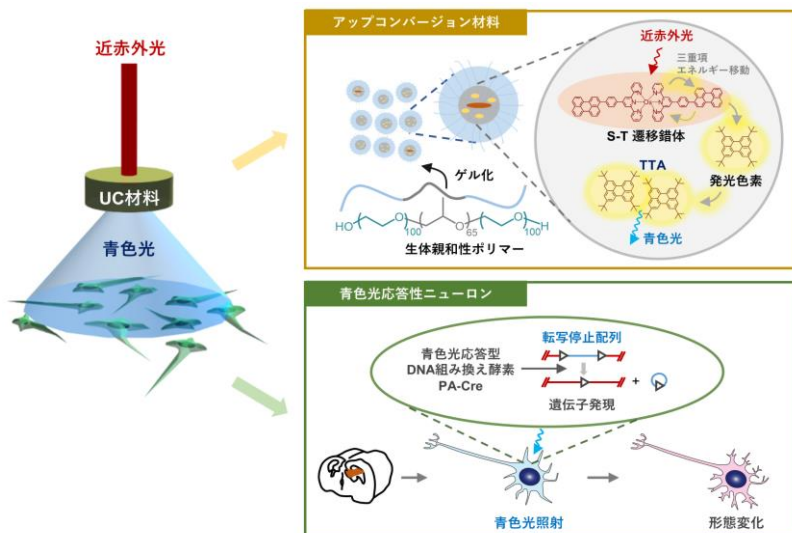


## 近赤外光で脳神経細胞の遺伝子进行操作するアップコンバージョン分子技術の開発に成功 ～生体深部におけるオプトジェネティクスと高次脳機能の解明に道～

感情と行動の関係性など高次脳機能の仕組みを解くために、生体透過性の高い近赤外光（低いエネルギーを持つ光）を青色光（高いエネルギーを持つ光）にフォトン・アップコンバージョン（UC）\*<sup>1</sup> させ、生体深部で遺伝子操作できる技術の開発が期待されています。特に、三重項—三重項消滅（TTA）\*<sup>2,3</sup> と呼ばれる分子間の三重項エネルギー移動\*<sup>4</sup> に基づく TTA-UC 機構は、比較的弱い光でも駆動しうるため生体を傷つけずに遺伝子操作できるという利点がありますが、これまで水中において近赤外光を青色光に変換するための有効な方法論がありませんでした。

今回、九州大学大学院工学研究院（佐々木陽一大学院生、楊井伸浩准教授、君塚信夫教授）と東京医科歯科大学統合研究機構（押川未央共同研究員、味岡逸樹准教授）の研究グループは、東京大学の佐藤守俊教授、群馬大学の林（高木）朗子教授らとの共同研究により、水中で近赤外光から青色光へ TTA-UC を示すヒドロゲルの開発に初めて成功しました。九州大学のグループが近年開発した基底—三重項状態から励起三重項状態への直接遷移（S-T 吸収）を経る三重項増感法を基盤とし、三重項増感剤に適切なアクセプター分子を連結する分子設計に基づいて励起三重項を長寿命化した結果、粘度の高いヒドロゲル中において近赤外—青 TTA-UC を初めて実現しました。さらに、発生した青色光をオプトジェネティクス\*<sup>5</sup> へと応用することによって遺伝子機能を時空間的に操作し、神経細胞の形態を制御することにも成功しました。今回新たに開発したアップコンバージョン分子技術を発展させ、生体（ネズミやサルなどの動物個体）脳深部の神経細胞を遺伝子操作することによって、高次脳機能の解明への貢献が期待されます。

本研究成果は、2019年9月23日（月）にドイツの国際学術誌「Angewandte Chemie International Edition」にオンライン掲載されました。なお本研究は JST さきがけ「分子技術と新機能創出」（JPMJPR14KE, JPMJPR14K1）、日本学術振興会科学研究費（JP25220805, JP17H04799, JP16H06513, JP16H00844）、旭硝子財団からの支援により行われました。



