

Title	アップコンバージョンナノ粒子を用いた双安定型オプシン OPN5の近赤外光による制御
Author(s)	小手川, 福笑
Citation	
Issue Date	2026-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="https://hdl.handle.net/10119/20607">https://hdl.handle.net/10119/20607</a>
Rights	
Description	Supervisor: 前之園 信也, 先端科学技術研究科, 博士

# 博士論文

アップコンバージョンナノ粒子を用いた  
双安定型オプシン OPN5 の近赤外光による制御

小手川 福笑

主指導教員 前之園 信也

北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術専攻

[マテリアルサイエンス]

令和8年3月

## Abstract

Optogenetics enables precise regulation of cellular functions through the genetic introduction of light-responsive proteins and optical stimulation. Conventional optogenetic approaches predominantly rely on ultraviolet (UV) or visible light, which suffer from limited tissue penetration and high phototoxicity, thereby restricting non-invasive and deep-tissue applications. Upconversion nanoparticles (UCNPs), capable of converting near-infrared (NIR) light into higher-energy UV and visible emission, provide a promising strategy to overcome these limitations by exploiting the superior tissue penetration and low phototoxicity of NIR light.

In addition to microbial opsins that function as light-gated ion channels, G protein-coupled receptor (GPCR)-type opsins offer an attractive alternative because they activate intracellular signaling cascades via G proteins, enabling signal amplification and highly sensitive cellular responses. Among GPCR-type opsins, bistable opsins are particularly attractive because they can be reversibly switched between active and inactive states by different wavelengths of light. However, their application in combination with UCNPs remains challenging. In particular, for the bistable opsin neuropsin (OPN5), both the activation and inactivation wavelengths overlap with the emission bands of commonly used UV-emitting UCNPs, raising a fundamental question as to whether selective and reproducible optical control is achievable using UCNP-mediated NIR excitation. The objective of this dissertation is to investigate whether UCNP-mediated NIR excitation can enable effective optical control of OPN5 despite this spectral overlap, by systematically examining UCNP design, cell-surface targeting strategies, and optogenetic responses.

In Chapter 2, the formation mechanism and optical properties of NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm-based UCNPs are investigated, with particular attention to the  $\alpha$ - $\beta$  phase transition, self-focusing growth during Ostwald ripening, and size-dependent luminescence behavior. UV-emitting UCNPs suffer from nonradiative relaxation via lattice phonons and surface defects, particularly affecting high-energy excited states such as the Tm<sup>3+</sup> <sup>1</sup>D<sub>2</sub> level. To address this limitation, core-shell UCNP architectures are designed to suppress surface quenching and enhance UV emission, demonstrating that highly crystalline  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> UCNPs with appropriate particle size are essential for OPN5-based optogenetic applications.

In Chapter 3, a strategy to selectively target UCNPs to the cell surface of OPN5-expressing cells (OPN5-HEK) is established. UCNPs are rendered water-dispersible by encapsulation with biotinylated phospholipids while retaining stable emission properties and low cytotoxicity. An OPN5 expression construct is designed and constructed to present a FLAG tag on the extracellular domain using a Snorkel system, enabling specific cell-surface targeting. Biotin-functionalized UCNPs are then bound to OPN5-HEK via biotin-avidin interactions, allowing efficient local photon delivery to membrane-localized OPN5.

In Chapter 4, the photoreaction properties of OPN5 are evaluated using Ca<sup>2+</sup> imaging. Despite the spectral overlap between UCNP emission and both activation and inactivation wavelengths, NIR irradiation induces Ca<sup>2+</sup> responses when UCNPs are targeted to OPN5, and kinetic analysis reveals distinct response patterns across experimental conditions, suggesting enhanced activation efficiency through spatial localization of UCNPs.

Finally, Chapter 5 summarizes the overall findings and discusses future perspectives for UCNP-based optogenetics. In conclusion, this dissertation demonstrates that bistable opsin signaling can be modulated using UCNP-mediated NIR excitation even in spectrally challenging systems such as OPN5, and suggests a viable approach toward non-invasive optogenetic control of GPCR-type bistable opsins through integrated nanoparticle, opsin, and spatial design.

**Keywords:** *optogenetics; upconversion nanoparticles; bistable opsin; OPN5; near-infrared light; Ca<sup>2+</sup> imaging*

# 目次

第1章 緒論	1
1.1 微生物型オプシンを基盤とする光遺伝学の発展	1
1.1.1 光遺伝学の誕生と技術的背景	1
1.1.2 微生物型オプシンの構造と光反応機構	2
1.1.3 微生物型オプシンの応用と光遺伝学ツールの発展	3
1.2 動物型オプシンとその多様性	4
1.2.1 動物型オプシンの分類と光応答の多様性	4
1.2.2 GPCR 型オプシンの分類とシグナル作動機構	5
1.2.3 GPCR 型オプシンの光化学的特性：退色型と双安定型	6
1.2.4 主な双安定型オプシンとその生理機能	7
1.3 アップコンバージョンナノ粒子の概要	7
1.3.1 アップコンバージョン発光現象の発見と アップコンバージョンナノ粒子研究の発展	7
1.3.1.1 アップコンバージョン発光の発見と基礎原理	7
1.3.1.2 NaYF <sub>4</sub> ホストの確立とアップコンバージョン材料研究の発展	10
1.3.1.3 アップコンバージョンナノ粒子合成方法の確立	10
1.3.2 アップコンバージョンナノ粒子の様々なバイオ応用	11
1.3.2.1 バイオイメーjing	11
1.3.2.2 バイオセンシング	12
1.3.2.3 治療	13
1.3.2.4 薬剤送達・放出制御	14
1.4 アップコンバージョンナノ粒子の光遺伝学的応用	15
1.4.1 アップコンバージョンナノ粒子を利用した光遺伝学の既存研究	15
1.4.1.1 <i>In vitro</i> 神経細胞での ChR2 制御	16
1.4.1.2 <i>In vivo</i> 深部神経回路の光制御	16
1.4.1.3 筋細胞・心筋における ChR 依存的収縮制御	17
1.4.1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> での行動制御	18
1.4.1.5 非興奮性系における遺伝子発現型光遺伝学	19
1.4.2 UCNPs による双安定オプシン制御の課題	20
1.5 研究の目的	20
1.6 参考文献	23

第2章 アップコンバージョンナノ粒子の生成機構 .....	32
2.1 緒言 .....	32
2.2 アップコンバージョンナノ粒子の合成.....	32
2.2.1 試薬及び評価装置.....	32
2.2.2. NaYF <sub>4</sub> :Yb,Tm コアアップコンバージョンナノ粒子の合成方法 .....	33
2.2.3. NaYF <sub>4</sub> :Yb,Tm@NaLuF <sub>4</sub> コア-シェル型アップコンバージョンナノ粒子の 合成方法.....	34
2.3 NaYF <sub>4</sub> :Yb,Tm の反応時間による粒子形成の比較 .....	35
2.3.1 透過型電子顕微鏡による観察と粒径分布.....	35
2.3.2 光学特性評価.....	36
2.4 UCNPs の生成機構 .....	36
2.4.1 $\alpha$ -NaYF <sub>4</sub> の生成とオストワルド熟成を介した $\beta$ 相への相転移.....	36
2.4.2 相転移に伴う self-focusing.....	38
2.4.3 配位子による $\alpha$ 相粒子の安定化と $\beta$ 相転移の制御.....	39
2.5 考察 .....	40
2.5.1 粒子サイズの制御について.....	40
2.5.2 $\alpha$ 相が残存する原因の考察.....	41
2.5.2.1 本研究系における $\alpha$ 相残存の背景.....	41
2.5.2.2 XRD による $\alpha$ 相残存粒子の結晶相評価 .....	41
2.5.2.3 サンプリングによる $\alpha \rightarrow \beta$ 相転移過程の観察.....	43
2.5.2.4 初期 $\alpha$ 相粒径分布が $\beta$ 相転移に及ぼす動力的影響.....	44
2.5.2.5 Yb <sup>3+</sup> 高濃度ドーピングによる結晶学的影響 .....	46
2.5.2.6 F <sup>-</sup> 濃度および Na <sup>+</sup> 濃度の組成的影響.....	46
2.5.2.7 総合的考察.....	47
2.5.3 発光効率について.....	47
2.5.3.1 欠陥準位と多フォノン緩和.....	47
2.5.3.2 光散乱の寄与.....	48
2.5.3.3 濃度消光の影響.....	49
2.5.3.4 最適粒径領域の総合的考察.....	50
2.5.4 コア-シェル化による発光効率向上と粒径設計 .....	50
2.5.4.1 シェル化による表面クエンチング抑制の原理.....	50
2.5.4.2 シェル厚の最適化と粒径設計.....	51
2.5.4.3 コア-シェル方アップコンバージョンナノ粒子の設計指針 .....	52
2.6 コア-シェル型アップコンバージョンナノ粒子の構造解析結果.....	52
2.6.1 構造解析結果.....	52

2.6.2	光学特性評価.....	53
2.6.3	考察.....	54
2.7	結言.....	56
2.8	参考文献.....	56

## 第3章 アップコンバージョンナノ粒子の

	細胞表面 OPN5 へのターゲティング.....	60
3.1	緒言.....	60
3.2	ターゲティング戦略.....	60
3.3	アップコンバージョンナノ粒子の水分散化.....	61
3.3.1	試薬及び評価装置.....	62
3.3.2	水分散 UCNPs (UCNP@Biotin) の合成方法.....	62
3.3.3	UCNP@Biotin の結果.....	62
3.3.3.1	透過型電子顕微鏡による形態観察.....	62
3.3.3.2	動的光散乱による流体力学的サイズ分布および ゼータ電位による表面電荷評価.....	63
3.3.3.3	光学特性評価.....	64
3.4	プラスミド作製.....	64
3.4.1	コンストラクト設計.....	64
3.4.2	試薬、装置及び評価方法.....	65
3.4.3	プラスミド調整.....	66
3.4.4	大腸菌形質転換およびコロニー選別.....	66
3.4.5	プラスミド精製およびシーケンスの確認.....	67
3.5	OPN5-HEK の構築.....	67
3.5.1	トランスフェクション.....	67
3.5.2	試薬および評価装置.....	68
3.5.3	トランスフェクションによる OPN5 発現細胞の構築.....	68
3.5.3.1	トランスフェクション方法.....	68
3.5.3.2	免疫染色の結果.....	69
3.5.4	OPN5 陽性細胞の蛍光標識の試み.....	70
3.5.4.1	p2A 配列を用いた OPN5-tdTomato 共発現系の構築.....	70
3.5.4.2	tdTomato を用いた共発現法.....	70
3.5.4.3	FLAG タグの蛍光免疫標識法.....	71
3.6	UCNP@Biotin と OPN5-HEK の結合.....	72

3.6.1	UCNP@Biotin と OPN5-HEK の結合実験方法.....	73
3.6.2	透過型電子顕微鏡観察.....	73
3.6.2.1	観察方法.....	73
3.6.2.2	透過型電子顕微鏡による UCNP@Biotin と細胞の結合観察の結果.....	74
3.7	細胞毒性評価 .....	75
3.7.1	MTT アッセイ .....	75
3.7.2	使用した細胞株、試薬、評価装置.....	75
3.7.3	MTT アッセイの方法 .....	76
3.7.4	UCNP@Biotin の細胞毒性 .....	76
3.9	結言 .....	77
3.10	参考文献 .....	77
第4章	Ca <sup>2+</sup> イメージング.....	79
4.1	緒言 .....	79
4.2	OPN5 の光反応特性および吸収スペクトル.....	79
4.2.1	OPN5 の双安定性と吸収スペクトル.....	79
4.2.2	光刺激条件と OPN5 光反応特性の関係.....	81
4.3	Ca <sup>2+</sup> イメージング方法 .....	81
4.3.1	Ca <sup>2+</sup> 指示薬について .....	81
4.3.2	試薬、器具及び評価装置など.....	82
4.3.3	方法 .....	83
4.4	Ca <sup>2+</sup> イメージングの結果 .....	84
4.4.1	UV 光刺激による Ca <sup>2+</sup> イメージングの結果.....	84
4.4.2	NIR 光刺激による Ca <sup>2+</sup> イメージングの結果.....	86
4.4.3	各 Case における $P_{res}$ の違いの要因.....	88
4.5	Ca <sup>2+</sup> 応答挙動の特徴量抽出 .....	89
4.6	速度論的解釈 .....	91
4.7	結言 .....	93
4.8	参考文献 .....	94
第5章	総括 .....	95
5.1	各章のまとめ .....	95
5.2	今後の展望 .....	97
5.2.1	双安定型オプシン光遺伝学の深化に向けた展望.....	97

5.2.2 オプシン光応答と UCNP 発光特性の統合的設計 .....	98
謝辞 .....	99
付録 .....	101
A.1 細胞培養 .....	101
A.2 プラスミド作製 .....	103
A.2.1 プライマーの配列 .....	103
A.2.2 全シーケンス解析結果 .....	103
A.3 バッファー調整方法 .....	106
A.4 LB 寒天培地の作り方 .....	107
A.5 アガロースゲルの作製方法 .....	107
A.6 アガロースゲル中の DNA の精製方法 .....	108
A.7 DH5 $\alpha$ コンピテントセルの調整 (Inoue 法) .....	109
A.8 大腸菌を用いたプラスミド複製 .....	110
A.8.1 形質転換 .....	110
A.8.2 コロニー選別と培養 .....	110
A.8.3 プラスミド精製 .....	110
研究業績 .....	112

# 第1章 緒論

アップコンバージョンナノ粒子 (Upconversion Nanoparticles, UCNPs) は、低エネルギー光である近赤外 (Near-infrared, NIR) 光を高エネルギー光である紫外 (Ultraviolet, UV) 光や可視光に波長変換する特性を持ち、NIR 光の生体組織透過性や低光毒性といった利点を活かせることから、近年、光遺伝学<sup>1-15</sup>、治療<sup>16,17</sup>、バイオイメージング<sup>18,19</sup>、バイオセンシング<sup>20,21</sup> など様々な生命科学分野で注目を集めているナノ材料である。本論文では、UCNPs を用いた光遺伝学的応用の新たな展開として、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 型の双安定型オプシンの光制御に取り組んだ。本章では、光遺伝学について概説した後、従来の光遺伝学分野での UCNPs 応用例を紹介し、最後に本研究の意義と目的を示す。

## 1.1 微生物型オプシンを基盤とする光遺伝学の発展

### 1.1.1 光遺伝学の誕生と技術的背景

光遺伝学 (Optogenetics) とは、光に応答するタンパク質を遺伝子工学的に細胞へ導入し、その活動を光刺激によって精密に制御する技術であり、近年神経科学を中心に急速に発展してきた<sup>22-26</sup>。神経活動を光によって制御するという概念自体は、光遺伝学が誕生する以前から構想されていた。フランシス・クリックは1979年に、「あるタイプの神経細胞だけを不活化し、他の細胞にはほとんど影響を与えないようにする方法があれば、神経科学の発展にとって極めて有用である」と述べ<sup>27</sup>、1999年では、「覚醒状態の動物において、特定の神経細胞型の発火を迅速かつ選択的にオン/オフできる技術が必要であり、その理想的な刺激手段は光である」と提案していた<sup>28,29</sup>。その後、2005年に Boyden らがクラミドモナス由来のチャネルロドプシン (Channelrhodopsin, ChR) を神経細胞に導入し、青色光照射によって活動電位を制御することに成功した報告は、光遺伝学の幕開けとして広く認識されている<sup>30</sup>。

図1-1に、神経活動を制御する従来の方法 (薬理的刺激や電気刺激) と光遺伝学の概略を示す。薬理的刺激法は、神経伝達物質アナログや受容体作動薬・阻害薬を投与することで神経活動を化学的に制御できるが<sup>31</sup>、時間分解能が低いことや薬剤の拡散に

よる空間的非選択性が課題であった<sup>32</sup>。電気刺激法は、電極を介して神経細胞を直接興奮させることができるものの、刺激範囲を限定することが難しく、複数の神経が同時に活性化してしまうという制約があった<sup>33</sup>。これに対して光遺伝学では、光応答性タンパク質（例：チャネルロドプシン2（ChR2）などの光活性化イオンチャンネル）を遺伝子工学的に神経細胞に発現させ、光応答性タンパク質を活性化する波長の光を照射することで、ミリ秒オーダーでの選択的かつ可逆的な活動制御が可能となった<sup>30</sup>。このように、光刺激を用いることで神経活動を非侵襲的かつ高空間分解能で制御できる点が光遺伝学の最大の長所であり、神経回路の情報処理や行動制御機構の解明に大きく貢献しているほか、心筋・筋組織など他の興奮性細胞研究にも応用が広がっている<sup>34</sup>。

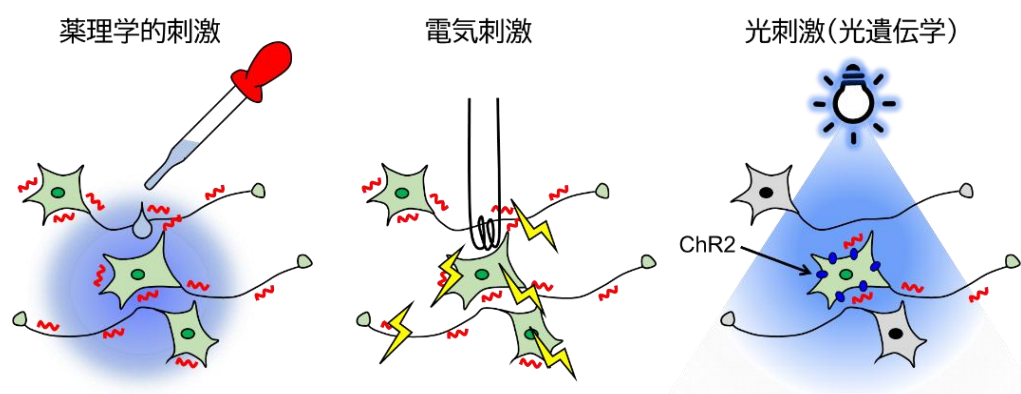


図 1-1 神経活動制御技術の比較:薬理学的手法、電気刺激、光刺激(光遺伝学:ChR2 を発現させた場合)。

### 1.1.2 微生物型オプシンの構造と光反応機構

従来光遺伝学では、主に真正細菌や古細菌などが持つ光応答性タンパク質（微生物型オプシン）が用いられてきた<sup>22,28,35-37</sup>。微生物型オプシンは7本の膜貫通 $\alpha$ ヘリックス（A～Gヘリックス）から構成される光駆動型の膜タンパク質であり、N末端は細胞外基質、C末端は細胞内基質に位置する（図 1-2(a, b)）<sup>38</sup>。タンパク質部分をオプシン（Opsin）、オプシンにレチナールが発色団として結合した複合体をロドプシン（Rhodopsin）と呼ぶ。発色団であるレチナールはオプシンの7回膜貫通ヘリックスのうちGヘリックス（第7膜貫通領域）に存在するリジン残基とシッフ塩基結合を形成しており<sup>39</sup>、光吸収によりオールトランス型から13-シス型へと光異性化する<sup>38</sup>。この構造変化を契機として、一連の光反応サイクルを経てチャンネルまたはポンプ機能が発現し、その後自然に暗

状態（オールトランス型）へと戻る。例えば図 1-2(c) に示す ChR2 の場合、青色光照射後、ミリ秒のオーダーでチャンネルが開き、 $\text{Na}^+$ や  $\text{Ca}^{2+}$ などの陽イオンを透過させ、その後十ミリ秒のオーダーでチャンネルが閉じ、十秒のオーダーで元の安定な基底状態へと戻ることが知られており<sup>40,41</sup>、光刺激により迅速な電位変化を誘導できることから、神経活動のオン/オフ制御に有効である。これにより、神経細胞の興奮を極めて迅速に制御できるため、広く利用されてきた<sup>42-44</sup>。微生物ロドプシンファミリーには、 $\text{Cl}^-$ ポンプロドプシンというロドプシンも存在する。図 1-2(d) に示す高度好塩性アルカリ古細菌 (*Natronomonas pharaonis*) 由来のハロロドプシン (NpHR) は現在分子機構が最も解明されている  $\text{Cl}^-$ ポンプロドプシンであり、NpHR に黄橙色光を照射すると細胞外から細胞内への  $\text{Cl}^-$ の能動輸送が起こり、膜電位を過分極させ神経活動を抑制できるため、光遺伝学のツールとして利用されてきた<sup>35,45</sup>。

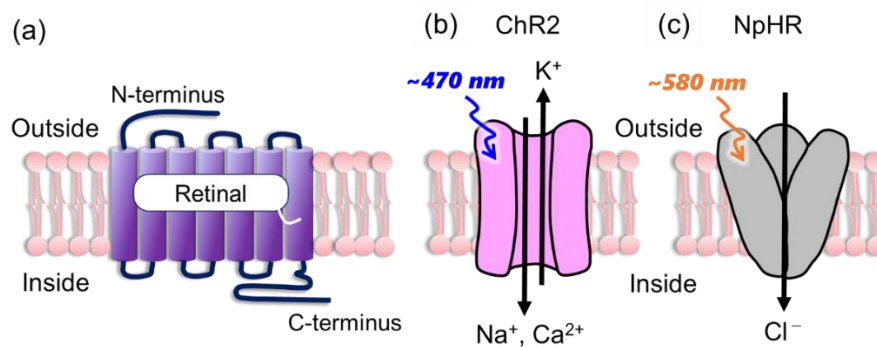


図 1-2 (a) 微生物型ロドプシンのトポロジー、(b) ChR2 の光応答機構、(c) NpHR の光応答機構。

### 1.1.3 微生物型オプシンの応用と光遺伝学ツールの発展

微生物型オプシンを利用した光遺伝学的手法は、光刺激によってイオン流を制御し、神経活動を精密にオン/オフできる技術として発展してきた。一方で、神経系をはじめとする多くの細胞においては、活動電位の発生のみならず、Gタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) を介した細胞内シグナル伝達が、神経伝達物質やホルモンによる応答、代謝調節、遺伝子発現制御などの多様な生理機能を担っている<sup>46,47</sup>。したがって、光によってこれらの GPCR シグナル経路を直接制御できれば、神経活動の制御を超えた新たな光操作ツールとしての応用が期待された。このような発想のもと、Airan らは微生物型オプシン (チャンネルロドプシン) の光受容ドメインと、哺乳類 GPCR

の細胞内ドメインを融合することで、光刺激によって特定の G タンパク質シグナルを誘導できる人工受容体 OptoXR (optically activated chimeric receptor) を開発した<sup>48</sup>。OptoXR は、チャンネルロドプシン由来の光受容ドメインを有し、500 nm 付近の光照射によって構造変化を起こすことで、融合先である GPCR 由来細胞内ドメインを介して G タンパク質を活性化する。この受容体の登場により、リガンドを用いずに光刺激のみで細胞内シグナル伝達経路を制御できる新しい概念が示され、光による細胞内情報伝達の操作が可能であることが実証された<sup>48,49</sup>。

一方で、OptoXR は従来のオプシンのアミノ酸配列を改変したキメラ構造であるため、ミスフォールドを起こしやすく、複数の下流経路が同時に活性化される生理的な GPCR 応答とは異なり、OptoXR では単一経路への偏った活性化が生じやすいことが指摘されている<sup>36,50</sup>。こうした OptoXR の限界と、150 年以上にわたる動物型オプシン研究の蓄積によって、感覚生理学や三量体 G タンパク質シグナルの理解が大きくなったことを背景に、近年では光刺激に対する構造変化およびシグナル伝達機構を本来備えた動物型オプシン (Type II) そのものを光制御ツールとして利用する研究が進展してきている<sup>50</sup>。

微生物型オプシンおよび動物型オプシンともに 7 回膜貫通構造を共有するが、光応答機構が本質的に異なる。微生物型オプシンは光刺激によって直接イオン流を制御するのに対し、動物型オプシンは G タンパク質を介した化学的信号増幅を特徴とする。応答速度はミリ秒～数秒単位とやや遅いが、シグナル増幅が可能であるため、高感度な応答を実現できる点が大きな特徴である<sup>38</sup>。従って、微生物型オプシンは神経活動の迅速な光制御に適しており、動物型オプシンは多様な細胞応答や非視覚的光応答の光制御に適している。

## 1.2 動物型オプシンとその多様性

### 1.2.1 動物型オプシンの分類と光応答の多様性

動物型オプシンは本来、視覚や非視覚的光応答を担う光受容タンパク質群であり、いずれも GPCR として機能し、光刺激を受けると、細胞内シグナル伝達カスケードを活性化する。大きく視覚オプシン (visual opsins) と非視覚オプシン (non-visual opsins) に分類される<sup>51,52</sup>。前者は網膜の視細胞に局在し、光情報を電気信号に変換して外界の像認識を担う。後者は視覚情報処理以外の光応答を担う動物型オプシンの総称であり、脳、皮膚、内分泌器官など全身に広く分布し<sup>53,54</sup>、神経活動<sup>55</sup>、代謝<sup>56</sup>、ホルモン分泌<sup>57</sup>、概日リズム<sup>58</sup> など多様な生理現象に関与する。

## 1.2.2 GPCR 型オプシンの分類とシグナル作動機構

G タンパク質は、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 つのサブユニットからなるヘテロ三量体タンパク質であり、安静時にはグアノシン二リン酸 (Guanosine diphosphate, GDP) 結合型の  $G\alpha$  サブユニットが  $G\beta\gamma$  サブユニットと複合体を形成している。光刺激によってオプシンが活性化すると、レチナールの 11 シス型からオールトランス型への異性化に伴いオプシンの立体構造が変化し、G タンパク質と結合可能な状態となる。これにより、オプシンは  $G\alpha$  サブユニットに結合した GDP のグアノシン三リン酸 (Guanosine triphosphate, GTP) への交換を促進し、G タンパク質を活性化する。活性化後、 $G\alpha$ -GTP は  $G\beta\gamma$  サブユニットから解離し、それぞれが下流のエフェクター分子を制御する。 $G\beta\gamma$  サブユニットは機能的に一体として作用する一方、 $G\alpha$  サブユニットはその分子種に応じて異なるシグナル伝達経路を担う。 $G\alpha$  サブユニットは機能および配列相同性に基づいていくつかのファミリーに分類されており、動物型オプシンでは図 1-3 に示すように、 $G_i$  (transducin)、 $G_{i/o}$  (inhibitory/other)、 $G_q$ 、 $G_o$ 、 $G_s$  (stimulation)、 $G_i$  結合型の 6 つのサブファミリーに分類される<sup>52,59,60</sup>。これらはいずれも光異性化によってレチナールが 11 シス型からオールトランス型へ異性化することで G タンパク質が活性化し、GPCR の構造変化を介して下流シグナルが活性化されるという共通の機構を持つ<sup>51,61</sup>。

サブファミリーごとに結合する G タンパク質およびシグナル伝達経路が異なり、例えば  $G_i$  結合型オプシンは脊椎動物の視覚オプシンに代表され、ホスホジエステラーゼの活性化を介した環状グアノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate, cGMP) 濃度の低下により、光情報を電気信号へと変換する<sup>62,63</sup>。 $G_{i/o}$  結合型<sup>64</sup>および  $G_o$  結合型<sup>65</sup>のオプシンはいずれもアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase, AC) の抑制を介して環状アデノシン一リン酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 濃度を低下させる抑制的シグナル経路に関与する。 $G_i$  結合型オプシンの代表例であるニューロプシン (Neuropsin) (OPN5)<sup>66,67</sup>も同様に  $G_i$  タンパク質を介して抑制的 cAMP 経路を活性化し、細胞内 cAMP 濃度を低下させることが報告されている。 $G_o$  結合型オプシンは特に神経系に高発現し、神経活動制御に関与し<sup>65</sup>、 $G_{i/o}$  および  $G_i$  結合型オプシンでは代謝調節など様々な非視覚的光応答を担う<sup>64,66,67</sup>。一方、 $G_s$  結合型は AC の活性化によって環状アデノシン一リン酸 (cyclic guanosine monophosphate, cAMP) 上昇を誘導する光応答を示す<sup>68</sup>。 $G_q$  結合型オプシンは無脊椎動物の視覚オプシンやメラノプシンに代表され、ホスホリパーゼ C  $\beta$  (phospholipase C  $\beta$ , PLC  $\beta$ ) を活性化することでホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP<sub>2</sub>) をイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) とジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) に加水分解し、IP<sub>3</sub> 受容体を介した滑面小胞体空の Ca<sup>2+</sup>放出によって細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を誘導する<sup>69-71</sup>。このような機構を持つ GPCR 型オプシンは、光刺激によって神経活動以外の多様な生理応答を光制御できるツールとし

ての可能性を秘めている。



図 1-3 GPCR 型オプシンの分類と結合タンパク質の種類 (Reproduced from ref. 52 with permission from Elsevier.).

### 1.2.3 GPCR 型オプシンの光化学的特性:退色型と双安定型

脊椎動物の視覚オプシンは、光刺激によって発色団であるレチナールが光異性化し、活性型を経て最終的にレチナールを遊離して退色 (bleaching) する<sup>52,72,73</sup>。このような退色型オプシンでは、レチナールの再結合を経ない限り暗状態 (不活性状態) へ戻れないため、再使用が困難であり光遺伝学ツールとしての応用には不向きとされてきた (図 1-4(a))。これに対し、一部の GPCR 型オプシンは、光刺激により生成した活性状態が比較的安定であり、別波長の光を照射することで再び不活性状態に戻ることが可能である<sup>52,74</sup>。こうした性質を持つオプシンは双安定型オプシン (bistable opsin) と呼ばれ (図 1-4(b))、光再生が可能であるという利点から、光遺伝学ツールとしての応用が期待されている<sup>75,76,77</sup>。

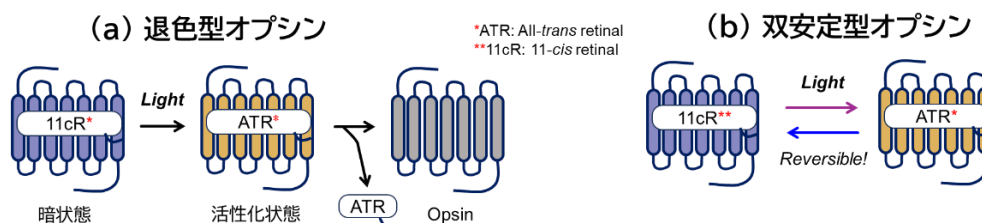


図 1-4 (a)退色型オプシン、(b)双安定型オプシンの光応答サイクルの模式図 (Reproduced from ref. 52 with permission from Elsevier.).

## 1.2.4 主な双安定型オプシンとその生理機能

これまでに、複数の双安定型オプシンが動物種を超えて同定されており、それぞれが異なる波長で活性化・不活性化される光応答特性と多様な生理機能を示すことが報告されているため、代表例を挙げていく。Mouse および human のメラノプシンは、主に網膜の内因性光感受性網膜神経節細胞に発現し、青色光 ( $\lambda \sim 470$  nm) で活性化され、黄色光 ( $\lambda \sim 560$  nm) で不活性化される bistable-like な特性を示すことが報告されており<sup>78,79</sup>、概日リズムの光同調や瞳孔反射 (pupillary light reflex)<sup>80</sup>、睡眠・覚醒リズムの調節<sup>81</sup>、ホルモン調節・気分・代謝への影響<sup>82</sup>といった非視覚的機能に携わっている。ゼブラフィッシュなどの魚類の松果体 (pineal organ) に発現するパラピノプシンは、UV 光 ( $\lambda \sim 370$  nm) で活性化され、緑色光 ( $\lambda \sim 515$  nm) で不活性化される bistable opsin であり<sup>83</sup>、色弁別を担っている可能性が示唆されている<sup>84</sup>。また、chicken, mouse および human のニューロプシン (OPN5) は UV 光により活性化され、青色光により不活性化される<sup>66,67</sup>。近視抑制といった視覚に関与する機能<sup>85</sup>以外に、網膜だけでなく脳深部や体内臓器にも発現しており<sup>67,86</sup>、褐色脂肪組織における熱産生<sup>87</sup>や脳下垂体におけるホルモン形成<sup>88</sup>といった非視覚的機能にも関与していることが報告されている。最近 Wietek らは、イソツルヒゲゴカイ (*Platynereis dumerilii*) の繊毛型オプシン (*PdCO*) は、UV 光 ( $\lambda \sim 365, 405$  nm) で活性化され、緑色光 ( $\lambda \sim 525$  nm) で不活性化される双安定型オプシンであり、高い時間的精度でシナプス伝達を抑制することが可能であると報告している<sup>77</sup>。これら双安定型オプシンの生理的役割やシグナル伝達機構については未解明な点も多く残されており、今後の光遺伝学ツールとしての応用拡大のためには、非侵襲的かつ空間的に精密な光制御技術の開発が強く求められる。しかし、刺激光を直接照射する従来の光遺伝学では、光刺激に使用される UV 光や可視光 (特に青色光) が生体組織において光散乱や吸収の影響を強く受け、生体組織に対する透過性が低く、光毒性のリスクも高いという問題がある<sup>89-91</sup>。

## 1.3 アップコンバージョンナノ粒子の概要

### 1.3.1 アップコンバージョン発光現象の発見とアップコンバージョンナノ粒子研究の発展

#### 1.3.1.1 アップコンバージョン発光の発見と基礎原理

アップコンバージョン (upconversion) とは、低エネルギーの光子を吸収し、それらのエネルギーを加算して高エネルギーの光を放出する反ストークス型の発光現象である。この現象は、通常の蛍光 (ストークス発光) とは逆のエネルギー変換を示し、複数の光

子吸収を伴う非線形光学過程として理解されている。具体的に、発光強度  $I_{UC}$  は励起光強度  $I_{ex}$  に対して一次的には比例せず、光子吸収数  $n$  に依存して  $I_{UC} \propto (I_{ex})^n$  ( $n \geq 2$ ) と表される。このような強度依存性は、1光子励起型に基づく線形的な蛍光発光とは異なる光物理的特性を示している<sup>92</sup>。

アップコンバージョン発光が体系的に報告されたのは、1960年代半ばの François Auzel による研究であり、 $Er^{3+}$ ,  $Ho^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$  などの希土類（ランタノイド）イオンをドーブした固体ホストにおいて、NIR 光励起による可視発光を観測し、協同的エネルギー移動過程（Energy Transfer Upconversion, ETU）の概念を初めて明確に提示した（図 1-5(a)）<sup>93,94</sup>。この過程では、まず増感剤（sensitizer）が低エネルギー光子を吸収すると、感光体内の電子が基底状態から励起状態へ遷移する。その後、エネルギー移動を介して隣接する活性剤（activator）へと伝達される。すると、発光体に存在する電子が段階的に高エネルギー準位へ励起され、発光再結合の際に高エネルギー発光が得られる。一方で、単一イオン内で複数光子を逐一吸収して高準位に励起される過程は励起状態吸収（Excited State Absorption, ESA）と呼ばれる（図 1-5(b)）。後述するアップコンバージョンナノ粒子（Upconversion nanoparticles, UCNPs）では、 $Yb^{3+}$ などの増感剤が NIR 光（980 nm など）を吸収し、 $Er^{3+}$ や  $Tm^{3+}$ などの活性剤に効率的にエネルギーを移動させる ETU 機構が主である。

ランタノイドイオンの 4f 電子は、外殻の 5s および 5p 軌道によって空間的に遮蔽されているため、周囲の環境や配位子の影響をほとんど受けず、結晶場分裂は数百  $cm^{-1}$  程度である。4f 電子は原子核近傍に局在しており、電子-格子相互作用が小さい。このため、発光線幅は狭く、シャープなピークとして観測される。これらの特性により、発光は特定の波長に集中し、ピーク強度が高くなるため、背景ノイズの影響を受けにくい良好な S/N 比を有する光エネルギー変換が可能となる。

また、4f-4f 遷移はラポルテ禁制であるため、電気双極子遷移としての遷移モーメントは本質的に小さい。ただし、結晶場の非対称性や欠陥の存在により偶奇混成が生じることで部分的に緩和され、実際には放射遷移が許容されている。NaYF<sub>4</sub>において、結晶学的には  $\alpha$ （立方）相（空間群： $Fm\bar{3}m$ ）では  $Y^{3+}$  サイトが高対称な点群（ $O_h$ ）を、 $\beta$ （六方）相（空間群： $P6_3/m$ ）ではより低対称な点群（ $C_{3h}$ ）を有するが、 $Na^+$  と  $Y^{3+}$  の無秩序占有に起因する局所構造の乱れにより、 $\alpha$  相では  $O_h$  から  $C_s$  または  $C_2$  へ、 $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> では  $C_{3h}$  から  $C_s$  へ低下することが分光学的に示されており、 $Ln^{3+}$  が実際に感じる局所対称性は結晶学的点群よりも低下する<sup>95</sup>。その結果、4f 電子準位における結晶場は理想的

な対称性から逸脱し、偶奇混成が促進される。

図 1-5(c) には、本研究で用いる NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm 系における具体的なエネルギーダイアグラムを示す<sup>96</sup>。980 nm 光励起により Yb<sup>3+</sup>から Tm<sup>3+</sup>への多段エネルギー移動が起こり、<sup>1</sup>G<sub>4</sub>準位を経由して 478 nm の青色発光が生じる。一方、より高エネルギーの <sup>1</sup>D<sub>2</sub>は、Yb<sup>3+</sup>からの直接的なエネルギー移動では到達しにくく、図 1-5(c) 黄緑色の矢印で示す Tm<sup>3+</sup>–Tm<sup>3+</sup>間の交差緩和が生じ、これにより、453 nm の青色光と 362 nm の UV 光発光が生じる<sup>96</sup>。Huang ら<sup>97</sup>はの NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm 系 UCNP において、アップコンバージョン発光強度と励起光強度の関係  $I_{uc} \propto (I_{ex})^n$  ( $n \geq 2$ ) から求められる非線形次数  $n$  は各発光準位に到達するまでの励起過程の数を反映する指標であるため、励起光強度依存性の解析より、<sup>1</sup>G<sub>4</sub>由来の 478 nm 発光は  $n = 2.10$ 、<sup>1</sup>D<sub>2</sub>由来の 365 nm 発光は  $n = 3.99$  に対応することを報告した。このように、低次の多光子過程の方がアップコンバージョン効率が高いという一般的な性質は、励起次数の違いとして各発光バンドの強度および励起光依存性に反映されていると考えられる。

実際の UCNPs では、結晶中の欠陥に由来する欠陥準位やナノ粒子表面に存在する表面欠陥に由来する表面準位が不可避免的に存在し、これらの準位は励起エネルギーを捕獲するトラップ準位として機能し、非放射緩和経路として働いてアップコンバージョン発光効率を低下させる<sup>98,99</sup>。また、多フォノン緩和 (multi-phonon relaxation, MPR) を介した非放射緩和もアップコンバージョン発光効率を低下させる。MPR とは、励起状態にある電子が複数個のフォノンを同時に放出することで低エネルギー準位へ緩和する非放射過程であり、準位間エネルギー差が大きいほど顕著となる。特に UCNPs ではホストに由来する格子フォノン振動 ( $350 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>100</sup>に加え、ナノ粒子表面に存在するヒドロキシル基 (–OH) などの高エネルギー振動モードに起因する表面フォノンが存在するため、バルク材料と比較して MPR が生じやすいという特徴がある。これらの非放射緩和機構が UCNPs における発光効率低下の主要因となるが、その詳細な機構および本研究系における影響については第 2 章で改めて議論する。

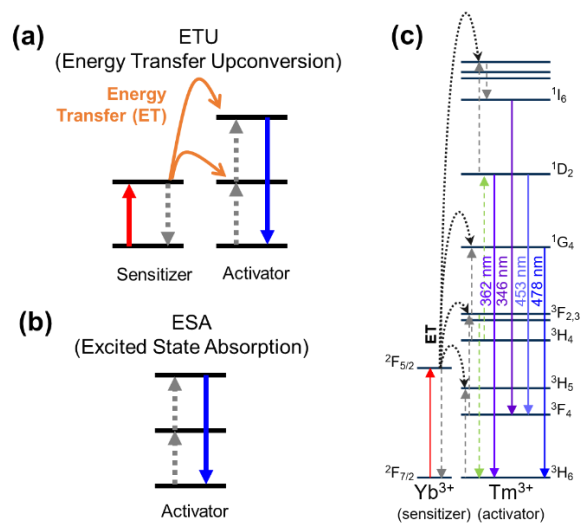


図 1-5 (a)エネルギー移動アップコンバージョン(Energy Transfer Upconversion, ETU)の模式図、(b)励起状態吸収(Excited State Absorption, ESA)の模式図、(c)NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm系における具体的なエネルギーダイアグラム (Reproduced from ref. 96 with permission from the Royal Society of Chemistry.)。

### 1.3.1.2 NaYF<sub>4</sub>ホストの確立とアップコンバージョン材料研究の発展

1970年代に入り、希土類ドープフッ化物におけるアップコンバージョン発光特性の体系的研究が進展した。Menyukら<sup>101</sup>は、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er系において強い緑色および赤色のアップコンバージョン発光を観測し、続くSommerdijkら<sup>102</sup>も、NaYF<sub>4</sub>:Er,Yb,Tm系を用いた比較実験により、NaYF<sub>4</sub>がアップコンバージョン発光材料として最も高い量子効率を示すことを報告した。これらの報告により、NaYF<sub>4</sub>はアップコンバージョンホストとして最良であることが主張された。

1980~1990年代には、より安定かつ機械的に強靱で加工しやすいホスト材料として、酸化物系<sup>103,104</sup>やフッ化物ガラス系<sup>105,106</sup>材料の研究が盛んに行われた。これらの研究は、発光スペクトル、寿命解析、エネルギー移動機構の解明など、光物性研究としての基盤形成に大きく寄与した。

### 1.3.1.3 アップコンバージョンナノ粒子合成方法の確立

1990年代以降、アップコンバージョン発光材料の微粒子化が進み、希土類ドープフッ化物のナノスケール合成が試みられるようになった。2004年には水熱法を用いた研究が報告され、主に立方晶(α相)構造をもつナノ粒子が得られた<sup>107,108</sup>。しかし六方晶(β相)構造をもつアップコンバージョン材料の発光効率の高さが知られていたことから、より高効率なβ相をナノスケールで合成する試みが続いた。Zengら<sup>109</sup>は2005年に水熱法を用いて

$\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er ナノ粒子（粒径 ~50 nm）を得て、その発光効率の高さを実証した。しかし、水熱条件では粒子の凝集やサイズ分布のばらつきが避けられず、生体応用などで必要とされる均一で分散性の高い粒子を得ることは困難であった。

このような背景のもと、Yi ら<sup>110</sup> および Mai ら<sup>111</sup> は 2006 年に、Na(CF<sub>3</sub>COO)と RE(CF<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub> を前駆体とし、オレイン酸／オレイルアミン／1-オクタデセン混合溶媒中での熱分解法により、高分散かつ結晶性の高い  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er および  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm ナノ粒子の合成に成功した。この手法では、Na および希土類元素とフッ素を同一分子内に含むトリフルオロアセテート前駆体を使用することで、反応系中の元素供給を均一化し、従来の水熱法に比べて、粒径・相構造・表面状態の精密制御が可能となった。

