

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「定量的光操作と計測技術を基軸とする
生体深部の細胞応答ダイナミクスの解析」

研究終了報告書

研究期間 2017年 9月～2023年 3月

研究代表者：小澤 岳昌

(東京大学 大学院理学系研究科、
教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究は、生体深部の細胞応答ダイナミクスを解析する革新的技術開発を目的として、遺伝子発現、キナーゼや細胞膜レセプター活性を、近赤外光により定量的に制御する技術開発を第1の目標とした。そして光操作と同時にアウトプットシグナルを、蛍光・発光・ラマン散乱により検出する新たなセンシング技術開発を目的とした。これらの技術を統合して、マウスを対象とした代謝調節と神経幹細胞分化の動的メカニズムの解明を目指し研究を進めてきた。

小澤グループは、化学的シグナル伝達を担う細胞膜レセプターを標的とした光操作ツールとして、肝臓におけるインスリンシグナルを光制御する新規光応答型分子を開発した。代表的な光操作ツールの一つは光応答型インスリン受容体を開発である。青色光照射から3分後にはインスリン受容体が活性化し、さらに10分以内に下流分子のIRS1, Erk, Aktのリン酸化を誘導するツールを開発した。また内在性細胞膜レセプターの制御として、一本鎖抗体分子Nanobodyによる可逆型光機能性抗体および不可逆型光機能性抗体を開発した。また細胞間接着を制御するE-Cadherin 光制御技術(*ACS Chem. Biol.*, (2020))や、GPCRのリサイクリング機構を制御するE-fragment, また情報伝達物質の一つであるPIP3 産生(*Cell Chem. Biol.*, in press)やその下流のAktのアイソフォームを個別に光制御するPA-Akt1,2,3を開発するなど、青色光刺激により高感度にシグナルを制御するツールを開発することに成功した。また今吉グループは、遺伝子発現系の光制御技術の革新を進め(*Cell Rep.*, (2018), *iScience* (2020)), 既存技術を凌駕する特性を有すること、幹細胞の増殖・分化メカニズムの解析に応用可能であることを示した(*Genes Dev.*, (2019)). さらに青色光により遺伝子発現を効率良くオン・オフできる新しいテトラサイクリン誘導系(Tet)システムを世界で初めて開発した。本研究成果によって、幹細胞の細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子のダイナミックな発現パターンを「光」と「薬剤」によって人工的に操作することが可能となった。

これらの開発した光操作ツールを近赤外光で制御するため、アップコンバージョンを利用した実験系を培養細胞レベルで検証した。さらにマウス肝臓に安定してアップコンバージョンナノ粒子を滞留させるための表面修飾法を確立した。マウス個体内での近赤外光を利用したインスリンレセプターの操作を試みたところ、コントロールでも細胞内シグナルが活性化されることが解った。その原因が近赤外光照射による局所温度の上昇であり、40°Cを超える温度の上昇が短時間・長時間いずれもリン酸化レベルを変動させることを明らかにした(*Cells*, (2022)). 一方40°C未満では大きなシグナルの攪乱が起きないことから、近赤外光照射強度・時間制御が重要であることが判明した。平行して新たなナノ粒子開発を進めていたところ、長寿命性発光材料を偶然開発することに成功し、リン光イメージングへの応用可能性を提唱した(*Nature Commun.*, (2022)).

久保田グループは、小澤Gが開発したErkとPIP3産生の光操作モジュールに対する数理モデルの構築を行った。PIP3産生では、5分の繰り返し光刺激によって40分程度まではPIP3量は徐々に増加したが、その後減少に転じること、このPIP3の減少はPTENが存在しないU87細胞では観察されないことなど、応答を再現する微分方程式モデルを作成した。PIP3からPTENへのネガティブフィードバックを導入してモデルを作成したところ、その存在を強く示唆する興味深い結果が得られた。

光操作ツールのマウスへの応用について、榎本グループは、光操作ツールを生体臓器内の特定細胞に発現させるために、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの遺伝子改変およびインジェクション手法の最適化を行い、脳内特定ニューロンへの高効率かつ高選択性を持つ改変AAVベクターを開発した(*Front Cell Neurosci.*, (2020), *Mol. Brain*, (2022)). 今吉グループは、上記遺伝子発現の光制御システムを用いて、マウス成体脳に存在する神経幹細胞におけるbHLH型転写因子の光操作を行い、bHLH型転写因子の発現動態の変化が、成体脳・海馬の神経幹細胞の休眠と活性化状態の制御を担っているという新規知見を得た(*Gene Dev.*, (2019)).