(参考図) 本研究で実現した近赤外光による神経細胞の遺伝子操作

### 研究者からひとこと：

本研究は、JST さきがけ「分子技術と新機能創出」において材料化学者である楊井と神経生物学者である味岡が出会ったことがきっかけで開始しました。異分野間での共同研究を行う事で、これまで例のないアップコンバージョン材料の開発と応用に成功しました。今後は、アップコンバージョンの更なる高効率化と生体への適用を並行して進め、高次脳機能の解明に貢献する分子技術の構築を目指します。

【お問い合わせ】 大学院工学研究院 准教授 楊井 伸浩

TEL:092-802-2836

Mail:yanai@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

## ■研究背景

フォトン・アップコンバージョン (UC) とは、低いエネルギーの光を高いエネルギーの光に変換する現象です (図 1a)。これまで有効に活用できなかった近赤外光を有用な高いエネルギーの青色光に変換することで、エネルギー分野 (光触媒、太陽電池) やバイオ分野 (光線力学療法、オプトジェネティクス) が直面している波長の制約を克服できると考えられており、世界中で活発な研究がおこなわれています。

特に、有機分子の三重項-三重項消滅に基づく UC (TTA-UC) は、他の UC 機構よりも弱い光で変換が可能であるという点でより実用的な材料といえます。九州大学の楊井・君塚グループは近年、基底一重項状態から励起三重項状態への直接遷移 (S-T 吸収) を示す金属錯体を三重項増感剤 (ドナー分子) として用いることで、バイオ分野への応用に必要な近赤外-青 TTA-UC を可能にしました (図 1b)。しかしながら、三重項増感剤の励起状態の寿命が短いため、ヒドロゲルのような粘度が高く分子拡散が抑制される環境では三重項エネルギーを発光色素 (アクセプター分子) に受け渡す前に失活してしまい、TTA-UC を起こすことは困難でした。

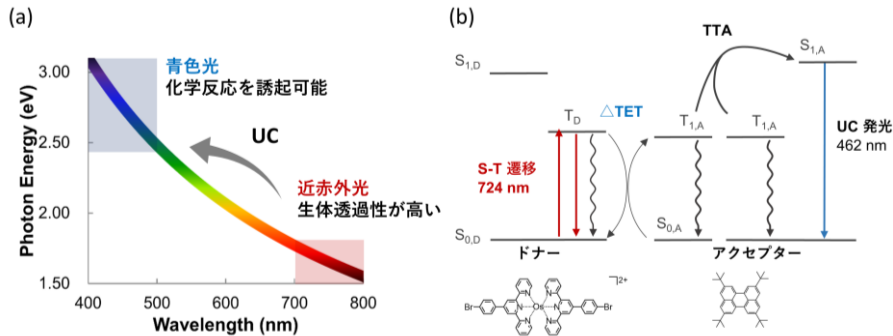


図 1. (a) 近赤外-青 フォトン・アップコンバージョンのイメージ図と (b) S-T 吸収を用いた近赤外-青 TTA-UC のエネルギーダイアグラム

## ■内容

そこで本研究では、S-T 吸収を示すドナー分子にアクセプター分子を連結させ、より励起寿命の長いアクセプター部位に励起エネルギーを溜めることにより、従来より 120 倍も長寿命な三重項励起状態を達成しました (図 2a)。これにより粘度の高いヒドロゲル中においても三重項エネルギーを発光色素に受け渡し、アップコンバージョン出来ることが分かりました。また、TTA-UC に必要な三重項励起状態は通常水中に溶存する酸素により容易に失活してしましますが、加熱処理によりゲルを構成するミセルの集合状態を変化させて酸素の侵入を阻害することにより、空気中においても TTA-UC 発光を示すヒドロゲルの開発に成功しました (図 2b)。青色光に反応して細胞の形を操作できる遺伝子を神経細胞に導入し、その神経細胞を播種したシャーレに UC 材料を浸漬して波長 724 nm の近赤外光を照射したところ、発生した青色 UC 発光により神経細胞の形態を制御できることが確認されました (図 2c,d)。