### 1.3.2 アップコンバージョンナノ粒子の様々なバイオ応用

UCNPs を生体組織の目的の場所に集積・送達した状態で生体組織外から生体透過性の高い NIR 光<sup>89,112</sup> を照射することにより UV・可視光を選択的・局所的に発生させることが可能であり、非侵襲的かつ空間的に精密な光制御が達成できる。このような NIR 光→UV・可視光波長変換技術を基盤として、UCNPs は近年、以下に紹介する様々な生命科学分野で応用が進んでいる。本節では、これらの代表的応用例について、用途に応じた特徴と技術的背景、研究例を順に説明する。

#### 1.3.2.1 バイオイメーjing

従来のバイオイメーjingでは、小分子蛍光色素<sup>113</sup> や蛍光タンパク質<sup>114,115</sup>、量子ドット<sup>116,117</sup> などが広く用いられてきたが、可視光励起に伴う光散乱や吸収の影響により観察深度が限られ、光退色や発光の点滅<sup>118</sup>、重金属由来の毒性<sup>119</sup> といった課題を抱えていた。そのため、長時間にわたる生体動態の追跡や、生理的条件下での高精度観察には限界があった。これに対し UCNPs は、可視光と比較して光散乱や吸収が少ない NIR 光によって励起される反ストークス発光を利用することで、高い信号対雑音比 (S/N 比) と優れた光安定性を同時に実現できる。また、Er<sup>3+</sup> や Tm<sup>3+</sup> などのドーパント組成を制御することで、発光波長を UV から NIR 光まで精密に調整できる柔軟性を持つ。Zeng ら<sup>19</sup> は、NaLuF<sub>4</sub>:Yb,Er UCNP を用いて、980 nm の NIR 光励起下でも光退色を起こさず、背根神経節ニューロン内の軸索輸送を単一粒子レベルでリアルタイム観察することに成功した。この研究は、UCNP が従来の蛍光トレーサーの物理的限界を超え、細胞内の微小輸送過程を安定かつ長時間可視化できる新しいバイオイメーjingプローブであることを明確に示した (図 1-6)。

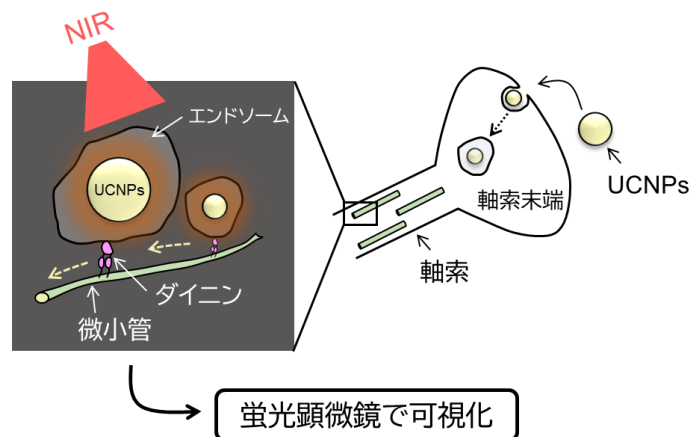


図 1-6 軸索末端から取り込まれた UCNP が逆行輸送される様子を示す模式図。

### 1.3.2.2 バイオセンシング

バイオセンシングとは、生体内または生体由来の化学種の濃度や動態を、光学的・化学的信号の変化として読み出すことにより定量的または半定量的に検出する技術である。ここでいう定量性とは、プローブが分析対象の濃度に応じて再現性のあるシグナル変化（発光強度、比率型シグナルなど）を示す性質を指し、必ずしも生体内で絶対濃度を直接算出することを意味しない。実際、生体組織内では光散乱・吸収の影響から絶対定量が困難であるため、バイオセンシング研究では *in vitro* 溶液系で濃度依存応答を評価し、生体サンプルでは局在情報を得るイメージングとして機能させる二段構成が標準的である。バイオイメージング同様、従来は蛍光色素や蛍光タンパク質、量子ドットなどが用いられてきたが、可視光励起に伴う光散乱や自家蛍光により背景ノイズが大きく、深部組織や生理的条件下での定量性に限界があった。そこで Peng ら<sup>20</sup> は、 $Zn^{2+}$  感受性色素を修飾した  $NaYF_4:Yb,Tm$  UCNP を用い、発光比の変化を指標とした比率型センシングを構築した。これにより、ゼブラフィッシュおよびアルツハイマー病モデルマウスの脳スライスにおいて、 $Zn^{2+}$  の局所濃度変化を NIR 光励起下でリアルタイムに検出することに成功している（図 1-7）。この成果は、UCNP が生体透過性の高い NIR 光を活用することで、深部組織における高感度センシングを可能にする有望な光学プローブであることを示した代表的研究である。

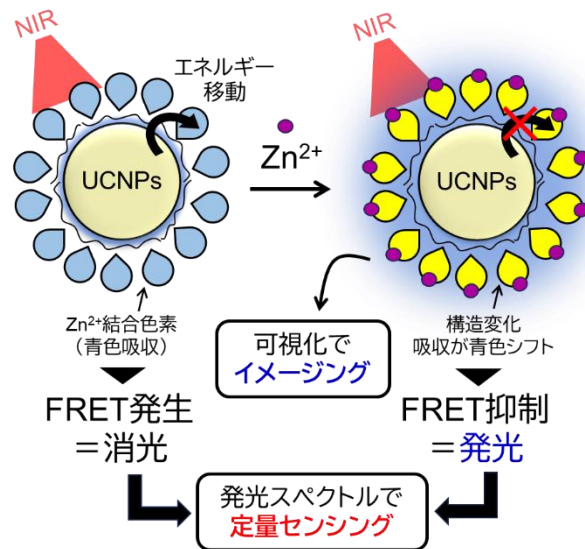


図 1-7 UCNP を用いた  $Zn^{2+}$  センシングの概念図。

### 1.3.2.3 治療

光線力学療法 (Photodynamic Therapy, PDT) は、光感作剤・光・酸素の三要素を利用して活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) を発生させ、がん細胞などの異常組織を選択的に殺傷する治療法である。光感作剤が特定波長の光を吸収して励起状態となり、周囲の酸素分子にエネルギーを伝達して一重項酸素 ( $^1O_2$ ) を生成することで、細胞内小器官の酸化的損傷を引き起こす。PDT は非侵襲的かつ局所的な治療が可能であるが、可視光励起では組織透過性が低いという課題がある。そのため、NIR 光を可視光に変換可能な UCNP を組み合わせることで、深部組織での PDT が可能となっている。Xing ら<sup>16</sup> は、 $Nd^{3+}$  をドーピングした UCNP の表面に、光感作剤 Chlorin e6 (Ce6) とカテプシン B 認識ペプチドを導入し、腫瘍細胞内のリソソームにおいて酵素カテプシン B がペプチドを切断することで、UCNP 同士が共有結合的に架橋し、腫瘍局所に高密度に集積する腫瘍微小環境に応答する精密 PDT システムを提案した。808 nm の NIR 光励起によって UCNP が 655 nm の可視光を放出し、それが Ce6 を励起して一重項酸素 ( $^1O_2$ ) を生成、結果として腫瘍細胞のアポトーシスを誘導した (図 1-8)。

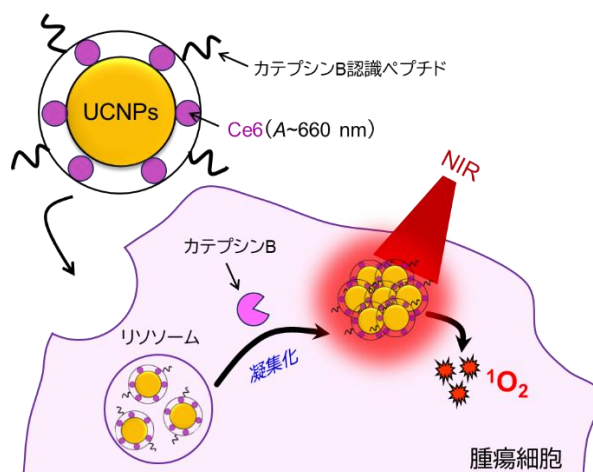


図 1-8 カテプシン B 応答性 UCNP 凝集による NIR 駆動型 PDT の概念図。

#### 1.3.2.4 薬剤送達・放出制御

UCNPs を薬物送達・放出制御に応用する意義は、従来のキャリアでは実現が困難であった非侵襲的かつ精密な光制御を可能にする点にある。薬物送達 (Drug Delivery System, DDS) においては、UCNPs をキャリアとして利用することで、NIR 光照射による蛍光発光を利用した薬物分布の可視化や、PEG 化・リガンド修飾による標的部位への選択的集積が可能となる。特に NIR 光は生体組織中の散乱や吸収が少ないため、体内深部における薬物輸送過程を非侵襲的に追跡できる点で大きな利点を有している。Wang ら<sup>120</sup> は、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$  UCNPs を薬物キャリアとして用いた多機能型 DDS を構築し、両親媒性ポリマー修飾によって水分散性を高めた UCNPs に抗がん剤ドキシソルビシン (DOX) を搭載し、葉酸修飾により葉酸受容体を過剰発現するがん細胞への選択的取り込み、酸性環境での DOX 放出と UCNPs の蛍光による送達過程の可視化を示すことで、薬物送達とイメージングを統合したセラノスティクス型 DDS の基盤を提示した (図 1-9)。

一方、薬剤放出制御 (Drug Release System, DRS) においては、UCNP の光変換特性 (NIR 光→UV・可視光) を利用し、薬物分子を保持する光分解性リンカーやキャリア表面の化学結合を光のオン/オフで遠隔的に切断することで、光トリガー型の薬物放出制御を実現できる。これにより、治療のタイミングや薬効の強度を空間的・時間的に調節することが可能となり、深部組織での高精度治療を目指す次世代のスマートドラッグデリバリー技術として期待されている。Zheng ら<sup>121</sup> は、NIR 光照射によって複数の薬物を独立かつ段階的に放出可能なフォトスイッチ型アップコンバージョンナノ粒子を開発し、コア-マルチシェル構造の UCNPs を設計して各層に異なる薬物分子を搭載するこ

とで、発光波長に応じたエネルギー分割 (energy segmentation) 機構を実現した。これにより、単一粒子内で光波長ごとに放出経路を精密に制御し、複数の治療薬を順次放出することが可能となり、NIR 光による非侵襲的な多剤放出システムとして、複合疾患やがん治療における精密医療への応用が期待されている。

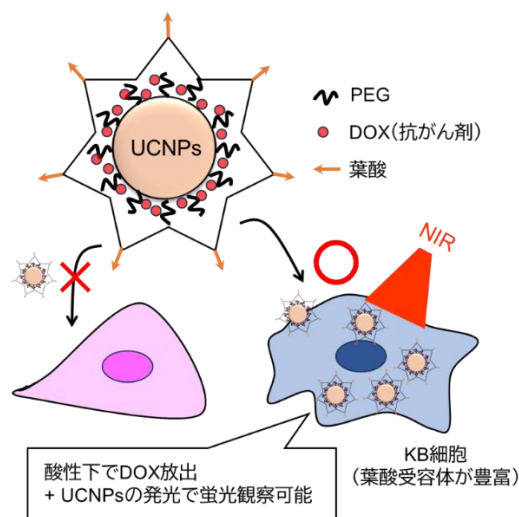


図 1-9 UCNP を用いた薬剤放出の概念図。

## 1.4 アップコンバージョンナノ粒子の光遺伝学的応用

### 1.4.1 アップコンバージョンナノ粒子を利用した光遺伝学の既存研究

光遺伝学は細胞内シグナル伝達や神経活動を光で精密に制御できる強力な技術であるが、可視光依存であるがゆえに生体組織深部への光到達性の低さや外科的な光導入デバイスの必要性といった物理的制約を抱えている<sup>89-91</sup>。ここでは、UCNP が NIR 光照射により UV・可視光を局所的に生成できる特性を活かし、バイオイメージング、バイオセンシング、治療など多岐にわたる生命科学研究に応用されてきたことを概観した。これらの応用の中でも、光遺伝学は UCNP の「深部光変換」という特徴が最も直接的に活かされる分野であり、UCNP の利点が最大限に発揮される代表的領域である<sup>122,123</sup>。UCNP を用いた光遺伝学的制御では、粒子を標的組織に送達したうえで体外から NIR 光を照射することで、深部組織内で青色光や UV 光を「非侵襲的に」生成し、光応答性タンパク質を活性化することが可能となる。特に ChR2 を用いた既存研究は、*in vitro* 神経細胞における膜電位制御から出発し、深部脳回路、心筋・骨格筋、末梢神経、さらには免疫応答へと応用領域を拡大してきた。これらの知見は、UCNP が可視光では到達

困難な組織に対しても非侵襲的に光遺伝学的操作を行えるプラットフォームであることを示している。以下では、対象別に UCNP を利用した光遺伝学の代表的研究を概説する。

#### 1.4.1.1 *In vitro* 神経細胞での ChR2 制御

UCNPs を利用した光遺伝学的制御において、最も基礎的かつ重要なステップは、培養神経細胞や脳スライスといった *in vitro* 系での ChR2 活性化の実証である。可視光では深部到達性が乏しいため、従来の光刺激では細胞に直接光ファイバーを近接させる必要があったが、UCNPs を併用することで NIR 光照射のみで青色光を局所的に発生させ、ChR2 を活性化できる。このアプローチは、深部制御や生体内応用へ発展させるための基礎となる技術であり、材料設計・細胞毒性・発光波長・細胞周囲での光強度勾配など、多くの要素がここで検証されてきた<sup>1-3</sup>。Shah ら<sup>1</sup>は、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP を poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ポリマーに分散させたハイブリッド足場を作製し、その上で ChR2 発現海馬ニューロンを培養するシステムを構築した。ポリマー内部に UCNP を埋め込むことで細胞への直接暴露を避けつつ、均一なナノ粒子配置による安定した光照射環境を実現しており、このフィルムに 980 nm NIR 光を照射すると UCNPs から青色発光が起こり、ChR2 が吸収して細胞を光応答させる (図 1-10)。Shah らのこの研究は、UCNP と光遺伝学を組み合わせた先駆的な実証例となった。

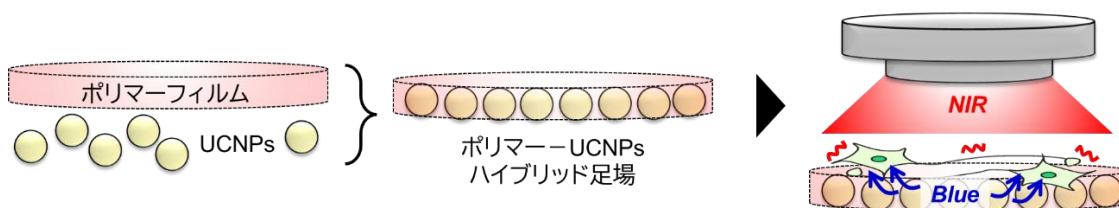


図 1-10 ポリマー-UCNP ハイブリッド足場を用いた NIR 光による ChR2 発現細胞活性化の模式図。

#### 1.4.1.2 *In vivo* 深部神経回路の光制御

UCNPs を利用した光遺伝学の中でも、とりわけ大きな発展を遂げた研究領域として中枢神経系 *in vivo* における深部神経回路の遠隔制御が挙げられる<sup>4-7</sup>。これは従来の可視光ベースの光遺伝学では光の組織透過性の制約から深部構造の制御が困難であったという問題に対し、NIR 光を深部まで安全に透過させ、局所で UCNPs が青色光へと変

換することで ChR2 を活性化する、という UCNP の最大の利点が最も強調される応用領域と言えるだろう。代表的な例として Chen ら<sup>4</sup>は、ドーパミン神経が光応答性を持つように、ChR2 と改良型黄色蛍光タンパク質 (Enhanced yellow fluorescent protein, EYFP) をチロシン水酸化酵素 (TH) Cre マウスの中脳腹側被蓋野 (Ventral tegmental area, VTA) に発現させた。4 週間後、同部位に NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP を注入し、外部から NIR 光を照射することで、UCNP による局所的な青色光発光で ChR2 陽性ニューロンを選択的に活性化できることを示した (図 1-11)。これにより細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇、ドーパミン放出、神経活動変化が誘導され、行動指標として回転行動の変化も確認された。これらの結果は、生体深部の神経回路を光ファイバーなしで非侵襲的に制御可能であることを初めて示した報告の一つである。この研究は、光遺伝学を深部制御へ拡張した決定的ブレークスルーであり、以後の脊髄刺激や疾患モデルへの応用研究の基盤となった。

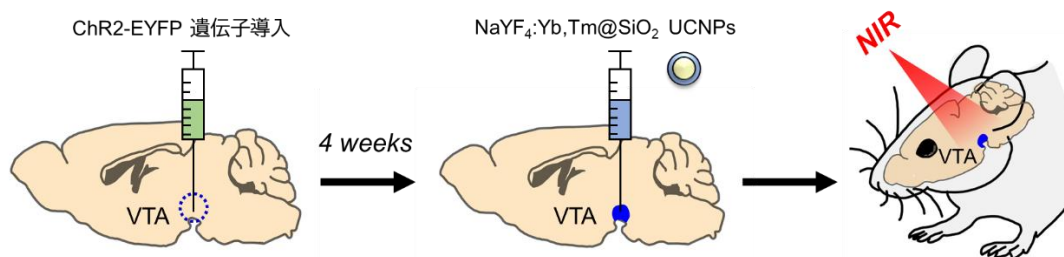


図 1-11 VTA を標的とした UCNP 介在型光遺伝学実験の概略図。

#### 1.4.1.3 筋細胞・心筋における ChR 依存的収縮制御

UCNPs を利用した光遺伝学的制御は神経細胞に限らず、心筋や骨格筋といった“興奮性組織”に対しても応用が進められている<sup>8,9</sup>。特に、厚みを有し光散乱の強い筋組織に対して、NIR 光を深部まで透過させたいうで局所的に青色光へ変換し ChR2 を活性化できるという点は、従来の可視光依存型光遺伝学では達成できなかった大きな利点であると言える。代表例として Rao ら<sup>9</sup>は、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP をポリジメチルシロキサン (Polydimethylsiloxane, PDMS) フィルム内に均一に封入した薄膜デバイスを作製し、これを心臓表面 (右心室) に貼付することで、NIR 光照射により青色光発光が起こり、心筋細胞に発現させた ChR2 を *in vivo* で確実に作動させることに成功した (図 1-12)。UCNP の高効率な上方変換発光とフィルムの柔軟性により、心拍リズムは照射する NIR 光の強度に応じて連続的に調節可能であり、心臓の拍動周期を外部から精密に制御でき

ることが示された。この研究は筋系における UCNP × 光遺伝学研究の中でも洗練された実証例の一つであり、心疾患治療、非侵襲的バイオデバイス、さらには筋生理学への応用展開に向けた大きな基盤を提供している。

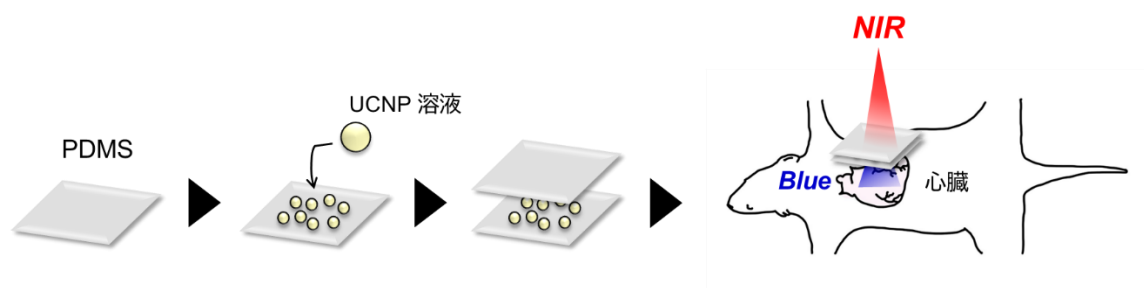


図 1-12 UCNP 封入フィルムによる NIR 駆動型の心筋における光遺伝学の概略図。

#### 1.4.1.4 *Caenorhabditis elegans* での行動制御

小動物モデルにおける UCNP 媒介光遺伝学は、*Caenorhabditis elegans* (以下、線虫) の逃避行動を NIR 光照射により誘導した Bansal ら<sup>14</sup>によって初めて概念実証が行われ、その後 Ao ら<sup>15</sup>が神経回路単位の精密制御へと発展させた。線虫は透明で全身が光学的に可視化可能であり、神経細胞数が 302 個と単純で行動表現型が明瞭であるため、光遺伝学的刺激が神経活動から行動へどのように反映されるかを解析する小動物モデルとして極めて有用である。特に NIR 光は可視光よりも線虫に対する非特異的な行動誘発(回避行動・熱反応など)が少なく、UCNPs の光変換特性と組み合わせることで、透明な小型生物においても外科的操作を必要としない非侵襲的な光刺激が可能となる。Ao らの研究<sup>15</sup>では、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNPs を線虫の口器付近および体表に取り込ませ、運動神経回路に発現させた赤色光感受性チャネルロドプシン Chrimson を NIR 光照射で活性化し、膜電位変化に由来する前進・後退行動の制御を実現した(図 1-13)。さらに、UCNPs の組織内分布、NIR 光強度に依存した行動応答、可視光刺激との比較解析などを包括的に行い、本手法が非特異的影響を最小化しつつ高い精度で神経活動を制御できることを示した。この成果は、小型動物モデルを用いた神経回路研究において、UCNPs を介した深部光操作が実用的かつ有効なアプローチであることを明確に示し、光遺伝学ツールの応用範囲を大幅に拡張した。

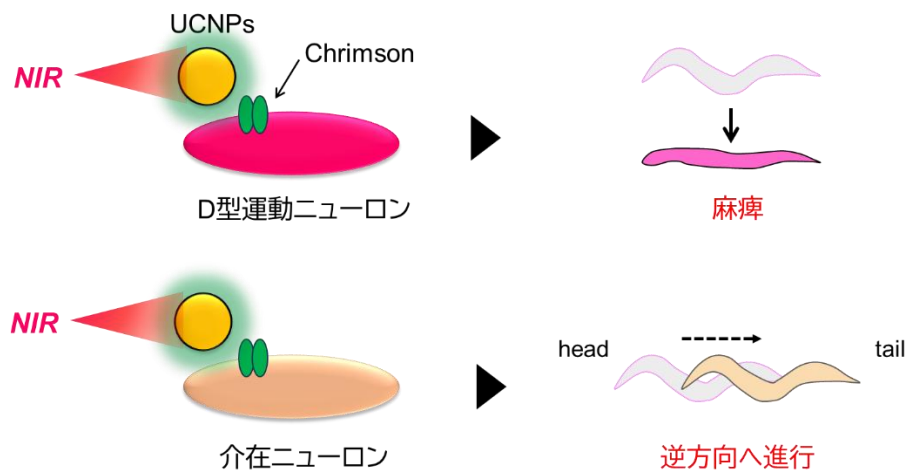


図 1-13 UCNPs を介した NIR 光刺激による線虫の神経回路依存的行動制御の模式図。

#### 1.4.1.5 非興奮性系における遺伝子発現型光遺伝学

前節まで扱ったチャンネルロドプシンによる興奮性細胞の光操作に対し、UCNPs を用いた光制御技術は、免疫細胞や腸内細菌といった“非興奮性”細胞へも応用が拡大している。これら非興奮性系では、チャンネルロドプシンを介した膜電位操作ではなく、光応答性プロモーターや光制御型転写因子を利用した遺伝子発現型の光遺伝学が主流である。この方式は、光刺激によって特定の遺伝子の発現、分泌、代謝経路を直接制御できる点に特徴があり、特に深部臓器に位置する細胞群に対して、NIR 光と UCNPs を組み合わせた光伝達技術が大きな役割を果たす<sup>10,13</sup>。Yang ら<sup>13</sup> は、遺伝子改変により光応答性タンパク質を発現させた腸内細菌と、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$  UCNPs を搭載したマイクロナノシステムを組み合わせることで、NIR 光照射による腸内局所での青色光発生→細菌からの治療因子の分泌→腸管免疫および全身免疫応答の増強という一連の光制御プロセスを実証した (図 1-14)。このシステムは、UCNPs の深部透過性と細菌の局所定着性を組み合わせることで、外部デバイスを一切必要とせず体内深部の免疫環境を遠隔調節できる点が大きな特徴であり、腫瘍微小環境の改善や抗腫瘍免疫の誘導など、従来の光遺伝学では達成不可能であった非神経系の光制御を可能にする重要な技術的前進となった。このように、UCNPs を介した光操作は、神経活動に限らず微生物・免疫・代謝など幅広い生理機能に波及しつつあり、本分野の応用範囲を大きく拡張するものである。

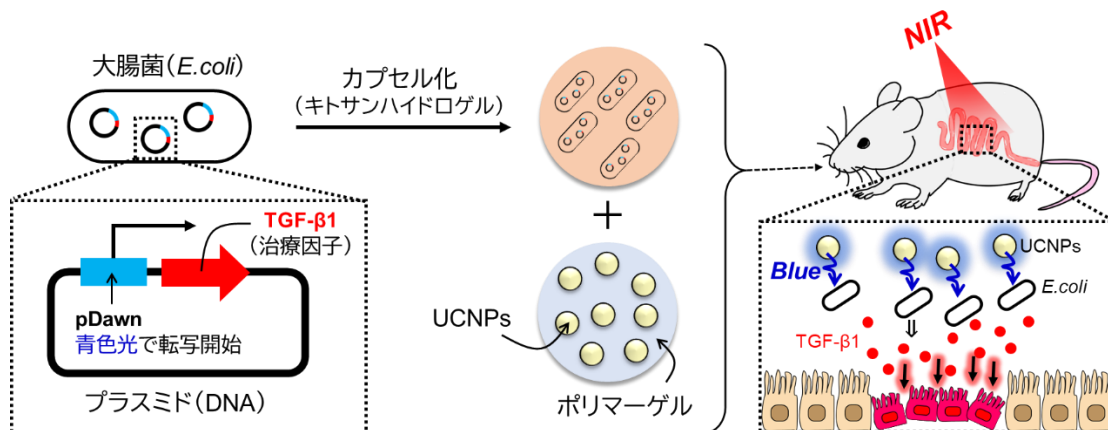


図 1-14 光応答性大腸菌と UCNP を組み合わせた腸内光制御システムの概略図。

#### 1.4.2 UCNP による双安定オプシン制御の課題

これまでの UCNP 光遺伝学研究は、そのほとんどがイオンチャネル型オプシン（特に ChR 系）を対象としており、GPCR 型オプシン、とりわけ光再生可能な双安定型オプシンを UCNP と組み合わせた例は報告されていない。パラピノプシン、OPN5、PdCO などの UV 光によって活性化する双安定型オプシンを UCNP の発光によって光刺激することを考えた場合、厄介な問題が浮上する。つまり、NIR 光励起によって UV 発光が可能な UCNP は、しばしばそれよりも強い青～緑色の発光ピークを同時に持ち<sup>124-131</sup>、この副産物的な可視光が往々にして双安定型オプシンを不活性化させる波長の光であるということである。ChR を光遺伝学ツールとして使用する場合には UCNP の発光に複数の波長の発光ピークが存在していても、ChR の活性化に必要な波長の光さえ含まれていれば大きな問題はないが、GPCR 型双安定型オプシンである OPN5 を多波長光源である UCNP を用いて実際に光制御できるかは自明ではない。単色 UV 光発光の UCNP を創製することはその発光機構に鑑みて原理的に極めて難しく、双安定型オプシンを UCNP 発光で制御しようとする場合にこの問題は不可避である。したがって、UCNP を利用した双安定型オプシン制御の可能性を明らかにすることは、光遺伝学における新しい領域を切り拓く上で重要である。

### 1.5 研究の目的

GPCR 型の双安定型オプシンを用いた光遺伝学は、従来のチャネルロドプシンを用いた手法とは異なるシグナル伝達経路を選択的に活性化できる点から、高い注目を集めて

いる。特に、OPN5はUV光で活性化し青色光で不活性化する特性をもち、深部組織応用の観点からも興味深い分子である。しかし、UV光は生体組織における散乱・吸収が大きく、直接照射には大きな制約がある。これらの問題を克服する手段として、NIR光励起で多波長発光を示すUCNPsを光源として利用するアプローチが提案されている。その一方で、 $Tm^{3+}$ をドープメントとするUCNPsはUV・青色を含む複数の発光ピークを同時に放射するため、活性化波長(UV)と不活性化波長(青色)が同時に細胞に照射されるという本質的な課題が存在する。このため、UCNPsがOPN5の活性化に寄与し得るかどうかは理論的にも実験的にも未解明であり、まずは*in vitro*細胞系において活性化の可能性を基礎的に検証することが不可欠である。

ここで明確にしておくべき重要な点として、本研究はNIR光による深部組織での*in vivo*光制御を目的とするものではない。NIR光の高い透過性は将来的な利点ではあるが、本研究の焦点は、「多波長発光を示すUCNPsが、細胞膜上に局在化したOPN5を活性化し得るか」を基礎的に明らかにすることにある。組織レベルでの光散乱・吸収、*in vivo*でのUCNP動態、薬物送達などの課題は、本研究の範囲外であり、今後の発展的研究課題と位置付ける。

本研究が扱う中心的な課題は以下の通りである：

1. OPN5発現細胞に対するUCNPsのターゲティング

OPN5を細胞外に提示するため、Snorkelシステムを用いて細胞外にFLAGタグを提示するOPN5発現プラスミドを設計・作製し、適切に発現する細胞系を構築する。その上で、FLAGタグ抗体、アビジン、ビオチン化UCNPsから成る結合系を最適化し、UCNPsをOPN5発現細胞の細胞膜表面に安定的に局在化させる。

2. NIR照射下における多波長発光UCNPsによるOPN5活性化の可能性の検証

UV・青色光が同時に放射される条件下で、OPN5が実際に活性化され得るかを、細胞内 $Ca^{2+}$ 応答を指標として評価する。

3. NIR光照射によるUCNPs発光のOPN5活性・不活性化の時間発展の定量的解析

$Ca^{2+}$ 応答の時間変化を反応速度論モデルで解析し、OPN5活性化種率の推移を定量化することで、UCNPsからの多波長発光光源下でのOPN5の活性・不活性化の挙動を解析し、その特徴を検討する。

第1章では、双安定型オプシンの一般的な特徴と、GPCRシグナル制御におけるその重要性を概説している。特に、UV光で活性化、青色光で不活性化するOPN5の光応答

特性を紹介し、双安定型オプシンの代表例として GPCR 型光遺伝学の応用可能性を整理する。さらに、NIR 光を UV・可視光へ変換できる UCNP の原理と、生体深部での非侵襲的光操作を可能にする材料としての利点を述べる。一方で、Tm<sup>3+</sup>ドープ UCNP は複数の発光ピークを同時に放射するため、双安定型オプシンに対して活性・不活性化波長が同時に作用し得るという未解決の課題が存在する。これまで UCNP を用いた光遺伝学はチャンネルロドプシンが中心であり、双安定型オプシンへの適用は報告例がない。本研究では、この点を踏まえ、UCNP を用いた双安定型オプシンの代表例として OPN5 活性化の可能性を基礎的に検証する手法を構築した。

第 2 章では、本研究で用いる NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル UCNP の合成に加え、その生成機構を先行研究と比較しながら体系的に整理する。特に、NaYF<sub>4</sub>系 UCNP で広く議論されてきた  $\alpha$  相から  $\beta$  相への相転移について、温度・時間・配位子・ドープ濃度が与える影響を文献的知見と自らの合成条件に基づき再検討する。また、高濃度 Yb<sup>3+</sup>ドープ下で  $\alpha$  相が残存しやすい理由や、オストワルド熟成による相転移機構についても考察し、本研究の反応条件で観察された粒子成長挙動を位置づける。

第 3 章では、後章の Ca<sup>2+</sup>応答実験に進むための前提として、UCNP を細胞表面の OPN5 へ確実に誘導するための系を構築する。まず、合成直後の疎水性 UCNP を PEG 化リン脂質およびビオチン化リン脂質を用いてカプセル化し、水分散性とビオチン基を付与する。続いて、Snorkel システムを用いて細胞外に FLAG タグを提示する OPN5 発現プラスミドを構築・作製する。最後に、リポフェクション法により OPN5 発現細胞を確立し、ビオチン-アビジン反応を利用した OPN5 への UCNP のターゲティングを可能にした。

第 4 章では、UCNP を介した OPN5 活性化の可能性を明らかにするため、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化を指標とした光応答解析を行う。まず、UV 光照射による既報の OPN5 応答を再現し、本研究で構築した OPN5 発現系の機能を確認する。続いて、UCNP@Biotin が結合した細胞に NIR 光を照射し、UCNP の多波長発光が OPN5 活性化に寄与し得るかを検証する。また、Ca<sup>2+</sup>シグナルの時間変化を速度論的モデルで解析することで、UCNP 発光と OPN5 活性・不活性化の関係を定量的に評価し、多波長発光源による双安定型オプシン制御の原理的理解を深める。

第 5 章では、各章で得られた成果を総括し、UCNP を用いた OPN5 光制御の意義をまとめた上で、今後の研究展開について展望する。

## 1.6 参考文献

- (1) Shah, S.; Liu, J.-J.; Pasquale, N.; Lai, J.; McGowan, H.; Pang, Z. P.; Lee, K.-B. Hybrid Upconversion Nanomaterials for Optogenetic Neuronal Control. *Nanoscale* **2015**, *7* (40), 16571-16577.
- (2) Hososhima, S.; Yuasa, H.; Ishizuka, T.; Hoque, M. R.; Yamashita, T.; Yamanaka, A.; Sugano, E.; Tomita, H.; Yawo, H. Near-Infrared (NIR) up-Conversion Optogenetics. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 16533.
- (3) Wu, X.; Zhang, Y.; Takle, K.; Bilsel, O.; Li, Z.; Lee, H.; Zhang, Z.; Li, D.; Fan, W.; Duan, C.; Chan, E. M.; Lois, C.; Xiang, Y.; Han, G. Dye-Sensitized Core/Active Shell Upconversion Nanoparticles for Optogenetics and Bioimaging Applications. *ACS Nano* **2016**, *10* (1), 1060-1066.
- (4) Chen, S.; Weitemier, A. Z.; Zeng, X.; He, L.; Wang, X.; Tao, Y.; Huang, A. J. Y.; Hashimoto, Y.; Kano, M.; Iwasaki, H.; Parajuli, L. K.; Okabe, S.; Teh, D. B. L.; All, A. H.; Tsutsui-Kimura, I.; Tanaka, K. F.; Liu, X.; McHugh, T. J. Near-Infrared Deep Brain Stimulation via Upconversion Nanoparticle-Mediated Optogenetics. *Science* **2018**, *359* (6376), 679-684.
- (5) Liu, X.; Chen, H.; Wang, Y.; Si, Y.; Zhang, H.; Li, X.; Zhang, Z.; Yan, B.; Jiang, S.; Wang, F.; Weng, S.; Xu, W.; Zhao, D.; Zhang, J.; Zhang, F. Near-Infrared Manipulation of Multiple Neuronal Populations via Trichromatic Upconversion. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 5662.
- (6) Wang, Y.; Xie, K.; Yue, H.; Chen, X.; Luo, X.; Liao, Q.; Liu, M.; Wang, F.; Shi, P. Flexible and Fully Implantable Upconversion Device for Wireless Optogenetic Stimulation of the Spinal Cord in Behaving Animals. *Nanoscale* **2020**, *12* (4), 2406-2414.
- (7) Yan, J.; Wan, Y.; Ji, Z.; Li, C.; Tao, C.; Tang, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Liu, J. Motor Neuron - specific Membrane Depolarization of Transected Peripheral Nerves by Upconversion Nanoparticle - mediated Optogenetics. *Adv. Funct. Mater.* **2023**, *33* (50), 2303992.
- (8) Maemura, D.; Le, T. S.; Takahashi, M.; Matsumura, K.; Maenosono, S. Optogenetic Calcium Ion Influx in Myoblasts and Myotubes by Near-Infrared Light Using Upconversion Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (36), 42196-42208.
- (9) Rao, P.; Wang, L.; Cheng, Y.; Wang, X.; Li, H.; Zheng, G.; Li, Z.; Jiang, C.; Zhou, Q.; Huang, C. Near-Infrared Light Driven Tissue-Penetrating Cardiac Optogenetics via Upconversion Nanoparticles in Vivo. *Biomed. Opt. Express* **2020**, *11* (3), 1401-1416.
- (10) He, L.; Zhang, Y.; Ma, G.; Tan, P.; Li, Z.; Zang, S.; Wu, X.; Jing, J.; Fang, S.; Zhou, L.; Wang, Y.; Huang, Y.; Hogan, P. G.; Han, G.; Zhou, Y. Near-Infrared Photoactivatable Control of Ca<sup>2+</sup> Signaling and Optogenetic Immunomodulation. *eLife* **2015**, *4*, e10024.
- (11) Zheng, B.; Wang, H.; Pan, H.; Liang, C.; Ji, W.; Zhao, L.; Chen, H.; Gong, X.; Wu, X.; Chang, J. Near-Infrared Light Triggered Upconversion Optogenetic Nanosystem for Cancer Therapy. *ACS Nano* **2017**, *11* (12), 11898-11907.
- (12) Chu, H.; Zhao, J.; Mi, Y.; Di, Z.; Li, L. NIR-Light-Mediated Spatially Selective Triggering of Anti-Tumor Immunity via Upconversion Nanoparticle-Based Immunodevices. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 2839.
- (13) Yang, C.; Cui, M.; Zhang, Y.; Pan, H.; Liu, J.; Wang, S.; Ma, N.; Chang, J.; Sun, T.; Wang, H. Upconversion Optogenetic Micro-Nanosystem Optically Controls the Secretion of Light-Responsive Bacteria for Systemic Immunity Regulation. *Commun. Biol.* **2020**, *3* (1), 561.

- (14) Bansal, A.; Liu, H.; Jayakumar, M. K. G.; Andersson-Engels, S.; Zhang, Y. Quasi-Continuous Wave near-Infrared Excitation of Upconversion Nanoparticles for Optogenetic Manipulation of *C. Elegans*. *Small* **2016**, *12* (13), 1732-1743.
- (15) Ao, Y.; Zeng, K.; Yu, B.; Miao, Y.; Hung, W.; Yu, Z.; Xue, Y.; Tan, T. T. Y.; Xu, T.; Zhen, M.; Yang, X.; Zhang, Y.; Gao, S. An Upconversion Nanoparticle Enables near Infrared-Optogenetic Manipulation of the *Caenorhabditis Elegans* Motor Circuit. *ACS Nano* **2019**, *13* (3), 3373-3386.
- (16) Ai, X.; Ho, C. J. H.; Aw, J.; Attia, A. B. E.; Mu, J.; Wang, Y.; Wang, X.; Wang, Y.; Liu, X.; Chen, H.; Gao, M.; Chen, X.; Yeow, E. K. L.; Liu, G.; Olivo, M.; Xing, B. In Vivo Covalent Cross-Linking of Photon-Converted Rare-Earth Nanostructures for Tumour Localization and Theranostics. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (1), 10432.
- (17) Qu, A.; Wu, X.; Li, S.; Sun, M.; Xu, L.; Kuang, H.; Xu, C. An NIR-Responsive DNA-Mediated Nanotetrahedron Enhances the Clearance of Senescent Cells. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (14), e2000184.
- (18) Chen, C.; Wang, F.; Wen, S.; Su, Q. P.; Wu, M. C. L.; Liu, Y.; Wang, B.; Li, D.; Shan, X.; Kianinia, M.; Aharonovich, I.; Toth, M.; Jackson, S. P.; Xi, P.; Jin, D. Multi-Photon near-Infrared Emission Saturation Nanoscopy Using Upconversion Nanoparticles. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 3290.
- (19) Zeng, X.; Chen, S.; Weitemier, A.; Han, S.; Blasiak, A.; Prasad, A.; Zheng, K.; Yi, Z.; Luo, B.; Yang, I.-H.; Thakor, N.; Chai, C.; Lim, K.-L.; McHugh, T. J.; All, A. H.; Liu, X. Visualization of Intra - neuronal Motor Protein Transport through Upconversion Microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2019**, *58* (27), 9262-9268.
- (20) Peng, J.; Xu, W.; Teoh, C. L.; Han, S.; Kim, B.; Samanta, A.; Er, J. C.; Wang, L.; Yuan, L.; Liu, X.; Chang, Y.-T. High-Efficiency in Vitro and in Vivo Detection of  $Zn^{2+}$  by Dye-Assembled Upconversion Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (6), 2336-2342.
- (21) Ai, X.; Wang, Z.; Cheong, H.; Wang, Y.; Zhang, R.; Lin, J.; Zheng, Y.; Gao, M.; Xing, B. Multispectral Optoacoustic Imaging of Dynamic Redox Correlation and Pathophysiological Progression Utilizing Upconversion Nanoprobes. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1087.
- (22) Boyden, E. S. A History of Optogenetics: The Development of Tools for Controlling Brain Circuits with Light. *F1000 Biol. Rep.* **2011**, *3*, 11.
- (23) Boyden, E. S. Optogenetics: Using Light to Control the Brain. *Cerebrum* **2011**, *2011*, 16.
- (24) Guru, A.; Post, R. J.; Ho, Y.-Y.; Warden, M. R. Making Sense of Optogenetics. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2015**, *18* (11), yv079.
- (25) Chen, W.; Li, C.; Liang, W.; Li, Y.; Zou, Z.; Xie, Y.; Liao, Y.; Yu, L.; Lin, Q.; Huang, M.; Li, Z.; Zhu, X. The Roles of Optogenetics and Technology in Neurobiology: A Review. *Front. Aging Neurosci.* **2022**, *14*, 867863.
- (26) Zhao, H.; Yue, H.; Chou, W.; Yang, S.; Liu, Y.; He, M.; Li, Y.; Guo, J.; Qiu, H.; Xiao, Y.; Gu, Y. Optogenetic Technology: Breakthroughs and Challenges from Basic Research to Clinical Translation. *Adv. Photonics* **2025**, *7* (05).
- (27) Crick, F. H. Thinking about the Brain. *Sci. Am.* **1979**, *241* (3), 219-232.
- (28) Piatkevich, K. D.; Boyden, E. S. Optogenetic Control of Neural Activity: The Biophysics of Microbial Rhodopsins in Neuroscience. *Q. Rev. Biophys.* **2023**, *57*, e1.
- (29) Crick, F. The Impact of Molecular Biology on Neuroscience. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1999**, *354* (1392), 2021-2025.

