

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05538

研究課題名（和文）光機能的抗体による内在性タンパク質活性制御システムの開発

研究課題名（英文）The development of light-sensitive antibody for controlling protein activities.

研究代表者

遠藤 瑞己（Endo, Mizuki）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教

研究者番号：80793231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、光により機能を内在性タンパク質の活性をコントロール可能な光機能的抗体の開発、および金属ナノ粒子を活用することにより新たな分析基盤技術を創出することを目的とした。光機能的抗体の開発においては、対象となる内在性タンパク質の活性を可逆・不可逆に制御する分子の開発に成功した。一方で、金属ナノ粒子については溶液中で安定にリン光を発する分子を発見し、細胞内取り込み経路がリガンド分子によって制御可能であること、およびリン光寿命顕微鏡による観察で、細胞内に取り込まれた金属ナノ粒子の発光寿命が100-200 nsと比較的長いこと、自家蛍光シグナルを抑えたイメージングが可能であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した光機能的抗体を用いることで、内在性タンパク質の活性を可逆的・不可逆的に人為的に制御することが可能となり、時空間的に変動するタンパク質活性パターンの生理的意義の解明につながると期待される。また、開発した金属ナノクラスターは、そのリン光発光を利用した細胞イメージングが可能となり、細胞内の取り込み経路や集積させる細胞小器官を自在に制御できる可能性を示すことができた。本研究成果は、多元素金属ナノクラスターの化学を拓き、光バイオ分析のための新たな物質群と基礎技術を提供することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present project, we aimed to develop a light-sensitive antibody for controlling endogenous protein activities, and establish a novel analytical platform with the help of unique metal nanoparticles. As for the light-sensitive antibody, we succeeded in the development of the molecule that controls endogenous protein activities reversibly or irreversibly. On the other hand, we found a novel metal nanocluster that retains phosphorescence in the aqueous solution. The route for cellular uptake of the nanocluster was modulated by the ligand molecules surrounding the metal cores. Utilizing the long lifetime of phosphorescence, the incorporated nanocluster was successfully visualized with phosphorescence lifetime imaging with high contrast, where background autofluorescence signal is sufficiently minimized.

研究分野：分析化学

キーワード：光制御 抗体 金属ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

これまで生命現象の仕組みを解明しようとする自然科学研究では、現象を担うタンパク質などの生体分子を網羅的に同定する還元的アプローチが大きな成功を納め、得られた知見は同定された分子を標的とした薬剤開発に活用されるなど、様々な疾患治療に多大な貢献をしてきた。一方で、生きた個体内では、タンパク質活性が周囲環境に応じて動的に制御されていることが判明しつつあった。したがって、これからのさらなる自然科学研究の発展には、生きた個体内ではシステム内のタンパク質群がどのように振る舞い、複雑な機能を実現するのかという統合的観点が重要であり、非破壊的にシステム内のタンパク質活性の動態を解析可能な研究手法の需要が格段に高まっていた。研究開始当初、標的タンパク質の活性を光照射により人為的に制御する光遺伝学が注目を集めていたほか、任意の標的タンパク質を抗原として高い親和性、特異性をもって結合する抗体により、内在性タンパク質の活性部位等に結合することで活性を直接制御する技術が注目を集めていた。しかしながら、両手法ともに技術的欠点を抱えていたため、これらの欠点を克服し、内在性タンパク質活性を時空間的に制御可能な汎用性の高い分析技術を創出する必要があった。

2. 研究の目的

本申請研究では、広範な内在性タンパク質を標的とする「抗体」による分子認識技術を基盤として、タンパク質活性の時空間的制御を可能にする「光遺伝学的」手法を取り入れ、
1)光照射により抗原へ結合し、内在性細胞内タンパク質活性を制御する「光機能性抗体」の開発
2)精製した光機能性抗体を用いた、細胞外での内在性タンパク質活性制御の実証
3)生体内応用を志向した、近赤外光波長を用いた光機能性抗体の制御方法の確立
を目的とした。目的1では、抗原結合能を光制御する新たな基盤技術を構築し、細胞内発現系において内在性タンパク質活性を制御する光機能性抗体を開発することを目的とした。目的2では、光機能性抗体の精製条件を確立し、細胞外内在性膜タンパク質活性の光制御を目指した。目的3では金属ナノ粒子技術を活用し、生体透過性の高い近赤外光を利用した光機能性抗体の制御法の確立を目指した。

