

Title	磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を使用した無傷のリソソームの迅速かつ穏やかな分離
Author(s)	LE, THE SON
Citation	
Issue Date	2022-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/18150
Rights	
Description	Supervisor:前之園 信也, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	LE, Son The		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 551 号		
学位授与年月日	令和 4 年 9 月 22 日		
論文題目	Quick and Mild Isolation of Intact Lysosomes using Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoparticles		
論文審査委員	主査	前之園 信也	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		高村 禪	同 教授
		松村 和明	同 教授
		平塚 祐一	同 准教授
		田口 友彦	東北大学大学院 生命科学研究所 教授

論文の内容の要旨

Since their discovery by Christian de Duve in the 1950s, the role of lysosomes in cellular function has been explored extensively, which led to the change of the view of lysosomes from a static digestive system to the dynamic regulator of cellular metabolism. As indicated in various studies, lysosomal dysfunctions are found to be linked with the group of metabolic disorders known as lysosomal storage diseases. Therefore, understanding lysosomal biology in both normal and pathogenic conditions is crucial to figuring out the mechanistic insights of lysosomal activity, to facilitate diagnostic methods or establish a new therapeutic strategy.

The rapid and efficient isolation of lysosomes is a prerequisite to identify lysosomal protein composition, using proteomic analysis to reveal their involvement in cellular functions or disease progression. So far, several strategies have been developed to isolate lysosomes, including density-gradient centrifugation, immunoaffinity purification, and magnetic nanoparticle-based fractionation. Among these approaches, a nanoparticle-based method that delivers magnetic nanoparticles to the lumen of lysosomes, through an endocytic pathway, followed by a separation process, using a magnetic column, has been proven to be able to isolate lysosomes with the highest yield and purity, while efficiently preserving their integrity. The traditional magnetic probes, such as superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), require surface modification by fluorescent dyes to enable the investigation of their intracellular trafficking, which has some disadvantages, including the possible alternation of their bio-interaction, and the instability of fluorescence properties in the lysosomal environment.

In this thesis, we have focused on developing a multifunctional magnetic probe with intrinsic imaging capabilities for tracking the intracellular transport of nanoparticles to lysosomes through endocytic pathways before performing magnetic separation. Notably, the kinetic transport is an important parameter that strongly affect the yield and purity of isolated fraction. In addition, we established the protocol to isolation of lysosomes as intact as possible.

Firstly, the magnetic-plasmonic AgFeCoAg nanoparticles (MPNPs) were prepared using polyol method. The obtained MPNPs was then undergone the encapsulation in phospholipid micelles, followed by the conjugation of amino dextran (aDxt) for targeting lysosomes. The hydrodynamic size of particles after encapsulation and conjugation process are 33.9 ± 2.6 nm and 52.4 ± 7.8 nm, respectively. The zeta potential was positive charge after conjugating aDxt. We observed that the dispersion of aDxt-MPNPs in culture medium, DMEM (+10% FBS), would suppress the cytotoxicity of nanoparticles, cell viability was above 70% even after 24 h incubation with nanoparticle concentration, CNPS = 100 μ g/mL. Furthermore, the aDxt-MPNPs was also highly stable in culture medium which was very important to maintain the particle uptake. The number of aDxt-MPNPs internalized was almost double when extending the loading time from 1 h to 8 h.

Next, the intracellular trafficking of aDxt-MPNPs to a cell model (COS-1 cells) was investigated using the pulse-chase experiment and colocalization analysis. The colocalization between nanoparticle and organelles was determined by Manders' coefficient (R_1). As the result, the time-lapse colocalization of aDxt-MPNPs and early endosomes (EE), late

endosomes (LE) and lysosomes (L) were constructed, which indicated that the aDxt-MPNPs arrived at lysosomes after a chasing period of 7 h. Furthermore, a simple mathematic model based on stretch exponential functions has been established to derive time constant that represented the speed with which nanoparticles were transported to EE, LE and L. Finally, TEM and EDS analysis of aDxt-MPNPs-treated COS-1 cells after 1 h loading and 7 h chase was performed to confirm the result of colocalization analysis.