- (30) Boyden, E. S.; Zhang, F.; Bamberg, E.; Nagel, G.; Deisseroth, K. Millisecond-Timescale, Genetically Targeted Optical Control of Neural Activity. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8* (9), 1263-1268.
- (31) Martin, J. H.; Ghez, C. Pharmacological Inactivation in the Analysis of the Central Control of Movement. *J. Neurosci. Methods* **1999**, *86* (2), 145-159.
- (32) Stuber, G. D.; Mason, A. O. Integrating Optogenetic and Pharmacological Approaches to Study Neural Circuit Function: Current Applications and Future Directions. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65* (1), 156-170.
- (33) Deisseroth, K. Circuit Dynamics of Adaptive and Maladaptive Behaviour. *Nature* **2014**, *505* (7483), 309-317.
- (34) Park, S.-J.; Gazzola, M.; Park, K. S.; Park, S.; Di Santo, V.; Blevins, E. L.; Lind, J. U.; Campbell, P. H.; Dauth, S.; Capulli, A. K.; Pasqualini, F. S.; Ahn, S.; Cho, A.; Yuan, H.; Maoz, B. M.; Vijaykumar, R.; Choi, J.-W.; Deisseroth, K.; Lauder, G. V.; Mahadevan, L.; Parker, K. K. Phototactic Guidance of a Tissue-Engineered Soft-Robotic Ray. *Science* **2016**, *353* (6295), 158-162.
- (35) Han, X.; Boyden, E. S. Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution. *PLoS One* **2007**, *2* (3), e299.
- (36) Fenno, L.; Yizhar, O.; Deisseroth, K. The Development and Application of Optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* **2011**, *34*, 389-412.
- (37) Deisseroth, K. Optogenetics: 10 Years of Microbial Opsins in Neuroscience. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18* (9), 1213-1225.
- (38) Ernst, O. P.; Lodowski, D. T.; Elstner, M.; Hegemann, P.; Brown, L. S.; Kandori, H. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 126-163.
- (39) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **2000**, *289* (5480), 739-745.
- (40) Ritter, E.; Stehfest, K.; Berndt, A.; Hegemann, P.; Bartl, F. J. Monitoring Light-Induced Structural Changes of Channelrhodopsin-2 by UV-Visible and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (50), 35033-35041.
- (41) Bamann, C.; Kirsch, T.; Nagel, G.; Bamberg, E. Spectral Characteristics of the Photocycle of Channelrhodopsin-2 and Its Implication for Channel Function. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375* (3), 686-694.
- (42) Cardin, J. A.; Carlén, M.; Meletis, K.; Knoblich, U.; Zhang, F.; Deisseroth, K.; Tsai, L.-H.; Moore, C. I. Targeted Optogenetic Stimulation and Recording of Neurons in Vivo Using Cell-Type-Specific Expression of Channelrhodopsin-2. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (2), 247-254.
- (43) Pulver, S. R.; Hornstein, N. J.; Land, B. L.; Johnson, B. R. Optogenetics in the Teaching Laboratory: Using Channelrhodopsin-2 to Study the Neural Basis of Behavior and Synaptic Physiology in *Drosophila*. *Adv. Physiol. Educ.* **2011**, *35* (1), 82-91.
- (44) Dawydow, A.; Gueta, R.; Ljaschenko, D.; Ullrich, S.; Hermann, M.; Ehmann, N.; Gao, S.; Fiala, A.; Langenhan, T.; Nagel, G.; Kittel, R. J. Channelrhodopsin-2-XXL, a Powerful Optogenetic Tool for Low-Light Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (38), 13972-13977.
- (45) Arrenberg, A. B.; Del Bene, F.; Baier, H. Optical Control of Zebrafish Behavior with Halorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (42), 17968-17973.

- (46) Pierce, K. L.; Premont, R. T.; Lefkowitz, R. J. Seven-Transmembrane Receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3* (9), 639-650.
- (47) Rosenbaum, D. M.; Rasmussen, S. G. F.; Kobilka, B. K. The Structure and Function of G-Protein-Coupled Receptors. *Nature* **2009**, *459* (7245), 356-363.
- (48) Airan, R. D.; Thompson, K. R.; Fenno, L. E.; Bernstein, H.; Deisseroth, K. Temporally Precise in Vivo Control of Intracellular Signalling. *Nature* **2009**, *458* (7241), 1025-1029.
- (49) Oh, E.; Maejima, T.; Liu, C.; Deneris, E.; Herlitze, S. Substitution of 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Signaling by a Light-Activated G Protein-Coupled Receptor. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (40), 30825-30836.
- (50) Tsukamoto, H. Functional Characteristics of Animal Opsins as Optical Control Tools. *Hikaku Seiri seikagaku(Comp. Physiol. Biochem.)* **2022**, *39* (2), 84-91.
- (51) Terakita, A. The Opsins. *Genome Biol.* **2005**, *6* (3), 213.
- (52) Koyanagi, M.; Terakita, A. Diversity of Animal Opsin-Based Pigments and Their Optogenetic Potential. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1837* (5), 710-716.
- (53) Guido, M. E.; Marchese, N. A.; Rios, M. N.; Morera, L. P.; Diaz, N. M.; Garbarino-Pico, E.; Contin, M. A. Non-Visual Opsins and Novel Photo-Detectors in the Vertebrate Inner Retina Mediate Light Responses within the Blue Spectrum Region. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2022**, *42* (1), 59-83.
- (54) Andrabi, M.; Upton, B. A.; Lang, R. A.; Vemaraju, S. An Expanding Role for Nonvisual Opsins in Extraocular Light Sensing Physiology. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **2023**, *9*, 245-267.
- (55) Koelle, M. R. Neurotransmitter Signaling through Heterotrimeric G Proteins: Insights from Studies in *C. Elegans*. *WormBook* **2018**, *2018*, 1-52.
- (56) Ekechukwu, O. N.; Christian, M. Metabolic Responses of Light and Taste Receptors - Unexpected Actions of GPCRs in Adipocytes. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2022**, *23* (1), 111-120.
- (57) Tse, L. H.; Wong, Y. H. GPCRs in Autocrine and Paracrine Regulations. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 428.
- (58) Basili, D.; Gioacchini, G.; Todisco, V.; Candelma, M.; Marisaldi, L.; Pappalardo, L.; Carnevali, O. Opsins and Gonadal Circadian Rhythm in the Swordfish (*Xiphias Gladius*) Ovary: Their Potential Roles in Puberty and Reproductive Seasonality. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2021**, *303* (113707), 113707.
- (59) Zhang, M.; Chen, T.; Lu, X.; Lan, X.; Chen, Z.; Lu, S. G Protein-Coupled Receptors (GPCRs): Advances in Structures, Mechanisms, and Drug Discovery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9* (1), 88.
- (60) Iwasaki, M.; Sakai, Y.; Shirata, T.; Sugihara, T.; Koyanagi, M.; Terakita, A. Characterization of Anthozoan-Specific Opsins from a Reef-Building Coral, *Acropora Tenuis*, as Gq-Coupled Opsins. *Zoolog. Sci.* **2025**, *42* (2), 196-205.
- (61) Yau, K.-W.; Hardie, R. C. Phototransduction Motifs and Variations. *Cell* **2009**, *139* (2), 246-264.
- (62) Okano, T.; Yoshizawa, T.; Fukada, Y. Pinopsin Is a Chicken Pineal Photoreceptive Molecule. *Nature* **1994**, *372* (6501), 94-97.
- (63) Max, M.; McKinnon, P. J.; Seidenman, K. J.; Barrett, R. K.; Applebury, M. L.; Takahashi, J. S.; Margolskee, R. F. Pineal Opsin: A Nonvisual Opsin Expressed in Chick Pineal. *Science* **1995**, *267* (5203), 1502-1506.

- (64) Koyanagi, M.; Takada, E.; Nagata, T.; Tsukamoto, H.; Terakita, A. Homologs of Vertebrate Opn3 Potentially Serve as a Light Sensor in Nonphotoreceptive Tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (13), 4998-5003.
- (65) Kojima, D.; Terakita, A.; Ishikawa, T.; Tsukahara, Y.; Maeda, A.; Shichida, Y. A Novel G $\alpha$ -Mediated Phototransduction Cascade in Scallop Visual Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (37), 22979-22982.
- (66) Yamashita, T.; Ohuchi, H.; Tomonari, S.; Ikeda, K.; Sakai, K.; Shichida, Y. Opn5 Is a UV-Sensitive Bistable Pigment That Couples with Gi Subtype of G Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (51), 22084-22089.
- (67) Kojima, D.; Mori, S.; Torii, M.; Wada, A.; Morishita, R.; Fukada, Y. UV-Sensitive Photoreceptor Protein OPN5 in Humans and Mice. *PLoS One* **2011**, *6* (10), e26388.
- (68) Koyanagi, M.; Takano, K.; Tsukamoto, H.; Ohtsu, K.; Tokunaga, F.; Terakita, A. Jellyfish Vision Starts with CAMP Signaling Mediated by Opsin-G(s) Cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (40), 15576-15580.
- (69) Hardie, R. C.; Raghu, P. Visual Transduction in *Drosophila*. *Nature* **2001**, *413* (6852), 186-193.
- (70) Koyanagi, M.; Nagata, T.; Katoh, K.; Yamashita, S.; Tokunaga, F. Molecular Evolution of Arthropod Color Vision Deduced from Multiple Opsin Genes of Jumping Spiders. *J. Mol. Evol.* **2008**, *66* (2), 130-137.
- (71) Huang, J.; Liu, C.-H.; Hughes, S. A.; Postma, M.; Schwiening, C. J.; Hardie, R. C. Activation of TRP Channels by Protons and Phosphoinositide Depletion in *Drosophila* Photoreceptors. *Curr. Biol.* **2010**, *20* (3), 189-197.
- (72) Rayer, B.; Naynert, M.; Stieve, H. New Trends in Photobiology. *J. Photochem. Photobiol. B* **1990**, *7* (2-4), 107-148.
- (73) Rogers, K. *Rhodopsin*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/rhodopsin> (accessed 2025-04-03).
- (74) Tsukamoto, H.; Terakita, A. Diversity and Functional Properties of Bistable Pigments. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9* (11), 1435-1443.
- (75) Spangler, S. M.; Bruchas, M. R. Optogenetic Approaches for Dissecting Neuromodulation and GPCR Signaling in Neural Circuits. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2017**, *32*, 56-70.
- (76) Abreu, N.; Levitz, J. Optogenetic Techniques for Manipulating and Sensing G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2173*, 21-51.
- (77) Wietek, J.; Nozownik, A.; Pulin, M.; Saraf-Sinik, I.; Matosevich, N.; Gowrishankar, R.; Gat, A.; Malan, D.; Brown, B. J.; Dine, J.; Imambocus, B. N.; Levy, R.; Sauter, K.; Litvin, A.; Regev, N.; Subramaniam, S.; Abrera, K.; Summarli, D.; Goren, E. M.; Mizrachi, G.; Bitton, E.; Benjamin, A.; Copits, B. A.; Sasse, P.; Rost, B. R.; Schmitz, D.; Bruchas, M. R.; Soba, P.; Oren-Suissa, M.; Nir, Y.; Wiegert, J. S.; Yizhar, O. A Bistable Inhibitory OptoGPCR for Multiplexed Optogenetic Control of Neural Circuits. *Nat. Methods* **2024**, *21* (7), 1275-1287.
- (78) Spoida, K.; Eickelbeck, D.; Karapinar, R.; Eckhardt, T.; Mark, M. D.; Jancke, D.; Ehinger, B. V.; König, P.; Dalkara, D.; Herlitze, S.; Masseck, O. A. Melanopsin Variants as Intrinsic Optogenetic on and off Switches for Transient versus Sustained Activation of G Protein Pathways. *Curr. Biol.* **2016**, *26* (9), 1206-1212.
- (79) Melyan, Z.; Tarttelin, E. E.; Bellingham, J.; Lucas, R. J.; Hankins, M. W. Addition of Human Melanopsin Renders Mammalian Cells Photoresponsive. *Nature* **2005**, *433* (7027), 741-745.

- (80) Brown, R. L.; Robinson, P. R. Melanopsin--Shedding Light on the Elusive Circadian Photopigment. *Chronobiol. Int.* **2004**, *21* (2), 189-204.
- (81) Piorz, V.; Tam, S. K. E.; Hughes, S.; Pothecary, C. A.; Jagannath, A.; Hankins, M. W.; Bannerman, D. M.; Lightman, S. L.; Vyazovskiy, V. V.; Nolan, P. M.; Foster, R. G.; Peirson, S. N. Melanopsin Regulates Both Sleep-Promoting and Arousal-Promoting Responses to Light. *PLoS Biol.* **2016**, *14* (6), e1002482.
- (82) Lazzerini Ospri, L.; Prusky, G.; Hattar, S. Mood, the Circadian System, and Melanopsin Retinal Ganglion Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **2017**, *40* (Volume 40, 2017), 539-556.
- (83) Koyanagi, M.; Kawano, E.; Kinugawa, Y.; Oishi, T.; Shichida, Y.; Tamotsu, S.; Terakita, A. Bistable UV Pigment in the Lamprey Pineal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (17), 6687-6691.
- (84) Kawano-Yamashita, E.; Koyanagi, M.; Wada, S.; Tsukamoto, H.; Nagata, T.; Terakita, A. Activation of Transducin by Bistable Pigment Parapinopsin in the Pineal Organ of Lower Vertebrates. *PLoS One* **2015**, *10* (10), e0141280.
- (85) Jiang, X.; Pardue, M. T.; Mori, K.; Ikeda, S.-I.; Torii, H.; D' Souza, S.; Lang, R. A.; Kurihara, T.; Tsubota, K. Violet Light Suppresses Lens-Induced Myopia via Neuropsin (OPN5) in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118* (22).
- (86) Tarttelin, E. E.; Bellingham, J.; Hankins, M. W.; Foster, R. G.; Lucas, R. J. Neuropsin (Opn5): A Novel Opsin Identified in Mammalian Neural Tissue1. *FEBS Lett.* **2003**, *554* (3), 410-416.
- (87) Zhang, K. X.; D' Souza, S.; Upton, B. A.; Kernodle, S.; Vemaraju, S.; Nayak, G.; Gaitonde, K. D.; Holt, A. L.; Linne, C. D.; Smith, A. N.; Petts, N. T.; Batie, M.; Mukherjee, R.; Tiwari, D.; Buhr, E. D.; Van Gelder, R. N.; Gross, C.; Sweeney, A.; Sanchez-Gurmaches, J.; Seeley, R. J.; Lang, R. A. Violet-Light Suppression of Thermogenesis by Opsin 5 Hypothalamic Neurons. *Nature* **2020**, *585* (7825), 420-425.
- (88) Fukuda, A.; Sato, K.; Fujimori, C.; Yamashita, T.; Takeuchi, A.; Ohuchi, H.; Umatani, C.; Kanda, S. Direct Photoreception by Pituitary Endocrine Cells Regulates Hormone Release and Pigmentation. *Science* **2025**, *387* (6729), 43-48.
- (89) Ash, C.; Dubec, M.; Donne, K.; Bashford, T. Effect of Wavelength and Beam Width on Penetration in Light-Tissue Interaction Using Computational Methods. *Lasers Med. Sci.* **2017**, *32* (8), 1909-1918.
- (90) Chen, G.; Cao, Y.; Tang, Y.; Yang, X.; Liu, Y.; Huang, D.; Zhang, Y.; Li, C.; Wang, Q. Advanced Near-Infrared Light for Monitoring and Modulating the Spatiotemporal Dynamics of Cell Functions in Living Systems. *Adv. Sci. (Weinh.)* **2020**, *7* (8), 1903783.
- (91) Pearson, S.; Feng, J.; del Campo, A. Lighting the Path: Light Delivery Strategies to Activate Photoresponsive Biomaterials in Vivo. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31* (50), 2105989.
- (92) Pollnau, M.; Gamelin, D. R.; Lüthi, S. R.; Güdel, H. U.; Hehlen, M. P. Power Dependence of Upconversion Luminescence in Lanthanide and Transition-Metal-Ion Systems. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **2000**, *61* (5), 3337-3346.
- (93) Auzel, F. Compteur quantique par transfert d'énergie entre deux ions de terres rares dans un tungstate mixte et dans un verre germanate. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1966**, *262*, 1016-1019.
- (94) Auzel, F. Compteur quantique par transfert d'énergie entre deux ions de terres rares dans un tungstate mixte et dans un verre germanate. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1966**, *263*, 819-821.

- (95) Tu, D.; Liu, Y.; Zhu, H.; Li, R.; Liu, L.; Chen, X. Breakdown of Crystallographic Site Symmetry in Lanthanide-Doped NaYF<sub>4</sub> Crystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (4), 1128-1133.
- (96) Zhang, Y.; Shen, Y.; Liu, M.; Han, Y.; Mo, X.; Jiang, R.; Lei, Z.; Liu, Z.; Shi, F.; Qin, W. Enhanced High-Order Ultraviolet Upconversion Luminescence in Sub-20 nm  $\beta$ -NaYbF<sub>4</sub>:0.5% Tm Nanoparticles via Fe<sup>3+</sup> Doping. *CrystEngComm* **2017**, *19* (9), 1304-1310.
- (97) Huang, D.; Li, F.; Ågren, H.; Chen, G. Inhibiting Concentration Quenching in Yb<sup>3+</sup>-Tm<sup>3+</sup> Upconversion Nanoparticles by Suppressing Back Energy Transfer. *Nat. Commun.* **2025**, *16* (1), 4218.
- (98) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (10), 5161-5214.
- (99) Bian, W.; Lin, Y.; Wang, T.; Yu, X.; Qiu, J.; Zhou, M.; Luo, H.; Yu, S. F.; Xu, X. Direct Identification of Surface Defects and Their Influence on the Optical Characteristics of Upconversion Nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12* (4), 3623-3628.
- (100) Ivaturi, A.; MacDougall, S. K. W.; Martín-Rodríguez, R.; Quintanilla, M.; Marques-Hueso, J.; Krämer, K. W.; Meijerink, A.; Richards, B. S. Optimizing Infrared to near Infrared Upconversion Quantum Yield of  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Er<sup>3+</sup> in Fluoropolymer Matrix for Photovoltaic Devices. *J. Appl. Phys.* **2013**, *114* (1), 013505.
- (101) Menyuk, N.; Dwight, K.; Pierce, J. W. NaYF<sub>4</sub> : Yb,Er—an Efficient Upconversion Phosphor. *Appl. Phys. Lett.* **1972**, *21* (4), 159-161.
- (102) Sommerdijk, J. L.; Bril, A. *Phosphors for the conversion of infrared radiation into visible light*. [https://pearl-hifi.com/06\\_Lit\\_Archive/02\\_PEARL\\_Arch/Vol\\_16/Sec\\_53/Philips\\_Tech\\_Review/PTechReview-34-1974-024.pdf](https://pearl-hifi.com/06_Lit_Archive/02_PEARL_Arch/Vol_16/Sec_53/Philips_Tech_Review/PTechReview-34-1974-024.pdf) (accessed 2025-11-07).
- (103) Tanabe, S.; Hirao, K.; Soga, N. Upconversion Fluorescences of TeO<sub>2</sub>- and Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Based Oxide Glasses Containing Er<sup>3+</sup>. *J. Non Cryst. Solids* **1990**, *122* (1), 79-82.
- (104) Hua, Y.-M.; Li, Q.; Chen, Y.-L.; Chen, Y.-X. Frequency Upconversion in Er<sup>3+</sup>- and -Doped Silica Fibers. *Opt. Commun.* **1992**, *88* (4-6), 441-445.
- (105) Shinn, M. D.; Sibley, W. A.; Drexhage, M. G.; Brown, R. N. Optical Transitions Of Er<sup>3+</sup> ions in Fluorozirconate Glass. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1983**, *27* (11), 6635-6648.
- (106) Yeh, D. C.; Sibley, W. A.; Schneider, I.; Afzal, R. S.; Aggarwal, I. Intensity-Dependent Upconversion Efficiencies of Er<sup>3+</sup> Ions in Heavy-Metal Fluoride Glass. *J. Appl. Phys.* **1991**, *69* (3), 1648-1653.
- (107) Heer, S.; Kömpe, K.; Güdel, H.-U.; Haase, M. Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide - doped NaYF<sub>4</sub> Nanocrystals. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (23-24), 2102-2105.
- (108) Yi, G.; Lu, H.; Zhao, S.; Ge, Y.; Yang, W.; Chen, D.; Guo, L.-H. Synthesis, Characterization, and Biological Application of Size-Controlled Nanocrystalline NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er Infrared-to-Visible up-Conversion Phosphors. *Nano Lett.* **2004**, *4* (11), 2191-2196.
- (109) Zeng, J.-H.; Su, J.; Li, Z.-H.; Yan, R.-X.; Li, Y.-D. Synthesis and Upconversion Luminescence of Hexagonal - phase NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er<sup>3+</sup> Phosphors of Controlled Size and Morphology. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (17), 2119-2123.

- (110) Yi, G. S.; Chow, G. M. Synthesis of Hexagonal - phase NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er and NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm Nanocrystals with Efficient Up - conversion Fluorescence. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16* (18), 2324-2329.
- (111) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Si, R.; Yan, Z.-G.; Sun, L.-D.; You, L.-P.; Yan, C.-H. High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (19), 6426-6436.
- (112) Hofmann, K. P.; Lamb, T. D. Rhodopsin, Light-Sensor of Vision. *Prog. Retin. Eye Res.* **2023**, *93*, 101116.
- (113) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (3), 142-155.
- (114) Lochner, J. E.; Kingma, M.; Kuhn, S.; Meliza, C. D.; Cutler, B.; Scalettar, B. A. Real-Time Imaging of the Axonal Transport of Granules Containing a Tissue Plasminogen Activator/Green Fluorescent Protein Hybrid. *Mol. Biol. Cell* **1998**, *9* (9), 2463-2476.
- (115) Ganguly, A.; Roy, S. Using Photoactivatable GFP to Track Axonal Transport Kinetics. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1148*, 203-215.
- (116) Cui, B.; Wu, C.; Chen, L.; Ramirez, A.; Bearer, E. L.; Li, W.-P.; Mobley, W. C.; Chu, S. One at a Time, Live Tracking of NGF Axonal Transport Using Quantum Dots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (34), 13666-13671.
- (117) Chang, Y.-P.; Pinaud, F.; Antelman, J.; Weiss, S. Tracking Bio-Molecules in Live Cells Using Quantum Dots. *J. Biophotonics* **2008**, *1* (4), 287-298.
- (118) Ntziachristos, V. Going Deeper than Microscopy: The Optical Imaging Frontier in Biology. *Nat. Methods* **2010**, *7* (8), 603-614.
- (119) Hardman, R. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114* (2), 165-172.
- (120) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. Drug Delivery with Upconversion Nanoparticles for Multi-Functional Targeted Cancer Cell Imaging and Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32* (4), 1110-1120.
- (121) Zheng, S.; Zhang, H.; Sheng, T.; Xiang, Y.; Wang, J.; Tang, Y.; Wu, Y.; Liu, J.; Zhu, X.; Zhang, Y. Photoswitchable Upconversion Nanoparticles with Excitation-Dependent Emission for Programmed Stepwise NIR Phototherapy. *iScience* **2023**, *26* (10), 107859.
- (122) Zhang, Z.; Han, Q.; Lau, J. W.; Xing, B. Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles Meet the Needs for Cutting-Edge Bioapplications: Recent Progress and Perspectives. *ACS Materials Lett.* **2020**, *2* (11), 1516-1531.
- (123) Mahata, M. K.; De, R.; Lee, K. T. Near-Infrared-Triggered Upconverting Nanoparticles for Biomedicine Applications. *Biomedicines* **2021**, *9* (7), 756.
- (124) Wang, F.; Deng, R.; Wang, J.; Wang, Q.; Han, Y.; Zhu, H.; Chen, X.; Liu, X. Tuning Upconversion through Energy Migration in Core-Shell Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2011**, *10* (12), 968-973.
- (125) Karami, A.; de Prinse, T. J.; Spooner, N. A.; Kidd, S. P.; Sumbly, C. J.; Bi, J. UV Emission from Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles in Super-Resolution Microscopy: Potential for Cellular Damage. *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6* (8), 7031-7043.
- (126) Lin, X.; Chen, X.; Zhang, W.; Sun, T.; Fang, P.; Liao, Q.; Chen, X.; He, J.; Liu, M.; Wang, F.; Shi, P. Core-Shell-Shell Upconversion Nanoparticles with Enhanced Emission for Wireless Optogenetic Inhibition. *Nano Lett.* **2018**, *18* (2), 948-956.

- (127) Wiesholler, L. M.; Genslein, C.; Schroter, A.; Hirsch, T. Plasmonic Enhancement of NIR to UV Upconversion by a Nanoengineered Interface Consisting of NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm Nanoparticles and a Gold Nanotriangle Array for Optical Detection of Vitamin B12 in Serum. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (24), 14247-14254.
- (128) Nguyen, N. T.; Kim, J.; Le, X. T.; Lee, W. T.; Lee, E. S.; Oh, K. T.; Choi, H.-G.; Youn, Y. S. Amplified Fenton-Based Oxidative Stress Utilizing Ultraviolet Upconversion Luminescence-Fueled Nanoreactors for Apoptosis-Strengthened Ferroptosis Anticancer Therapy. *ACS Nano* **2023**, *17* (1), 382-401.
- (129) Wen, S.; Zhou, J.; Zheng, K.; Bednarkiewicz, A.; Liu, X.; Jin, D. Advances in Highly Doped Upconversion Nanoparticles. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2415.
- (130) Wu, S.; Kong, X.-J.; Cen, Y.; Yuan, J.; Yu, R.-Q.; Chu, X. Fabrication of a LRET-Based Upconverting Hybrid Nanocomposite for Turn-on Sensing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Glucose. *Nanoscale* **2016**, *8* (16), 8939-8946.
- (131) Yang, W.; Li, X.; Chi, D.; Zhang, H.; Liu, X. Lanthanide-Doped Upconversion Materials: Emerging Applications for Photovoltaics and Photocatalysis. *Nanotechnology* **2014**, *25* (48), 482001.

## 第2章 アップコンバージョンナノ粒子の生成機構

### 2.1 緒言

発光効率の高い NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP の生成機構を調べることは、再現性高く粒子を合成するために非常に重要である。特に本研究では、OPN5 の光遺伝学に必要なとされる UV 光の高発光を実現するため、β-NaYF<sub>4</sub> を高結晶性かつ適切な粒径で得ることが不可欠である。原理的に、Tm<sup>3+</sup> ドープ NaYF<sub>4</sub> 系では <sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位からの UV 発光は相対的に不利であり、UV 光高発光を得ることは容易ではない。したがって、UV 光発光を最大化するためには、結晶相、結晶性および粒径を精密に制御し、表面起因の非放射緩和を極力抑制し、生成過程における α → β 相転移の理解や粒子成長の制御因子を明確にすることが重要となる。これまで多くの研究者による努力により、ワンポット法により合成することが可能になったが、合成過程で α 相（立方晶 (fcc)）から β 相（六方晶 (hcc)）への相転移が生じるタイミングについては多くの文献で議論されている<sup>1-13</sup>。本章では、これらの先行研究を整理しつつ、実際の反応条件・粒子構造・相形成の経時変化を比較することで、NaYF<sub>4</sub> 系 UCNP における α → β 相転移の進行過程とその要因について検討する。

### 2.2 アップコンバージョンナノ粒子の合成

本研究で合成する UCNP は NaYF<sub>4</sub> をホストとし、Yb<sup>3+</sup> を増感剤、Tm<sup>3+</sup> を活性剤とした組成である。UV 光発光効率最大化のため、Y<sup>3+</sup> 50 mol%、Yb<sup>3+</sup> 49.7 mol%、Tm<sup>3+</sup> 0.3 mol% の組成で合成した。なお、Yb<sup>3+</sup> 高濃度ドープが結晶相形成に及ぼす影響は 2.5.2.5 に、Tm<sup>3+</sup> 濃度最適化（濃度消光）の考え方は 2.5.3.3 に示す。

#### 2.2.1 試薬及び評価装置

**【試薬】** 塩化イッテルビウム(III)六水和物 (YbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、純度 99.998%)、塩化ツリウム(III)六水和物 (TmCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、純度 99.99%)、塩化ルテチウム(III)六水和物 (LuCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、純度 ≥99.99%)、フッ化アンモニウム (NH<sub>4</sub>F、純度 >99.99%)、水酸化ナトリウム (NaOH、純度 >98%)、オレイン酸（純度 90%）、シクロヘキサン（純度 ≥99%）は Sigma-Aldrich から購入した。塩化イットリウム(III)六水和物 (YCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、純度 99.9%) は富士フイルム和光純薬から購入した。ヘキサンとアセトン、メタノール、クロロホルム、1-オクタ

デセン（純度 90%）は関東化学から購入し、エタノールはナカライテスクから購入した。

**【評価装置】** ナノ粒子の構造解析は、透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope: TEM、Hitachi H-7650、加速電圧 100 kV）、X 線回折装置（X-ray Diffractometer: XRD、Rigaku MiniFlex600、CuK $\alpha$  線（1.5418 Å））、高角散乱環状暗視野（High-Angle Annular Dark Field: HAADF）検出器とエネルギー分散型 X 線分光装置（Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: EDS）を備えた走査型 TEM（Scanning TEM: STEM、JEOL JEM-ARM200F、加速電圧 200 kV）で行った。光学特性は、励起光として 980 nm の近赤外ダイオードレーザー（PGL-V-H-980-1W、Changchun NewIndustries Optoelectronics Tech Co.Ltd.、出力 1084 mW）を用い、蛍光分光光度計（FP-6300、日本分光）を用いて測定した。

### 2.2.2. NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コアアップコンバージョンナノ粒子の合成方法

Youn ら<sup>14</sup>の方法を改良して NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル型 UCNP を合成した。まず、コアとなる NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm の合成について説明する。攪拌子が入った 100 mL 三口フラスコに、8 mL のメタノール及び YCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.5 mmol)、YbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.497 mmol)、TmCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.003 mmol) を加え、全ての前駆体がメタノールに十分に溶解するまで攪拌した。三口フラスコの両側の口をセプタムで閉じ、片方のセプタムには Ar バブリング用にパストゥールピペットを挿入した。バイアル瓶にオレイン酸 8 mL と 1-オクタデセン 15 mL を加え、超音波を印加して混合させ、これを三口フラスコに加えた。続いて、三口フラスコをコンデンサーと接続したトラップ球に繋げ、室温・Ar ガス気流下（350 mL/分）で 5 分間ほど攪拌した。

フラスコ内が Ar ガスで十分に置換された後、反応溶液の温度を温度コントローラーと接続されたマントルヒーターで 160°C まで上げ、30 分攪拌した。その後、マントルヒーターを取り除き、反応溶液を室温まで自然冷却させた後、再びマントルヒーターを設置した。バイアル瓶に 20 mL のメタノール及び NH<sub>4</sub>F (4 mmol) と NaOH (2.5 mmol) を加え、超音波に印加して分散した混合溶液を準備しておき、シリンジを使用して反応溶液へ注入し、5 分間ほどフラスコ内を Ar ガスで十分に置換した。その後、昇温速度を制御できる温度コントローラーを用いて反応溶液を 120°C まで加熱し、30 分間攪拌した。続いて、120°C から 290°C までの昇温時間を 12、20、36 分の 3 条件で設定した。なお、120°C から 290°C は NaYF<sub>4</sub> の  $\alpha$  相から  $\beta$  相への相転移が進行する温度域として知ら

れているため<sup>13</sup>、本研究ではこの昇温過程を主要な議論とした。その後、317°Cまで20分で昇温し、10分間反応を維持したのち、マントルヒーターを取り外して反応溶液を自然冷却した。

反応終了後はマントルヒーターを取り除き、反応溶液を自然冷却し、2本の50 mL遠心管へ均等に分配した。エタノールを全体の容積が40 mLとなるように加え、2000 × g (ユニバーサル冷却遠心機 5910、Kubota) で5分間の遠心分離を行った。上澄み溶液を捨てた後、1.5 mLのクロロホルムを加え、超音波を印加して粒子を十分に分散させた。エタノールを全体の容積が20 mLとなるように加え、2000 × g で5分間の遠心分離を行った。上澄み溶液を捨てた後、1.5 mLのシクロヘキサンを加え、超音波を印加して粒子を十分に分散させた。アセトンで全体の容積が20 mLとなるように加え、2000 × g で5分間の遠心分離を行った。これをもう一度繰り返し、その後、8 mLのシクロヘキサンを加え、超音波を印加して粒子を十分に分散させ、1500 × g で5分間の遠心分離を行い、上澄みを別の新しい遠心管に移し、アセトンで全体の容積が40 mLとなるように加え、4000 × g で10分間の遠心分離を行った。最後に上澄みを捨て、遠心管底に沈殿した粒子が乾燥する前に1 mg/mLでクロロホルムに分散させた。

### 2.2.3. NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル型アップコンバージョンナノ粒子の合成方法

次に、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル型 UCNP の合成について説明する。攪拌子が入った100 mL三口フラスコに8 mLのメタノール及びLuCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.5 mmol)を加え、全ての前駆体がメタノールに十分に溶解するまで攪拌した。三口フラスコの両側の口をセプタムで閉じ、片方のセプタムにはArバブリング用にパスツールピペットを挿入した。バイアル瓶にオレイン酸8 mLと1-オクタデセン15 mLを加え、超音波を印加して混合させ、これを三口フラスコに加えた。続いて、三口フラスコをコンデンサーと接続したトラップ球に繋げ、室温・Arガス気流下(350 mL/分)で5分ほど攪拌した。

フラスコ内がArガスで十分に置換された後、反応溶液の温度を温度コントローラーと接続されたマントルヒーターで160°Cまで上げ、30分攪拌した。その後、マントルヒーターを取り除き、反応溶液を室温まで自然冷却させた後、再びマントルヒーターを設置した。シリンジを使って、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コア UCNP のクロロホルム分散液(1 mg/mL) 25 mLをフラスコに加えた。その後、再び約110°Cまで昇温し、クロロホルムを完全に蒸発させた後、マントルヒーターを取り除き、反応溶液を室温まで自然冷却させた後、再びマントルヒーターを設置した。バイアル瓶に10 mLのメタノール及びNH<sub>4</sub>F(2 mmol)

と NaOH (1.25 mmol) を加え、超音波に印加して分散した混合溶液を準備しておき、シリンジを使用して反応溶液へ注入し、5 分間ほどフラスコ内を Ar ガスで十分に置換した。反応溶液を 120°C に上昇させ、30 分間攪拌後、317°C まで上昇させ、10 分間反応を継続させた後、マントルヒーターを取り除き、反応溶液を自然冷却した。洗浄工程は NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コア UCNP と同様に行い、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル UCNP を得た。この時も、遠心管底に沈殿した粒子が乾燥する前に 1 mg/mL でクロロホルムに分散させた。

## 2.3 NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm の反応時間による粒子形成の比較

### 2.3.1 透過型電子顕微鏡による観察と粒径分布

120°C から 290°C の昇温時間を 12、20、36 分に設定し、生成した粒子の形態と粒径を TEM により比較した (図 2-1)。昇温時間 12 分 (図 2-1(a, b)) の平均粒径 ( $D_{TEM}$ ) は  $43.3 \pm 3.4$  nm であり、20 分 (図 2-1(c, d)) では平均粒径が  $61.8 \pm 3.8$  nm に増大し、粒子の輪郭に六角形状が顕著に現れた。さらに 36 分 (図 2-1(e, f)) では、平均粒径が  $124.0 \pm 6.0$  nm と一段と成長し、明瞭な六角柱状の粒子が観察された。また、図 2-1 (c, f, i) に示すように、いずれの昇温時間で得られた UCNP も粒径分布が比較的シャープで単分散性高く、正規分布状の分布を示した。

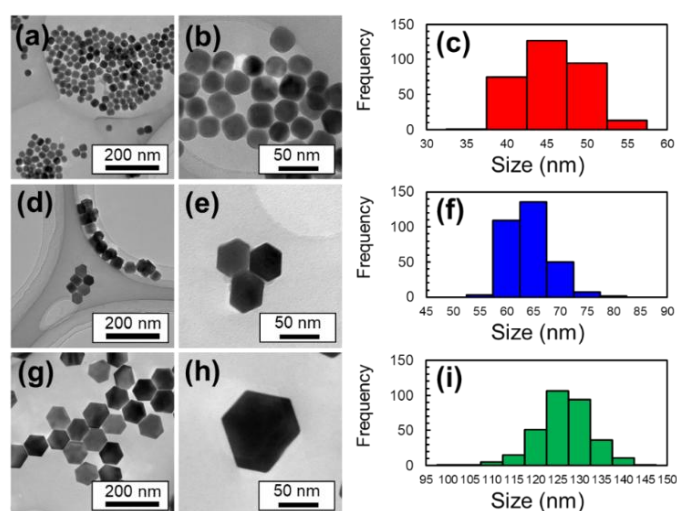


図 2-1 昇温時間の異なる NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP の TEM 像と粒径分布ヒストグラム。(a-c) 昇温時間 12 分、(d-f) 20 分、(g-i) 36 分の条件で得られた粒子について、低倍率 TEM 像(a, d, g)、高倍率 TEM 像(b, e, h)、および粒径分布ヒストグラム(c, f, i)を示す。

### 2.3.2 光学特性評価

粒径の異なる NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP に対して 1 mg/mL に統一した濃度で発光スペクトルを測定した結果を図 2-2(a)に、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP のエネルギーダイアグラムを図 2-2(b)に示す。昇温時間 12 分の UCNP では Tm<sup>3+</sup>の <sup>1</sup>D<sub>2</sub>→<sup>3</sup>H<sub>6</sub> (360–365 nm)、<sup>1</sup>D<sub>2</sub>→<sup>3</sup>F<sub>4</sub> (450 nm)、<sup>1</sup>G<sub>4</sub>→<sup>3</sup>H<sub>6</sub> (475 nm) に対応するピークは極めて低強度であったが、昇温時間 20 分の UCNP ではこれらのピークが大幅に増大し、最も高い発光効率を示した。一方、昇温時間 36 分の UCNP では粒径がさらに増大するにもかかわらず発光は減少した。

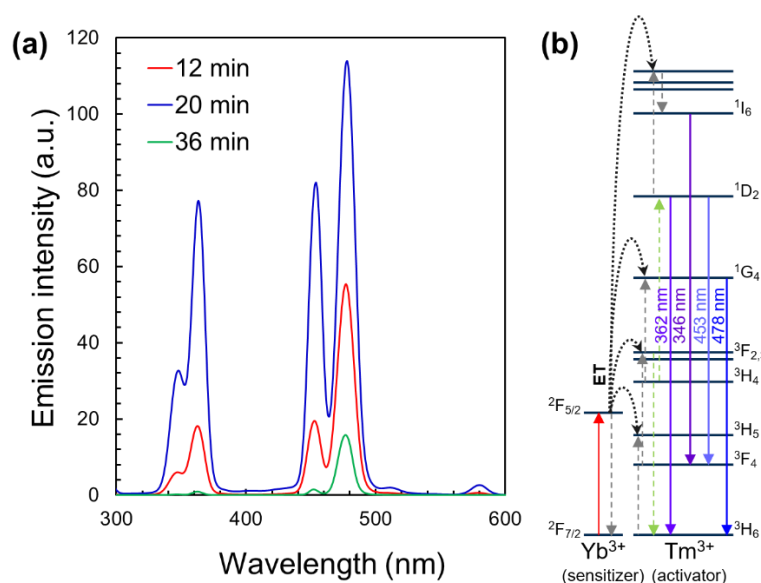


図 2-2 (a)12、20、36 分の昇温時間における NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP のヘキサン分散液を NIR レーザー光で励起した際の発光スペクトル(濃度は 1 mg/mL に統一)、(b)NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP のエネルギーダイアグラム。

## 2.4 UCNP の生成機構

### 2.4.1 $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> の生成とオストワルド熟成を介した $\beta$ 相への相転移

考察にあたり、まず NaYF<sub>4</sub> 系 UCNP の生成機構に関する先行研究について述べる。Mai ら<sup>1</sup>は、330°Cにおける反応時間を変化させ、TEM 観察および XRD 解析を行うことで、NaYF<sub>4</sub>系が合成過程において立方晶系の  $\alpha$  相から六方晶系の  $\beta$  相へと相転移を起こすことを詳細に検討した。反応初期である 5 分の段階では、TEM 像 (図 2-3(b)) において数 nm 程度の非常に小さな粒子が多数観察されており、XRD パターン (図 2-3(c)) か

らもこれらの粒子が  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> であることが確認された。これらの小粒子は粒径が極めて小さいため表面エネルギーが高く、熱力学的には不安定な状態にあると考えられる。反応時間が 8 分へと進行すると、TEM 像 (図 2-3(b)) では一部に比較的大きな粒子が出現し始め、XRD パターン (図 2-3(c)) においても  $\alpha$  相と  $\beta$  相の両方の回折ピークが観測されるようになる。さらに反応時間が 12 分に達すると、 $\beta$  相に由来する回折ピークが顕著となり (図 2-3(c))、 $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> が主相として形成されていることが分かる。これらの結果から、反応初期に生成した小さな  $\alpha$  相粒子は、反応の進行に伴って部分的に溶解し、その溶解によって供給された Y<sup>3+</sup>、Yb<sup>3+</sup> および F-イオンが、より安定な  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> の核へと再析出していると解釈される。

このような「小粒子の溶解—大粒子への再析出」という非対称な物質移動過程は、一般にオストワルド熟成 (Ostwald ripening) として知られている (図 2-3(d))。すなわち、初期状態においてある程度の粒径分布が存在する系では、表面エネルギーの差により小粒子が不安定化して溶解し、より安定な大粒子へと物質が移動することで粒成長が進行する。Mai らの系において、反応時間の経過に伴って XRD における  $\beta$  相ピークが増大していることから、再析出によって成長する粒子は  $\beta$  相へと相転移しながら成長していることが示唆される。すなわち、NaYF<sub>4</sub> 系 UCNP の合成過程では、オストワルド熟成と  $\alpha \rightarrow \beta$  相転移が同時に進行している可能性が高く、この点は本材料系の相形成機構を理解する上で非常に興味深い特徴である。

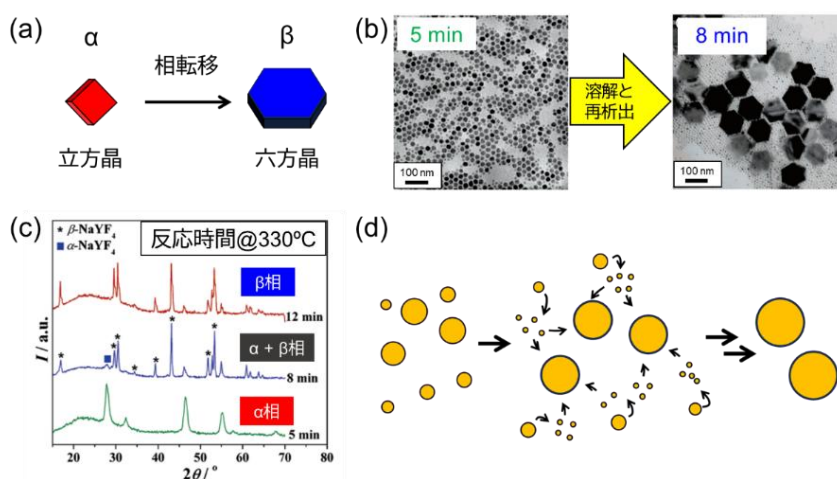


図 2-3 (a)  $\alpha$  相(立方晶)から  $\beta$  相(六方晶)への相転移のイメージ図、(b) NaYF<sub>4</sub> 粒子合成の反応時間 330°C における 5 分後、8 分後の TEM 像、(c) (b) と同反応の 5 分後、8 分後、12 分後の XRD パターン、(d) 一般的なオストワルド熟成の概念図。((b) and (c) are reproduced from ref. 1 with permission from American Chemical Society.)

