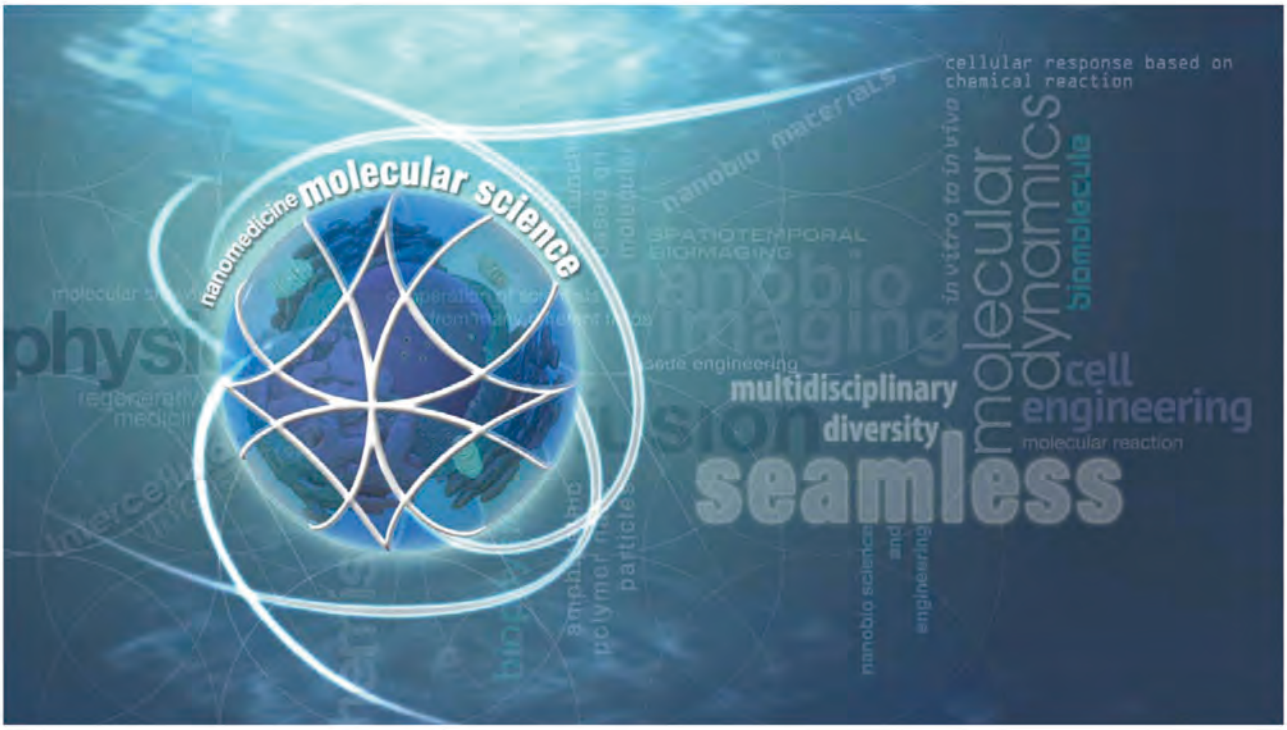
nanomedicine molecular science

March, 2013

ナノメディシン分子科学

平成 24 年度研究成果報告書



文部科学省科学研究費補助金
新学術領域研究　（研究領域提案型）
平成23年8月～28年3月
領域番号：2306
領域略称名：ナノメディシン
領域代表者：石原一彦

目次

ページ

1. 研究領域の概要と総括班 ---------- 1

領域代表　石原一彦（東京大学・大学院工学系研究科）

2. A01(ア) ---------- 5

「細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析」

計画班代表　樋口秀男（東京大学・大学院理学系研究科）

3. A01(イ) ---------- 9

「細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析」

計画班代表　由井伸彦（東京医科歯科大学・生体材料研究所）

4. A01(ウ) ---------- 13

「心筋細胞内分子機能のナノイメージングと個体への応用」

計画班代表　福田紀男（東京慈恵会医科大学・医学研究科）

5. A02(エ) ---------- 17

「バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス」

計画班代表　石原一彦（東京大学・大学院工学系研究科）

6. A02(オ) ---------- 21

「直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製」

計画班代表　三宅　淳（大阪大学・大学院基礎工学研究科）

7. A02(カ) ---------- 25

「細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節」

計画班代表　丸山　厚（九州大学・先導物質化学研究所）

8. A03(キ) ---------- 29

「がんリンパ行性転移の分子機構に解明基づく新治療法創発」

計画班代表　権田幸祐（東北大学・大学院医学系研究科）

9. A03(ク) ---------- 33

「悪性脳腫瘍の抗がん剤耐性分子を標的とする核酸医薬を
convection-enhance delivery システムと先駆的ロボティック手術を導入した
統合的ナノテク先端医療の実用化」

計画班代表　夏目敦至（名古屋大学・大学院医学系研究科）

10. A03(ケ) ---------- 37

「多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御」

計画班代表　岩田博夫（京都大学・再生医科学研究所）

11. 公募 --------- 41
「細胞内動態を応用した新規DDSナノキャリアーの検討」
板野　理　（慶應義塾大学・医学部）
12. 公募 --------- 45
「糖鎖改変技術を利用したセルベースデバイスの設計」
岩崎　泰彦（関西大学・化学生命工学部）
13. 公募 --------- 49
「革新的生体ナノイメージング技術による繊毛疾患の分子機構解明」
上野　裕則（東北大学・国際高等研究教育機構）
14. 公募 --------- 53
「光増感によるエンドソーム脱出の分子科学」
大槻　高史（岡山大学・自然科学研究科）
15. 公募 --------- 57
「生細胞イメージングによる内在性mRNA分解過程の定量解析」
岡部　弘基（東京大学・大学院薬学系研究科）
16. 公募 --------- 61
「フォトニックDNAプロセッサを用いた核酸機能の活性化制御」
小倉　裕介（大阪大学・大学院情報科学研究科）
17. 公募 --------- 65
「細胞環境を再現したフェムトリットル空間デバイスの創製とその生化学反応への展開」
加地　範匡（名古屋大学・大学院工学研究科）
18. 公募 --------- 69
「細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発」
樫田　啓　（名古屋大学・大学院工学研究科）
19. 公募 --------- 73
「固液界面におけるタンパク質間相互作用に及ぼす分子クラウディングの影響」
加藤　功一　（広島大学・大学院医歯薬保健学研究院）
20. 公募 --------- 77
「機能性ナノ界面をもちいた分子動態の解析」
合田　達郎　（東京医科歯科大学・生体材料工学研究所）
21. 公募 --------- 81
「細胞の微弱電流環境下における物質取り込み変化の機構解明と革新的薬物送達への展開」
小暮　健太朗　（京都薬科大学・薬学部）
22. 公募 --------- 85
「細胞内局所での分子反応と軸索変性との関連を明らかにする」
小西　慶幸　（福井大学・大学院工学研究科）

23. 公募 --------- 89
「歩くナノ○○計の創成」
鈴木 団 （早稲田大学・重点領域研究機構）
24. 公募 --------- 93
「抗原ペプチドナノファイバーの形態に由来するキャリア機能探索と樹状細胞機能の理解」
田中 直毅 （京都工芸繊維大学・工芸科学部）
25. 公募 --------- 97
「人工細胞系に構成した細胞膜受容体・細胞骨格複合ナノ装置の動作解析」
湊元 幹太 （三重大学・工学研究科）
26. 公募 ---------101
「幹細胞制御機能を有するタンパク質担持基材の分子設計」
中路 正 （富山大学・先端ライフサイエンス拠点）
27. 公募 ---------105
「細胞内酵素反応を定量的に解析するためのナノプローブの開発」
中田 栄司 （京都大学・エネルギー理工学研究所）
28. 公募 ---------109
「三光子励起自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境変化のその場測定」
中林 孝和 （北海道大学・電子科学研究所）
29. 公募 ---------113
「細胞ナノ領域と生体微小環境における核酸送達システムの動態と機能発現解析」
畠山 浩人 （北海道大学・大学院薬学研究院）
30. 公募 ---------117
「エンドソーム脱出能チューニングによるウイルス様動的構造変化惹起ナノカプセルの構築」
原田 敦史 （大阪府立大学・工学研究科）
31. 公募 ---------121
「ケミカルデバイスを利用したsiRNAによって誘起される分子反応の発現機構解明」
南川 典昭 （徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部）
32. 公募 ---------125
「細胞内分子環境の化学模倣系の構築とそれを用いたテロメア核酸プローブの開発」
三好 大輔 （甲南大学・フロンティアサイエンス学部）

文部科学省科学研究費補助金
新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」
研究期間：平成 23 年 8 月−平成 28 年 3 月

【本領域研究の目的】

ナノメディシン分子科学とは、生体を構成し生命活動を司る細胞環境における分子反応に関わるものである。細胞環境でタンパク質や核酸が関わる反応は、生命機能に極めて重要であることは周知の事実である。しかしながら、細胞環境は、通常の化学反応環境と比べて、全く異なることが知られている。ナノメディシン分子科学では、このように未開拓であった特殊な細胞環境における分子反応を定量的に理解・考察するために、分子反応パラメーターを導出する。すなわち、細胞にフォーカスし、細胞環境下での分子反応論の確立、細胞内、細胞膜近傍の特殊環境の理解、バイオ分子の特異的反応様式の理解を基本とする学術領域と定義する。これにより、分子反応場となる細胞系を通して、組織、生体全体へと高次元に連携する生体システムを、各次元で、異分野に属する研究者が共通する言葉で理解・考察できるようにする。ここでは、２つの基本的目的を掲げて、研究を推進するとともに新しい学術領域の創成を目指す。一つは、“ナノメディシン分子科学”の創成により、細胞環境での分子反応パラメーターを基盤として、生命反応の理解、病態理解の科学的根拠、医薬品や医療デバイス創製のための設計に結実し、超高齢社会に対応する、安全・安心、高効率医療の発展に大きな貢献する。二つ目は、バイオ･医療産業の爆発的発展を誘引する工学的基礎情報提供と、将来的にこれを支え、より発展させることができる人材育成を行う。

【本領域研究の内容】

研究項目 A01「ナノメディシンの分子科学」では細胞内での分子反応環境、分子反応時間、化学反応に関するパラメーターの測定原理を考案し、その決定と検証をする。研究項目 A02「ナノメディシンのための分子科学」では、細胞内への物質輸送や探針による直接観察より、分子拡散係数や分子間親和性などのパラメーターの導出と考察をする。研究項目 A03「ナノメディシンを用いた分子科学」では、細胞環境での分子反応パラメーターに基づく病態の一義的な理解をすすめ、治療分子の構造や治療デバイスの設計法を考察する。また、対象を細胞レベルから組織レベル・生体レベルまで拡張し、疾病原因の特定と分子反応に基づく治療法、治療デバイスの考案を行う。さらに公募研究を加えて、それぞれの研究班間での共同研究を積極的に推進し、これまで未遭遇の知識の思いがけない結合を誘起し、シームレスな融合によりナノメディシン分子科学を作り上げ

る。

例えば、細胞環境下で生じる様々な分子反応を解明するためのポリマー分子や超分子の創製と、分光学的精密測定、ナノ探針による細胞内での直接分子間力の測定より、従来困難であった細胞内の特殊環境におけるバイオ分子反応の定量化と検証が可能となる。これらは、生命現象において特徴的な分子反応の不連続性、非線形性の理解につながります。 また、実際の生体環境下での細胞内分子反応を精度よく解析することで、疾病発症・転移機構の理解や分子シグナル伝達と組織治癒の相関解明につなげる。これらにより、全ての疾病の原因を細胞内での分子反応の異常に起因すると考察し、統一的に理解する新医療原則を提案する。また、細胞周期調整・細胞反応調節分子の導入による根本的疾病治療法・デバイスの創出へと結実させる。

平成 24 年度より採択された公募研究を包含し、「ナノメディシン分子科学」を創成するために必要な課題を統合し、相乗的に何倍もの成果をあげるために活動を活発にする。

【領域研究で期待される成果】

新学術領域の創成により細胞内分子反応の理解と考察により、正確な分子反応パラメーターが得られる。また、難治疾患治療のための革新的化学療法の開拓やコンピューター創薬の効率化、医療デバイス創製の促進、iPS 細胞などの細胞ソースの製造の安定化が実現される。その波及効果として、細胞環境での分子科学の飛躍的な発展、QOL の向上を目指す低侵襲治療・診断の実現、先端医療を創出する新しい工学の確立、医療・医薬品産業の成長促進と国際的競争力の回復、および新しい学術領域を担う研究者の育成などが挙げられる。

【平成 24 年度の成果】

研究体制の整備

平成 24 年度は公募研究班を 22 件採択し、総括班および計画研究班共相成って、本学術領域研究が本格的に始動した。公募研究の採択にあたっては、113 件の応募があり、書類審査の結果、採択研究が決定した。なお、公募研究に関してはあえてグループ分けすることなく、全体を包括できるような体制とした。

総括班では、昨年度からの継続活動として、各研究班の情報交換を密にかつ円滑に遂行するために、領域研究事務局を東京医科歯科大学生体材料工学研究所内に設置し、専門事務補助員を配置した。ナノメディシン分子科学 WEB を整備し、公募班に関する情報を（http://www.tmd.ac.jp/nanomedicine）を追加した。また、領域研究全体の基盤となる標準化細胞試料の提供を目的として、名古屋大学内に研究支援員を配置した。平成

24 年度は、本領域研究において、「細胞内イメージング」が重要な共通基盤技術として利用されることから、東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻内に共焦点レーザー顕微鏡システムを設置し、共有設備とした。本システムの周囲には細胞培養設備を中心に、細胞内反応解析、追跡に必要な機材を集中的に配置しており、研究班員には簡便に利用することができるようにした。これらの人員、設備の整備により、領域全体の情報交換が行えるようになった。

情報交換・公開の促進

本領域から生み出される成果を一般に公開する目的で、WEB を有効に活用し、平成 23 年度研究報告書を掲載するとともに、領域研究の内容を平易に解説することを目的として、News Letter を発刊した（Vol.5-8)。

平成 23 年 7 月に第 3 回全体会議（東京大学：参加者 60 名）を行い、研究内容に関して集中的に討論し理解を深めるとともに、共同研究の推進、融合研究の開拓について積極的に進められるようにした。総括班としても、これを支援する体制を整えた。また、評価委員の一人である神原秀記博士（日立製作所フェロー）より基調講演をしていただくとともに、研究領域全体の評価をいただいた。第 4 回全体会議を平成 25 年 3 月（神戸）で行い、同時に国内外から関連分野の研究者を招聘し、第 1 回国際公開シンポジウムを主催した。

関連する新学術領域研究との合同公開シンポジウムを企画し、「ソフトインターフェイスの分子科学」、「融合マテリアル」、「超高速バイオアセンブラ」との 4 新学術領域にわたる合同公開シンポジウムを企画・実現した（平成 24 年 7 月東京大学:参加者 80 名：基調講演:Prof. Jiro Nagatomi, Clemson University, USA)。

海外からの研究者、企業との情報交換など、比較的小規模の情報交換を支援・推進することを目的とした NMMS セミナーシリーズを新たに開始し、平成 24 年度は、5 回開催するに至った（開催地：東京 4 回、仙台)。

新学術領域研究を継続的に発展させるための若手人材育成を目的とし、研究領域に関連する若手研究者が積極的に「ナノメディシンン分子科学」に参加・議論する、「若手の会」を発足させ、第 1 回「若手の会」会議（名古屋）を平成 24 年 9 月に開催した（招待講演 3 件、出席者 21 名)。

中高生や一般者へ向けて本学術領域の内容を紹介するアウトリーチ活動を、研究室見学、公開実験、市民公開シンポジウムへの情報提供などにより積極的に行った（計 14 件)。

関連研究領域との連携

関連学術学会において「ナノメディシン分子科学」に関するシンポジウムを共催し、より広く情報の提供を行った。

(1) 平成 24 年 9 月：日本バイオマテリアル学会 九州ブロック研究シンポジウム （福岡）

(2) 平成 24 年 9 月：北東アジア国際シンポジウム（仙台）

(3) 平成 24 年 11 月：ナノ学会バイオ部会国際シンポジウム（6th International Symposium on Nanomedicine（ISNM2012）（松江）

(4) 平成 24 年 12 月：日本バイオマテリアル学会 北陸ブロック若手研究シンポジウム（金沢）

(5) 平成 25 年 1 月：ナノメディシンに関する日本-台湾ジョイントシンポジウム（The 4th Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine） （Taipei）

細胞内分子機能のナノイメージングと機能のモデル解析

研究代表者：東京大学理学系研究科　樋口　秀男
分担研究者：東京大学理学系研究科　　茅　元司

1. 研究の概要

「百聞は一見に如かず」とは、人の話を何回も聞くより、自分の目で確かめた方がよく分かるとの喩えである。生物科学においても、聞くよりも見たほうが理解できる場合が多い。我々は、細胞内やマウス体内で起こる生命現象を 1 分子あるいは 1 粒子レベル高時空間精度でイメージングをおこなっている。今年度は、マウスを傷つけづに非侵襲下で量子ドットを用いて、マウス内の好中球内の小胞を観察し動きに特徴があることを見出した。小胞は、3μm/s の超高速で移動するだけでなく、突然止まるといったおもしろい現象である。

2. 研究の背景と目的

細胞内分子機能の理解は，過去 15 年間の蛍光蛋白質観察と分子生物学の進展によって劇的に深まった．しかしながら，分子生物学や蛍光蛋白質は個々の分子を観察するのではないため，分子反応や機能を直接的に理解することはできない．一方，組換蛍光蛋白質の登場とほぼ時を同じくして分子機能を直接的に観察する 1 分子ナノ精度の計測が登場した．この方法の登場によって，精製された実験系においてモーター蛋白質などの 1 分子運動，ATP 加水分解反応，分子内構造変化などが明らかにされた．さらに近年蛍光性ナノ粒子（CdSe やダイヤモンド）の登場により，高輝度で長時間の蛍光観察が可能となり，細胞内の分子位置を正確に測定できるようになった．この粒子を利用して，マウス内でも 1 分子の位置を追跡できるようになった．しかしながら，これらの技術，すなわち蛍光蛋白質，分子生物学，1 分子計測，蛍光性ナノ粒子を組み合わせて，細胞内の分子反応を観察する研究はほとんどない．そこで本研究では，これらの近年の技術革新を取り入れ，さらに新しい方法を開発して，細胞内のナノメートル領域の分子や小器官の反応を 1 分子・1 粒子レベルで高精度測定を行う．

3. 成果

非侵襲 *in vivo* がん細胞･白血球のイメージング: これまでの *in vivo* イメージングでは，腫瘍部を切開して、癌腫瘍表面近くを観察できた。しかしながら、切開をすると、出血や免疫細胞の活性化などが起こり、生きたままの姿を観察する事は困難である。そこで、非侵襲で観察できる装置システムの改良と観察法の工夫をおこなった。明るくするため、倍率を下げ、レーザーの集光度を上げた。血量が見えるように、青い光の透過像を得られるようにした。観察法として、約 200μm の厚さしかない耳をえらび、蛍光を発する

毛の脱毛をした。がん細胞をラベルするために Herceptin-量子ドット複合体を尾静脈注射た。細胞膜に結合した量子ドットの観察に成功した。また、白血球の中でも運動能が高い好中球やマクロファージに結合した多粒子化量子ドットを結合することで、血管中の好中球をより鮮明に量子ドットを観察する事ができた。また、耳に刺激剤を塗りクロファージを誘発したところ、貪食した量子ドットの詰まった小胞の運動を観察する事ができ、小胞の位置を 50nm 精度で追跡することができた（図)。また、細胞運動を観察でき、仮足が急速に伸びたのち、細胞体が仮足の方法に動き出した。好中球が生体内を動くメカニズムが解ってきた。

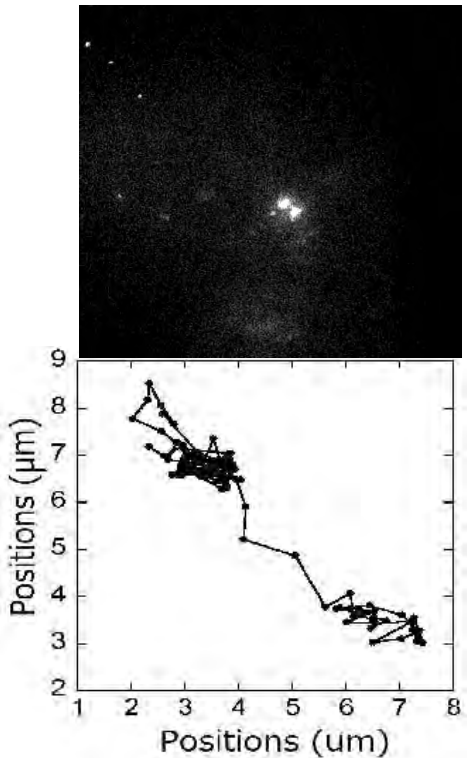
非侵襲がん細胞の観察

そこで、マウスの耳殻の厚さが 150～200μmと薄く皮下組織層が非常に少ないことに着目し、耳にがん腫瘍を形成し非侵襲下でがん細胞を観察を試みました。耳殻に乳がん組織を形成する実験モデル（マウス）の開発を試みたところ、耳殻での腫瘍形成に成功しました。さらに、このがんモデルマウスを用い、乳がん細胞に特異的に付着するように処理した蛍光量子ドット（QD）と当研究室で開発した共焦点顕微鏡を用い、リアルタイムで、かつ非侵襲下で乳がん細胞膜上の QD を観察することに成功しました。

本技術は in vivo における腫瘍細胞特性を解明と、がん治療のための医療応用としての基盤技術につなげていけるものと考えております。

マウス骨格筋構造の *in vivo* イメージングの開発

骨格筋は生体内の器官の中でも極めて高次の組織的構造を有し、その主要な構築物である筋収縮装置はおびただしい量のタンパク質の複合体により成り立っている。我々は、運動分子ダイニンに着目して、筋肉内のダイニン分子の運動の観察を行った。筋肉内では微小管は微小管の平行方向と垂直方法に縦横に走行している。ダイニンはこの微小管に結合する事ができるが、運動を行わないという奇妙な”運動“であった。この奇妙な運動の停止が何時起こるかを決めるために、筋管細胞の内のダイニンの運動を観察したところ、一般の細胞に比べて非常に遅いことがおきらかとなった。現在運動の停止の原因を明らかにすべく、様々なタンパク質を筋肉に発現させている。

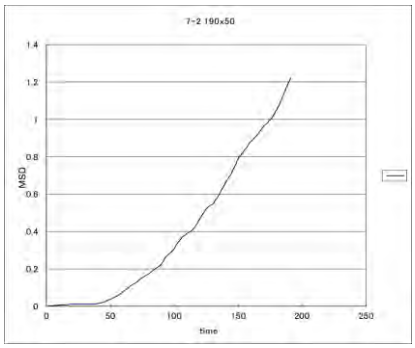


図：非侵襲下で観察されたマクロファージ内に貪食された量子ドットの位置の解析結果

Imaging and model analysis of molecular function in cells

Hideo Higuchi
Motoshi Kaya, Taro Gakujitu*
Department of Physics, the University of Tokyo, Japan
** Department of Biotechnology, University of Kyoto, Japan*

Tumor was exposed by dissecting the skin and a epicedium, so far. Many biological systems especially the immune system were activated by the dissection. To avoid the dissection, we developed the method of non-invasive imaging. The auricle was selected for non-invasive imaging because of thin and short hair. The auricle was illuminated by high power laser for short time. We investigated the motility of vesicle in neutrophil, a kind of white blood cell, in mice. Neutrophil is activated by the inflammation of TPA and goes out of blood vessel to cure the inflammation. 1 day after the inflammation, many of neutrophil go out of the blood vessel. We observed clearly the movement of vesicle containing antibody-quantum dot. The shape of neutrophil becomes long and front domain may pull the cell. The velocity of the vesicle was changed very much from 0.3 to 3.1 um/s. Surprisingly, the velocity of 3 um/s is about three times of velocity of dynein and kinesin. The MSD plots indicate that the “stop and go” fassion (figure).



Skeletal muscles are thought to be rigid structure, but it must be always maintained. In non-muscle cells, cytoplasmic dynein is bearing important roles for intracellular maintenance. However, the roles of dynein are not understood in skeletal muscles. In order to understand the role of cytoplasmic dynein, we developed the *in vivo* fluorescence imaging of mouse skeletal muscle which molecular structures are visualized by using the gene transfer of GFP-fused proteins. Microtubules and cytoplasmic dyneins in *in vivo* muscles were successfully visualized by expressing GFP-Tubulin and dynein IC74-GFP with confocal microscope. The distribution and dynamics of vesicles transported by cytoplasmic dyneins in living muscle differed from non-muscle cells, and these vesicles did not move along the microtubule in living muscle. Meanwhile, dynein IC74-GFP were stably expressed in the myoblast cell line C2C12 and, vesicle transports were observed in myoblast cell and myotube. The dynein binding vesicles in the myoblast stage distributed as similar as in non-muscle cells. However, in myotube, the vesicles mainly moved along longitudinal axis and the speed of the vesicles was decreased to 20% of myoblast stage. Thus, the distribution and dynamics of vesicle transport by cytoplasmic dyneins remarkably changed during the muscle differentiate process.

業績リスト

学術論文

1. Arslam Y. Z., Jinha A., **Kaya M.** and Herzog W. (2013) Prediction of muscle forces using static optimization for different contractile conditions. Journal of Mechanics in Medicine and Biology **13**, 1350022-1-13.
2. Jinha A., Ait-Haddou R., **Kaya M.** and Herzog W. (2012) Response to Letter to the Editor regarding Jinha et al. (2009) "A task-specific validation of homogeneous non-linear optimization approaches" Journal of Theoretical Biology **306**, 145.

総説・解説・成書

1. (著書) Y Toyoshima and H. Higuchi "Motile and Enzymatic properties of native dynein molecules" *in* Handbook of Dynein. K. Hirose and LA Amos ed. (2012)
2. （著書） 樋口秀男、権田幸祐 「量子ドットを用いたがん細胞の単一分子イメージング」 分担執筆 NTS 出版 バイオマテリアル （2012）
3. （解説）樋口秀男、神原丈敏　「歩行型分子モーター、ダイニン」　パリティ　（2013）
4. **茅元司**, 樋口秀男 (2012) ビジュアルレビュー : 筋肉の巧みな収縮メカニズム. 感染・炎症・免疫 **42-2**, 28-35.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. (受賞) 菊島健児　「量子ドットを用いたマウス耳介内における白血球内小胞運動の非侵襲イメージング」ナノ学会　若手優秀発表賞　2012. 6
2. （招待）Higuchi H., Kikushima K., and Kita S. Single molecule biophysics toward in vivo. The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine. Taipei 2013.1
3. （招待）Higuchi H. and M Kaya Single molecule biophysics in a in vivo and in vitro. Japan-Taiwan joint symposium. Kyoto. 2012. 2
4. （招待）Higuchi H., Kikushima K., and Kita S. Single molecule biophysics toward in vivo. 2nd Tokyo U-Korea U Joint Symposium. Soul, Korea　2013.3
5. （招待）Kikushima k. A non-invasive method for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils.　6th International Symposium of Nanomedicine　Tottori 2012.11
6. （招待）茅元司 (2012) Mechanism of muscular activities revealed by single molecule measurements.　理研セミナー　理化学研究所　和光市　(Dec10, 2012).
7. （活動：シンポジウム企画と発表）**Kaya, M.** (2012) Force generation mechanism of single skeletal myosin molecules in myofilaments. The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya University (2012.9).

細胞内応答駆動型超分子によるバイオ分子間反応解析

研究代表者：東京医科歯科大学生体材料工学研究所　由井　伸彦
分担研究者：東京大学大学院工学系研究科　金野　智浩
東京医科歯科大学生体材料工学研究所　徐　知勲
東京医科歯科大学生体材料工学研究所　田村　篤志

1. 研究の概要

本研究では細胞内分子反応解析、治療のための基盤材料として、シクロデキストリン（CD）空洞部に線状高分子（PEG 等）が貫通した超分子ポリロタキサン（PRX）の利用を推進している。PRX を利用した分析、診断、治療材料の設計へ向け、細胞内への取り込みや種々生体分子の細胞内デリバリーにおける超分子骨格の影響を検討した。

2. 研究の背景と目的

細胞内での各種酵素反応や pH 変化に応答して構造の骨格が変化し、その情報をもとに細胞内反応をリアルタイムで解析するとともに、構造変化をもとにした治療が可能な超分子の設計を目指す。具体的には、環状分子である CD の空洞部に線状高分子鎖が貫通した PRX を基本骨格として、CD の運動性や局在性の変化を蛍光分光等の手法で解析する。更には、細胞内代謝反応や pH 変化による PRX 骨格の応答変化を利用することで、細胞内診断と治療の両面での応用展開を図る。最終的には、領域内での連携をもとにして、細胞内反応に応答して駆動するナノメディシンの分子科学を確立する。

3. 成果

3-1. ポリロタキサン骨格構造が細胞取り込みに及ぼす影響

ポリロタキサンはCD部位の運動性により多価相互作用を亢進されることを見出しているが、一方で CD の貫通量に従いポリロタキサン分子の剛直性が変化する。このような特性を鑑みると、PRX は超分子骨格構造に応じて細胞との相互作用、細胞への取り込みにおいて特異的な作用を示すと考えられる。そこで CD 貫通数 5, 34, 63 の PRX に対し、ジメチルアミノ（DMA）基と蛍光分子を修飾し細胞への取り込みを評価した。その結果、CD 貫通数の増加に伴い細胞への取り込み量が増加する傾向が認められた。特に、CD 貫通数 63、DMA 修飾数 58 の PRX（58N-63-CD-PRX）は、同等のアミノ基数のメタクリレートポリマーや DMA 修飾多糖（プルラン）よりも飛躍的に高いものであった。また、4 ºC で細胞と接触させた結果、58N-63-CD-PRX と接触した細胞のみ細胞膜に PRX が局在する様子が観察された。詳細なメカニズムに関しては現在解明中であるが、ポリロタキサン骨格の剛直性、あるいは動的な多価相互作用が細胞膜との相互

作用を亢進し得ることが示唆された。

3-2. siRNA デリバリーにおけるポリロタキサン骨格構造の影響

このような超分子骨格特徴的な細胞との相互作用を応用し、生体分子の細胞内デリバリーへと展開した。生体分子として siRNA を選択し、ジメチルアミノエチル基修飾 PRX（DMAE-PRX）との静電複合形成を評価した結果、CD 貫通数が多く剛直な骨格の PRX ほど低混合（N/P）比で複合体を形成することが明らかとなった。一方、PRX/siRNA 複合体に対してヘパリンを添加した際のポリアニオン交換反応による siRNA の放出挙動を調べた結果、CD 貫通数 31 の PRX と比較して、CD 貫通数 52 の PRX は最大で 10 倍高い濃度のヘパリンを添加することではじめて複合体からの siRNA の放出が観察された。以上より、PRX の骨格構造（CD 貫通数）が siRNA との静電複合体形成能と安定化に寄与していることが明らかとなった。また、細胞内へ DMAE-PRX/siRNA 複合体の導入を行なった結果、既存の導入試薬である ExGen や Lipofectamine より有意に高い細胞内 siRNA 導入量を示し、特に CD 貫通数 52 の PRX においては約 30 倍高い取り込みを示した。このような PRX による細胞内 siRNA 導入における有意性は、PRX 上のアミノ基の修飾数や複合体のゼータ電位といった細胞との静電相互作用に関する因子よりも、交換反応に対する安定性との間に相関関係が見出された。以上より、siRNA の細胞内導入において超分子骨格が強く影響することが明らかとなった。

3-3 超分子的アプローチによる PRX/siRNA のエンドソーム脱出

一方、RNA 干渉の誘導には細胞質での RISC 形成が必須であるが、細胞質への移行過程でエンドソームが障壁となる。エンドソーム脱出のためのアプローチとして、本研究では PRX の構成成分である CD の利用に焦点を当てた。CD は細胞膜からリン脂質、コレステロールを引き抜く（空洞部へ包摂）ことで膜を脆弱化させるため、エンドソーム内局所的に PRX から CD を放出することが可能であれば、エンドソーム膜を不安定化し、結果として細胞質への移行が促されると考えた。このような仮説のもと、エンドソーム内低 pH 環境で加水分解されるエステル結合を末端に導入した PRX（DMAE-COO-PRX）を設計し、膜障害性、エンドソーム脱出能の評価を行なった。DMAE-COO-PRX を赤血球と接触させたところ、pH 7.4 では全く溶血が起こらなかったが、pH 5.5 では有意に高い溶血活性を示した。さらに、複合体のエンドソーム脱出効率を共焦点顕微鏡で解析した結果、酸分解型 PRX は非分解型 PRX より有意に高いエンドソーム脱出効率を示した。また、酸分解型 PRX は非加水分解型 PRX や ExGen よりも高い遺伝子発現抑制効果を示し、10 nM という低濃度でも約 40%の抑制効果を示すことが明らかとなった。以上の結果より、酸性環境で PRX が分解する設計を施すことで、上述の細胞内への取り込み過程における PRX の有意性を担保したまま、細胞質移行過程の障壁であるエンドソームを突破できることが示された。PRX の超分子骨格や分解性結合に関する基礎的知見は細胞内反応解析、治療の実現に向けた研究展開の加速に寄与する非常に有用な結果である。

Analysis of biomolecules using cyto-responsive supramolecular polymers

Nobuhiko Yui
Tomohiro Konnno*, Ji-Hun Seo, Atsushi Tamura
Institute of Biomaterials and Bionengineering, TokyoMedical and Dental University, Japan
**Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Japan*

Biological systems including cells and tissues are sophisticatedly hierarchical and dynamic, and they always inspire us to design materials for the possible applications. In the last quarter century, many scientists have studied interfacial phenomena between these biological systems and artificial materials surfaces in order to design functional biomaterials for medical uses. It should be stated that one of the dominant differences would be the mobility of molecules constructing these materials, and quite a new approach is strongly required to design biomaterials which can perform far-reaching properties in future advancing nanomedicines. In these perspectives, we have studied supramolecular-structured polyrotaxanes as novel biomaterials. One of the characteristics seen in polyrotaxanes is the mobility of cyclic compounds, and they can be freely rotational and sliding if any intermolecular forces with the linear chain and the neighboring cyclic compound are eliminated. In particular, polyrotaxanes consisting of α-CD molecules and a poly(ethylene glycol) (PEG) chain are feasible in the structural components as biomaterials.

