

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26600053

研究課題名(和文) プラズモンイメージングとサブ細胞レベル磁気分離によるオートファジーの理解

研究課題名(英文) Understanding of autophagy utilizing plasmon imaging and subcellular magnetic separation techniques

研究代表者

前之園 信也 (MAENOSONO, SHINYA)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：00323535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子(Ag/FeCo/Agコア/シェル/シェル型ナノ粒子)を創製し、このナノ粒子を用いてオートファゴソームの磁気分離に挑戦した。ハイブリッドナノ粒子を哺乳細胞にリポフェクションし培養したところ、30分後にはナノ粒子がVps26と共局在し、その後LC3と共局在する様子が観察された。最適なタイミングで細胞膜を温和に破碎し磁気分離に供した。磁気分離分画にはLC3-II、トランスフェリン受容体、及びLAMP2が濃縮されていたが、LC3-Iは含有されていなかった。これらの結果はオートファゴソームが単離できたことを示している。

研究成果の概要(英文)：We developed ultrasmall magnetic-plasmonic hybrid nanobeads and applied them to the isolation of autophagosomes by applying a magnetic field. The beads were chemically synthesized and comprised an Ag/FeCo/Ag core/shell/shell structure with a mean diameter of 15 nm. The Ag core and the FeCo shell conferred imaging and magnetic separation capabilities, respectively. The nanobeads were transfected into mammalian cells by lipofection. Thirty minutes after lipofection, the nanobeads co-localized with Vps26, and subsequently with LC3. Cell lysates were prepared at the appropriate time points and were subjected to magnetic separation. The separated fraction contained LC3-II, transferrin receptor, and LAMP2, but not LC3-I, suggesting that autophagosomes of endosomal origin had been isolated.

研究分野：ナノ材料化学

キーワード：オートファジー 磁気分離 バイオイメージング 細胞小器官

### 1. 研究開始当初の背景

オートファジーとは、栄養飢餓などに応じて細胞が自身の構成成分(細胞質や細胞内小器官)をオートファゴソームと呼ばれる二重の脂質膜の小胞で包み込んで、リソソームなどの加水分解酵素を豊富に含む場に輸送し分解する現象であり、酵母からヒトにいたるまで真核生物が共通して持つシステムである。オートファジーは、新たなタンパク質の合成、エネルギーの生産、様々な変性疾患の原因となる異常タンパク質や侵入した病原体を排除する役割を果たしている。この他にも、発生や分化や老化、細胞死、免疫応答といった多彩な生命現象にも関与することが次第に明らかとなり、オートファジーは、現在では生命科学分野で最もホットな研究テーマの一つとなっている。しかし、分子レベルでは未知の部分が多く、オートファジーのメカニズムの分子レベルでの理解が切望されている<sup>[1]</sup>。そのための方法の一つとして、細胞内に形成されたオートファゴソームをリソソームと融合する前に単離し、膜タンパクや脂質を解析するという手段が考えられるが、オートファゴソームを単離する手段は今のところ無い。

<sup>[1]</sup>N. Mizushima, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2011, 27, 107

### 2. 研究の目的

磁性とプラズモン特性を併有したハイブリッドナノ粒子を創製し、哺乳培養細胞にこのナノ粒子をトランスフェクションした後、ナノ粒子の細胞内での局在をイメージしながら(図1) ナノ粒子がオートファゴソームに取り込まれたタイミングでオートファゴソームを磁気分離することで(図2) オートファゴソーム形成に関わるタンパクの同定や、オートファゴソーム内容物の直接分析を可能にする技術を確認することを目的とする。