## 2.4.2 相転移に伴う self-focusing

Johnson らは、このオストワルド熟成過程に強い成長点選択性が存在することを明らかにした<sup>5</sup>。彼らは、溶解したイオン種が溶液中に複数存在する粒子のうち、 $\beta$ 相核の表面へ選択的に再析出する現象を観察し、これを **self-focusing** と呼んでいる。この **self-focusing** は、成長点が  $\beta$ 相核へ集中することで粒径分布が急激に狭まり、単分散の  $\beta$ 相粒子が得られることを意味する。

図 2-4(a-c) は、犠牲粒子 (sacrificial nanocrystals, SNCs) としてより小さな  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> 粒子を、既に  $\beta$ 相 UCNP が存在する反応系に注入した後の TEM 像である。SNC 注入直後である 15 秒後 (図 2-4(b)) には、小粒径の  $\alpha$ 相粒子が多数観察され、粒径分布は一時的に二峰性 (bimodal) となる。しかし反応を 10 分間進行させると (図 2-4(c))、これらの小さな  $\alpha$ 相粒子は速やかに溶解し、溶解によって供給されたイオン種が  $\beta$ 相核の表面へ選択的に再析出することで、 $\beta$ 核が急速に成長する様子が確認される。この結果として、図 2-4(d)に示されるように、当初は二峰性であった粒径分布は短時間で単峰性 (monomodal) へと収束し、 $\sigma < 5\%$  という極めて狭い粒径分布をもつ  $\beta$ 相粒子が得られる。彼らはこの「 $\beta$ 相核への選択的な成長点集中」を **self-focusing** と呼び、単なるオストワルド熟成とは異なる、強い成長点選択性を伴う粒子成長機構であると結論づけている。

このように NaYF<sub>4</sub>系 UCNP の相転移過程は、(1) 初期  $\alpha$ 相粒子の形成、(2) オストワルド熟成による選択的溶解-再析出、(3)  $\beta$ 相核に対する **self-focusing** による成長点の集中という三つの要素から構成される。ただし、これらは時間的に明確に分離した現象ではなく、実際には重なり合いながら協奏的に進行していると考えられる。特に、一度  $\beta$ 相核が形成されると **self-focusing** によってその優先的成長が加速され、粒径分布の急激な収束と高い結晶性を併せ持つ  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> 粒子が最終生成物として得られる点が重要である。

本研究で合成した NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP においても、昇温時間の違いにかかわらず、最終的に得られた粒子はいずれも粒径分布が収束する傾向を示した (図 2-1(c, f, i))。この挙動は、Johnson らが提唱した **self-focusing** モデルにおける「選択的成長による分布の単分散化」という特徴と整合的であり、本研究の粒子成長過程においても同様の選択的成長プロセスが働いている可能性を示唆している。

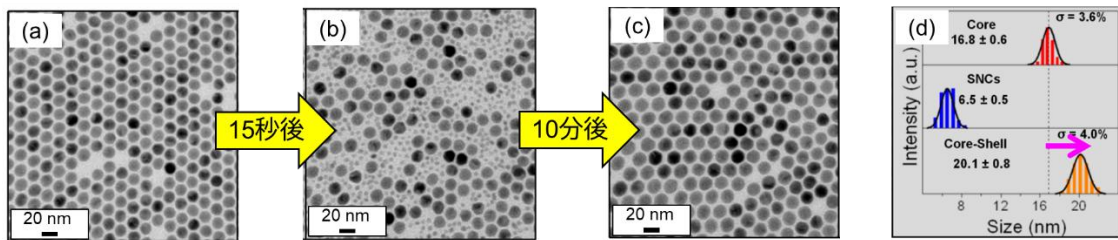


図 2-4 (a)NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>(15/2%)コアナノ結晶の TEM 像( $t=0$ )、(b)SNC として  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> ナノ結晶を注入した 15 秒後( $t=15$  sec)の TEM 像、(c)self-focusing が進行した 10 分後( $t=10$  min)の NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>コア/NaYF<sub>4</sub>シェルナノ結晶の TEM 像、(d)(a)-(c) に対応するナノ結晶の粒径分布。(Reproduced from ref. 5 with permission from American Chemical Society.)

### 2.4.3 配位子による $\alpha$ 相粒子の安定化と $\beta$ 相転移の制御

本研究で採用した有機溶媒はオレイン酸 (Oleic acid, OA) と 1-オクタデセン (1-octadecene, ODE) であり、このうち OA が配位子として金属イオン (Y<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>) と強く錯体を形成し、RE(oleate)<sub>3</sub> として均一に溶解した状態を保つ<sup>1</sup>。昇温初期において OA は  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> ナノ粒子の表面、特に表面エネルギーの高い (100) 面に選択的に吸着し、界面エネルギーを低下させることが知られている<sup>1,6</sup>。その結果、生成直後の  $\alpha$  相ナノ粒子は一時的に熱力学的に安定化し、小粒径のまま多数存在する状態が維持される。これは  $\alpha \rightarrow \beta$  相転移を理解するうえで重要な特徴であり、OA が過剰に存在する条件では  $\alpha$  相粒子が過安定化し、格子再配列や溶解・再析出に必要なイオン拡散が阻害されるため  $\beta$  相の形成が遅延する。

一方、ODE は OA を希釈し、反応場の粘性・分子拡散速度・局所濃度を調整する。ODE 自体は金属イオンと錯体を形成しないが、非極性・低粘度の溶媒として機能することで OA による強い被覆を緩和し、核生成と成長が極端に加速されない穏やかな反応環境を提供する。ODE 含量が低すぎると OA の有効濃度が高まり  $\alpha$  相が過度に安定化する一方、ODE が過剰になると OA の有効濃度が低下し、RE(oleate)<sub>3</sub> が十分に形成されなくなり、遊離の希土類イオンが増加して核生成が急激に進むため、粒径分布が広がると考えられる。したがって、OA と ODE の比率は、 $\alpha$  相粒子のサイズと数、 $\alpha$  相の安定性、 $\beta$  相転移の起点となる欠陥生成、オストワルド熟成の進行度を同時に調整する最重要パラメータである。

## 2.5 考察

### 2.5.1 粒子サイズの制御について

本研究では、120°Cから 290°Cまでの昇温時間を 12、20、36 分と変化させることで、昇温過程が最終的な  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP の粒径に与える影響を検討した。その結果、昇温時間が長い条件ほど最終的な粒径が大きくなるという明瞭な傾向が得られた (図 2-1)。

NaYF<sub>4</sub> の  $\alpha \rightarrow \beta$  相転移は、溶解-再析出を伴うオストワルド熟成であり、この過程では、相転移開始時点で存在する  $\alpha$  相粒子の粒径および粒子数が  $\beta$  相形成後の粒径に影響を与えることが知られている<sup>1,15</sup>。2.4.1 で述べたように、反応初期に生成する  $\alpha$  相粒子は数 nm 程度と小さく、表面エネルギーが高いため準安定状態であるため、昇温に伴って小粒径の  $\alpha$  相粒子が部分的に溶解し、より大きな粒子へと物質が再分配される。結果として、粒子数が減少しつつ平均粒径が増大する、いわゆる「粗大化」が進行する。図 2-5 に示すように、昇温時間が長い条件ではこのオストワルド熟成がより長時間進行するため、 $\alpha$  相粒子の粗大化が進んだ状態で相転移温度域に到達すると考えられる。その結果、相転移開始時における  $\alpha$  相粒子の平均粒径および粒子数の違いが、 $\beta$  相転移後に形成される粒子の最終粒径として反映されると考えられる。

実際に、本研究で観察された昇温時間 12 分 < 20 分 < 36 分の順での粒径増大は、昇温過程における  $\alpha$  相粒子の粗大化の進行度の違いによって整合的に説明できる。以上より、本研究の条件範囲では、相転移温度そのものよりも、相転移前の昇温過程における  $\alpha$  相粒子の粗大化の程度が、最終的な  $\beta$  相粒径に強く反映されると考えられる。

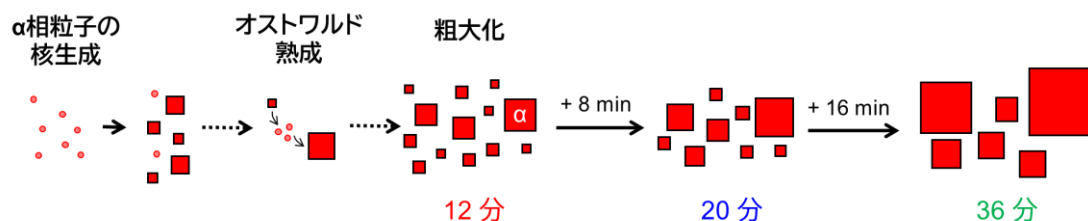


図 2-5 昇温時間の違いに伴う  $\alpha$  相粒子の成長挙動を示す模式図。

## 2.5.2 $\alpha$ 相が残存する原因の考察

### 2.5.2.1 本研究系における $\alpha$ 相残存の背景

本研究では、生成機構を検討する以前は、我々の既報<sup>16</sup>に基づく従来プロトコル（120°Cから317°Cまで特に昇温速度を制御しない条件）でNaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNPsを合成していた。この条件では、 $\beta$ 相粒子のみが得られる場合もあった一方で、粒径50 nm以上の六角柱粒子はほんの一部でしか観察できず、小粒径が残存することがあった（図2-6）。この粒子を高濃度でヘキサンに分散しNIR光照射を行ったが、肉眼では発光をほとんど確認できないほどアップコンバージョン強度は著しく低かった。NaYF<sub>4</sub>においては、 $\beta$ 相よりも小粒径の $\alpha$ 相はエネルギー移動効率・発光量子収率が著しく低いことが報告されており<sup>2</sup>、残存した小粒径は主に $\alpha$ 相であった可能性を示唆した。

また、バッチ間で結晶相の再現性にばらつきが多々見られていたため、従来プロトコルでは $\alpha \rightarrow \beta$ 相転移の進行が条件依存であり、結晶相の制御が十分ではないことを示していた。そこで「何が原因なのか」を探ったのがこの第2章を作成したきっかけでもある。本節では、先行研究の知見を踏まえ、本研究系で $\alpha$ 相が残存した要因について考察したことについてまとめる。

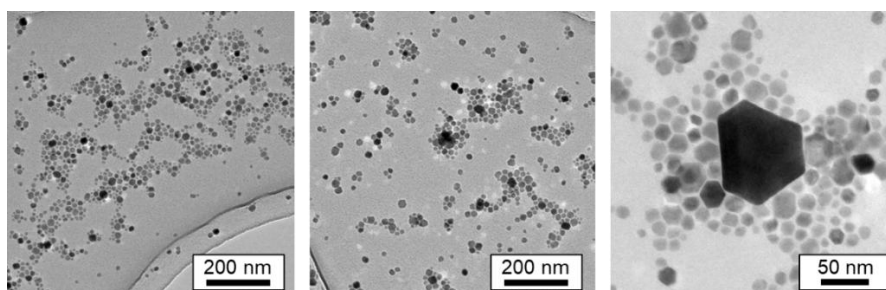


図 2-6 小粒子が残存した最終生成物のTEM像。

### 2.5.2.2 XRDによる $\alpha$ 相残存粒子の結晶相評価

図2-3に示した小粒子の結晶相をXRDで測定したところ、図2-7に示すXRDパターンを取得した。得られた回折パターンは、主要ピークが立方晶 $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub>に対応しており、 $\beta$ 相は観察されなかった。高角側には $\alpha$ 相と $\beta$ 相のピーク位置が重なる領域が存在するものの、 $\beta$ 相を特徴付ける強度の高い反射が認められなかったことから、本サンプルはほぼすべてが $\alpha$ 相粒子で構成されていると判断した。次に、 $\alpha$ 相に帰属される主要解説ピークである(111)、(200)、(220)の主要ピーク位置をGaussian-Lorentzian mixed関数<sup>17</sup>でフィッティング・解析したところ、いずれのピークもPDF値よりもわずかに低

角側へシフトしていることが分かった。また、立方晶  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> に対する格子定数  $a$  を、格子面間隔  $d_{(hkl)}$  と Bragg 条件式と組み合わせることができる以下の式(1)で求めた。

$$a = \frac{\lambda}{2\sin\theta} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \quad (1)$$

ここで、 $\lambda$  は X 線源 (Cu K $\alpha$ , 1.5406 Å)、 $\theta$  は観測されたピーク位置の 1/2 である。(111), (200), (220) の各ピーク位置から算出した格子定数はいずれも  $a = 5.48$  Å であり、標準  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> (PDF No. 04-008-3251) の値  $a = 5.46$  Å と比較して約 0.02 Å 大きかった。これらの結果を表 2-1 にまとめる。

この傾向は Pin ら<sup>12</sup> が報告した  $\alpha \rightarrow \beta$  相転移の初期過程で立方晶  $\alpha$  相が六方晶  $\beta$  相の成長に“引っ張られる (lattice pulled)”結果、格子歪みが蓄積する現象である。すなわち、 $\beta$  相核が形成されると、 $\alpha/\beta$  界面における格子ミスマッチが原因となり、 $\alpha$  相側が引張応力を受けて d-spacing が増大する。本研究で得られた XRD パターンでも同様の低角シフトが確認されたことから、本サンプルに含まれる粒子は立方晶  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> ではなく、 $\beta$  核の形成に伴い格子が伸張した“歪んだ  $\alpha$  相”であると結論づけられる。すなわち、 $\beta$  核の形成は開始していたものの、相転移を完了させるための溶解・再析出 (オストワルド熟成) が十分に進行せず、転移途中で停止した  $\alpha$  粒子が残存したと考えられる。

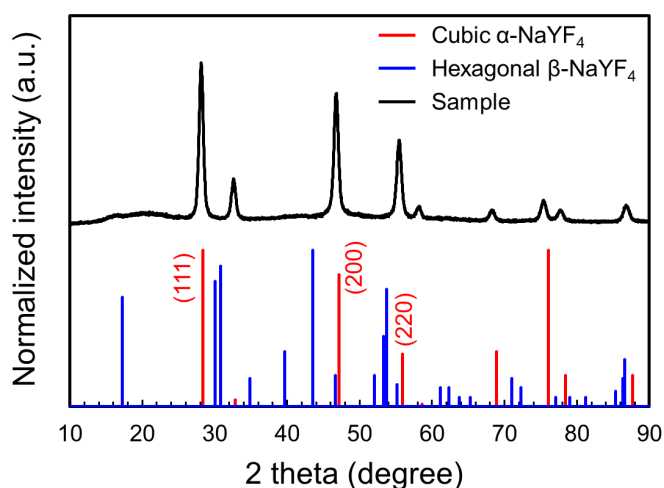


図 2-7 図 2-6 で示した粒子の XRD パターン(Reference: 立方晶  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub>(ICDD PDF No. 04-008-3251)、六方晶  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>(ICDD PDF no. 00-016-0334))。

表 2-1 小粒径 UCNPs の XRD ピーク位置、d-spacing、格子定数の比較(Reference: 立方晶  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub>(ICDD PDF No. 04-008-3251)。

面(hkl)	2 $\theta$ (degree)	PDF 標準 2 $\theta$ (degree)	d-spacing (Å)	格子定数 $a$ (Å)	PDF 標準 $a$ (Å)
(111)	28.13	28.35	3.164	5.48	5.46
(200)	32.60	32.85	2.740	5.48	5.46
(220)	46.77	47.14	1.939	5.48	5.46

### 2.5.2.3 サンプルングによる $\alpha \rightarrow \beta$ 相転移過程の観察

Chen らは、OA:ODE = 1:1 条件における NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er UNNPs 合成において、温度上昇に伴う相転移挙動を詳細に解析し、290°C付近で $\alpha$ 相から $\beta$ 相への転換が始まり、約310°Cで相転移がほぼ完了すると報告している<sup>13</sup>。この知見を踏まえ、本研究においても同様の温度領域で相転移が進行すると予想されることから、280~317°Cの範囲で反応途中の溶液を段階的にサンプルングし、TEMにより粒子形態の時間発展を観察した(図2-8)。280°Cでは、数 nm 程度の極めて小さな球状粒子が生成しており、生成初期の $\alpha$ 相粒子が大量に形成されている状態に相当する。300°Cへ昇温すると、粒子径は徐々に増大し、形状は球状・不定形であるものの、オストワルド熟成による小粒子の溶解と大粒子の粒子成長が進行している様子が捉えられた。310°Cに達すると六角形の前駆的形状が現れ始め、 $\beta$ 相の核形成が局所的に開始していることが示唆された。さらに313°Cでは、より大きなサイズの六角柱状の粒子が急速に増加した。この粒子成長挙動は、オストワルド熟成と self-focusing による粒子成長に加え、 $\alpha \rightarrow \beta$ 相転移の進行が関与している可能性が示唆された。315°Cに到達する頃には粒径が揃った六角柱状粒子が観察され、 $\alpha \rightarrow \beta$ 転移は完了したと考えられる。317°Cでは、粒子形状および粒径に大きな変化は見られず、self-focusing を経て形成された約 50 nm の $\beta$ 相と考えられる粒子がそのまま安定状態を保っていることが確認された。

ここで、図 2-6 に示した失敗サンプルの粒径が 10–20 nm に留まっていた一方、サンプルング TEM 観察では 310~313°C付近で $\beta$ 相への相転移の兆候が現れた。これらの結果を踏まえると、本研究条件下で $\alpha \rightarrow \beta$ 相転移を成立させるためには、少なくとも 20 nm 程度以上に成長した粒子が存在することが重要であると考えられる。さらに、粒径約 50 nm のより大きい $\beta$ 相粒子を得るためには、オストワルド熟成による成長を十分に進行させる必要があるため、粒径分布がある程度広い状態を経ることが重要であると考えられる。

なお、本研究のサンプリングは、120°Cから 317°Cまでを昇温操作の設定値に従って自然昇温させた過程で実施したものであり、昇温速度を厳密に一定に制御した実験ではない。そのため、Chen ら<sup>13</sup>のように昇温速度を固定した系と相転移温度を直接比較するものではなく、あくまで本研究の反応条件下における粒子形態の温度依存的な変化を確認する目的で行ったものである。また、このサンプリングでは反応途中のサンプル量が限られており、各温度における XRD 測定は行っていない。そのため、個々の粒子について TEM のみから厳密に結晶相を判別することはできないが、2.5.2.1、2.5.2.2 の結果より、小粒径で球状の粒子が支配的なサンプルでは XRD により  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> のみの回折ピークが観察されており、本研究のサンプリングにおける低温域での微小粒子も  $\alpha$  相である可能性が高いと考えられる。

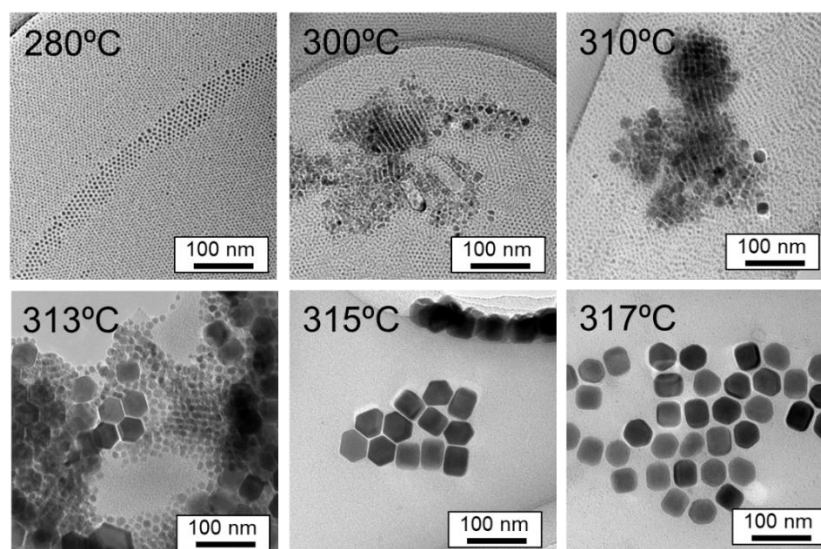


図 2-8 280~317°Cでサンプリングした NaYF<sub>4</sub>,Yb,Tm UCNP の TEM 像。

#### 2.5.2.4 初期 $\alpha$ 相粒径分布が $\beta$ 相転移に及ぼす動学的影響

以上を踏まえて、本研究の失敗サンプルで  $\alpha$  相が残存した影響について順次考察していく。本研究で  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> の生成に失敗したサンプルでは、反応初期に形成された  $\alpha$  相粒子が十分に成長せず、粒径分布が狭い状態のまま比較的均一に推移したことが主要因であると考えられる。Mai らが報告しているように、 $\alpha \rightarrow \beta$  相転移には高い活性化エネルギーが必要であり (図 2-9(a))、転移を開始するためにはある程度の粒径 (臨界サイズ) や、表面歪み・欠陥などの構造的不安定性が重要な役割を果たすとされている<sup>1</sup>。この臨界サイズは、粒子サイズに依存して表面エネルギー項の寄与が変化することに起因す

る。一般に、ナノ粒子では粒径が小さいほど表面エネルギーの寄与が相対的に大きくなり、安定な $\beta$ 相よりも $\alpha$ 相が見かけ上安定化される場合があるため、粒子が臨界サイズ未満の領域では $\beta$ 相への核形成・成長の駆動力が小さく、相転移が進行しにくいと考えられる。

図 2-9(b) に、推測される相転移失敗メカニズムの模式図を示す。最終的に 10~20 nm 程度までしか成長しなかった図 2-6 の失敗サンプルは、290~300°Cで粒径分布が狭い比較的安定な状態に留まり、310~313°Cの相転移開始温度領域に到達するまでに十分にオストワルド熟成が生じず、相転移の臨界サイズまで成長しなかった可能性がある。その結果、 $\beta$ 相転移に必要な物質移動が起こらず、局所的に $\beta$ 核が生成したとしても、その成長に寄与すべき不安定な小粒子が周囲に存在しない、あるいは粒径分布が狭くエネルギー差が生じず溶解しないため、核成長が途中で停止したと推察される。今回の失敗サンプルで観察された格子伸張 (lattice-pulled) した $\alpha$ 相は、まさに $\beta$ 相転移が局所的に開始したものの、成長が途中で止まり完了しなかった状態に対応すると解釈できる。

このように、初期 $\alpha$ 粒径が均一かつ小さく、相転移温度領域においても 10-20 nm 程度の粒子が残存した場合、 $\beta$ 核を起点とした self-focusing による粒径選択的成長が立ち上がりにくく、結果として相転移が途中で停止すると考えられる。また、初期粒径分布の広がり、 $\beta$ 形成後の成長駆動力 (物質移動) を担保する上で重要な要因であるといえる。

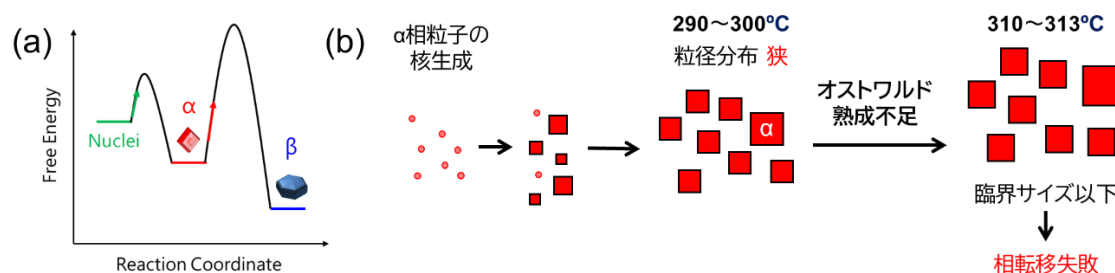


図 2-9 (a)  $\alpha$ 相および $\beta$ 相における自由エネルギーの概念図(Reproduced from ref. 1 with permission from American Chemical Society.)、(b)初期 $\alpha$ 相粒径分布が狭い場合に生じる相転移失敗メカニズムの模式図(オストワルド熟成不足による $\beta$ 核成長の停滞)。

### 2.5.2.5 Yb<sup>3+</sup>高濃度ドーピングによる結晶学的影響

本研究では、120°Cから 290°Cの昇温時間を系統的に変化させることで、相転移前の $\alpha$ 相粒子の成長状態を制御し、最終的な $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>粒子のサイズや相純度に与える影響を検討した。しかし、昇温条件を適切に設定しても、 $\beta$ 相の形成が十分に進まず、 $\alpha$ 相が残存するケースが存在した。これらの結果は、昇温時間の制御や2.5.2.4『初期 $\alpha$ 相粒径分布が $\beta$ 相転移に及ぼす動学的影響』で述べた $\alpha$ 相形成だけでは説明できない別の影響が粒子形成挙動に影響している可能性を示唆している。

本研究では、980 nm 励起光の吸収効率を最大化するため、Yb<sup>3+</sup>を 50 mol%ドーピングした組成を採用している。Yb<sup>3+</sup>は980 nmのNIR光を効率よく吸収する増感剤として機能し、大きな吸収断面積を有するため、Er<sup>3+</sup>やTm<sup>3+</sup>といった活性剤へのエネルギー移動を著しく促進する<sup>18,19</sup>。したがって、Yb<sup>3+</sup>濃度を高めることはアップコンバージョン発光強度の増大に直結し、多くのUCNP研究で標準的な設計として採用されている。本研究においても、既報および我々の先行研究<sup>16</sup>に基づき、光学的性能を最優先したYb<sup>3+</sup> 50 mol%ドーピング組成を選択した。

一方、Yb<sup>3+</sup>は母体カチオンであるY<sup>3+</sup>よりもイオン半径が小さく、Y<sup>3+</sup>サイトへの置換により単位格子体積を減少させることが知られている。一般に、このようなドーパントによる格子収縮や局所構造の変化に起因して、熱力学的に準安定な多形が安定化される現象は「異種イオン安定化効果 (dopant-induced stabilization)」として報告されており、LaVO<sub>4</sub>系などで詳細に検討されている<sup>10</sup>。NaYF<sub>4</sub>においても、Yb<sup>3+</sup>高濃度ドーピングが局所的な格子収縮・歪みを通じて $\alpha$ 相を安定化させる方向に作用する可能性がある。

このように、Yb<sup>3+</sup>高濃度ドーピングには、発光効率向上に必須である一方で結晶学的には $\alpha$ 相を安定化させてしまうリスクがあるという二面性が存在する。本研究では、光学的性能と結晶相安定性のトレードオフを考慮したうえで、Yb<sup>3+</sup> 50 mol%が最も適切であると判断し採用した。すなわち、本ドーピング量は、発光強度を十分に確保しつつ、Yb<sup>3+</sup>置換によって生じる格子収縮・局所歪みが $\beta$ 相転移を妨げない範囲に留まるバランス設計となっている。

### 2.5.2.6 F<sup>-</sup>濃度およびNa<sup>+</sup>濃度の組成的影響

Li<sup>+</sup>らはNa<sup>+</sup>/Ln<sup>3+</sup>/F<sup>-</sup>比および前駆体濃度を系統的に変化させ、フッ素不足の条件では大きな $\beta$ 相が形成されて粒径が増大する一方、Na<sup>+</sup>とF<sup>-</sup>を同時に増加させた条件では小さな $\beta$ 相種が多数生成し、小粒径かつ単分散な $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>ナノ結晶が得られることを報

告している<sup>11</sup>。また Liang らは NaF/Y<sup>3+</sup>比と温度・時間を系統的に変化させ、NaF が不足する条件では  $\alpha$  相が安定化しやすいことを示している<sup>3</sup>。さらに Rinkel らは、 $\alpha$  相中の Na 含有量が  $\beta$  相核の生成を支配することを示し、Na リッチな  $\alpha$  相粒子では  $\beta$  相形成が促進されるが、Na 欠損粒子では  $\beta$  相がほとんど生成しないと述べている<sup>7</sup>。本研究では Ln<sup>3+</sup>/F<sup>-</sup>比を 1:4、Na<sup>+</sup>/Ln<sup>3+</sup>比を約 2.5 となるように調整しており、いずれも  $\beta$  相形成が起こりやすい最適組成範囲にある。したがって、本研究で観察された  $\alpha$  相残存は、F-不足や Na 欠損によるものではないと考えられる。

### 2.5.2.7 総合的考察

以上を総合すると、 $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> UCNP 合成に際して  $\alpha$  相が残存する原因は、単一の因子ではなく、Yb<sup>3+</sup>高濃度ドーピングによる格子安定化、初期  $\alpha$  相粒子のサイズ依存的安定性が考えられる。これに加え、2.4.3 で述べた OA 過剰被覆による溶解・再析出阻害、RE(oleate)<sub>3</sub>の安定性も重要になる。これらの界面化学的要素は、粒子の溶解速度や拡散動力学に影響し、結果として  $\alpha$  相粒子が転移温度域に到達しても十分な再構成が進行しない状況を引き起こし得る。そのため、UCNP 合成は実験操作上の微細な条件にも敏感であり、試薬の品質、秤量精度、溶液攪拌の均一性、マフラーによるフラスコ内温度場の均質化といった要素も、 $\alpha \rightarrow \beta$  相転移の進行度に影響を及ぼす可能性が高い。これらの要因は一見些細に見えるが、溶解・再析出を主体とする本系の相転移機構においては、局所温度差や濃度揺らぎが粒子成長の選択性を左右し、結果として  $\alpha$  相残存に結びつく場合がある。以上より、 $\alpha$  相残存は「特定の一因による失敗」ではなく、複数の要因が同時並行的に作用した結果として生じる現象であると位置付けられる。

### 2.5.3 発光効率について

希土類イオンをドーピングした NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP における発光効率は、粒子内部における励起エネルギー移動プロセスだけでなく、表面で生じる非放射失活、MPR、光散乱による損失、濃度消光といった複数の要因が相互に影響することで最終的に決定される。本研究で得られた粒径依存性の発光データは、既存の報告とも整合する典型的な傾向を示しており、ここではその背景となる物理化学的要素について詳しく考察する。

#### 2.5.3.1 欠陥準位と多フォノン緩和

第 1 章で述べたように、UCNP における発光効率低下の要因としては、ナノ粒子特有の欠陥準位を介した非放射緩和および多フォノン緩和 (multi-phonon relaxation, MPR)

が挙げられる。実際の UCNP s では、結晶中の格子欠陥やナノ粒子表面に存在する欠陥、配位子未被覆部位などに由来する欠陥準位が不可避免的に存在し、これらは励起エネルギーを捕獲するトラップ準位として機能する。その結果、励起エネルギーは非放射的に散逸し、アップコンバージョン発光効率が低下する<sup>20,21</sup>。

また、MPR は励起状態にある希土類イオンが複数個のフォノンを同時に放出することで下位準位へ緩和する非放射過程であり、その発生確率は励起準位と下位準位とのエネルギー差および関与するフォノン数に強く依存する。Dexter の理論によれば、多フォノン緩和率  $W_{\text{MPR}}$  は、 $W_{\text{MPR}} \propto \exp(-an)$  ( $a$ : 定数、 $n$ : 関与するフォノン数) と表され、必要フォノン数の増加するほど MPR は指数関数的に減少する。MPR は励起準位から下位準位への非放射遷移として進行するため、MPR において重要となるエネルギー差  $\Delta E$  は、発光準位とその直下の準位とのエネルギー差で定義される。Tm<sup>3+</sup>においては、<sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位の直下準位は <sup>1</sup>G<sub>4</sub> であり、そのエネルギー差  $\Delta E$  は約  $6.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$ 、<sup>1</sup>G<sub>4</sub> 準位の直下準位は <sup>3</sup>F<sub>2</sub> 準位であり、 $\Delta E = 6.0 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$  と、<sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位の  $\Delta E$  と同程度である（これらの値は Tm<sup>3+</sup>内殻電子準位に由来する代表的な文献値であり、ホスト材料にほとんど依存しない）<sup>22</sup>。UCNP s ではホスト格子に由来する低エネルギーフォノン (NaYF<sub>4</sub> では約  $350 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>23</sup> に加え、ナノ粒子表面に存在するヒドロキシル基 (-OH) などの高振動数モード (約  $3000\text{--}3600 \text{ cm}^{-1}$ ) を起源とする表面フォノンが存在する<sup>24,25</sup>。-OH 振動子を仮定した場合、<sup>1</sup>D<sub>2</sub> および <sup>1</sup>G<sub>4</sub> 準位からの非放射緩和に必要なフォノン数はいずれも  $n \approx 2$  程度となり、UCNP s では特に表面近傍に希土類イオンが存在するため、小粒子であるほど MPR が生じやすいという特徴を有する。以上より、昇温時間 12 分で得られた小粒径 UCNP s (約 40 nm) において発光強度が低く観測されたのは、ナノ粒子表面に由来する欠陥準位および高振動数フォノンを介した非放射緩和、特に MPR が支配的となったためであると考えられる。

### 2.5.3.2 光散乱の寄与

粒径が増大した UCNP s においては、表面欠陥や多フォノン緩和に起因する非放射失活が抑制される一方で、発光した光そのものが粒子内部で散乱されることによる損失が無視できなくなる。特に、粒径が光の波長と同程度、あるいはそれ以上になる場合には、ミー散乱 (Mie scattering) が顕著となる。本研究において、昇温時間 36 分で得られた粒径約 120 nm の UCNP s は、UV~青色領域 (約 360~480nm) の発光波長と同じオーダーの粒径を有している。このような条件下では、粒子内部および粒子界面において光散乱

が強く生じ、発光した光が粒子外部へ取り出される前に多重散乱を受ける。その結果、外部で検出される発光強度が低下すると考えられる。特に、UV 光および青色光は波長が短いため、散乱断面積が大きく、可視長波長域と比較して散乱の影響を受けやすい。したがって、大粒径 UCNP には、内部で生成された発光が粒子自身によって散乱され、実効的な光取り出し効率が低下する。この光散乱による損失は、粒径の増大に伴って顕在化するため、約 120 nm の粒径を有するサンプルにおいて発光強度が再び低下した要因の一つであると考えられる。

### 2.5.3.3 濃度消光の影響

本節で議論する濃度消光は、前節までに示した反応時間（粒径）の違いに起因する発光効率差を直接説明するものではないが、 $\text{Tm}^{3+}$  ドープ濃度はアップコンバージョン発光強度、特に高励起準位に由来する UV 光発光効率を大きく左右する重要な設計因子である。そこで、本研究において  $\text{Tm}^{3+}$  濃度を 0.3 mol% と低濃度に設定した理由について述べる。

$\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$  UCNP には、 $\text{Yb}^{3+}$  が 980 nm 光を吸収して励起され、そのエネルギーが段階的に  $\text{Tm}^{3+}$  へ移動することで高励起準位が形成される。 $\text{Tm}^{3+}$  濃度が高くなると  $\text{Tm}^{3+}$ – $\text{Tm}^{3+}$  間距離が短くなり、隣接イオン間での交差緩和 (cross relaxation, CR) が顕著に生じるが、特に  $^3\text{H}_4$  準位は寿命が長く励起エネルギーが蓄積しやすいため、高濃度条件では  $^3\text{H}_4$  準位を起点とした  $^3\text{H}_4 + ^3\text{F}_{2,3} \rightarrow ^3\text{F}_4 + ^3\text{F}_4$  非放射的エネルギー散逸経路が増大しやすい<sup>26</sup>。このような交差緩和過程が進行すると、 $^1\text{D}_2$  準位への多段階励起が阻害され、UV 光発光 ( $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_6$ ) 遷移に至るアップコンバージョン効率が著しく低下する。さらに、高濃度  $\text{Tm}^{3+}$  条件では、 $^3\text{H}_4$  準位に滞留した励起エネルギーが  $\text{Yb}^{3+}$  へ逆エネルギー移動 (back energy transfer, BET) すると報告されており<sup>27</sup>、高励起準位の形成効率は一層低下する。これらの現象は一般に濃度消光と呼ばれる。

既報では、 $\text{Tm}^{3+}$  濃度が概ね 0.2–0.5 mol% の範囲において UV 光および可視光アップコンバージョン発光が増強されることが実験的に示されている<sup>27,28</sup>。励起光強度に依存する部分でもあるが、本研究ではこれらの先行研究を踏まえ、濃度消光を回避しつつ十分な発光効率を確保できる条件として、 $\text{Tm}^{3+}$  濃度を 0.3 mol% に設定した。

#### 2.5.3.4 最適粒径領域の総合的考察

以上のように、発光効率は単一の因子によって決定されるものではなく、小さすぎる粒子では欠陥準位や MPR が支配的であること、大きすぎる粒子ではミー散乱による光損失が増加すること、という複数の要因の競合によって最適サイズが決まる。本研究において約 60 nm の粒子が最も高い発光効率を示したという結果は、これらの要因が競合する中で、非放射失活と光散乱の影響がともに比較的抑制された条件に対応していると捉えられる。

本研究で観察された粒径依存性は、Yin らが NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm ナノ結晶を用いて詳細に報告したサイズ効果とよく一致している<sup>4</sup>。Yin らは、粒径の異なる β-NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm (約 25 nm、50 nm、150 nm) を合成し、粒径の増大に伴って表面欠陥や吸着水に由来する非放射失活が減少し、アップコンバージョン発光が大幅に向上することを示した。特に、25 nm から 50 nm へと粒径が増加する際には、UV (360 nm) および青色 (450 nm) 発光が劇的に増大することを示し、これは表面積/体積比の低下により表面クエンチングが抑制されることが主要因であると結論づけている。一方、粒径が 150 nm に達すると、UV および青色発光は再び低下することも明らかにしている。本研究では約 62 nm の粒子が最大の発光強度を示したが、これは Yin らが示した 25 → 50 nm で大幅に増強し、150 nm で再び減少する」というサイズ依存性の挙動と整合的である。すなわち、50-60 nm 程度の粒子サイズは、欠陥準位と MPR、光散乱の条件が最も良好となる領域であることが Yin らの結果および本研究の結果の双方から支持される。

しかしながら、この最適粒径の存在は、粒径制御のみによって欠陥準位や MPR が完全には解消されていないことを意味している。特に Tm<sup>3+</sup>の UV 発光は表面吸着種の高振動数フォノンによる多フォノン緩和の影響を強く受けるため、粒径最適化だけでは UV 発光量子収率を大きく向上させることは困難である。これに対処するためには、粒子表面を低振動数フォノン材料で覆い、表面欠陥からドーパントを空間的に隔離するコア-シェル構造が極めて有効である。次節では、このシェル化の役割とその効果について詳述する。

### 2.5.4 コア-シェル化による発光効率向上と粒径設計

#### 2.5.4.1 シェル化による表面クエンチング抑制の原理

2.5.3 で述べたように、NaYF<sub>4</sub>系 UCNPs における発光効率を制限する主要因は、粒子表面に存在する欠陥準位や高エネルギーフォノンによって誘起される表面クエンチン

グである。これらの表面由来の非放射失活経路は、発光中心が表面に近いほど強く影響し、特に UV～可視域のアップコンバージョン発光を大きく低下させる。この表面クエンチングを抑制するための代表的な戦略が、格子整合性の高い不活性シェルでコア表面を被覆するコア-シェル化 (shelling) である。シェル化によって発光中心 ( $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ) が表面欠陥や表面フォノンから物理的に隔離されることで、非放射緩和が大幅に抑制され、放射再結合が支配的となる。

#### 2.5.4.2 シェル厚の最適化と粒径設計

シェル化は表面クエンチングを抑制する上で有効である一方、シェル厚が厚ければ厚いほど発光が向上するわけではなく、特定の範囲に最適値が存在することが報告されている。Xu らはシェル厚を系統的に変化させた検討により、シェルが薄すぎる場合には表面クエンチングを十分に抑制できない一方、厚すぎる場合にはむしろ発光が低下することを示した<sup>29</sup>。その原因として以下の複合的要因が挙げられる。

まず、シェルが薄い場合 (数 nm 以下) には、シェル層が表面欠陥や高エネルギーフォノンから発光中心を十分に隔離できず、2.6.2 で述べた表面クエンチングが引き続き支配的となる。これに対し、シェル厚が増大すると表面由来の非放射失活は抑制されるが、過度の厚みは逆効果となる。具体的には、(i) シェル厚が大きい場合、コア-シェル界面に結晶歪みや格子不整合が蓄積し、界面欠陥が新たな非放射経路として働くこと、(ii) undoped シェルが厚くなることで、励起光 (980 nm) がシェル内部で散乱・吸収され、コア内の  $\text{Yb}^{3+}$  への実効励起密度が低下することが指摘されている<sup>29</sup>。

さらに、本研究の粒子系では、20 分反応で得られたコア粒径が約 60 nm で最適であることが明らかになった。シェル厚を 20–30 nm とすると全体粒径は 100–120 nm に達し、このサイズ領域では溶液中のミー散乱が顕著に増大する。励起光および放射光の両方が散乱されるため、外部に取り出される発光強度が減少し、見かけの発光効率が低下する結果となる。したがって、コア粒径が約 60 nm である本系においては、シェル厚を過度に増大させることは、表面クエンチング抑制の利点を打ち消す要因となり得る。

以上の知見を踏まえ、本研究では「表面クエンチングを十分に抑制しつつ、散乱・界面欠陥の増大を避ける」という観点から、シェル厚を 10 nm 程度とする条件を採用した。実際、Youn ら<sup>14</sup> の合成プロトコルを参考にした本手法では、この範囲のシェル厚が再現性よく得られ、粒径も約 90 nm に維持できることを確認した (2.6『コア-シェル型アップコンバージョンナノ粒子の構造解析結果』で後述)。この厚さは表面クエン