In this fiscal year, we prepared a variety of cytocleavable and/or ligand-immobilized polyrotaxanes to examine interaction with cells. To verify the relationship between supramolecular structure and cellular uptake of polyrotaxanes, we synthesized various cationic polyrotaxanes with different number of threading CDs. We found that the cellular uptake level of polyrotaxanes increased with the number of threading CDs. Note that the cellular uptake level of polyrotaxanes was remarkably higher than conventional methacrylate-based polymers. From these results, we confirmed that the precise regulation of supramolecular structure of polyrotaxane was important to achieve efficient cellular entry.

Alternatively, we examined to utilize the polyrotaxane to the intracellular delivery of siRNA. To elucidate the supramolecular structure–function relationship of polyrotaxane in siRNA delivery, a comprehensive study was conducted by varying the number of threading CDs and modified amino groups on the polyrotaxanes, and the relationships between the physicochemical characteristics of polyplexes and their biological activities such as cellular internalization and gene silencing activities were investigated. The highly CD-threaded cationic polyrotaxanes was found to form stable complex with siRNA, and resulting complexes showed efficient cellular entry and gene silencing in comparison with conventional polycations.

業績リスト

学術論文

1. Yuma Yamada, Masahiro Hashida, Taku Nomura, Hideyoshi Harashima, Yuichi Yamasaki, Kazunori Kataoka, Atsushi Yamashita, Ryo Katoono, Nobuhiko Yui. Different mechanisms for nanoparticle formation between pDNA and siRNA using polyrotaxane as the polycation. *ChemPhysChem* **10**, 1161-1165 (2012).
2. Yuma Yamada, Taku Nomura, Hideyoshi Harashima, Atsushi Yamashita, Nobuhiko Yui. Post-nuclear gene delivery events for transgene expression by biocleavable polyrotaxanes. *Biomaterials* **33**, 3952-3958 (2012).
3. Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui. Cellular internalization and gene silencing of siRNA polyplexes by cytocleavable cationic polyrotaxanes with tailored rigid backbones. *Biomaterials* **34**, 2480-2491 (2013).
4. Koji Nagahama, Rie Aoki, Toshifumi Saito, Tatsuro Ouchi, Yuichi Ohya, Nobuhiko Yui. Enhanced stereocomplex formation of enantiomeric polylactides grafted on a polyrotaxane platform. *Polymer Chemistry* **4**, 1769-1773 (2013).
5. Tatsuo Aikawa, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara. Spherical phospholipid polymer hydrogels for cell encapsulation prepared with a flow-focusing microfluidic channel device. *Langmuir*, **28**, 2145−2150 (2012).
6. Batzaya Byambaa, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. Detachment of cells adhered on the photoreactive phospholipid polymer surface by photoirradiation and their functionality. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **103**, 489‑495 (2013).
7. Botao Gao, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. A simple procedure for the preparation of precise spatial multicellular phospholipid polymer hydrogels. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, in press (2013).
8. Tatsuo Aikawa, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. Phospholipid polymer hydrogel microsphere modulates the cell cycle profile of encapsulated cells. *Soft Matter*, in press (2013).

総説・解説・成書

1. 金野智浩，細胞ソースをつくる：細胞親和性ポリマーによる細胞の機能保持・回収，*バイオマテリアル*，**30**(3)，148−152（2012）.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. （招待講演）Nobuhiko Yui, CRC Inernational Symposium on New Challenges on the Biointerfaces: Structures and Dynamics Hydrated molecular mobility at supramolecular surfaces dominates the fate of cellular adhesion, , Sapporo, Japan, February 6th, 2013.
2. （招待講演）Tomohiro Konno, Cytocompatible and reversible phospholipid polymer hydrogels for designing of artificial stem cell niche, 6th International symposium on Nanomedicine, Matsue Japan, November 29 – December 1, 2012
3. （受賞）Tomohiro Konno, Polymer International poster prize awards, 9th International Gel Symposium (Gelsympo2012), Spontaneous forming phospholipid polymer hydrogels “Cell-Container” for cell engineering, October, 2012
4. （アウトリーチ活動）金野智浩，日本大学鶴ヶ丘高等学校第二学年模擬授業，2012 年 11 月

心筋細胞内分子機能のナノイメージングと個体への応用

研究代表者：東京慈恵会医科大学　福田紀男
分担研究者：東京慈恵会医科大学　小比類巻 生
分担研究者：早稲田大学　大山廣太郎

1. 研究の概要

21 世紀は「心臓病の時代」と呼ばれ、癌に次いで高い死亡率を示している。これまで様々な方面から心臓病の研究がなされてきたが、いまだに古典的な手法を用いて病態の解析が行われている。我々は、“Cardiac Nano-medicine”という分野を創成し、nm 精度で病態診断や治療効果の判定を可能にする技術の開発を目指している。本年度は、その土台となる “Cardiac Nano-physiology”の研究に取り組んだ。心筋における収縮の基本単位はサルコメア（~2.0 μm）と呼ばれる分子集合体であり、この長さが~0.1 μm 変化しただけでも心臓のポンプ機能に著しい影響を与える。したがって、サルコメア長とポンプ機能との関係を探ることは心臓の機能を探る上で最も重要な課題の一つである。我々は、蛍光タンパク質である GFP を *in vivo* 心臓に応用し、生きたマウスにおいてサルコメアの長さを 10 nm の精度で測定するシステムを構築することに成功した。

2. 研究の背景と目的

心筋細胞（長軸:~100 μm、短軸:~20 μm）では、長軸方向に~2.0 μmの間隔で存在する横行小管（T管）周辺のナノ領域において細胞膜の電気的興奮が細胞内Ca^{2+}濃度の局所的上昇を惹起し、Ca^{2+}の拡散がアクチン分子とミオシン分子の結合、そしてATP加水分解反応を引き起こす。心筋細胞に特徴的なこの反応（興奮収縮連関）は、細胞内を一定の方向に伝播し、イオン通過性の高い介在板を介して隣接する心筋細胞へと伝達される。結果、リズミックな心臓の拍動が得られる。 心筋研究の分野では、心筋細胞内の構造と機能との関係が長年に渡り調べられているが、ほとんどの研究が空間分解能にして数10 nm以上の変化を対象としたものであり、しかも実験結果を生物学の言葉で現象的に記述しているに過ぎなかった。

本研究では、mm レベルの動きをともなう小動物個体の心臓から心筋細胞内局所の生体分子の挙動やイオン動態を nm 精度で抽出できる顕微システムを新たに開発し、これを基盤として生体分子の集団がどのようにして心臓拍動のリズム調節機構を生み出すかを physical sciences の言葉を使って明らかにする。また、各心臓病のモデル動物を使い、心筋細胞ナノ領域における生体分子の挙動やイオンの動態がどのように変化して心拍のリズム破綻につながるかを明らかにする。得られた実験結果はモデル化し、心臓各部位での心筋細胞内分子ダイナミクスの変化が心臓のリズム調節機構に与える影響を正確に予測することのできる数理モデルを開発する。

3. 成果

Cardiac Nano-medicine の土台となる Cardiac Nano-physiology について、細胞、個体の両面から研究を行った。以下に詳細を記す。

（Ⅰ）幼若心筋細胞を用いた実験:ラットの幼若心筋細胞の Z 線に AcGFP を発現させ、サルコメアの動態解析を行った。サルコメア長の測定精度は 3 nm であった（50 fps）。これは、G アクチンの直径よりも小さな値であることを強調したい。Ca^{2+}イオノフォアにて処理を行い、さらにCa^{2+}ポンプ機能を阻害した上で幼若心筋細胞を低濃度(~10^{-6} M)の Ca^{2+}溶液に暴露すると、サルコメアの鋸波状の自励振動（Cell-SPOC）が観察された（短縮時間＞伸展時間)。次に、様々な頻度で細胞に電気刺激を加え、波形解析を試みた。刺激頻度を生理的なレベル（3～5 Hz）に上げると、伸展速度が上昇し、波形が Cell-SPOC に類似した。循環器医学・生理学の教科書では、一般に、サルコメアの動きに関して、短縮時間＜伸展時間であると記載されている。我々はナノ計測技術を駆使してこれが正しいかどうかを検証した。その結果、生理的な拍動時、各々の単一サルコメアは、短縮時間＞伸展時間に従って SPOC 型として振舞うが、平均化されると各サルコメア間で伸展時間のズレが生じるために、短縮時間＜伸展時間となることが分かった。すなわち、生理的な拍動条件下、幼若心筋細胞においてもサルコメアの自励振動機構が駆使されていることが示唆される。さらに、この系を応用して、心不全治療薬(omecamtiv mecarbil : OM、現在開発中）の薬効評価を試みた。OM を加えると Cell-SPOC の動きがダイナミックになり、アクトミオシン活性が上昇していることが示された。すなわち、我々が開発した幼弱心筋細胞の実験系は、薬理学の評価系としても優れている。

（Ⅱ）*In vivo* マウス実験 : *In vivo* マウス心臓において、単一サルコメアの動きを共焦点下に観察した（カメラ速度：100 fps)。すなわち、α-actinin-AcGFP 発現組み換えアデノウイルスベクター（ADV）を作製し、これを麻酔・開胸したマウスの心臓に投与した。ADV 投与 2～3 日後に心臓を摘出し、表面から共焦点観察すると、約 10%の心筋細胞において横紋構造が確認された。静止時のサルコメア長は~2.0 μm であった。単一サルコメアの長さの測定精度は 10 nm であり、昨年度に QD を使って得られた結果とほぼ同じであった。マウスを人工呼吸下、開胸してサルコメア長を計測すると、短縮相、拡張相において平均で~1.7 μm、~2.0 μm という値が得られた。いずれの相においても、同一細胞内でサルコメア長には~0.3 μm のバラツキが見られた。さらに我々は、対物レンズにピエゾを設置し、心臓の動きにともなう焦点ズレの問題を克服した。すなわち、心電図や心臓内圧から判断した一回の心臓周期を~20 のフェーズに分割し、各フェーズにおいて対物レンズを動かし、焦点の合った画像を再構築することによって動画を作成した。その結果、心周期のどの部分においても焦点が合っている動画を構築することに成功した。

Nano-imaging of molecular functions in cultured neonatal cardiomyocytes and adult cardiomyocytes in the beating heart *in vivo*

Norio Fukuda
Fuyu Kobirumaki-Shimozawa
Koatro Oyama*
Department of Cell Physiology, the Jikei University School of Medicine, Japan
**Department of Physics, Waseda University, Japan*

Active force in cardiac muscle is highly dependent on sarcomere length (SL), known as the Frank-Starling mechanism of the heart. Indeed, a change of ~0.1 μm in SL causes a dramatic change in its contractile performance, especially under partial activation states. However, because of technical difficulties, no stuides have been conducted hetheto to quantitatively analyze sarcomere dyanmics in the living heart *in vivo*. In the present study, we developed an experimental system allowing for the real-time imaging of sarcomeric motions in ventricular myocytes in the anesthetized mouse. We expressed AcGFP at sarcomeric Z-discs (α-actinin-AcGFP) by using the adenovirus vector system in the left ventricle of the adult mouse, and measured the length of a single sarcomere at 100 fps in cardiomyocytes of the beating heart in the anesthetized open-chest mouse under a fluorescence microscope (combined with a confocal unit and a piezo scanner). We recorded electrocardiogram and left ventricular pressure simultaneously with the sarcomeric motions. We found that (1) SL was ~1.7 and ~2.0 μm during systole and diastole, respectively, and (2) it varied by ~0.3 μm at both phases even in the same myocyte.

Likewise, we conducted a study at the cellular level by developing a novel experimental system allowing for the measurement of the movement of single sarcomeres in rat neonatal cardiomyocytes expressed with AcGFP at Z-discs (spatial resolution, 3 nm at 50 fps). We successfully induced transient sarcomeric contractions upon electrical stimulation (1 - 5 Hz) and spontaneous sarcomeric oscillations (Cell-SPOC) after treatment with ionomysin in the presence of ryanodine and thapsigargine. As found in adult cardiomyocytes, the sarcomeric oscillations consisted of quick lengthening and slow shortening during Cell-SPOC. Studies with electric stimulation revealed that the waveform properties at physiologically high electric frequencies (4 - 5Hz) were statistically indistinguishable from those obtained during Cell-SPOC occurring at the similar frequencies. These results suggest that the auto-oscillatory properties of cardiac sarcomeres are involved in the regulation of cardiac beat in neonates. Furthermore, we tested the effects of the cardiotonic agent omecamtiv mecarbil on Cell-SPOC. It was found that omecamtiv mecarbil dramatically increased translational motions of the Z-discs along the myocyte, supporting the notion that the compound exerts its cardiotonic actions by enhancing the actomyosin ATPase activity.

業績リスト

学術論文

1. Kobirumaki-Shimozawa F, Oyama K, Serizawa T, Mizuno A, Kagemoto T, Shimozawa T, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Sarcomere imaging by quantum dots for the study of cardiac muscle physiology. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:313814.

総説・解説・成書

なし

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 福田紀男　「心筋の収縮機構に関する最近の知見について　－ナノとマクロの融合－」心筋会　招待講演　慶應義塾大学医学部　2012 年 7 月 21 日
2. 福田紀男　「高精度分子イメージングを用いた *in vivo* 心筋収縮メカニズムの解析」高精度分子イメージングで拓く医学新領域～細胞･組織中での高精度分子機能解析とその医学的応用の紹介～　招待講演　東北大学医学部　2012 年 9 月 4 日
3. 井上天宏（大学院生）　東京慈恵会医科大学　第 129 回成医会　優秀ポスター賞　2012 年 10 月 12 日
4. 福田紀男　「Nano-imaging of sarcomeres in the heart *in vivo* –Basis for Cardiac Nanophysiology and Nanomedicine–」台湾－日本ナノメディシン研究会　招待講演　台湾中央研究院　2013 年 1 月 14 日

バイオ分子結合型細胞内分子輸送デバイス

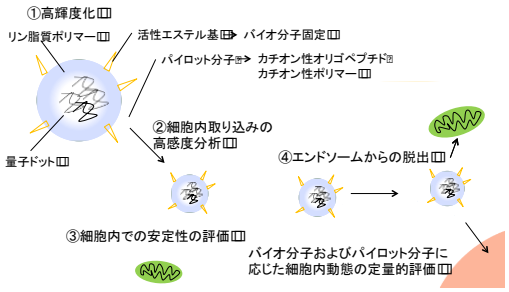
研究代表者：東京大学工学系研究科　石原　一彦
分担研究者：東京大学工学系研究科　井上　祐貴

1. 研究の概要

細胞内の任意の場所にナノ粒子を輸送する際、細胞膜の透過およびエンドソームは障害となる。今年度は、細胞への取り込みと細胞内での移動プロセスに注目し、細胞親和型ポリマーナノ粒子の表面をカチオン性オリゴペプチドで修飾した。その特性に応じたナノ粒子の細胞内動態を定量的に解析することによって、量子ドット(Quantum dots ； QD)内包リン脂質ポリマーナノ粒子の選択的な細胞内輸送を実現した。また、細胞内において長時間安定に蛍光を発する構造を規定し、細胞の増殖プロセス（倍加時間）に対応した観察時間を達成した。

2. 研究の背景と目的

細胞とバイオ分子との相互作用を分子レベルで解明するためには、高時空分解能蛍光イメージングシステムの構築は極めて有用である。これには、細胞環境の分子レベルでの可視化には高輝度で S/N 比の高い蛍光プローブが必要である。我々は、生体親和性とバイオ分子結合能を併せ持つポリマーで半導体ナノ粒子の量子ドット(Quantum dots ； QD)を被覆した QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子によりこれを実現した。この QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子は表面に結合させたバイオ分子の特性を明確に反映した。より詳細な細胞環境の分子レベルの可視化には、QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子のさらなる高輝度化およびこれまでに付与できなかった細胞内標的部位への輸送が必要である。本研究では、細胞内への選択的輸送が可能な高輝度ポリマーナノ粒子の創製を目的とする。



したナノ粒子の創製

QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子作製過程において超音波照射は QD 表面に影響を与え、輝度を低下させると考えられる。本年度は超音波照射が QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子の蛍光量子収率に与える影響を評価することにより QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子の高輝度化を目指した。また、蛍光イメージングツールを細胞内の任意の場所に輸送する際、細胞膜の透過およびエンドソームは障害となる。そこで、カチオン性ペプチドおよびカチオン性ポリマーを用い、その特性に応じた QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子の細胞内動態を定量的に解析することによって、QD 内包リン脂質ポ

リマーナノ粒子の選択的な細胞内輸送を目的とした。

３．成果

ラジカル重合により合成した poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-*co*-*n*-butyl methacrylate-*co*-*p*-nitrophenyl oxycarbonyloxy oligo(ethylene glycol) methacrylate) (PMBN) と、poly (lactic acid) (PLA)を用いて溶媒蒸発法により QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子 (PMBN/PLA/QD) を調製した。得られた PMBN/PLA/QD は水中および PBS 中で安定に分散した。酢酸ウラニルによって染色を行った TEM 観察では、ネガティブ染色されて、PMBN/PLA/QD が白く観察された。染色を行なわない場合には QD のみが観察された。これより、調製した PMBN/PLA/QD が粒径 10-20 nm の球形の粒子であり、QD を 1-8 個程度内包していることがわかった。ナノ粒子作成時において、超音波照射時間が長くなるにつれて蛍光量子収率が低下した。また、照射時間が 5 分間以上で PMBN/PLA/QD の粒径が変化しなかった。これより、超音波照射時間を短縮することによって PMBN/PLA/QD の高輝度化に成功した。

次に PMBN/PLA/QD のバイオイメージング能を評価した。表面に結合するオリゴペプチド中の R8/G8 の割合が増加するにつれてナノ粒子の細胞内への取り込み量が増加した。アルギニン(R)を有するオリゴペプチドの細胞膜透過は、カチオン性の R と細胞膜表面に存在するプロテオグリカンとの静電的相互作用および R のグアニジノ基とプロテオグリカンの硫酸基との水素結合形成に起因すると考えられている。この結果より、PMBN/PLA/QD の表面に 2 種類の異なるオリゴペプチドを固定して細胞内に導入することが可能である。R8-PMBN/PLA/QD は、細胞内に取り込まれた後も細胞倍加時間を超える期間安定に細胞内に存在することが明らかとなった (図 2)。このことは、ナノ粒子の安定性と細胞親和性を示す結果である。

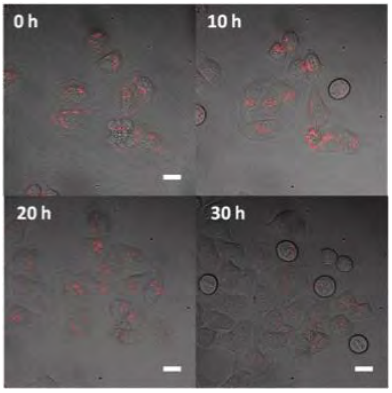


図 2. 細胞内に取り込まれたナノ粒子の長時間連続観察結果

PMBN/PLA/QD のさらなる細胞透過性の向上を図るために、カチオン性ポリマー(PEI)の表面修飾による細胞内取り込み量の変化を検討した。その結果、PEI とグリシン(G1)-PMBN/PLA/QD を混合して加えた場合、G1-PMBN/PLA/QD が細胞内に移行することがわかった。これは G1-PMBN/PLA/QD の表面を覆っている PEI の正電荷のためであると考えられる。また、R8-PMBN/PLA/QD および PEI (G1-PMBN/PLA/QD) は transferrin と比較してエンドソームとの共局在率が低いことがわかった。これは R8-PMBN/PLA/QD および PEI (G1-PMBN/PLA/QD) がエンドソームから脱出したことを示す。

Transport nanodevice immobilized specific biomolecules

Kazuhiko Ishihara
Yuuki Inoue
Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, Japan

To obtain a stable and highly sensitive bioimaging fluorescence probe, polymer nanoparticles with embedded quantum dots (QDs) were prepared and the surface was covered with biocompatible phospholipid polymer. Semiconductor nanocryastal, QDs are promising alternative to organic dyes for bioimaging. The QDs have novel properties such as optical tunability, improved photostability, narrow photoluminescence spectra, and simultaneous multi-color emission. However, their use has been strongly limited by difficulties in obtaining biocompatibility of QDs. The polymeric nanoparticles embedding QDs covered with phospholipid polymers showed resistance to cellular uptake from HeLa cells owing to the nature of the phosphorylcholine groups. On the other hand, when an arginine octapeptide (R8), which was one of the cell penetrating peptide, was immobilized at the surface of the nanoparticles, they could penetrate the membrane of HeLa cells effectively. Cytotoxicty of the polymeric nanoparticles was not observed even after immobilization of R8. Fluorescence intensity of the nanoparticles was not bleached during 30 h observation. Thus, we obtained stable fluorescent polymer nanoparticles for excellent bioimaging probe.

Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-*n*-butyl methacrylate (BMA)-*co*-*p*-nitrophenyloxycarbonyl oligooxyethylene methacrylate)s (PMBN) was synthesized. Phospholipid polymer nanoparticles containing ZnS-overcoated CdSe QDs (PMBN/PLA/QD) were prepared by solvent evaporation technique.

The PMBN/PLA/QD showed good dispersibility in aqueous medium including cell culture medium. The morphology of the PMBN/PLA/QD was sphere and its diameter was 10 nm determined with AFM. The surface characterization with XPS demonstrated that the surface was completely covered with the MPC units. The optical properties of QDs did not alter even after incorporation of them into the polymer nanoparticles. The R8 was immobilized to the PMBN/PLA/QD (R8-PMBN/PLA/QD) for evaluation of dynamics of nanoparticles in cells. It has the ability to translocate through cell membranes in a manner that does not involve the typical endocytic pathways of internalization. The R8-PMBN/PLA/QD clearly was associated with the HeLa cells and was found internalized at a perinuclear location after 2 h incubation. During 30 h continuously observation with the confocal scanning microscope, the R8-PMBN/PLA/QD internalized in cell were separated into two daughter cells by cell division and the amount of R8-PMBN/PLA/QD in a cell decreased (Fig. 1). Also, the total fluorescence intensity derived from R8-PMBN/PLA/QD in the cells was unchanged for 30 h. This indicated PMBN/PLA/QD keep the photostability of QDs.

業績リスト

学術論文

1. X. Lin, K. Nishio, T. Konno, K, Ishihara, The effect of the encapsulation of bacteria in redox phospholipid polymer hydrogels on electron transfer efficiency in living cell-based devices, *Biomaterials*, 33(33), 8221-8227 (2012)
2. B. Byambaa, T. Konno, K. Ishihara, Detachment of cells adhered on the photoreactive phospholipid polymer surface by photoirradiation and their functionality, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 489-495 (2013)
3. Y. R. Silberberg, S. Mieda, Y. Amemiya, T. Sato, T. Kihara, N. Nakamura, K. Fukazawa, K. Ishihara, J. Miyake, Chikashi Nakamura, Evaluation of the actin cytoskeleton state using an antibody-functionalized nanoneedle and an AFM, *Biosens Bioelectron,* 40(1), 3-9 (2013)
4. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara, A simple procedure to prepare precise spatial multicellular phospholipid polymer hydrogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, in press (2013)

総説・解説・成書

1. Y. Iwasaki, K. Ishihara, Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces, *Sci Technol Adv Mate,* 13, 064101 (2012)
2. K. Ishihara, Y. Tsukamoto, Y. Goto, Y. Inoue, Enhanced and Specific Internalization of Polymeric Nanoparticles to Cells, *IFMBE Proceedings*, 40, 262-265 (2013)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. K. Ishihara, “Bioinspired Concepts for Surface Modification on Implantable Medical Devices” Keynote Lecture, 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China, June 1, 2012
2. 石原一彦、細胞内分子輸送デバイスの創製とナノメディシン、基調講演、日本バイオマテリアル学会九州地区講演会、福岡、2012 年 9 月 14 日
3. K. Ishihara, “Specific interaction of polymeric nanoparticles to cells”, Keynote Lecture, 2012 Northeastern Asian Symposium, Sendai, September 19, 2012
4. K. Ishihara, “Bioinspired Phospholipid Polymers for Nanobiodevices” Plenary Lecture, Sosiety for Biomaterials, Biomaterials Day at Clemson University, Clemson, USA, September 29, 2012
5. K. Ishihara, “Self-forming polymeric biomaterials for cell-based engineering”, Plenary Lecture, Biomaterials Symposium in Korean Society for Biomaterials, Seoul, Korea, November 16, 2012
6. 石原一彦、基調講演、ナノメディシン分子科学とバイオマテリアルサイエンス、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台、2012 年 11 月 26 日
7. K. Ishihara, “Oligopeptide-modified phospholipid polymer nanoparticles for specific internalization of cells”, Invited Lecture, 6th International Symposium on Nano-Medicine, Matsue, December 1, 2012
8. K. Ishihara, “Cell/Protein and Protein/Materials Interactions-Evaluation of Interaction Force by AFM Technology”, Invited Lecture, The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Taipei, Taiwan, January 14, 2013

直接細胞内分子観察できる極微小探針の創製

研究代表者：大阪大学基礎工学研究科　三宅　淳
分担研究者：大阪大学基礎工学研究科　木原隆典
研究協力者：大阪大学基礎工学研究科　新岡宏彦
連携研究者：産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門　中村　史

1. 研究の概要

極微小探針を用いて生細胞内における細胞骨格の直接的検出技術の開発を行った。これによりアクチン繊維や中間径フィラメントを特異的に検出することに成功した。また、細胞表層のアクチン繊維の構造・剛性を高分解能で明らかにした。さらに細胞内・細胞周辺環境における分子拡散動態の解析および流体力学下における白血球ローリング時の接着動態について解析した。

2. 研究の背景と目的

疾病を分子反応の統合として理解し、それを解決する技術系の構築には、細胞を反応場とした分子反応の統合的理解あるいは高次の体系化が欠かせない。特に細胞内は通常の化学実験と異なり、多くの繊維性構造体や膜構造体、様々なタンパク質複合体・巨大核酸が高密度に存在する分子クラウディング環境となっている。そのため、細胞内における分子反応を理解・考察するためには、通常の in vitro で行われるような希薄溶液中での分子反応研究ではなく、実際の細胞内環境下での分子反応研究、特に細胞内での分子拡散等に影響を与える高分子環境を明らかにし、その環境下での分子反応を研究することが必要となる。

しかしながら、細胞内空間は極度に複雑な高分子流体であり、これを簡易な形で定式化し、さらにその中での分子反応の定量的解析・分子反応パラメーターの同定を行うことは困難である。そのため、実際の細胞内環境下における分子動態・分子反応を解析可能な実験系の構築と、それを簡略的にも再現可能なモデルを構築することが出来れば、細胞内分子反応研究の重要なプラットフォームになると考えられる。

本研究は、細胞内環境下における分子反応の詳細な解析を可能とする「極微小探針」の創製を行い、それを用いた細胞内における分子反応の定量解析、細胞内における分子の拡散解析、シミュレーションによる細胞モデルの構築、新規の高分解能イメージング手法の開発を行うことで、広く細胞内における分子動態・反応解析のプラットフォームの構築を目指す。

3. 成果

(1)細胞内における力学構造体としての細胞骨格の解析

我々は微細加工により極微小探針(直径 200-400nm, 長さ 10um)を作成し、それを原子間

力顕微鏡（AFM）によって操作し細胞内への物理的な挿入、さらには極微小探針表面に分子プローブを修飾することで、細胞内環境下での生体分子の直接検出に成功している。そこで、細胞骨格であるアクチン繊維および中間径フィラメントを対象とし、それらに対する特異的なモノクローナル抗体を極微小探針表面に修飾することで、細胞内環境下で力学的に直接検出する技術の開発を行なった。特に細胞内で中間径フィラメントの発現量や、アクチン細胞骨格の力学構造体としての様子を、極微小探針を細胞から引き抜く際の力学的な応答から評価することが可能であることを見出した。

また、アクチン細胞骨格は細胞内で多様な構造を取ることで、細胞運動制御など重要な役割を果たす。アクチン細胞骨格は力学的な構造体として細胞内あるいは細胞表層に存在しているため、細胞を力学的に解析することでアクチン細胞骨格の様子を Live で解析することが可能となる。そこで、AFM を用いて細胞の詳細な力学解析を行うことで、各種細胞内におけるアクチン細胞骨格の様子を解析した。細胞はその形態が球状であっても、その種類や状態により力学特性が異なることが明らかとなった。また、正常細胞・癌細胞において、その表層近傍に存在するアクチン繊維の構造と制御機構が異なったものになっていることが明らかとなった。

(2)細胞内・細胞周辺環境における分子の拡散動態

細胞内および細胞周辺部における分子環境を知る上で、分子の拡散動態は重要な指標となる。そこで、細胞内・細胞周辺環境において、低分子～タンパク質程度の大きさの分子の拡散動態の計測を行った。細胞周辺環境として、人工真皮の形成過程における細胞周辺部での分子拡散の計測を行った。これにより、細胞周辺でコラーゲン線維が再配置される過程で生体分子の拡散動態も大きく変化する様子が明らかとなった。さらに、細胞内環境として、細胞質中および核内・核小体内における分子の拡散動態を明らかにした。特に核内の物理環境としてクロマチンの役割について明らかにした。こうした分子の拡散動態を指標とすることで、細胞周辺部や細胞内・核内における物理環境の推察が可能になると考えられる。

(3)流体力学下における細胞動態シミュレーション

細胞周囲は細胞外マトリックスと液体によって満たされており、特に血中では細胞は流体下存在する。細胞自身に作用する物理環境を理解するため、流体力学下における細胞の挙動をコンピュータ・シミュレーションで解析することを試みた。流体力学的な解析手法である粒子法を用いて、白血球が示すローリング現象の接着解析を行った。その結果、白血球のローリングには血管内皮細胞との間における力学的な解離が重要であり、これを段階的に制御することでローリングから接着へと移行する様子が示された。

(4)新規高分解能イメージング手法の開発

細胞を対象としたイメージング手法において、電子顕微鏡法はnmオーダーの非常に高い空間分解能を持つ技術である。電子顕微鏡像はモノクロであるが、電子線励起による発光(カソードルミネッセンス)を示すプローブを開発・作製することにより、生体内分子をカラーかつ高空間分解で観察可能なイメージング手法の確立を目指す。

Development of a nanoprobe for measuring the molecular dynamics in living cells

Jun Miyake
Takanori Kihara, Hirohiko Niioka, Chikashi Nakamura*
Department of Engineering Science, Osaka University, Japan
**Biomedical Research Institute, AIST, Japan*

In living cells, there are many large filamentous structures, organelles, protein complexes, and nucleic acids. The protein concentration in living cells is estimated to reach several hundred mg/mL. The complex intracellular environment rises from awful molecular crowding conditions in the cytosol. To learn about the dynamic molecular reactions in living cells, it is essential to clarify their physicochemical structure and features like disproportional macromolecular crowding structures, molecular diffusion, and excluded volume effect.

In this project, we aimed to analyze the macromolecular dynamics, simulate physical structures, and finally discuss the dynamic molecular reactions in cells. Particularly by developing a nanoprobe for intracellular macromolecules, we intended to quantitatively measure macromolecular dynamics and reactions inside cells. Our research will be a platform for better achievements in nanomedicine molecular science.

1) We developed a fine nanoprobe (200 nm in diameter, 10 um in length) for study of cytoskeletal components including actin cytoskeleton and intermediate filaments. We modified a nanoneedle with antibody for the cytokskeletal analysis. The developed nanoprobe could specifically detect these cytoskeletal structures inside cells.
2) We built a measurement system for mechanical property analysis of floating round cells, which have negligible asymmetric acto-myosin tension. This system could evaluate the mechanical properties of many cell types sharing relatively same morphological features. We further clarified that normal stromal and cancer cells had different sub-membrane actin cytoskeleton, and that the regulatory mechanisms for the actin cytoskeleton of these two cell types were different.
3) We succeeded in detecting the non-Newtonian behavior of molecules surrounding and inside of cells using FCS system. Particularly, we demonstrated that the behavior of molecular diffusion largely altered during structural modification.
4) We simulated the hydrodynamic rolling behavior of leukocytes in blood using particle simulation method. We clarified the importance of dissociation rates of the surface of leukocytes and blood vessel.

