、その細胞を LNP を塗布したスライドガラスに載せ、近赤外光 (808 nm) 照射による青色のアップコンバージョン光で LOV2 活性化が可能かどうかを検討した。結果、近赤外光照射に伴う膜リセプターの自己リン酸化反応は確認されたものの、シグナル下流分子の一部は活性化されることが判明した。その原因は、近赤外光照射による 40°C を超える培地温度の上昇が原因であることが解った。本検証結果は Cells 誌 (DOI: 10.3390/cells11193136) に報告した。そこで光照射を短時間でインターバルをとることで、溶液温度が 37-39°C の範囲内となる光照射条件を決定し、PI-Luc の実験に適用できることが判明した。精製 PI-Luc が光照射後の失活から試験管内で回復させることができれば、動物細胞内での in vivo 標準添加法を実現することが期待できる。

(2) 生細胞内 RNA 分子計測技術の開発—これまで細胞内で RNA を検出する RNA 発光プローブは報告ない。そこで先ず、ルシフェラーゼを二分割した RNA 発光プローブを開発した。開発したプローブは、変異 RNA 結合タンパク質ドメイン mPUM と発光タンパク質 NanoLuc の二分割体からなる (図 1)。2つの mPUM ドメインは標的 RNA の中の異なる 2つの領域をそれぞれ認識し、結合するように設計されている。mPUM 標的 RNA の非存在下では、分割 NanoLuc 断片はその酵素活性が失活し発光しない。一方、標的 RNA の存在下では、mPUM がタンデムに RNA に結合すると、分割 NanoLuc が近接し再構成する。その結果、NanoLuc の発光能が回復し標的 RNA の局在を発光検出できる。標的 RNA としてマウス由来 β -actin mRNA とし、その 3' 側非翻訳領域内にある 2つの 8塩基領域を mPUM の標的配列とした。

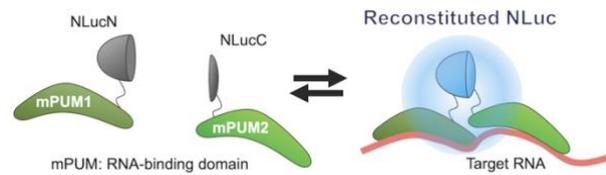


図1. NanoLuc ルシフェラーゼを用いた RNA 発光プローブの基本原則。mPUM が標的 RNA に結合すると、NanoLuc の二分割断片が近接し、再構成することで発光能が回復する。

先ずプローブを設計し最適化を行った。具体的には、NanoLuc 断片と mPUM ドメインをつなぐリンカー長の最適化を行った。作成したプローブを、標的 RNA を発現しているマウス由来 NIH3T3 細胞および標的 RNA を持たないヒト由来 HEK293 細胞にそれぞれ導入し発光値を比較した。HEK293T 株では NIH3T3 と比較していずれのプローブも著しく低い発光値を示した。この結果から、本プローブは mouse β -actin mRNA を特異的に検出していることが示唆された。リンカー長は、5 アミノ酸、10 アミノ酸、15 アミノ酸の 3 種類の長さのものを作成し比較検討した。その結果、NanoLucN 末端断片、C 末端断片ともに 10 アミノ酸のリンカー長が、2 種類の細胞間で最も高い発光強度比を示した。以上の結果から、NanoLuc 断片をリンカー長が 10 アミノ酸で PUM に連結するプローブが最適であることが解った。

次に、最適化を図った RNA 発光プローブの可逆性及び定量性を評価した。本プローブを大腸菌を利用して大量発現し、カラムクロマトグラフィーにより単離精製した。得られた精製プローブを含む溶液に標的配列を含む合成 RNA を添加し発光測定を行った。その結果、発光値は RNA を添加しないものと比較して 3 倍以上増大した。また RNA を加えた後に RNase を添加したところ、RNA を添加していない試料と同等の発光値となった。この結果から、本プローブは標的 RNA の結合により NanoLuc 断片が再構成して発光値が増大したこと、そして RNase 添加により RNA が分解することで発光値が定常状態に戻ることが明らかとなった。次に、プローブ溶液に様々な濃度の標的 RNA を添加し発光強度測定を行った。その結果、発光値は RNA 濃度依存的に増加し、RNA 濃度 10 nM で一定値に達した。この結果は、開発した発光プローブが細胞内における標的 RNA を検出するために十分な感度を有していることを示唆している。さらに RNA 発光プローブの発光強度経時変化を測定した。その結果、RNA 添加後 400 秒程度で速やかに発光値は上昇し、RNase 添加により 100 秒程度で RNA 添加前の発光値に戻った。本結果は、開発した発光プローブが細胞内 RNA 量の変化をリアルタイムに検出できる応答速度を有していることを示している。以上より、RNA 発光プローブは細胞内標的 RNA の検出および存在量変化の追跡を実現するために十分な性能を有していることが示唆された。