チング抑制効果と光学的ロスとのバランスが最も良い領域に位置しており、以降のバイオ実験に十分な発光強度と安定性を確保できると判断された。

#### 2.5.4.3 コア-シェル方アップコンバージョンナノ粒子の設計指針

本研究では、コア材料の NaYF<sub>4</sub> に対して、不活性シェルとして NaLuF<sub>4</sub> を採用した。NaLuF<sub>4</sub> はフッ化物ホストとして高い結晶安定性を持ち、かつコア材料と同じ六方晶 ( $\beta$ -NaREF<sub>4</sub>) 構造をとるため、格子定数が近くエピタキシャル成長に適している<sup>9</sup>。特に Lu<sup>3+</sup> は Y<sup>3+</sup> よりもイオン半径が小さく、格子収縮により核生成障壁が高くなることが知られており、単独での NaLuF<sub>4</sub> より核生成が起こりにくいことはシェル成長反応において重要であり、溶液中に独立した NaLuF<sub>4</sub> ナノ粒子が生成することを防ぎ、コア表面のみに選択的かつ均一にシェルが成長する条件を生み出す<sup>9</sup>。

また、Lu<sup>3+</sup> は 4f<sup>14</sup> の完全閉殻で光学的に不活性であるため、シェル内で不要なエネルギー移動経路を生じず、コア内部の Yb<sup>3+</sup>-Tm<sup>3+</sup> アップコンバージョン過程に影響を与えない点も利点である<sup>30</sup>。加えて、Lu<sup>3+</sup> の高い電荷密度に由来する格子の強い剛性は低フォノン環境を生み、シェル層全体の非放射緩和を抑制しやすい<sup>31</sup>。実際、既報では NaYF<sub>4</sub> コアに対する NaLuF<sub>4</sub> シェルの適用により、均一で欠陥の少ないシェル層が形成され、UV~青色発光において特に顕著な増強が報告されており<sup>9</sup>、「核生成しにくく、格子整合性が高く、不活性である」というシェル材料として理想的な特性を有していることを示しており、本研究でも同様の理由から NaLuF<sub>4</sub> をシェルとして採用した。

## 2.6 コア-シェル型アップコンバージョンナノ粒子の構造解析結果

### 2.6.1 構造解析結果

NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm をコアとして NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル UCNP を合成した。図 2-10(a) の TEM 像に示すように、合成直後の NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コア粒子は六角柱状の形状を有し、高い単分散性を示した。平均粒径は 63.4 ± 2.1 nm であり、既報の  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> 系 UCNP で一般的に得られる柱状形態と一致する。NaLuF<sub>4</sub> シェルを成長させたコア-シェル型 UCNP の TEM 像 (図 2-10(b)) では、平均粒径が 88.9 ± 4.0 nm に増加しており、コア粒子と比較すると、約 12.7 nm のシェルが外側に均一に形成されたことが示唆される。粒子形状はコアと同様に六角柱状であり、シェル成長に伴う形態変化は特に認められなかった。これは図 2-10(c) に示す XRD パターンの結果からも確認ができ、

コアおよびコア-シェルいずれの UCNP も六方晶系の  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> 相であり、不純物相は存在せず、シェル形成による結晶相転移も起こっていないことが分かった。

さらに、コア-シェル構造を直接的に評価するため、図 2-10(d) に HAADF-STEM 像、図 2-10(e-k) に STEM-EDS による元素マッピングを示す。Y、Yb、Tm は粒子内部に集中して分布し、一方で Lu は外層に均一に局在していた。F および Na は粒子全体に広く分布した。これらの結果から、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コアの外側に NaLuF<sub>4</sub> シェルが均一かつ連続的に成長していることが明確に示された。

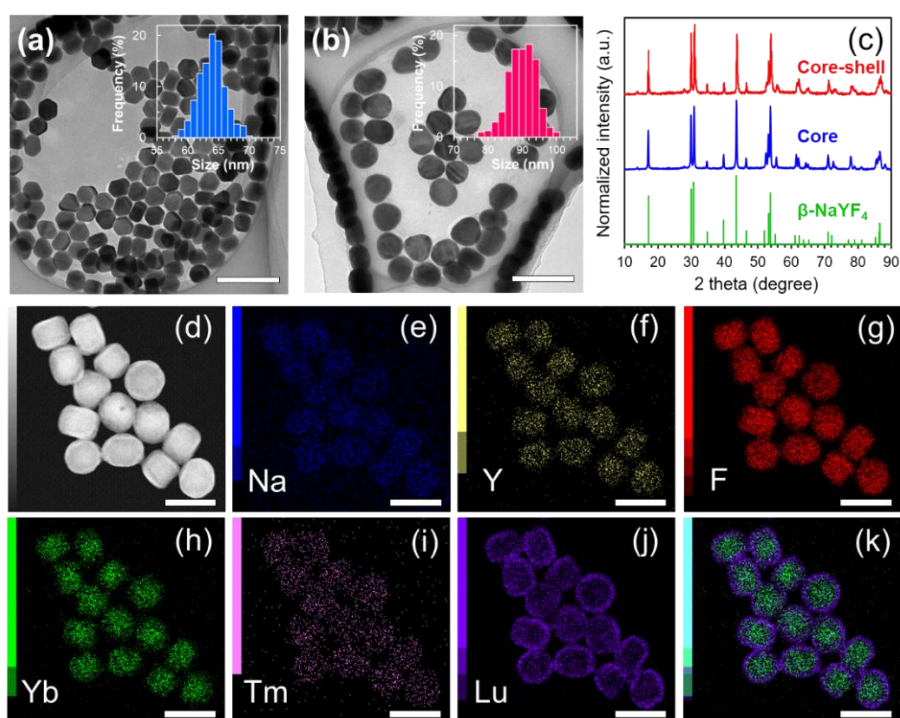


図 2-10 合成直後の(a)コアおよび(b)コア-シェル UCNP の TEM 像(挿入図は粒径分布のヒストグラムを示す)、(c)コアおよびコア-シェル UCNP の XRD パターン(Reference: 六方晶の  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> (ICDD PDF no. 00-016-0334))、(d)HAADF-STEM 像および(e-k)コア-シェル UCNP の EDS マッピング、(e)Na K $\alpha$  線、(f)Y K $\alpha$  線、(g) F K $\alpha$  線、(h)Yb L $\alpha$  線、(i)Tm L $\alpha$  線、(j)Lu L $\alpha$  線、(k)Yb と Lu の重ね合わせ。

## 2.6.2 光学特性評価

NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コア UCNP および NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル UCNP の光学特性を比較するために、980 nm 励起下での発光スペクトルを測定した。図 2-11(a) にヘキサンに分散させたコアおよびコア-シェル UCNP の発光スペクトルの重ね合わせた図を示す。特に 362 nm、453 nm、478 nm の主要ピークで大幅な強度増加が見られ、シ

エル形成によりアップコンバージョン変換効率が大きく向上したことが分かる。図 2-11(b) には図 2-11(a) のセミログプロットを示す。Log スケールにより、コア UCNP 中で非常に弱く観察される発光ピークも可視化され、どちらの粒子も同じ波長変換機構 (図 2-2(b)) を保持していることが確認できた。

図 2-11(c, d) に、それぞれ図 2-11(a) のコアおよびコア-シェル UCNP 単独の発光スペクトルと NIR 光照射時の発光写真を示す。コア粒子では UV・青色発光が弱く、980 nm 照射時の写真においても発光の視認性は低い。一方、コア-シェル粒子では明瞭なピークが観察され、照射時の写真においても肉眼で認識できるほど明るい可視発光が得られた。さらに、 $Tm^{3+}$  の高励起準位に由来する 362 nm ( $^1D_2 \rightarrow ^3H_6$ ) および 453 nm ( $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$ ) の発光はそれぞれコア粒子の約 120 倍、約 130 倍の強度を示した。また、中励起準位である 478 nm ( $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ ) の発光は約 50 倍の増強が確認された。

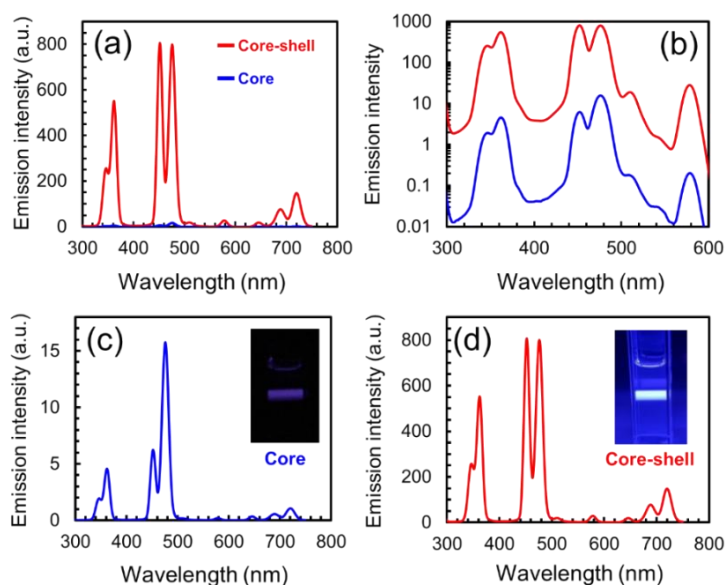


図 2-11(a) コア(98  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )とコア-シェル UCNP(300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )のヘキササン分散液を NIR レーザー光で励起した際の発光スペクトルと写真(UCNP 数が同等になるよう調整)、(b)(a)の主発光ピーク領域のセミログプロット、(c)(a)のコア UCNP の単独スペクトルと、NIR 光照射時の発光写真、(d)(a)のコア-シェル UCNP の単独スペクトルと、NIR 光照射時の発光写真。

### 2.6.3 考察

まず注目すべき点として、全体的な発光効率が向上したことである。NaYF<sub>4</sub>系 UCNP のコア粒子表面には、合成直後の状態では格子欠陥や未被覆部位、さらには表面吸着し

た-OH基などに起因する欠陥準位が多く存在し、これらが強い非放射緩和経路として作用することが知られている。特にナノ粒子系においては、励起エネルギーが量子トンネリングを介して表面欠陥や高エネルギー振動モードに結合することで失活しやすく、発光効率の低下を招く<sup>29</sup>。これに対し、本研究で作製した NaLuF<sub>4</sub> シェルは結晶性が高く、かつ Yb<sup>3+</sup>や Tm<sup>3+</sup>を含まない不活性シェルとして機能するため、コア表面の欠陥準位を効果的にパッシベーションする<sup>29</sup>と同時に、表面近傍での MPR を抑制する。その結果、コア内部で励起された Tm<sup>3+</sup>イオンの励起エネルギーが表面へ拡散した場合でも、非放射的に失活する確率が低減され、全体としてアップコンバージョン変換効率が大幅に向上したと考えられる。

さらにもう一つ注目すべき点として、コア-シェル化によって 362、453 nm に対応する <sup>1</sup>D<sub>2</sub> → <sup>3</sup>H<sub>6</sub> および <sup>1</sup>D<sub>2</sub> → <sup>3</sup>F<sub>4</sub> 遷移が、478 nm に対応する <sup>1</sup>G<sub>4</sub> → <sup>3</sup>H<sub>6</sub> 遷移よりも顕著に増大したことである。一般論として、Tm<sup>3+</sup>の <sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位は高励起準位に位置し、多光子励起過程を経るため、交差緩和や MPR などの非放射緩和経路の影響を受けやすいことが知られている<sup>27,32</sup>。本研究では不活性な NaLuF<sub>4</sub> シェルによる表面パッシベーション効果により、これらの非放射緩和経路が効果的に抑制された結果、<sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位への多光子蓄積効率が向上し、362、453 nm に由来する発光遷移の相対強度が大きく増大したと考えられる。

以上のことから、コア-シェル型 UCNP における UV 発光ピークの著しい増大は、表面欠陥に起因する非放射緩和の抑制と、高励起準位（特に <sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位）へのエネルギー蓄積効率の向上が相乗的に作用した結果であると結論づけられる。

なお、本研究では <sup>1</sup>D<sub>2</sub> 準位と <sup>1</sup>G<sub>4</sub> 準位における結晶場感受性の違いについても検討を試みた。一般に、ランタノイドイオンの電気双極子遷移の強度は Judd-Ofelt 理論に基づいて記述され、遷移固有の還元行列要素  $U^{(i)}$  と、結晶場や局所構造を反映する強度パラメータ  $\Omega_{(i)}$  の積として表され、特に  $\Omega_{(2)}$  は、結晶場の非対称性や局所構造の変化に対する感受性を反映する指標として知られている<sup>33</sup>。この観点から、Tm<sup>3+</sup>における <sup>1</sup>D<sub>2</sub> および <sup>1</sup>G<sub>4</sub> 準位からの遷移強度の違いを Judd-Ofelt 理論に基づいて議論の可能性についても検討した。しかしながら、Tm<sup>3+</sup>の <sup>1</sup>D<sub>2</sub> および <sup>1</sup>G<sub>4</sub> 遷移の双方に対する Judd-Ofelt 解析結果を同一文献内で体系的に示した報告は探してみた限り存在せず、特に本研究で用いた NaYF<sub>4</sub> ホストに対する  $U^{(i)}$  パラメータの実験的報告は確認できなかった。既報としては、1970 年代に報告された Carnall ら<sup>34</sup>による LaF<sub>3</sub> ホスト中の Tm<sup>3+</sup>に対する <sup>1</sup>D<sub>2</sub> → <sup>3</sup>H<sub>6</sub> 及び <sup>1</sup>D<sub>2</sub> → <sup>3</sup>F<sub>4</sub> 遷移の Judd-Ofelt 解析が存在したが、<sup>1</sup>G<sub>4</sub> → <sup>3</sup>H<sub>6</sub> 遷移の解析値について

は存在しなかったため、本研究の NaYF<sub>4</sub> 系 UCNP への直接的な適用には慎重さが求められるため、本研究では、U<sup>(2)</sup>に基づく定量的議論を行うことは避け、Judd–Ofelt 理論についてはその定義および一般的な物理的意味に留めて記載することとした。

## 2.7 結言

本章では、NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP を、相転移・粒径成長・配位子化学・ドープ効果・発光特性という複数の観点から総合的に検討した。まず、反応初期に生成する  $\alpha$ -NaYF<sub>4</sub> 粒子は準安定であり、昇温過程で進行するオストワルド熟成と self-focusing によって  $\beta$  相核へ選択的に溶解・再析出することが確認された。また、昇温速度を制御することで相転移開始時点の  $\alpha$  相粒子数が変化し、質量保存則に基づいて  $\beta$  相粒子の最終サイズが決定されると考察した。さらに、配位子 (OA/ODE) の比率や Yb<sup>3+</sup> 高濃度ドープの影響、そして初期  $\alpha$  相粒子サイズに起因する動力学的要因が複合的に作用することで、特定条件では  $\alpha$  相が最終生成物として残存し得ることも明らかになった。これらは、 $\beta$  相が熱力学的に安定であっても、実際の反応場では界面化学・格子歪み・拡散速度といった動力学的因子が強く支配することを示している。

粒径と発光効率の関係については、小粒径では表面クエンチングが支配的であり、中程度 (約 60 nm) では結晶性向上と適切なドープ間距離により最も高い発光が得られ、大粒径では光散乱により効率が低下するという「最適粒径領域」の存在を体系的に示した。これらは先行研究と整合しつつ、本研究系に固有の発光最大化条件を具体的に提示するものである。

以上より、本章で得られた知見は、 $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm UCNP の粒径・結晶相・発光効率を高精度に制御するための基盤となるものであり、次章で扱うコア-シェル化によるさらなる発光増強戦略の合理性を裏付けるものである。

## 2.8 参考文献

- (1) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Si, R.; Yan, Z.-G.; Sun, L.-D.; You, L.-P.; Yan, C.-H. High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (19), 6426-6436.
- (2) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. Size- and Phase-Controlled Synthesis of Monodisperse NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er Nanocrystals from a Unique Delayed Nucleation Pathway Monitored with Upconversion Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces*

- 2007**, *III* (37), 13730-13739.
- (3) Liang, X.; Wang, X.; Zhuang, J.; Peng, Q.; Li, Y. Synthesis of NaYF<sub>4</sub> Nanocrystals with Predictable Phase and Shape. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17* (15), 2757-2765.
  - (4) Yin, A.; Zhang, Y.; Sun, L.; Yan, C. Colloidal Synthesis and Blue Based Multicolor Upconversion Emissions of Size and Composition Controlled Monodisperse Hexagonal NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm Nanocrystals. *Nanoscale* **2010**, *2* (6), 953-959.
  - (5) Johnson, N. J. J.; Korinek, A.; Dong, C.; van Veggel, F. C. J. M. Self-Focusing by Ostwald Ripening: A Strategy for Layer-by-Layer Epitaxial Growth on Upconverting Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (27), 11068-11071.
  - (6) Ostrowski, A. D.; Chan, E. M.; Gargas, D. J.; Katz, E. M.; Han, G.; Schuck, P. J.; Milliron, D. J.; Cohen, B. E. Controlled Synthesis and Single-Particle Imaging of Bright, Sub-10 nm Lanthanide-Doped Upconverting Nanocrystals. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2686-2692.
  - (7) Rinkel, T.; Nordmann, J.; Raj, A. N.; Haase, M. Ostwald-Ripening and Particle Size Focussing of Sub-10 Nm NaYF<sub>4</sub> Upconversion Nanocrystals. *Nanoscale* **2014**, *6* (23), 14523-14530.
  - (8) Wang, F.; Richards, V. N.; Shields, S. P.; Buhro, W. E. Kinetics and Mechanisms of Aggregative Nanocrystal Growth. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 5-21.
  - (9) Huang, K.; Jayakumar, M. K. G.; Zhang, Y. Lutetium Doping for Making Big Core and Core-Shell Upconversion Nanoparticles. *J. Mater. Chem. C Mater. Opt. Electron. Devices* **2015**, *3* (39), 10267-10272.
  - (10) Rastogi, C. K.; Sharma, S. K.; Patel, A.; Parthasarathy, G.; Pala, R. G. S.; Kumar, J.; Sivakumar, S. Dopant Induced Stabilization of Metastable Zircon-Type Tetragonal LaVO<sub>4</sub>. *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces* **2017**, *121* (30), 16501-16512.
  - (11) Li, H.; Xu, L.; Chen, G. Controlled Synthesis of Monodisperse Hexagonal NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er Nanocrystals with Ultrasmall Size and Enhanced Upconversion Luminescence. *Molecules* **2017**, *22* (12).
  - (12) Pin, M. W.; Park, E. J.; Choi, S.; Kim, Y. I.; Jeon, C. H.; Ha, T. H.; Kim, Y. H. Atomistic Evolution during the Phase Transition on a Metastable Single NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er Upconversion Nanoparticle. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 2199.
  - (13) Chen, B.; Kong, W.; Wang, N.; Zhu, G. Oleylamine-Mediated Synthesis of Small NaYbF<sub>4</sub> Nanoparticles with Tunable Size. *Chem. Mater.* **2019**.
  - (14) Nguyen, N. T.; Kim, J.; Le, X. T.; Lee, W. T.; Lee, E. S.; Oh, K. T.; Choi, H.-G.; Youn, Y. S. Amplified Fenton-Based Oxidative Stress Utilizing Ultraviolet Upconversion Luminescence-Fueled Nanoreactors for Apoptosis-Strengthened Ferroptosis Anticancer Therapy. *ACS Nano* **2023**, *17* (1), 382-401.
  - (15) Das, G. K.; Stark, D. T.; Kennedy, I. M. Potential Toxicity of Up-Converting Nanoparticles

- Encapsulated with a Bilayer Formed by Ligand Attraction. *Langmuir* **2014**, *30* (27), 8167-8176.
- (16) Maemura, D.; Le, T. S.; Takahashi, M.; Matsumura, K.; Maenosono, S. Optogenetic Calcium Ion Influx in Myoblasts and Myotubes by Near-Infrared Light Using Upconversion Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (36), 42196-42208.
- (17) Maenosono, S.; Lee, J.; Dao, A. T. N.; Mott, D. Peak Shape Analysis of Ag 3d Core-Level X-Ray Photoelectron Spectra of Au@Ag Core-Shell Nanoparticles Using an Asymmetric Gaussian-Lorentzian Mixed Function. *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44* (13), 1611-1614.
- (18) Wang, Y.; Tu, L.; Zhao, J.; Sun, Y.; Kong, X.; Zhang, H. Upconversion Luminescence of  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>@ $\beta$ -NaYF<sub>4</sub> Core/Shell Nanoparticles: Excitation Power Density and Surface Dependence. *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces* **2009**, *113* (17), 7164-7169.
- (19) Bagheri, A.; Arandiyani, H.; Boyer, C.; Lim, M. Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles: Emerging Intelligent Light-Activated Drug Delivery Systems. *Adv. Sci. (Weinh.)* **2016**, *3* (7), 1500437.
- (20) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (10), 5161-5214.
- (21) Bian, W.; Lin, Y.; Wang, T.; Yu, X.; Qiu, J.; Zhou, M.; Luo, H.; Yu, S. F.; Xu, X. Direct Identification of Surface Defects and Their Influence on the Optical Characteristics of Upconversion Nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12* (4), 3623-3628.
- (22) Chen, X.; Li, S.; Salamo, G. J.; Li, Y.; He, L.; Yang, G.; Gao, Y.; Liu, Q. Sensitized Intense Near-Infrared Downconversion Quantum Cutting Three-Photon Luminescence Phenomena of the Tm<sup>3+</sup> Ion Activator in Tm<sup>3+</sup>Bi<sup>3+</sup>:YNbO<sub>4</sub> Powder Phosphor. *Opt. Express* **2015**, *23* (3), A51-61.
- (23) Ivaturi, A.; MacDougall, S. K. W.; Martín-Rodríguez, R.; Quintanilla, M.; Marques-Hueso, J.; Krämer, K. W.; Meijerink, A.; Richards, B. S. Optimizing Infrared to near Infrared Upconversion Quantum Yield of  $\beta$ -NaYF<sub>4</sub>:Er<sup>3+</sup> in Fluoropolymer Matrix for Photovoltaic Devices. *J. Appl. Phys.* **2013**, *114* (1), 013505.
- (24) Morea, R. Synthesis and Characterization of Rare Earth Doped Fluorotellurite Glasses, Glass-Ceramics, and Thin Film Glasses for Active Photonic Applications. **2015**.
- (25) Green, K.; Huang, K.; Pan, H.; Han, G.; Lim, S. F. Optical Temperature Sensing with Infrared Excited Upconversion Nanoparticles. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 416.
- (26) Wang, G.; Qin, W.; Wang, L.; Wei, G.; Zhu, P.; Kim, R. Intense Ultraviolet Upconversion Luminescence from Hexagonal NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Tm<sup>3+</sup> Microcrystals. *Opt. Express* **2008**, *16* (16), 11907-11914.
- (27) Huang, D.; Li, F.; Ågren, H.; Chen, G. Inhibiting Concentration Quenching in Yb<sup>3+</sup>-Tm<sup>3+</sup> Upconversion Nanoparticles by Suppressing Back Energy Transfer. *Nat. Commun.* **2025**,

16 (1), 4218.

- (28) Yan, M.; Guo, L.; Cai, P.; Huang, Y.; Zhang, Q.; Lue, Q. Hydrothermal Synthesis of NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Tm<sup>3+</sup> Upconversion Microparticles and Their Effects on Polymerization for Stereolithography. *Opt. Mater. (Amst.)* **2020**, *109* (110311), 110311.
- (29) Xu, X.; Zhou, Z.; Liu, Y.; Wen, S.; Guo, Z.; Gao, L.; Wang, F. Optimising Passivation Shell Thickness of Single Upconversion Nanoparticles Using a Time-Resolved Spectrometer. *APL Photonics* **2019**, *4* (2), 026104.
- (30) Bünzli, J.-C. G. Lanthanide Luminescence for Biomedical Analyses and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2729-2755.
- (31) Tiwari, S. P.; Maurya, S. K.; Yadav, R. S.; Kumar, A.; Kumar, V.; Joubert, M.-F.; Swart, H. C. Future Prospects of Fluoride Based Upconversion Nanoparticles for Emerging Applications in Biomedical and Energy Harvesting. *J. Vac. Sci. Technol. B Nanotechnol. Microelectron.* **2018**, *36* (6), 060801.
- (32) Auzel, F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 139-173.
- (33) Judd, B. R. Optical Absorption Intensities of Rare-Earth Ions. *Phys. Rev.* **1962**, *127* (3), 750-761.
- (34) Carnall, W. T.; Crosswhite, H.; Crosswhite, H. M. *Energy Level Structure and Transition Probabilities in the Spectra of the Trivalent Lanthanides in LaF<sub>3</sub>*; ANL--78-XX-95; Argonne National Lab. (ANL), Argonne, IL (United States), 1978.

## 第3章 アップコンバージョンナノ粒子の細胞表面 OPN5 へのターゲティング

### 3.1 緒言

第2章で UCNP の合成法について詳しく述べたとおり、合成直後のハイブリッドナノ粒子の表面は OA によって保護されているため、UCNP は無極性溶媒には分散するが、極性溶媒に分散しない。そのため、生細胞を対象とした応用に供するには、まず UCNP の水分散化が不可欠となる。また、本論文の最終目的である OPN5 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験においては、UCNP を細胞表面の OPN5 に結合させる必要がある。そこで本章では、この目的に向けて行った UCNP の水分散化および OPN5 へのターゲティングの検討とその結果について述べる。

### 3.2 ターゲティング戦略

本研究では、UCNP を細胞膜上の OPN5 に選択的に結合させることで、OPN5 の光制御と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを実現することを目的とした。そのために、以下の2つの要素技術を組み合わせる戦略を立てた。

#### (i) UCNP の水分散化と機能化

合成直後の UCNP を PEG 化リン脂質とビオチン化リン脂質でカプセル化し、水分散性を付与するとともに、表面にビオチン基を導入する (以下 UCNP@Biotin)。

#### (ii) FLAG タグ付き OPN5 発現系の構築

細胞外に FLAG タグを提示するように設計した OPN5 発現プラスミドを構築し、細胞膜上で抗 FLAG 抗体との結合部位を提供する。

この2つを組み合わせ、図 3-1 に示すように、(1) FLAG タグにビオチン化抗 FLAG 抗体を結合させ、(2) アビジンを通して、(3) UCNP@Biotin を結合させることで、UCNP を細胞表面の OPN5 に特異的にターゲティングすることを可能にした。

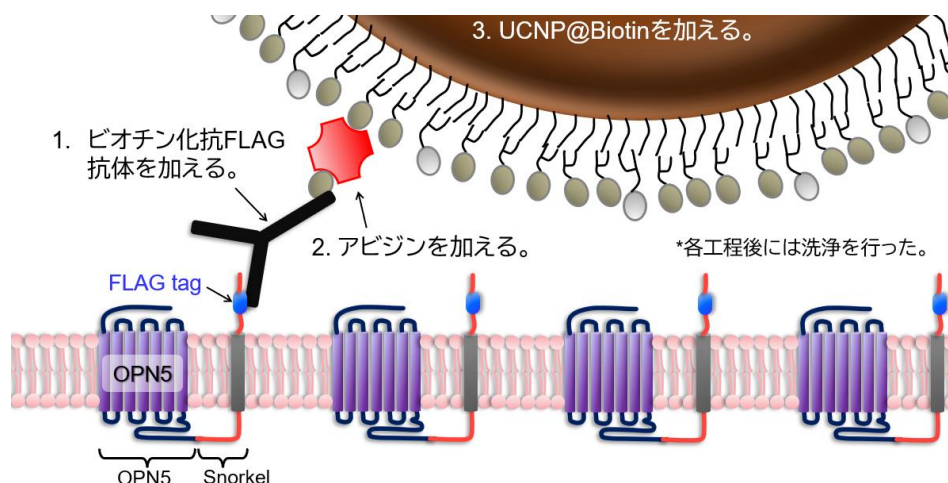


図 3-1 UCNP@Biotin と OPN5 の結合の概要図。

### 3.3 アップコンバージョンナノ粒子の水分散化

我々の以前の研究を参考に、PEG 化リン脂質とビオチン化リン脂質によるカプセル化によって水分散 UCNPs (以下 UCNP@Biotin) を作製した<sup>1,2</sup>。カプセル化に用いる試薬として、1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-*N*-(ビオチン化) (ナトリウム塩) (ビオチン-DOPE) (以下ビオチン化リン脂質、図 3-2(a)) を選択した。また、非特異的反応の抑制および水分散性・コロイド安定性の向上を目的として、1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-*N*-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-350] (アンモニウム塩) (以下 PEG 化リン脂質、図 3-2(b)) を用いた<sup>3,4</sup>。

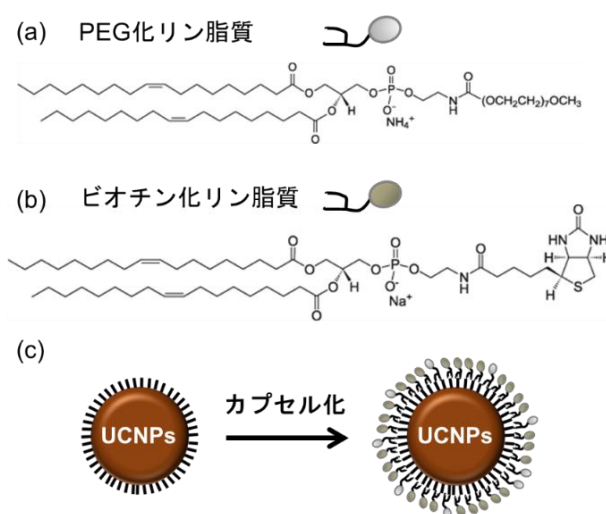


図 3-2(a)PEG 化リン脂質、(b)ビオチン化リン脂質の構造式、(c)UCNPs カプセル化の模式図。

### 3.3.1 試薬及び評価装置

【試薬】 ビオチン化リン脂質と PEG 化リン脂質は、Avanti Polar Lipids で購入した。これらを 5.5 mM のクロロホルム溶液として調整し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

【評価装置】 構造解析は透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM、Hitachi H-7650、加速電圧 100 kV)、UCNP@Biotin のゼータ電位および流体力学的粒径は、ゼータサイザーナノ ZS (Malvern) を使用して測定した。

### 3.3.2 水分散 UCNPs(UCNP@Biotin)の合成方法

合成直後の UCNPs は、ビオチン化リン脂質と PEG 化リン脂質を 4:1 のモル比で混合することでカプセル化した。具体的には、ビオチン化リン脂質溶液 (5.5 mM) 840  $\mu\text{L}$  と PEG 化リン脂質溶液 (5.5 mM) 210  $\mu\text{L}$  を混合し、続いてクロロホルムに分散させた UCNP 溶液 (1 mg/mL) 1.4 mL を加えて混合した。次に、Ar 気流下でクロロホルムを完全に蒸発させ、得られた乾固物を超純水に再分散した。これを  $10,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、上清を除去した後、沈殿物を超純水に再分散させ、ビオチン化リン脂質および PEG 化リン脂質でカプセル化された UCNP@Biotin を得た。

TEM の評価としては、Cu のカーボングリッドでは親水性対応していないため、グリッドをプラズマ処理することによってサンプル溶液をグリッドに滴下しやすく処理を行った。装置は DII-29020HD 電子顕微鏡親水化処理装置 (日本電子) を使用し、30 秒間プラズマ処理した。

### 3.3.3 UCNP@Biotin の結果

#### 3.3.3.1 透過型電子顕微鏡による形態観察

図 3-3 に UCNP@Biotin の TEM 像を示す。複数視野を観察したが、複数の UCNPs が同一リポソーム内部に同時にカプセル化された凝集構造は確認されず、単一粒子が均一に分散して存在していた。このことから、カプセル化プロセスにおいて大きな凝集は生じていないと判断される。ただし、TEM 観察は乾燥状態における局所的な形態の情報に限られるため、溶液中での分散状態を評価するために、続いて DLS、ゼータ電位測定を行った。

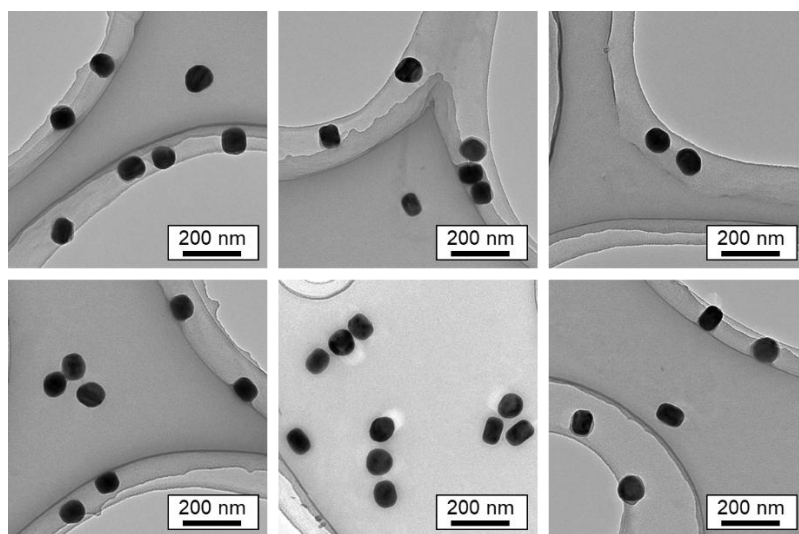


図 3-3 UCNP@Biotin の TEM 像。

### 3.3.3.2 動的光散乱による流体力学的サイズ分布およびゼータ電位による表面電荷評価

水 (pH=7) 中における UCNP@ビオチンの流体力学的サイズ分布を図 3-4(a) に示す。平均流体力学的サイズ ( $D_H$ ) は 117 nm であり、この値は OA (2.2 nm) およびリン脂質 (約 3 nm) の分子長を考慮した UCNP@Biotin の理論幾何学的サイズ (約 100 nm) とほぼ一致しており、大部分の UCNP が個別にリン脂質によりカプセル化されていることが示唆された。 $D_H$  分布が広いのは、空のリン脂質リポソーム (図 3-4(b),  $D_H = 32.6$  nm) と UCNP-リン脂質ハイブリッドの共存に起因すると考えられる。図 3-4(c) に示したゼータ値の結果は -22.6 mV を示し、リン脂質由来の負電荷が水中での良好な分散安定性を与えていることが示唆された。

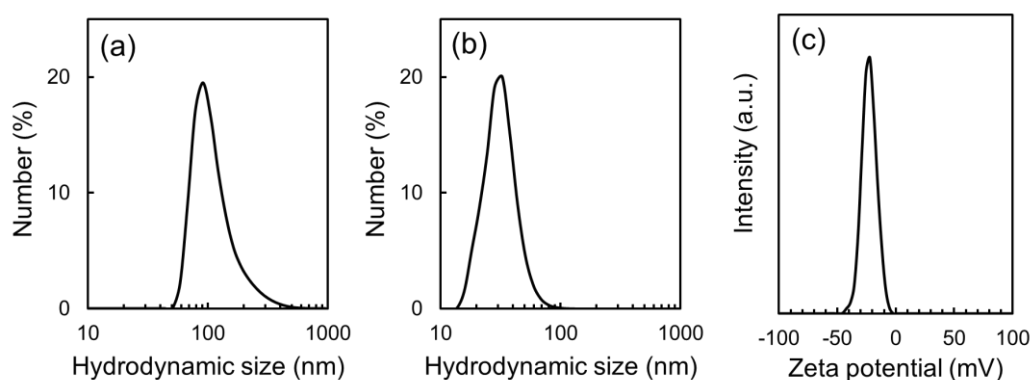


図 3-4 (a)UCNP@Biotin の流体力学的サイズ分布、(b)リン脂質リポソームの流体力学的サイズ分布、(c)UCNP@Biotin のゼータ電位。

### 3.3.3.3 光学特性評価

図 3-5(a) および 3-5(b) にヘキササン分散 UCNP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) と水分散 UCNP@Biotin (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の発光スペクトルを示す。発光ピークの相対的形状は維持されており、波長変換メカニズムそのものは変化していないことを示したが、UCNP@Biotin の濃度はヘキササン分散溶液の濃度の 2/3 であるにもかかわらず、発光強度は桁違いに低下しており、水分散化によって実効的なアップコンバージョン変換効率が著しく低下することを明確に示した。これはよく知られた現象であり、主な原因は非放射再結合の促進と、水分子による NIR 光の吸収である<sup>5</sup>。

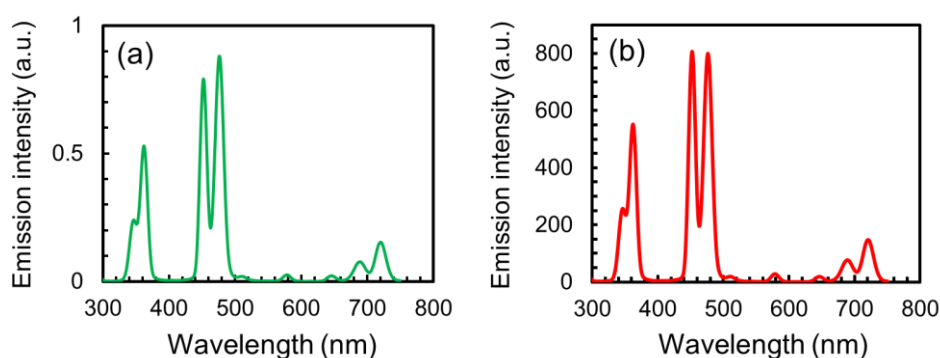


図 3-5(a) 水分散 UCNP@Biotin (pH=7、濃度: 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、(b) ヘキササン分散 UCNP (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の NIR 光励起発光スペクトル。

## 3.4 プラスミド作製

本研究に必要な、細胞外に FLAG タグを発現させるプラスミドは市販されていなかったため、図 3-6(a) のように設計し、自作した。

### 3.4.1 コンストラクト設計

細胞外 FLAG タグ付きヒト OPN5 をコードするプラスミドは、Snorkel システム<sup>6</sup> を用いて構築された。Snorkel は図 3-1 で示したように、OPN5 の C 末端から延長し、細胞膜を貫通して細胞外表面に FLAG タグを提示するドメインであり、人工的に細胞膜を一度貫通して細胞外側へ突出する構造を形成することで、C 末端側に配置した FLAG タグを細胞外表面に提示する役割を持つ。

OPN5 のコード配列とベクターバックボーンは、市販のヒト OPN5 プラスミドを供給源として用いた。図 3-6 (a) に示すように、このベクターには SV40 ori (Simian Virus 40

origin of replication) が組み込まれており、SV40 大 T 抗原を発現する HEK293T ではプラスミドが細胞内で複製され、一時的なコピー数増加を介して発現効率が高まる<sup>7)</sup>。以上の理由から、以後の実験には HEK293T 細胞株を用いることとする。

コンストラクトの組み立てに際して、3つのフラグメント、すなわち (1) OPN5 コード配列、(2) ベクターバックボーン、(3) Snorkel ドメインを準備し、それぞれ PCR により増幅した。これらの断片を EcoRI および AgeI 制限酵素部位を介してライゲーションにより組み立てた。

深層学習タンパク質言語モデルに基づくアルゴリズム (DeepTMHMM<sup>8)</sup>) による膜貫通領域予測を行ったところ (図 3-6(b))、OPN5 領域に典型的な 7本の膜貫通ヘリックスが高い確率で予測された。また、C 末端側に融合した Snorkel についても疎水性領域が“Membrane”として認識され、Snorkel が設計どおり一度膜を貫通するトポロジーを示した。

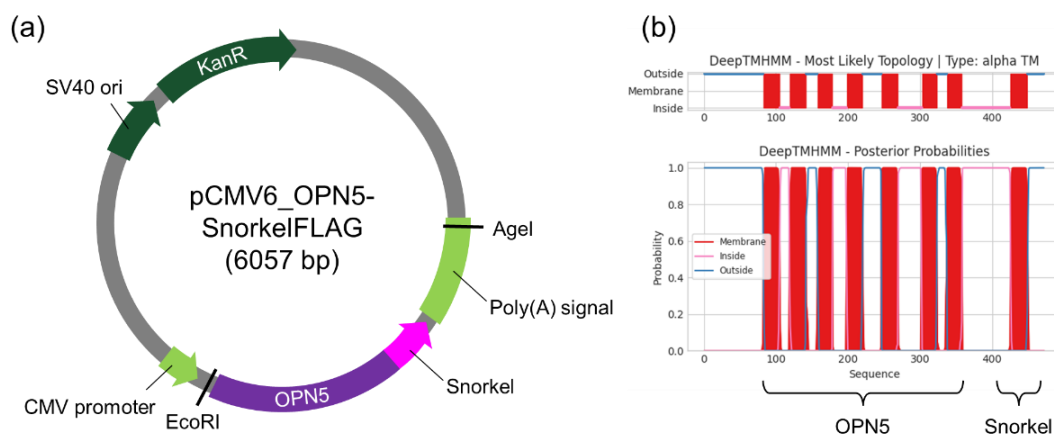


図 3-6 (a)本研究で設計したプラスミドのマップ、(b)プラスミド (pCMV6\_OPN5 SnorkelFLAG)から発現される OPN5 の膜貫通トポロジー。

### 3.4.2 試薬、装置及び評価方法

【試薬】 OPN5 発現プラスミド (GPR136 (OPN5) (NM\_181744) Human Tagged ORF Clone) は OriGene から購入した。PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase を Takara Bio から購入した。付属の 5× PrimeSTAR GXL Buffer (Mg<sup>2+</sup>含む) (2 mM)、dNTP Mixture (0.4 mM) とともに用いた。PCR で使用する各プライマー (50 μM) は Eurofins Genomics に発注した。Snorkel ドメインの DNA 配列は、参考文献に基づき Eurofins Genomics に合成を依頼した。Agarose S はニッポン・ジーンから購入した。臭化エチジウム (10 mg/mL)

はナカライテスクから購入した。TAE バッファーはニッポン・ジーンズの 50×TAE (2 mol/l Tris-acetate, 50 mmol/l EDTA) を 50 倍希釈して使用した。EcoRI はタカラバイオから購入した。AgeI は NEW ENGLAND Biolabs から購入した。Ligation high Ver.2 (ライゲーション試薬) は東洋紡から購入した。カナマイシン硫酸塩 (抗生物質) は富士フイルム和光純薬から購入した。プラスミド精製キットは QIAGEN から購入した。

【装置】 PCR 装置は Mastercycler EpGradient S PCR Thermal Cycle (Eppendorf) を使用した。電気泳動装置は Mulpid-exU (アドバンス) を使用した。

【評価方法】 得られた FLAG タグ付き OPN5 発現プラスミド (以下 OPN5-SnorkelFLAG プラスミド) は、Oxford Nanopore 技術 (Eurofins Genomics) に基づく全プラスミドシーケンシングにより配列を確認した。

### 3.4.3 プラスミド調整

3.4.1 で設計した各フラグメントを用いて、プラスミドを構築した。まず、OPN5 コード配列、ベクターバックボーン、Snorkel ドメインを PCR により増幅した。PCR は高精度 DNA ポリメラーゼを用い、反応液組成は 25  $\mu$ L 中にプライマー (各 0.3  $\mu$ M) : 配列は Appendix A.2.1『プライマーの配列』に記載、dNTP 混合液 (0.2 mM)、鋳型 DNA (10–50 ng) を含むように調製した。PCR サイクル条件は、98 °C で 2 分間の初期変性後、98 °C で 10 秒、55–65 °C で 10 秒、68 °C で 30 秒/1 kb の伸長を 30 サイクル繰り返し、最後に 72 °C で 5 分間の伸長を行った。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で確認後、ゲル抽出キットにより精製した。