業績リスト

学術論文

1. Kazumi Hakamada, Hirofumi Shintaku, Takeshi Nagata, Hiroshi Fujimoto, Satoyuki Kawano, Jun Miyake, Development of a microfabricated device for low-voltage electropermeabilization of adherent cells, *J. Biosci. Bioeng.* **115**, 314-319 (2013)
2. Yoshihiro Ojima, Kazumi Hakamada, Yosuke Nishinoue, Minh Hong Nguyen, Jun Miyake, Masahito Taya, Motility behavior of rpoS-deficient Escherichia coli analyzed by individual cell tracking, *J. Biosci. Bioeng.* **114**, 652-656 (2012)
3. Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake, Chikashi Nakamura, Evaluation of the actin cytoskeleton state using an antibody-functionalized nanoneedle and an AFM, *Biosens. Bioelectron.* **40**, 3-9 (2013)
4. Shinji Sakai, Hitomi Inagaki, Yang Liu, Tomohito Matsuyama, Takanori Kihara, Jun Miyake, Koei Kawakami, Masahito Taya, Rapidly serum-degradable hydrogel templating fabrication of spherical tissues and curved tubular structures, *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 2911-2919 (2012)
5. Yuji Shimizu, Seyed Mohammad Ali Haghparast, Takanori Kihara, Jun Miyake, Cortical rigidity of round cells in mitotic phase and suspended state, *Micron* **43**, 1246-1251 (2012)
6. Sho Shinohara, Takanori Kihara, Shinji Sakai, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, Masahito Taya, Jun Miyake, Fabrication of in vitro three-dimensional multilayered blood vessel model using human endothelial and smooth muscle cells and high-strength PEG hydrogel, *J. Biosci. Bioeng.* (in press)
7. Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Patriche Simona, Takanori Kihara, Jun Miyake, Mihaela Banu, Taiji Adachi, Probing actin filament and binding protein interaction using an atomic force microscopy, *J. Nanosci. Nanotech.* (in press)
8. Takanori Kihara, Takuji Yoshida, Seyed Mohammad Ali Haghparast, Jun Miyake, Elasticity mapping analysis of apical cell periphery actin structures of normal fibroblasts and cervical cancer cells, *J. Analy. Sci. Methos Instrument.* (in press)
9. Seyed Mohammad Ali Haghparast, Takanori Kihara, Yuji Shimizu, Shunsuke Yuba, Jun Miyake, Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells, *J. Biosci. Bioeng.* (in press)

総説・解説・成書

1. Sho Shinohara, Satoko Shinohara, Takanori Kihara, Jun Miyake, Regulation of differentiated phenotypes of vascular smooth muscle cells, Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans, Sugi H (ed), InTech, 331-344 (2012)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Yaron R. Silberberg, Shingo Mieda, Yosuke Amemiya, Toshiya Sato, Takanori Kihara, Noriyuki Nakamura, Kyoko Fukazawa, Kazuhiko Ishihara, Jun Miyake, Chikashi Nakamura, Best Paper Award 2012 (Winner) of 22nd Anniversary World Congress on Biosensors, Evaluation of the actin cytoskeleton state using an antibody-functionalized nanoneedle and AFM, May 17, 2012

細胞内核酸イメージングによる細胞機能発現の解明と調節

研究代表者：九州大学先導物質化学研究所　丸山厚
分担研究者：九州大学先導物質化学研究所　　狩野　有宏
分担研究者：九州大学先導物質化学研究所　　嶋田　直彦

1. 研究の概要

遺伝子の変異や発現状態の解析は、細胞の機能発現、疾病の病態・要因解明に有用である。昨今では、マイクロ(mi)RNA など短い核酸断片が重要な細胞機能を担うことが見いだされている。細胞内で空間的および時間的に高い分解能で、これら核酸のイメージング並びに機能制御する手法が求められている。我々は、高感度な核酸を検出並びに機能制御するための材料としてデオキシリボザイム(DNAzyme)に注目した。本年度は、核酸シャペロン機能を持った高分子材料によって、DNAzyme 活性を大きく向上させることに成功した。

2. 研究の背景と目的

RNA アーゼ活性を有するリボザイムやデオキシリボザイム（DNAzyme）は標的 RNA を触媒的な分解による遺伝子発現の制御法の一つとして注目されてきた。また、標的核酸配列の存在により活性化する（デオキシ）リボザイムである MNAzyme は、遺伝子発現制御に加え細胞内 RNA のイメージング法への応用が期待されている。一方で、これらの機能性核酸の発展には、これらを効果的に細胞内に送り込む送達法の確立とさらなる切断効率の向上が求められる。触媒活性の向上のために、触媒コアとなる核酸シークエンスのスクリーニング、非天然核酸の導入、核酸ハイブリッドを安定化するインターカレーターやポリアミンなどのコンジュゲート化などが検討されてきた。これらは酵素（E）−基質（S）複合体（ES）の安定化や切断速度 k_2 の向上に寄与する。一方で、さらなる触媒活性の向上には、ターンオーバー効率を高めることが必要となる。DNAzyme のターンオーバーは、図 1 に示す二つの過程が考えられる。DNAzyme と生成物（Product、P）との複合体（EP）が安定である低温では、EP と S との核酸鎖交換速度、一方 EP が不安定な高温では ES の形成速度つまりハイブリダイゼーション速度を高める必要がある。既に、我々はカチオン性くし型共重合体（図 2 (a)）が核酸ハイブリッドの安定化機能を有しさらに、ハイブリッド形成速度や核

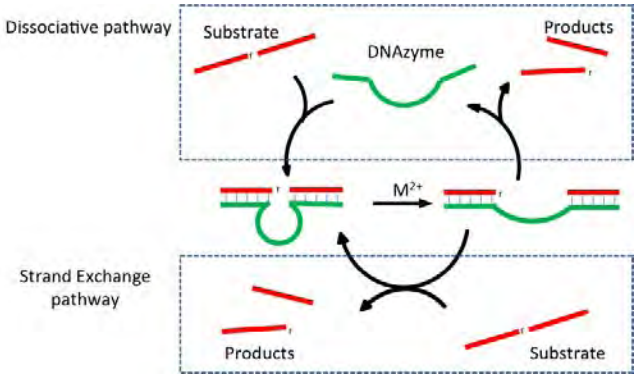


図 1　RNase 活性 DNAzyme のターンオーバー過程

酸鎖交換反応速度を高めることを見出してきた。したがって、くし型共重合体は、*K*m を下げつつターンオーバー活性を向上させえると考えられた。本研究では、DNAzyme 活性に及ぼすくし型共重合体の影響を解析した。

3. 成果

図 2 に用いたくし型共重合体および核酸配列を示す。DNAzyme としては、高い活性が知られている 10–23DNAzyme を用いた[1]。

先ず、切断反応をシングルターンオーバー（STO）条件およびマルチプルターンオーバー（MTO）条件、25℃で行った。図 3 は、反応後の溶液を PAGE で解析した結果である。時間と共に S のバンド強度が減少し、P のバンドが現れ、切断反応が進行していることがわかる。STO 条件では、共重合体の影響はほとんど見られない。共重合体と核酸とはイオン的に相互作用しているが、この相互作用が 2 価の金属イオンの配位が必要である DNAzyme 活性に影響を与えない点は興味深い。一方、MTO 条件下では、共重合体存在下で顕著に反応が促進した。この条件下、EP 複合体の融解温度 *T*m は約 39℃であり、ターンオーバー反応を促すには、EP と S との鎖交換反応を促進する必要がある。共重合体が、この鎖交換促進効果が、反応性の向上に寄与したと考えられる。

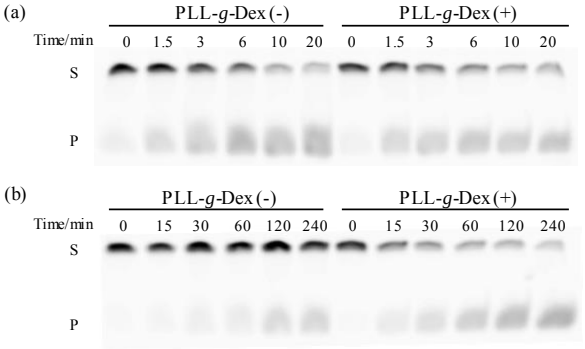


図 3　シングルおよびマルチプルターンオーバー条件下でのくし型共重合体の影響（0.5 mM $MgSO_4$, 25℃）. (a) シングルターンオーバー条件, [Substrate] = 500 nM, [DNAzyme] = 750 nM. (b) マルチプルターンオーバー条件, [Sub 2] = 500 nM, [DNAzyme] = 16.7 nM.

次に MTO 条件下、温度を変えて共重合体の効果を検討した。その結果、共重合体の存否に関わらず温度の上昇に伴い反応性が向上した。しかし、共重合体存在下では、0 次で反応が進行し、律速段階が、ターンオーバー過程から切断過程(k_2)に移行していることが示唆された。したがって、k_2 を上げることでより触媒活性を向上できることが考えられる。そこで、2 価カチオンを Mg^{2+}からより活性の高い Mn^{2+}変えて共重合体の効果を検討した。その結果、結果的に Mn^{2+}による切断活性が共重合体により 10 倍高められる事がわかった。共重合体が E と S のハイブリッド形成速度を高め、触媒活性を向上していると考えられる。以上、共重合体は、ターンオーバー過程を促し、DNAzyme 活性を向上できることがわかった。

1)　S. W. Santoro and G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 1997, **94**, 4262–4266

Evaluation and regulation of cellular functions through in-situ nucleic acid imaging

Atsushi Maruyama
Arihiro Kano, Naohiko Shimada
Institute for Materials Chemistryand Engineering, Kyushu University, Japan

DNAzymes having RNase activity can cleave a phosphodiester linkage in the complementary RNA substrate with the help of divalent metal ion. The DNAzymes have been studied to regulate gene expression and detect genetic materials. Increase in enzyme activity, especially turn-over efficacy is, however, required for these applications. Slow dissociation of product from DNAzyme and slow association of substrate to DNAzyme seemingly limited multi-turnover reaction rate. We have shown that the cationic comb-type copolymer, poly-(L-Lysine)-*g*-Dex increases stability of DNA hybrid by accelerating hybridization rate. Moreover, the copolymer activates strand exchange reaction between DNA hybrid and its homologous single stranded DNA. Thus, we hypothesized that the copolymer could increase DNAzyme activity by increasing turn-over efficiency.

DNAzyme reactions carried out with 0.4 mM $MgCl_2$ at 25ºC and substrate/DNAzyme ratio = 30 in the absence or presence of PLL-*g*-Dex were traced by gel electrophoresis. In the presence of PLL-*g*-Dex, faster substrate degradation was observed. The copolymer accelerated the reaction about 3 times. The effect of PLL-*g*-Dex on the DNAzyme reaction was further explored under higher $MgCl_2$ concentration at various temperatures by fluorescent assay using the substrate labeled with a set of fluorophore/quencher molecules. While the acceleration effect of the copolymer was observed at lower temperature, it was reduced at higher temperature, > 40ºC. We considered that the decreased effect of the PLL-*g*-Dex at higher temperature was due to change in rate-limiting step in the DNAzyme reaction. At the lower temperature the rate-limiting step is formation of enzyme-substrate (ES) complexes. The copolymer promoted formation of ES complexes by facilitating the strand exchange between enzyme-product (EP) complexes with flesh substrates. With increasing temperature the rate-limiting step shifted to cleaving reaction step because spontaneous strand exchange rate between EP and S was increased. To assess this possibility we replaced divalent cations to more active Mn^{2+} from Mg^{2+}. The reaction with Mn^{2+} is faster than that with Mg^{2+} at higher temperature. This result indicated that at temperature > 40ºC the rate-limiting step with Mg^{2+} was the cleaving step. By replacing Mg^{2+} to Mn^{2+} it was possible to keep the rate-limiting step at the ES formation step, so that the over-all reaction was facilitated by PLL-*g*-Dex. In conclusion, PLL-*g*-Dex was shown to be useful to accelerate multi-turnover DNAzyme reaction.

業績リスト

学術論文

1. Du, J., Wu, L., Shimada, N., Kano, A., and Maruyama, A. (2013) Polyelectrolyte-assisted transconformation of a stem-loop DNA, *Chem. Commun. 49*, 475-477.
2. Wada, T., Kano, A., Shimada, N., and Maruyama, A. (2012) α-amino acid pendant polymers as endosomal pH-responsive gene carriers, *Macromol. Res. 20*, 302-308.
3. Asanuma, H., Osawa, T., Kashida, H., Fujii, T., Liang, X., Niwa, K., Yoshida, Y., Shimada, N., and Maruyama, A. (2012) A polycation-chaperoned in-stem molecular beacon system, *Chem Commun (Camb) 48*, 1760-1762.

総説・解説・成書

1. Shimada, N., and Maruyama, A. (2013) Thermoresponsive Polymers with Functional Groups Selected for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *ACS Symp. Ser.*, in press.
2. 嶋田直彦, 丸山厚 (2012) *遺伝子診断チップ　先端バイオマテリアルハンドブック*.
3. 嶋田直彦, 丸山厚.(2012) 生理的条件下で作用する UCST 型高分子, *化学工業 63*, 66-70.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. A. Maruyama, Ureido-polymers exhibiting UCST phase behavior under physiological conditions, *The 6th International Workshop on Advanced Materials Science And Nanotechnology, IWAMSN2012*, Nov. 1, 2012, Ha Long, Vietnum.
2. A. Maruyama, Polymeric materials to manipulate biopolymer assemblies and functions, *International Symposium of Materials on Regenerative Medicine*, August 29-31, 2012 in Taipei, Taiwan.
3. A. Maruyama, Novel smart polymers for biological application, *1st International Symposium on Polymer Ecomaterials (PEM 2012)*, August 19-23, 2012, Changchun Institute of Applied Chemistry,China.
4. A. Maruyama, Smart Materials, Structures and Systems, Ureido-polymers Exhibiting UCST-type Phase Transition Behavior under Physiologically Relevant Conditions, *4th International Conference*, June 10-14, 2012, Montecatini Terme, Italy.
5. (発明者)　嶋田 直彦、丸山 厚(出願番号) 特願 2012-285042 (発明の名称）高温膨潤型ゲル及びそれを調製するためのポリマー(出願日) 2012 年 12 月 27 日
6. (発明者)丸山 厚、嶋田 直彦、遊佐 真一 (出願番号) 特願 2012-270368 (発明の名称）温度感応性材料及びその用途 (出願日) 2012 年 12 月 11 日
7. (発明者)丸山 厚、嶋田 直彦 (出願番号) 61/645271 (発明の名称）Agent for accelerating nucleotide chain exchange reaction (出願日) 2012 年 5 月 10 日

がんリンパ行性転移の分子機構に解明基づく新治療法創発

研究代表者：東北大学 大学院医学系研究科　権田　幸祐

1. 研究の概要

本研究班の目標を達成するには、がん組織の検出法と診断法の開発が鍵となる。本年度は、「X 線 CT を用いた高感度ながん組織検出法開発」と「蛍光ナノ粒子を用いた高精度ながん組織診断法開発」に関して成果が得られた。がん検出では X 線 CT イメージング用造影剤として、金を材料として独自のナノ粒子を開発した。この金ナノ粒子は良好な血液滞留性を保持しているため、EPR(Enhanced permeation and retention)効果によって十分にがん組織に取り込まれ、結果として数 mm 以下の微小ながん組織の可視化に成功した。またがん診断では、診断用プローブとして、有機系材料を使った蛍光ナノ粒子を開発した。この粒子は市販の量子ドットの 10 倍の明るさを持っているため、高い S/N 比でがん化関連因子の発現量を定量化することに成功した。

2. 研究の背景と目的

国内死因の第１位はがんであり、年間35万人以上が亡くなっている。本研究班では、効果的ながん治療法の開発を行うために、研究成果の最終的な出口として、がんリンパ行性転移メカニズムの解明とこれに基づく新治療法の創発を目指している。本目標を達成するためには、分子レベルのイメージング法の開発が重要である。優れたイメージング法は、本研究領域が掲げる「特殊な細胞環境における分子反応を定量的に理解・考察するために、分子反応パラメーターを導出する」という目標に対し、大きな貢献ができると考えている。がん治療には、高感度でがんを検出し、摘出がん組織を的確に病理診断することが必須である。我々はナノ粒子を用いた高感度・高精度なイメージング法を開発し、がん検出からがん組織診断まで応用展開を図っている。

がん検出法の開発では、X線CTイメージングによる微小がん検出を試みた。X線CTイメージングは、CT造影剤の量とX線吸収係数が比例関係にあるため、生体深部のがん組織情報を定量的に解析するのに有効な方法の1つである。一方、がんの病理診断では、乳がんの増殖関連因子estrogen receptor(ER)の発現量を、蛍光粒子を用いた免疫染色法で高精度で解析する方法の開発を試みた。ERは、乳がんにおいて、progesterone receptorやhuman epidermal growth factor receptor 2と並び病理診断の標準的診断に用いられるマーカーである。ERは核内ホルモンファミリーであり、estrogenによって活性化された後、DNAに結合し、様々な増殖関連因子の転写を制御する。乳がんでは70%の患者がER陽性であり、ER陽性患者はaromatase阻害剤(aromatase: estrogen合成酵素)や抗estrogen剤であるtamoxifenの適応対象となる。

3. 成果

【X線CTを用いた高感度ながん組織検出法開発】我々はCT造影剤の材料として金に注目し、一定の大きさの金ナノ粒子を液相還元法により作製した後、EPR効果を利用し、マウスがん組織の*in vivo*イメージングを試みた。金は一般的に使用されているヨード造影剤と比較し、高いX線吸収能を持つことから高感度CT造影剤として期待できる。作製した金ナノ粒子の表層をPEG鎖でコーティングした後(金/PEGナノ粒子)、ナノ粒子を担がんマウスに静脈注入したところ、金/PEGナノ粒子は注入してから24時間後において、注入直後の血液滞留粒子の内50%が、血液中への滞留性を維持していた。血液滞留性の向上に伴いEPR効果が強化され、結果として微小がん組織を効果的にイメージングすることに成功した。また金/PEGナノ粒子を注入したがん組織の超薄切片の透過電子顕微鏡観察を行った結果、ナノ粒子が腫瘍血管の血管内皮細胞の間隙部分に存在している様子や間質に存在するマクロファージに取り込まれている様子を捉えることに成功した。今後、造影剤の分子標的性の機能強化を行うことにより、がん検出感度のさらなる向上に加え、がんの生体内分子メカニズムの解明が進むと期待される。

【蛍光ナノ粒子を用いた高精度ながん組織診断法開発】従来の病理組織の免疫染色は、組織切片上の標的抗原に対し、1次抗体や2次抗体を反応させ、その後、酵素反応によって組織の色素染色が行われていた。しかし、酵素反応は温度、時間、基質量に大きく左右されるため、発色強度に関して高い定量性を望むことが難しかった。一方、蛍光を用いた免疫染色法では、蛍光物質の発光強度は、励起光の出力に比例するため、定量性を向上させることができる。しかし、組織には自家蛍光物質が大量に存在する。このことは、蛍光物質由来の陽性シグナルの検出を困難にさせ、蛍光免疫染色の発展の阻害となっていた。我々はこの自家蛍光を回避し、高いS/N比で標的抗原量を定量化するため、免疫染色用に高輝度蛍光ナノ粒子の開発を行った。蛍光物質であるテトラメチルローダミンを大量に高充填化したナノ粒子を作製し、表層をシリカコーティングした。さらに、組織への非特異性を抑制するため、シリカコートナノ粒子の表層にPEG鎖を担持した後、ビオチン結合2次抗体との反応用としてPEG鎖にアビジンを結合させた。作製した粒子の粒径は約110nmであり、蛍光輝度は市販量子ドットの約10倍であった。この粒子を用いて、ヒト乳がん組織中に存在するERの免疫組織染色を行った結果、従来の酵素を使った色素染色では検出できなかった低レベルのER発現から高レベルの発現まで、自家蛍光の影響を受けることなく、幅広いレンジでERの局在量を定量化することに成功した。またER以外に、がん転移活性化因子PAR1にも注目し、これに対する独自抗体と蛍光ナノ粒子を用いて、がん診断技術開発の取り組みを始めている(A01 樋口班との共同研究)。我々の高精度蛍光イメージングを用いた乳がん組織診断は、従来の色素を用いた組織染色法に比べ、がん関連因子発現量の定量的評価レベルが格段に向上しているため、術後の予後診断や抗がん剤奏効性診断を高確度で行うことに役立つと期待される。

Clarification of molecular mechanism of lymphatic metastasis and development of new therapy for cancer metastasis

Kohsuke Gonda
Department of Nano-Medical Science, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan

To clarify molecular mechanism of lymphatic metastasis and apply the mechanism to development of new therapy for cancer metastasis, technologies for an early detection of cancer site and an accurate pathological examination of cancer tissues are very important. In this year, our group developed two technologies. One is X-ray computed tomography (CT) with gold (Au) nanoparticles for cancer detection and another is fluorescence imaging of immunohistochemical test for cancer pathological examination.

CT is commonly used to make a diagnosis in hospital. Contrast agents are often used to enhance contrast and thus improve diagnostic accuracy. Currently-used clinical contrast agents are low molecule. The agents circulate in the bloodstream and before being excreted from the kidney, move to extravascular tissue through the capillary vessel depending on their concentration gradient. Thus there is a situation that the agents nonspecifically enhance the tissue. To image tumor specifically with CT, we here developed a new contrast agent. Recently enhanced permeability and retention effect (EPR effect) draw attention in the fields of imaging and DDS of cancer. EPR effect is a characteristic phenomenon of tumor tissue. The endothelial cells of the vessel in tumor are irregular in shape and lacunal. As the result, properly-sized (10-200 nm) nanoparticle can pass through the vessel wall in tumor and be retained in cancer tissues while not through the most of vessel in normal tissue. To perform CT imaging of tumor using EPR effect, we made Au nanoparticle smaller than 50 nm in size . Au has higher X-ray absorption coefficient than iodine which is a normally-used clinical contrast agent. As high blood retention is desirable for effective EPR effect, polyethylene glycol (PEG)-supported Au nanoparticles (Au/PEG) were prepared. The surface modification with PEG is often used to increase the blood retention. We injected the Au-PEG nanoparticles into the tumor-bearing mice and the distribution of Au/PEG was examined with CT and TEM images, showing that the Au/PEG were well-localized to tumor by EPR effect and very small size tumor was imaged finely with the Au/PEG.

In breast cancer, the estrogen receptor (ER), progesterone receptor and human epidermal growth factor 2 were the first biomarkers to be recommended for routine clinical use. ER is a member of the nuclear hormone family of intracellular receptors, and it plays a critical role in cancer growth. Approximately 70% of breast cancer cases are ER-positive. Estrogen activates the ER, which binds to DNA and regulates the activity of many different cellular proliferation genes. Pathological examination with immunohistochemistry (IHC) using 3.3'-diaminobenzidine (DAB) is the gold standard for cancer diagnosis. IHC using DAB is a poor quantitative method because horseradish peroxidase (HRP) activity depends on reaction time, temperature and substrate concentration. However, IHC using fluorescent material provides an effective method to quantitatively use IHC because the signal intensity is proportional to the intensity of the photon excitation energy. However, the high level of autofluorescence has impeded the development of quantitative IHC using fluorescence. We developed organic fluorescent material-assembled nanoparticles for IHC and applied the nanoparticles to IHC targeting ER. The fluorescent intensity of our novel nanoparticles was 10-fold greater than quantum dots. Therefore, the fluorescent intensity of our nanoparticles significantly exceeded autofluorescence, which produced a significantly higher signal-to-noise ratio on IHC-imaged cancer tissues than previous methods. This enhancement in the diagnostic accuracy and sensitivity for ERs using our immunostaining method will improve the prediction of responses to therapies.

業績リスト

学術論文

1. Kobayashi Y, Inose H, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of Au–silica core–shell particles by sol–gel process. *Surface Engineering* **28**, 129-133 (2012)
2. Kobayashi Y, Minato M, Ihara K, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N, Kasuya A. Synthesis of high concentration colloid solution of silica-coated AgI nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **12**, 6741-6745 (2012).
3. Ma Q, Nakane Y, Mori Y, Hasegawa M, Yoshioka Y, Watanabe TM, Gonda K, Ohuchi N, Jin T. Multilayered, core/shell nanoprobes based on magnetic ferric oxide particles and quantum dots for multimodality imaging of breast cancer tumors. *Biomaterials* **33**, 8486-8494 (2012).
4. Gonda K, Miyashita M, Watanabe M, Takahashi Y, Goda H, Okada H, Nakano Y, Tada H, Amari M, Ohuchi N. Development of a quantitative diagnostic method of estrogen receptor expression levels by immunohistochemistry using organic fluorescent material-assembled nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **426**, 409-414 (2012).
5. Sakurai Y, Tada H, Gonda K, Takeda M, Cong L, Amari M, Kobayashi Y, Watanabe M, Ishida T, Ohuchi N. Development of silica-coated silver iodide nanoparticles and their biodistribution. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* **228**,317-323 (2012).
6. Kobayashi Y, Ayame T, Nakagawa K, Gonda K, Ohuchi N. X-ray imaging technique using colloid solution of AgI/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticles. *Materials Focus* **1**, 127-130 (2012).

総説・解説・成書

1. 樋口秀男、権田幸祐　「量子ドットを用いたがん細胞の単一分子イメージング」 先端バイオマテリアルハンドブック 第 4 章 14 節（NTS 出版）478-481（2012 年）
2. 中川智彦、権田幸祐、亀井尚、叢莉蔓、久保田洋介、大内憲明 「金ナノ粒子を用いた CT イメージング」 ナノ学会会報　第 11 巻第 1 号 27-30（2012 年）
3. 多田寛、権田幸祐、大内憲明 「がんの *in vivo* 1 分子イメージング」 ここまで進んだバイオセンシング・イメージング Part II 研究最前線 18 章（化学同人）166-171（2012）

招待講演

1. Gonda K, Tada H, Amari M, Ohuchi N. Nano-bio imaging of disease mechanisms with fluorescent nano-particles. 2012 Northeastern Asian Symposium. September 19-21, Sendai.
2. 権田幸祐、中野寧、大内憲明「高精度蛍光ナノイメージングで拓くがん医学・医療研究の新展開」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 ″S12 バイオマテリアルとイメージング”2012 年 11 月 27 日　仙台国際センター
3. Gonda K, Nakagawa T, Tada H, Amari M, Nakano Y, Ohuchi N. Development of imaging technology for advanced cancer diagnosis. 6th International Symposium on Nanomedicine. November 29-December 1, 2012, Matsue.
4. 権田幸祐 「ナノ粒子を用いた高精度イメージングで拓くがん医学・医療研究の新展開」第 14 回 がん医療基盤科学技術研究センターセミナー 2013 年 3 月 6 日 東京理科大学

悪性脳腫瘍の抗がん剤耐性分子を標的とする核酸医薬を convection-enhance delivery システムと先駆的ロボティック手術を導入した統合的ナノテク先端医療の実用化

研究代表者：名古屋大学大学院医学系研究科　夏目敦至
分担研究者：名古屋大学大学院医学系研究科　　千賀　威

1. 研究の概要

悪性脳腫瘍に用いられる化学療法の感受性耐性に関与する O^6-methylguanine DNA-methyltransferase （MGMT）を分子標的とし、siRNA をリポソームをキャリアとし、convection-enhanced delivery と手術ロボットを用いて、高精度かつ高効率に送達する世界初の臨床応用を実施すべく準備中である。

2. 研究の背景と目的

悪性脳腫瘍において治療予後因子となっている代表的なものには、O^6-methylguanine DNA-methyltransferase （MGMT）がある。標準治療薬であるアルキル化抗がん剤の効果を減弱し、その発現は予後不良因子となっており（NEJM, 2005)、治療成績向上の為の主たる標的分子として注目されている。

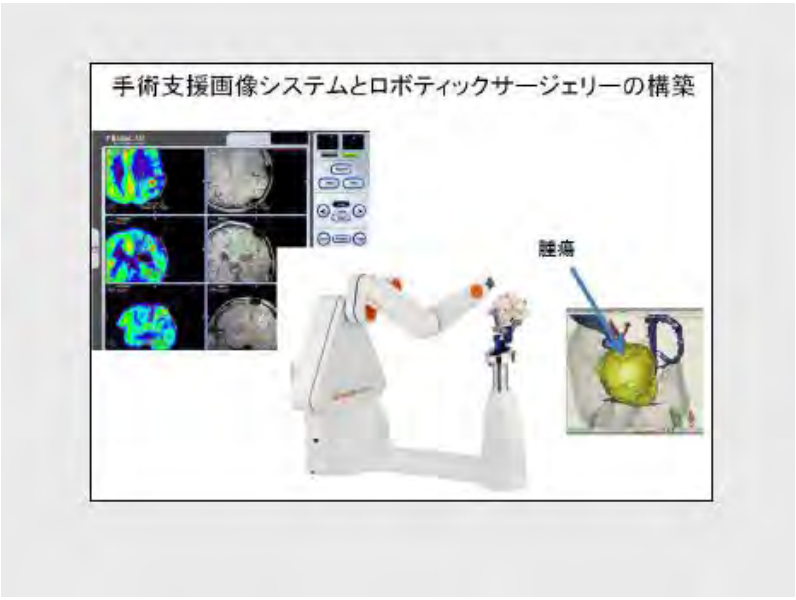
我々はドラッグデリバリーシステムとしてLipoTrust™に、MGMTmRNAに対するsmall interference RNA（siRNA)を包埋し、流体力学を応用した送達方法で悪性脳腫瘍内に投与すると、アルキル化抗がん剤の効果を相乗的に増強し、また、脳腫瘍幹細胞に対しても有効であることを報告した(Kato, et al. Gene Therapy, 2010)。この LipoTrust は生体内でも効率よく siRNA を導入することができ、2009 年の Nature Review Drug Discovery に紹介されており、しかも GMP に準拠した製造が可能である。本研究では、LipoTrust 包埋 siRNA を本学バイオマテリアルセンターの産学連携ユニットにおいて GMP 準拠で製造し、実用化することを目的とする。siRNA を用いた核酸治療臨床応用は本邦でも例がなく、実現すれば国内初となり、本学で国内初に実施された脳腫瘍遺伝子治療を基盤とした、次世代型の新しい核酸医療の試金石になりうる。

また、流体力学を用いた送達方法はconvection-enhanced delivery(CED)と呼ばれ、高精度の定位技術を必要とし、薬剤分布を術中MRIでリアルタイムにモニターすることが可能である。高精度の定位的手術技術に関しては、ロボティック手術技術開発を進めている。本手法で、当院脳神経外科手術室にある既存のopen MRIシステムと統合させ、ソフト開発や周辺機器の開発を推進し、ナノテクノロジーによる革新的なドラッグデリバリーを目指す。すでに、ラットを用いたGLPレベルでの前臨床試験が終了し、ロボッ

トと CED を統合させて、ブタを用いて投与量と投与速度の適正化を行い、来年度中に、臨床試験へ発展させることを目的とする。

3. 成果

悪性脳腫瘍における O^6-methylguanine DNA-methyltransferase （MGMT）は化学療法の効果抵抗に大きく関与し、標的分子になっている。我々は、MGMT に対する siRNA によって MGMT 発現を脳腫瘍局所で抑制すると、顕著に抗がん剤の効果が増強され、マウス脳腫瘍モデルでの生存期間を延長できることを報告した。これを臨床応用すべく、A. 前臨床安全性試験、B. 画像統合システムの構築と薬剤デリバリーカニューレの最適化、C. 手術ロボットの最適化の３つを並行し実施している。ラットを用いた前臨床安全性試験を行い、組織学的なデータ、血液学的データともに有害事象は認めなかった。siRNA によって惹起されることが危惧されたインターフェロン応答は検出されなかった。siRNA により　発現低下する MGMT を非侵襲的に可視化する PET トレーサの開発をしている。ブタを使用し、ラットで安全性の確認された薬剤を造影剤と混合し、デリバリーカニューレと手術ロボットを用いて、薬剤の安全性とデリバリー速度の最適化を検討してきた。手術ロボット（NeuroMate）が名古屋大学に導入され、ロボットの安全性を確かめるべく、パーキンソン病に対する深部脳刺激術でアジア初の NeuroMate を用いた臨床研究を行っている。以上より、新しい核酸医療の臨床応用を脳腫瘍において本邦初で行う準備が整いつつある。



Convection-enhanced delivery of siRNA for the drug-resistant gene, O^6-methylguanine-DNA methyltransferase to Glioblastoma multiforme

Atsushi Natsume
Takeshi Senga*
Department of Neurosurgery, Nagoya University, Japan
** Division of Cancer Biology, Nagoya University, Japan*

Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most frequently occurring tumors in the central nervous system and the most malignant tumor among gliomas. Despite aggressive treatment including surgery, adjuvant TMZ-based chemotherapy, and radiotherapy, GBM still has a dismal prognosis: the median survival is 14.6 months from diagnosis. To date, many studies report several determinants of resistance to this aggressive therapy: (1) O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), and (2) the blood–brain barrier. The blood–brain barrier blocks most molecules that are larger than ~500 Da. Many drugs are denied access to the very regions where they would be effective, thus limiting the clinical application of most anticancer drugs for treating brain tumors. Each anticancer agent showed various permeability for BBB, although the relationship of its permeability to therapeutic efficacy is not clear. Although several local therapies are attempted to overcome this BBB or 'blood-tumor barrier', local therapies should be more developed to deliver therapeutic agents in more distant locations due to highly infiltrative nature of high-grade gliomas. A direct intracerebral approach called convection-enhanced delivery (CED) may be used as a strategy to address these issues. CED employs positive pressure that generates a local pressure gradient to distribute agents in the extracellular space. Unlike diffusion delivery, CED is not significantly affected by the concentration, molecular weight, or particle size of the agent. Furthermore, CED ensures high concentrations and the homogenous distribution of a drug throughout a given target tissue. Here we would like to present our preclinical studies to develop a novel CED-based siRNA delivery for GBM.

業績リスト

学術論文

1. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Kondo Y: Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 protein suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. J Biol Chem 2012, 287(33):27396-27406.
2. Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, Takeuchi I, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Saito K, Ando H, Ohka F et al: Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. Carcinogenesis 2012, 33(2):436-441.
3. Natsume A, Kato T, Kinjo S, Enomoto A, Toda H, Shimato S, Ohka F, Motomura K, Kondo Y, Miyata T et al: Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. Oncogene 2012, 31(22):2715-2724.
4. Hyodo T, Ito S, Hasegawa H, Asano E, Maeda M, Urano T, Takahashi, M, Hamaguchi M, Senga T. Misshapen-like kinase 1 (MINK1) is a novel component of striatin interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) and is required for the completion of cytokinesis. J Biol Chem. 2012, 287(30):25019-29.
5. Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Yoshikawa N, Hyodo T, Asano E, Hasegawa H, Maeda M, Shibata K, Hamaguchi M, Kikkawa F, Senga T. ALX1 induces Snail expression to promote epithelial to mesenchymal transition and invasion of ovarian cancer cells. Cancer Research 2013, 73(5):1581-90.