次に、上記 RNA 発光プローブを NIH3T3 細胞内に導入し、発光顕微鏡を用いてイメージングを行った。その結果、プローブを発現した細胞の発光像が数十分にわたり取得できた。開発したプローブの細胞内における定量性を評価するため、HEK293 細胞にプローブの標的配列と赤色発光タンパク質 mCherry の融合遺伝子をプローブ遺伝子とともに導入し、発光顕微鏡を用いて 1 細胞解像度で観察した (図 2)。その結果、個々の細胞におけるプローブ由来の発光強度と mCherry 由来の蛍光強度に正の相関が見られた。この結果は、生細胞内において開発した発光プローブが標的遺伝子を定量検出し、顕微鏡により 1 細胞解像度で標的遺伝子発現を評価できることを示している。

そこで、当初の目的であった反復配列を有する RNA を検出するプローブ開発を行った。標的とするカスタムメイド mPUM を効率的に作成できるよう、Golden Gate Assembly 法を利用してカス

タムメイドに mPUM を作成できる mPUM 単位リピート構造ライブラリを構築した。ハンチントン病の原因とされている CAG 反復 RNA を標的とする mPUM の作成した。具体的には 5' -CAGCAGCA-3', 5' -AGCAGCAG-3', 5' -GCAGCAGC-3' をそれぞれ認識し結合する 3 種類の mPUM を作成した。これらと CAG リピート合成 RNA を混合し電気泳動したところ, RNA と mPUM が結合し分子量が増大したバンドが検出された。またテロメアの転写産物であるテロメア反復配列含有 RNA (TERRA) を特異的に認識する mPUM を用い, TERRA を生細胞内で発光検出するプローブを作成した。このプローブを用いて試験管内で TERRA 配列を有する RNA を定量的に発光検出できることを実証した。本研究成果は, β アクチンの RNA 定量と同様に, 蛍光タンパク質をコントロールとして RNA 繰り返し配列を定量することが期待できる。

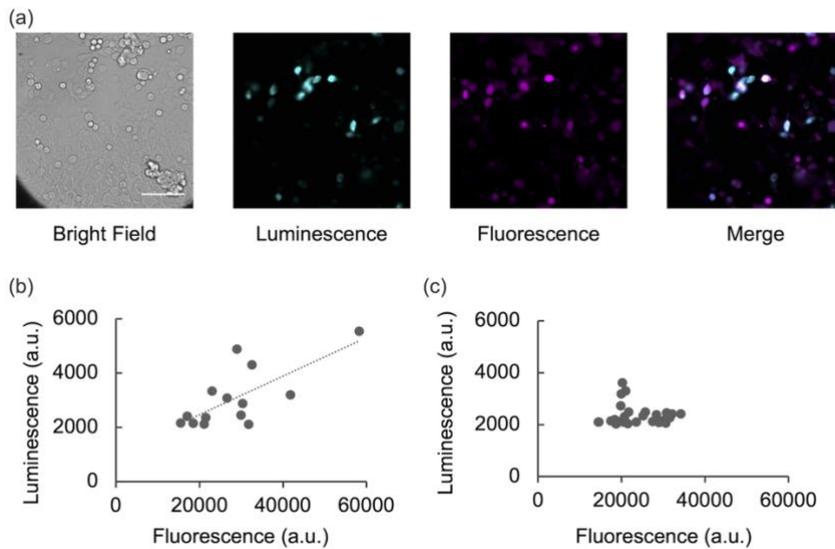


図 2. RNA 発光プローブ及び標的遺伝子を発現した HEK293 細胞の発光顕微鏡像 (上) と蛍光・発光強度相関プロット (下).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizui Yuki, Eguchi Masatoshi, Tanaka Masanobu, Ikeda Yuma, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki, Citterio Daniel, Hiruta Yuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Long-term single cell bioluminescence imaging with C-3 position protected coelenterazine analogues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 579 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B02020F	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 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 Light Sensitive 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