次に、各断片とベクターバックボーンを EcoRI および AgeI で制限酵素処理し、ライゲーション試薬を用いて 16 °C で 30 分間ライゲーション反応を行った。その後、大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入した。形質転換体は LB 寒天培地 (100  $\mu$ g/mL カナマイシン含有) 上で一晚培養し、得られたコロニーをスクリーニングに供した。

コロニー PCR および制限酵素解析により適切な組換え体を確認し、選抜したコロニーからミニプレップキット (QIAGEN) によりプラスミド DNA を抽出した。

### 3.4.4 大腸菌形質転換およびコロニー選別

ライゲーション産物はコンピテントセル (*E. coli* DH5  $\alpha$ , 50  $\mu$ L) にプラスミド DNA を添加し、氷上で 30 分間保持した。続いて 42 °C で 45 秒間ヒートショックを行い、直ちに氷上で 2 分間冷却した。その後、SOC 培地 100  $\mu$ L を加えて軽く混和し、37 °C で

30 分間培養した。得られた培養液を抗生物質含有 LB 寒天培地（カナマイシン 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  またはアンピシリン 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に播種し、37  $^{\circ}\text{C}$  で一晩培養した。

翌日、形成されたコロニーを確認し、滅菌済みつまようじを用いて単一コロニーをつつき、抗生物質含有 LB 培地（2 mL）を入れた試験管に接種した。培養は 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 rpm で 12–16 時間振とうして行った。なお、16 時間以上の培養はプラスミド収量の低下や細胞溶解を引き起こす可能性があるため避け、試験管は培地量の 4 倍以上の容積を有するものを使用した。

### 3.4.5 プラスミド精製およびシーケンスの確認

培養液を遠心チューブに回収し、19,000  $\times g$  で 5 分間遠心して沈殿を得た。沈殿は 250  $\mu\text{L}$  の Buffer P1（RNase A 含有）で懸濁し、続いて 250  $\mu\text{L}$  の Buffer P2 を加えて軽く反転混和した。さらに 350  $\mu\text{L}$  の Buffer N3 を添加し、直ちに反転混和した後、19,000  $\times g$  で 5 分間遠心した。得られた上清を QIAprep Spin Column に添加し、14,000  $\times g$  で 1 分間遠心してフロースルーを廃棄した。

次に、カラムに 750  $\mu\text{L}$  の Buffer PE を加えて 14,000  $\times g$  で 1 分間遠心し、フロースルーを廃棄した。再度 14,000  $\times g$  で 1 分間遠心し、残留エタノールを完全に除去した。カラムを新しい 1.5 mL チューブに移し、カラム中央に 50  $\mu\text{L}$  の Elution buffer（10 mM Tris-Cl, pH 8.5）または滅菌水を添加し、室温で 1 分間静置した後、14,000  $\times g$  で 1 分遠心し、精製プラスミドを回収した。

得られたプラスミド DNA は、Oxford Nanopore 技術を用いた全プラスミドシーケンシングによって配列を検証した結果、設計した配列と一致していることを確認した。Appendix A.2.2 『全シーケンス解析結果』に記載した。

## 3.5 OPN5-HEK の構築

### 3.5.1 トランスフェクション

作製したプラスミドを用いて HEK293T 細胞に OPN5 を発現させるために、トランスフェクションを行った。トランスフェクションとは、外来の核酸を細胞内に導入する操作の総称であり、物理的方法、化学的方法、ウイルスベクター法に大別される。今回は化学的方法の一つであるリポフェクションを利用した。リポフェクションでは、カチオン性脂質が DNA と複合体を形成し、この複合体がエンドサイトーシスを介して数時間

以内に細胞内へ取り込まれる。その後、プラスミド DNA は核内へ移行し、24-48 時間で目的タンパク質の発現が確認可能となる。膜タンパク質である OPN5 は小胞体で翻訳され、ゴルジ体で修飾を受け、小胞輸送により細胞膜へ局在する。本研究では FLAG タグを細胞外側に提示させるよう設計しており、抗 FLAG 抗体を介したターゲティング実験に利用した。

### 3.5.2 試薬および評価装置

【試薬】 ポリ-L-リジン溶液は Sigma-Aldrich から購入した。Lipofectamine® 2000 (リポフェクション試薬、以下 Lipofectamine)、Opti-MEM (リポフェクタミン用無血清培地) は Thermo Fisher Scientific から購入した。モノクロナール抗 FLAG M2 抗体、ビオチン付き抗 FLAG 抗体、ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA, 純度  $\geq 96\%$ ) は Sigma-Aldrich から購入した。Alexa Fluor 594 ヤギ抗マウス IgG 二次抗体は Invitrogen から購入した。

アビジンとジギトニン、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  は富士フィルム和光純薬から購入した。4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液はナカライテスクから購入した。

【評価装置】 蛍光顕微鏡としては BZ-810 (キーエンス) を使用した。観察では、フィルターとして TRITC フィルター ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 545 \pm 25/605 \pm 70 \text{ nm}$ ) を使用した。

### 3.5.3 トランスフェクションによる OPN5 発現細胞の構築

#### 3.5.3.1 トランスフェクション方法

トランスフェクションは後述の結合実験や  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験に関わってくる。何度も洗浄の工程が入ってきて細胞がはがれやすくなったため、細胞播種に先立ち、35 mm ディッシュをポリリジンで被覆する。ポリ-L-リジン原液を 35 mm ディッシュ 1 枚あたり 1 mL を加え、10 分間室温でインキュベートし、ポリリジンを捨て、クリーンベンチ内で一晩放置して風乾させた。翌日ディッシュを PBS で 3 回、10% FBS 含有 DMEM で 1 回洗浄し、細胞播種を行った。10% FBS 含有 DMEM に分散させた  $2 \times 10^5$  細胞をポリ-L-リジン処理した 1 枚の 35 mm ディッシュに播種し、37°C、5%二酸化炭素雰囲気下のインキュベーターで約 24 時間インキュベートした。これは、リポフェクション実施時において細胞密度が 50-60%、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験実施時において 80-90%となるように調製した。リポフェクションでは、Lipofectamine とプラスミド DNA を無血清培地の Opti-MEM 中でそれぞれ希釈した後、室温で 5 分間インキュベートし、混合して室

温で 10 分間インキュベートすることで複合体を形成させた。Lipofectamine と DNA の比率は 4:1 とし、本研究では、1 ディッシュあたり DNA 0.2  $\mu\text{g}$  に対して Lipofectamine 0.8  $\mu\text{L}$  を用いた。形成された複合体溶液は、1 ディッシュあたり 100  $\mu\text{L}$  を細胞培養液に添加した。以降、OPN5 発現 HEK293T 細胞を OPN5-HEK と表記する。

### 3.5.3.2 免疫染色の結果

OPN5-HEK が構築できたかどうかを確認するため、膜透過処理をせずに免疫染色を行い、FLAG タグが細胞外に発現していることを蛍光顕微鏡で観察した。トランスフェクションから 24 時間経過した OPN5-HEK のディッシュの培地を吸い取り、PBS で 1 回洗浄した。続いて固定化のために 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を加え、15 分間待ち、PBS で 1 回洗浄した。透過処理を行う場合には、ここで 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ジギトニン-PBS を加え 5 分間待ち、PBS で 1 回洗浄した。50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -PBS を加えクエンチングし、10 分後に PBS で 1 回洗浄した。その後、3% BSA-PBS で 30 分間ブロッキングし、1 mL の 3% BSA 含有 PBS にモノクローナル抗 FLAG M2 抗体を 1000 倍希釈してディッシュに加え、一晩 4°C でインキュベーションした。翌日、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、1 mL の 3% BSA 含有 PBS に二次抗体を 2000 倍希釈してディッシュに加え、1 時間室温でインキュベーションした。その後、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、PBS を 0.5 mL ずつ加え、蛍光顕微鏡での観察を行った。

膜透過処理を行わなかった免疫染色の結果を図 3-7(a, b) に示す。細胞周縁に特異的な蛍光シグナルが観察されたことから、Snorkel システムによって設計通りに OPN5 が細胞膜上に結合し、FLAG が細胞外側に提示されていることが確認された。一方、膜透過処理を行った免疫染色の結果を図 3-7(c, d) に示す。膜透過処理を行った場合にはより強いシグナルが観察された。これは一部の OPN5 が膜輸送を経ずに細胞質内に留まっていることを示唆している。膜タンパク質、とりわけ GPCR ではこのような現象は十分に起こり得ることである<sup>9</sup>。トランスフェクション効率は、全細胞数に対して蛍光を示した細胞をカウントすることで算出した。その結果、図 3-7(b) より、全細胞数に対するトランスフェクション効率は約 9%であった。また、図 3-7(d) より、全細胞数に対して細胞外に FLAG を発現している細胞の割合は約 5%であることが分かった。

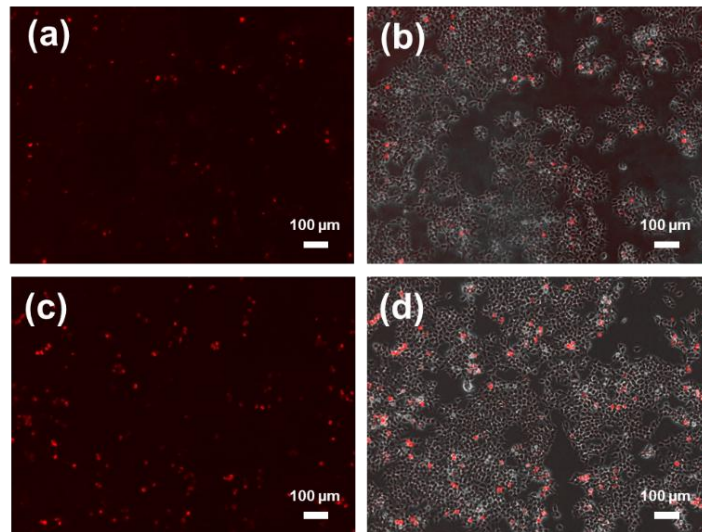


図 3-7 OPN5-HEK の蛍光像(左)および蛍光像と位相差像のマージ画像(右)。一次抗体(抗 FLAG 抗体)および Alexa Fluor 594 標識二次抗体(IgG)で免疫染色を行った。(a, b) 膜透過処理なし、(c, d) 膜透過処理あり。

### 3.5.4 OPN5 陽性細胞の蛍光標識の試み

本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$  応答率を正確に求めるために、OPN5 を発現している細胞を生細胞状態で識別する蛍光標識法の確立を試みた。具体的には、tdTomato を用いた共発現法、共トランスフェクション法、および FLAG タグの蛍光免疫標識法の 3 種類を検討した。しかし、以下に示す理由により、いずれも OPN5 陽性細胞を高精度かつ再現性高く識別する手法として確立することはできなかった。

#### 3.5.4.1 p2A 配列を用いた OPN5-tdTomato 共発現系の構築

OPN5 と tdTomato を p2A 配列で連結したプラスミド (OPN5-p2A-tdTomato) を構築し、tdTomato 蛍光と  $\text{Ca}^{2+}$  応答 ( $\text{Ca}^{2+}$  指示薬 Fluo-4 の蛍光) を同時に観察することで応答率 ( $P_{\text{res}} = 100 \times N_{\text{responding}} / N_{\text{available}}$ ) を算出する計画であった。しかし、tdTomato に SacII 認識配列を付加して PCR 増幅を試みた際、複数回の試行にもかかわらず目的フラグメントが得られず、プラスミドの構築自体が不可能であった。

#### 3.5.4.2 tdTomato を用いた共発現法

tdTomato プラスミドと OPN5 プラスミドの共トランスフェクションを行ったが、tdTomato 蛍光を示す細胞と  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示す細胞の重複率が低く、本実験系では 2 種類

の DNA が Lipofectamine 複合体内に均一に取り込まれず、高効率な共発現を実現することが困難であると判断された。

#### 3.5.4.3 FLAG タグの蛍光免疫標識法

3つ目の方法として、FLAG タグを Alexa Fluor 555 標識二次抗体によって生細胞蛍光標識し、その蛍光と  $\text{Ca}^{2+}$  応答を同時に観察した。しかし、蛍光標識されているにもかかわらず  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示さない細胞、または  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示すにもかかわらず蛍光標識が確認できない細胞が多数観察された。

同一条件で 2 回行った結果を図 3-8(a, b) に示す。1 回目の実験 (図 3-8(a)) では、蛍光標識された細胞 (64 細胞) のうち  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示した細胞 (19 細胞) の割合は約 30% (19/64) であった。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  応答を示した細胞 (84 細胞) のうち蛍光標識されていた細胞 (19 細胞) の割合は約 23% (19/84) であった。2 回目の実験 (図 3-8(b)) では、蛍光標識された細胞 (50 細胞) のうち  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示した細胞 (23 細胞) の割合は約 46% (23/50) であり、また  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示した細胞 (76 細胞) のうち蛍光標識されていた細胞 (23 細胞) の割合は約 30% (23/76) であった。

このような蛍光標識と  $\text{Ca}^{2+}$  応答の不一致が生じた要因として、以下の可能性が考えられる。まず、蛍光標識されているにもかかわらず  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示さなかった細胞については、OPN5-HEK の OPN5 への 11 シス型レチナールの結合が不十分であった可能性が高い。次に、 $\text{Ca}^{2+}$  応答を示すにもかかわらず蛍光標識されていなかった細胞が存在した理由としては、(1) 生細胞標識の困難さに起因する偽陰性 (生細胞染色における技術的問題)、(2) OPN5 の発現不良 (膜に局在しているものの、翻訳不全に伴う Snorkel 領域の切断や FLAG タグの細胞外非提示) によって抗体が認識できなかった可能性が考えられる。

なお、図 3-8 において細胞外に多数観察される赤色の点状シグナルは、ディッシュ表面に非特異的に吸着した Alexa Fluor 555 標識二次抗体に由来するものである。洗浄を強化することでこれらのシグナルは低減できる可能性があるものの、過度の洗浄は細胞の剥離やストレスを引き起こすため、生細胞を対象とした本実験では完全な除去は困難であった。そのため、本研究では、細胞周縁に沿った均一な Alexa Fluor 555 蛍光が確認できる細胞を「蛍光標識細胞」として厳密に定義した。

以上より、生細胞において OPN5 陽性細胞を確実に識別する蛍光標識法は本研究条件下では確立できなかったため、第 4 章で述べる  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験では免疫染色および  $\text{Ca}^{2+}$  応答の観察に基づいて OPN5 発現の有無を判断することとした。

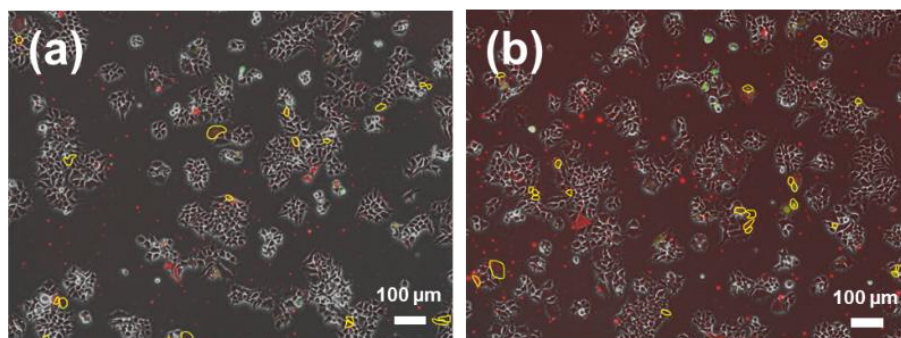


図 3-8 OPN5-HEK 細胞における FLAG タグの蛍光免疫標識と  $\text{Ca}^{2+}$  応答の比較。(a) 1 回目の実験結果、(b) 2 回目の実験結果。Alexa Fluor 555 標識二次抗体を用いた免疫染色により、FLAG タグ提示細胞を赤色蛍光として検出した。緑色は Fluo-4 蛍光を示す。黄色の実線で囲まれた細胞は、Alexa Fluor 555 により蛍光標識され、かつ  $\text{Ca}^{2+}$  応答を示した細胞。赤色と緑色の蛍光強度差により、両者が重なっても完全な黄色としては観察されない。

### 3.6 UCNP@Biotin と OPN5-HEK の結合

トランスフェクションにより OPN5-HEK の構築を確認できたので、UCNP@Biotin を OPN5-HEK に結合させる工程に入る。UCNP@Biotin が細胞に結合しているかどうかを蛍光顕微鏡で確認しようとしたが、細胞に NIR レーザーを照射し、DAPI フィルター ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 360 \pm 40/460 \pm 50 \text{ nm}$ ) を通して蛍光を観察したところ、NIR レーザー光の 2 倍波の散乱光によって隠されてしまい、UCNP の発光をはっきりと捉えることができなかった。この結果から、NIR レーザー光照射下での蛍光顕微鏡観察には NIR 光の影響を考慮し、細心の注意を払って実施する必要性が認識されたため、TEM 観察により UCNP@Biotin と OPN5-HEK 細胞の結合を確認した。

以後、第 4 章の  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験でも、蛍光像撮影は必ず刺激光がオフの状態で行った。

### 3.6.1 UCNP@Biotin と OPN5-HEK の結合実験方法

UCNP@Biotin と OPN5-HEK の結合は、図 3-1 に示したように FLAG タグを介して行う。FLAG タグに結合する抗 FLAG 抗体はビオチン付きのものを選び、そのビオチンにアビジンを結合させ、最後に UCNP@Biotin とビオチン-アビジン反応により、間接的に OPN5-HEK と UCNP@Biotin を結合させる。試薬は 3.5.2 に記載しているものを使用した。

Ca<sup>2+</sup>イメージング実験ではトランスフェクションから 24 時間経過した OPN5-HEK を使用する。まず、1 mg/mL のビオチン付き抗 FLAG 抗体を 1 mL の HBSS で 250 倍希釈してディッシュに加え、5 分間振とう、1 分間静置させた後、0.1%BSA 含有 HBSS で 1 回洗浄した。次に、5 mg/mL のアビジン溶液を 1 mL の HBSS で 1000 倍希釈してディッシュに加え、4 分間振とう、1 分間静置させた後、0.1%BSA 含有 HBSS で 2 回洗浄した。最後に、1 mL の DMEM (-FBS) に分散させた 200 µg の UCNP@Biotin をディッシュに加え、3 分間振とう後、細胞の活性化と UCNP@Biotin と OPN5-HEK との結合促進のために、37°C、5%二酸化炭素雰囲気下のインキュベーターで 2 分間インキュベートし、DMEM (-FBS) で 1 回洗浄した。

### 3.6.2 透過型電子顕微鏡観察

#### 3.6.2.1 観察方法

細胞の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察は、作製した試料を株式会社 花市電子顕微鏡技術研究所に送付し先方でマイクロトーム法により実施して頂いた。マイクロトーム法とは、樹脂に包埋した試料から超薄切片を作製するための方法であり、透過型電子顕微鏡による観察に必須の試料調製法である。ウルトラマイクロトームを用いて樹脂ブロックを厚さ数十 nm 程度に切削することで、電子線が透過可能な薄さの切片を得ることができる。この過程によって、細胞や組織の内部構造を高解像度で観察することが可能となる<sup>10</sup>。TEM 観察用の試料は、以下の手順で作製した。UCNPs を OPN5-HEK に結合後、培地を吸い取り、2%グルタルアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液を加えて 4°Cにて前固定した。続いて、0.1 M リン酸緩衝液で 4°C、12 時間洗浄し、2%オスミウム水溶液を加えて後固定を 4°C、2 時間で行った。次に、試料を室温でエタノール上昇系列により脱水し、プロピレンオキサイドで置換を行った。脱水後の試料はエポキシ樹脂に包埋し、60°C で 48 時間重合させた。包埋ブロックからはウルトラマイクロトームを用いて約 80 nm の超薄切片を作製し、200 メッシュの銅グリッド上に積載した。得られた試料は、2%酢酸

ウランおよび鉛染色液を用いて染色後、透過型電子顕微鏡 JEM-1200EX（日本電子）を用いて観察を行った（前固定後の工程は花市電子顕微鏡技術研究所のほうで実施した）。

### 3.6.2.2 透過型電子顕微鏡による UCNP@Biotin と細胞の結合観察の結果

結合実験後の細胞の TEM 像を図 3-9 に示す。細胞質の辺縁部に見られる電子密度の高い黒点がナノ粒子（赤矢印）であり、細胞と結合していることがわかった。なお、細胞質全体にわたって観察される微小な黒点はリボソームの顆粒状構造であり、UCNP@Biotin とは容易に区別できた。

一部の UCNP@Biotin が細胞質側に位置して観察される例も確認されたが（黄矢印）、これは真のエンドサイトーシスによる内部化ではなく、TEM 試料作製過程で生じたアーティファクトである可能性が高いと考えられる。化学固定、エタノール脱水、樹脂浸透の処理過程では細胞膜が部分的に損傷あるいは収縮することが知られており<sup>11,12</sup>、この際に細胞外に存在していた粒子が細胞内に入り込んだと考えられる。同様に、細胞膜からわずかに離れた位置に UCNP が観察される例もあったが、これらは固定時点で膜への結合が緩かった粒子、あるいは脱水・包埋工程に伴う細胞膜収縮によって見かけ上離れた位置に描出されたものと解釈される。以上の結果から、UCNP@Biotin は意図した通り OPN5-HEK 細胞の表面に結合しており、観察された一部の内部粒子は前処理由来のアーティファクトであると判断した。

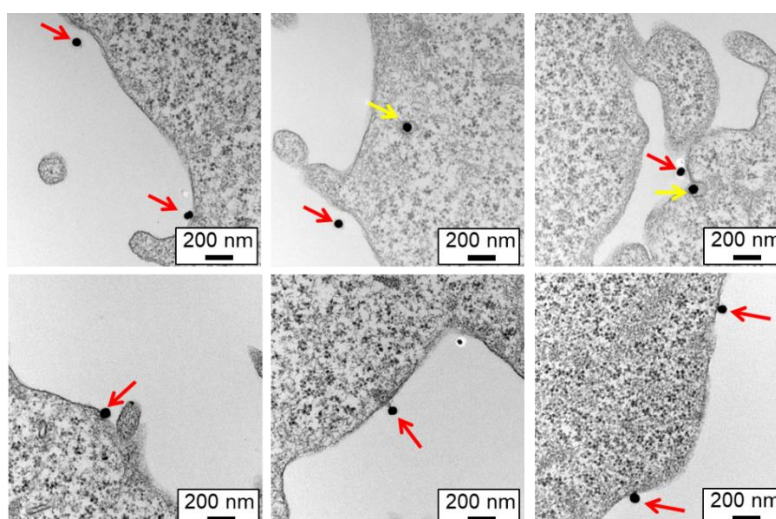


図 3-9 OPN5-HEK に対して、ビオチン化抗 FLAG 抗体、ストレプトアビジン、UCNP@Biotin を順次結合させた試料の TEM 画像。赤色の矢印は UCNP、黄色の矢印は細胞質側に位置していた UCNP を示す。

## 3.7 細胞毒性評価

### 3.7.1 MTT アッセイ

UCNP@Biotin の HEK293T 細胞への毒性評価として、MTT assay を行った。MTT とは 3-(4, 5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイドであり、Methyl thiazolyl tetrazolium である。生細胞は、MTT をホルマザンという不溶解性の結晶に還元することができる NAD(P)H 依存の酸化還元剤を持っている。ホルマザンをジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide, DMSO) に溶解することによって紫色を呈する。540 nm の吸光度をバーコードにより読み取ることで、生細胞がどれくらい多いかを知ることができる。

MTT アッセイは生細胞が正常に代謝されているかを確認するための方法であるため、たとえば、細胞が毒に呈されてからすぐに評価したい場合は、例えば、細胞膜損傷に伴う乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出の測定や、細胞内 ATP 量を指標とする CellTiter-Glo® アッセイ、あるいはアポトーシス初期を検出する Annexin V 染色法などが用いられる。本研究では、HEK293T 細胞がどの程度 UCNP@Biotin の毒性の影響を受けるかを代表的な方法である MTT アッセイで評価した。

### 3.7.2 使用した細胞株、試薬、評価装置

**【使用した細胞株】** HEK293T 細胞 (Human Embryonic Kidney cells 293) は理化学研究所バイオリソース研究センターから購入した。

**【試薬】** 培養には Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ナカライテスク) 培養液にウシ血清 (Fetal Bovine Serum (FBS, biosera)) を 10%、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク) を 1% 添加し、これを培養液として使用した (以下 DMEM (+ FBS))。Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS(-)) は、島津ダイアグノスティクス社製アキュディア™ D-PBS(-) 粉末を超純水に溶解後、オートクレーブ滅菌して使用した。MTT 粉末は同仁化学研究所から購入した。DMSO は富士フィルム和光純薬から購入した。

**【評価装置】** 吸収スペクトルはマイクロプレート (Infinite M Nano, TECAN) を使用した。

### 3.7.3 MTT アッセイの方法

HEK293T 細胞を 96 ウェルプレートに、DMEM で分散させた細胞を  $1 \times 10^4$  細胞/well で播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下のインキュベーターで約 24 時間インキュベートした。UCNP@Biotin は DMEM (+FBS) で分散させ、最終濃度が 200 µg/mL となるよう調製し、添加した。24 時間後、1.2 mg/mL で MTT 粉末を DMEM (-FBS) で攪拌しながら調製した。これを各ウェルに 100 µL ずつ添加し、空白ウェルには添加しなかった。その後、プレートを 37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下のインキュベーターで 4 時間インキュベートした。各ウェルの溶液を除去し、100 µL の DMSO を添加し、生成したホルマザン結晶を完全に溶解させた。溶解後、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、まず細胞を含まない空白ウェルの吸光度 ( $A_{\text{blank}}$ ) を各ウェルの測定値から差し引いて補正した。続いて、UCNP@Biotin 無添加条件 ( $A_{\text{control}}$ ) から  $A_{\text{blank}}$  を差し引いた値を 100% として正規化することで算出した。算出式を以下に示す。

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}}$$

各条件について  $n=7$  で測定し、結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表記した。

### 3.7.4 UCNP@Biotin の細胞毒性

UCNP@Biotin 添加後の細胞生存率の結果を図 3-10 に示す。粒子を添加してから 0.5, 1, 2, 24 時間後のいずれの時点でも生存率は約 75~95% の範囲にあり、24 時間後においても顕著な低下は認められなかった。これらの結果から、UCNP@Biotin は少なくとも 24 時間以内の短期曝露において HEK293T 細胞に対し明確な細胞毒性を示さないことがわかった。

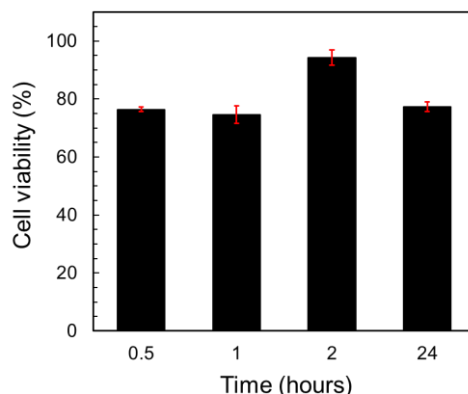


図 3-10 HEK293T 細胞を用いた UCNP@Biotin の MTT アッセイによる細胞毒性評価。

### 3.9 結言

本章では、UCNPs の生細胞応用に不可欠となる水分散化および機能化、そして FLAG タグ付き OPN5 への選択的ターゲティング系の構築について検討した。PEG 化リン脂質とビオチン化リン脂質によるカプセル化により、UCNPs は水中で安定に分散し ( $D_H \approx 117$  nm)、負電荷由来の良好なコロイド安定性を示した。また、発光特性に大きな変化は見られなかったものの、水中における非放射失活により変換効率が低下することを確認した。OPN5 については、Snorkel ドメインを利用した細胞外 FLAG 提示型コンストラクトを設計・構築し、HEK293T 細胞において膜局在する OPN5-HEK 細胞を得た。免疫染色により、FLAG タグが細胞外に提示されていることを明確に確認した。さらに、FLAG-ビオチン-アビジン-UCNP@Biotin という多段階反応を介したターゲティングにより、UCNP@Biotin が OPN5-HEK 細胞表面に結合することを TEM 観察によって直接的に実証した。加えて、MTT アッセイの結果から、UCNP@Biotin は HEK293T 細胞に対して少なくとも 24 時間以内の短期曝露では明確な細胞毒性を示さないことが分かり、本研究における生細胞実験に十分適用可能であることが示された。

以上より、UCNP@Biotin を OPN5 へ特異的に結合させるための基盤技術が確立された。次章では、本章で構築したターゲティング系を用いて、UCNPs からの光変換によって OPN5 を活性化し、Ca<sup>2+</sup>イメージングによって細胞応答を定量的に解析することを目的として検討を進める。

### 3.10 参考文献

- (1) Le, T. S.; Takahashi, M.; Isozumi, N.; Miyazato, A.; Hiratsuka, Y.; Matsumura, K.; Taguchi, T.; Maenosono, S. Quick and Mild Isolation of Intact Lysosomes Using Magnetic-Plasmonic Hybrid Nanoparticles. *ACS Nano* **2022**.
- (2) Maemura, D.; Le, T. S.; Takahashi, M.; Matsumura, K.; Maenosono, S. Optogenetic Calcium Ion Influx in Myoblasts and Myotubes by Near-Infrared Light Using Upconversion Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (36), 42196-42208.
- (3) Nag, O. K.; Awasthi, V. Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics* **2013**, *5* (4), 542-569.
- (4) Lee, H.; Larson, R. G. Adsorption of Plasma Proteins onto PEGylated Lipid Bilayers: The Effect of PEG Size and Grafting Density. *Biomacromolecules* **2016**, *17* (5), 1757-1765.
- (5) Arppe, R.; Hyppänen, I.; Perälä, N.; Peltomaa, R.; Kaiser, M.; Würth, C.; Christ, S.; Resch-Genger, U.; Schäferling, M.; Soukka, T. Quenching of the Upconversion Luminescence of

- NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Er<sup>3+</sup> and NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>,Tm<sup>3+</sup> Nanophosphors by Water: The Role of the Sensitizer Yb<sup>3+</sup> in Non-Radiative Relaxation. *Nanoscale* **2015**, 7 (27), 11746-11757.
- (6) Brown, M.; Stafford, L. J.; Onisk, D.; Joaquim, T.; Tobb, A.; Goldman, L.; Fancy, D.; Stave, J.; Chambers, R. Snorkel: An Epitope Tagging System for Measuring the Surface Expression of Membrane Proteins. *PLoS One* **2013**, 8 (9), e73255.
- (7) Pear, W. S.; Nolan, G. P.; Scott, M. L.; Baltimore, D. Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, 90 (18), 8392-8396.
- (8) Hallgren, J.; Tsirigos, K. D.; Pedersen, M. D.; Almagro Armenteros, J. J.; Marcatili, P.; Nielsen, H.; Krogh, A.; Winther, O. DeepTMHMM Predicts Alpha and Beta Transmembrane Proteins Using Deep Neural Networks. *bioRxiv*, 2022.
- (9) Vernay, A.; Cosson, P. Immunofluorescence Labeling of Cell Surface Antigens in Dictyostelium. *BMC Res. Notes* **2013**, 6 (1), 317.
- (10) Bozzola, J. J. Electron Microscopy. *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001.
- (11) Schrand, A. M.; Schlager, J. J.; Dai, L.; Hussain, S. M. Preparation of Cells for Assessing Ultrastructural Localization of Nanoparticles with Transmission Electron Microscopy. *Nat. Protoc.* **2010**, 5 (4), 744-757.
- (12) Hobro, A. J.; Smith, N. I. An Evaluation of Fixation Methods: Spatial and Compositional Cellular Changes Observed by Raman Imaging. *Vib. Spectrosc.* **2017**, 91, 31-45.

## 第4章 Ca<sup>2+</sup>イメージング

### 4.1 緒言

第3章では、UCNP@Biotinの創製および細胞外FLAGタグ付きOPN5発現プラスミドの構築を行い、OPN5発現細胞の細胞膜表面にUCNP@Biotinを結合させることに成功した。これにより、本研究の最終目的である「UCNPを介したOPN5の光制御」のための準備が整ったといえる。本章では、これらのUCNP@Biotin結合細胞に光刺激を与え、実際に細胞を活性化できるかどうかを検証する。一般に、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は細胞応答の代表的な指標であり、光遺伝学を含む多くの研究において、受容体やイオンチャネルの活性化の結果としてCa<sup>2+</sup>シグナルが上昇することが知られている。本論文では、Ca<sup>2+</sup>イメージングを用いてOPN5発現細胞の応答を定量的に解析する。具体的には、UV光照射による既報の応答を再現することでプラスミドの機能を確認するとともに、UCNPを介したNIR光刺激によりOPN5を活性化できるかを検証する。

### 4.2 OPN5の光反応特性および吸収スペクトル

#### 4.2.1 OPN5の双安定性と吸収スペクトル

第1章でも触れた通り、OPN5はUV光で活性化し、青色光によって不活性化される双安定型オプシンである<sup>1,2</sup>。本研究では、OPN5の光活性化をCa<sup>2+</sup>イメージングによって評価するため、まずその光反応特性および吸収スペクトルについて、小島らのグループによる既報をもとに整理する<sup>2</sup>。

図4-1(a, d)に、ヒトOPN5 (hOPN5) およびマウスOPN5 (mOPN5) に対し、UV光照射および可視光照射を交互に行った際のスペクトル変化を示す。具体的には、hOPN5に対してUV光(357 nm)を4分間照射した後、黄色光(>480 nm)を4分間照射すると、活性状態(光産物)から不活性状態(暗状態)への逆変換が生じた。また、mOPN5に対しては、UV光(357 nm)16分間照射後にオレンジ色光(>520 nm)を4分間照射した際に、同様の可逆光反応が観察された。図4-1(a) 曲線1は、初期の暗状態で測定したスペクトルからUV照射後に測定したスペクトルを差し引くことで得られ、曲線2は黄色光照射後のスペクトルからUV照射後のスペクトルを差し引くことで得られた。

図4-1(b)の差スペクトル(曲線2)で、光産物の寄与が支配的となる450–600 nm領域に着目し、この領域をopsin-type photopigmentsのテンプレートスペクトル<sup>3</sup>に最適フィットさせることで、活性状態の吸収スペクトル( $\lambda_{\max} \approx 471$  nm)を推定した(図4-1(c) 曲線2)。次に、推定された光産物スペクトルを図4-1(b) 曲線2に加えることにより、不活性状態の近似スペクトルを再構成した。そして、不活性状態の吸収が主に現れる

350–500 nm 領域をテンプレートスペクトル<sup>3</sup>にフィットさせることで、hOPN5 の不活性状態の吸収スペクトル ( $\lambda_{\max} \approx 380$  nm) を得た (図 4-1(c) 曲線 1)。最後に、推定された暗状態および光産物スペクトルの差を再計算し、元の差スペクトル (図 4-1(b) 曲線 2) と良好に一致することを確認することでフィッティング手法の妥当性を検証した。

同様の手法で mOPN5 の推定吸収スペクトルを求めると、図 4-1(f) に示すように、活性・不活性状態でそれぞれ 379 nm および 471 nm 付近に吸収極大が見られる。また、OPN5 を含まない HEK293S 細胞膜抽出物では、UV 光および可視光の照射によって差スペクトルは生じず、これらの光反応が OPN5 に起因するものであることが確認された (図 4-1(g, h))。

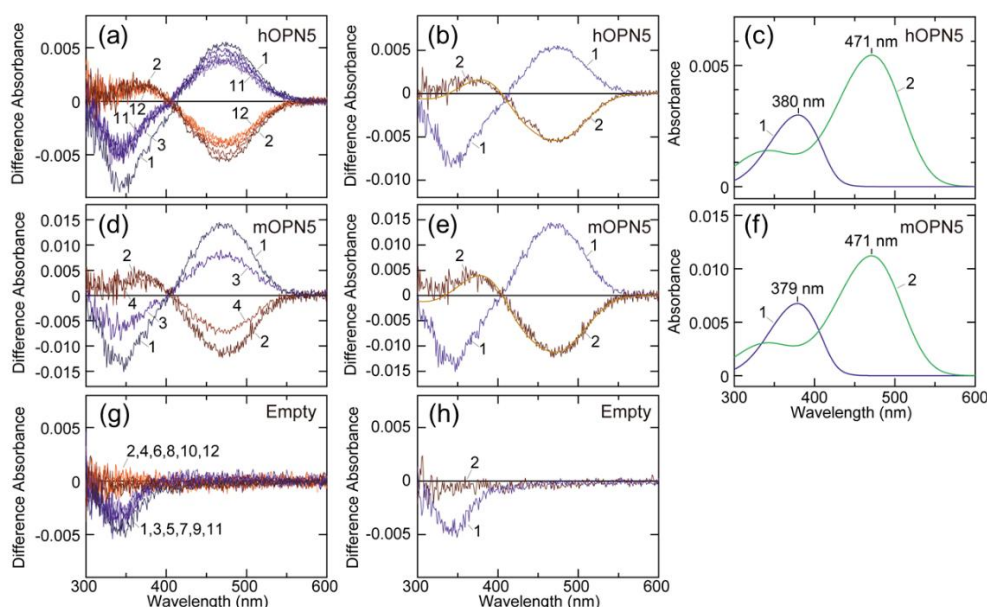


図 4-1 ヒト OPN5 (hOPN5) およびマウス (mOPN5) の吸収スペクトルの推定。(a) hOPN5 に対し、UV 光 (357 nm) 4 分間照射後、黄色光 (>480 nm) 4 分間照射を行った際のスペクトル変化。差スペクトルである曲線 1 は、最初の暗状態で測定したスペクトルから UV 照射後に測定したスペクトルを差し引くことで得られ、曲線 2 は UV 照射後のスペクトルが黄色光照射後のスペクトルを差し引くことで得られた。(b, c) (a) で得られた差スペクトルをもとに作成した hOPN5 の推定吸収スペクトル。(c) の曲線 1, 2 はそれぞれ不活性状態 (暗状態) と活性状態 (光産物) を示す。(d) mOPN5 に対し、UV 光 (357 nm) 16 分間照射後、オレンジ色光 (>520 nm) 4 分間照射を行った際のスペクトル変化。(e, f) (d) の差スペクトルをもとに作成した mOPN5 の推定吸収スペクトル。(g, h) OPN5 を含まない HEK293S 細胞膜抽出物に対し、(a) と同じ手順で UV 光 (曲線 1, 3, 5, 7, 9, 11) と黄色光 (2, 4, 6, 8, 10, 12) を交互かつ反復照射した際のスペクトル変化。(ref. 2 をそのまま引用。本図は Creative Commons Attribution License (CC BY) に基づき、原著者および掲載元を明記した上で転載している。)

## 4.2.2 光刺激条件と OPN5 光反応特性の関係

前節 4.2.1 で述べた通り、OPN5 は UV 光で活性化し青色光で不活性化される双安定性を示す。本研究ではこの光反応特性を踏まえ、UCNPs への NIR 光 (980 nm) 照射によって生じる UV・青色光発光を利用した光刺激条件を設計した。UCNP@Biotin の発光波長域と OPN5 の推定吸収波長域を比較するため、小島ら<sup>2</sup>が報告したヒト OPN5 の推定吸収スペクトル (図 4-1(c)) をもとにデータを抽出・作成し、UCNP@Biotin の発光スペクトルと重ね合わせて比較した (図 4-2)。本研究で用いた UCNPs は約 360 nm の UV 光および 450–475 nm 付近の青色光を放射しており、これらはそれぞれ OPN5 の活性化波長域および不活性化波長域と重なる領域に位置する。

すなわち、NIR 光照射下では、OPN5 の局所環境に存在する UCNP が UV 光と青色光を同時に放射するため、OPN5 に対して活性・不活性化の両方の光が作用し得る。この発光特性を踏まえ、本研究では  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより OPN5 活性化の有無を評価した。

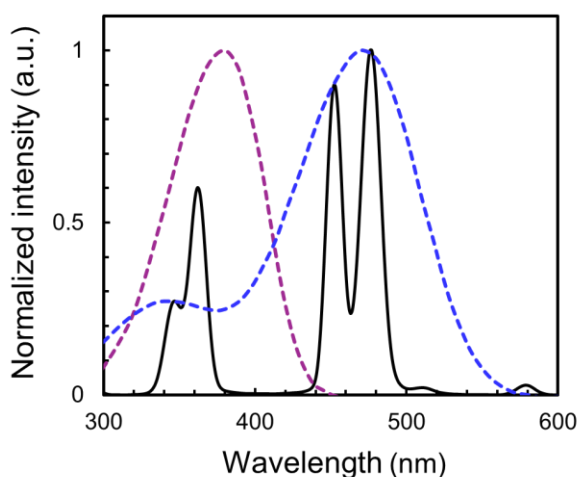


図 4-2 UCNP@Biotin の発光スペクトル(黒線)と、ヒト OPN5 の不活性状態(紫破線)および活性状態(青破線)の推定吸収スペクトルとの重ね合わせ図。いずれのスペクトルも最大強度を 1 として規格化した。

## 4.3 $\text{Ca}^{2+}$ イメージング方法

### 4.3.1 $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬について

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を可視化するためには、適切な  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の選択が極めて重要である。指示薬の選択基準としては、主に以下の 4 点が挙げられる。

(i)  $\text{Ca}^{2+}$  への親和性

Ca<sup>2+</sup>指示薬はそれぞれ固有の解離定数  $K_d$  を持ち、この値が指示薬の感度を決定する。一般に、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度は静止時で約 100 nM、刺激時で数百 nM から数  $\mu$ M に達するため、この範囲に適した  $K_d$  を持つ色素を選ぶ必要がある。例えば、Fura-2 ( $K_d$  ~145 nM) は静止レベルの Ca<sup>2+</sup>に対して高感度であるが、刺激後の高濃度領域では蛍光が飽和しやすい。一方、Fluo-4 ( $K_d$  ~345 nM) は静止時と刺激時の両方を過不足なくカバーでき、幅広いダイナミックレンジを提供する。

#### (ii) 励起・蛍光波長と顕微鏡のフィルターセットとの適合性

顕微鏡に搭載されているフィルターセットと指示薬の励起・蛍光波長が一致していなければ、十分なシグナルを得られない。例えば、Fluo-4 や Fluo-8 は励起波長 488–494 nm、蛍光波長 510–520 nm 付近にピークを持ち、標準的な GFP フィルターセットで容易に観察できる。Calcium Orange (励起 549 nm、蛍光 576 nm) は TRITC フィルターセットを必要とするため、装置によってはバックグラウンドの自家蛍光の影響を受けやすい。

