

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

2019 年度は生理機能光操作ツールとして、化学的・物理的シグナル伝達を担う受容体タンパク質の光操作システム(小澤G・榎本G)の開発、およびマウス個体における光操作ツールを用いた実験系の構築準備(小澤G・榎本G・久保田G・今吉G)を進めた。

生理機能光操作ツールについて、光応答型インスリン受容体タンパク質を開発した(小澤G)。光照射に伴い、インスリン受容体タンパク質が活性化され、シグナル下流タンパク質をリン酸化することでシグナル経路が活性化されることを確認した。一方、前年度から開発を進めているGPCRをはじめとする細胞膜タンパク質の細胞内取り込み(エンドサイトーシス)を光誘導する E-fragment を活用したシステムについて、適用できるタンパク質をさらに検討した。今年度は様々な GPCR (ADRA2A, dOR, DRD2, mGluR1)やイオンチャネルをはじめとした GPCR 以外の膜タンパク質 (TRPV2, Stargazin)について、光照射依存的なエンドサイトーシスの誘導を確認した。特に DRD2 については榎本Gと共同してトランスジェニックマウスの作成を開始した。その他のタンパク質についても領域内の他研究室との共同研究を進めている。また、物理的シグナル伝達としては細胞間張力伝達を担うタンパク質であるカドヘリンを改変した、光切断型カドヘリンを開発した(小澤G)。光切断型カドヘリンを発現する細胞に光を照射することで、細胞間張力伝達が解消されることを実証した。また、これまでに開発した光応答型 Akt をはじめとする光応答型分子を活用し、シグナル経路を定量的に光操作するシステムの構築を進めた(小澤G・久保田G)。

これらのツールの生体応用を志向し、改変型 AAV ベクターを開発した(榎本 G)。肝臓においてインフェクションから 2 日後に GFP の発現を確認し、光操作ツールの発現についても確認を進めている。一方で、光操作ツールを駆動する光刺激の生体透過性を確保するため、近赤外光を青色光に変換するアップコンバージョンナノ粒子の生体内分布を詳細に解析した(小澤G)。ナノ粒子を導入したマウス肝臓を透明化し、ライトシート顕微鏡や共焦点顕微鏡により肝臓に蓄積したナノ粒子を可視化した。その結果、血管構造に関わらず肝臓全体に蓄積すること、導入してから 1 日

間は安定に肝臓に蓄積し、肺には蓄積しないことが明らかとなった。また、久保田Gではマウスの門脈からのインスリン刺激を行う系を確立した。本実験系を用いることで、小澤 G が作成する光操作ツールが、どの程度内在性のインスリン応答を再現できるかどうかを評価することができる。さらにこの系を拡張させ、食餌性肥満誘導マウスにおいても同様な実験が行えるかどうかの検討を始めた。これらの成果から今後、小澤 G の光操作ツールを用いて肥満マウスにおけるインスリンシグナル伝達経路の変容の検討を行うことができる。今吉Gでは、生後脳・成体脳における神経幹細胞の制御メカニズムと人工的操作を実施するため、遺伝子発現の光制御システムを中心に光操作ツールの開発を行ってきた。本年度は、それらをモデル動物の生体脳で使用するための遺伝子改変モデルの構築や、光操作プロトコルの検証を行った。特に、成体脳・海馬に存在する、休眠状態の神経幹細胞に適用することに成功し、神経幹細胞の制御メカニズムの一端が明らかになった。

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。2019 年度は内視鏡プロトタイプ構築を行った。内視鏡ファイバーを 2018 年度に構築したラマン顕微鏡プロトタイプに組み込み、レーザー、分光器、近赤外光検出器を共用するわせることで超高感度 1064 nm 励起内視鏡ラマン分光計のプロトタイプを構築した。本システムを活用することで、肝臓サンプルからタンパク質、脂質、糖をはじめとする様々な生体分子のシグナルを検出可能であることが明らかとなった。

【代表的な原著論文】

Photocleavable Cadherin Inhibits Cell-to-cell Mechanotransduction by Light. M. Endo, T. Iwawaki, H. Yoshimura, and T. Ozawa, *ACS Chem. Biol.*, 14, 2206–2214 (2019).

Parallelized shifted-excitation Raman difference spectroscopy for fluorescence rejection in a temporary varying system. R. Shimada, T. Nakamura and T. Ozawa, *J. Biophotonics*, 12, e201960028 (2019).

High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. R. Sueda, I. Imayoshi, (equal contribution), Y. Harima and R. Kageyama, *Genes Dev*, 33, 511–523 (2019).

§ 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