1. 著者名 Nishiguchi Tomoki, Yoshimura Hideaki, Kasai Rinshi S., Fujiwara Takahiro K., Ozawa Takeaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Synergetic Roles of Formyl Peptide Receptor 1 Oligomerization in Ligand-Induced Signal Transduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2577 ~ 2587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00631	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 Biselli Sabrina, Alencastre Inês, Tropmann Katharina, Erdmann Daniela, Chen Mengya, Littmann Timo, Maia Andre F., Gomez-Lazaro Maria, Tanaka Miho, Ozawa Takeaki, Keller Max, Lamghari Meriem, Buschauer Armin, Bernhardt Gunther	4. 巻 11
2. 論文標題 Fluorescent H2 Receptor Squaramide-Type Antagonists: Synthesis, Characterization, and Applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1521 ~ 1528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.0c00033	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 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, Ozawa Takeaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Advanced Bioluminescence System for In Vivo Imaging with Brighter and Red-Shifted Light Emission	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6538 ~ 6538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186538	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 2274
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Membrane Receptor Trafficking Manipulated by Optogenetic Tools	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 15 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_2	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 Littmann Timo, Ozawa Takeaki, Bernhardt Gunther	4. 巻 2274
2. 論文標題 Quantitative Determination and Imaging of G _q Signaling in Live Cells via Split-Luciferase Complementation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 69 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_7	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 Li Qiaojing, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki	4. 巻 2274
2. 論文標題 A Split-Luciferase-Based Cell Fusion Assay for Evaluating the Myogenesis-Promoting Effects of Bioactive Molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 79 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_8	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 Matsuo Junji, Haga Sanae, Hashimoto Kent, Okubo Torahiko, Ozawa Takeaki, Ozaki Michitaka, Yamaguchi Hiroyuki	4. 巻 65
2. 論文標題 Activation of caspase-3 during Chlamydia trachomatis-induced apoptosis at a late stage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Microbiology	6. 最初と最後の頁 135 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1139/cjm-2018-0408	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 Morimoto Takeshi, Chiu Liang-da, Kanda Hiroyuki, Kawagoe Hiroyuki, Ozawa Takeaki, Nakamura Makoto, Nishida Kohji, Fujita Katsumasa, Fujikado Takashi	4. 巻 144
2. 論文標題 Using redox-sensitive mitochondrial cytochrome Raman bands for label-free detection of mitochondrial dysfunction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2531 ~ 2540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8an02213E	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 Takamura Ayari, Halamkova Lenka, Ozawa Takeaki, Lednev Igor K.	4. 巻 91
2. 論文標題 Phenotype Profiling for Forensic Purposes: Determining Donor Sex Based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Urine Traces	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6288 ~ 6295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b01058	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, MIYASAKI Masashi, LI Qiaojing, KAWAMURA Genki, OZAWA Takeaki	4. 巻 35
2. 論文標題 A Detection Method for GLUT4 Exocytosis Based on Spontaneous Split Luciferase Complementation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 835 ~ 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19C003	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 Shimada Rintaro, Nakamura Takashi, Ozawa Takeaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Parallelized shifted excitation Raman difference spectroscopy for fluorescence rejection in a temporary varying system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biophotonics	6. 最初と最後の頁 e201960028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbio.201960028	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 Bartole Edith, Littmann Timo, Tanaka Miho, Ozawa Takeaki, Buschauer Armin, Bernhardt Gunther	4. 巻 62
2. 論文標題 [3H]UR-DEBa176: A 2,4-Diaminopyrimidine-Type Radioligand Enabling Binding Studies at the Human, Mouse, and Rat Histamine H4 Receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 8338 ~ 8356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b01342	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 Takamura Ayari, Watanabe Daisuke, Shimada Rintaro, Ozawa Takeaki	4. 巻 2
2. 論文標題 Comprehensive modeling of bloodstain aging by multivariate Raman spectral resolution with kinetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-019-0217-1	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 Noda Natsumi, Ishimoto Tetsuya, Mori Hisashi, Ozawa Takeaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Enhanced bioluminescent sensor for longitudinal detection of CREB activation in living cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 2740 ~ 2747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9PP00249A	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33件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 江口 正敏、吉村 英哲、小澤 岳昌
2. 発表標題 生細胞内性RNAの1細胞可視化定量を志向した発光プローブの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