#### (iii) シグナル強度および S/N 比

指示薬によって蛍光強度や S/N 比は大きく異なる。Fluo 系の色素は蛍光強度が明るく、ライブセルイメージングに適している。一方、Fura-2 や Indo-1 は二波長励起型 (ratiometric dye) であり、蛍光比を測定することで Ca<sup>2+</sup>濃度を定量できる利点があるが、光源の切り替えや専用フィルターが必要となるため装置依存性が高い。

#### (iv) 細胞透過性や負荷の容易さ

アセトキシメチル (acetoxymethyl, AM) エステル型色素である Fluo-4 AM、Calcium Orange AM などは、細胞膜を容易に透過し、細胞内のエステラーゼによって加水分解されることで活性型となるため、比較的簡便に細胞内へ負荷できる。一方で、非エステル型の色素はマイクロインジェクションや膜透過性ペプチドとの併用が必要であり、実験系が複雑になる場合がある。

以上のように、Ca<sup>2+</sup>指示薬を選択する際には、単に蛍光を検出できるかどうかだけでなく、目的とする実験条件 (細胞種、測定装置、応答の時間スケールなど) に適合するかを総合的に判断する必要がある。本研究では Calcium Orange AM と Fluo-4 AM を検討したが、前者は  $K_d$  が約 185 nM であり、実際に OPN5-HEK へ UV 光刺激を行った際に細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化が確認しづらかったため、本研究では Fluo-4 AM を使用した。以後、Fluo-4 AM を Fluo-4 と表記する。

### 4.3.2 試薬、器具及び評価装置など

【試薬】 Fluo-4 は Invitrogen から購入した。Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS、フェノールレッドフリー、Ca<sup>2+</sup>含有) はナカライテスクから購入した。11 シス型レチナール (純度 >65%) は富士フイルム和光純薬から購入した。

カルシウムイオノフォア (カルシマイシン) は Sigma-Aldrich から購入した。

【器具及び評価装置】 蛍光顕微鏡としては BZ-810 (キーエンス) を使用した。蛍光顕微鏡としては BZ-810 (キーエンス) を使用した。観察では GFP フィルター ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 470\pm 40/525\pm 50$  nm)、を使用した。本研究で使用した励起光および蛍光検出の波長帯域は、Fluo-4 の主ピーク ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 494/506$  nm) を十分に包含しており、BZ-810 蛍光顕微鏡下で適切に  $Ca^{2+}$  蛍光シグナルを取得できる条件であったことを確認した(図 4-3(a))。また、GFP フィルターセットを用いた蛍光顕微鏡 BZ-810 の蛍光観察光路を図 4-3(b) に示す。UV 光装置として ZUV-C30H (オムロン) を使用した。NIR ダイオードレーザーは PGL-V-H-980-1W (Changchun New Industries Optoelectronics Tech. Co., Ltd.) (出力 1084 mW) を使用した。

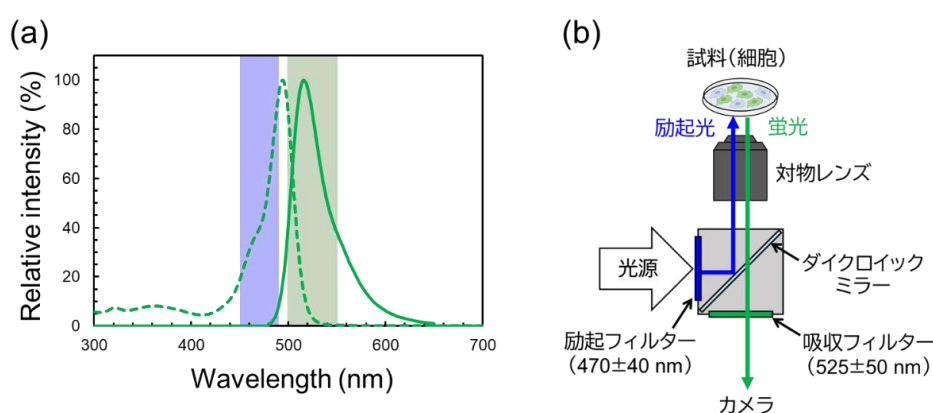


図 4-3 (a)Fluo-4 の励起および蛍光スペクトルと GFP フィルターセットの透過帯域の重ね合わせ図。破線は Fluo-4 の励起スペクトル、実線は蛍光スペクトルを示す。青色の帯は GFP フィルターセットの励起透過帯域(450–490 nm)、緑色の帯は蛍光透過帯域(500–550 nm)をそれぞれ示す。(b) GFP フィルターセットを用いた蛍光顕微鏡 BZ-810 における蛍光観察光路の概略図。

### 4.3.3 方法

細胞播種前に、35 mm ディッシュをポリ-L-リジンで被覆した。OPN5-HEK 細胞は既報の方法に従ってリポフェクションで行った。リポフェクションから 10 時間後に、11 シス型レチナール (1  $\mu$ M) を含む DMEM (10% FBS) 2 mL に置換した。さらに 14 時間後、前述 (3.7.2) の方法により UCNP@Biotin を細胞に結合させ、 $Ca^{2+}$  指示薬であるアセトキシメチル化 Fluo-4 (2  $\mu$ M) を含む HBSS 1 mL を添加した。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の相対的变化は、Fluo-4 の蛍光強度を GFP フィルター ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 470\pm 40/525\pm 50$  nm) を用いた蛍光顕微鏡で観察することにより測定した。蛍光顕微鏡画像は 10 秒ごとに取得し、励起光は画像取得と励起光照射が重ならないようにするため、撮影開始 1 分 1 秒後に照射を開始し、1 分 9 秒後に消灯した。実験のセットアップの模式図を図 4-4 に示す。

光刺激前1分間の蛍光強度の平均値を  $F_0$  とし、蛍光強度  $F(t)$  が  $F_0$  の1.2倍以上の優位な上昇を見せた細胞を「応答した細胞」と定義した。取得した蛍光顕微鏡画像から応答細胞をすべて抽出し、それぞれの細胞における  $F(t)$  の時間変化を、ImageJソフトウェアを用いて画像解析した。OPN5-HEK に結合した UCNP の励起は、NIR レーザー（波長 980 nm、出力 1084 mW）により行った。対照実験では、UV LED (ZUV-L 10H, OMRON)（波長 365 nm、出力 45 mW/cm<sup>2</sup>）を用い、UV 光を直接 OPN5-HEK に照射して OPN5 を活性化した。Ca<sup>2+</sup>イメージング実験終了後、カルシマイシン（10 μM）を培養ディッシュに添加し、Fluo-4 の蛍光強度が飽和に達した時点で蛍光顕微鏡により撮影を行い、本実験系における HEK293T 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上限を推定した。

独立した実験を各条件で3回ずつ行った。

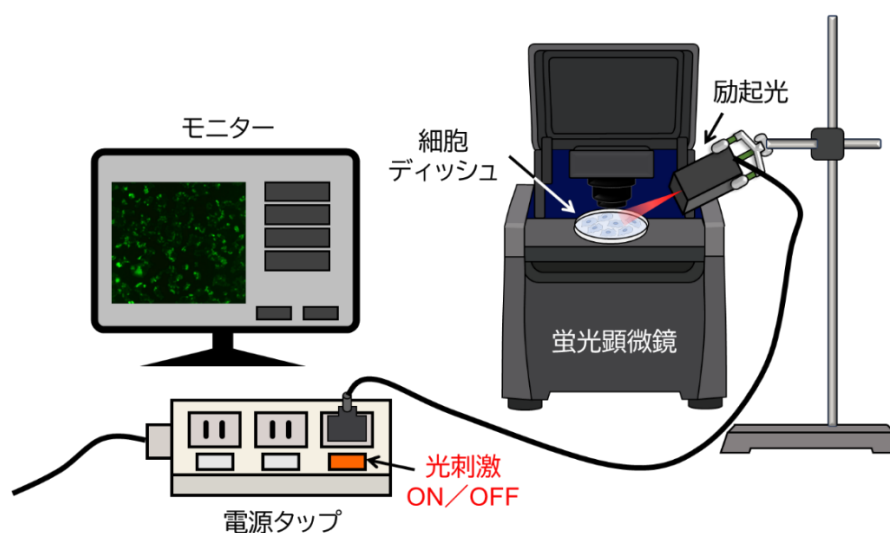


図 4-4 実験のセットアップの模式図。

## 4.4 Ca<sup>2+</sup>イメージングの結果

### 4.4.1 UV 光刺激による Ca<sup>2+</sup>イメージングの結果

Sugiyama らは OPN5 は UV 光刺激により一過性の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を引き起こすことを報告している<sup>4</sup>。そこで、まず OPN5-HEK に 365 nm の UV 光を照射し (Case 1)、既往の報告どおり OPN5 の光制御が行えるかどうかを確認した。図 4-5(a, b) は Fluo-4 により可視化した細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を GFP フィルターで観察した蛍光画像であり、UV 光照射前(a) と照射後(b) のシグナル強度を示す。さらに、OPN5-HEK に 8 秒間 UV を照射後 (図 4-5(b)) から照射前 (図 4-5(a)) を減算した差分画像 (図 4-5(c)) では、多くの細胞で蛍光強度の増加が見られ、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が明瞭に確認できた。よって、自作したプラスミドが適切に機能していることがわかった。

Case 1 の場合、応答細胞数 ( $N_{\text{responding}}$ ) は  $74 \pm 4$  であり、細胞外に FLAG を発現する細胞数 ( $N_{\text{available}}$ ) は約 120 と推定された (細胞外 FLAG 発現細胞の割合から算出した)。したがって、応答率 ( $P_{\text{res}} = 100 \times N_{\text{responding}} / N_{\text{available}}$ ) は  $62 \pm 7\%$  と算出された。ここで、第 3 章 3.5.4 『OPN5 陽性細胞の蛍光標識の試み』でも述べたように、 $P_{\text{res}}$  を正確に算出するために OPN5-HEK あるいは FLAG タグの蛍光標識による  $N_{\text{available}}$  の算出を試みたが、いずれも成功しなかったことに留意しておきたい。図 4-5(d) は応答した全ての細胞の  $F(t)/F_0$  の平均値 ( $\bar{F}$ ) をプロットしたものである。個々の細胞の  $F(t)/F_0$  の挙動については、最大値以外は上昇速度や減衰速度などにばらつきは少なく、図 4-5(d) と同様であった。UV 光照射直後に  $F(t)/F_0$  は最大値を取り、その後 20~30 秒かけて速やかに元の状態に戻るといった Sugiyama らの報告<sup>4</sup>と同様の  $\text{Ca}^{2+}$  応答が観測され、OPN5 が正常に機能していることを確認した。また、可逆性を調べるため、UV 光照射を断続的に繰り返し行った結果、図 4-5(e) に示すように、 $\text{Ca}^{2+}$  応答は繰り返し誘導可能であることが明らかとなった。なお、図 4-5(e) は応答していない細胞も含め、100 個の細胞の平均のため、 $F(t)/F_0$  の最大値が図 4-5(d) よりも小さく、かつエラーバーが大きくなっている。

また、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング実験終了直後に calcimycin を添加し、最大  $\text{Ca}^{2+}$  応答  $F_{\text{max}}$  を見積もったところ、 $F_{\text{max}}/F_0 = 3.4 \sim 6.0$  であった。よって、UV 光照射によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $F_{\text{max}}$  の約 40~80% 程度まで上昇していると考えられる。

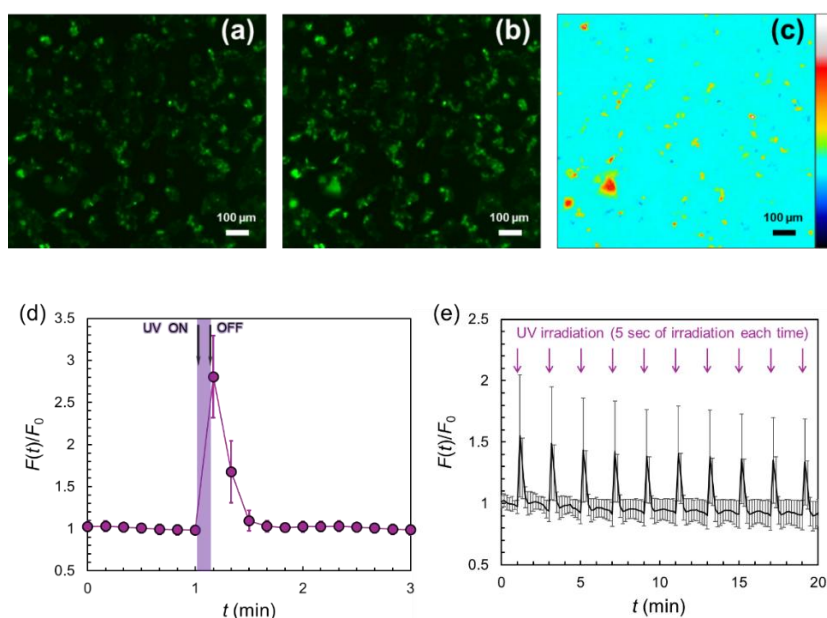


図 4-5 (a, b)Fluo-4 により可視化した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の蛍光画像 (UV 光照射前(a), 照射後(b))、(c)UV 光照射後と照射前の蛍光強度差 ( $(b) - (a)$ ) を示す差分画像。UV 刺激により増加した蛍光シグナル領域が強調されている、(d)UV 光刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化、(e)UV 光 (照射時間: 各 5 秒) の断続的照射時の  $\text{Ca}^{2+}$  応答。(d) は独立して 3 回実験を行った。

#### 4.4.2 NIR 光刺激による Ca<sup>2+</sup>イメージングの結果

UCNP@Biotin を OPN5-HEK に存在しない条件で NIR レーザー光を照射した場合 (Case 2) の Ca<sup>2+</sup>応答を図 4-6(a) に示す。驚くべきことに  $P_{res} = 5 \pm 2\%$  であり、NIR レーザー光の照射によって Ca<sup>2+</sup>応答を示した。この理由については後述する。個々の細胞における  $F(t)/F_0$  の挙動は、最大値を除けば図 4-6(a) と同様であった。Case 1 と異なり、 $F(t)/F_0$  は NIR レーザー光照射終了後 10 秒で最大値に達し、その後 20~30 秒かけて元の状態に戻った。

図 4-6(b) に、UCNP@Biotin が結合した OPN5-HEK に NIR レーザー光を照射した場合 (Case 3) の Ca<sup>2+</sup>応答を示す ( $P_{res}=15 \pm 3\%$ )。Case 1 および Case 2 とは異なり、 $\bar{F}$  は NIR レーザー光照射終了後 20 秒で最大値に達し、その後 30~60 秒かけて緩やかに元の状態へ戻った。コントロール条件として、図 4-6(c) には、抗 FLAG 抗体やストレプトアビジンを用いずに UCNP@Biotin (200  $\mu$ g) を単純にディッシュへ添加した場合 (Case 4) の Ca<sup>2+</sup>応答を示す ( $P_{res}=4 \pm 2\%$ )。この場合、Ca<sup>2+</sup>応答は Case 2 (図 4-6 (a)) と同様の挙動を示した。

図 4-6(d)は図 4-6(a-c) を重ね合わせ、Ca<sup>2+</sup>応答が観察されたタイミングに着目して示したグラフである。なお、Case 3 では UCNP@Biotin (200  $\mu$ g) 添加後にディッシュを 2 回洗浄しているのに対し、Case 4 では洗浄を行っていないため、ディッシュ内に存在する UCNP@Biotin の量は Case 3 のほうが圧倒的に少ない。それにもかかわらず、 $P_{res}$  の値は Case 3 は Case 2, 4 の約 3 倍であった。

図 4-6(e) および(f) には、それぞれ 11 シス型レチナル (11-*cis* retinal, 以後 11cR) を添加していない OPN5-HEK に NIR 光を照射した場合 (Case 5) と、未処理の HEK293T (Case 6) に NIR 光を照射した場合のコントロール実験の結果を示す。いずれの場合も Ca<sup>2+</sup>応答は観察されなかった。図 4-7(g) には Case2~6 の  $P_{res}$  の棒グラフを示す ( $n=3$ 、独立した dish での実験)。Case 2 vs. Case 3 および Case 3 vs. Case 4 について Welch の t 検定 (両側、有意水準 5%) を行ったところ、それぞれ  $p=0.0167$ ,  $0.0115$  であったため、Case 3 の  $P_{res}$  はコントロール条件である Case 2 および Case 4 と比較して有意に高いといえる。

これらの結果と Case 2 (図 4-6(b)) の結果を踏まえると、OPN5-HEK が NIR 光照射に対して Ca<sup>2+</sup>応答を示した理由は、温度上昇または多光子吸収によって 11cR が異性化したためであると考えられる。前者については、ショウジョウバエのロドプシンが光受容と温度受容の 2 つの機能を持つことが報告されており、強い NIR 光によって生じる温度上昇に反応する可能性が示唆されている<sup>5</sup>。後者については、NIR 光の多光子吸収によって 11cR が異性化し得ることが報告されている<sup>6</sup>。まとめとして、すべての実験条件と  $P_{res}$  の値をまとめて表 4-1 に示す。

なお、Case 3 において、個々の細胞における  $F(t)/F_0$  の挙動には大きなばらつきがみられたため、全応答細胞の  $F(t)/F_0$  の時間変化を図 4-7 に示した。

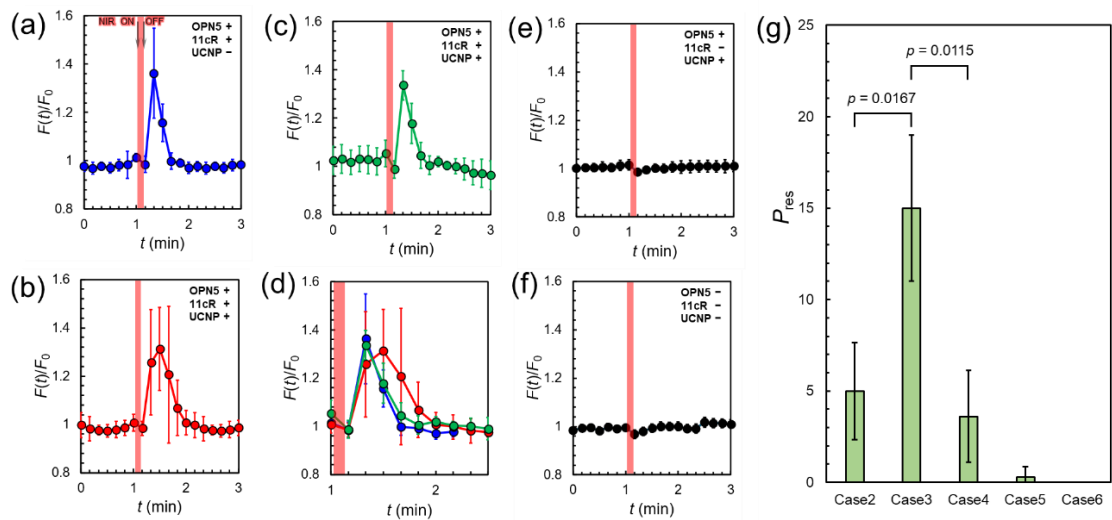


図 4-6 (a) OPN5-HEK(-UCNP)に NIR 光を照射した際の  $F$  の時間変化、(b) OPN5-HEK(+UCNP(結合))に NIR 光を照射した際の  $F$  の時間変化、(c) OPN5-HEK(+UCNP(非結合))に NIR 光を照射した際の  $F$  の時間変化、(d) (a-c) を重ね合わせて示したグラフ、(e) OPN5-HEK(+UCNP(結合)、-11cR)に NIR 光を照射した際のランダムに選択した 100 細胞の平均  $F(t)/F_0$  ( $N_{\text{responding}}=0$ )、(f) HEK293T に NIR 光を照射した際のランダムに選択した 100 細胞の平均  $F(t)/F_0$  ( $N_{\text{responding}}=0$ )、(g) Case2-6 の  $P_{res}$  の棒グラフ( $n=3$ , 独立した dish での実験)。

表 4-1 実験条件と  $P_{res}$  値(独立して実施した 3 回の実験に基づく平均値  $\pm$  標準偏差を示す)。

Case	励起光	OPN5	11cR	UCNP	抗体	アビジン	$P_{res}$
1	UV	+	+	-	-	-	$62 \pm 7\%$
2	NIR	+	+	-	+	+	$5 \pm 2\%$
3	NIR	+	+	+	+	+	$15 \pm 3\%$
4	NIR	+	+	+	-	-	$4 \pm 2\%$
5	NIR	+	-	+	+	+	0%
6	NIR	-	-	-	-	-	0%

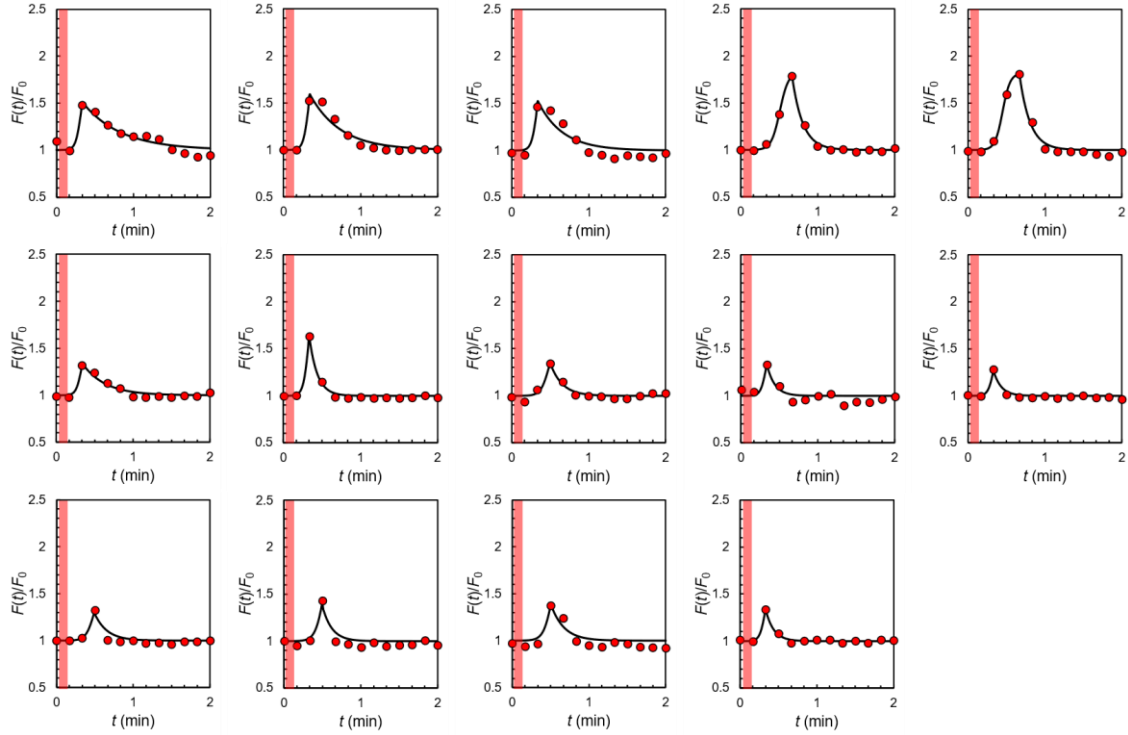


図 4-7 Case 3 における全応答細胞の  $F(t)/F_0$  の時間経過(蛍光画像取得開始 1 分後からプロット)。赤丸は実験データ、黒線はフィッティング曲線、各図の赤帯は NIR 光照射時間である。

#### 4.4.3 各 Case における $P_{res}$ の違いの要因

Case 1~4 において、 $N_{responding}$  はそれぞれ以下の式で表すことができる。

$$N_{responding} = N_{available} \times p_n \times p_{e_{UV}} \quad (1)$$

$$N_{responding} = N_{available} \times p_n \times p_{e_{NIR}} \quad (2)$$

$$N_{responding} = N_{available} \times p_n \times (p_{e_{NIR}} + p_b \times p_{e_{UCNP}}) \quad (3)$$

$$N_{responding} = N_{available} \times p_n \times (p_{e_{NIR}} + p_{e_{UCNP}}) \quad (4)$$

ここで、 $p_n$  は正常に機能する OPN5 が存在する確率、 $p_e$  は刺激光が OPN5 に到達して活性化を引き起こす確率(刺激光の光子が細胞内外の環境で吸収・散乱・屈折などによってロスする可能性を考慮した上での値)、 $p_b$  は UCNP@Biotin が OPN5 が FLAG に結合する確率を表す。なお、 $p_e$  の添え字は刺激光の種類を示す。Case 1 では、 $N_{responding}/N_{available}$

=0.62 であるため、 $p_{e\_UV}=1$  と仮定すれば  $p_n=0.62$  となる。Case 2 では、 $N_{\text{responding}}/N_{\text{available}}=0.05$  であり、 $p_n=0.62$  を用いると  $p_{e\_NIR}=0.081$  となる。Case 3 では、 $N_{\text{responding}}/N_{\text{available}}=0.15$  であるため、 $p_b \times p_{e\_UCNP}=0.161$  が得られる。例えば  $p_b=0.5$  であれば  $p_{e\_UCNP}=0.322$  となり、 $p_b=1$  であれば  $p_{e\_UCNP}=0.161$  となる。いずれの場合も  $p_{e\_UCNP} > p_{e\_NIR}$  である。一方、Case 4 では  $N_{\text{responding}}/N_{\text{available}}=0.04$  であるため、 $p_{e\_UCNP}=0.015$  となり、UCNP 発光に起因する応答増加は実質的に観測されないと考えられる。以上により、これらの確率は現実的な値であると考えられる。

本研究では、UCNP@Biotin を用いて OPN5 を光活性化した場合でも、 $\text{Ca}^{2+}$  応答を示す細胞数は大きく増加しなかった。この原因としては、第 3 章 (3.5.4.3 FLAG タグの蛍光免疫標識法) で示したように、(1) 11cR の結合不全、(2) OPN5 のタグ提示不良や Snorkel 領域の切断による抗体非認識が挙げられる。これらの要因は、UCNP@Biotin が細胞表面に結合した細胞数が極めて少なかったこととも整合しており、Case 3 の  $N_{\text{responding}}$  が限定的であった理由を説明するものと考えられる。

#### 4.5 $\text{Ca}^{2+}$ 応答挙動の特徴量抽出

一般的に、細胞質内の遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度は 100 nM 程度と低く保たれており、これは、ATP のエネルギーを利用して濃度勾配に逆らって  $\text{Ca}^{2+}$  を輸送するイオンポンプ、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換、キレート化タンパク質、細胞膜および小胞体膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルなど、さまざまな機構の複雑な相互作用によって達成されている。OPN5-HEK では、これら天然の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送機構に加え、GPCR 型双安定型オプシンである OPN5 が人工的に付加されている。OPN5 による  $\text{Ca}^{2+}$  輸送機構については完全には解明されていないが、UV 光刺激により Gq タンパク質  $\alpha$  サブユニットがシグナル伝達経路を駆動し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することが報告されている<sup>7</sup>。また、Gq 結合型受容体の効果器 (ホスホリパーゼ C) によって生成されたイノシトール三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) が滑面小胞体 (SER) の  $\text{IP}_3$  受容体に結合し、SER から細胞質へ  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇することも知られている<sup>7</sup>。前述のとおり、Case 1~4 でそれぞれ異なる  $\text{Ca}^{2+}$  応答挙動が見られたが、この原因について考察してみたい。そのために、まず  $F(t)/F_0$  の増加と減衰の部分について、それぞれロジスティック関数 (式(1)) および指数減衰関数 (式(2)) でフィッティングした (図 4-8(a))。

$$\frac{F(t)}{F_0} = 1 + \frac{K}{1 + Ae^{-rt}} \quad (1)$$

$$\frac{F(t)}{F_0} = 1 + ae^{-\beta t} \quad (2)$$

$A$  と  $\alpha$  は定数、 $K$  は環境収容力 (the carrying capacity)、 $r$  は内的自然増加率 (the intrinsic rate of increase)、 $\beta$  は崩壊定数 (the decay constant)、 $t$  は時間である。フィッティングにおいては  $K$  と  $A$  の値は全て一定値とし、 $r$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  をフィッティングパラメータとした。Case 1~4 について、独立に実施した全試行 ( $n=3$ ) で得られた全応答細胞の  $F(t)/F_0$  をフィッティングし、得られた  $r$  および  $\beta$  の値を、図 4-8(b) の相図に示す。 $r$  の値の違いによって大きく 3 つのグループに分けられた。Case 1 は最も大きな  $r$  を示し ( $r_{\text{high}}$ )、Case 3 の約半分の細胞は最も小さな  $r$  を示した ( $r_{\text{low}}$ )。Case 3 の残りの約半分の細胞と Case 2 および Case 4 はその中間の  $r$  を示した ( $r_{\text{mid}}$ )。特に Case 3 では、 $r_{\text{low}}$  および  $r_{\text{mid}}$  に分類される細胞が同一条件下で共存し、各独立試行において概ね同程度の細胞数として観測された (試行 1 では  $N_{\text{responding}}(r_{\text{low}})=6$ 、 $N_{\text{responding}}(r_{\text{mid}})=8$ 、試行 2 では  $N_{\text{responding}}(r_{\text{low}})=9$ 、 $N_{\text{responding}}(r_{\text{mid}})=9$ 、試行 3 では  $N_{\text{responding}}(r_{\text{low}})=10$ 、 $N_{\text{responding}}(r_{\text{mid}})=12$ )。このことから、Case 3 における応答パターンは独立試行間で再現性が高いことが確認された。UCNP@Biotin が OPN5-HEK に結合した状態で NIR 光照射を行うと、 $r_{\text{low}}$  に分類される細胞が必ず一定割合で出現したという Case 3 の結果は、細胞表面に結合した UCNP の発光によって OPN5 が確実に活性化される細胞が、実験条件に依存せず一定数存在することを示唆している。 $\beta$  については大きなばらつきが見られたが、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が定常状態へと戻る過程についてはあまりにも複雑であるため、ここでは議論しない。

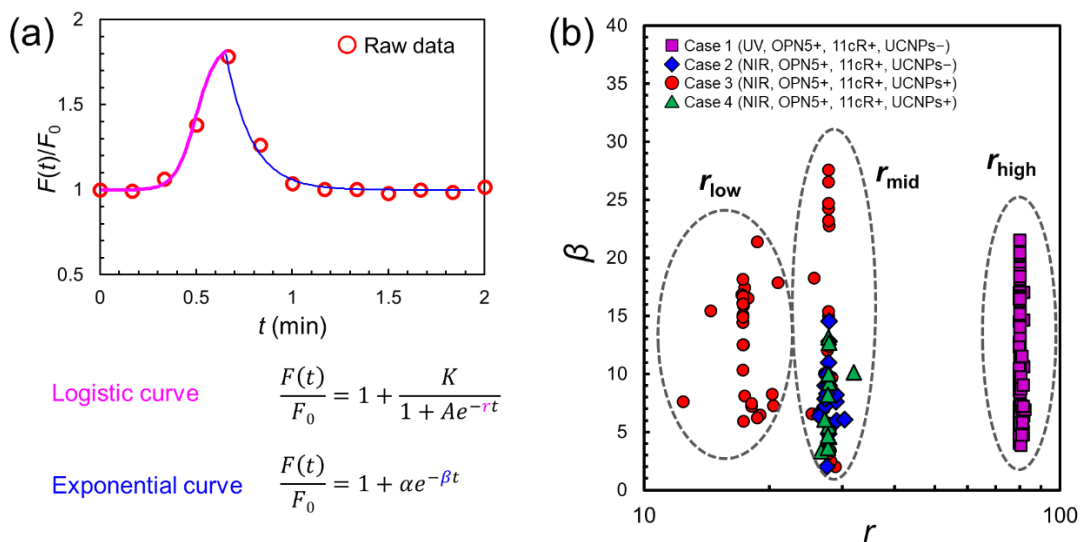


図 4-8 (a) 応答細胞における  $F(t)/F_0$  の立ち上がりをロジスティック関数、減衰を指数関数でフィッティングした Case 1 の例、(b) Case 1~4 における応答を示した全細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  応答をフィッティングして得られた  $r$  と  $\beta$  の相図。

## 4.6 速度論的解釈

SER 膜上に存在するイノシトール三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) は、分子量約 313 kDa のサブユニット 4 個からなる四量体構造を有する Ca<sup>2+</sup>放出チャネルであり、各サブユニットに IP<sub>3</sub> 結合部位を持つ<sup>8</sup>。IP<sub>3</sub>R のチャネル開口確率および Ca<sup>2+</sup>放出活性は、結合した IP<sub>3</sub> 分子数に依存して増大すると考えられるため、光刺激直後に生成される IP<sub>3</sub> 量が多いほど複数の IP<sub>3</sub>R が協調的に活性化され、SER からの Ca<sup>2+</sup>放出が進行すると考えられる。

OPN5 の光活性化により Gq タンパク質を介してホスホリパーゼ C が活性化されると IP<sub>3</sub> が生成されるが、この IP<sub>3</sub> の生成速度は活性化された OPN5 の数に比例すると考えられる。前節 4.5 で示したように、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度は Ca<sup>2+</sup>ポンプなどの排出機構によって速やかに基底レベルへ回復するため、観測される Ca<sup>2+</sup>応答の初期立ち上がり部分は、主として光刺激直後に SER から放出された Ca<sup>2+</sup>量を反映する。以上より、ロジスティック関数の立ち上がり速度  $r$  は、光刺激直後に活性化された OPN5 の実効数、すなわち IP<sub>3</sub> 生成量および IP<sub>3</sub>R の協調的活性化の程度を反映する指標として解釈できる。

そこで、活性型および不活性型の OPN5 の分率をそれぞれ  $\phi_a$  および  $\phi_i$  とすると ( $\phi_a + \phi_i = 1$ )、OPN5 の活性化・不活性化に関わる全ての要因 (図 4-5(a)) を考慮した場合、以下のような反応速度式が成り立つ。

$$\frac{d\phi_a}{dt} = k_{UV}\phi_i + k_{NIR}\phi_i - k_{Blue}\phi_a - k_{Dark}\phi_a \quad (3)$$

$k_{UV}$ 、 $k_{NIR}$ 、 $k_{Blue}$ 、 $k_{Dark}$  はそれぞれ UV 光による活性化の速度定数、NIR 光による活性化の速度定数、青色光による不活性化の速度定数、および暗所における失活速度定数を表す。実験結果より、 $k_{NIR} \ll k_{UV}$  と仮定できる。また、双安定型オプシンである OPN5 の場合  $k_{Dark}$  は他の速度定数に比べて十分に小さいため、 $k_{Dark} \approx 0$  とする。したがって、Case1~3 における反応速度式はそれぞれ下記の式の(4)~(6)となる。

$$\frac{d\phi_a}{dt} = k_{UV}\phi_i \quad (4)$$

$$\frac{d\phi_a}{dt} = k_{NIR}\phi_i \quad (5)$$

$$\frac{d\phi_a}{dt} = k_{UV}\phi_i + k_{NIR}\phi_i - k_{Blue}\phi_a \quad (6)$$

当然、 $k_{UV}$ 、 $k_{NIR}$ 、 $k_{Blue}$  は光強度、量子収率、吸光度などの要因が深く関係するが、単純化のため、厳密な物理的要因には立ち入らず、これらの様々な要因が畳み込まれた総括

速度定数として取り扱う。前述した仮定 ( $r \propto \phi_a$ ) に基づくと、励起光を 8 秒間照射した直後の  $\phi_a$  と  $r$  には比例関係があると考えられる。 $r_{\text{high}}$ 、 $r_{\text{mid}}$ 、 $r_{\text{low}}$  の平均値はそれぞれ 80.1、27.8、17.6 であるので、8 秒照射後の  $\phi_a$  (Case 1) :  $\phi_a$  (Case 2) :  $\phi_a$  (Case 3) の比がおおよそ 80.1 : 27.8 : 17.6 となるように  $k_{\text{UV}}$ 、 $k_{\text{NIR}}$ 、 $k_{\text{Blue}}$  をフィッティングしたところ、 $k_{\text{UV}} = 0.2$ 、 $k_{\text{NIR}} = 0.04$ 、 $k_{\text{Blue}} = 1.0$  となった。なお、UV 光照射の場合は 8 秒間の照射でほとんど ( $\phi_a > 0.8$ ) の OPN5 が活性化されるとした。この速度定数を用いて励起光照射中の  $\phi_a$  の時間変化を Case 1~3 のそれぞれについて計算した結果を図 4-9(b) に示す。Case 3 で  $\phi_a$  がすぐに定常状態になるのは、UCNPs が UV 光と青色光を同時に発光するためである。従って、 $r_{\text{high}}$  は UV 光による OPN5 の活性化速度、 $r_{\text{mid}}$  は NIR 光による OPN5 の活性化速度 (メカニズムは現段階では不明)、 $r_{\text{low}}$  は UCNPs によって NIR 光から波長変換された短波長光による OPN5 の活性化速度であると考えられる。この結論に基づいて、 $r_{\text{mid}}$  のグループに属する Case 3 の残りの半分の細胞と Case 4 について考える。Case 3 では、主に UCNPs の発光によって OPN5 が活性化された細胞と NIR 光によって直接 OPN5 が活性化された細胞の 2 種類がほぼ同数存在している。Case 4 では、UCNPs はディッシュ内に多く存在するものの、細胞に結合されていないため UCNPs の発光が OPN5 を活性化させるほど強くなく、それよりも NIR 光による OPN5 の活性化が優先的に起こったと考えられる。これらの結果から、双安定型オプシンである OPN5 に対し、活性化波長と不活性化波長の光を同時に発光する UCNPs を用いても OPN5 の活性化は可能であるが、OPN5 近傍に結合させたほうが活性化効率は良いと考えられる (図 4-10)。

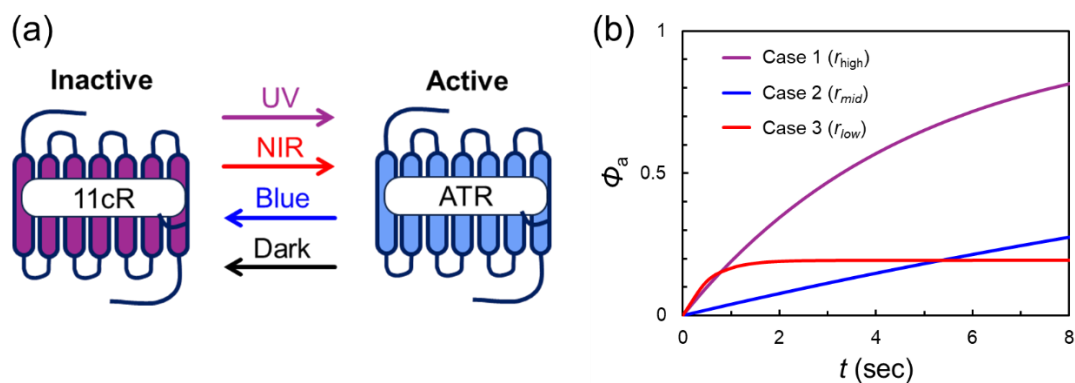


図 4-9 (a) 双安定型オプシン OPN5 の活性化と不活性化を示す模式図、(b) 初期条件  $\phi_a(0) = 0$ 、 $\phi_i(0) = 1$  において、Case 1~3 の励起光照射 8 秒間の  $\phi_a$  の時間変化の計算例。

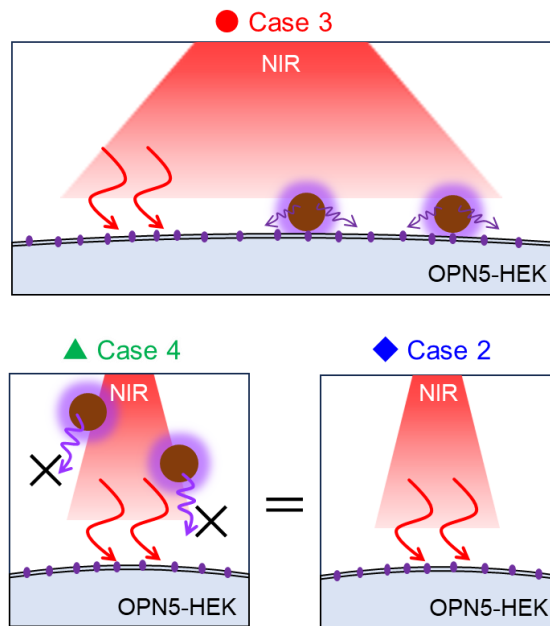


図 4-10 NIR 光照射に対する OPN5-HEK の応答条件(Case2~4)の比較模式図。

#### 4.7 結言

本章では、UCNP@Biotin を介した NIR 光による OPN5 活性化の可否を検証するため、Fluo-4 を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを実施し、その応答挙動を定量的に解析した。まず、UV 光刺激 (Case 1) により既報<sup>4</sup> 通り一過的な  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が確認され、自作した OPN5 発現プラスミドが正常に機能していることを示した。続いて、UCNP を介さない NIR 光刺激 (Case 2) では 6% の細胞が応答を示し、11cR 熱異性化あるいは多光子吸収に起因する OPN5 活性化の可能性が示唆された。

一方、OPN5 近傍に UCNP@Biotin を結合させた場合 (Case 3) には 15% の細胞が応答し、Case 2 や非特異的添加条件 (Case 4) と比較して高い活性化効率が得られた。これは、OPN5 近傍に局在させた UCNP が、NIR 光を受けて放射する短波長光によって OPN5 を効率的に活性化したことを示唆する結果であった。さらに、応答曲線の立ち上がりおよび減衰挙動について速度論的解析を行い、OPN5 活性化速度  $r$  が光刺激の種別や UCNP の局在性を反映する指標となることを明らかにした。特に、Case 3 において  $r$  が二つの分布に分かれたことは、NIR 光による直接的な OPN5 活性化と、UCNP 由来の短波長光による間接的な活性化の双方が共存していることを示している。

以上の結果より、UCNP は OPN5 の活性化波長と不活性化波長を同時に発光するにもかかわらず、OPN5 の光活性化を十分に達成できること、さらに OPN5 近傍に UCNP をターゲティングすることで活性化効率が大きく向上することが示された。すなわち、UCNP を細胞膜直近へ空間的に配置することが、双安定型オプシンを用いた NIR 光制

御において極めて重要であると結論づけられる。本成果は、深部組織における NIR 光を介した GPCR 型オプシンの制御という新たな可能性を示すものであり、本論文の最終章で述べる総括および今後の展望へとつながる重要な知見である。

#### 4.8 参考文献

- (1) Yamashita, T.; Ohuchi, H.; Tomonari, S.; Ikeda, K.; Sakai, K.; Shichida, Y. Opn5 Is a UV-Sensitive Bistable Pigment That Couples with Gi Subtype of G Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (51), 22084-22089.
- (2) Kojima, D.; Mori, S.; Torii, M.; Wada, A.; Morishita, R.; Fukada, Y. UV-Sensitive Photoreceptor Protein OPN5 in Humans and Mice. *PLoS One* **2011**, *6* (10), e26388.
- (3) Govardovskii, V. I.; Fyhrquist, N.; Reuter, T.; Kuzmin, D. G.; Donner, K. In Search of the Visual Pigment Template. *Vis. Neurosci.* **2000**, *17* (4), 509-528.
- (4) Sugiyama, T.; Suzuki, H.; Takahashi, T. Light-Induced Rapid Ca<sup>2+</sup> Response and MAPK Phosphorylation in the Cells Heterologously Expressing Human OPN5. *Sci. Rep.* **2014**, *4* (1), 5352.
- (5) Shen, W. L.; Kwon, Y.; Adegbola, A. A.; Luo, J.; Chess, A.; Montell, C. Function of Rhodopsin in Temperature Discrimination in *Drosophila*. *Science* **2011**, *331* (6022), 1333-1336.
- (6) Palczewska, G.; Vinberg, F.; Stremplewski, P.; Bircher, M. P.; Salom, D.; Komar, K.; Zhang, J.; Cascella, M.; Wojtkowski, M.; Kefalov, V. J.; Palczewski, K. Human Infrared Vision Is Triggered by Two-Photon Chromophore Isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (50), E5445-54.
- (7) Dickson, E. J.; Falkenburger, B. H.; Hille, B. Quantitative Properties and Receptor Reserve of the IP(3) and Calcium Branch of G(q)-Coupled Receptor Signaling. *J. Gen. Physiol.* **2013**, *141* (5), 521-535.
- (8) Foskett, J. K.; White, C.; Cheung, K.-H.; Mak, D.-O. D. Inositol Trisphosphate Receptor Ca<sup>2+</sup> Release Channels. *Physiol. Rev.* **2007**, *87* (2), 593-658.