総説・解説・成書

1. Ohno M, Natsume A, Wakabayashi T: Cytokine therapy. Adv Exp Med Biol 2012, 746:86-94.
2. Ohka F, Natsume A, Wakabayashi T: Current trends in targeted therapies for glioblastoma multiforme. Neurol Res Int 2012, 2012:878425.
3. Kishida Y, Natsume A, Toda H, Toi Y, Motomura K, Koyama H, Matsuda K, Nakayama O, Sato M, Suzuki M et al: Correlation between quantified promoter methylation and enzymatic activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastomas. Tumour Biol 2012, 33(2):373-381.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 夏目敦至；日本脳腫瘍病理学会賞受賞　2012 年 5 月 24 日
2. 夏目敦至：日本脳腫瘍学会星野賞受賞　2012 年 11 月 24 日
3. 夏目敦至：大阪脳腫瘍学術講演会　2013 年 2 月 15 日
4. 夏目敦至：癌と代謝シンポジウム　2013 年 1 月 17 日
5. 夏目敦至：19th International Symposium of Brain Tumor Research and Therapy 2012 年 6 月 22 日

多点の弱い相互作用を利用した分子／細胞の制御

研究代表者：京都大学再生医科学研究所　岩田　博夫
分担研究者：京都大学再生医科学研究所　北村　成史
分担研究者：名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター　岡本　行広

1. 研究の概要

当研究グループは昨年に引き続き、細胞に障害を与えずに細胞表面の修飾を行う方法、さらに、その方法を用いて細胞を２次元、３次元と自由自在に配列する方法の研究を行ってきた。この手法によって再生医療の研究の基礎となる細胞アレイや複雑な組織の構築を行うことが可能になる。再生医療の多くの局面で必要となる手法を提供できると考える。

2. 研究の背景と目的

生体内では二次結合、すなわち弱い結合を通じて分子がダイナミックに相互作用している。DNA の二重らせん、抗原・抗体反応、レセプター・リガンド相互作用、酵素・基質相互作用、細胞・細胞間相互作用、高次形態形成等々、生命活動の多くの局面で、二次結合は一つ一つの相互作用は弱いがそれが共同することで極めて特異的で多様性を持った強い相互作用を行うことができるばかりでなく、ダイナミックに相互作用の on-off を行っている。生命活動の本質は“弱い相互作用の協同性”に潜んでいるといっても過言ではないと考えている。本研究では、申請者が再生医科学研究所に所属していることもあり、細胞レベルのダイナミックスに着目する。初期の細胞集合体を形成させた後、細胞は予想外の速さでこの集合体の中でダイナミックに相互の位置を変えている。個体発生時、組織の再生時、がん細胞の転移という具合に生物のほとんどの局面でこの細胞のダイナミックな動きに遭遇する。この過程の研究法を確立するとともに、この過程に関与する分子を明らかにし、相互作用定数を決め、数理モデルを構築してそのダイナミックな過程の理解を進める。応用面では、再生医療への展開、また、iPS 細胞から誘導した機能細胞、その集合体である機能組織体の薬物スクリーニングへの供給が可能になる。本研究は、まさにナノスケールの分子間相互作用から再生医療（メディシン）に向かうナノメディシンの研究である。

3. 成果

当研究グループは、再生医療への応用を目的として、異なる細胞を三次元的に配列させて新たな組織を作るための細胞表面の修飾を行う試みを行ってきた。

細胞表面の修飾方法としては、一般に①イオン間相互作用；負に帯電している細胞膜とカチオン性高分子とのイオンコンプレックス形成、②疎水性相互作用；細胞膜の脂質二重膜と長いアルキル鎖の疎水性相互作用、③共有結合；膜タンパクのアミノ基と活性エステルとの反応の３つの方法が用いられている。①と③の方法は細胞への障害が大きく、修飾後の細胞の生存率は決して高くない。本研究では②の方法を採用した。具体的には両親媒性のポリエチレングリコールとリン脂質の複合体（PEG 脂質）を用いて行った。疎水部であるリン脂質のアルキル鎖が自発的に細胞膜の脂質二重膜に導入され、親水部分は細胞表面に残る。親水部分に他の官能基を導入しておくことで、他の機能性分子を細胞表面に導入できる。この手法では細胞に与える影響は極めて小さく、修飾後の細胞の生存率は高い。

PEG 脂質の末端に ssDNA を結合した ssDNA-PEG 脂質が細胞―基板間の接着や細胞同士の接着に有効であることはすでに報告してきたが、同様の手法を用いて薬剤を内包したリポソームや、ナノメートルサイズの微粒子などを細胞表面に導入する研究も行った。それらの研究のうち、有効な結果を得たものを以下に紹介する。

虚血状態からの再灌流時の酸化ストレスによる血管内皮細胞の破壊を軽減する目的で、ビタミン E を内包したリポソームに ssDNA-PEG 脂質を作用させ、DNA ハイブリダイゼーションで血管内皮細胞表面にリポソームを固定した。蛍光色素を導入したリポソームを用いた顕微鏡観察から、細胞表面に固定化されたリポソームが数時間の間に細胞内に取り込まれていく様子が確認できた。また、アンチマイシン A を用いた酸化ストレス実験を行ったところ、ビタミン E 含有リポソームを固定化した血管内皮細胞では、コントロールに比較して活性酸素種の発生を抑制することが可能となった。

MRI を用いて移植膵島の正着状況を直接観測することを目的とし、酸化鉄ナノ粒子（SPIO）で膵島をラベリングする方法を開発した。ssDNA で表面修飾した SPIO を作製し、表面に ssDNA-PEG 脂質を作用させた膵島の表面に DNA ハイブリダイゼーションを利用して固定化した。得られた SPIO 標識膵島をアガロースゲル中に固定化し、MRI の T_2 強調画像で観察したところ、膵島を黒抜きの影として検出することが可能であったことから、本手法を用いることで効果的なラベリングが可能であることがわかった。また、TEM 観察の結果から、SPIO が細胞表面に固定化されたのち、エンドソームに取り込まれる形で細胞内に蓄えられる過程が明らかになった。

また、細胞アッセイおよび細胞３次元化前の２次元での細胞非侵襲回収を目指して、ナノサイズのカーボン基板を作製した。このカーボン基板上にて細胞培養を実施した結果、カーボン材料の間隔および親水疎水の違いにより細胞増殖の挙動が異なることを見出し、特に超撥水表面では、細胞の低侵襲回収に成功した。

Three Dimensional Tissue Regeneration Through Multipoint Molecular Weak Association

Hiroo Iwata[1]
Narufumi Kitamura[1], Yukihiro Okamoto[2]
[1]*Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University*
[2]*FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice, Nagoya University*

We have reported that single stranded DNA-poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates (ssDNA-PEG-lipids) can be easily modified on the cell surface. The ssDNA which is presented on the cell surface can be used as an adhesive to immobilize functional molecules, materials and various cells on the cell surfaces.

Ischemia-reperfusion damage is a problem to be overcome in organ transplantation. Reactive oxygen species (ROS) are produced in cells by blood-mediated reactions at the time of blood reperfusion. We used the ssDNA-PEG-lipid to immobilize and internalize antioxidant vitamin E-loaded liposomes to endothelial cells. The liposome containing vitamin E and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were modified with poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates carrying 20-mer of deoxyadenylic acid (oligo$(dA)_{20}$) and 20-mer of complementary thymidylic acid (oligo$(dT)_{20}$), respectively. The liposomes were effectively immobilized on HUVECs through DNA hybridization between oligo$(dA)_{20}$ and oligo$(dT)_{20}$. The liposomes containing vitamin E were gradually internalized into HUVECs. Amount of reactive oxygen species which was produced in HUVECs by antimycin A treatment was greatly reduced in HUVECs carrying liposome containing vitamin E.

For direct monitoring of transplanted islet in real time by MRI, SPIOs modified with oligo$(dA)_{20}$-SH were synthesized through the reaction between maleic acid and thiol for labeling onto islet cells. The oligo$(dA)_{20}$-modified SPIOs could be anchored on the surface of oligo$(dT)_{20}$-modified islets via DNA hybridization. We investigated the hypointensity of SPIO-labeled islets on T_2-weighted MR image. Non-labeled islets were not detected, whereas SPIO-labeled islets could be detected as dark spots at the corresponding position to stereo microscopy.

In addition to these results, we also attempted to fabricate three dimensional carbon nano-structures for less invasive cell collection and cell assay. By varying the space between carbon structures and wettability, we found the cell behavior become different. Especially, with super-hydrophobic carbon nanostrucutres, we could collect cells in less invasive manner.

業績リスト

学術論文

1. "Immobilization of Sertoli cells on Islets of Langerhans."
   Takemoto, N.; Teramura, Y.; Iwata, H. *Biomater. Sci.*in press.
2. "Long term culture of cells patterned on glass via membrane-tethered oligonucleotides."
   Sakurai, K.; Hoffecker, I. T.; Iwata, H.*Biomaterials***2013**,*34(2)*, 361-370.
3. "Effect of dielectric spacer thickness on signal intensity of surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy."
   Murakami, T.; Arima, Y.; Toda, M.; Takiguchi, H.; Iwata, H.*Anal. Biochem.***2012**,*421*, 632-639.
4. “Graphene forest devices as cell scaffolds for stem cells” Yukihiro Okamoto, Hitoshi Watanabe, Kazutoshi Kubo, Hiroki Kondo, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Masaru Hori, Yoshinobu Baba Micro Total analysis Systems, 2012, 1632-1635.

総説・解説・成書

1. "生細胞への低分子薬剤の担持とその移植医療への応用."
   岩田博夫; 陳顥; 出野翔; 竹本直紘; 寺村裕治 *日本化学繊維研究所講演集* **2012**,*69*, 120-129.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

公募

細胞内動態を応用した新規 DDS ナノキャリアーの検討

研究代表者：慶應義塾大学医学部　　板野　理

1. 研究の概要

ナノ粒子キャリアーの薬物細胞内動態の違いを利用した効果の高い医工融合型 DDS 製剤の開発を目指すため、Poly(MPC-*co*-BMA)(PMB)や Poly(MPC-*co*-BMA-MEONP)(PMBN)等の生体適合性高分子両親媒性ポリマーをナノキャリアーとして用いた。これらの拡散、エンドサイトーシス等、細胞への取り込み機序の違うポリマーを用い、作用機序の違う薬剤の取り込み法による薬効の違いを薬剤が作用するフィールドまで踏み込んで細胞レベルで解明し、最適なデリバリー法の検討を行い、さらに動物モデルを用いてその効果の検証を行った。

2. 研究の背景と目的

最近の高分子化学や工学的研究の進歩により、種々のナノサイズ粒子の作製と特性が明らかになり、医学領域や外科疾患への応用が期待されている。拡散、エンドサイトーシス等、細胞への取り込み機序の違うポリマーを用い、作用機序の異なる薬剤の最適なデリバリー法を細胞内動態、及び生体内動態両面から検証することを目的とし、本研究を企画した。

3. 成果

【ベルテポルフィン封入ナノ粒子による光線力学療法】

光線力学療法（Photodynamic therapy, 以下 PDT）は光感受性物質とレーザー光線による光化学反応を利用した全身的または局所的治療法である。ベルテポルフィンは疎水性のポリポルフィリンオリゴマーであり、2 種類の位置異性体の混合物である。ベルテポルフィン封入ナノ粒子による光線力学療法では、PMBN 及び PMB を用いた DDS と PDT の組み合わせにより、ベルテポルフィン封入ナノ粒子の腫瘍特異性と抗腫瘍効果の検討を行った。皮下腫瘍モデルで、抗体を結合させた PMBN-ベルテポルフィンは抗原を高発現している細胞株においてのみ高い抗腫瘍効果を示した（図１）。また、近年、乳癌における腋窩リンパ節郭清(ALND)が予後の改善に

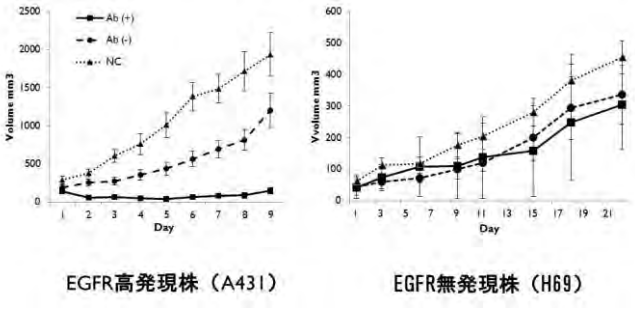


図 1

つながっているかどうかが議論されており、ALND が省略可能であれば、リンパ浮腫や上肢挙上障害などの後遺症を防ぐこともできる。そこで、ALND に代わる方法としてベルテポルフィン封入ナノ粒子のリンパ節への集積性及び PDT の有用性も検討した。

【ナノキャリアーを用いた DHMEQ の製剤作製及び抗腫瘍効果の検討】

NF-κB は多くの癌細胞では恒常的に刺激され、浸潤・転移・apoptosis 抵抗性に関わる関連遺伝子の転写・活性化が亢進されていることが明らかにされており、その阻害により効果的な癌治療が期待される。DHMEQ は強力な NFκ-B 阻害剤で、その特異性の高さや副作用の少なさから臨床応用への期待が大きい分子であるが、極度に疎水性であること、体内での半減期が短すぎることから未だ臨床応用には至っていない。PMB をナノキャリアーとして用いることで DHMEQ を効果的に細胞内にデリバリーを行い、膵癌浸潤能を抑制し、転移形成を減少させうるかを検証した。1 回投与量を 12mg/kg とした in vivo 投与試験では、PMB/DHMEQ 製剤を 2 日おきに i.v.した群が、CMC/DHMEQ 懸濁液を連日 i.p.した群より高い腫瘍増殖抑制効果を示した（図２）。

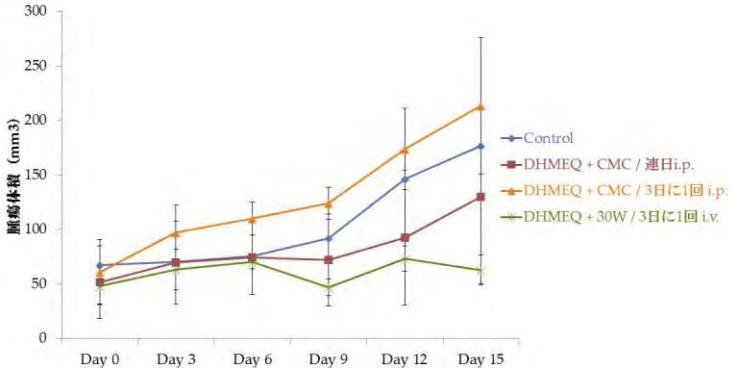


図２AsPC‐１皮下腫瘍径の推移

【まとめ】

PMB と PMBN の 2 種類の生体適合性高分子両親媒性ポリマーをナノキャリアーとして用い、作用機序の違う 2 つの薬剤：ベルテポルフィンと DHMEQ の最適なデリバリー法の検討を行い、さらに動物モデルを用いてその効果の検証を行った。まず、ベルテポルフィンには PMBN を用い、アクティブエステル基に抗体を付加することで癌への特異的 DDS としての効果があることが in vivo においても証明された。また、PMB を用いた実験系では、ベルテポルフィンを可溶化した製剤がリンパ節に滞積することを示し、PMB によるナノキャリアーが乳癌リンパ節転移等に対して有効な新規低侵襲治療となる可能性を示唆、さらに PMB をもちいることで NF-κB 阻害剤である DHMEQ の可溶化静注用製剤の作製を可能とし、ナノキャリアーによって可溶化された DHMEQ が、懸濁状態より安定性を増し、in vitro 及び in vivo においてその効果が高い可能性を示した。今後実臨床においても、癌や白血病、炎症性疾患などへの応用が可能となることが期待される。

公募

Imaging and model analysis of molecular function in cells

Osamu Itano
Sachiko Matsuda
Department of Surgery, Keio University, Japan

Poly [2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) –*co-n*- butyl methacrylate (BMA)] (PMB) and poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate -co -p-nitrophenylcarbonyloxyethyl methacrylate] (PMBN) form a stable polymer aggregate in water that can enhance the solubility of hydrophobic substance. The aim of this study is to investigate usage of PMB and PMBN as nano-carrier for verteporfin and DHMEQ, and evaluate anti-cancer effect in *in vivo* and *in vitro*.

Photodynamic therapy is a noninvasive optical treatment method in which the topical or systemic delivery of photosensitizing drugs is followed by irradiation with broadband red light. PMBN was conjugated with an anti-EGFR antibody and mixed with a photosensitizer, verteporfin (verteporfin-PMBN-antibody complex). Tumor-bearing mice were intravenously injected with the verteporfin-PMBN-antibody complex or verteporfin plus PMBN without the antibody. Irradiation was conducted at 640 nm with a dose of 75 J/cm^2. In A431 tumor-bearing mice, the intratumor concentration of verteporfin was 9.4 times higher than that of the skin, following administration of the verteporfin-PMBN-antibody complex. Tumor size significantly decreased within 8 days in mice treated with verteporfin-PMBN-antibody complex compared with those treated with verteporfin-PMBN. PDT using a PMBN-verteporfin-antibody complex offers a promising anticancer therapy.

DHMEQ is a powerful inhibitor for NF-κB which prevents its nuclear translocation. Despite of its anti-tumor effect, DHMEQ has not been used in clinical because of hydrophobic property and instability. To make the PMB-DHMEQ aggregate, DHMEQ and PMB were dissolved in dichloromethane and PBS, respectively. Then, these solutions were mixed, sonicated and evaporated. The diameter of PMB-DHMEQ and CMC-DHMEQ were measured using Zetasizer nano. The particle diameter of PMB-DHMEQ was 7-8nm. CMC-DHMEQ showed multiple peaks in size. Cell proliferation rate of AsPC-1 cells (a human pancreas adenocarcinoma cell line) was measured by WST assay. PMB-DHMEQ showed higher growth inhibition than CMC-DHMEQ. To develop liver metastases model of pancreatic cancer, .AsPC-1 cells which expressing Gaussia luciferase were injected into mice portel vein. Metastases level of each group was compared by measuring luciferase activity of mice whole liver homogenate using Renilla Luciferase Assay System form Promega. PMB-DHMEQ showed higher inhibition of development of liver metastases than control groups. PMB polymer is useful nanao-carrier for DHMEQ and our results suggested that PMB-DHMEQ can be used in clinical in the future.

公募

業績リスト

学術論文
該当なし

公募

糖鎖改変技術を利用したセルベースデバイスの設計

研究代表者：関西大学化学生命工学部　岩﨑　泰彦

1. 研究の概要

細胞膜にはあらゆる生体機能を司る糖鎖や膜タンパク質が存在しており，これらを化学的に修飾して，細胞独特の内部環境を封じ込めたカプセルの調製と膜画分を担持したポリマーマテリアルの合成を試みた．細胞膜に存在する糖鎖の最表層にメタクリロイル基を誘導し，これとチオール基をもつ合成高分子を反応させることに成功した．細胞表層に合成ポリマーの薄膜が形成されることを蛍光顕微鏡観察で確認し，また，温度応答性ポリマーを修飾した糖タンパク質を温度刺激によって回収できることも明らかにした．

2. 研究の背景と目的

近年，ES 細胞，iPS 細胞の樹立が可能になり，難病の治療や組織再生技術に細胞を積極的に利用することが進められている．その反面，細胞の機能は多岐にわたり，また，その構造が極めて複雑であるため，細胞の特殊性については未だ不明な点が多い．例えば，細胞内部はとても混み合った環境（分子クラウディング環境）であることが知られている．この環境おいて糖鎖合成に関わる酵素反応が促進されることや核酸の二重螺旋構造が安定化されることが認められている．しかし，それらの多くはアルブミンやポリエチレングリコールなどを高濃度に溶解したモデル環境で評価されたものであり，実際の細胞内部環境でこのような現象を評価できるようになると，細胞内部の特殊環境が生体物質の活性に与える影響や細胞内に存在するあらゆる物質の働きがより明確になる．

そこで，本研究では細胞膜糖鎖に誘導した重合性基を利用し，細胞表層に薄いゲル膜を形成させ，細胞の内部環境を封入したセルカプセルを調製し，このカプセルを化学反応場として利用することを試みる．また，細胞膜糖鎖に誘導した重合性基と他のビニルモノマーの共重合を試み，細胞膜成分を担持したポリマーを獲得する．細胞種特有の糖鎖を持つポリマーの分子認識特性を解析し，診断用マテリアルや薬物輸送担体としての応用を検討する．

3. 成果

糖鎖の末端にはシアル酸と呼ばれる一群の糖が存在している．このシアル酸は *N*-アセチルマンノサミン(ManNAc)を前駆体として細胞内で合成される．この機構を利用し，ManNAc のアセチル基を化学的に改変した非天然の ManNAc 誘導体を細胞培養環境に添加すると

ManNAc 誘導体由来の官能基をシアル酸に提示できる．本研究では，*N*-メタクリロイルマンノサミン(ManMA)処理により生細胞の表面に誘導したメタクリロイル基を通じて合成高分子を修飾し，細胞間相互作用を制御するとともに，細胞膜上に存在する糖タンパク質を組み込んだポリマーマテリアルの獲得を試みた．

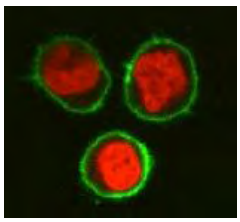


Fig. 1 LSC micrograph of ManMA-treated HL-60 cells after immobilization with PEG and Alexa Fluor 488 C5-maleimide.

ManMA を終濃度 5mM になるように添加した 10%FBS/RPMI-1640 培地中で 3.0x10^5cells/ml のヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)を3日間培養した．HL-60 細胞を無血清培地で3回洗浄した後，末端に -SH 基をもつ4分岐ポリエチレングリコール (PEG)，またはポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm)を所定濃度含む無血清培地中で再分散させた．ここに終濃度が 0.175 mg/mL になるように Irgacure2959 を添加し，紫外光(365 nm)を 10 分間照射した．再度無血清培地で3回洗浄し，以下の実験に用いた．

P-セレクチングリコプロテインリガンド-1(PSGL-1)は HL-60 の表面に恒常発現している糖タンパク質であり，P-セレクチンと特異的に結合する．この PSGL-1 と PEG や PNIPAAm との複合体形成をウエスタンブロッティングにより追跡した．また，PEG や PNIPAAm が HL-60 表面に修飾されていることを共焦点レーザー顕微鏡観察により確認した．

表面に修飾された合成ポリマーが細胞の機能におよぼす影響を明らかにするために，PEG を修飾した HL-60 については IL-1α の添加によりセレクチンを発現させた正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)への接着性について評価し，PNIPAAm を修飾した HL-60 については，温度変化にともなう細胞凝集の生起について調査した．

ウエスタンブロッティングの結果より，ManMA 処理した HL-60 と PEG-SH を反応させた場合のみ PSGL-1 の分子量増加が確認されたことから，PSGL-1 を PEG-SH で化学的に修飾できることが明らかとなった．細胞表面における PEG の局在化は Fig.1に示した共焦点レーザー顕微鏡像（緑:PEG-SH，赤:核）からもわかる．PNIPAAm においても同様な結果が認められた．

IL-1α処理した HUVEC に対する PEG 修飾した HL-60 の接着性を調べたところ，PEG を修飾することにより HL-60 の粘着は減少し，シアル酸に修飾された PEG によってリガンド／レセプター相互作用が阻害されることが認められた．しかし，HL-60 と HUVEC の結合が完全に阻止されないことから，PEG の修飾量によって，細胞間の結合を制御できると考えられる．

PNIPAAm の LCST 以下の 25℃では細胞は点在しているのに対し，37℃に昇温すると，細胞が密に凝集することが分かった．このような温度応答性は ManMA を処理していない HL-60 には認められなかった． 以上の実験結果より，ManMA 処理により細胞表面に誘導されたメタクリロイル基を介して合成ポリマーを修飾できることがわかった．本技術はシアル酸をもつ多くの細胞に応用することができ，また，原理的には-SH 基を持ついかなる分子を細胞表面に修飾することを可能にするため，生きた細胞に非天然の機能を付与することができる．すなわち，細胞を要素とした DDS 担体や医用用デバイスの構築が可能になると期待できる．

公募

Development of cell-based devices through methacryloyl groups delivered onto the carbohydrates

Yasuhiko Iwasaki
Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, Japan

Mammalian cell surfaces are covered with dense carbohydrates anchoring into the plasma membrane. The carbohydrates on the cell surface contribute to most communications between the cell and its environment. The incorporation of unnatural carbohydrates onto living cells then provides an opportunity to control cell surface recognition and binding events. Moreover, chemical modification of a variety of membrane protein connected to the carbohydrates can be also made possible. We then here proposed N-methacryloylmannosamine (ManMA) as a new precursor derivative of sialic acid.

N-Methacryloylmannosamine (ManMA) was synthesized by previously described method1). After 3 days cultivation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) cells with ManMA, the cells were rinsed three times. RPMI-1640 containing thiol-terminated 4-arm poly(ethylene glycol) ($PEG_4$10K-SH) and Irgacure 2959 was then in contact with the cells and were exposed to UV light at room temperature. $PEG_4$10K-SH immobilized on the HL-60 cells was covalently labeled in the dark with Alexa Fluor 488 C5-maleimide dissolved in the culture medium. The cell surface modification was also performed by using thiol-terminated poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm-SH) in place of $PEG_4$10K-SH. The molecular weight change of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) of PNIPAAm-immobilized HL-60 cell was confirmed with a western blotting method. The selective collection of PNIPAAm-conjugated PSGL-1 from lysate via thermal cycle treatment (4°C⇆37°C) was also performed.

The outline of the ManMA-treated cells could clearly be seen on the laser scanning confocal micrograph. However, when the cells were not treated with ManMA, no cells bordered with green fluorescence were observed. The result indicates that the methacryloyl groups were delivered to the surface of the HL-60 cells by the ManMA treatment and the functional groups participated in the thiol–ene reaction. From the blotting results of PSGL-1 in lysates of ManMA-treated and non-treated HL-60 cells after immobilization with PNIPAAm, the molecular weight increment of PSGL-1 from ManMA-treated HL-60 cells was observed, but not from non-treated HL-60 cells. Furthermore, the PNIPAAm conjugated PSGL-1 was selectively identified by collection of precipitation generated at 37°C.

公募

業績リスト

学術論文

1. Ikeuchi R, Iwasaki Y. High mineral affinity of polyphosphoester ionomer-phospholipid vesicles. *J. Biomed. Mater. Res.* A, **101A**, 318-325 (2013).

総説・解説・成書

1. Iwasaki Y, Ishihara K. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Tech. Adv. Mater.* **13**, 064101 (2012).

その他（報道，受賞，特許，主な招待講演，活動など）

1. 岩﨑泰彦　「細胞要素を組み込んだポリマーバイオマテリアルの設計」　第 78 回高分子若手研究会[関西]，2012 年 7 月.
2. 岩﨑泰彦　「生体に倣ったリン含有ポリマーバイオマテリアルの設計」　プラスチック技術者協会の定例講演会，2012 年 10 月.
3. 岩﨑泰彦　「細胞膜に倣ったポリマーバイオマテリアルの設計と応用」　第 54 回湘北地区懇話会，2012 年 11.

公募

革新的生体ナノイメージング技術による繊毛疾患の分子機構解明

研究代表者：東北大学国際高等研究教育機構　上野　裕則

1. 研究の概要

近年、真核生物の繊毛・鞭毛は、気管や精子をはじめ、ほぼすべての細胞に存在し、その異常は様々な疾患に関与する事が分かってきている。この繊毛構造はモーター蛋白質をはじめ、様々な構造物が周期的に配置されている。近年のプロテオミクス解析によって、約３００種類の繊毛・鞭毛構成蛋白質が明らかになったが、それらの分子がどのように繊毛運動を制御しているのかは分かっていない。本研究ではナノマテリアルを用いたイメージング技術により繊毛運動や繊毛流れの定量解析を行うと共に、クライオ電子線トモグラフィー法による３次元分子形態解析を行う。

2. 研究の背景と目的

真核生物の繊毛・鞭毛は、基本的に９＋２構造と呼ばれる特徴的な構造をしており、数種類の分子モーターダイニンとそのレールである微小管の滑り運動によって引き起こされる。哺乳類では気管上皮細胞、脳室上衣細胞、精子、初期発生胚のノードの他、ほとんどすべての細胞に存在しており、これら繊毛・鞭毛運動の欠失は呼吸器疾患による感染症、水頭症、不妊症などの原発性線毛機能不全症（PCD：prymary ciliary dyskinesia）と総称される疾患の原因となる。本研究課題では気管繊毛に着目して研究を行う。気管・気管支の繊毛運動は吸気中の異物を清浄化（クリアランス作用）する役割を持っており、絶えず吸気中に含まれる雑菌をトラップして体外へ放出している。しかし、繊毛構成蛋白質が正常に輸送されなくなると、繊毛運動に異常をきたし、気管内でのクリアランス作用が行われなくなる。その結果、様々なウィルスによる感染症などを引き起こす。本研究では、繊毛運動をナノメートルレベルで詳細に定量化することによって繊毛運動の運動メカニズムや複数の繊毛の同期性を考察する。また、それによってできる流れをイメージング技術により解析し、輸送効率を算出する。さらに、これら繊毛構造をクライオ電子線トモグラフィー法により詳細な 3 次元構造を解析し、運動と構造を結びつけ理解する。このようなイメージング技術を用いて、将来的には繊毛疾患の診断や治療方法の提案を目指す。

3. 成果

本研究では、気管での異物排除機構の解明に向け、大きく分けて３つの研究を行っている。以下、それらの具体的な成果について記述する。

1.　気管組織表面の繊毛運動による流体解析

繊毛運動によって、気管上皮表面にどのような流体が形成されるのかを調べるため、気管組織表面に直径１マイクロメートルの蛍光粒子を加え、それらがどのように輸送されるのかを解析した。その結果、気管表面の流体は繊毛運動の非定常な分布と運動により攪拌されながらも、ほぼすべての粒子が肺から喉の方へ輸送されていくことが分かった。また、流体の粘性による影響を調べるため、メチルセルロースを用いて粘性を人工的に増加させ、気管組織表面の蛍光粒子の輸送速度、及び繊毛運動の周波数を解析した。その結果、ある程度粘性が増加すると粒子の輸送速度は増加するが、その後は粘性の増加に伴い徐々に減少していく事が分かった。しかし、繊毛打頻度は粘性の増加に伴って減少するという結果が得られた。

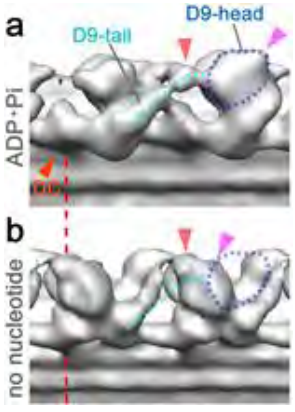
2. 繊毛運動の定量化解析

気管の繊毛細胞は１つの細胞あたり 200 本ほどの繊毛が存在しており、それらの運動によって、一定方向に流体を作り出している。本研究では、複数の繊毛の軌跡を解析し、その運動がどの程度協調して運動しているのかを、運動の位相差をとることによって解析した。実験方法は繊毛の先端に量子ドット(蛍光粒子)付加し、共焦点蛍光顕微鏡とハイスピードカメラを用いて撮影記録し、粒子の中心位置を追跡することによって、繊毛一本一本の運動を詳細に定量化した。約 8nm の空間分解能で１本繊毛運動を記録する事に成功し、気管繊毛１本の運動は振幅運動を通して非対称的であること、また、複数の繊毛間ではある程度同期して運動していることが確認された。

繊毛運動による粒子の軌跡

3. 気管繊毛の外腕ダイニンの 3 次元構造解析

分子モーター・ダイニンの重鎖は構造的に４つのサブドメインに分けられており、それぞれ、頭部、ストーク、テイル、リンカーと呼ばれている。気管繊毛内部のダイニン分子の 3 次元構造を調べるため、クライオ電子線トモグラフィー法を行い、繊毛内における外腕ダイニンの構造について、約 3.7nm の分解能で 3 次元構造を得た。気管繊毛の外腕ダイニンは DNAH5 重鎖、DNAH9 重鎖に加え、２つの電子密度（複合体 A、複合体 B)、及び微小管とダイニンを架橋するドッキングコンプレックスに相当する電子密度を確認することが出来た。次に、1mM ATP と 50mM バナジン酸を加え、ダイニンを力発生前の状態に誘導し、3 次元構造解析を行った。その結果、外腕ダイニンは ATP の有無で大きな構造変化をしており、また、2 つの頭部は異なる様式で運動している事が分かった。



外腕ダイニンの構造

公募

Nano-imaging of ciliary motion and structure with light and electron microscopy

Hironori Ueno
IAREO, Tohoku University

Mucociliary clearance on the surface of the tracheal lumen is an important component of lung defense against dust mites, viruses. Fluid on the surface of the tracheal lumen flows from the lungs to the oropharynx as a result of effective ciliary motion. However, the nano-scale kinetics of ciliary motion, axonemal structure and the mechanisms by which discretely distributed ciliary cells generate directional flow have been unknown. In this study, we examined the motion of individual cilia with 7-9 nm spatial precision by labeling the tip of each cilium with quantum dots, and detected an asymmetric beating pattern in individual cilia. Then, in order to understand the molecular mechanisms of asymmetric ciliary motion, we analyzed the axonemal structure of respiratory cilia by cryo-electron tomography and image processing. Interestingly, isolated cilia from the mouse trachea have curvature in the non-active state, and the densities of two of the eight inner dynein arms—dyneins b/g and e, which have been described in *Chlamydomonas* flagella—were missing from at least two doublet microtubules in respiratory cilia. These results suggest that the asymmetric axonemal structure contributes to asymmetric ciliary motion. Lastly, we investigated the flow field generated by the asymmetric ciliary motion of sparsely distributed ciliated cells in mouse trachea. Although the flow directions generated by individual ciliated cells were unsteady, the velocity field was found to be directional. These results indicate that mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliated cells can generate overall directional flow from the lungs to the oropharynx. Now, we are examining the 3D fluid flow on the surface of tracheal cells and the impact of the fluidic viscosity on ciliary motion. Moreover, we investigate the 3D structure of outer dynein arm of respiratory cilia in more detail which is involved in some diseases, known as the primary ciliary dyskinesia.

業績リスト

学術論文

1. **Hironori Ueno,** Takuji Ishikawa, Khanh Huy Bui, Kohsuke Gonda, Takashi Ishikawa, Yamaguchi T. Mouse respiratory cilia with the asymmetric axonemal structure on sparsely distributed ciliary cells can generate overall directional flow. Nanomedicine –Nanotechnology, Biology, and Medicine. Vol.8 No.7 Page.1081-1087, 2012
2. Tanaka Tatsuya, Ishikawa Takuji, Numayama-Tsuruta Keiko, Imai Yohsuke, **Ueno Hironori**, Matsuki Noriaki, Yamaguchi Takami. Separation of cancer cells from a red blood cell suspension using inertial force. Lab on a Chip, Vol.12, No.21, pp.4336–4343, 2012

著書

1. **Hironori Ueno**. Flow on the surface of the tracheal lumen by ciliary motion of asymmetric axonemal structures. Springer, in press, 2013.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

国際学会

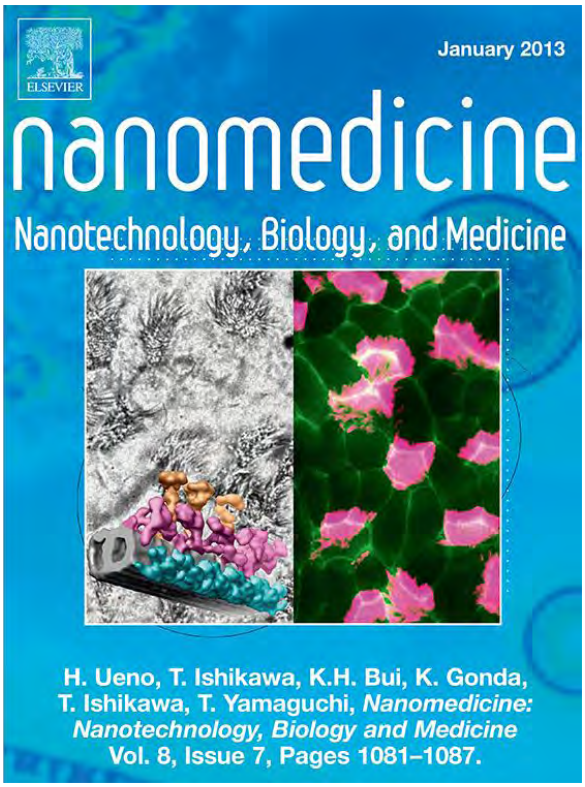
1. **Hironori Ueno**, Takuji Ishikawa, Khanh Huy Bui, Kohsuke Gonda, Takashi Ishikawa, Takami Yamaguchi. Nano-imaging of ciliary motion and structure with light and electron microscopy. Japan-Taiwan Nanomedicine Symposium. Taiwan, 2012.