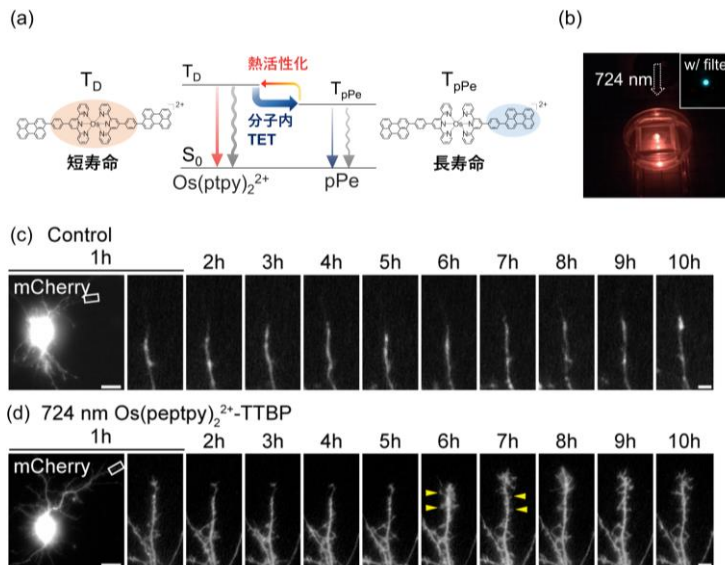


図 2. (a) S-T 吸収錯体とアクセプターの連結による励起三重項の長寿命化、(b) 神経細胞の近赤外光による形態制御実験の様子と励起光カットフィルターを通して確認された青色 UC 発光、(c) UC 照射なしおよび (d) UC 照射ありでの神経細胞の形態観察

## ■効果・今後の展開

本研究では水中で近赤外—青 TTA-UC を示すヒドロゲルを初めて開発し、また TTA-UC のオプトジェネティクスへの応用にも初めて成功しました。生体透過性の高い近赤外光を用いて生体深部における神経細胞の光制御を可能にすることで、高次脳機能の解明に貢献する分子技術の実現に繋がると期待されます。今後は水中においてより低い励起光強度で高い TTA-UC 効率を示す材料を開発し、生体深部でのオプトジェネティクスを可能にするを通じ、汎用的な「生体内光源」の確立を目指します。

## ■論文情報

題目 : Near-infrared optogenetic genome engineering based on photon upconversion hydrogels (フォトン・アップコンバージョンヒドロゲルに基づく近赤外光による光遺伝学操作)

著者 : Yoichi Sasaki, Mio Oshikawa, Pankaj Bharmoria, Hironori Kouno, Akiko Hayashi-Takagi, Moritoshi Sato, Itsuki Ajioka,\* Nobuhiro Yanai,\* and Nobuo Kimizuka\* (佐々木陽一、押川未央、パンカジ・バルモリア、河野宏徳、林(高木)朗子、佐藤守俊、味岡逸樹、楊井伸浩、君塚信夫)

雑誌名 : *Angewandte Chemie International Edition* (出版社 Wiley-VCH)

DOI : 10.1002/ange.201911025

## ■用語解説

\* 1) フォトン・アップコンバージョン (photon upconversion, UC)

低いエネルギーを持つ光を高いエネルギーを持つ光に変換する現象です。古典的には、第二次・第三次高調波発生、多光子吸収などの非線形光学現象が用いられてきました。近年では希土類元素の多段階励起も多く報告されていますが、高強度の光が必要となるため、適応範囲が限られています。そこで近年、太陽光程度の弱い光でも駆動する三重項—三重項消滅 (TTA) に基づく UC 機構が注目を集めています。

\* 2) 三重項

分子の状態の一つで、スピン多重度  $2S+1=3$  となるような、スピン量子数  $S=1$  の状態 (基底状態と励起状態の電子スピン状態が平行な状態、図 3) を指します。励起三重項状態 ( $T_1$ ) から基底一重項状態 ( $S_0$ ) への失活はスピン禁制遷移であるためとても遅く、近くの分子にエネルギーを受け渡すことができます。

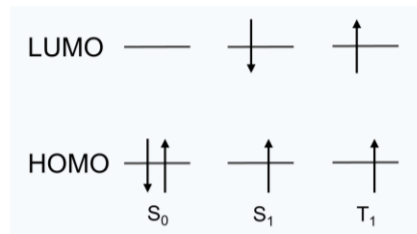


図 3. 基底一重項状態 ( $S_0$ )、励起一重項状態 ( $S_1$ )、励起三重項状態 ( $T_1$ ) の電子配置

\* 3) 三重項—三重項消滅 (triplet-triplet annihilation, TTA)

