

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	https://hdl.handle.net/10119/20607
Rights	
Description	Supervisor: 前之園 信也, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	小手川 福笑		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 637 号		
学位授与年月日	令和 8 年 3 月 25 日		
論文題目	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		
論文審査委員	前之園 信也	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	松村 和明	同	教授
	平塚 祐一	同	准教授
	上田 純平	同	准教授
	小島 大輔	東京大学	准教授

論文の内容の要旨

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 NaYF₄:Yb,Tm-based UCNPs are investigated, with particular attention to the α - β 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 Tm³⁺ ¹D₂ level. To address this limitation, core–shell UCNP architectures are designed to suppress surface quenching and enhance UV emission, demonstrating that highly crystalline β -NaYF₄ 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 UCNP 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^{2+} imaging. Despite the spectral overlap between UCNP emission and both activation and inactivation wavelengths, NIR irradiation induces Ca^{2+} responses when UCNP are targeted to OPN5, and kinetic analysis reveals distinct response patterns across experimental conditions, suggesting enhanced activation efficiency through spatial localization of UCNP.

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^{2+} imaging*

論文審査の結果の要旨

生体内で任意の場所やタイミングで特定の化学反応を起こさせる方法が生命科学の幅広い分野で求められている。特に、光化学反応を利用して生体内で機能性分子を制御する方法は、生命現象の解明や新たな遺伝子治療・薬物治療の開発につながることから大きな注目を集めている。こうした中、近年、生体内で局所的に紫外 (UV) 光を発生させる技術の需要が高まっている。生体高分子の *in vivo* 光重合、光駆動バイオ直交化学、UV 光を受容する非視覚オプシンの光遺伝学的研究など、UV 光による *in vivo* 光化学反応に基づく新しい科学が実現し始めているからである。しかし残念なことに、UV 光は生体透過性が極めて低く、光毒性が高いため、現在のところその利用は限られている。UCNPs は、バイオセンシング、深部バイオイメージング、深部腫瘍セラノスティクス、精密ナノ医療、遠隔バイオマニピュレーションに至るまで、様々な最先端のバイオ応用において広く注目を集めている波長変換ナノ材料である。ランタノイドをドープした UCNP は、ランタノイドイオンの 4f 電子により、近赤外 (NIR) 光から UV 光までの広い波長領域に発光ピークを持つ。UCNPs を生体内の特定の場所に集積し、外部の NIR 光で励起することで、光毒性のない微弱な UV 光を局所的に発生させることができれば、生体透過性の低さや光毒性の高さといった UV 光の弱点を解決することができ、生体内での UV 光発生の時空間制御が可能となる。

本研究では、UV 光による *in vivo* 光化学への UCNP の応用の第一歩として、UV 光で活性化され青色光で不活性化される G タンパク質共役受容体 (GPCR) 型非視覚オプシンである OPN5 を用いた光遺伝学をターゲットとした。従来光遺伝学では、チャンネルロドプシンなどの可視光を受容する微生物由来光受容タンパクが広く用いられてきた。一方、GPCR 型オプシンは信号増幅能力を有し、高感度光遺伝学ツールの有望候補として注目されている。多くの GPCR 型オプシンは光を用いて活性状態と不活性状態を切り替えられる「双安定オプシン」であるため、UCNP から多波長光 (双安定オプシンを活性化する波長と不活性化する波長を同時に含む) が双安定オプシンを制御できるかは明らかではなかった。

そこで本研究では、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}@\text{NaLuF}_4$ コア-シェル型 UCNP を OPN5 を発現する HEK293T 細胞に結合させ、NIR 光を照射し、細胞内の Ca^{2+} 応答を観察した。その結果、UCNP の蛍光発光には UV 光だけでなく同等以上の強度の青色光も含まれるにもかかわらず、OPN5 を活性化可能であることが示された。本研究は、UCNP を用いた GPCR 型双安定オプシンの非侵襲的かつ空間的に精密な光制御に関する初の実験的証拠を提供し、深部組織の光操作や複雑な生物学的システムにおける双安定オプシンの機能研究への新たな道を開くものである。

本学位論文の成果は、UCNP を利用した光遺伝学の発展に向けて新たな可能性を示しただけでなく、UV 光による *in vivo* 光化学に関わる幅広い生命科学関連分野において学術的に貢献するところが大きい。よって博士 (マテリアルサイエンス) の学位論文として十分価値あるものと認めた。