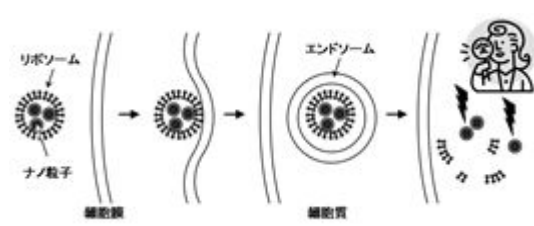


図1 ハイブリッドナノ粒子の細胞質への送達とイメージング。

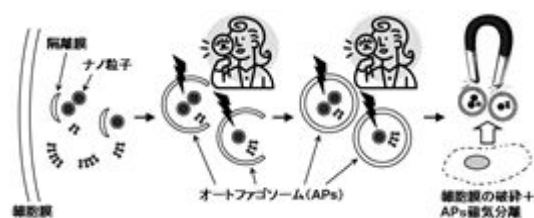


図2 ハイブリッドナノ粒子によるオートファゴソームのイメージングと磁気分離。

### 3. 研究の方法

細胞内物質輸送に係る細胞小器官を高選択的に磁気分離するためには、まず標的小器官に磁気ビーズを取り込ませ、何らかの方法で可視化することによって磁気ビーズが標的小器官に取り込まれたことを確認し、適切な時間帯(細胞内物質輸送に係る小器官は、多くの場合時間の経過とともに別の小器官へ変態していくため。例えば、初期エンドソーム 後期エンドソーム リソソームなど)に細胞膜を温和に破碎して磁気分離を行う必要がある。この一連の操作を可能にする磁気ビーズの必要条件は(1)粒径30nm以下、(2)長時間イメージングが可能、(3)優れた磁気特性、(4)高い表面機能化の自由度、の4つである。

我々は、オートファゴソームの単離を目的として、磁性材料の中でも最も高い飽和磁化(酸化鉄の約4倍)を持つ鉄コバルト合金(FeCo)と、プラズモン材料の中でも最も高い散乱断面積(金の約10倍)を持つ銀(Ag)を複合化したAg/FeCo/Agコア/シェル/シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を創製した(図3)<sup>[2-5]</sup>。本ナノ粒子は、粒径約15nmで、高い磁気分離能力と長時間ライブイメージング能力を兼ね備えた次世代バイオプローブである。この独自開発の磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の表面をポリ-L-リジン(PLL)で被覆し、cos-1細胞(アフリカミドリザル腎細胞)にトランスフェクションした後、ナノ粒子の細胞内分布の培養時間依存性を調べ、ナノ粒子がオートファゴソームに最も局在するタイミングでホモジナイザーを用いて速やかに細胞膜のみを破碎して磁気分離を行い、ショットガンプロテオミクス解析に供してオートファゴソームに局在するタンパク質の同定を行う。

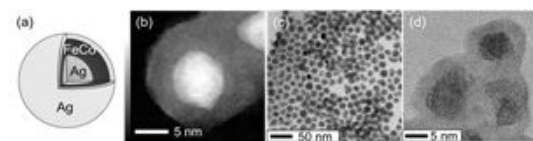


図3 Ag/FeCo/Agコア/シェル/シェル型磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子の(a)構造模式図と(b-d)透過型電子顕微鏡像。

<sup>[1]</sup>M. Takahashi, P. Mohan, A. Nakade, K. Higashimine, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, *Langmuir*, 2015, 31, 2228

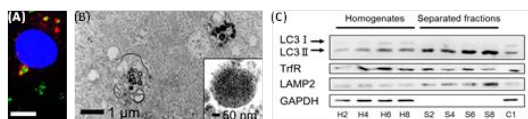
<sup>[2]</sup>M. Takahashi, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, *CrystEngComm*, 2015, 17, 6923

<sup>[3]</sup>M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, *J. Magn. Magn. Mater.*, 2016, 401, 339

<sup>[4]</sup>M. Takahashi, P. Mohan, K. Higashimine, D. Mott, and S. Maenosono, *J. Appl. Phys.*, 2016, 120, 134301

#### 4. 研究成果

ハイブリッドナノ粒子を *c o s - 1* 細胞にリポフェクションした後、ナノ粒子の細胞内分布の培養時間依存性を調べたところ、ナノ粒子の局在が、初期エンドソーム、オートファゴソーム、オートリソソームへと移行する様子の可視化に成功した(図4 A)。この結果を踏まえ、オートファゴソームにナノ粒子が取り込まれた時点でホモジナイザーを用いて速やかに細胞膜のみを破碎して磁気分離を行い、磁気分画成分をウェスタンブロットティングしたところ、LC3 - の濃縮が確認された(図4 C)。LC3 - 量はオートファゴソーム形成と正の相関を示すことが吉森、大隅らの研究でわかっているため、オートファゴソームの磁気分離に成功したことが確認された。このような成功例は既往の類似研究には無い。