3. 研究の方法

3.1. 光機能性抗体の開発

遺伝子工学的手法により光照射により構造変化する光受容タンパク質を一本鎖抗体タンパク質と融合した遺伝子を作成した。次にヒト培養細胞株 HEK293T 細胞に作成した遺伝子を一過的に導入し、24時間培養した。遺伝子導入した細胞を共焦点顕微鏡 FV-1000D で観察し、目的の融合タンパク質の発現、および細胞内局在を蛍光イメージングにより確認した。抗原結合能の評価には、抗原タンパク質発現時の細胞内局在の変化に加え、必要に応じて免疫沈降実験により確認した。最も光応答能の良い分子を光機能性抗体として次の機能評価に用いた。

3.2. 光機能性抗体によるタンパク質活性制御

作成した光機能性抗体分子を発現した細胞において、薬剤添加による刺激時の細胞応答を蛍光イメージングにより定量し、光照射前後での刺激応答量の変化を比較した。また、必要に応じて下流遺伝子の発現量を比較し、光照射時と暗所培養時での遺伝子発現量変化を比較した。

3.3. 金属ナノ粒子の細胞導入

金属ナノクラスターを様々な導入条件(濃度・時間)でヒト培養細胞株 HEK293T 細胞, HeLaS3 細胞, アフリカミドリザル細胞株 COS-7 細胞に導入し、細胞を共焦点顕微鏡 FV-1000D で観察することで細胞内取り込みをイメージングにより確認比較した。必要に応じて経時観察を実施し、細胞内取り込み動態を評価した。細胞内の蓄積部位を特定する際には、細胞内小器官染色試薬を用いて観察を行った。細胞内取り込み経路の特定には、各取り込み経路を選択的に阻害する薬剤を添加し、細胞内蓄積量を比較した。細胞毒性の評価には代謝活性を検出可能な alamarBlue 細胞生存率検出試薬を用いた。リン光寿命イメージングには、東京工業大学生命理工学院の蒲池利章教授にご協力頂いた。

4. 研究成果

青色光に応答する光受容タンパク質を一本鎖抗体タンパク質に融合することで候補分子を作成し、標的タンパク質への抗原結合能を蛍光イメージングにより評価した。結果、数種類の分子において光照射依存的な標的タンパク質への可逆的・非可逆的な結合が確認された。また、薬剤添加による標的タンパク質の活性化をイメージングにより定量化し、光機能性抗体の光活性化前後での応答能を比較したところ、光照射時に薬剤への応答が低下することが確認された。また、下流遺伝子の発現量を評価したところ、光照射時には有意に発現量が低下することが確認された。以上の結果から、光機能性抗体により、光照射依存的に標的タンパク質に結合し、その機能を阻害することに成功した。

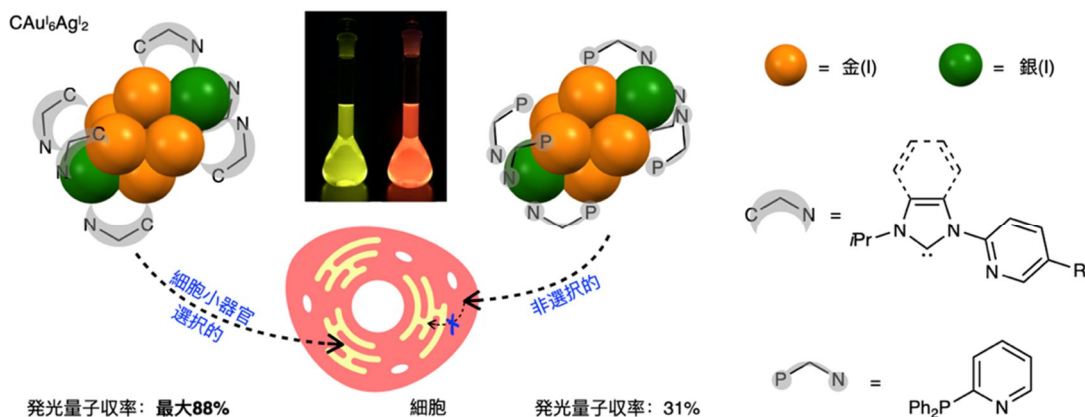
当初は金属ナノ粒子技術の活用し、開発した光機能性抗体の生体への応用を検討していた。生体