国際学会（査読有）

1. **Hironori Ueno**, Takuji Ishikawa, Khanh Huy Bui, Kohsuke Gonda, Takashi Ishikawa, Takami Yamaguchi. Analysis of ciliary motion and the axonemal structure in the mouse respiratory cilia. ASME 2012 Summer Bioengineering Conference, SBC2012, USA, 2012.
2. **Hironori Ueno**, Takashi Ishikawa, Khanh Huy Bui, Takami Yamaguchi. The axonemal structure of mouse respiratory cilia. Cilia in Development and Diseases. UK, 2012.

学術雑誌の表紙

1. Nanomedicine –Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2013 年、1 月号



公募

光増感によるエンドソーム脱出の分子科学

研究代表者：岡山大学自然科学研究科　　大槻 高史

1. 研究の概要

細胞のエンドソーム内に溜まっている物質を細胞質に移行させる方法として、光増感剤と光を用いる方法が知られている。この方法において利用可能な光増感剤を、蛋白質 SH 基に結合させることのできるマレイミド基をもつ色素の中から選抜した。結果として、赤色光に応答する色素、および近赤外光に応答する色素を選び出すことができた。また、この色素に求められる性質として、疎水性溶媒中での一重項酸素生成の効率が関係していることが示唆された。

2. 研究の背景と目的

動物細胞内への物質導入法において、エンドサイトーシス経路を経由する場合、目的物質の多くがエンドソームに閉じ込められてしまう問題がしばしばおこる。この問題の解決法の１つとして、近年、光と光増感剤を用いる方法（photochemical internalization; **PCI**）が用いられている（図１）。これは(1)キャリア分子と(2)キャリア分子により運ばれる物質と(3)光増感剤とを同時に細胞培養液に加え、(2)と(3)とをエンドソーム内に蓄積させた後に、光をあててエンドソーム脱出させる方法である。このときエンドソーム膜が崩壊するのは、エンドソームに集積した光増感剤が励起光照射により活性酸素種を放出することが理由と考えられている。ただし、従来の研究では、PCI の成否に関わる光増感剤の性質として「細胞内局在」と「光増感反応」とがきちんと分けて議論されていない。また、PCI に用いられる光増感剤の性質と PCI の成否の相関を論じるには、多数の種類の光増感剤について調べる必要がある。

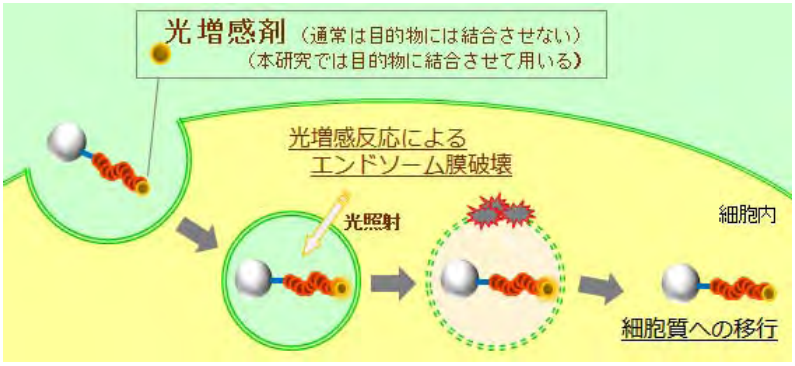


図１．PCI 法

申請者らが最近開発した**光誘導 RNA 導入法**(光照射した細胞において細胞質内に RNA を導入する方法）も PCI の一種である。ただし、キャリア分子に光増感剤を共有結合させている点は一般的な PCI とは異なる。この方法では、図２に示す**光応答 RNA キャ**

リア、すなわち、光増感剤を結合させたキャリア蛋白質を用いる(Ohtsuki et al. *J. Control. Release*, 2009)。 このキャリアおよび RNA は細胞内に入るとエンドソーム内にほぼ完全に溜まってしまうが、光刺激により、RNA はエンドソームから逃れて細胞質に拡がる。

本研究では、この光誘導 RNA 導入法をベースにして、以下に取り組んだ。

1）蛋白質 SH 基に結合させることのできるマレイミド基をもつ色素の中から、赤色光および近赤外光に応答して効率よく光誘導 RNA 導入を起こすための光増感剤を、選び出す。

2）光誘導 RNA 導入を起こすために、この光増感剤（色素）に必要な性質は何かを調べる。光誘導 RNA 導入法では、小さな光増感剤部分の「細胞内局在」は大きなキャリア蛋白質部分に支配されがちであると考えられるため、主として「光増感反応」に焦点を当てて議論することができると考えられる。

3. 成果

1）RNA キャリア蛋白質を調製し、これに様々な光増感剤候補物質を共有結合させて、RNA キャリアのバリアントを作製した。ここでは、赤色光（波長 590-645 nm）により励起できる８種類の光増感剤候補物質、および、近赤外光（740-790 nm）により励起できる１２種類の光増感剤候補物質を用いた。その結果、赤色域および近赤外域の色素の中からそれぞれ３種類ずつ有効な光増感剤を見つけることができた。

2）光増感剤候補物質を付加した RNA キャリアに対して、赤色励起光をあてたときの蛍光量子収率（Φ）、$^1O_2$ 生成量子収率（Φ_Δ）、を水溶液および疎水溶液条件のもとで測定した。また、およその熱生成に関係するパラメータ（$1-\Phi-\Phi_\Delta$）についても計算により求めた。光増感剤候補物質を付加した RNA キャリアを用い、RNA のエンドソーム内導入操作の後、光照射による RNA の細胞質内拡散（エンドソーム脱出）の度合を調べた。 これらの結果とパラメータ測定の結果とを照らし合わせて、エンドソーム脱出の度合と最も相関の高いパラメータを探し出した。結果として、エンドソーム破壊の相関が高いのは $^1O_2$ 生成量子収率であることが見いだされた（図３）。

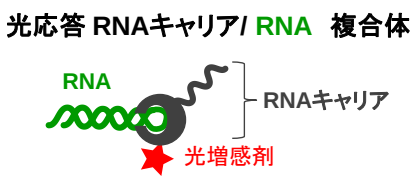


図２．光応答 RNA キャリア／RNA 複合体

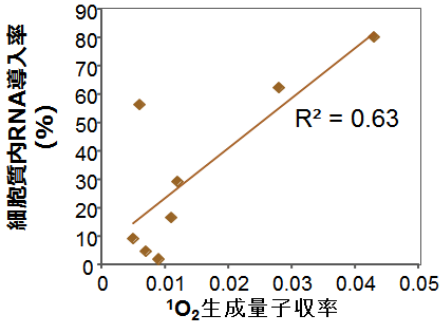


図３．$^1O_2$ 生成とエンドソーム破壊の関係

公募

Mechanism of light-dependent endosomal escape of photosensitizing molecules

Takashi Ohtsuki

Department of Biotechnology, Okayama University, Japan

In many drug delivery strategies, an inefficient transfer of macromolecules, such as proteins and nucleic acids, to the cytosol often occurs due to their endosomal entrapment. The endosomal entrapment of macromolecules limits the therapeutic use of them. One of the methods to overcome this problem is to use a photosensitizer and light for disruption of the endosomal membrane. This method is referred to as photochemical internalization (PCI). It has been considered that the endosomes are disrupted by reactive oxygen species generated photo-dependently from the photosensitizer. However, "photosensitizing reaction" and "cellular localization" of photosensitizers have not been separately discussed in the previous reports. In addition, it is necessary to compare many kinds of photosensitizers to discuss their property important for PCI. Our photo-dependent cytosolic RNA delivery method (*J. Control. Release*, 2009) is a kind of PCI. By this method, RNAs are introduced into cells by an RNA carrier bearing a photosensitizer moiety and entrapped within endosomes, and endosome disruption and cytosolic RNA dispersion is induced by light.

In this study, fluorescent dyes were screened for effective photosensitizers in the photo-dependent RNA delivery method. Here, we used eight kinds of photosensitizer candidate dyes which could be excited by red light (wavelength 590-645nm) and 12 kinds of photosensitizer candidate dyes which could be excited by near-infrared light (740-790nm). As a result, we found three kinds of effective photosensitizers for red light and three for near-infrared light.

Next, we examined the property of the photosensitizers, which are effective for the photo-dependent RNA delivery method. We measured fluorescence quantum yield (Φ), $^1O_2$ generation quantum yield (Φ_Δ) of the photosensitizers in the water solution and the hydrophobic solution conditions. The photo-dependent heat generation efficiency was approximately estimated by the parameter ($1 - \Phi - \Phi_\Delta$). It was suggested that $^1O_2$ generation quantum yield of the photosensitizer in the hydrophobic solvent was highly related to the endosomal escape efficiency.

公募

業績リスト

学術論文

1. Kitamatsu, M., Kitabatake, M., Noutoshi, Y., Ohtsuki, T., Synthesis and Properties of Peptide Dendrimers Containing Fluorescent and Branched Amino Acids. Biopolymers: Peptide Science, 100, 64-70, (2013)

総説・解説・成書

2. Matsushita-Ishiodori Y, Ohtsuki T. Photoinduced RNA interference. Acc. Chem. Res. 45(7), 1039-1047 (2012)

公募

生細胞イメージングによる内在性ｍＲＮＡ分解過程の定量解析

研究代表者：東京大学大学院薬学系研究科　岡部　弘基

1. 研究の概要

mRNA は遺伝子発現の鍵として働いており、mRNA 分解をはじめとするその活性制御は次世代創薬の重要な標的である。本研究では、mRNA を生きた単一細胞内において定量解析する方法を開発し、それを用いた細胞内の mRNA 分解過程の実時間追跡によりそのメカニズムを解明することを目的としている。まず、蛍光相関分光法（FCS）を用いて、アンチセンスプローブの拡散を定量的に検討したところ、拡散速度の違いから、プローブの解離状態および mRNA との結合状態をそれぞれ定量解析することができた。さらに、生細胞内におけるプローブの解離定数と結合比率から標的 mRNA の濃度を見積ることにも成功した。

2. 研究の背景と目的

真核生物の遺伝子発現において中心的役割を担う mRNA の一生には転写、プロセシング、輸送、局在、分解等の過程があり、複雑かつ多様な遺伝子発現を可能としている。長年の間、mRNA は核内の DNA が持つ遺伝情報を細胞質に伝える単なる介在分子であると認識されて来たが、近年 siRNA や miRNA などの小分子 RNA や非翻訳 RNA の発見により、積極的に翻訳を介して遺伝子発現を調節する機能性分子が存在することが示された。これら小分子 RNA の作用標的は細胞質 mRNA が担う翻訳や分解であり、細胞質における翻訳活性の制御によるタンパク質発現量の調節を行っている。このような細胞質を舞台とした制御はストレス応答といった細胞の多彩かつ臨機応変な応答を担う重要な機能であるだけでなく、細胞運命の操作に基づく治療法の開発において有望な標的である。しかしながら、細胞内における翻訳制御についてはそれに関与する因子同定の域を超えず、メカニズムやダイナミクスは不明である。このことから、本研究では細胞質において mRNA の発現量や振る舞いをとらえることにより、翻訳制御を理解し、細胞機能を操作する基盤技術の創成を目的とした。

3. 成果

生細胞内における mRNA の蛍光イメージング法は mRNA の機能、動態解析において強力な解析法である。一方、これまで生きた細胞に内在する mRNA の有用な蛍光標識技術は無く、生きた細胞内における内在性 mRNA イメージングはほとんど未開の領域であった。本研究では、これまでに開発した線形アンチセンスプローブを用いた生細胞内におけるネイティブな

RNA 分子のイメージング技術を応用して、mRNA の定量解析へと応用する。本 RNA 標識法の特長は、優れた認識能と任意の内在性 mRNA 配列を標的にできることである。特定の mRNA の可視化では、蛍光標識したアンチセンス 2'*O*-methyl RNA プローブを細胞内にてハイブリダイズさせ、その蛍光を蛍光顕微鏡により観察する。標的 mRNA として、転写因子 AP-1 の構成タンパク質をコードしている c-*fos* mRNA や解糖系の酵素をコードする GAPDH mRNA を選択し、これに相補的な配列の 20 塩基程度の Cy3 標識アンチセンスプローブを設計及び調製した。調製したプローブは COS7 細胞の細胞質にマイクロインジェクションにより導入し、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）や蛍光褪色後回復法などを用いて標的 mRNA との結合を確認した。なお、蛍光イメージングの結果、細胞質においてこれらの mRNA は一様に分布していた。

続いて、mRNA 発現量を詳細に解析することを目指し、生細胞内においてアンチセンスプローブで蛍光標識した mRNA を蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS）により解析した。FCS は共焦点光学系により形成されるごく小さな領域を通過する蛍光分子の発する蛍光のゆらぎを解析することにより、その拡散時間を算出できる測定系である。生きた COS7 細胞に蛍光標識アンチセンスプローブをマイクロインジェクションにより導入し、細胞に内在する mRNA とハイブリダイズさせた後に、細胞質において FCS 測定を行った。FCS 測定により得られた自己相関関数を解析したところ、アンチセンスプローブは細胞内において、異なる拡散時間を有する二成分として存在した。一方、標的 RNA とは結合することのできないコントロールプローブを導入した細胞においては、ほとんどが拡散時間の早い成分として検出された。以上の結果から、アンチセンスプローブの示す二成分の由来は、mRNA との結合型及び解離型であると考えられた。さらに、種々の濃度のアンチセンスプローブを導入して同様の実験を行ったところ、それぞれの細胞内において異なる比を有する二成分として検出された。次に、mRNA とアンチセンスプローブとの結合反応の解離定数（K_d）および個々の細胞内におけるアンチセンスプローブと mRNA との結合型・解離型濃度の比から、個々の COS7 細胞に発現している mRNA の量を見積もった。多数の細胞において同様の定量を行い、算出した mRNA 濃度をすでに確立された化学固定細胞内の mRNA の定量的解析法である一分子感度 FISH 法（smFISH）による mRNA 分子数カウントの結果と比較した。また、転写阻害による mRNA 発現量を低下させた時の標的 mRNA の濃度変化を検討した。

今回、アンチセンスプローブを用いて生きた細胞に内在する mRNA を可視化し、さらに FCS 測定によりその発現量を定量解析する方法を構築した。これにより、生きた細胞を mRNA を観察しながら、任意の場所における mRNA の発現量を見積もることが可能となった。今後はこれまで困難であった生細胞内における内在性 mRNA の追跡へと応用する予定である。

公募

Quantitative analysis of endogenous mRNA in single living cells

Kohki Okabe
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo, Japan

In eukaryotic cells mRNA plays a key role in gene regulations. However, the function of mRNA is not fully understood because direct detection of endogenous mRNAs in living cells has been difficult. Here, we developed a novel method for the observation of specific endogenous mRNA in living cells. Endogenous c-*fos* mRNA was visualized with fluorescently labeled antisense 2'*O*-methyl RNA oligonucleotides. To detect the target mRNA selectively, we utilized two antisense probes having different fluorophores. These probes are complementary to an adjacent sequence of c-*fos* mRNA and therefore fluorescence resonance energy transfer (FRET) occurs upon hybridization. Two probes were microinjected into living COS-7 cells and the fluorescence was imaged under an epi-fluorescence microscope. We observed FRET fluorescence and found that endogenous c-*fos* mRNA was diffusely distributed throughout the cytoplasm of cells.

Furthermore, the estimation of mRNA level in living cells was investugated. Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was employed to quantitatively analyze the kinetics of hybridization of antisense probe and the target mRNA. In living COS-7 cells, two fractions having different diffusion times were observed, suggesting that probes hybridized with mRNA showed slower diffusion times than those of unbound probes. Using a model for hybridization reaction and kinetic parameters such as the K_d value and the concentration ratio of bound/free probe, the concentration of endogenous mRNA in each COS-7 cell was estimated. This novel method to monitor and quantify endogenous mRNAs in single living cells will help us to elucidate the characteristics of mRNA regulations.

公募

業績リスト

学術論文

1. Uchiyama S, Kimura K, Gota C, Okabe K, Kawamoto K, Inada N, Yoshihara T, Tobita S., Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer, *Chemistry*. **18**, 9552-9563 (2012)

総説・解説・成書

なし

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 米国生物物理学会、米国物理協会　記者報道「Imaging of Temperature Distribution in a Living Cell」2013 年 2 月 1 日（関連ウェブ報道 : Sci-News（2013 年 2 月 1 日）, Science Daily（2013 年 2 月 1 日）, Science Newsline（2013 年 2 月 13 日）, Biotech Daily（2013 年 2 月 13 日））
2. 日本生物物理学会　第 8 回若手奨励賞（2012 年 9 月 23 日）
3. 日本バイオイメージング学会　2012 年度奨励賞（2012 年 8 月 27 日）
4. 岡部弘基、第 85 回日本生化学会大会「生きた細胞内の温度イメージング」、福岡市　2012 年 12 月 14 日（招待講演）
5. 岡部弘基、分子科学研究所所長招聘研究会「2020 年の光分子科学を語る」、岡崎市 2013 年 1 月 23 日（招待講演）
6. 岡部弘基、第三回 NMMS セミナー「定量的蛍光イメージングによる細胞機能解析」、東京大学、2013 年 1 月 31 日（招待講演）
7. 岡部弘基、Cell-Material Integration Symposium、京都大学、2013 年 3 月 19 日（予定）（招待講演）
8. 岡部弘基、第 90 回日本生理学会大会、東京都江戸川区、2013 年 3 月 27 日（予定）（招待講演）

公募

フォトニック DNA プロセッサを用いた核酸機能の活性化制御

研究代表者：大阪大学大学院情報科学研究科　小倉　裕介

1. 研究の概要

細胞内での生体分子の計測や制御を効率的に行うためのツールとして、分子系に入り込み、その場で分子情報を扱うことが可能な情報処理装置-フォトニック DNA プロセッサ-の構築を行った。蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を用いる DNA スキャッホルド論理において、外部光信号により演算をプログラムするための方式を考案した。その実装手法として、FRET ペアにおけるアクセプタの活性を別の蛍光分子（アクティベータ）を介して切り換えることにより、FRET 信号伝達を繰り返し制御することに成功した。また、演算系の反応速度式の解析により、出力信号の絶対強度や信号対雑音比などプロセッサの基本特性を明らかにした。

2. 研究の背景と目的

生体を構成する細胞系は、多くの物質（分子）で構成された物理システムであると同時に、分子が情報キャリアとして働く情報システムとしても捉えられる。このような細胞系を効率的に計測・制御するためには、実体としての分子と抽象的な情報を一括して扱うナノプロセッサが有効である。DNA は適切に塩基配列を設計することにより反応動作を高い精度で予測・制御することが可能であり、またさまざまな生体分子との相互作用能力を有することから、ナノプロセッサの構成材料として優れている。これまでに、分子情報を扱う論理演算や有限オートマトンが実証されている。ただし、分子系外部とのインターフェースが存在せず、細胞形態等のマイクロ、マクロスケールで得られる情報をプロセッサ動作に反映させることは難しい。一方、ナノメディシン研究領域が対象とする細胞系は階層性をもったシステムであり、その分子反応の理解に、さまざまなスケールでの情報を統合的に扱う仕組みは有用と考える。

我々は、ナノ世界（分子系）とマクロ世界の通信に光を活用したフォトニック DNA プロセッサの開発を進めてきた。光技術の活用により、時空間的な制御や適応制御、DNA 反応系の簡素化が期待される。本研究では、拡張性に優れた DNA スキャッホルド論理を基に、外部光信号により実行する演算を選択して実行可能なフォトニック DNA プロセッサを構築する。DNA スキャッホルド論理は、分子情報を入力、蛍光分子の励起／基底状態を出力とする分子論理演算法であり、足場 DNA 上への蛍光分子の配置と、FRET により演算を実行する。このプロセッサの出力として機能性核酸の活性制御を行い、手法の特性と性能限界を示す。最終的には波長多重光信号を用いた並列駆動システムを作製し、生体計測・制御のためのツールとしての能力を明らかにする。

3. 成果

まず、アレイロジックの考え方に基づき、DNA スキャッホルド論理を光によりプログラムする手法を考案した。この手法では、任意の 2 入力（A、 B）1 出力の論理演算を、A∧B、¬A∧B、A∧¬B、¬A∧¬B の 4 種類の AND 演算と、これらの出力の論理和演算により実行する。要点は、4 つの AND 演算を異なる波長の光信号に対応させ、光信号に応じて AND 演算を選択的に実行する仕組みにある。波長の組み合わせにより、2 値 2 入力 1 出力の全 16 種類の任意の演算を指定できる。

この仕組みを実現する機構として、外部光信号を用いた FRET の伝達経路制御系（図 1 上）を作製した。ドナー、アクセプタ、アクティベータの三つの蛍光分子から成る。アクセプタはアクティベータを介した活性化と、直接光照射による不活性化が可能である。活性化状態のアクセプタはドナーからの FRET により励起状態に遷移するのに対して、不活性化状態では FRET は生じない。実験では、Cy3 をドナー、Cy5 をアクセプタ、Alexa405 もしくは FAM をアクティベータとして用いた。系はこれらの蛍光分子を修飾した DNA の結合によって作製した。初期状態（活性状態）の系に対して不活性化光（波長 660 nm）を入射すると Cy5 からの蛍光が低下し、アクティベータ励起光（Alexa405：波長 405 nm、FAM：波長 460 nm）を照射すると蛍光が回復した。アクティベータを欠く系ではこのような変化は生じなかったことから、アクティベータの機能による FRET 信号伝達制御を実証できた。アクティベータを介した活性状態への遷移割合は、Alexa405 で 0.41、FAM で 0.31 であった。活性状態は少なくとも 500 秒以上維持され、メモリとしての利用可能性が示された。また、FRET 信号伝達は可逆的に制御できることも確認した（図 1 下）。

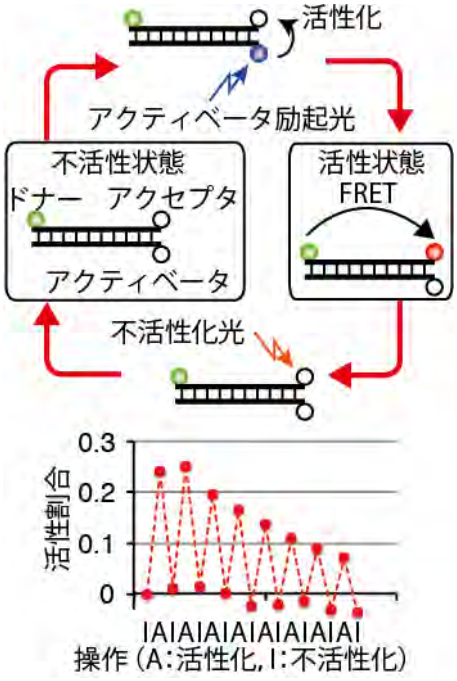


図 1 （上）FRET 伝達制御系、（下）繰り返し制御結果

次に、DNA スキャッホルド論理における反応速度方程式を数値解析し、その基本特性を導出した。例えば、出力信号の絶対的強度と信号対雑音比は、足場 DNA の初期導入量に対して必ずしも正の相関関係にはないことを示した。この知見は、想定される入力 DNA 量に対して、足場 DNA の初期導入量を決定するための指針となる。入力 DNA 濃度がある値を上回ると、その濃度ゆらぎに対して安定的な応答が得られ、ディジタル回路の構成に適した特性をもつこともわかった。また、高い空間分解能でフォトニック DNA プロセッサを並列駆動するための光パターン生成法について検討した。「光を分散させることにより局所的に微小な光スポットを生成する」発想に基づくことで、サブ回折限界スポットアレイを生成する新たな回折光学素子の設計に成功した。

公募

Activation control of nucleic acids using photonic DNA processors

Yusuke Ogura
Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, Japan

A living organism is a physical system composed of many matters, and it is also considered as a sophisticated information system in which various molecules work as information carriers. Thus, an information system that can deal both with matters as real objects and with the associated information is useful to catch valuable information from the living organism or to control it effectively. To realize such information systems, embodiment of the systems at a nanoscale is essential to handle the information on site. As a solution to the requirements, we are studying about photonic DNA processors, which are capable of sensing biomolecular information in surrounding environment, computing the information, and actuating a physical action depending on the result. In the photonic DNA processor, light is utilized to bridge the molecular system (nano-world) and macro-world. In this project, we develop a photonic DNA processor whose operations can be programmed through external light signals and apply it to control of the activation of functional nucleic acids to demonstrate the capability of the processor as a tool for biological control. For computing, we employ DNA scaffold logic, which is based on self-assembly of fluorescence molecules according to molecular inputs and a signal transmission through fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the molecules.

To achieve optical program of operations based on the DNA scaffold logic, a scheme for controlling a energy-transfer path depending on external light signals is proposed. The system consists of three fluorescence molecules, a donor and an acceptor as a FRET pair, and an activator. The acceptor is inactivated by direct irradiation with inactivating light, and it is activated through the excited activator. In the experiments, we used Cy3 as a donor, Cy5 as an acceptor, and Alexa405 or FAM as an activator. The fluorescence intensity of Cy5 decreased after irradiating with inactivating light, and it increased after irradiating with excitation light of the activator. This result indicates that the FRET signal transmission can be controlled as expected. An experiment on repeated irradiation for activation and inactivation also demonstrated the reversible switch of the FRET signal transmission.

Fundamental properties of DNA scaffold logic were investigated by numerical analysis of the reaction rate equations. A result shows that the absolute intensity of an output signal and a signal-to-noise ratio are not positively correlated with the initial concentration of the DNA scaffold. This will be a valuable guide to determine the initial concentration of the DNA scaffold depending on an expected concentration of input DNAs. Another result suggests that the behavior is stable for variation of the concentration of the input DNAs when it is more than a specific value.

公募

業績リスト

学術論文

1. Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, and Jun Tanida A nanoscale set–reset flip-flop in fluorescence resonance energy transfer-based circuits *Appl. Phys. Express.* **6**, 015201 (2013)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Hirotsugu Yamamoto, Kenji Yamada, and Jun Tanida, Functional molecular sensing using photonic DNA nano-processor, The 1st International Workshop on Information Physics and Computing in Nano-scale Photonics and Materials (IPCN), Orleans, Sep. 7, 2012 (Invited speaker)
2. Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Hirotsugu Yamamoto, Kenji Yamada, and Jun Tanida, Photonic nanoscale logic using fluorescence resonance energy transfer on a DNA scaffold, The Second Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP) 2012, Tokushima, Nov. 11, 2012 (Invited speaker)

公募

細胞環境を再現したフェムトリットル空間デバイスの創製とその生化学反応への展開

研究代表者：名古屋大学大学院工学研究科　加地　範匡
連携研究者：名古屋大学大学院工学研究科　　馬場　嘉信

1. 研究の概要

本研究では、微細加工技術により作製したフェムトリットル空間デバイスが有する空間（具体的には 0.1 – 1 fL(10^{-15} L)程度の大きさを有する極微量チャンバー）を利用して擬似的な細胞環境を構築し、細胞環境における分子反応、特に酵素反応のような生化学反応を定量的に理解するための方法論を確立した。

2. 研究の背景と目的

化学・生化学分析を手のひらサイズのチップ上で実現する μTAS(micro Total Analysis Systems)の研究は、近年のナノテクノロジーの進展と相まって、今やマイクロスケールからナノスケールへとその分析の場を移しつつある。このナノスケールの空間（ナノ空間）においては、バルクはもちろんのこと、マイクロスケールでも観察されなかったような新しい現象が発現するため、「ナノ流体」として注目を集め、世界中の研究者が実験と理論の両面から「ナノ流体」の解明、さらにはその応用研究を進めている。

本研究では、このような物理化学的な観点からのナノ空間の研究に対して、より生物学的な観点からのアプローチがとれないか、すなわちナノ空間において水の粘性といった物性が異なるのであれば、その中に存在するタンパク質分子の機能にも何らかの影響を及ぼしているのではないかという発想の元に研究を進めている。特に今年度は、細胞やオルガネラと同程度の空間サイズであるフェムトリットル空間（0.1-1.0 fL 程度）の大きさを有する極微量チャンバーを利用して擬似的な細胞環境を構築し、細胞環境における生化学反応を定量的に理解するための方法論を確立することを目的に、さらに来年

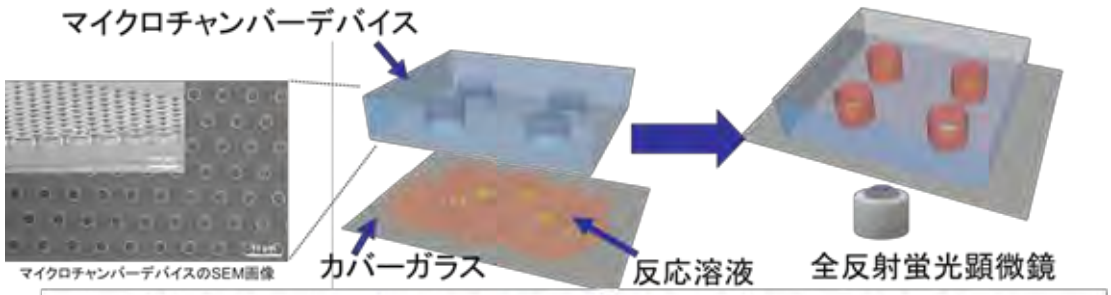


図１．極微量チャンバーデバイスの SEM 画像と反応溶液の封入手順の概略図

度は各種生化学反応に関わるパラメーターの取得を目的に研究を進めた。

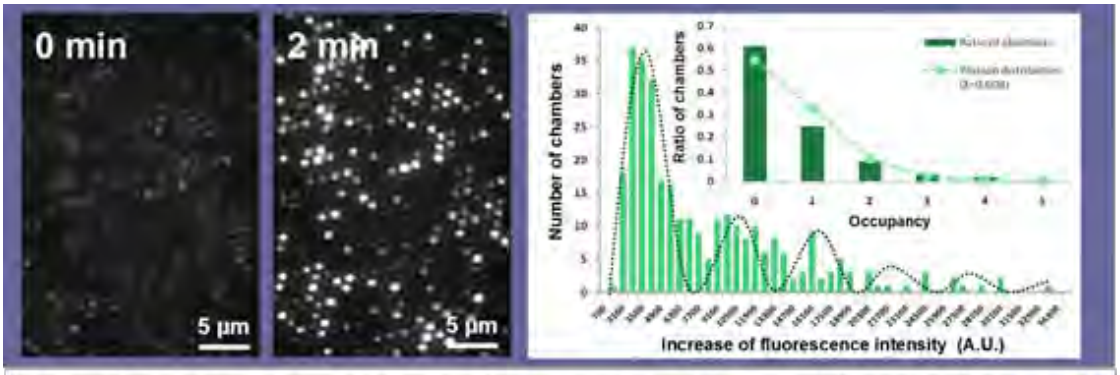


図２．極微量チャンバー（510 aL）中に封入したβ-gal による発蛍光反応の様子を観察した蛍光顕微鏡画像と、それに対応する蛍光強度変化のヒストグラム。挿入図は各ピーク中のチャンバー数の割合とポアソン分布の比較を示したもの。

3. 成果

疑似細胞空間として、フォトリソグラフィーにより作製したシリコンマスターからPDMS(Polydimethylsiloxane)に極微量チャンバーを転写したものを作製し、PDMS の高い接着性を利用して観察対象溶液をカバーガラスで挟み込んで接合したものを用いた（図 1)。このマイクロ・ナノチャンバー内には、酵素分子として β-gal(β-galactosidase)を、基質分子として FDG(Fluorescein di-β-D-galactopyranoside)を封入し、その発蛍光反応をもとに β-gal の酵素活性を算出した（図 2)。このような極微量チャンバーを用いた実験では、溶液の漏れや蒸発、酵素分子の壁面への吸着が結果に大きな影響を及ぼすため、これらの要因を取り除いた実験系の構築に注力した。その結果、極微量チャンバーの反応容器サイズの縮小に従って、酵素活性が低下する現象が数 fL から 500 fL（直径が数百 nm から 10 μm のチャンバー）程度までの間で広く観察された。このような「サイズ効果」が関与していると思われる事象を、より定量的に評価するために、分子クラウディング剤（BSA、PEG8000、PEG20000）を用いて細胞内環境を再現した実験系でも検討を行った。その結果、分子クラウディング剤の濃度上昇に伴い、酵素活性（turnover number）は上昇するものの、ある濃度以上になると低下することが明らかとなった。また、ミカエリス定数は、分子クラウディング剤の濃度上昇に比例して上昇することが分かった。この結果から、酵素活性は、分子拡散が制限されればされるほど分子衝突の確率が低下するため低下し、一方で分子クラウディング剤自身も酵素分子の水和状態に直接的影響を与えるため、これらの添加により、酵素分子と基質との親和性が高まり、酵素反応は進行しやすくなったと考えられる。これらの結果を総合的に考えると、極微量チャンバーを用いて細胞内環境を再現するためには、拡散の制限とともに共存する高分子が与える水の活量といったことにまで配慮する必要がある。

Mimicking Intracellular Environments by Micro- and Nanotechnologies toward a Better Understanding of *in vivo* Biochemical Reactions

Noritada Kaji and Yoshinobu Baba
Department of Applied Chemistry, FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevices, Nagoya University, Japan

Most biochemical experiments such as biochemical assay and biophysical kinetic measurements are done with so-called “diluted” solution ranged from few μg to mg/ml. However cytoplasm includes high concentration of polymers such as DNA, RNA, protein, and polysaccharide, from 200 to 400 mg/ml concentration range. These molecular crowding conditions might strongly affect biochemical reaction kinetics as well as dynamics. One of the major approaches to defeat the problem is adding molecular crowding reagents like PEG (polyethylene glycol) and Ficoll into the reaction solutions and mimicking cytoplasm environment. This biochemical approach is powerful to understand biochemical reactions in cell more quantitatively. But some concerns are still remained; reactivity of molecular crowding reagents and target polymers, influences on the higher-order structures of the target polymers and so on. Therefore one of challenges to understand biochemical reaction in vivo using test tubes is to find a suitable molecular crowding reagent depending on the intended reactions.