島田グループは、光操作を行ったマウスの肝臓からプローブ標識せずに代謝物を検出する

ため、ラマンエンドスコープシステムを開発した。マウス肝臓の異なる部位からシグナルを抽出した結果、タンパク質、脂質、グリコーゲン、ビタミン A(カロテノイド)などに由来する信号を検出できることを明らかにした。また大規模スペクトルデータの解析法を開発し、複雑なラマンスペクトルパターンから分子由来の定量信号を半自動で抽出することが可能になった。マウス肝臓のインスリンシグナルを光操作した時の代謝物変動をモニターする有力なツールとなることが期待される。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 金属ナノ粒子の生体応用に関連し、水溶液中でも安定してリン光を発する Au(I)-Ag(I)ナノクラスター $[(C)(Au^I-L)_6Ag^I_2]^{4+}$ の細胞イメージングへの応用について詳細に解析した。配位子を変更することで発光特性、細胞内取り込み経路、細胞内局在が制御可能であることを示した。また、リン光シグナルを活用することでバックグラウンドシグナルを抑えたリン光寿命イメージングが可能であることを実証した。これまでの有機蛍光プローブや量子ドットや金属ナノ粒子とは異なる、全く新たな発光イメージング材料として位置づけられ、世界に先駆けて炭素中心金属イオンクラスターの生体分析応用を提唱した意義は極めて大きい。今後プローブ開発において大きな展開が期待できる成果である。本一連の成果は *Nature Commun.* (2022) に報告した。
2. インスリンシグナルに関与するインスリンリセプターや、PIP3 産生 (*Cell Chem. Biol.*, (2022)) やその下流の Akt のアイソフォームを個別に光制御する PA-Akt1,2,3 を開発した。定量的操作を実現しトランスオミクスと組み合わせることで、Akt 依存的なシグナルを明らかにした (*Science Signaling*, (2023))。また遺伝子発現の光操作ツールを開発し (*Cell Rep.*, (2018), *iScience* (2020)), それらを幹細胞の増殖・分化メカニズムの解析に応用可能であることを示した (*Genes Dev.*, (2019))。また各種神経幹細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った (*Genes Dev.*, (2021))。
3. 光操作ツールを生体臓器内の特定細胞に発現させるために、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの遺伝子改変およびインジェクション手法の最適化を行い、脳内特定ニューロンへの高効率かつ高選択性を持つ改変 AAV ベクターを開発した (*Front Cell Neurosci.*, (2020), *Mol Brain*, (2022))。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに遺伝子改変を行うことにより、高い感染特異性および感染効率を持つ新規ベクターの開発を行った。その過程において、マウス嗅覚二次ニューロンを特異的に可視化および操作できる手法(AAV ベクター)の開発に成功した。さらに開発した可視化手法を用いて、マウス嗅覚二次ニューロンの樹状突起の発達様式を詳細に記述した。
2. マウス生体脳などの3次元生体組織や、脳オルガノイドモデルにおいて、高感度深部イメージングを可能にする多光子イメージング技術を開発し、また狙った細胞や細胞集団に多光子レーザーをパターン照射する顕微鏡システムを開発した。本技術は、浜松ホトニクス社によって製品としての設計が進められている。
3. 光操作を行ったマウスの肝臓からプローブ標識せずに代謝物を検出するため、ラマンエンド

スコープシステムを開発した。マウス肝臓の異なる部位からシグナルを抽出した結果、タンパク質、脂質、グリコーゲン、ビタミン A(カロテノイド)などに由来する信号を検出できることを明らかにした。また大規模スペクトルデータの解析法を開発し、複雑なラマンスペクトルパターンから分子由来の定量信号を半自動で抽出することが可能になった。マウス肝臓のみならず様々な臓器の代謝物変動をモニターする有力な計測器となることが期待される。