**図4** ハイブリッドナノ粒子を *c o s - 1* 細胞にリポフェクションし、2時間培養後に撮影した(A)共焦点顕微鏡像[青は細胞核(DAPI染色)赤はオートファゴソーム(LC3染色)緑はナノ粒子のプラズモン散乱。ナノ粒子はオートファゴソーム内に局在している]および(B)透過型電子顕微鏡像(挿入図はオートファゴソーム内に取り込まれたナノ粒子の拡大像。ナノ粒子はリポフェクション試薬と複合体を形成している)。(C)ウェスタンブロットの結果(サンプル名中の数字は培養時間)。磁気分離分画S2-S8においてLC3 - の濃縮が確認されると同時にTrfR(エンドソームマーカー)及びLAMP2(リソソームマーカー)も確認され、反対にネガティブコントロールのGAPDHは検出されていないことから、オートファゴソーム及びオートリソソームの濃縮に成功したことがわかる。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計4件)

- [1] M. Takahashi, P. Mohan, K. Higashimine, D. Mott, and S. Maenosono, "Transition of exchange bias from the linear to oscillatory regime with the progression of surface oxidation of Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanoparticles", *J. Appl. Phys.*, **2016**, 120, 134301 (査読有)
- [2] M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, "Exchange bias in Ag/FeCo/Ag core/shell/shell nanoparticles due to partial oxidation of FeCo intermediate shell", *J. Magn. Magn. Mater.*, **2016**, 401, 339 (査読有)
- [3] M. Takahashi, K. Higashimine, P. Mohan,

D. Mott, and S. Maenosono, "Formation mechanism of magnetic-plasmonic Ag@FeCo@Ag core-shell-shell nanoparticles: fact is more interesting than fiction", *CrystEngComm*, **2015**, 17, 6923 (査読有)

- [4] M. Takahashi, P. Mohan, A. Nakade, K. Higashimine, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, "Ag/FeCo/Ag core/shell/shell magnetic nanoparticles with plasmonic imaging capability", *Langmuir*, **2015**, 31, 2228 (査読有)

##### 〔学会発表〕(計28件)

- [1] M. Takahashi, P. Mohan, K. Mukai, Y. Takeda, T. Matsumoto, K. Matsumura, M. Takakura, T. Taguchi, and S. Maenosono, "Imaging and isolation of autophagosomes using magnetic-plasmonic hybrid nanobeads", *The 8<sup>th</sup> International Symposium on Autophagy (The 8<sup>th</sup> ISA)*, 29 May - 1 Jun 2017, 奈良春日野国際フォーラム麓, 奈良県奈良市
- [2] 高橋 麻里, P. Mohan, 向井 康治朗, 武田 裕一, 松本 多圭夫, 松村 和明, 高倉 正博, 田口 友彦, 前之園 信也, "磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を用いたオートファゴソームの単離", *日本化学会第97春季年会*, 16-19 Mar 2017, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜, 神奈川県
- [3] M. Takahashi, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, "Formation mechanism of Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanoparticles: fact is more interesting than fiction", *The 2016 MRS Fall Meeting*, 27 Nov - 2 Dec 2016, Boston, USA
- [4] R. Kitaura, M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, "Au@FeCo core-shell plasmonic nanoparticles with magnetic manipulation capability", *The 2016 MRS Fall Meeting*, 27 Nov - 2 Dec 2016, Boston, USA
- [5] R. Kitaura, M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, "Magnetic-plasmonic Au@FeCo core-shell nanoparticles for next-generation biomedical applications", *The 2016 MRS Fall Meeting*, 27 Nov - 2 Dec 2016, Boston, USA
- [6] 高橋 麻里, P. Mohan, 東嶺 孝一, D. Mott, 前之園 信也, "Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型ナノ粒子における磁気交換バイアスと FeCo シェル酸化膜厚の相関について - 線形領域から振動領域への転移", *第67回コロイドおよび界面化学討論会*, 22-24 Sep 2016, 北海道教育大学旭川校, 北海道旭川市
- [7] 北浦 諒一, 高橋 麻里, P. Mohan, D. Mott, 前之園 信也, "次世代医療技術へ向けた、