To compensate the above drawbacks of the molecular crowding reagent system, we are trying to apply cell-sized reaction chambers as a confinement space for biochemical reactions. In particular, micro- and nanochambers ranged from 0.5 to 5 cubic μm were fabricated by “top-down” approach using electron beam and photolithography, dry etching, and PDMS (Polydimethylsiloxane) cast. The fabricated micro- and nanochamber device was a powerful tool to provide confinement space for biochemical reactions and enable single enzyme assay. We applied various sizes of micro- and nanochambers for kinetic measurements of enzyme reaction and revealed that the reaction space affects the kinetics of enzyme and the confinement decelerates the reaction speed. The result indicates the reaction space become smaller and smaller, unexpected influence was observed in this experimental system. So our grand challenge is to understand the observed phenomena by comparing the molecular crowding system, and develop precisely reproduced intracellular environment by micro- and nanofabrication techniques.

公募

業績リスト

学術論文

1. Takao Yasui, Noritada Kaji and Yoshinobu Baba, Nanobiodevices for Biomolecule Analysis and Imaging, *Annual Review of Analytical Chemistry*, *in press*

総説・解説・成書

1. 加地範匡「ナノバイオデバイスによる単一 DNA 分子解析技術の最前線」　化学と工業 **9**, 65-69（2012）
2. 加地範匡、渡慶次学、馬場嘉信　「超解像顕微鏡とは-Abbe の法則への挑戦-」　現代化学 **502**, 50-54 （2012）

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Noritada Kaji and Yoshinobu Baba, “Micro- and Nanofabricated Structures on a Chip for Biomolecule Analysis in Artificial Intracellular Environments”, ISMM2012, Hsinchu, Taiwan, Invited Lecture, 2012 年 6 月 11 日
2. 加地範匡、「“大きな技術”で小さな生体分子を視る・操る」、さかえサイエンストーク、名古屋、2012 年 10 月 1 日

公募

細胞内イメージングに向けた超高感度核酸プローブの開発

研究代表者：名古屋大学大学院工学研究科　樫田　啓

1. 研究の概要

我々は mRNA の細胞内イメージングを目指し、高感度なモレキュラービーコン（MB）の開発を行っている。今年度は消光を受けにくい新規 Cy3 誘導体を合成し、この誘導体を複数分子導入したインステムモレキュラービーコン（ISMB）を開発した。また、我々が開発したセリノール核酸（SNA）を用いた MB の開発を行い、この SNA-MB が RNA を高感度に検出できるだけではなく、高い酵素耐性を持つことを明らかにした。一部の MB に関しては細胞に投与することにより、細胞内 mRNA イメージングに展開した。

2. 研究の背景と目的

細胞内における mRNA の局在性は細胞分裂や分化の過程において重要な役割を担っていることが近年明らかになりつつある。モレキュラービーコン（MB）は Tyagi らによって開発された核酸プローブであり、ターゲット非存在下では発光せず、ターゲット存在下でのみ発光するという特長がある。そのため、タグや RNA を用いる他の手法と比べて、高感度な検出が期待できる。しかしながら、従来の MB は末端に色素が結合されていたために、バックグラウンド発光による偽陽性が大きな問題となっていた。それに対し、我々はステム内部に色素を導入したインステムモレキュラービーコン（ISMB）を開発した。このプローブは従来型 MB と比べてバックグラウンド発光が小さいという利点がある。そこで、本研究ではこの ISMB を更に改良することによって超高感度な核酸検出プローブを開発し、実際に細胞内イメージングへ展開することを目指す。

3. 成果

Cy3 複数導入 MB の開発

これまで我々は蛍光色素である perylene を複数分子導入した ISMB の開発に成功している。しかしながら、perylene は励起・発光波長が短波長であるために、細胞の自家蛍光によって検出が阻害される恐れがあった。また我々は、より長波長で吸収・発光する Cy3 を導入した ISMB を開発しているが、核酸塩基によって消光されてしまうため複数分子導入した際に感度が低下するという問題点があった。そこで、核酸塩基による消光を受けにくい新規 Cy3 誘導体を合成し、これを複数分子導入した ISMB の開発を行った（図1）。モデル配列で検討を行ったところ、この誘導体は従来用いていた Cy3 誘導体と異なり、二重鎖を不安定化しないことが分かった。また、複数分子導入しても蛍光が消光しないことが明らかになった。そこで、この Cy3

誘導体及び消光色素として Nitromethylred を複数導入した ISMB を合成した。蛍光スペクトルを測定したところ、ターゲットとなる RNA 非存在下では発光はほとんど観察されなかった。それに対し、ターゲット RNA を加えたところ非常に強い Cy3 の発光が観察され、ターゲットの有無による発光強度の比（S/B 比）は 116 となった。また、一分子の色素を導入した配列と比較したところ、ターゲット存在下での発光が増大しただけではなく、バックグラウンド発光も抑制されたことが分かった。以上のことから、新規 Cy3 誘導体を複数分子導入することによって従来よりも高感度な RNA 検出に成功した。

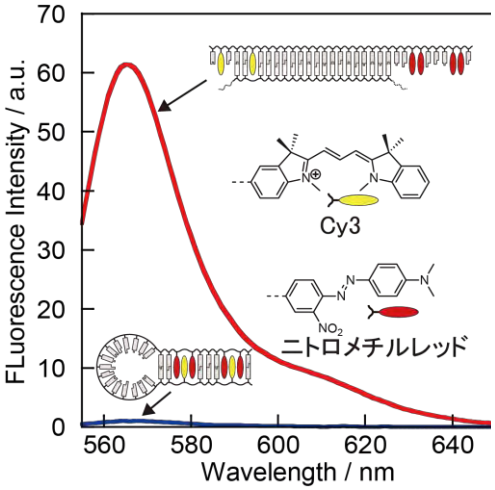


図 1　Cy3 導入 ISMB を用いた RNA 検出結果

またこの ISMB を用い、細胞内における mRNA のイメージングを行った。GFP プラスミドを導入した細胞を固定化し、ISMB を加えて共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、GFP プラスミドを導入した場合のみ、細胞質において強い発光が観察された。従って、我々が開発した ISMB が細胞内 mRNA イメージングに利用可能であることが明らかとなった。今後は開発した ISMB を他の mRNA のイメージングや生細胞イメージングへと展開する予定である。

SNA-MB の開発

我々はこれまでにセリノールをリンカーとして用いた新規人工核酸 SNA（Serinol Nucleic Acid）の開発に成功している。これまでにこの SNA は RNA 及び DNA と高い親和性を示し、二重鎖を形成することを明らかにした。更に、この SNA の構造は DNA や RNA と全く異なるため、高い酵素耐性が期待できる。そこで、まずモデル配列を合成し、SNA に色素を導入した際の安定性や発光特性について検討した。その結果、SNA の末端に色素を導入した際に最も効率よく消光することが明らかとなった。

そこで、次にこの設計を用いた MB を合成し、核酸検出を行った（図2）。ターゲットは慢性白血病（BCR-ABL）の mRNA とし、蛍光色素としてペリレン、消光色素としてアントラキノンをもちいた。その結果、ターゲット RNA 存在下において、非存在下と比べて蛍光強度が 600 倍増大した。この S/B 比は他のプローブと比較しても非常に高感度であるといえる。また、酵素耐性を検討したところ、DNA を骨格に持つ MB と比べ SNA-MB は高い酵素耐性を持つことが分かった。このように SNA-MB は高感度な検出能及び酵素耐性を持つため、今後はこの MB を用いた mRNA イメージングへと展開する。

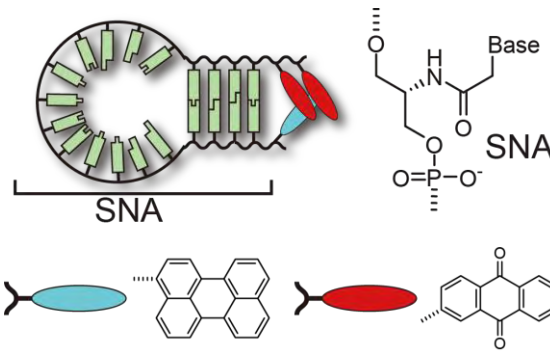


図 2　SNA-MB の基本構造

公募

Development of a highly-sensitive nucleic acid probe for in vivo imaging

Hiromu Kashida
Graduate School of Engineering, Nagoya University, Japan

Recently, localization of mRNA has been paid much attention due to its relevance to spatial and temporal protein expression. To clarify roles of mRNA localization in living cells, monitoring tools with high sensitivity are strongly required. We have developed In-Stem Molecular Beacons (ISMB) by incorporating fluorophores (perylene) and quenchers (anthraquinone) into stem portion of molecular beacon. ISMB could detect target DNA and RNA with higher sensitivity than conventional molecular beacons. In this project, we aim to develop highly sensitive MB for *in vivo* mRNA imaging.

We synthesized ISMB tethering multiple Cy3 fluorophores instead of perylene to circumvent effects of autofluorescence from cells. In our design, Cy3 fluorophore was attached with DNA through amide bond to suppress quenching of dyes and to improve duplex stability. In addition, Nitromethylred was used as a quencher. The ISMB tethering two Cy3 fluorophores showed extremely weak emission in the absence of the target RNA. However, strong emission was observed by the addition of the target. The signal to background (S/B) ratio was 116, which was much higher than ISMB with single Cy3. We then applied the ISMB to monitoring mRNA in cells. Hela cells were transfected with the target GFP plasmid and fixed with paraformaldehyde. When ISMB was added to cells not transfected with GFP plasmid, almost no emission was observed, indicating background emission was suppressed. On the other hand, strong emission was observed with ISMB added to cells with GFP plasmid. These results clearly demonstrated that ISMB can be applied to visualization of mRNA in cells.

Digestion of MB is one of most severe problems in cell imaging because emission from free fluorophores causes false positive signals. Thus, we utilized Serinol Nucleic Acids (SNA), which we have reported previously, in order to suppress enzymatic digestion of molecular beacons. Although chemical structure of SNA is much different from natural nucleic acids, SNA can form a stable duplex both with DNA and RNA. Thus, high sensitivity of target detection as well as nuclease resistance is expected with SNA-MB. SNA molecular beacon (SNA-MB) was prepared by attaching a fluorophore (perylene) and a quencher (anthraquinone) with SNA. The S/B ratio of SNA-MB was as high as about 600, which was much higher than DNA-based molecular beacons. Nuclease resistance of molecular beacons was also evaluated by adding Hela cell lysate to MBs. Although fluorescence intensity of DNA-based MBs increased due to enzymatic digestion, no increase in emission was observed with SNA-MB. Thus, SNA-MB showed high resistance with nuclease digestion as well as high sensitivity of RNA detection.

公募

業績リスト

学術論文

1. Tomohiro Kato, Hiromu Kashida, Hideo Kishida, Hiroyuki Yada, Hiroshi Okamoto, Hiroyuki Asanuma Development of a Robust Model System of FRET using Base Surrogates Tethering Fluorophores for Strict Control of Their Position and Orientation within DNA Duplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 741-750 (2013)
2. Hiroyuki Asanuma, Mariko Akahane, Nobuyo Kondo, Takuya Osawa, Tomohiro Kato, Hiromu Kashida Quencher-free linear probe with multiple fluorophores on an acyclic scaffold *Chem. Sci.*, **3**, 3165-3169 (2012)

総説・解説・成書

1. Hiromu Kashida, Hiroyuki Asanuma, "Oligonucleotide Conjugates for Detection of Specific Nucleic Acid Sequences" "DNA Conjugates and Sensors" edited by K. R. Fox and T. Brown, RSC Publishing, 242-257 (2012)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Hiromu Kashida. Preparation of novel artificial base pairs for functionalization of DNA. The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012). November 28-30, 2012, Tokyo. (Invited speaker)

公募

固液界面におけるタンパク質間相互作用に及ぼす分子クラウディングの影響

研究代表者：広島大学大学院医歯薬保健学研究院　加藤　功一
分担研究者：広島大学大学院医歯薬保健学研究院　平田　伊佐雄

1. 研究の概要

様々なタンパク質が高濃度で溶解している細胞内は分子クラウディング状態にある。このような環境下では、巨大分子の排除体積効果に基づいて、結合定数や反応速度が大きく変動すると推測される。我々は、細胞内における固液界面でのタンパク質間相互作用に焦点を当て、分子クラウディングが反応挙動に及ぼす影響を調べている。今年度はクラウディング環境下において、固液界面における表面プラズモン共鳴分析の可能性を示し、抗原-抗体反応の結合速度および結合量が、抗原の結合状態により異なることを見出した。

2. 研究の背景と目的

細胞内の環境は多種類の生体分子が 200～300 mg/mL の高濃度に溶解した分子クラウディング状態にある。このような環境下でさまざまなタンパク質間相互作用が効率よく起こることによって細胞システムは機能する。クラウディング環境下では、巨大分子であるタンパク質の排除体積効果が大きく現れるため、クラウディングの程度の上昇につれて、特定の種類のタンパク質の活量は増大する。一般にこのような活量の増大はタンパク質間相互作用の結合定数を上昇させ、より安定な複合体の形成に至ると言われている。一方、反応の動力学の観点では、反応分子の拡散速度が大幅に低下するため、拡散律速の反応では反応速度が低下するものと考えられる。したがって、細胞の振る舞いをより深く理解するには、これまで分析の中心であった希薄系でのタンパク質間反応ではなく、クラウディング環境下におけるタンパク質間反応について理解を深めることが極めて重要である。

細胞内では、細胞質中に溶存するタンパク質間の反応以外に、固液界面での反応も数多く存在する。例えば、不溶性の分子集合体である細胞骨格分子に輸送タンパクや細胞接着分子と複合化したアンカータンパクが結合する。また、リガンドの結合によって活性化された受容体の細胞内ドメインは細胞膜にアンカーリングされており、それにアダプター分子が結合することによって細胞内にシグナルが伝達される。これらの固液界面におけるタンパク質間の反応は生命活動にとって重要な意味をもつが、クラウディング環境下で起こる点についてはあまり注目されてこなかった。そこで本研究では、細胞内における固液界面でのタンパク質間相互作用に焦点を当て、分子クラウディングが反応の静的および動的挙動に及ぼす影響を調べることを目的とした。

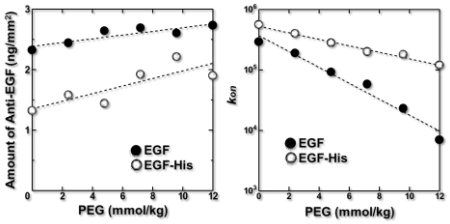
3. 成果

本研究では表面プラズモン共鳴法(SPR)を分子クラウディング環境下での分析系に展開す

ることを試みた。 SPR 装置および解析プログラムは自作品を用いた。溶媒の屈折率は、クラウディング環境下においては希薄系と比較して大きくなるため、既存の測定系においてはクラウディング剤による検出感度および検出範囲の低下を生じる。これらを補うため、SPR センサーチップとSPR 用光学プリズムの基材として高屈折率のガラス(S-LAL10、屈折率 1.72)を採用した。コンピューターシミュレーションによりこの高屈折率ガラスを用いることで、水晶体のような高い分子クラウディング状態(300～600mg/mL)を維持している生体組織と同様の屈折率を有するクラウディング環境下においても SPR 測定が可能であることを示した。

また、我々は人工材料表面に固定されたタンパク質と細胞表面に発現するタンパク質との特異的相互作用を通じて機能する各種の生体材料を開発してきた。その過程で、タンパク質工学の手法を用いて固定分子の末端に基材親和性をもつポリペプチドを融合することによって、タンパク質の機能を高く維持しながら配向固定できることを見出した。この方法を用いれば、固液界面におけるタンパク質間相互作用をきわめて精度よく解析できるものと考えた。本研究では、分子クラウディング環境における固定化抗原－抗体反応に焦点をあて、その反応速度に及ぼす抗原の表面結合様式の影響について調べた。

固定化する抗原として EGF (rhEGF-AF, Wako)と EGF-His (EGF の C 末端に His×6 を融合したタンパク質。大腸菌発現系を利用して作製)、抗体として抗 EGF 抗体を用いた。EGF を固定したセンサーチップは、*N*-ヒドロキシスクシンイミドおよびカルボジイミドを用いて活性化したカルボン酸含有自己組織化単分子膜を EGF 溶液に暴露することによって作製した。EGF-His 固定基板の作製には、まず、上記と同様な方法で活性化した基板を *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid(NTA)溶液に浸漬し、表面に NTA 基を導入した。その後、Ni^{2+}を加えてキレート化し、最後に EGF-His 溶液に浸漬して、EGF-His を His-Ni^{2+}間の結合を介して固定した。ポリエチレングリコール(PEG, Mw: 8300)をクラウディング剤として用いた。PEG をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に 0.0～12.0 mmol/kg の濃度で溶解させ、クラウディング溶媒とした。クラウディング溶媒に溶かした 2 μg/ml の抗体を抗原固定基板に流し、固定化抗原と抗体の結合・脱離過程を SPR で測定した。



PEG 濃度に対する（左）抗 EGF 抗体の結合量と（右）抗 EGF 抗体の結合速度定数の関係

クラウディング環境下での抗 EGF 抗体の結合量は、EGF, EGF-His 共に PEG 濃度が上昇するにつれて増加する傾向にあった。これは、クラウディング剤の影響により抗体の活量が上昇したためと考えられる。この影響は EGF より EGF-His の方が大きかった。一方、結合速度係数(k_{on})はクラウディング剤の濃度が高くなるにつれて低下した。これは、クラウディング剤の影響により抗体の拡散係数が低下したからと考えられる。この傾向は、EGF-His よりも EGF の方が大きかった。以上のように、抗原の表面結合様式が分子クラウディング環境における固液界面での抗原－抗体反応速度に影響を及ぼすことが示された。

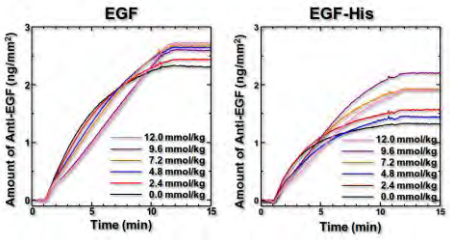
Effect of macromolecular crowding on antigen-antibody interactions at solid-liquid interfaces

Koichi Kato and Isao Hirata

Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan

The condition of molecular crowding is that macromolecules are dissolved at high concentrations. Such conditions occur in living cells which consist of proteins, polysaccharides, DNA, RNA, etc. Under molecular crowding conditions, excluded volume effects of macromolecules is considered to alter activities of particular proteins, and then these reaction rates are subject to be influenced. There are a number of reactions at the microscopic solid-liquid interfaces in the internal of cells. The aim of this research is to analyze the molecular crowding effect on protein interactions at solid-liquid interfaces. Here, we examined a surface plasmon resonance (SPR) analytical method for antigen-antibody interactions at an interface under molecular crowding conditions.

We chose the SPR method for this purpose. To compensate for the reduction of detection sensitivity, which is supposed under molecular crowding conditions, a high refractive index glass (S-LAL10, n; 1.72) was used for an SPR sensor chip. EGF and EGF-His were used as an immobilized antigen, while anti-EGF antibody as an antibody. After introducing and activating of carboxyl groups on the SPR chips, EGF or *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid (AB-NTA) was immobilized. The AB-NTA introduced chips were treated by Ni^{2+}, and EGF-His was immobilized by binding of His-tag through Ni^{2+}-NTA linkage. Poly(ethylene glycol) (PEG; Mw = 8,300) was used as a crowding agent at a concentration of 0 to 12.0 mmol/kg in phosphate buffered saline. The antigen-antibody reactions in the crowding environment were analyzed by SPR in real-time. Two μg/ml of anti-EGF antibody was dissolved in the crowding solvents.



The association and dissociation processes of the anti-EGF antibody

The association and dissociation processes of the antibody on the antigen-immobilized surfaces under crowding environments were measured by SPR. With an increase in the concentration of the crowding agent, the association rates of the antibody deceased, but the binding amounts increased. These results indicated that PEG strongly affected the interaction between the antigen and the antibody.

As demonstrated by our experiments, the SPR method allows us to analyze the antigen-antibody interactions at solid-liquid interfaces under crowding environment. And, the antigen-binding conditions on the surfaces affected the binding amounts and the association constants under molecule crowding conditions.

公募

業績リスト

学会発表

1. 平田伊佐雄，加藤功一：固液界面における抗原-抗体反応速度に及ぼす分子クラウディングの影響，日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012（仙台，2012）

2. Isao Hirata, Koichi Kato: Effect of molecular crowding on antibody-antigen interactions at solid-liquid interfaces. The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (Taipei, 2013)

公募

機能性ナノ界面をもちいた分子動態の解析

研究代表者：東京医科歯科大学生体材料工学研究所　合田　達郎

1. 研究の概要

ポストヒトゲノム時代をむかえ、テーラーメード医療を実現するための一分子・一細胞のマニピュレーションをおこなうナノバイオテクノロジーが出現しつつある。しかし、本新学術領域で提案されるように、細胞環境での分子反応パラメータに基づく病態の一義的な理解や、細胞内分子動態の理解はいまだ不明な点が多い。また、核酸や薬物のキャリアである各種ナノマテリアルの細胞内送達の分子メカニズムや、ナノキャリアを用いた細胞内輸送にともなう細胞毒性誘起の分子メカニズムなど、ナノメディシンのための分子科学を構築する必要がある。さらに、炎症反応に代表されるように、生体内での分子認識反応は pH やカルシウムイオンの局在といった周りの微細環境に大きく影響する。本研究では、機能性ナノ界面を各種センシングデバイス上に構築し、分子の結合反応をラベルフリー・リアルタイムに解析を行うことにより、これらの問題についての分子科学的知見を得ること目的とする。

2. 研究の背景と目的

核酸や薬物のキャリアである各種ナノマテリアルの細胞内送達の分子メカニズムや、細胞内輸送にともなう細胞毒性誘起の分子科学など、ナノメディシンのための分子科学を構築し、将来的な高スループット薬剤スクリーニングへの応用や、動物実験の代替評価技術の礎を構築する必要がある。本研究では、バイオエレクトロニクス技術を用いて、生体分子・細胞・機能性ナノ材料・半導体デバイスを融合させ、電荷やイオンを信号変換要素として、生体分子のナノ界面での分子挙動、あるいは細胞とナノ材料との相互作用を高感度・高精度に評価することにより、生体分子の分子動態、ナノ材料に対する細胞毒性の一義的評価、細胞病態・治療効果・予後診断を科学パラメータにより統一的に評価することを目的とする。また、バイオミメティックス技術を用いて、生体内に存在する外部環境・局所環境に応じて変動するスマートな分子認識機構を再現する機能性ナノ界面を構築する。そうした機能性ナノ界面に対して半導体デバイスをセンサープラットフォームに用いることで、標的バイオ分子の静電荷や生化学反応にまつわるイオンを高感度・特異的に検出することが可能となる。これらバイオセンサーを用いて、細胞膜近傍の特定イオンを高感度・高精度に測定することにより、ナノ材料の細胞膜通過機構、各種オルガネラでの生化学反応に対する細胞内外でのイオン収支の解明、ナノ材料が細胞に形成する一時的なナノポアがもたらす胞膜障害性を定量的・一義的に評価することを目指す。

3. 成果

タンパク質分子が元来有する表面電荷に着目し、電界効果トランジスタ（FET）を基とした半導体型センサーを用いて、その電荷を静電的相互作用に検出するという新たな手法を開発した。タンパク質の分子内に着目すると、その電荷分布は非常に不均一であり、プラスとマイナスの電荷の双方をヘテロに有する両性イオンナノコロイドである（図 a)。電荷の不均一性は長距離の分子認識や複合体形成、生化学反応と密接にかかわっている。そこで、吸着タンパク質の局所的な電荷情報を得ることで、分子レベルでの配向、変性過程などを評価することを検討した。高イオン強度溶液中における電荷検出は、溶液中の対イオンによって遮蔽されることを逆手に取り、タンパク質分子の接着斑近傍の電荷のみを選択的に検出できることが明らかとなった（図 b)。そして、既存のラベルフリー検出技術である SPR・QCM センサーによって得られた結果と、FET センサーで得られた結果とをタンパク質吸着量といった定量的な解析に加えて、高次構造変化・分子配向といった定性的な情報を得ることが可能になった。

イオン応答性電界効果トランジスタ（ISFET）を用いて、細胞膜を隔てて授受される水素イオンをトレーサーとして、 高感度（ΔpH = 0.01)、高時間分解能（Δt = 100 ms)、非侵襲で細胞膜トランスポーター活性を計測するセンシングプラットフォームを構築した。プロトン駆動型アミノ酸トランスポーターである PAT1 のプロリンに対する応答を観測したところ、プロトンとプロリンの細胞内流入に伴って ISFET 界面で pH が局所的に上昇した。一方で、ナトリウム結合型リン酸コトランスポーター（NaPi-IIb）を発現した細胞においては、pH が局所的に減少した。これは生理条件下において、リン酸が一価と二価の平衡状態にあり、NaPi-IIb によって一価のリン酸が細胞内に取り込まれた結果、平衡反応によって二価のリン酸とプロトンが新たに生成されたためである。同様にして、NaPi-IIc および PiT-2 のトランスポーター活性をプロトンセンシングによって評価できることが判明した。なお、プロトンの移動を伴わない GAT1、ENaC においては、シグナルは検出されなかった。現在、不死化ヒト細胞を用いて、ナノ材料に対する細胞膜障害性を検討しているところであり、本技術の今後の応用が期待できる。

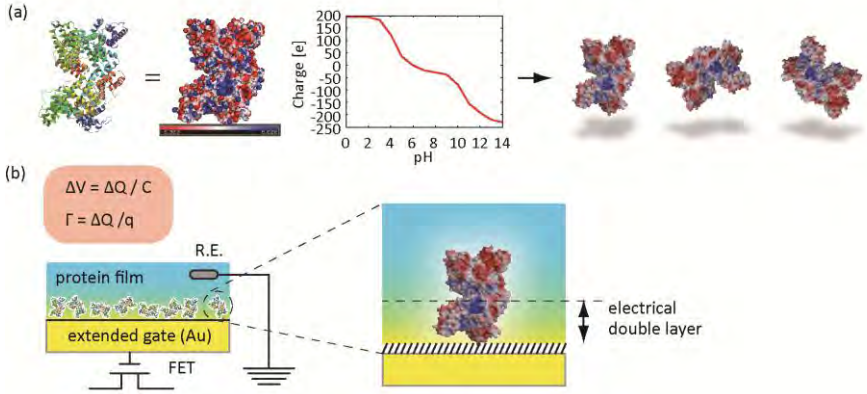


図. (a) 局所的なタンパク質電荷の検出による分子配向性および高次構造変化の評価. (b) タンパク質吸着と界面電位変化の機構.

公募

Functional Interface for Molecular Dynamics in Nanomedicine

Tatsuro Goda

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan

There have been limited methods on the analysis of higher ordered structure of protein on the surface in situ at the intact state. Herein we focused on sensing of the heterogeneously distributed local net-charges of protein as essential information to interpret molecular structure of adsorbed protein film on a solid surface. A semiconductor-based transistor device enables to direct electrical readout of local innate charges of the protein at the contact phase in a physiological buffer environment owing to the predominant counterion screening effect. A comparison of the electric charges with the adsorbed dry and/or wet masses determined by conventional SPR and QCM techniques indicates time- and concentration-dependent variations on the orientation and conformation of the protein in the thin film. Further, we successfully integrated the charge sensor into QCM device to achieve a simultaneous detection of adsorbed charges and mass onto an identical sensor surface in real time. The local charge-sensing of protein gives us a feedback for developing designer biomatetrials for tissue regenerations.

An integrated microdevice for measuring proton-dependent membrane activity at the surface of *Xenopus laevis* oocytes has been achieved. By establishing a stable contact between the oocyte vitelline membrane and an ion-sensitive field-effect (ISFET) sensor inside a microperfusion channel, changes in surface pH that are hypothesized to result from facilitated proton lateral diffusion along the membrane were detected. The solute diffusion barrier created between the sensor and the active membrane area allowed detection of surface proton concentration free from interference of solutes in bulk solution. The proposed sensor mechanism was verified by heterologously expressing membrane transport proteins and recording changes in surface pH during application of the specific substrates. Experiments conducted on two families of phosphate-sodium cotransporters (SLC20 & SLC34) demonstrated that it is possible to detect phosphate transport for both electrogenic and electroneutral isoforms and distinguish between transport of different phosphate species. Furthermore, the transport activity of the proton/amino acid cotransporter PAT1 assayed using conventional whole cell electrophysiology correlated well with changes in surface pH, confirming the ability of the system to detect activity proportional to expression level.

公募

業績リスト

学術論文

1. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Label-free and Reagent-less Protein Biosensing using Aptamer-modified Extended-gate Field-effect Transistors", *Biosens. Bioelectron.,* 2013, In press, DOI: 10.1016/j.bios.2013.01.053.
2. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Interpretation of Protein Adsorption through its Intrinsic Electric Charges: A Comparative Study using a Field-effect Transistor, Surface Plasmon Resonance, and Quartz Crystal Microbalance", *Langmuir*, 2012, 28(41), 14730-14738. DOI: 10.1021/la302977s.
3. Tatsuro Goda, Yasuhiro Maeda and Yuji Miyahara, "Simultaneous Monitoring of Protein Adsorption Kinetics using a Quartz Crystal Microbalance and Field-Effect Transistor Integrated Device", *Anal. Chem.*, 2012, 84(17), 7308-7314. DOI: 10.1021/ac3015092. *Selected as "Editors' Highlight"*.

総説・解説・成書

1. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Chapter 12 Sensing of Biomolecular Charges at Designer Nanointerfaces", In: Manipulation of Nanoscale Materials: An Introduction to Nanoarchitectonics (ed.: K. Ariga), The Royal Society of Chemistry, UK, 302-317 (2012), DOI: 10.1039/9781849735124-00302
2. 合田達郎, 宮原裕二, "バイオＦＥＴセンサ Bio-FET sensors" In: 先端バイオマテリアルハンドブック (eds.: K. Akiyoshi, K. Ishihara, T. Yamaoka), NTS Inc., Japan, Chapter 4.7, 445-449 (2012)
3. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Aptamer Nanostructures as Signaling Molecular Switches in Electrochemical Biosensing", In: Nanotechnology, Volume 8 Nanosensors, Studium Press LLC, USA, In press,

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

受賞

1. 2nd International Conference on Biomaterials Science (ICBS) in Tsukuba 2013, Travel Award for Young Researcher

活動

・2012 年 1 月～現在：カロリンスカ研究所，客員研究員

公募

細胞の微弱電流環境下における物質取り込み変化の機構解明と革新的薬物送達への展開

研究代表者：京都薬科大学　小暮健太朗

1. 研究の概要

我々はこれまでに、微弱電流によって siRNA 等を非侵襲的に皮内細胞質まで送達する技術を確立している。我々は、微弱電流によって細胞の取り込み機構等が変化していると仮説を立て、本研究においてその検証と薬物送達への展開を目指して取り組んでいる。今年度は、微弱電流によって核酸が取り込まれる機構を解析したところ、微弱電流によって細胞本来の取り込み機構（エンドサイトーシス）で取り込まれること、さらには種々のシグナル伝達系が活性化されておりエンドサイトーシス関連タンパク質も活性化されることを見出した。

2. 研究の背景と目的

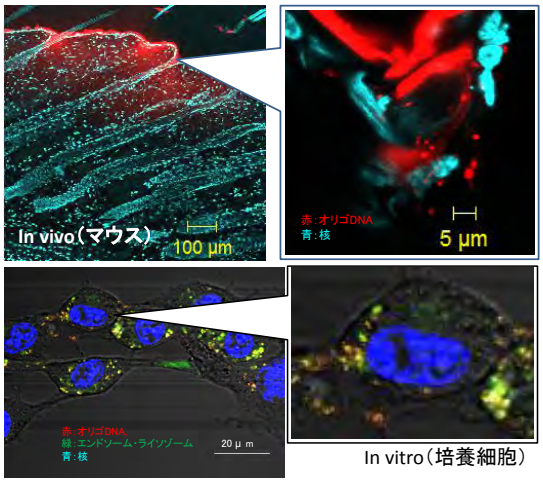
我々はこれまでに、イオントフォレシス（微弱電流による経皮薬物送達促進技術）により siRNA や CpG オリゴ核酸など親水性高分子を皮膚内（in vivo）に効率よく浸透させるとともに、高い RNAi 効果や抗腫瘍免疫反応を誘起することに成功している（Kigasawa et al., Int. J. Pharm (2010), Kigasawa et al., J. Control. Release (2011)）。イオントフォレシスは、強力な電圧によって一過的に細孔を形成させるエレクトロポレーションと異なり、非常に微弱な電流を負荷することで、非侵襲的に皮膚組織内に低分子薬物を送達する方法として知られている。一般に、負電荷を有する核酸は負に帯電している細胞に取り込まれ難いと考えられており、仮に細胞内にエンドサイトーシスによって siRNA などが取り込まれたとしても、エンドソーム脱出能を有しない siRNA 単体では脱出は不可能であり、分解されてしまうため RNAi 効果などを発揮することはできない。しかし、微弱電流環境（0.3mA/cm^2 程度）下において siRNA をイオントフォレシスに供することで非侵襲的に細胞内に送達し、さらに高い RNAi 効果を示したという結果は、siRNA 単体が直接細胞膜を突破して細胞内に取り込まれたか、もしくはエンドサイトーシスで取り込まれた後、エンドソームを脱出して細胞質へ到達し機能発揮したことを意味している。我々は、これまでに微弱電流刺激によって細胞生理状態が変化し、細胞内シグナル伝達系の変動を介して細胞間隙が開裂する現象を見出している（Hama et al., 投稿中）。このことは、物理刺激（微弱電流刺激）が、細胞内に大きな生化学的変化を引き起こすことを意味している。

これらの発見から我々は、「微弱電流環境下では細胞の物質取り込み機構およびエンドソームの性質等が通常と異なる状態にある」と仮説を立てた。本公募研究では、細胞の微弱電流環境における物質取り込み機構に関連する変化とその機構を解明するとともに、その知見に基づき細胞内取り込みと最大の障壁であるエンドソーム脱出を制御す

ることで毒性のない革新的薬物送達への展開を目指している。

3. 成果

本公募研究開始後、in vivo および in vitro における蛍光ラベル化核酸の動態観察の結果から、イオントフォレシスによって皮膚内（in vivo）および細胞内（in vitro）に送達された核酸分子は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたことが示唆されている。さらに、in vivo において送達された siRNA による有意な RNAi 効果が得られていることから、微弱電流環境下においてエンドサイトーシスで取り込まれた siRNA がエンドソームから脱出し、細胞質に到達していることも示唆されている。そこで、in vitro において微弱電流処理した細胞における生化学的変化の網羅的解析により、細胞の中で起こっているイベントを明らかにしようと考えた。まず初めに、in vivo および in vitro において蛍光標識化オリゴ核酸を微弱電流処理した後、顕微鏡観察したところ、細胞内において蛍光核酸がドット状に観察されたことから（右図）、微弱電流によりエンドサイトーシスが誘導されたことが示唆された。さらに、微弱電流処理した細胞における遺伝子発現変動の網羅的解析を試みた。2 種類の培養細胞を微弱電流処理し、DNA チップにより遺伝子発現を解析したところ、約 1000 個の遺伝子変動が観察された。両細胞に共通で発現変動している複数個の遺伝子について、real time PCR 法を用いて詳細に変動解析を行ったところ、予想に反して有意な変動を示していたのは、1 種類の遺伝子のみであった。このことから、短時間における微弱電流処理時の遺伝子変動が、細胞内取り込みおよび細胞内動態の変化に直接結びついている可能性は、低いことが示唆された。そこで、シグナル伝達を中心とする細胞内タンパク質が微弱電流処理によって変化しているのではないかと仮説を立て、質量分析法を用いてタンパク質のリン酸化に関する網羅的解析を試みた。培養細胞を用いて、微弱電流刺激による細胞内タンパク質のリン酸化変動を解析した結果、リン酸化が 1.5 倍以上亢進しているタンパク質は約 100 個、1/2 以下にリン酸化が減少しているものは約 50 個認められた。これらのうち、リン酸化が亢進しているタンパク質について解析を行ったところ、多くは核内および細胞質内のタンパク質であったが、エンドサイトーシスや細胞骨格に関与するものが含まれていた。このことから、上述した仮説のように、微弱電流刺激によって細胞取り込みやエンドサイトーシスが変化している可能性が示唆された。



微弱電流処理後の蛍光標識核酸の細胞内動態

公募

Mechanism of Efficient Cellular Delivery via Imperceptible Electricity

Kentaro Kogure
Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Recently, we developed the efficient novel system for delivery of functional nucleic acid medicines, such as siRNA and CpG oligonucleic acid, into skin by iontophoresis, and succeeded in the induction of potent RNAi effect and tumor growth inhibition (Kigasawa K, et al., Int. J. Pharm. 383 (2010) 157., Kigasawa K, et al., J. Control. Release 150 (2011) 256). Iontophoresis is known as a noninvasive acceleration technology for transdermal drug delivery via imperceptible electricity. In general, it is considered that the cellular entry of negatively charged nucleic acids would be difficult due to the electric repulsion between the anionic polymers and negatively charged cellular surface. Moreover, if the cellular entry mechanism was endocytosis, the functional nucleic acids should escape from endosomal compartment after the cellular internalization for avoidance of degradation in endosome-lysosome. However, endosomal escape of naked nucleic acids having no functional device, such as fusogenic peptides or proton sponge polymers, would be impossible. Actually, the potent knockdown effect was induced after iontophoresis of naked siRNA (0.3 mA/cm^2 for 1 hr) on the mouse dorsal skin, indicating that siRNA was delivered into the cytoplasm via electric stimulus. Recently, we found that imperceptible electric stimulus induce cellular signal activation and change of physiological state of skin cells. This phenomenon suggests that physical stimulus could induce biological change in the cells. From these findings, we hypothesized that cellular uptake mechanism and properties of endosomes under imperceptible electricity must be different from those under physiological condition. Based on this hypothesis, we analyzed the cellular entry mechanism of fluorescent-labeled oligonucleotide by confocal laser scanning microscopic observation. It was found that the cellular entry mechanism was endocytosis in vitro and in vivo. In order to clarify the detail mechanism of cellular entry and endosomal escape of the nucleic acid medicines, we examined exhaustive analysis of protein phosphorylation in the culture cells after treatment with imperceptible electricity. As the results, it was found that phosphorylation of over 100 proteins including cell signaling-related proteins was stimulated by imperceptible electric stimulus. In conclusion, it was suggested that cellular uptake of nucleic acid medicines was induced through stimulation of cell signaling by imperceptible electric stimulus.