二つの励起三重項状態 ( $T_1$ ) の分子が衝突することで、一方のエネルギーが他方に移り、エネルギー的により高い励起状態が生成する過程を指します。ここで、 $T_1$  の分子二つの持つエネルギーが一つの分子の励起一重項状態 ( $S_1$ ) の持つエネルギーより大きいとき ( $2 \times E_{T_1} > E_{S_1}$ )、TTA を経た後に  $S_1$  の一分子が効率よく生成されます。

TTA を起こす発光色素 (アクセプター分子) と  $T_1$  を効率的に生成する増感剤 (ドナー分子) を組み合わせ、フォトン・アップコンバージョンを起こす方法が TTA-UC と呼ばれています。一般的な TTA-UC では、まずドナー分子が光を吸収し、項間交差 (intersystem crossing, ISC) を経て、 $T_1$  を生成します。その後、ドナーからアクセプターへの三重項エネルギー移動 (triplet energy transfer, TET) により、アクセプターの  $T_1$  が生成されます。二分子のアクセプター  $T_1$  が拡散・衝突して TTA を起こすことで、ドナー  $S_1$  より高いエネルギーを持つアクセプター  $S_1$  が生じ、UC 発光が得られます (図 4)。しかし、このメカニズムでは系間交差により多くのエネルギー (数百 meV) が失われるため、近赤外光を可視光に変換することが困難でした。そこで九

州大学の楊井・君塚グループは、基底状態から励起三重項状態への直接遷移である S-T 吸収を利用することにより、系間交差によるエネルギーロスを回避し、近赤外光から青色光への TTA-UC を実現しました(図 1b)。

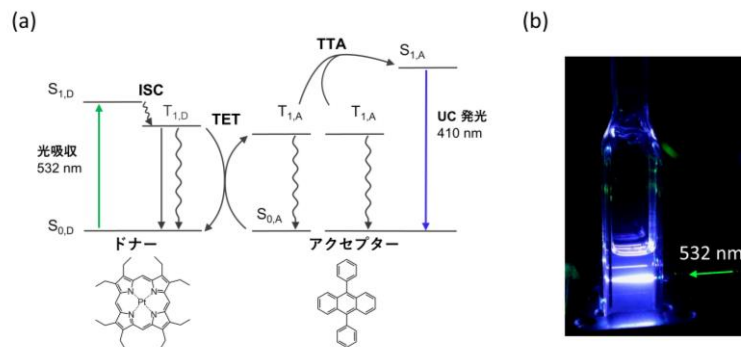


図 4. (a) ISC を経由する一般的な TTA-UC のメカニズムおよび (b) 白金オクタエチルポルフィリンと 9,10-ジフェニルアントラセン 溶液の緑→青 TTA-UC の様子

\* 4) 三重項エネルギー移動 (triplet energy transfer, TET)

三重項状態の分子が他の分子と衝突・近接 (<1 nm) した際に電子交換に基づいてエネルギーが移動する現象を指します。

\* 5) オプトジェネティクス (Optogenetics)

可視光によって活性化されるタンパク質をコードする遺伝子を特定の細胞に発現させ、そのタンパク質機能を光で制御する技術を指します。



佐々木陽一 大学院生



楊井伸浩 准教授



君塚信夫 教授



味岡逸樹 准教授

■ 問い合わせ先

<研究に関すること>

君塚 信夫(キミヅカ ノブオ)

九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門/ 分子システム科学センター(CMS)主幹教授

TEL:092-802-2832 FAX:092-802-2838

Mail:n-kimi@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

楊井 伸浩(ヤナイ ノブヒロ)

九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門/ 分子システム科学センター(CMS) 准教授

TEL:092-802-2836 FAX:092-802-2838

Mail:yanai@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

味岡 逸樹(アジオカ イツキ)

東京医科歯科大学 統合研究機構 先端医歯工学創成研究部門

脳統合機能研究センター 准教授

TEL:03-5803-4972 FAX:03-5803-4716

Mail:iajioka.cbir@tmd.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報室

TEL:092-802-2130 FAX:092-802-2139

Mail:koho@jimu.kyushu-u.ac.jp

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

Mail:kouhou.adm@tmd.ac.jp