- 磁性-プラズモン複合 Au@FeCo コアシェル型ナノ粒子”, 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 22-24 Sep 2016, 北海道教育大学旭川校, 北海道旭川市
- [8] D. Mott, A. T. N. Dao, M. Takahashi, and S. Maenosono, “Electron transfer as a tool to create heterostructured nanoscale probes with robust, active, and enhanced sensing properties and functionality”, *ACS Fall 2016 National Meeting*, 21-25 Aug 2016, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA
- [9] M. Takahashi, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, “Formation mechanism of Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanoparticles”, *The 2<sup>nd</sup> International Conference on Polyol Mediated Synthesis (IC-PMS 2016)*, 11-13 Jul 2016, 滋賀県立大学, 滋賀県彦根市
- [10] M. Takahashi, P. Mohan, K. Higashimine, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, “Magnetic-plasmonic hybrid nanopropes for isolation of intracellular membrane vesicles”, *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France
- [11] M. Takahashi, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, “Formation mechanism of Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanopropes designed for biomedical separation/imaging applications”, *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France
- [12] M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, “Exchange bias in Ag@FeCo@Ag core@shell@shell hybrid biopropes due to partial oxidation of FeCo intermediate shell”, *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France
- [13] S. Maenosono, “Next-generation biomedical magnetic nanopropes”, *E-MRS 2016 Spring Meeting*, 2-6 May 2016, Lille, France
- [14] M. Takahashi, P. Mohan, K. Higashimine, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, “Magnetic-plasmonic hybrid Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanopropes for isolation of intracellular membrane vesicles” (English, Poster), *日本化学会第 96 春季年会*, 24-27 Mar 2016, 同志社大学, 京都府京田辺市
- [15] M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, “Exchange bias in Ag/FeCo/Ag core/shell/shell nanoparticles due to partial oxidation of FeCo intermediate shell” (English, Oral), *日本化学会第 96 春季年会*, 24-27 Mar 2016, 同志社大学, 京都府京田辺市
- [16] M. Takahashi, K. Higashimine, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, “Formation mechanism of Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanoparticles”, *PACIFICHEM 2015*, 15-20 Dec 2015, Honolulu, Hawaii, USA
- [17] M. Takahashi, P. Mohan, K. Higashimine, A. Nakade, D. Mott, T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, “Magnetic-plasmonic hybrid Ag@FeCo@Ag core@shell@shell nanopropes for isolation of intracellular membrane vesicles”, *PACIFICHEM 2015*, 15-20 Dec 2015, Honolulu, Hawaii, USA
- [18] 高橋 麻里, 東嶺 孝一, P. Mohan, D. Mott, 前之園 信也, “単分散 Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子の生成機構: サイズフォーカシングと表面偏析による自発的層構造形成”, 第 66 回コロイドおよび界面化学討論会, 10-12 Sep 2015, 鹿児島大学, 鹿児島県鹿児島市
- [19] 高橋 麻里, P. Mohan, 中出 暁子, D. Mott, 松村 和明, 濱田 勉, 前之園 信也, “磁気分離とプラズモンイメージングの機能を有した Ag@FeCo@Ag ダブルシェル型ナノ粒子”, *日本化学会第 95 春季年会*, 26-29 Mar 2015, 日本大学理工学部, 千葉県船橋市
- [20] M. Takahashi, R. Rastogi, P. Mohan, D. Mott, and S. Maenosono, “Investigation of the effect of polyol amount on FeCo@Ag magnetic-plasmonic hybrid nanoparticle synthesis”, *The 2014 MRS Fall Meeting*, 30 Nov - 5 Dec 2014, Boston, USA
- [21] R. Rastogi, M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, K. Matsumura, and S. Maenosono, “Targeting of HepG2 cells using lactose modified magneto-plasmonic nanoparticles towards magnetic separation with optical detection”, *The 2014 MRS Fall Meeting*, 30 Nov - 5 Dec 2014, Boston, USA
- [22] R. Rastogi, M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, K. Matsumura, and S. Maenosono, “Surface functionalization of magnetic-plasmonic nanoparticles with poly-L-lysine based polymer for cell targeting and imaging”, *The 2014 MRS Fall Meeting*, 30 Nov - 5 Dec 2014, Boston, USA
- [23] 高橋 麻里, R. Rastogi, 寺坂 慎平, P. Mohan, 武田 裕一, 中出 暁子, D. Mott, 濱田 勉, 松村 和明, 田口 友彦, 前之園 信也, “細胞内小胞の磁気分離に向けた磁性-プラズモンヘテロ構造ナノ粒子の合成及び特性評価”, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 17-18 Nov 2014, タワーホール船堀, 東京都江戸川区
- [24] M. Takahashi, R. Rastogi, S. Terasaka, P. Mohan, Y. Takeda, A. Nakade, D. Mott,

T. Hamada, K. Matsumura, T. Taguchi, and S. Maenosono, "Magnetic-plasmonic Ag@FeCo@Ag double-shell nanoparticles as novel bioprobes", *The 7<sup>th</sup> International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (IWAMSN 2014)*, 2-6 Nov 2014, Halong City, Vietnam