<代表的な論文>

1. Z. Lei, M. Endo, H. Ube, T. Shiraogawa, P. Zhao, K. Nagata, X.-L. Pei, T. Eguchi, T. Kamachi, M. Ehara*, T. Ozawa* and M. Shionoya*, *N-Heterocyclic carbene-based C-centered Au(I)-Ag(I) clusters with intense phosphorescence and the ligand-specific, organelle-selective translocation in cells. Nature Communications* **13**, 4288 (2022). doi: 10.1038/s41467-022-31891-3
概要: 金属ナノ粒子の生体応用に関連し、水溶液中でも安定してリン光を発する Au(I)-Ag(I)ナノクラスター[(C)(Au^I-L)₆Ag₂]⁴⁺の細胞イメージングへの応用について詳細に解析した。配位子を変更することで発光特性、細胞内取り込み経路、細胞内局在が制御可能であることを示した。また、リン光シグナルを活用することでバックグラウンドシグナルを抑えたリン光寿命イメージングが可能であることを実証した。
2. Y. Ueda, Y. Miura, N. Tomishige, N. Sugimoto, M. Murase, G. Kawamura, N. Sasaki, T. Ishiwata, and T. Ozawa, Mechanistic insights into cancer drug resistance through optogenetic PI3K signaling hyperactivation. *Cell Chemical Biology*, **29**, 1-12 (2022). DOI: 10.1016/j.chembiol.2022.10.002.
概要: 細胞膜上で PIP3 産生を外部光により on/off 制御する可逆性に優れた光操作ツールを開発した。光の強度を変えることで、リガンド刺激で産生される PIP3 量に対して倍以上の PIP3 が産生できることを明らかにした。癌細胞の過剰な PIP3 産生を光操作で創り出し、抗がん剤の耐性メカニズムを解析した。
1. G. Kawamura, T. Kokaji, K. Kawata, Y. Sekine, Y. Suzuki, T. Soga, Y. Ueda, M. Endo, S. Kuroda* and T. Ozawa*, Optogenetic decoding of Akt2-regulated cellular metabolic signaling pathways in skeletal muscle cells using transomics analysis. *Science Signaling*, **16**, eabn0782 (2023). DOI: 10.1126/scisignal.abn0782.
概要: 骨格筋培養細胞をモデルとして、インスリンシグナルにおける Akt の役割を、独自に開発した光活性化型 Akt2 (PA-Akt2)を用いて解明した。トランスクリプトームおよびメタボロームデータを取得しトランスオミクス解析を用いて、Akt2依存的な代謝経路を特定した。Akt2 によりアロステリック制御を介して代謝変化が生じる一方で、一部の代謝反応では Akt2 と他酵素との協調的な働きが必要であることを解明した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①小澤グループ(研究機関別)

研究代表者:小澤 岳昌 (東京大学大学院理学系研究科, 教授)

研究項目

・様々な細胞現象を操作する新規光遺伝学モジュールの作成

②榎本グループ(研究機関別)

主たる共同研究者:榎本 和生 (東京大学大学院理学系研究科, 教授)

研究項目

・新規光遺伝学ツールの個体解析応用

③久保田グループ(研究機関別)

主たる共同研究者:久保田 浩行 (九州大学生体防御医学研究所, 教授)

研究項目

・光刺激と応答を繋ぐ数理モデルの作成

④今吉グループ(研究機関別)

主たる共同研究者:今吉 格 (京都大学大学院生命科学研究科, 教授)

研究項目

・遺伝子発現の光制御システムの開発と神経幹細胞の制御機構の解析

⑤島田グループ(研究機関別)

研究代表者:島田 林太郎 (青山学院大学理工学部, 助教)

研究項目

・生理応答可視化・定量技術の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

アップコンバージョンナノ粒子(UCNP)は、シンガポールの南洋理工大学(NTU)の Bengang XING 教授との共同研究により提供してもらってきた。2020年1月に研究室学生1名が XING lab に1ヶ月滞在し、UCNPの合成技術を学習した。結果、現在は小澤Gで独自にUCNP合成できるようになり、UCNPの実験が今後加速することが期待できる。UCNPを用いたAktの光操作は、北海道大学の尾崎倫孝教授との共同研究で、肝がん細胞でのAkt光制御とシグナル解析に応用されている。さらにGPCRとarrestinとの相互作用を光操作する技術、またその相互作用を発光検出する技術は、Manchester大学のRobert J. Lucas 研やRegensburg大学のG. Bernhardt 研などと精力的に共同研究を行い、論文発表を行ってきた。

今吉Gは、オプトバイオCRESTの小坂田チームとの連携を行っている。深部イメージング技術やパターン照明技術、光源開発に取り組んでおり、本CREST課題と相互に技術の共有を行っている。光操作ツールの開発と応用については同オプトバイオCRESTの柚崎チームと緊密な連携を行っている。さらに、今吉Gは他のCREST領域との連携として多細胞CREST内の、永楽チーム、榎本チーム、新宅チームとの連携を行っている。永楽チーム・永楽Gとは、シングルセルRNAseq解析とフローサイトメーター開発に取り組んでおり、榎本チーム・榎本Gと宮道Gとは、遺伝子改変マウスリソースの開発と共有を行っている。