Finally, after understanding the transport kinetics of aDxt-MPNPs to lysosomes in the cell model. Cells were completely homogenized using syringe with 23G needle after 15 passages, which was confirmed by the bright-field microscope. Subsequently, lysosomes were isolated using a magnetic column. The integrity was qualitatively screened by confocal laser scanning microscopy (CLSM), while the Western blot results confirmed the high purity of the isolated fraction. Additionally, it is concluded that to isolate lysosomes as intact as possible, the lysosomes should be isolated within 30 min after homogenization at 4°C. Furthermore, our established protocol was demonstrated to be superior to the density gradient centrifugation method (DGC) in term of number of starting materials, isolation yield, purity, and time. Lysosomes were also isolated from HEK293 cells to confirm the versatility of the established methods.

Keywords: *magnetic isolation, lysosomes, intracellular trafficking, bioimaging, nanoparticles*

論文審査の結果の要旨

本博士学位論文は、リソソームの高純度磁気単離を目的として、優れた磁気特性を持つ鉄コバルト合金 (FeCo) と高いプラズモン散乱特性を持つ銀 (Ag) をナノレベルで複合化した Ag@FeCo@Ag コア@シェル @シェル型磁性-プラズモン複合ナノ粒子 (MPNPs) を化学合成し、この MPNPs をリン脂質でカプセル化した後アミノデキストラン (aDxt) で修飾した aDxt-MPNPs を創製と、aDxt-MPNPs を用いた培養哺乳動物細胞からのリソソームの迅速かつ高純度磁気単離に関するものである。

リソソームはタンパク質、炭水化物、脂質、ヌクレオチドなどの高分子の分解と再利用に主要な役割を果たす。これらの機能に加えて、最近の発見では、リソソームがアミノ酸シグナル伝達にも関与していることがわかってきている。リソソーム機能障害に由来する疾患 (リソソーム病) も数多く存在する。そのため、リソソームの機能をより深く理解することは基礎生物学においても医学においても重要な課題である。また、リソソームの代謝物の探索は、近年急速に関心が高まっている研究分野である。たとえば、飢餓状態と栄養が豊富な状態でリソソームの代謝物を研究することにより、アミノ酸の流出が V-ATPase および mTOR に依存することが示された (M. Abu-Remaileh *et al.*, *Science*, 358, 807, 2017)。このように、外部刺激に応答したリソソームの動的な性質を調べるためには、リソソームを細胞内の状態を維持したまま迅速かつ高純度に分離する必要がある。しかし、最も一般的な単離法である密度勾配遠心分離法では、長時間の遠心分離が必要なため、その間に表在性タンパク質がリソソーム膜から脱離したり、膜の損傷によりリソソーム内腔からタンパク質が漏出したりする問題がある。また、リソソームとほぼ同じ大きさや比重を持つ他のオルガネラ (エンドソームなど) が不純物として必ず混入する。これらはリソソーム構成分子の正確な同定を妨げる忌々しき問題である。

そこで LE 氏は、無傷のリソソームを高純度に分離する新たな単離法として、aDxt-MPNPs をエンドサイトーシス経路を介してリソソームの内腔に集積した後、細胞膜を温和に破碎し、リソソームを磁気分離するという手法を開発した。リソソームを可能な限り無傷で高純度で分離するには、細胞破碎後 30 分以内に低温環境で磁気分離する必要があることもわかった。これらの条件を満たすことは超遠心分離法では原理的に困難であり、エンドサイトーシスという細胞の営みを利用して人為的にリソソームを帯磁させて迅速かつ温和に単離する本手法の優位性が明らかとなった (T. S. Le *et al.*, *ACS Nano*, 16, 885, 2022)。

本論文の成果は、バイオ医療分野での応用が大いに期待できる次世代多機能磁気ビーズの実現に向けて新た

な可能性を示しただけでなく、幅広い関連分野において学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。