## 第5章 総括

### 5.1 各章のまとめ

本論文では、最終目的である「双安定型オプシンを用いた、NIR 光による非侵襲的・空間的精密な細胞応答制御の確立」を目指し、光遺伝学、遺伝子工学、ナノマテリアル化学、細胞生物学といった複数の分野にまたがる研究を行った。具体的には、OPN5 の光応答特性の整理、UCNPs の発光特性とその制御、UCNPs の細胞内送達、ならびに  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによる細胞応答の速度論解析を使った定量的解析など、多角的な検討を進めた。その結果、OPN5 に UCNPs をターゲティングすることで、NIR 光照射下による局所的な UV 光刺激が効果的に OPN5 に伝達され、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を誘導できることが示唆することができた。この知見は、UV・可視光による直接照射光強度を増加させるのではなく、光源を光受容体にターゲティングすることで、NIR 光による比較的 low 刺激条件下でも細胞応答を誘導できる可能性を示唆するものである。本研究では、光による細胞毒性評価は行っていないものの、光刺激を必要最小限の空間に限定できる点は、非侵襲的かつ低刺激な細胞操作を実現する上で有利にはたらくと考えられる。

この研究成果は、本論文の主題である光遺伝学ツールの深化に貢献するのみならず、深部組織での双安定型オプシンを使った光遺伝学、生体内光応答性材料への応用、RNA 編集など、広範な応用展開が期待される分野においても有用な知見を提供するものと考えられる。本節では、第1章から第4章までに記述した研究成果を総括し、双安定オプシン制御の観点から得られた知見をまとめる。

#### 第1章

光遺伝学の基盤を成す微生物型および動物型オプシンの構造、光反応機構、そして双安定型オプシンの特徴について概説した。特に、UV 光で活性化し青色光で不活性化する動物型双安定オプシンである OPN5 は、GPCR を介して細胞内シグナル伝達を制御することが知られており、視覚以外にも概日時計調節、代謝制御、内分泌系調整など多岐にわたる生理機能への関与が次々に報告されている。しかし、OPN5 の活性化には UV 光が必要であり、この波長は組織透過性が極めて低いため、従来は培養細胞レベルに研究が限られてきた点が課題であった。また、OPN5 の下流応答を生細胞で精密に操作するためには、光刺激の空間的・時間的制御が不可欠であるが、UV 光照射は細胞毒性や光ダメージの問題も伴うため、非侵襲的かつ深部での光制御技術の開発が望まれている。一方、NIR 光を UV・可視光へと変換する UCNPs は、生体深部での光操作に適した材料として注目されており、特に  $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$  UCNPs は、NIR 励起により 365 nm 付近の UV 光と青色光の両方を放射できることから、双安定型オプシンの活性化と不活性化を遠隔的に制御する理論的可能性を有する。本研究では、UCNPs を用いて双安定型オプ

シン (OPN5) を活性化する新しい光遺伝学手法の開発を目的とし、光学的特性、粒子設計、細胞内応答の評価を通じて、この手法の実現可能性を検討した。第1章では、その背景となる光遺伝学の基礎概念および UCNP の物性と利用可能性を整理した。

## 第2章

NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm コアおよび NaYF<sub>4</sub>:Yb,Tm@NaLuF<sub>4</sub> コア-シェル型 UCNP の構造設計と発光特性の最適化について詳述した。本章の中心となる課題は、Tm<sup>3+</sup>の高励起準位(とくに UV 発光準位)が粒子表面に近いほど強く影響を受ける表面クエンチングの抑制であり、その対策としてコア-シェル構造の合理的設計指針を示した。

まず、UCNP における主要な発光損失メカニズムとして、粒子表面の欠陥準位や高エネルギーフォノンによる多フォノン緩和が挙げられ、特に Tm<sup>3+</sup>の UV 光発光が強く劣化することが示された。これを改善するための基本戦略として、格子整合性の高い不活性シェルでコアを被覆し、発光中心を表面から空間的に隔離するコア-シェル化が有効であることが示された。

本研究では、不活性シェルとして NaLuF<sub>4</sub> を採用した。さらに、Lu<sup>3+</sup>は完全閉殻 (4f<sup>14</sup>) で光学的に不活性であるため、コア内部の Yb<sup>3+</sup>-Tm<sup>3+</sup>エネルギー移動過程を乱さないという特徴も持つ。シェル厚の最適化に関する検討では、シェルが薄すぎると表面クエンチング抑制が不十分であり、逆に厚すぎると界面欠陥の増加や励起光の散乱・吸収により発光効率が低下するという、最適シェル厚の存在が示されている。さらに本研究の結果から、コア粒径約 60 nm に対し、光学損失とクエンチング抑制のバランスを考慮して 10 nm 前後のシェル厚が最適であると考えた。

以上の設計指針に基づき、本研究では欠陥の少ない NaLuF<sub>4</sub> シェルにより UV・青色光発光を効率的に高める UCNP を得ることに成功した。本章で確立したコア-シェル設計概念は、OPN5 活性化に必要な高効率 UV 光発光の実現に重要な基盤となり、次章以降の細胞実験や光制御実証に直結する材料学的基礎を構築した。

## 第3章

生体応用のため、得られた疎水性 UCNP を PEG 化リン脂質およびビオチン化リン脂質でカプセル化し、水分散性 UCNP@Biotin を調製した。DLS 測定では、平均流体力学径約 117 nm、負のゼータ電位、血清存在下でも高いコロイド安定性を示した。PEG 鎖は非特異吸着の抑制に寄与し、生体環境での粒子安定性を向上させた。また、MTT アッセイにより、200 µg/mL の高濃度条件でも十分な細胞生存率が確保され、光遺伝学用途に耐える生体適合性が確認された。

さらに、UV 光発光特性の評価では、980 nm 励起により OPN5 の活性化波長域に対応する強い UV 光が得られた。この特性は、従来困難であった UV 光依存性オプシンの深部光制御を可能にする基盤技術となる。本章では、その後の細胞実験および OPN5 光活性化に向けた、光学特性・安定性・生体適合性を兼ね備えた UCNP の合成基盤を確立した。

## 第 4 章

UCNPs を用いた OPN5 の光活性化の実証と、その細胞応答を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングにより定量的に評価した結果について述べた。まず、Snorkel-OPN5 を発現した HEK293T 細胞に 11 シス型レチナールを添加し、光受容体としての完全な機能を付与した後、 $\text{Ca}^{2+}$  指示薬として Fluo-4 を用いて細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を可視化した。UV 光照射のでは、OPN5 の活性化に伴って細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が急激に上昇する典型的な  $\text{Ca}^{2+}$  応答が得られたことから、本研究系における OPN5 の正常なシグナル伝達を確認された。

次に、UCNPs を OPN5-HEK に結合させ、980 nm 励起による UCNPs の UV 光発光を OPN5 の光刺激源として用いた。NIR 光照射により特異的な  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が誘導され、UCNPs が OPN5 の光活性化に十分な UV 光を生成していることが明らかになった。一方、UCNP を結合していない OPN5-HEK や UCNPs を添加しない条件でも  $\text{Ca}^{2+}$  変化が見られた。11cR を添加していない条件では  $\text{Ca}^{2+}$  変化は認められなかった。

得られた  $\text{Ca}^{2+}$  応答は、立ち上がり速度や応答強度に個細胞差を示したため、時間分解データを速度論モデルに基づいて解析した。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇は良好にフィッティングでき、OPN5 活性化後の  $\text{Ca}^{2+}$  流入・放出が進むダイナミクスを速度論的解析によって定量的に記述することができた。第 4 章では、双安定型オプシンの光制御を生体深部に拡張するための基礎データが得られ、次章で述べる将来展望へとつながる重要な成果を示した。

## 5.2 今後の展望

本研究では、双安定型オプシンである OPN5 が UV 光を受容するという本質的な性質に対し、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$  UCNPs の UV 光発光を利用することで NIR 光による活性化を実現した。本成果は、これまで深部組織での応用が困難であった双安定型オプシン光遺伝学に新しい操作原理を提供するものであり、今後の展開として以下の研究方向が考えられる。

### 5.2.1 双安定型オプシン光遺伝学の深化に向けた展望

本研究では、UCNPs を利用して UV 光依存型オプシンである OPN5 を NIR 光で活性化できることを示し、これまで深部組織での応用が困難であった双安定型オプシン光遺伝学に新たな可能性を提示した。第 1 章で述べたように、OPN5 は 2020 年以降、視覚以外の多様な生理機能に関与することが次々と報告されており、その生理的役割はいまだ十分に解明されていないのが現状である。従来、OPN5 研究は UV 光の組織透過性の低さから、主に培養細胞や浅い組織に限定されていたが、本研究の成果により、深部組織においても非侵襲的に OPN5 シグナルを操作できる可能性が示された。これは、OPN5 の未知の生理機能の解明に向けて新たな研究手段を提供しうると考えられる。

さらに、本研究で用いた手法は OPN5 に特有のものではなく、UV 光や可視光で活性化される他の双安定型オプシンにも応用可能である。特に、メラノプシンやパラピノプシン、PdCO など、近年重要性が増している双安定型オプシンは、それぞれ異なる光応答波長と生理機能を有している。これらのオプシンを UCNP<sub>s</sub> によって深部で光操作できるようにになれば、従来の光遺伝学では到達が困難であった臓器・組織においても、GPCR 型光応答を精密に制御し、その生理学的意義を解析する研究が広がると期待される。

### 5.2.2 オプシン光応答と UCNP 発光特性の統合的設計

本研究では、UV 光活性型オプシンと UV 光発光型 UCNP<sub>s</sub> を組み合わせることで光遺伝学の波長設計を拡張できることを示した。UCNP<sub>s</sub> の発光特性がドーパント組成やシェル厚に依存することは既知情報である。今後はこれらの知見に基づき、オプシンの光化学特性と UCNP のエネルギー移動効率を統合的に最適化する設計指針を確立することが重要になると考えられる。

具体的には、Tm<sup>3+</sup>の多段階エネルギー移動経路を制御することで UV 光発光比率を高める、あるいは青色発光成分を増強することで失活操作に適した光学設計を行うなど、オプシンの反応波長特性に合わせた発光波長制御が可能になると予測される。こうした波長工学的最適化によって、双安定型オプシンの活性化効率や反応速度を精密に制御できる光遺伝学プラットフォームの構築が期待される。

また、共同研究において新たに得られた反応結果は、UCNP<sub>s</sub> の生体内光化学への展開可能性を強く示唆するものであり、本研究で構築した技術基盤が実際に機能し得ることを裏付ける成果であった。この成果は、今後の応用研究を進める上で大きな指針となり、多領域をつなぐ新たな光技術の発展へとつながると考えられる。

## 謝辞

本研究は多分野にわたる多くの皆様に支えられ、また分析装置の豊富な本学だからこそ行うことができた研究だと思います。本研究に関わってくださいました指導教員、先生方、研究員、技術職員、学生の皆様に心から深く感謝申し上げます。

東京大学の小島大輔 准教授には OPN5 の第一人者の一人として、論文を共有していただくことをきっかけに共同研究者として協力していただき、心より感謝申し上げます。いつも私の研究に対して味方でいてくださり、励ましの言葉で自信をつけられるようになりました。

東嶺孝一 技術専門員には STEM-EDS の測定を何度も行っていただきました。プラズモン増幅の研究を論文化できなかつたこと、心よりお詫び申し上げます。いつもお忙しいところ急いで測定してくださり、本当にありがとうございました。

平塚 祐一先生には、OPN5 発現プラスミドの設計から作製まで懇切丁寧に指導していただきました。また、興味深い副テーマをご提案いただき、ご指導いただきまして誠にありがとうございました。技術補助員の辰巳 千春さんには、実験の細かな作業に関してご指導いただきました。一緒に実験をし、結果を共有するたびに共に一喜一憂できる仲間ができたことに喜びを感じました。様々なお話にも応じてくださり、本当にありがとうございました。

松村 和明先生には、細胞実験や研究結果の議論で大変お世話になりました。穏やかでありながら常にクリティカルな質問を投げかけてくださったり、アドバイスをくださったり、大変有意義なお時間をたびたびいただきました。土日にもかかわらず実験室の使用を許可してくださったことにも大変感謝申し上げます。松村研究室の技術補助員の河本 慶子さんには、MTT assay や細胞実験に関する基本的なアドバイスをいただきました。いつも親切なご対応に心が救われていました。心より感謝申し上げます。

盛 真友氏には、細胞実験の全般的な問題やトランスフェクションに関する知見に関するご相談に何度も乗っていただきました。プラスミドを提供してくださったこともありました。本当にありがとうございました。

工作室の元技術員である仲林 裕司氏には、早急なお願いにもかかわらず、NIR 光レーザのホルダーを作成してくださり、心より感謝申し上げます。

本論文の実験にあたり、UV 光装置をお貸ししてくださった藤本 健造教授と武貞龍氏に心より感謝申し上げます。

副指導教員の高村 由起子先生をはじめとするマテリアルの先生方、佐々木 恵先生、森田 美美氏、上原 隆平教授、鎌田 斗南助教、中田 泰子准教授、島田 淳一教授、長谷川 忍教授、その他事務職員の皆様は、私が学生生活を送る上で TA や RA のご紹介やサポートをしてくださいました。皆様のご協力がなければ間違いなく私は博士号を取得できなかつたと思います。心より、深く感謝申し上げます。

学部の頃から私の研究に対して激励のお言葉をかけ続けてくださいました、東北大学の阿部 博弥先生、地元が同じで同じく化学を研究する仲間として、学部生の頃から共に頑張ってきて何度も励ましてくださった藤澤 雄太博士に心より感謝申し上げます。

次世代特別研究員の同期の皆様【野田 かさねさん、藤原 綾さん、堀 諒雅さん、Zhou Jiabei さん、筑間 弘樹さん、横尾 雄士さん】には、博士後期課程から入学した私を快く受け入れ、仲良くしてくださったこと、心より感謝申し上げます。

前之園研究室に在籍していた方々【北崎 裕己さん、坪原 真旺さん、Hunain Shahid 氏、Jianhui Yang 先生、Samyog Adhikari さん、Thomas Moine さん、清水 咲弥さん、箕輪 樹さん】には、日々の研究生生活でたわいもない話や研究の議論、外食を楽しむことができました。修士まで孤独に研究を送っていたため、研究仲間が存在する時間は宝物でした。本当にありがとうございました。2022 年 9 月まで技術補助員だった大嶋 紘実さんはプロのマリンバ奏者であり、音楽をはじめとした様々なお話をして楽しい時間を過ごしてくださったこと、感謝申し上げます。技術補助員の酒井 歩さんには、度重なる悩み相談を受けてくださったこと、楽しくお話をしてくださったこと、感謝してもしきれません。

Simon MOORE さんには、研究生生活、英語の添削、英文法における私の些細な疑問に丁寧にお答えしていただき、多大なる感謝を申し上げます。何事も前向きに捉える明るさと、地道で面倒なことにコツコツと取り組む姿を間近でみて、何度も触発されてきました。

博士後期課程 4 年目からは平塚研究室を中心にデスクワークなど、研究をする場を設けてくださいました。平塚研究室に在籍していた方々【石野 秀一さん、戸出 侑輝さん、安田 光希さん、近藤 和さん】は快く私を受け入れてくださり、ごはんやお出かけに誘ってくださり、大変楽しかったです。本当にありがとうございました。

2022 年から 3 年間に渡り、JST 次世代特別研究員に採択してくださった本学の先生方に厚くお礼申し上げます。また、2024 年度笹川科学研究助成、2025 年度海外発表促進助成にて本研究や海外発表をサポートしてくださった日本科学協会の方々に心より感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活をあたたかく見守りながらサポートしてくれた友人・家族のみんなには感謝してもしきれません。本当にありがとうございました。

博士後期課程にて、多くのことを学びました。これからも新しいことに挑戦していく気持ちを忘れずに、新しい環境では自分が最大限に活躍できるよう、頑張ります。

令和 7 年 12 月 12 日

小手川 福笑

# 付録

## A.1 細胞培養

各細胞実験では、健常で安定した状態の細胞を使用することが重要であり、一般にディッシュ上で 80%程度コンフルエントに達した培養細胞を用いることが推奨されている。本研究においても、HEK293T 細胞の適切な細胞状態を確保するため、倍加時間 (doubling time, DT) を評価し、播種密度を調整した。

倍加時間とは、細胞数が 2 倍になるのに要する時間として定義される。一般に、細胞数  $N_t$  は指数関数的に増加すると仮定できるため、

$$N_t = N_0 \times 2^{t/DT} \quad (1)$$

と表される。ここから、倍加時間は

$$DT = \frac{t \times \log(2)}{\log(N_t/N_0)} \quad (2)$$

で求められる。ここで、 $N_0$  は培養開始時の細胞数、 $N_t$  は培養後  $t$  時間後における細胞数を示す。

**【方法】** 12 ウェルプレートを用い、1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^4$  個または  $2.0 \times 10^4$  個の細胞を播種した。播種から 24、48、72 時間後にそれぞれの細胞数を計測し、式 (2) に基づいて倍加時間を算出した。各条件は独立した 3 つのウェルで行い、平均値および標準偏差を算出した。

**【結果】** 播種密度  $1.0 \times 10^4$  cells/well の場合、培養 24、48、72 時間後の細胞数はそれぞれ  $1.20 \times 10^4$ 、 $2.20 \times 10^4$ 、 $8.06 \times 10^4$  個であり、24~48 時間区間の DT は約 27.7 時間、48~72 時間区間の DT は約 12.8 時間と算出された。播種密度が低い場合には、培養初期の増殖速度が低下する傾向が見られた。一方、播種密度  $2.0 \times 10^4$  cells/well では、24、48、72 時間後の細胞数はそれぞれ  $2.02 \times 10^4$ 、 $6.78 \times 10^4$ 、 $2.50 \times 10^5$  個であり、算出された DT は 24~48 時間区間で約 13.8 時間、48~72 時間区間で約 12.8 時間であった。これらの条件では、播種直後から安定した指数関数的増殖が観察された (図 A-1、表 A-1)。

**【考察】** HEK293T 細胞の倍加時間は 12~14 時間であり、播種密度が低い場合には初期のラグが長くなることが明らかとなった。実際に、単純な理論計算 (DT 一定) に基づく播種数では不十分であった。継代までの培養期間を見積もる際には、特に 10 cm ディッシュにおける長期間培養 (72~96 時間) では、播種密度が過度に低いと初期の増殖

遅延によってコンフルエントに到達できない可能性がある。そのため、実際の継代では、例えば 96 時間培養の場合は  $5 \times 10^4$  個ではなく、 $1 \times 10^5$  個を播種することで安定した増殖が得られることを確認した。HEK293T 細胞の播種スキームを表 A-2 に示す。

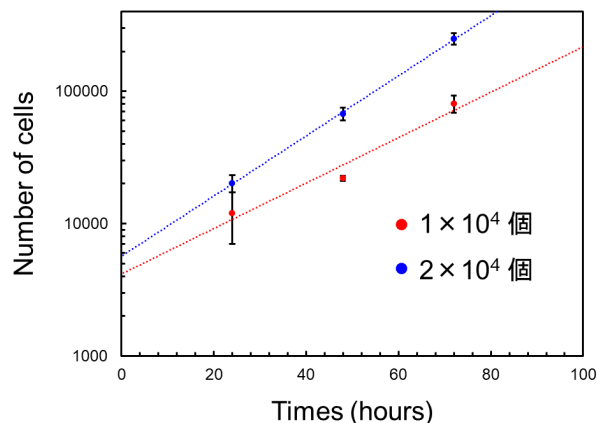


図 A-1 HEK293T 細胞の増殖曲線。各値は 1 ウェルあたりの平均細胞数(平均 ± 標準偏差、n = 3)を示す。

表 A-1 播種密度ごとの HEK293T 細胞数の経時変化と倍加時間

播種密度(cells/well)	時間(hours)	平均細胞数	標準偏差	DT(hours)
1×10 <sup>4</sup>	24	1.20×10 <sup>4</sup>	5.06×10 <sup>3</sup>	-
	48	2.20×10 <sup>4</sup>	1.02×10 <sup>3</sup>	27.7
	72	8.06×10 <sup>4</sup>	1.22×10 <sup>4</sup>	12.8
2×10 <sup>4</sup>	24	2.02×10 <sup>4</sup>	2.97×10 <sup>3</sup>	-
	48	6.78×10 <sup>4</sup>	7.66×10 <sup>3</sup>	13.8
	72	2.50×10 <sup>5</sup>	2.40×10 <sup>4</sup>	12.8

表 A1-2 HEK293T 細胞の培養時間に応じた播種密度の設定

培養時間(hours)	播種密度(cells/dish)
24	8.0×10 <sup>5</sup>
48	4.0×10 <sup>5</sup>
72	2.0×10 <sup>5</sup>
96	1.0×10 <sup>5</sup>

## A.2 プラスミド作製

プラスミド作製は PCR 法を用いて行った。

### A.2.1 プライマーの配列

- OPN5 部分 : RC214800 プラスミドを鋳型に PCR  
Forward Primer: TAATACGACTCACTATAGGG  
Reverse Primer: TTCCCACTCTTCATGAATTTCCAGC
- Snorkel 部分 : pEX-K4J2 vector に Snorkel ドメインの配列を組み込んでもらい、合成 DNA として Eurofins に発注。  
Forward Primer: CTGGAAATTCATGAAGAGTGGGAA  
Reverse Primer: CGCGGCCGGCCGTTTA
- Snorkle 後のペプチド (~800 bp)  
Forward Primer: TAAACGGCCGGCCGCG  
Reverse Primer: CATGAGAGGACAGTGCCAAG

### A.2.2 全シーケンス解析結果

```
TTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCG  
AGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTTCGA  
AATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCCTT  
CTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCG  
CGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGA  
AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAC  
GCACGGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGT  
CGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGCGTTTCTTCCTTTTCCCCACC  
CCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGC  
CCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAATTT  
AAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTAACGTGAG  
TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCT  
TTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTT  
TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCG  
CAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCT  
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC  
GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGG  
TCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG  
AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAG  
GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTC
```

CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC  
GTTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCG  
GCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATC  
CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCTGG  
CCGCGTACCCAATTCAACAGGCATCTACTGAGTGGACCCAACGCATGAGAGGACAGTGC  
CAAGCAAGCAACTCAAATGTCCCACCGGTTGGGCATGGCCAGGTAGCCTATGCTGTGTCT  
GGACGTCCTCCTGCTGGTATAGTTATTTTAAAATCAGAAGGACAGGGAAGGGAGCAGTG  
GTTACAGCCTGTAATCCCAGCAATTTGGGAGGCCAAGGTGGGTAGATCACCTGAGATTAG  
GAGTTGGAGACCAGCCTGGCCAATATGGTGAAACCCCGTCTCTACCAAAAAACAAAAA  
TTAGCTGAGCCTGGTCATGCATGCCTGGAATCCCAACAACCTCGGGAGGCTGAGGCAGGA  
GAATCGCTTGAACCCAGGAGGCGGAGATTGCAGTGAGCCAAGATTGTGCCACTGCACTC  
CAGCTTGGTTCCCAATAGACCCCGCAGGCCCTACAGGTTGTCTTCCCAACTTGCCCCTTG  
CTCCATAACCACCCCTCCACCCATAATATTATAGAAGGACACCTAGTCAGACAAAATGA  
TGCAACTTAATTTTATTAGGACAAGGCTGGTGGGCACTGGAGTGGCAACTTCCAGGGCC  
AGGAGAGGCACTGGGGAGGGGTACAGGGATGCCACCCGGGATCTGTTTCAGGAAACAG  
CTATGACCGCGGCCCGCCGTTTAGGCATAATCAGGCACATCATAGGGGTATTGCATCCCTT  
TGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCGCTTCCCCAAAGCATGATCAGGATGATCAGGCTAATGAC  
GGTGAGTACGACCAATGCCAGTATGGCGGAAATCACCACAACTTTCCACCTAATCTCGTA  
TCTTGGCTTCTTCTGGGATCCACTGCCAGAAGAACCGCTTGAAGCGCCTTCCCACTCTTC  
ATGAATTTCCAGCACAGCAGAAGACTTCCTGACTGTGGTTACGGTGTGCAGCCTGAAGC  
CTTCCAGAGACTTCTTCTTGGTTGCTTTCAAACCACCAGTTTGGCAACAGGCAAATTTGT  
AATCAATAACTTGGTAAATGATGGGATTGTACATCGCTGCAGATTTTGCAAGTAGGGTTGG  
CACCACAGAGAGCTGTATGGGAATGGAGTCTGGCCTTCCAAAAGCTGACCACACAGACA  
CCACTGCATAAGGAATCCAGGCAATCAGGAATCCAGCACAAATCAACATCGCTACCTTTG  
TCAGTTTCATTTCCAGCACATGGCTGCTATGGATCCGACTGTGCAAATGAGCTACTTCTTT  
GGAAGAGGACTTAACCTTGGCAATGATCTTTACGTAGGAGAACACGATCACAGCCGTTG  
GGAGCAAGAGGCAGAAGAAGAGGATGTTTCAGGATGAAAACCTGGCCCCCTACCGAGGC  
CTGGGCCAGCCACCAGTCCAGGGTGCACGAGGTTCCGAAGGGCTCAGGTACGTAGTCCC  
CCAGACCTACCAAGGGCATGGTGGTCCAGAAGGAAGCATAGGCCCAGATGGCTGCCAGG  
CAGATGTAGGCGTGCTTTCTTTTTCAGCCAAACCCATAAGATAAATAGCAGATTTTCAAAT  
ATCGATCCAGGCTGACAGCAGTCATGGTGATAAGGCTTCCACAGCCAAAGAAAAATCCA  
GCCCATCCATAACCAGCGGCAGCCGATCCAGCCAAACACCCAGCGGTGACAAAAGCAAG  
AGATGATGGTGAACGGCTTGCCTACAACCTGAAATCCCCAGATCACAGACTGCTAAATTGA  
TAGTCATTATTTTCAGCGGGTCTCAGCTTCTTCTTTCGTCTAGAAGACATGTAAAGGACATA  
TCCATTTCCAAATGTGGACAGAATCCCAATTATTGTTAGGTAAAAGCCAGCCACTAAATCC  
GCTTCCCAAGAAAGTTTGGAAAGCAAAAGGATCCCCATCTCGAAGGTAATGGGGCAGGCG

CTCGTCCTGAGGCAGGGCAGTGTGATTAAACGCCATGGCGATCGCGGGCGGCAGATCTCCT  
CGGTACCGGATCCAGTCGACGAATCCCGGCCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAAAATT  
CTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCC  
CATTGCGTCAACGGGGCGGGGTTATTACGACATTTTGGAAAGTCCCCTTGATTTTGGTG  
CCAAAACAAACTCCCATTGACGTCAATGGGGTGGAGACTTGAAATCCCCGTGAGTCAA  
ACCGCTATCCACGCCCATTGGTGTACTGCCAAAACCGCATCACCATGGTAATAGCGATGA  
CTAATACGTAGATGACTGCCAAGTAGGAAAGTCCCGTAAGGTCATGACTGGGCATAAT  
GCCAGGCGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGGACTTGGCATATGATACA  
CTTGATGACTGCCAAGTGGGCAGTTTACCGTAAATACTCCACCCATTGACGTCAATGGA  
AAGTCCCTATTGGCGTTACTATGGGAACATACGTCATTATTGACGTCAATGGGCGGGGGT  
GTTGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGCGGAACTCCATATA  
TGGGCTATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTAGTCAATAATCAATGTC  
AACATGGCGGTCATATTGGACATGAGCCAATATAAATGTACATATTATGATATAGATAAAC  
GTATGCAATGGCCAATAGCCAATATTGATTTATGCTATATAACCAATGACTAATATGGCTAAT  
TGCCAATATTGATTCAATGTATAGATCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTG  
ACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA  
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTG  
AATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA  
AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGA  
ATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAA  
CGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTG  
AACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACC  
CTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAA  
GGAAGGGAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTAC  
GCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTG  
GCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAA  
TATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG  
AGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCC  
CCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAG  
GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT  
AGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTT  
CCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCG  
CTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTG  
CAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTG  
CACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACA  
GACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCGTGTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTT

TTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGG  
CTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAA  
GCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCACTCA  
CCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCT  
TGATCCGGCTACCTGCCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA  
CTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC  
GCGCCAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGT  
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGG  
ATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGATCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTAC  
CCGTGATATTGCTGAAGAGC

### A.3 バッファー調整方法

#### 【免疫染色】

#### 50 mg/mL ジギトニン-PBS

30 mg のジギトニンを DMSO 0.3 mL を加えて溶解し、15  $\mu$ L ずつ分注。−20°C で冷凍保存。免疫染色使用時には PBS で 1000 倍希釈。

#### 50 mM NH<sub>4</sub>Cl-PBS 50 mL

0.1337 g の NH<sub>4</sub>Cl (MW 53.49) を 50 mL の PBS を加えて−4°C で冷蔵保存。

#### 20 %BSA 超純水

50 mL の遠心管に 10 g の BSA と 40 mL の超純水を加え、冷蔵庫で一晩静置(時々遠心管を転倒)。翌日、超純水を足して最終溶液を 50 mL にし、0.20  $\mu$ m のフィルター (ミニザルト、ザルトリウス) でろ過。

#### 【プラスミド作製】

#### LB (Luria-Bertani) 培地

- Tryptone : 10 g
- Yeast extract : 5 g
- NaCl : 10 g

蒸留水で 1 L にし、オートクレーブで滅菌。

### SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) 培地

- Bact-tryptone : 20 g
- Bact-yeast extract : 5 g
- NaCl : 0.5 g
- 250 mM KCl : 10 mL

超純水で 1 L にする。200 mL ずつ分注し、オートクレーブで滅菌。オートクレーブ済の 2 M MgCl<sub>2</sub> を 1 mL、1 M ブドウ糖液を 4 mL を分注した各溶液に加える。

※SOB (Super Optimal Broth) 培地にはブドウ糖液が入っていない。カタボライト抑制により不要な遺伝子発現が抑えられるため、形質転換後の大腸菌の回復と生存率が高まり、形質転換効率が向上することから本研究で使用した。

### A.4 LB 寒天培地の作り方

#### 【必要なもの】

LB Agar (粉末培地)、抗生物質ストック溶液 (カナマイシン 25 mg/mL もしくはアンピシリン 100 mg/mL)、超純水、500 mL 三角フラスコ、滅菌済みシャーレ

#### 【手順】

1. LB Agar 8 g を超純水 200 mL に溶解し、500 mL 三角フラスコに入れる。
2. 120 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌を行う (取り出しまでの冷却を含め、所要時間は約 3 時間)。
3. 室温まで冷却後、クリーンベンチ内で所定の抗生物質を適切な濃度となるよう添加する。
4. 滅菌済みシャーレに 20 mL ずつ分注し、室温で固化させる。
5. 固化後、シャーレに抗生物質名を明記し、培地面を上にして袋に封入し、4 °C で保存する。

### A.5 アガロースゲルの作製方法

#### 【必要なもの】

アガロース粉末、電気泳動用バッファー (TAE)、電子レンジまたは加熱装置、ゲルキャストイングトレイ、コーム (サンプルウェル形成用)

#### 【手順】

1. 所望の濃度となるようにアガロースを秤量する。本論文では 2%ゲルを使用したため、200 mL の TAE に対して 4 g のアガロースを用いる。
2. アガロースを TAE に加え、耐熱容器に入れて電子レンジで加熱し、完全に溶解させる。必要に応じて加熱と攪拌を繰り返す。

3. 溶液を約 60–65 °C まで冷却した後、臭化エチジウム溶液 (10 mg/mL) を 200 mL あたり 4  $\mu$ L 添加する。冷却しすぎると固化するため注意する。
4. ゲルキャストリングトレイを水平に設置し、コームをセットした状態で溶液を注ぎ、気泡が入らないようにする。
5. 室温で 20–30 分間静置し、完全に固化させる。
6. コームを取り外し、サンプルウェルを形成する。

## A.6 アガロースゲル中の DNA の精製方法

### 【必要なもの】

Buffer QG (ゲル溶解用)、イソプロパノール (IPA)、Buffer PE (洗浄用)、Elution buffer (Buffer EB, 10 mM Tris-Cl, pH 8.5)、QIAquick Spin Column (Qiagen)、UV トランスイルミネーター、メス、1.5 mL チューブ、

### 【手順】

1. UV 照射下で目的の DNA バンドを切り出し、滅菌ピンセットで 1.5 mL チューブに回収する。
2. ゲル重量の 3 倍量の Buffer QG を加える (例: ゲル重量 60 mg の場合、180  $\mu$ L を添加)。
3. 50 °C で 10 分間インキュベートし、完全に溶解させる。溶解後、溶液は黄色を呈する。
4. ゲル重量と同量のイソプロパノールを加え、混合する。
5. 溶液を QIAquick Spin Column に加え、13,000 rpm で 1 分間遠心し、フロースルーを廃棄する。
6. カラムに 750  $\mu$ L の Buffer PE を加え、13,000 rpm で 1 分間遠心する。フロースルーを廃棄する。
7. 再度 13,000 rpm で 1 分間遠心し、残留バッファーを除去する。
8. QIAquick Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、カラム中央に Elution buffer (または滅菌水) 30  $\mu$ L を添加して 1 分間室温で静置する。
9. 13,000 rpm で 1 分間遠心し、溶出液を回収する。得られた溶液が精製 DNA である。

## A.7 DH5 $\alpha$ コンピテントセルの調整(Inoue 法)

### 【概要】

Inoue 法は Hanahan 法を簡便化した方法であり、Mn<sup>2+</sup>を利用すること、18 °C で培養することなどを特徴とし、高い形質転換効率を示す。

### 【必要なもの】

LB プレート、SOB 培地、200 mL or 5 L のひだ付き三角フラスコ 3 本、Inoue Transformation Buffer (ITB)、50 mL 遠心管 (滅菌) 2 本、15 mL 遠心管 (滅菌)、1.5 mL tube (滅菌) 100 個、液体窒素  
ITB は以下の手順で調製する。

PIPES : 1.5 g

CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O : 1.1 g

KCl : 9.3 g

これらを 400 mL の超純水に懸濁後、5 M KOH で pH を 6.7-6.8 に合わせる。次に MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O を 5.45 g 添加し、500 mL にメスアップし、0.22  $\mu$ m フィルターでろ過滅菌する。

### 【手順】

1. -80 °C 保存の DH5 $\alpha$  株を LB 寒天培地に播種し、37 °C で一晩培養する。
2. 単一コロニーを 10 mL の SOB 培地に接種し、37 °C で 6-8 時間培養する。
3. 培養液を 4, 1, 0.5 mL 取り、それぞれを 100 mL の SOC 培地を含む 0.5 L 三角フラスコに移し、18 °C で 19-50 時間培養する。
4. 翌日、各培養液の OD<sub>600</sub> を 45 分間隔で測定し、0.55 に達した時点で培養を停止する。他の培養は廃棄する。
5. 培養フラスコを氷上に移し、10 分間冷却する。
6. 4 °C、2,500 × g で 10 分間遠心し、上清を除去する。
7. チューブを反転して 2 分間乾燥させ、残存液をピペットで完全に除去する。
8. 沈殿を 30 mL の氷冷 ITB で穏やかに懸濁し、氷上で 10 分間静置する (激しい攪拌は避ける)。
9. 再度 4 °C、2,500 × g で 10 分間遠心し、上清を除去する。
10. チューブを反転し 2 分間乾燥させ、残液を完全に除去する。
11. 沈殿を 8 mL の氷冷 ITB で懸濁する。
12. 0.6 mL の DMSO を加え、軽く混和し、氷上で 10 分間静置する。
13. 懸濁液を 50  $\mu$ L ずつ滅菌済み 1.5 mL チューブに分注し、直ちに液体窒素で凍結後、-80 °C で保存する。

## A.8 大腸菌を用いたプラスミド複製

### A.8.1 形質転換

#### 【必要なもの】

コンピテントセル (E. coli DH5  $\alpha$ )、プラスミド DNA、SOC 培地、抗生物質添加 LB 寒天培地 (カナマイシン 25  $\mu$ g/mL、アンピシリン 100  $\mu$ g/mL)

#### 【手順】

1. コンピテントセル 50  $\mu$ L にプラスミド DNA を添加し、氷上で 30 分保持する。
2. 42 °C で 45 秒間ヒートショックし、直ちに氷上で 2 分間冷却する。
3. SOC 培地 100  $\mu$ L を加え、軽く混和後、37 °C で 30 分間振盪培養する。
4. 抗生物質含有 LB 寒天培地に播種し、37 °C で一晩培養する。

### A.8.2 コロニー選別と培養

#### 【必要なもの】

抗生物質添加 LB 培地、試験管、滅菌済みつまようじ

#### 【手順】

1. 翌日、コロニーを確認する。
  2. ピンセットでつまようじを取り、単一コロニーを培養試験管に接種する。
  3. 37 °C、180 rpm で 12–16 時間振とう培養する。
- ※16 時間以上の培養はプラスミド収量の低下や細胞溶解を引き起こす可能性がある。また、試験管は培地量の 4 倍以上の容積を持つものを用いる。

### A.8.3 プラスミド精製

#### 【必要なもの】 (QIAprep Spin Miniprep Kit 使用)

Buffer P1 (RNase A 含有)、Buffer P2、Buffer N3、Buffer PE、Elution buffer (Buffer EB, 10 mM Tris-Cl, pH 8.5)、QIAprep Spin Column

#### 【手順】

1. 前日の培養液を遠心チューブに移し、15,000 rpm で 5 分間遠心し沈殿を回収する。
2. 沈殿を 250  $\mu$ L の Buffer P1 で懸濁する。
3. 250  $\mu$ L の Buffer P2 を加え、軽く反転混和する。
4. 350  $\mu$ L の Buffer N3 を加え、直ちに反転混和する。
5. 15,000 rpm で 5 分間遠心し、得られた上清を QIAprep Spin Column に添加する。

6. 13,000 rpm で1分遠心し、フロースルーを廃棄する。
7. カラムに 750  $\mu$ L の Buffer PE を加え、13,000 rpm で1分遠心し、フロースルーを廃棄する。
8. 再度 13,000 rpm で1分遠心し、残留エタノールを除去する。
9. QIAprep Spin Column を新しい 1.5 mL チューブに移し、カラム中央に 50  $\mu$ L の Buffer EB (または滅菌水) を添加し、1分室温で静置する。
10. 13,000 rpm で1分遠心し、溶出液を回収する。これを精製プラスミドとする。

## 研究業績

### 原著論文(筆頭著者として)

(1) "Demonstration of the Photo-controllability of the Bistable Opsin OPN5 using Upconversion Nanoparticles with Multiple Emission Peaks upon Near-infrared Photoexcitation", **F. Kotegawa**, M. Takahashi, K. Higashimine, Y. Hiratsuka, K. Matsumura, D. Kojima, S. Maenosono, *Nanoscale Adv.*, **2026**, 8, 1322–1330.

### 助成金

- (1) 2025 年度 公益財団法人日本科学協会 海外発表促進助成
- (2) 2024 年度 公益財団法人日本科学協会 笹川科学研究助成
- (3) 2022 年 4 月～2025 年 3 月 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)「次世代研究者挑戦的研究プログラム(SPRING)」

### 国際学会発表

- (1) **F. Kotegawa**, M. Takahashi, Y. Hiratsuka, K. Matsumura, D. Kojima, S. Maenosono, "Demonstration of controllability of bistable photoreceptor proteins by upconversion nanoparticles with multiple emission peaks upon near-infrared photoexcitation", *The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2025 (Pacifichem 2025)*, 15-20 Dec. 2025, Honolulu, USA (英語口頭発表)
- (2) **F. Kotegawa**, M. Takahashi, S. Maenosono, "Creation of Nano UV Light Source for In-Vivo Illumination", *The 3<sup>rd</sup> International Conference on Advanced Materials (MRM2023/IUMRS-ICA2023)*, 11-16 Dec. 2023, Kyoto, Japan

### 国内学会発表

- (1) **F. Kotegawa**, M. Takahashi, Y. Hiratsuka, K. Matsumura, D. Kojima, S. Maenosono, "Near-infrared light manipulation of non-visual opsin-expressing cells using upconversion nanoparticles" 日本化学会第 105 春季年会, 26-29 Mar. 2025, 関西大学千里山キャンパス、大阪 (英語口頭発表)
- (2) **小手川 福笑**、高橋 麻里、前之園 信也、"NIR から UV へのアップコンバージョン効率増幅のための NaYbF<sub>4</sub>:Tm@AgPd コア-サテライト型ナノ粒子の創製"、第 74 回コロイドおよび界面化学討論会, 12-15 Sep. 2023, 信州大学長野(工学)キャンパス, 長野 (口頭発表)

(3) 小手川 福笑、前村 大輔、The Son LE、高橋麻里、前之園信也、"生体内照明に向けたナノUV光源の創製"、2022年度北陸地区講演会と研究発表会, 11 Nov. 2022, 富山大学五福キャンパス, 富山

(4) 小手川 福笑、前村 大輔、The Son LE、高橋麻里、前之園信也、"生体内照明に向けたナノUV光源の創製"、第73回コロイドおよび界面化学討論会, 20-22 Sep. 2022, 広島大学 東広島キャンパス(オンライン参加)