

小澤 岳昌

東京大学大学院理学系研究科
教授

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

§ 1. 研究成果の概要

2018 年度は新規な生理機能光操作ツールとして、光応答性エンドサイトーシス操作システム (小澤 G), ニューロテンシン受容体の光操作システム (榎本 G) の開発を行った. 光応答性エンドサイトーシス操作システム開発では, 前年度までに構築した GPCR のエンドサイトーシス光誘導ツールの原理を利用し, GPCR の 1 つである V2R の C 末端側領域のペプチド断片 (V2RCT) のみでも細胞内で安定発現し, Arrestin との相互作用を光誘導することでエンドサイトーシスが誘起されることを発見した. またペプチド断片 V2RCT を他の GPCR (ADRA2A, mGluR1a) に付加した融合タンパク質でも, 光照射により融合タンパク質がエンドサイトーシスされる様子が観察された. すなわち, ペプチド断片 V2RCT を用いることで, 様々な GPCR についてエンドサイトーシスを光誘起可能であることを実証した. ニューロテンシン受容体 (NtR) の光操作系 (榎本 G) についても本エンドサイトーシス光操作系を利用して, 光操作型 NtR を作製し, NtR とヘテロダイマーを形成する D2R の膜動態やシグナル伝達制御に関与する仕組みの解明を進めている.

並行して, より生体透過性の高い近赤外光を用いて青色光駆動ツールを操作するため, アップコンバージョンナノ粒子を利用した各種青色光駆動光制御システムの開発を進めている. 2018 年度は, アップコンバージョン粒子を含むコラーゲン基板上で光制御システムを導入した細胞を培養し, 近赤外光レーザー照射下, 各種青色光駆動光制御システムの動作を検証した. その結果, 培養細胞内において近赤外光レーザー照射により, CRY2 をはじめとする青色光駆動光制御システムが期待通りに動作することを確認した. また, 表面修飾したアップコンバージョン粒子をマウス個体に静脈注射し, 各臓器の滞留時間を確認したところ, 肝臓においては導入から 24 時間後でも滞留していることが確認された.

開発を進めている光制御システムを動物個体内で機能させるため, アデノ随伴ウィルスベクター (AAV) の開発 (榎本 G) やマウス門脈からのインスリン刺激系 (久保田 G) の構築を進めている. AAV 開発では, AAV2 のキャプシド構造に点変異を加えることにより, オリジナルよりも約 10 倍の

感染効率をもつ AAV2-Retro を開発した。インスリン刺激系構築では、小澤 G の光操作技術によって減少すると考えられる血糖値降下に対処するためのグルコースクランプの実験系を基に、実験系を立ち上げた。今後、小澤 G が作成するインスリンシグナル伝達経路の光操作ツールと比較することで光操作ツールの評価を行う。また、数理モデルを作成することで、インスリンシグナル伝達経路の活性がどのように糖代謝などを制御しているかの検討を開始した。

また、今吉 G では哺乳類モデルで最も広範に使用されている Tet システムの光制御化に成功し (代表的な原著論文 1)、さらに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 (代表的な原著論文 2)。

生物個体内での生理応答可視化・定量技術として、小澤 G にて蛍光ラマンハイブリッド顕微鏡・内視鏡の構築を進めている。2018 年度は選定購入したコンポーネントを自前で組み立てることで、超高感度 1064 nm 励起顕微ラマン分光計のプロトタイプを構築し、その性能評価を行った。その結果、有機溶媒(エタノール)試料からわずか 1 秒の計測時間で良好なラマン信号取得できるまでに至った。次に生体試料のラマン計測を行い、生体分子(主にタンパク質)に由来する信号を数分の計測時間で取得が可能であることを確認した。顕微鏡プロトタイプの構築と並行し、内視鏡プロトタイプの構築に向けて内視鏡ファイバーの選定購入を行った。次年度以降の内視鏡によるラマン信号取得の準備として、内視鏡へのレーザー導入や、内視鏡で集光した信号の分光器への導入など基礎的な技術を確認した。

【代表的な原著論文】

1. Yamada, M., Suzuki, Y., Nagasaki, S., Okuno, H. and Imayoshi, I. Light-inducible Tet-gene expression system in mammalian cells. *Cell Reports*, 25, 487-500 (2018).
2. Sueda, R., Imayoshi, I. (equal contribution), Harima, Y., and *Kageyama, R. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. *Genes Dev*, in press (2019).
3. Noda, N. and Ozawa, T., Light-controllable Transcription System by Nucleocytoplasmic Shuttling of a Truncated Phytochrome B. *Photochem. Photobiol.*, 94, 1071-1076 (2018).

§ 2. 研究実施体制

(1) 小澤グループ

- ① 研究代表者: 小澤 岳昌 (東京大学大学院理学系研究科、教授)
- ② 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

- ① 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)
- ② 研究項目
 - ・新規光遺伝学ツールの個体解析応用

(2) 久保田グループ

- ① 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)
- ② 研究項目
 - ・光刺激と応答を繋ぐ数理モデルの作成

(2) 今吉グループ

- ① 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)
- ② 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