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

1. 発表者名 江口 正敏、吉村 英哲、小澤 岳昌
2. 発表標題 生物発光プローブ開発を通じた生細胞内在性RNA1細胞可視化定量法の創出
3. 学会等名 日本分析化学会年会第69回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bryan John Subong, Mizuki Endo, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Optogenetic control of insulin receptor activity in living cells
3. 学会等名 1st ETH Zurich- University of Tokyo Student Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 BryanJohn Subong, Takeaki Ozawa, Rhodora Azanza, Lilibeth Salvador-Reyes
2. 発表標題 Quantitative Proteomic Analyses Differentiates Harmful Algal Bloom (HAB)-causing dinoflagellates
3. 学会等名 11th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江口 正敏、吉村 英哲、小澤 岳昌
2. 発表標題 生細胞内RNAのリアルタイム可視定量分析を志向した生物発光プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021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
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 (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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤岳昌
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 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤岳昌
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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤岳昌
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 小澤岳昌
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 小澤岳昌
2. 発表標題 光で操作し観察する新たな細胞膜リセプターの機能解析法
3. 学会等名 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 Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Long Time Single Molecule Tracking on Receptor Molecules in the Plasma Membrane to Understand Signal Transduction
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayari Takamura, Lenka Halamkova, Takeaki Ozawa, Igor K. Lednev
2. 発表標題 Statistical Modeling for Gender Determination of Human Urine via Infrared Spectroscopy for Forensic Purposes
3. 学会等名 2019年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口正敏、吉村英哲、小澤岳昌
2. 発表標題 生体内RNA定量可視化を志向した新規発光プローブの開発
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genki Kawamura, Teruya Tamaru, Misturu Hattori, Ken Takamatsu, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Circadian BMAL1-p53 interplay regulates UV-triggered clock synchronization to evoke stress protection
3. 学会等名 The XVI Congress of the European Biological Rhythms Society (EBRs 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osamu Takenouchi, Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Molecular tools for optical control of the fate of receptors in living cells
3. 学会等名 Royal Society of Chemistry Tokyo International Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤瑞己, 吉村英明, 小澤岳昌
2. 発表標題 細胞間張力伝達を光制御する機能性タンパク質の開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口正敏、吉村英哲、小澤岳昌
2. 発表標題 生細胞内在性RNAの可視化定量を目指した発光プローブの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genki Kawamura, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Deciphering Akt-mediated metabolic signaling pathway by the photoactivatable Akt system.
3. 学会等名 第11回光操作研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口正敏、吉村英哲、小澤岳昌
2. 発表標題 発光プローブによる生細胞内RNAの可視化定量を志向した分析法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会年会第68回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Signal transduction mechanism revealed with single molecule imaging of Akt on the plasma membrane
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田なつみ、小澤岳昌
2. 発表標題 乳癌細胞におけるCD44s細胞外ドメイン切断を検出する生物発光センサー
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤瑞己, 小澤岳昌
2. 発表標題 光切断型カドヘリンによる細胞間張力伝達の光操作
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Bryan John Subong, Mizuki Endo, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Insulin Signaling Pathway Control through Photo-Activatable Insulin Receptor
3. 学会等名 2020 10th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西口知輝、吉村英哲、小澤岳昌
2. 発表標題 GPCRオリゴマー形成に伴うGタンパク質結合能変化の一分子解析
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideaki Yoshimura, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Analysis of molecular motility and assembly in living cells based on single molecule imaging to understand mechanisms of cellular functions
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤瑞己, 小澤岳昌
2. 発表標題 光切断型モジュールを用いた光による細胞間張力伝達制御
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eguchi Masatoshi, Yoshimura Hideaki, Ozawa Takeaki
2. 発表標題 Development of a Method for Visualizing and Quantifying of Endogenous RNAs by Bioluminescent Probes
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ying-hsien Lee, Yang Li, Mizuki Endo, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Signaling Attenuation and Degradation of Calcium Ion Channel via E-fragment Application
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小澤 岳昌	4. 発行年 2020年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 132
3. 書名 バイオイメージング	

〔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	尾崎 倫孝 (Ozaki Michitaka) (80256510)	北海道大学・保健科学研究院・教授 (10101)	

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			
シンガポール	NTU			