公募

業績リスト

学術論文

1. 該当ありません。

総説・解説・成書

1. 該当ありません。

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. K. Kogure, K. Kigasawa, K. Kanamura, A. Tamura, Y. Nagasaki, S. Hama, K. Kajimoto 「 Noninvasive and effective transdermal delivery of functional oligonucleotides by iontophoresis」The 6th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology (HaLong City, Vietnam) (2012)
2. 小暮健太朗「微弱電流刺激による高分子物質の皮膚透過促進メカニズム」第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2012)
3. 小暮健太朗「高分子物質のイオントフォレシス」 日本薬剤学会第 4 回経皮投与製剤 FG シンポジウム (2012)
4. 小暮健太朗「微弱電気を用いた経皮ワクチンデリバリー技術の開発」シンポジウムーナノバイオテクノロジーに基づく DDS 技術による新世代ワクチン技術 (2012)

公募

細胞内局所での分子反応と軸索変性との関連を明らかにする

研究代表者：福井大学大学院工学研究科　小西　慶幸

1. 研究の概要

細胞内では、分子は均一なネットワークを形成しているのではなく、微細な区画に依存して局所的に分子間相互作用が制御されると考えられる。特定の細胞内領域で生じた分子反応が細胞内に伝播し、細胞機能を制御するまでの過程を解明することは、細胞内の複雑な分子システムの理解に貢献すると期待される。本研究では神経細胞の軸索形態制御に着目し、局所的な分子の活性の変化が細胞内輸送、構造の安定性を制御する過程をモデル化する。本年度は主に神経軸索内の輸送分子の分布と軸索形態パターンを解析することで、両者に関連があることを示した。また、これらの動態を解析するためのタイムラプスイメージングの系を確立した。

2. 研究の背景と目的

近年の生命科学の進展により、細胞機能の制御に関わる多くの分子についての理解が進みつつある。これら分子の活性を制御することにより、バイオや医療の分野での様々な応用が可能になると期待される。しかし、分子細胞学分野における基礎的な知見の集積は同時に細胞機能の制御システムの複雑性を示してきた。とりわけ細胞内では、分子は均一なネットワークを形成しているのではなく、領域依存的に分子間相互作用が制御されると考えられる。本研究課題では神経細胞の軸索を対象とし、局所的な分子の活性が細胞内輸送、構造の安定性を制御する過程をモデル化することで、軸索変性の機序の理解や軸索再生の手法確立の基盤となる知見を得ることを目的とする。

神経回路の構成ユニットである神経細胞は方向性のある複雑な形態を有し、シナプスを介して互いに連絡することで信号の伝達を行う。入力端である樹状突起は通常細胞あたり複数本観察されるのに対して、出力端である軸索は 1〜2 本が細胞から伸展する。軸索は途中で枝分かれをすることで結果的に複数の細胞とシナプスを形成することが可能である。神経細胞の種類により軸索の分岐パターンは様々であり、またこのパターンは神経回路の発達の過程で再構築されることが知られている。軸索の分岐には複数の様式が報告されているが、多くの場合、既にある軸索から側枝として形成される。軸索の側枝形成や退縮・変性が起こる位置がどのように決定し、軸索の形態が維持されるかを理解することは神経回路の形成・維持機構を理解する上で重要な課題であるが、現在までに明らかにされていない点が多く残されている。このため、軸索分岐パターンの制御に関わる細胞内分子機構の解明を試みた。

3. 成果

局所的な神経突起形態を制御する重要な要因の一つとして、微小管を介した物質輸送システムがあげられる。キネシンは軸索輸送、軸索の伸長に重要な役割を担っていること、またキネシンのモーター領域を神経細胞内に発現させると、軸索を特異的に認識することが知られている。本年度は軸索の分岐パターンの制御にキネシンを介した物質輸送機構が関与する可能性について解析を行い、以下の研究成果を得た。

(1) 小脳顆粒細胞におけるキネシンモーター領域の局在。

小脳顆粒細胞の形態形成は海馬錐体細胞とは大きく異なっていると考えられている。小脳顆粒細胞にキネシンのモーター領域と GFP の融合タンパク質 (K5H-GFP) を発現させ、細胞内分布を観察したところ、軸索末端に局在することが観察された。このことから、キネシンによる軸索認識は特定の神経細胞に起こるものではなく、普遍的なものであることが示唆された。

(2) 分岐した軸索における輸送制御

次に各軸索分岐における K5H-GFP の蛍光強度比を定量し、各軸索の岐ごとのばらつきが偶発的な要因によるものか否かを解析した。もし偶発誤差によるものであれば蛍光強度比の頻度分布は正規分布とると予想されるが、解析の結果、隣接した枝で蛍光強度が 10 倍以上の差があるものが多数見られ、正規分布から大きく外れた分布をとることが確認された。このため未知の細胞内システムが存在し、K5H-GFP が軸索の特定の枝を選択するとうい新たな知見が得られた。

(3) 軸索輸送と軸索分岐パターンの関連性

各軸索分岐における K5H-GFP の蛍光強度を解析するのに加え、分岐した軸索のそれぞれの長さを定量し、軸索パターンの解析を行った。各軸索の枝における K5H-GFP の蛍光強度比と軸索枝の長さ比の間には正の相関関係がみられたことから、キネシンを介した輸送制御と軸索分岐パターンの間に因果関係が存在する可能性が示唆された。

(4) 軸索分岐解析のための実験系の確立

前述の過程を経時的に解析するために、本研究助成によりタイムラプスイメージングのセットアップを行い、小脳顆粒神経細胞の軸索形態および分子動態を長時間にわたり観察できる実験系の確立に成功した。

(5) 軸索分岐における標識因子の解析

軸索への特異的な輸送機構として複数の機構の存在が報告されている。その１つとして微小管を構成するチュブリンの翻訳後修飾が軸索と樹状突起で異なっており、これをキネシンが認識する機構が考えられる。本年度の予備的な解析で、軸索のそれぞれの枝においてチュブリンの翻訳後修飾の度合いに違いがあることが観察された。これまでの解析で、キネシンを特定の軸索枝に分配する機構が存在すること、これと軸索パターンに関連があることが示唆された。

公募

Local regulation of molecular reactions in maintaining axonal integrity

Yoshiyuki Konishi
Graduate school of Engineering, University of Fukui, Japan

Recent studies have identified that each cellular event is regulated through complex interactions of a large number of molecules. In addition, a single type of molecule often contributes to the multiple cellular events, depending on the situation. However, it is not fully understood about the system coordinating complicated cellular event, such as neuronal morphogenesis. In solving such cellular puzzle, we need to know more about the molecular-interactions generated in particular place of cells at particular time. The goal of this study is to elucidate molecular systems by which neurons process spatial information and deliver molecules or activate enzymes at right position at right time to establish and maintain the axons. We focused on the axonal branch morphology and tested the possibility that axonal transport might play roles to regulate the axonal branch pattern.

It is reported the motor domain of kinesin (K5H) is accumulated in axon in hippocampal neurons. When K5H-GFP was introduced in cerebellar granule neurons, it accumulated in axonal tip but not in dendrites as observed in hippocampal neurons. We next analyzed the signal intensity of K5H-GFP in each branched axonal terminal to test if K5H-GFP is randomly sorted to each branch terminal. Quantitative analysis revealed that frequency of relative signal intensity is not fit to a normal distribution, indicating that there is the active system by which K5H-GFP is transported to the particular axonal branches. Furthermore, we found that there is a positive correlation between signal intensity of K5H-GFP and axonal branch length, indicating the possibility that axonal branch pattern is regulated via axonal transport. To further investigate these phenomena, we set up the long-time time lapse imaging system of neurons to observe the axonal branch formation and axonal transport in the first year.

There are several factors reported to regulate the kinesin transport. The degree of post-translational modifications of tubulin that consist microtubules is different between dendrites and axons, and is thought to be involved in the polarized transport of kinesin. Preliminary results of current study indicated that the degree of microtubule modification is varied among axonal branches as well. Further study in the second year is expected to clarify whether microtubule modification is involved in the axonal branch morphogenesis and branch dependent transport.

公募

業績リスト

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 小西慶幸　「神経細胞の形態制御に関わる分子システム」　バイオインダストリー協会、大学発・選り抜きバイオセミナー　2013 年 3 月 15 日
2. 小西慶幸　「神経細胞の形づくりの機構－分子細胞生物学的視点から」形の科学会　2012 年 6 月 16 日
3. 小西慶幸「脳神経回路の再構築をめざして」　FBC ラジオキャンパス　2012 年 6 月 9 日

歩くナノ〇〇計の創成

研究代表者：早稲田大学重点領域研究機構・
早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所　鈴木 団

1. 研究の概要

本研究では、生きた細胞の中で生じるダイナミックな過渡応答を連続して計測したい。そのために、標的タンパク質の位置情報に加え、局所的な環境情報を同時に得られるプローブを新規に開発し、また計測系を構築することを目的としている。化学・生物学・物理学の分野間フィードバックを繰り返し、実践的なプローブとして完成する。本年度はこのプローブを構成するモジュールうち、標的タンパク質を選択的にラベルする手法を開発したので、以下に報告する。

2. 研究の背景と目的

巨大なケミカルライブラリーをスクリーニングする手法は、触媒化学、材料化学、医薬品化学の分野で開発されてきた。近年になって、標的やライブラリーをラベル化することなく、高いスループットでスクリーニングできる可能性がある手法として、エレクトロスプレーイオン化質量分析法（electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS）への期待が高まっている。すでに触媒化学分野のスクリーニングにおいては、反応中間体に関する研究で用いられている。この方法を用いることで、ライブラリー内にある非共有結合のリガンド・ターゲット複合体に関する情報について、各リガンドを精製すること無く得ることができる。新井らはこれまでに、リガンドと標的の非共有結合を介した複合体の気相での安定性と、溶液中での解離定数（K_D）との相関について、イオントラップ ESI-MS 法をもとにした衝突誘起解離法（collision activated dissociation）を用いて解析を進めていた［Arai *et al.*, *Rapid Commun Mass Spectro* (2004), Arai *et al.*, *Bull Chem Soc Jpn* (2005)］。しかしながら、気体状態での安定性と溶液中での速度論的パラメータ（k_{on} と k_{off}）との関係は明らかにされていなかった。

3. 成果

そこで本研究において、ターゲット分子を 6 量体のヒスチジンタグ（His-tag）に選び、これとの親和性が高いリガンドをスクリーニングすることで、上記の関係を調べた。His-tag をターゲットにするリガンドのライブラリーは、反応性が高いクリックケミストリーによる手法を用いて合成した。複数のリガンドが含まれる溶液中に、標的の

His-tag を混合し、生じた複数の複合体それぞれについて気相系での安定性を算出した。結果として、非対称な構造を有するある一つのリガンドが、気相系でもっとも安定に His-tag と結合している化合物として見出された。更に、気相での複合体が安定であればあるほど、溶液中での解離速度（k_{off}）が低下する傾向のあることが分かった。最終的に、このスクリーニングで得られた最も解離速度の遅いリガンドを備えた蛍光プローブを作成し、アクチンフィラメント上を歩行運動する His-tag 付きのミオシン V の一分子観察が可能であることを示した。本スクリーニングで用いられた手法は効果的な医薬品開発に大きく貢献しうるものである。なぜなら k_{off} は、薬効を予測する際に有効なパラメータの一つとして広く認知されているからである。

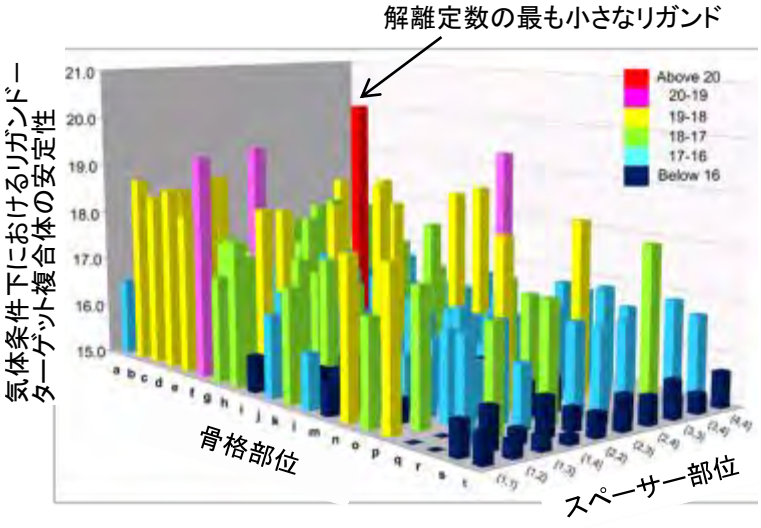


図１．イオントラップ ESI-MS 法による、リガンドの混合ライブラリーのスクリーニング。200 種のリガンドからなるライブラリーについて得られた安定性の指標（グラフの縦軸）を 6 つのカテゴリー（<16%, 16-17%, 17-18%, 18-19%, 19-20%, >20%）に分けて色分けし

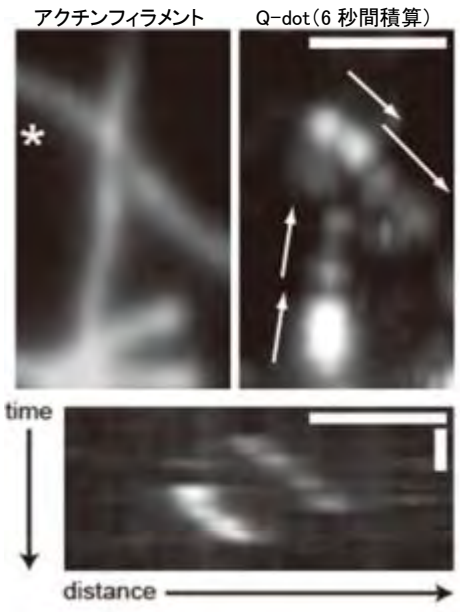


図２．ミオシン V の一分子イメージング。上左；アクチンフィラメントの蛍光像。上右；Q-dot 蛍光像の 6 秒間積算画像。アクチンフィラメントに沿った 4 つの Q-dot の動きが白線として見られる（白矢印の向き）。下；上で＊印で示すアクチンフィラメントに沿った Q-dot 像のカイモグラフ。横のスケールバー；2μm。縦のスケールバー；1 秒。

公募

Development of walking nano-*-meters

Madoka Suzuki
Organization for University Research Initiatives,
Waseda Bioscience Research Institute in Singapore,
Waseda University, Japan

Studies in cell biology and developmental biology have posted questions which should be tested in live cells and animal models. To approach these problems, it is required to capture a series of snapshots of the dynamic processes such as cell division, active transport of organelles and the gathering and scattering of proteins. In the meantime, the inside of a cell is filled with soluble proteins, cell cytoskeletons, organelles and other biological materials. These components create a cellular environment which is different from diluted conditions. Furthermore, the intracellular parameters such as Ca^{2+}, ionic strength and pH are fluctuated both in space and in time during cellular activities.

In this study, we will develop a new method to quantify the intracellular environment that is sensitive to specific parameters but not to others. Also, the method will have enough high spatial and temporal resolutions. This method enables us to clarify the relationship between the activity and the change in the cellular environment at the sub-cellular level.

This research stands on a combination of three components; 1) development of a new probe, 2) development of an optical microscopy system which fits with 1), and 3) evaluation of 1) in the *in vitro* (purified proteins) and *in vivo* (cells). We repeat this cycle of development, so that the probe and the measurement apparatus appropriate for the probe will be developed as a pair.

In this FY2012, we found the ligand which specifically labels the target molecule. We reported a convenient screening method using ion trap electrospray ionization mass spectrometry to classify ligands to a target molecule in terms of kinetic parameters. We demonstrated this method in the screening of ligands to a hexahistidine tag from a pooled library synthesized by click chemistry. The ion trap mass spectrometry analysis revealed that higher stabilities of ligand-target complexes in the gas phase were related to lower dissociation rate constants, i.e., off-rates in solution. Finally, we prepared a fluorescent probe utilizing the ligand with lowest off-rate and succeeded in performing single molecule observations of hexahistidine-tagged myosin V walking on actin filaments.

公募

業績リスト

学術論文

1. Satoshi Arai, Shota Hirosawa, Yusuke Oguchi, Madoka Suzuki, Atsushi Murata, Shin'ichi Ishiwata and Shinji Takeoka Mass Spectrometric Screening of Ligands with Lower Off-rate from a Clicked-based Pooled Library *ACS Comb. Sci.* **14(8)**, 451-455 (2012)

総説・解説・成書

（該当無し）

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Best Poster Presentation Award, "Fluorescent nanoparticles for the temperature measurement inside living cells with spatiotemporal resolution." The 2012 Small Sciences Symposium -Frontiers in Nanomedicine-, Singapore, 2012 年 12 月 10-12 日

公募

抗原ペプチドナノファイバーの形態に由来するキャリア機能探索と樹状細胞機能の理解

研究代表者：京都工芸繊維大学工芸科学部　田中　直毅

1. 研究の概要

がんペプチドワクチン療法は、患者への負担や副作用が小さいことから、従来法に代わる新たながん治療法として注目されている。効率的ながん免疫誘導のためには、抗原ペプチドを抗原提示細胞の細胞質に送達することが重要である。本研究では、抗原ペプチドを細胞質に高効率に送達するシステムの構築を目的として、抗原を担持したナノファイバーの作製とその細胞取り込みについて評価した。その結果より、ナノファイバーは細胞膜への貫入を経て細胞膜内もしくは細胞内へと取り込まれることが示唆された。

2. 研究の背景と目的

薬物や抗原をターゲット細胞に効率的に送達するデリバリーシステムの構築を目的として、高分子ナノ粒子やリポソームなどの球状キャリアの開発が活発に進められてきた。近年、キャリアの形態は①体内動態、②細胞による取り込み、③細胞内での局在などに影響を与える重要な因子であることが明らかとされ、球状のみならず異方性形態を持つナノ構造体が DDS キャリアとして注目されている。しかし、その報告例は少なく、形態とキャリア機能との相関に関する知見はまだ十分に蓄積されていない。

我々は異方性キャリアとして、①高いアスペクト比、②設計の自在性および③生体適合性を有する点に着目し、β-シートペプチドの自己組織化により形成するペプチドナノファイバーを選択した。本研究では、ナノファイバーの形態に基づく新規な DDS キャリア機能を探索するとともに、その得られた知見を基にした新規な抗原デリバリーシステムを開発することを目的とする。具体的には、β–シートナノ会合体の構造を精密に制御し、その形態や構造の違いが抗原提示細胞との相互作用 (取り込み機構や細胞内動態) および免疫機能 (成熟化能や抗原提示能) に与える影響について詳細な評価を行う。本年度は、ナノファイバーをキャリアに用いることで抗原ペプチドを細胞質へと直接送達するシステムを構築することが可能であるかどうかを調べることを目的として、表面組成の異なる抗原担持ペプチドナノファイバーを作製し、その細胞による取り込み挙動について評価した。

3. 成果

<u>抗原を担持させたβ-シートペプチドナノファイバーの作製と構造解析</u>

ナノ会合体のビルディングブロックとして、線維形成配列 (FVIFLD)[1] にモデル抗原配列 (OVA, $_{257}$SIINFEKL$_{264}$) と親水性配列 (TAT, $_{49}$RKKRRQRRR$_{57}$ もしくはオリゴエチレングリコール, EG$_{12}$) をスペーサー配列 (GSG) を介して導入した 2 種類のペプチドを設計、合成した

(Table 1)。このペプチドの PBS 中での自己組織化を利用して、抗原ペプチドを担持させたナノファイバーを作製した。得られたナノファイバーの線維高さおよび線維幅は、β-OVA-EG_{12}では4.0 ± 0.7 nmおよび5.8 ± 0.8 nm、β -OVA-TAT では 3.8 ± 0.5 nm および 7.2 ± 0.9 nm であるとTEM 観察および AFM 観察より見積もられた。FT-IR スペクトルからは、β-ストランド構造に由来するピーク (1631 cm^{-1}) およびランダム構造に由来するピーク (1656 cm^{-1}) が認められた。また、それらのピーク面積比より、線維形成配列 (FVIFLD) がβ-ストランド構造をとり、スペーサー配列 (GSG) と抗原配列 (SIINFEKL) はランダム構造をとることが示唆された。ナノファイバーの WAXD 測定からは、β-シート構造における水素結合距離およびシート面間隔に対応する 2θ = 18.7 º (d = 0.47 nm) および 2θ = 7.7 º (d = 1.15 nm) に回折ピークが得られた。以上の結果およびビルディングブロックペプチドとナノファイバーのディメンションの比較により、得られたペプチドナノファイバーは Fig.2 に示すように、線維形成配列がβ–シート構造からなる骨格を形成し、それを抗原鎖および親水性鎖が覆うような構造を持つことが示唆された (Fig. 2)。

Table 1. Peptide Used in This Study

β-OVA-EG_{12}	FVIFLDGSGSIINFEKL–oligoEG_{12}
β-OVA-TAT	FVIFLDGSGSIINFEKLRKKRRQRRR

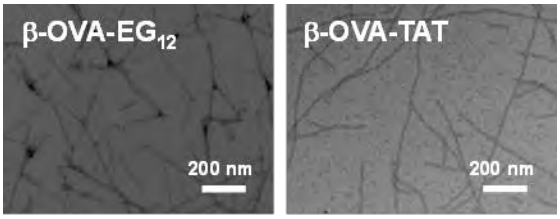


Figure 1. TEM images of peptide nanofibers consisting of β-OVA-EG_{12} and β-OVA-TAT.

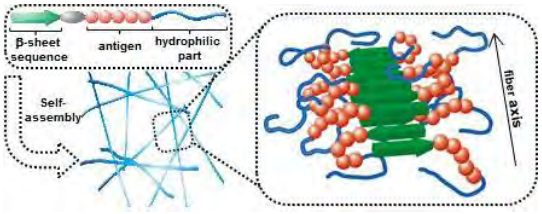


Figure 2. Schematic illustration of antigen-loaded peptide nanofibers.

<u>抗原を担持させたβ -シートペプチドナノファイバーの細胞による取り込み</u>

蛍光標識したβ-OVA-EG_{12}およびβ-OVA-TAT ナノファイバー共存下、RAW264 (マウス由来マクロファージ細胞) 細胞を 30 分、37ºC で培養し、このときの細胞取り込みを共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により観察した。β-OVA-TAT ナノファイバーを取り込ませた細胞の顕微鏡像からはドット状の蛍光シグナルが得られたのに対して、β-OVA-EG_{12} ナノファイバーを取り込ませた場合には、細胞内部からの蛍光シグナルに加えて細胞膜近傍からの蛍光シグナルが観察された。更に、この細胞膜近傍からの蛍光シグナルは、エンドサイトーシス阻害条件である 4 ºC でβ-OVA-EG_{12} ナノファイバーの取り込みを行った場合にも観察された。以上の結果より、β-OVA-EG_{12} ナノファイバーは球状のナノ粒子とは異なって、細胞膜内への貫入を経て細胞膜内もしくは細胞内と取り込まれる可能性が示唆された。

Reference

1. Fukuhara S. , Nishigaki T., Miyata K., Tsuchiya N., Waku T., Tanaka N. ***Biochemistry*** **51**, 5394 (2012).

公募

Novel Bio-function of Antigen-loaded Peptide Nanoassemblies with Anisotropic Morphology

Naoki TANAKA
Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology

Non-spherical particles, such as nanorods, nanotubes, and nanofibers, have attracted much attention as drug delivery carrier, since the particle shape may have a profound effect on their biological properties, such as bio-distribution, cellular uptake, and intracellular localization. Although the importance of controlling particle shape for nanomedicine applications is recognized, there still is a lack of systematic and fundamental understanding of how shape affects the biological properties.

Synthetic immunogenic peptides are ideal vaccine subunit components for cancer immunotherapy due to advances in safety, stability, and design. However, peptides on their own tend to be weak immunogens when administered alone. Cytoplasmic delivery system of antigenic peptides has been required for effective cancer immunotherapy.

In this study, we develop the direct cytoplasmic delivery system of antigenic peptides by using β-sheet peptide nano-assembries as carriers. The preparation of antigenic peptide-loaded nanofibers by self-assembly of β-sheet peptide containing T-cell epitope and hydrophilic block, and their cellular uptake are reported.

Two kinds of peptide conjugates consisting of four distinctive segments are designed for construction of antigenic peptide-loaded nanofibers and are composed of a β-sheet assembly block (FVIFLD; β) , antigen block (^{257}SIINFEKL^{264}; $OVA_{49\text{-}57}$), a flexible- linker block (GSG), and a hydrophilic block (RKKRRQRRR; $Tat_{49\text{-}57}$ or oligo(ethylene glycol); $oligo(EG)_{12}$). The β-OVA-Tat and β-OVA-$(EG)_{12}$ solution in PBS was incubated at 60 ^{o}C for 24 hours, nanofibers with a width of ca. 5 nm were formed. To evaluate the uptake of β-OVA-Tat and β-OVA-$(EG)_{12}$ nanofibers by cells, RAW264 cells, murine macrophage-like cell line, were incubated with fluorescence-labeled nanofibers for 30 min at 37 ^{o}C. CLSM images of RAW264 cells taking up β-OVA-Tat nanofibers showed dot-like fluorescence signals, indicating endocytosis entry, while those of taking up β-OVA-$(EG)_{12}$ nanofibers showed fluorescence signals from cell-membrane in addition to internal signals, indicating localization of nanofibers around cell-membrane. Furthermore, when cellular uptake of β-OVA-$(EG)_{12}$ nanofibers were performed at 4 ^{o}C, the fluorescence signals from cell-membrane were also observed. These results indicate β-OVA-$(EG)_{12}$ nanofibers penetrate cell-membrane directly.

公募

業績リスト

学術論文

1. Fukuhara S., Nishigaki T., Miyata K., Tsuchiya N., Waku T., Tanaka N. ***Biochemistry*** **51**, 5394 (2012).

総説・解説・成書

1. 田中直毅 「機能性アミロイドのバイオナノテクノロジーへの応用」 高分子 (2012)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

公募

人工細胞系に構成した細胞膜受容体・細胞骨格複合ナノ装置の動作解析

研究代表者：三重大学工学研究科　湊元　幹太
連携研究者：名古屋大学理学研究科　瀧口　金吾

1. 研究の概要

細胞膜は、細胞内外のコミュニケーション場として、刺激の受容、細胞内伝達の開始、刺激への応答、などの現象と深く結びついている。この界面の分子系の一部分を人工的に構成する手段を開発し、機能発現を実現することを試み、脂質二分子膜ベシクル（細胞サイズリポソーム）をモデル実験の材料に用いて、細胞膜受容体などの膜タンパク質複合系の成分を、組換えウイルス粒子を組み上げのブロックとして利用し、膜機能を担う装置を再構成できないか、検討している。今年度は、インテグリンを中心に、発現ウイルス粒子の作出、使いやすいリポソーム作製法との組み合わせの検証を行った。

2. 研究の背景と目的

私たちのグループは、細胞に近似した膜構造を提供する、細胞サイズリンリポソームの上に、膜タンパク質複合系の要素を構成した人工細胞系の構築をめざして、研究を行ってきている。要素ごとに人工ベシクルへ送り込むことで再構成系を構築しようと考え、私たちは、バキュロウイルス出芽ウイルスエンベロープ粒子(BV）とリポソームとの間の膜融合用いる方法を考案した。この方法では、まず、膜タンパク質の cDNA をウイルスゲノムに組み換えた BV を作出し、昆虫細胞(Sf9)に感染・増幅させる。培養上清より、目的膜タンパク質を搭載した BV を回収する。これをエンドソーム pH 条件下、内在性膜融合誘起タンパク質（GP64）の活性を用いて、酸性脂質(PG, PS)含有リポソーム膜へ融合し、ベシクル上に目的タンパク質を組み込む。界面活性剤による可溶化が不要であり汎用性が高いと期待される。

私たちは、これまでに、細胞シグナル伝達経路の一つ、G タンパク質共役型受容体（GPCR）経路の要素や、細胞接着、細胞間連絡に与るタンパク質の構成実験を行った。いくつもの同一のサブユニットからなる膜タンパク質の組込に成功している。一方、複数の要素がダイナミックに作用しながら機能発現する系については、改善すべき点が多い。人工細胞ベースの機能発現アッセイの手法を確立するためには、新しいベシクル作製法への活用も重要である。本課題では、まずインテグリンを胞サイズリポソーム上で構成する、外部・内部の環境を自由に変えられる実験系を構築し、動作解析が可能となるような人工細胞系へ繋げて行くことを目的とする。

3. 成果

今年度は、目的とする系の機能再構成が可能となるよう、①効率的なベシクル形成とプロテオリポソームへの変換方法の構築、②細胞膜受容体再構成（インテグリン）の準備に取り組んだ。

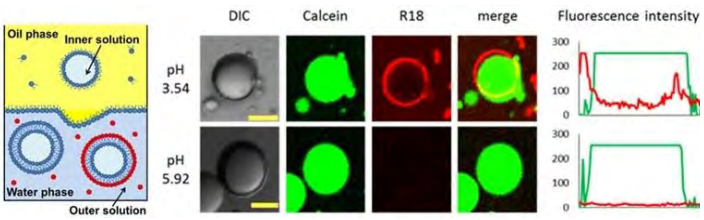


図 1：界面通過法リポソームと BV の膜融合

①細胞サイズリポソーム作製法として新たに連携研究者らが得意とする 界面通過法(droplet-transfer method)を採用した(図 1)。水／油界面に形成されたリン脂質単分子膜の張合わせで二分子膜ベシクルを形成、これまでの静置水和法で作製したリポソームとの融合検討を踏まえ、オクタデシルローダミン B (R18) 標識した野生型 BV と界面通過法により調製した PG を含むリポソームとの融合を、共焦点レーザー顕微鏡により単一ベシクルレベルで解析したところ、GP64 の融合能が発現する弱酸性 pH で内容物の漏出なく膜融合が観察された(図 1)。

②インテグリン α／β サブユニットアイソフォーム遺伝子のうち、ITGA2、ITGA3 および ITGB1 について C 末端側に蛍光タンパク質(TagGFP2、TagRFP)をタグ付した組換え遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを作出し、組換えタンパク質の発現を、宿主細胞膜上に確認した(図 2)。上記組合せを共感染させた細胞上清から回収した BV は蛍光顕微鏡下、ブラウン運動する個々の粒子として観測でき、両方の傾向が共局在することが分かった。現在、リポソーム膜上への融合と共発現によって構成されたタンパク質の会合の状況を FRET 等により詳細に調べている。さらに、個別に感染した細胞から回収した BV を混合融合しリポソーム上で複合体形成させることが可能か試験している。

今後、BV 融合により組み込んだ ITGA2/ITGB1、ITGA3/ITGB1 等の統合(integration)を、ベシクル膜上で実現し、コラーゲンや(G)RGD(S 配列との結合、膜上での拡散挙動などを検討し、内水相へ封入した細胞質側因子との相互作用が可能な人工細胞システムへと展開したい。

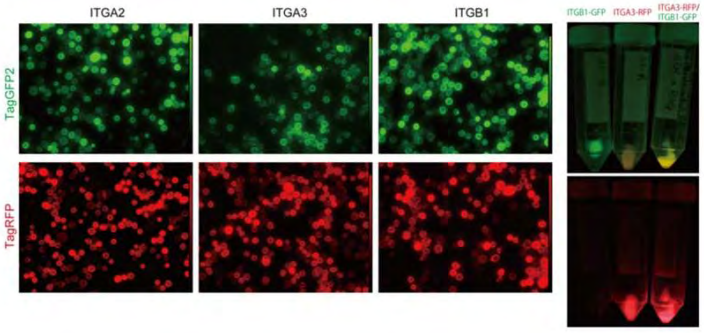


図 2:ITG 発現ウイルスに感染した宿主細胞

公募

Reconstitution of nanomerchinery with membrane receptor/cytoskeletal elements on artificial cell systems

Kanta Tsumoto
Kingo Takiguchi*
Graduate School of Engineering, Mie University, Japan
** Graduate School of Science, Nagoya University, Japan*

Cell-sized vesicles (giant liposomes or giant unilamellar vesicles (GUVs)), have been employed for reconstitution of cellular functions as artificial cell systems. Biological functions, including cell-cell and cell-matrix communications, are chiefly expressed by the nanomachinery of transmembrane proteins that work in transfer of cell signal molecules. By combining them, we attempt to construct GUV-based artificial cell systems with the reconstituted membrane proteins: As models, we have here chosen a system of transmembrane receptors (integrin (ITG) α/β) and cytoskeletal elements. The novel method for producing proteoliposomes based on a baculovirus/insect cell gene expression system would enable us to achieve the reconstitution of these recombinant transmembrane protein complex systems on GUVs at will. In this study, we have attempted to prepare GUVs with functional systems consisting of ITG and related recombinant proteins. Here, we try (i) to improve the experimental system in which single GUVs can be prepared using a droplet-transfer method and they can be fused with the budded virus particles displaying the recombinant proteins, and (ii) to construct recombinant baculovirus envelope particles expressing fluorescent protein-tagged ITG proteins.