応用への前段階として金属ナノクラスター分子の細胞応用を検討していたところ、NHC 配位子を用いた金属ナノクラスター分子が細胞中でリン光を発することを発見した。そこで、当初の計画を変更し、リン光を発する金属ナノクラスター分子の詳細な機能評価を実施した。

細胞導入条件を検討したところ、DMSO/PBS 溶液で 10 分間インキュベートすることで HeLa 細胞、HEK293 細胞、COS7 細胞などさまざまな培養細胞に導入することに成功した。細胞内に取り込まれた金属ナノクラスターは発光性を保持しており、共焦点顕微鏡下で 405 nm レーザー光で励起し 500-550 nm の発光を検出することで細胞内局在を可視化することができた。市販の染色試薬で細胞小器官を標識したところ、細胞内に取り込まれた金銀ナノクラスターは小胞体を選択的に集積することが明らかとなった。また、細胞内取り込み経路を詳細に解析するため阻害剤とともに金銀ナノクラスターの細胞導入を試みたところ、細胞内取り込みは Genistein 処理で阻害されることが判明した。このことは、金属ナノクラスターは Caveol in 依存的な経路で取込まれていることを示している。これは、過去に報告されていたホスフィン配位子を用いたナノクラスターが経路非選択的に細胞内に取り込まれサイトゾル中に分布していたことと大きく異なる。本実験結果より、本研究で新たに設計した NHC 配位子を用いた金属ナノクラスターにより、細胞内の取り込み経路や集積させる細胞小器官を自在に制御できる可能性があることが示された。

蛍光標識を用いた細胞イメージングにおいては、細胞内に元から存在する蛍光を示す物質によるシグナルがバックグラウンド蛍光として検出されてしまう恐れがある。一方、NHC 配位子を用いた金属ナノクラスターは、蛍光と比較して発光寿命の長いリン光を発することが判明したため、バックグラウンドの蛍光を抑えたイメージングが可能になると考えられた。そこで、金属ナノクラスターを導入した細胞を東京工業大学生命理工学院の蒲池利章教授のご協力のもと、リン光寿命顕微鏡で観察したところ、細胞内に取り込まれた金銀ナノクラスターは発光寿命が 100-200 ns と比較的長く、自家蛍光シグナルを抑えたイメージングが可能であることが確認された。

以上のように、NHC 配位子を用いた金属ナノクラスターを活用することで、そのリン光発光を利用した細胞イメージングが可能となり、配位子を変化させることで細胞内の取り込み経路や集積させる細胞小器官を自在に制御できる可能性を示すことができた。本研究成果は、多元金属ナノクラスターの化学を拓き、光バイオ分析のための新たな物質群と基礎技術を提供することが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lei Zhen, Endo Mizuki, Ube Hitoshi, Shiraogawa Takafumi, Zhao Pei, Nagata Koichi, Pei Xiao-Li, Eguchi Tomoya, Kamachi Toshiaki, Ehara Masahiro, Ozawa Takeaki, Shionoya Mitsuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 N-Heterocyclic carbene-based C-centered Au(I)-Ag(I) clusters with intense phosphorescence and organelle-selective translocation in cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31891-3	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mizuki Endo
2. 発表標題 Optical Modulation of Membrane Protein Function in Living Samples
3. 学会等名 4th ETH Zurich-The University of Tokyo Strategic Partnership Symposium（国際学会）
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
---------	---------