[25] 高橋 麻里, R. Rastogi, 寺坂 慎平, P. Mohan, 中出 暁子, D. Mott, 濱田 勉, 松村 和明, 田口 友彦, 前之園 信也, "細胞小胞のイメージングと単離を目的とした磁性 - プラズモンハイブリッドナノ粒子の合成と特性評価", 第 65 回コロイドおよび界面化学討論会, 3-5 Sep 2014, 東京理科大学, 東京都新宿区

[26] M. Takahashi, R. Rastogi, A. Nakade, D. Mott, K. Matsumura, T. Hamada, T. Taguchi, and S. Maenosono, "Magnetic core-plasmonic shell dual functional nanoparticles as a novel cellular probe for bioapplications", *The 15<sup>th</sup> IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014)*, 24-30 Aug 2014, 福岡大学, 福岡県福岡市

[27] M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, K. Matsumura, A. Nakade, T. Hamada, T. Taguchi, and S. Maenosono, "Magnetic-plasmonic heterostructured nanoparticles as a novel cellular probe for bioapplications", *UK Colloids 2014*, 6-9 Jul 2014, London, UK

[28] M. Takahashi, P. Mohan, D. Mott, K. Matsumura, A. Nakade, T. Hamada, and S. Maenosono, "Magnetic core-plasmonic shell dual functional nanoparticles as a novel cellular probe for bioapplications", *E-MRS 2014 Spring Meeting*, 26-30 May 2014, Lille, France

#### 〔図書〕(計 2 件)

[1] "Magnetic nanoparticles for organelle separation", M. Takahashi and S. Maenosono, *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications 2<sup>nd</sup> Volume*, Edited by Nguyen T. K. Thanh, Chapter 12, CRC Press/Taylor and Francis (2017) in press

[2] "Synthesis and characterization of magnetic-plasmonic hybrid nanoparticles", M. Takahashi, R. Kitaura, P. Mohan and S. Maenosono, *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications*, Edited by Raluca M. Fratila and Jesús M. de la Fuente, Elsevier (2017) in press

#### 〔産業財産権〕

##### 出願状況 (計 2 件)

名 称: 新規なコアシェル型ナノ粒子およびその製造方法  
発明者: 北浦 諒一, 高橋 麻里, 前之園 信也

権利者: 旭化成株式会社  
種 類: 特許  
番 号: 特願 2016-170637  
出願日: 2016 年 9 月 1 日  
国内外の別: 国内

名 称: 金属複合体粒子及びその製造方法  
発明者: 前之園 信也, 高橋 麻里  
権利者: 新日鉄住金化学株式会社  
種 類: 特許  
番 号: 特願 2015-031559  
出願日: 2015 年 2 月 20 日  
国内外の別: 国内

#### 取得状況 (計 0 件)

#### 〔その他〕

- ・高橋 麻里さん: 日本学術振興会 H27 年度特別研究員 D C 1 に採用
- ・高橋 麻里さん: IUMRS-ICA 2014 (2014 年 8 月 24-30 日、福岡) で奨励賞を受賞
- ・高橋 麻里さん: IWAMSN2014 (2014 年 11 月 2-6 日、ベトナム・ハロン市) でベストポスター賞を受賞
- ・高橋 麻里さん: E-MRS 2016 Spring Meeting (2016 年 5 月 2-6 日、フランス・リール) で Young Scientist Award を受賞
- ・北浦 諒一君: 第 67 回コロイドおよび界面化学討論会 国際シンポジウム (2016 年 9 月 22-24 日、旭川) でベストポスター賞を受賞
- ・Priyank Mohan 君: 日本化学会第 97 春季年会 (2017 年 3 月 16-19 日、慶應義塾大学日吉キャンパス) で学生講演賞を受賞

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

前之園 信也 (MAENOSONO SHINYA)  
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授  
研究者番号: 00323535

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

田口 友彦 (TAGUCHI TOMOHIKO)  
東京大学大学院薬学系研究科・准教授

向井 康治朗 (MUKAI KOJIRO)  
東京大学大学院薬学系研究科・助教

高倉 正博 (TAKAKURA MASAHIRO)  
金沢大学附属病院周産母子センター・准教授

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)

福島県立医科大学・解剖/組織学講座・教授

松村 和明 (MATSUMURA KAZUAKI)  
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授