The target gene encoding a human membrane protein with both the N-terminal signal peptide and C-terminal GFP/RFP was recombined into a transfer vector, and the vector and a linearized genome DNA of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) were transferred together into Sf9 cells. The transfected cells produced enveloped budded virus (BV) particles that expressed the target membrane proteins on their own envelope bilayers. The recombinant BVs were fused with GUVs containing acidic phospholipids (PG) at a weak acid condition (pH 4.0-5.5): the target membrane proteins could be incorporated into the GUVs. LSM observation shows that upon fusion induced at low pH, the membrane proteins reconstituted on GUVs prepared using a micro-emulsion droplet-transfer method without any leakage from inner aqueous phases of single GUVs.

Human integrin α/β (ITGA2, ITGA3, ITGB1) with a FP tag were expressed on infected cell membranes. ITGA/ITGB complex systems could be co-expressed when cells were co-infected with two types of baculovirus (ITGA3/ITGB1). In next step, we will combine these two methods to achieve reconstitution of GUVs that contain both integrin complexes on the membranes and cytoskeletal proteins within the inner compartments.

公募

業績リスト

学術論文

総説・解説・成書

1. 湊元幹太、冨田昌弘「次世代ハイブリドーマテクノロジー」次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線（熊谷泉監修） シーエムシー出版，10 章、197-202（2012）
2. Hisanori Yagami, Hiroshi Kato, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita, Monoclonal antibodies based on hybridoma technology *Pharmaceutical Patent Analyst* **2,** 249-263 (2013).

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 湊元幹太「バキュロウイルスを用いる人工細胞構築：少数要素による細胞的機能の発現をめざして」日本化学会生体機能関連化学部会若手の会 第 24 回サマースクール(2013)
2. Kanta Tsumoto, Misako Nishigami, Takaaki Mori, Masahiro Tomita「Application of the Baculovirus-Liposome Membrane Fusion to Reconstitution of Membrane Protein Systems toward Functional Artificial Cells」 6th International Symposium on Nanomedicine (ISNM)(2012)
3. 湊元幹太「人工膜系への細胞膜シグナル伝達経路構築とその機能評価」平成 24 年度物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究 バイオ分子集積体・バイオ界面の機能的構築のための分子分解能解析研究集会（2013）

公募

幹細胞制御機能を有するタンパク質担持基材の分子設計

研究代表者：富山大学先端ライフサイエンス拠点　中路　正

1. 研究の概要

幹/前駆細胞の増殖や分化を制御できるような材料の開発は、幹細胞医療の実現、難治疾患再生医療の発展に不可欠である。これまでに、タンパク質－高分子複合体が、幹/前駆細胞を厳密に制御できることを見出してきており、材料の高い有用性を示してきたが、基材に固定したタンパク質の細胞への作用に関して不明瞭な点が多々存在する。そこで、生物学的評価と分光学的評価を併用して、基材固定タンパク質の細胞制御メカニズムの全容を理解することを目的とした。これまでの知見として、基材固定タンパク質は、遊離で作用するタンパク質よりも、シグナル伝達量が多いこと、また、継続的なシグナル伝達を行っていることを示唆する結果が得られた。

2. 研究の背景と目的

再生医療の発展に向けた幹細胞の利用において、幹細胞の機能を厳密に制御できるような技術開発が必要不可欠である。本研究者は、幹細胞の自在な制御を目指し、機能タンパク質を担持させた材料創製に関する研究に取り組み、タンパク質担持材料を用いることで、幹細胞の増殖や分化を効率良く制御できることを見出した。

しかしながら、タンパク質担持材料を用いることによって細胞機能を効率良く制御できる理由について、すべてが明らかになっているわけではない。これまでに我々は、(i)安定したアンカーリング、(ii)レセプターと反応しやすい向きでのアンカーリング、そして、(iii)アンカーリングに伴う活性維持 の三点が、固定タンパク質の有意性であることを明らかにした。しかしながら、固定タンパク質がどのような経緯で、溶液中での作用よりも優位に働いているのかなど、理解できていない部分が多々存在する。特に、固定タンパク質の有意性の一つとして考えられている、基材への担持によってタンパク質が細胞内に取り込まれにくくなることによって継続的なシグナル伝達が起こっているという点は、証拠が未だ存在しない。さらに、生物学的には、機能タンパク質は細胞膜レセプターに結合後、取り込まれることによってはじめてシグナル伝達を行うと考えられており、見解が大きく乖離している。これらの点は、固定タンパク質のメカニズムの不明瞭さととらえられ、タンパク質担持材料の実用化にとって足枷となる。

そこで本研究課題では、(1) 基材担持タンパク質の細胞への作用機序とシグナル伝達経路の解明、(2) 作用タンパク質の運命（細胞内への取込みの有無）といった固定タンパク質が細胞機能を制御するまでにたどる過程について、一連の流れを理解することを目的とし研究を展開した。

3. 成果

基材固定タンパク質が細胞を制御するメカニズムを、生物学的評価、分光学的評価および蛍光顕微鏡を用いたタンパク質の直接追跡による評価を併用することで理解することを目指している。24 年度は、主に生物学的評価を中心として研究を進めるとともに、蛍光顕微鏡を応用した固定タンパク質直接追跡のためのタンパク質合成を行った。

蛍光ラベル化タンパク質の合成

細胞と相互作用した基材固定タンパク質の直接追跡に用いる基材固定タンパク質には、神経幹前駆細胞の増殖および未分化維持をになる表皮増殖因子 (EGF) にオリゴヒスチジン (His) を融合したキメラタンパク質 (EGF-His) を用いることとし、遺伝子工学的手法を応用して合成した。そして、活性エステル化法を利用して Alexa fluor 594 (A594) を修飾 (A594-EGF-His) した。 A594 修飾後でも、活性は維持されていた。

基材固定タンパク質濃度と細胞制御効率との関係

モデル細胞として神経幹/前駆細胞 (NSPC) を用い、モデルタンパク質としてオリゴヒスチジン融合脳由来神経栄養因子 (BDNF-His) を用いて、NSPC の分化効率から固定タンパク質の作用について検討を行った。この評価では、遊離タンパク質の作用との比較、さらに、細胞への作用濃度による影響についても検討した。その結果、一般的に過剰な添加量と言われる 200 ng/mL BDNF 中で培養した細胞の神経分化効率に比べ、基材固定 BDNF の方が、作用量が極めて低いにも関わらず、2.5 倍超の分化誘導効率を持つことが分かった。この結果は、タンパク質が固定されていることによる、「高局所濃度」による効果だけではなく、タンパク質が固定されていることによるシグナル伝達効率への影響が考えられる。

基材固定タンパク質のシグナル伝達評価

神経幹/前駆細胞 (NSPC) をモデル細胞として用い、オリゴヒスチジン融合表皮増殖因子 (EGF-His) をモデルタンパク質として用いて、固定タンパク質から細胞へのシグナル伝達について評価した。RT-PCR による EGF 受容体の mRNA 発現および Western blotting による EGF 受容体のリン酸化を評価したところ、基材固定 EGF に作用させた細胞では、リン酸化受容体量が、遊離 EGF に作用させた細胞のリン酸化受容体量よりも 3 倍以上多いことが分かり、また、遊離 EGF 作用の細胞の受容体リン酸化は、EGF 作用後 4 時間で消失するのに対し、固定 EGF 作用の細胞の受容体リン酸化は、培養 4 日後でも継続して存在することが分かった。一方、固定 EGF を作用させた細胞における mRNA の発現が、固定 EGF 作用時間 (3, 6, 24, 48, 60, 72 h) に伴い、極度に減少していることが分かった。これらの結果から、固定タンパク質が作用した場合の受容体は取り込まれにくくなり、細胞膜表面にとどまることで、受容体の追加発現が不必要となるため、mRNA の発現の極度のダウンレギュレーションが起こっているのではないかという仮説を立てた。つまり、この結果は、固定タンパク質の継続的なシグナル伝達を示唆する重要な結果ではないかと考える。

公募

Molecular designing of protein-immobilized materials for regulating stem cell function

Tadashi Nakaji-Hirabayashi*
Frontier Research Core for Life Sciences, University of Toyama, Japan

Application of stem cells is important for development of regenerative medicine. However, the development of technique to strictly regulate the functioning of stem cells is necessary for its clinical application. We have designed biomaterials conjugated with functional proteins for regulating the stem cell morphology. For example, glass substrate and hydrogel immobilized with proteins were developed to regulate growth and differentiation of stem cells by applying the characteristics of chimeric proteins. However, the action mechanism of the immobilized proteins isn't demonstrated clearly. These unclear points will constitute a serious obstacle to apply the protein-modified materials for clinical applications.

We have demonstrated three important points concerning action mechanism of the immobilized proteins; (1) stable immobilization (anchoring) of proteins to the substrate, (2) orientation of the immobilized proteins to easily react to receptor, (3) activity of proteins immobilized to substrate. ([1] Nakaji-Hirabayashi, T. et al. Biomateirals 29, 4403-4408 (2008), [2] Nakaji-Hirabayashi, T. et al. Bioconjugate Chem. 20, 102-110 (2009)) Moreover, it was shown that the immobilized proteins efficiently gave signaling to the cells in comparison with soluble proteins. However, it cannot be understood by what mechanism the immobilized proteins transduce the signaling to the cells. To clearly understand the action mechanism of the immobilized proteins, we evaluated the signaling transduction from immobilized proteins to cells and the uptake of immobilized proteins by cells after signal transduction.

To investigate the mechanism of cell regulation with protein immobilized to substrate, epidermal growth factor (EGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) fused with oligohistidine (His) were used as the model proteins (EGF-His and BDNF-His, respectively). EGF-His was labeled with Alexa Fluor 594 (A594) using Active Esterification for tracing the protein reacted to receptor on cell membrane with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Moreover, neural stem/progenitor cells (NSPCs) were used for the assay concerning signaling transduction with immobilized EGF or BDNF. In this year, I investigated about signal transduction with protein immobilized to substrate by cell differentiation assay, mRNA expression assay, and receptor phosphorylation analysis. From these results, it was suggested that cells continuously receive the signaling from immobilized protein. To confirm my notion, the release of immobilized protein from substrate will be investigated using TIRFM and CLSM. Moreover, the interaction between the immobilized protein and receptor will be traced using infrared spectroscopy.

公募

業績リスト

学術論文

該当なし

総説・解説・成書

該当なし

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

招待講演

1. 中路　正,「幹細胞医療の実現に貢献するためのタンパク質複合化高分子材料の創製」, 第 2 回医薬・バイオ応用を目指した高分子ナノ構造研究会, 富山（平成 24 年 11 月 21 日）

学会での成果発表

1. 中路　正,「神経分化誘導にとって最適な細胞外環境構築のための材料特性の探索」, 第 61 回高分子学会北陸支部研究発表会, C19, 福井（平成 24 年 11 月 18 日）

公募

細胞内酵素反応を定量的に解析するための ナノプローブの開発

研究代表者：京都大学エネルギー理工学研究所　中田　栄司

1. 研究の概要

細胞の中で活動する酵素は、その姿形を細胞内で直接捉えることはできないが、様々な生命機能に関与しており、生命機能を理解する上で非常に重要であることは疑う余地もない。さらにそれを利用した医療応用などを目指し、細胞機能を人の手で操作するためには、その存在と活性の度合いを検出することは非常に重要である。我々は、その見えない存在・活性を細胞機能を損なうことなく直接観察するための自己集合型ナノプローブの開発をおこなっている。今年度は、様々な自己集合型ナノプローブを合成し、構造とプローブ活性の相関関係について評価した。また、細胞内での自己集合型ナノプローブの動態の観察とその取り込み機構を明らかにすることに成功した。

2. 研究の背景と目的

生体を構成し生命活動を司る細胞環境において、酵素が関与する生体反応は、生命機能を理解する上で重要である。また、ドラッグデリバリーシステムでのナノキャリアからの薬剤放出のトリガーとしてなど、ナノメディシンにおける細胞機能制御や医療応用の鍵物質としても、酵素は非常に重要な意味を持っている。そのため、これら酵素反応を非侵襲的に可視化し、分子レベルで理解することは、そのシステムを有効に利用するための基礎的知見として不可欠である。

我々は自己集合した蛍光色素誘導体が細胞内酵素との反応をトリガーとして分散することを基本原理とした、OFF/ON のスイッチングが可能な自己集合型ナノプローブの開発に成功している。[1] 具体的には、キサンテン骨格を有する蛍光色素の一種である SNARF に対して細胞内酵素との特異的な反応により脱離する置換基を修飾することで、水溶液中において 100 nm 程度の非蛍光性の自己集合体を形成することができる。この置換基が、酵素反応を経て脱離することで、自己集合体は速やかに分散し、単体となった蛍光色素が蛍光性を回復するという原理である。これまでに導入する置換基をスクリーニングすることにより、どのような化学的特性を有する置換基を導入した際に自己集合体を形成するのかという構造活性相関を評価し、自己集合型ナノプローブの合理的設計法(第一世代)の確立に成功している。本年度は、この構造活性相関をさらに展開し、同一の置換基であっても、導入する位置を変化させた際に自己集合型ナノプローブを形成することが可能であるのかを評価した。また、蛍光色素骨格を変化させた場合に、どのような影響があるのかについても評価をおこなった。さらに、第一世代の自己集合型ナノプローブを用いて、細胞内酵素反応を検出する事は確認できていたが、どのよう

なメカニズムによって細胞内に取り込まれ作用するのかについて詳細な評価をおこなった。

3. 成果

○自己集合型ナノプローブの構造活性相関 (第二世代・第三世代)

これまで第一世代の自己集合型ナノプローブとして、SNARF のフェノール性水酸基に対して、様々な置換基を導入し評価をおこなっており、SNARF を基本骨格とした自己集合型ナノプローブの合理的設計戦略を獲得することに成功している。今後この自己集合型ナノプローブをさらに拡張していくうえで、蛍光色素骨格への修飾が自己集合体の形成にどのような影響を及ぼすのかについての知見が、非常に重要である。そこで SNARF 骨格の異なる位置に同一の置換基を導入した誘導体を合成し、その自己集合化能を評価した。導入する置換基としては、*p*-ニトロフェニル基を選択した。これは、第一世代の自己集合型ナノプローブとして良好な自己集合体を形成し、高活性なニトロ還元酵素との反応性が既に確認できており、細胞内においても機能することが確認できている事が挙げられる。実際に第二世代の自己集合型ナノプローブの自己集合性およびそのニトロ還元酵素との反応性について試験管内で詳細に評価をおこなった。また、蛍光色素骨格を SNARF から、Rhodol または Fluorescein へと拡張することで、自己集合体の形成の有無およびその反応性についても評価した(第三世代)。これらの知見を基に、レシオ検出が可能な蛍光性ナノプローブを設計し、細胞内酵素反応のリアルタイム検出をおこなうべく、評価をしている。

○自己集合型蛍光性ナノプローブの細胞内動態解析の詳細評価

自己集合型蛍光性ナノプローブの細胞内動態を解析するために、異なる波長を有する蛍光色素を自己集合化可能な蛍光色素 SNARF に導入した化合物を設計・合成した。その化合物は、自己集合化した状態でも新たに導入した蛍光色素由来の蛍光が観察されるため、蛍光色素の自己集合化状態を追跡できる。さらに、分散状態では両方の蛍光色素の蛍光が観測されるため、自己集合状態と比べると色調が変化することになる。そのため、自己集合体の状態変化をレシオ検出することができる。そこでこの化合物を実際に用いての細胞内動態を評価した。その結果、この自己集合型蛍光性ナノプローブは、細胞内においても自己集合体として存在していることが明らかとなった。また、その取り込み機構の詳細を特定の細胞内物質取り込み機構を阻害剤で抑制することで、評価し、経路の特定をおこなうことに成功した。

[1] a) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.,* **17**, 6952 (2009). b) E. Nakata, et al., *Chem. Comm.,* **46**, 3526 (2010). c) E. Nakata, et al., *Chem. Lett.,* **39**, 734 (2010) d) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.,* **21**, 1663 (2011).

公募

Development of self-assembled fluorescent nano probe for detecting enzymatic activity

Eiji Nakata
Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan

Fluorescence imaging is one of the powerful techniques for continuous observation of dynamic intracellular processes of living cells. Fluorescent probes bearing a fluorescence switching property associated with a specific recognition or reaction of target biomolecule are therefore important for fluorescence imaging. However the variation of visualizable biomolecule is still limited because of the shortage of rational design strategies for fluorescent probes. Recently, we developed a novel strategy to control the fluorescent property of asymmetric xanthene scaffold, such as SNARF, that enables rational design of fluorescent probe to monitor the cellular enzymatic activity.[1] The mechanism underlying the fluorescence off/on switching of SNARF is based on the lactone formation under a hydrophobic condition. A certain kind of SNARF derivatives formed self-assembly in an aqueous condition and existed as the lactone form. We explored the structure-activity relationship of the SNARF derivatives and developed a rational design strategy for self-assembled fluorescent nano probes (as called 1st generation). Therefore, we focused on the structure-activity relationship of SNARF derivatives (as called 2nd generation) and the other xanthene scaffolds (as called 3rd generation) to expand this strategy, where fluorescent nano probes to monitor nitroreductase activity were investigated as the model system. In addition, we focused on determining the mechanism of the cellular penetration of the fluorescent nano probe. To achieve such purposes, the ratiometric fluorescent nano probes were designed. Combining with the ratiometric fluorescent nano probe, organelle specific fluorescent dye and inhibitors, the mechanism of cellular penetration and the intracellular orientation of the ratiometric fluorescent nano probes were confirmed. Based on this knowledge, we would like to design a ratiometric fluorescent nano probe for specific enzyme and monitor the enzymatic activity in the cell in a ratiometric manner.

[1] a) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.,* **17**, 6952 (2009). b) E. Nakata, et al., *Chem. Comm.,* **46**, 3526 (2010). c) E. Nakata, et al., *Chem. Lett.,* **39**, 734 (2010) d) E. Nakata, et al., *Bioorg. Med. Chem.,* **21**, 1663 (2011).

公募

業績リスト

学術論文

1. Chiara Annoni, Eiji Nakata, Tomoki Tamura Fong Fong Liew, Shun Nakano, Maria Luisa Gelmi, Takashi Morii, Construction of Ratiometric Fluorescent Sensors by Ribonucleopeptides ***Org. Biomol. Chem.***, 10, 8767-8769(2012).
2. Katsuhiko Matsumoto, Eiji Nakata, Tomoki Tamura, Isao Saito, Yasunori Aizawa, Takashi Morii, A Peptide Nucleic Acid (PNA) Heteroduplex Probe Containing an Inosine-Cytosine Base Pair Discriminates a Single-Nucleotide Difference in RNA *Chem. Eur. J.* in press

総説・解説・成書

1. 中田 栄司, 森井 孝
   タンパク質ベースの蛍光バイオセンサー, ここまで進んだバイオセンシング・イメージング（分担執筆), 日本化学会 編著, 東京, 2012 年 11 月.

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 中田 栄司 京都大学エネルギー理工学研究所 平成 24 年度研究奨励賞

公募

三光子励起自家蛍光寿命イメージングを用いた細胞内環境変化のその場測定

研究代表者：北海道大学電子科学研究所　中林　孝和

1. 研究の概要

細胞内に元から存在する物質の蛍光(自家蛍光)を用いることによって，細胞内の状態を無染色で評価できる。本年度は，自家蛍光物質の蛍光寿命を画像化するイメージングシステム(AFLIM)を製作し，代表的な自家蛍光成分である FAD の AFLIM を用いた細胞内 pH 計測について検討した。FAD の蛍光寿命が細胞内 pH の増加に対して減少することを示し，細胞内の FAD の自家蛍光寿命を用いて，細胞内 pH を無染色で画像化できることを提案した。

2. 研究の背景と目的

本研究は，三光子まで行うことができる多光子励起蛍光寿命イメージングシステム(Fluorescence lifetime imaging, FLIM)を製作し，生体試料を染色することなく，生体内に元から存在する蛍光物質の蛍光(Autofluorescence, 自家蛍光)を用いた細胞計測を目指す。蛍光寿命の値は光退色や光学系に依存しないことから，蛍光強度測定に比べて定量性に優れ，蛍光分子の周囲の環境変化を定量的に求めることができる。そこで，FLIM と自家蛍光を組み合わせた自家蛍光寿命イメージング(AFLIM)を用いることで，無染色での細胞内環境イメージング測定を行うことができる。自家蛍光を用いて定量測定を行うためには，自家蛍光成分の蛍光寿命と生理的条件との関係を理解しておくことが必須となる。そのために自家蛍光成分の蛍光寿命のイオン濃度依存性などの測定も系統的に行う。

3. 成果

【多光子励起 AFLIM の製作】一光子励起の AFLIM については製作を行い，以下に示す結果を得ることができた。多光子励起については，共焦点顕微鏡のビームスキャナ部分を多光子励起用のミラーに交換し，二光子励起による AFLIM を行うことができる。しかし，三光子励起の配置では，蛍光強度が小さくなり，自家蛍光寿命イメージングの測定には至っていない。現在，ステージスキャナ型に変更し，検出器にマイクロチャンネルプレート内蔵型光電子増倍管を用いて，三光子励起 AFLIM を検討している。トリプトファンの自家蛍光寿命イメージングによる細胞内環境計測を目指す。

【自家蛍光寿命を用いた細胞内 pH 測定】 我々は自家蛍光成分である NADH (Reduced nicotinamide adenine dinucleotide)の自家蛍光寿命を用いて，細胞内 pH を無染色で画像化できることを提案した(J. Phys. Chem. B 115 (2011) 10385)。我々の知る限りでは，

細胞内イオン濃度を無染色でイメージングした初めての例となる。本年度は NADH と同様に代表的な自家蛍光成分である FAD (Flavin adenine dinucleotide)の自家蛍光寿命を用いても細胞内 pH をその場で測定できることを提案した。緩衝溶液中と HeLa 細胞内における FAD の蛍光減衰曲線の pH 依存性を Fig. 1a と b に示す。細胞内では，イオノフォアを加えて細胞内外の pH を等しくさせており，細胞外の pH を調製することによって，細胞内の pH を変化させている。緩衝溶液中においては，FAD の蛍光減衰曲線の形状は pH に対して一定であり，緩衝溶液中では FAD の蛍光寿命は pH に依存しない。しかし，HeLa 細胞内では，細胞内 pH に応じて FAD の蛍光減衰曲線が変化し，細胞内 pH の増加に伴い蛍光寿命が減少することがわかった。蛍光寿命の値も細胞内と緩衝溶液中で大きく異なり，細胞内の蛍光寿命の値は，緩衝溶液中の半分以下になっている。細胞内では FAD はタンパク質と相互作用をしたフラビンタンパク質として主に存在しており，観測された細胞中の蛍光寿命の減少および蛍光寿命の細胞内 pH 依存性は，FAD とタンパク質との分子間相互作用の pH 変化を観測していると考えられる。細胞内での蛍光減衰曲線は 4 成分の指数関数にて再現され，平均蛍光寿命は，細胞内 pH が 5.0, 7.0, 9.0 においてそれぞれ 1.11 ns, 0.84 ns, 0.78 ns であった。HeLa 細胞中の FAD の AFLIM を Fig. 2 に示す。AFLIM においても細胞内 pH の増加に伴う FAD の自家蛍光寿命の減少を観測しており，FAD の蛍光寿命と細胞内 pH との間の検量線を作成することによって，FAD を用いた無染色での pH イメージングができることがわかった。本研究より，自家蛍光成分の蛍光寿命は細胞内 pH に対して敏感であり，用いる試料に応じて自家蛍光成分を選択し，細胞内 pH を無染色で可視化できることが示唆される。

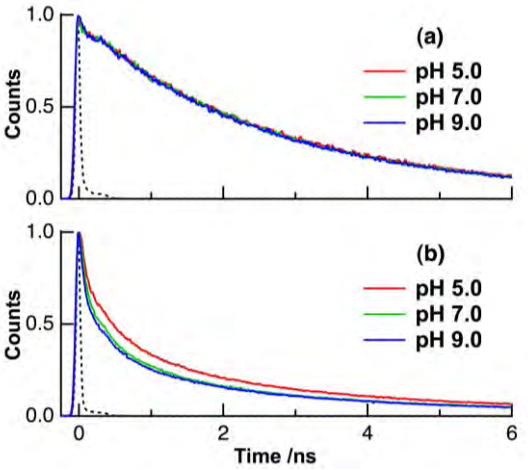


Fig. 1 Representative fluorescence decay profiles of FAD in buffer solution (a) and in HeLa cells (b) at different pH of 5.0, 7.0 and 9.0. Excitation and

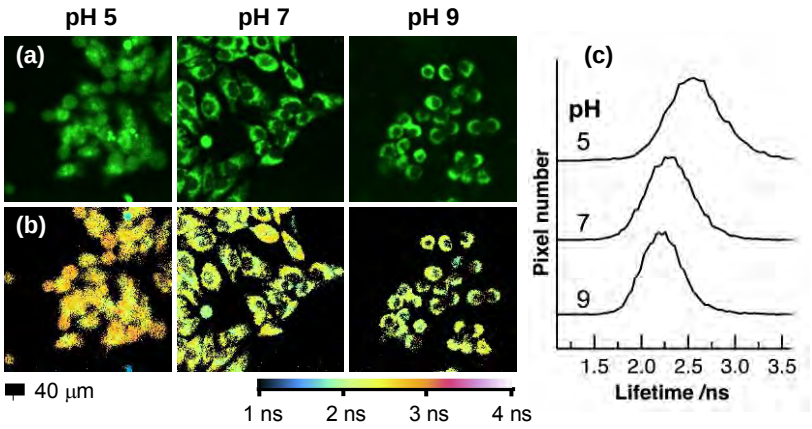


Fig. 2 Autofluorescence intensity images (**a**) and corresponding lifetime images (**b**) of HeLa cells at intracellular pH indicated at the top. (**c**) Intracellular pH dependence of

公募

Measurements of Changes in Intracellular Environment by Three-Photon Autofluorescence Lifetime Imaging Microscopy

Takakazu Nakabayashi
Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Japan

The purpose of the present project is to investigate intracellular environment using multi-photon autofluorescence lifetime imaging. Cells and tissues contain endogenous chromophores showing fluorescence called autofluorescence, and the use of autofluorescence for investigating cells maintains the original intracellular conditions without exogenous probes and enables diagnostic tests without staining time. Fluorescence lifetime is an inherent property of a chromophore and is independent of photobleaching, excitation power, and other factors that limit intensity measurements. Fluorescence lifetime imaging (FLIM) techniques therefore provide more quantitative information on intracellular environment compared with fluorescence intensity imaging. FLIM of autofluorescent chromophores (AFLIM) is a promising tool for understanding intracellular environment without dye labeling.

In the present period, pH dependence of the fluorescence lifetime of flavin adenine dinucleotide (FAD), that is a significant cofactor exhibiting autofluorescence, has been investigated in buffer solution and in cells. The fluorescence lifetime of FAD remained unchanged with pH 5 to 9 in buffer solution. However, the fluorescence lifetime in HeLa cells was found to decrease with increasing intracellular pH. FAD is regarded to exist in two forms in living systems that are referred to as protein-bound and free FAD, and picosecond-lifetime components assigned to protein-bound FAD were observed in autofluorescence of FAD in HeLa cells. The pre-exponential factor of the picosecond-lifetime component increases as intracellular pH increases, resulting in the reduction of the autofluorescence lifetime with the increase of intracellular pH. This result indicates that interaction between FAD and the enzyme to which it is bound depends on intracellular pH, which induces the pH-induced change in the non-radiative decay rate of FAD in HeLa cells. Fluorescence lifetime images of FAD in HeLa cells at different intracellular pH were measured using a time-gated detection method. It is shown that the fluorescence lifetime in the image becomes shorter as the intracellular pH increases. The peak of the histogram of the fluorescence lifetime obtained from the whole area of the image becomes shorter as the intracellular pH increases, which is in agreement with the results of the fluorescence decays. This result leads us to a conclusion that intracellular pH of a cell can be evaluated by AFLIM of FAD without adding exogenous probes. We believe that AFLIM can be applied to measure changes in intracellular pH with physiological processes such as apoptosis.

公募

業績リスト

学術論文

1. Md. Serajul Islam, Masato Honma, Takakazu Nakabayashi, Masataka Kinjo and Nobuhiro Ohta pH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1952-1963 (2013)

総説・解説・成書

1. 中林孝和、太田信廣 「自家蛍光寿命イメージングによる細胞観察」 生物物理 印刷中

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

（招待講演）

1. 中林孝和 「蛍光寿命イメージングを用いた細胞計測の展開」 日本分光学会平成 24 年度生細胞分光部会シンポジウム (2013)
2. T. Nakabayashi and N. Ohta, "Application of Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) to Measure Intracellular Environments" RIES-CIS Joint Symposium (2012)

公募

細胞ナノ領域と生体微小環境における
核酸送達システムの動態と機能発現解析

研究代表者：北海道大学大学院薬学研究院　畠山　浩人

1. 研究の概要

機能性核酸を癌疾患治療に応用するには、核酸を機能する場所である癌組織の癌細胞の中にまで届ける必要がある。そのため、効率的なドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発がボトルネックとなっている。癌組織中、癌細胞の中の３次元空間のどこにどれだけ存在するのかを、時間軸に沿って正確に把握することは、DDS 開発にとって重要な情報である。本研究では、核酸封入ナノ粒子の癌組織内における動態特性に大きく影響を与えるパラメータを明らかとし、革新的なナノ粒子創製とがん治療への応用を目指す。今年度は新規 pH 応答性脂質を合成し、in vitro 培養細胞や、全身投与により in vivo 肝臓やがん組織で標的遺伝子をノックダウン可能であることを見出し、新たに開発した pH 応答性ナノ粒子が in vivo で機能することを見出した。

2. 研究の背景と目的

短鎖二本鎖 RNA（siRNA）によって特定のタンパク質の発現制御が可能となり、RNA 干渉（RNAi）は生命科学研究になくてはならないツールとなっている。さらに、siRNA を用いて疾患関連遺伝子の発現を制御することで治療への応用が期待されている。しかし、siRNA のような機能性核酸は負電荷の水溶性高分子で、そのままでは目的とする臓器の細胞の中には到達できない。従って、siRNA の医薬への応用は効率的な DDS 開発が大きな鍵となっている。我々はこれまでに独自の核酸送達システムとして多機能性エンベロープ型ナノ構造体（MEND）の開発を進めている。MEND が投与部位から標的臓器にどのように移行するか、標的組織中での局在、細胞内動態に至る、直列的な一連のナノ粒子の動態を 3 次元でまた時間軸に沿って正確に把握し、どのような課題が存在するか明らかとすることで、より効率的で安全性に優れた MEND を開発することが可能となる。これを実現するには、生体組織において高精度で長時間 DDS を観察する必要がある。近年、量子ドットや新規蛍光蛋白質の開発、1 分子イメージング技術の発展により、細胞内やマウス個体においても標的分子の位置情報の追跡が可能になってきている。そこで本領域で展開される最先端イメージング法を MEND に応用することで、生体内がん微小環境領域や細胞内のナノ環境領域における MEND の動態を高精度で行うことで様々な課題と見出し、革新的な癌への核酸送達システムの開発とがん治療への応用を目指す。

3. 成果

1）新規 pH 応答性カチオン性脂質の合成と in vitro 機能評価

3 級アミンを有する新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を合成した。YSK05 を脂質エンベロープに含む MEND をアルコール希釈法で調製し、粒子径 80-100nm、表面電子は中性、また siRNA の封入率 90%以上のナノ粒子を構築した。また MEND の pKa はおよそ 6.5 であり、初期エンドソームなど弱酸性領域で正に荷電することが示された。ルシフェラーゼ安定発現 HeLa 細胞を用いた in vitro ノックダウン活性を評価したところ、YSK05-MEND は従来のカチオン性脂質を含む MEND と比較し 100 倍活性が向上した。市販のトランスフェクション試薬である Lipofectamine2000 と比較しても 10 倍以上高活性を示した。一方、YSK05-MEND は生理的条件では中性であり細胞内取り込みはカチオン性 MEND と比べて低いため、YSK05-MEND の高いノックダウン活性は細胞内取り込み後のエンドソーム脱出効率が高いことが主な要因であることが示された。細胞の酸性化を塩化アンモニウムで抑制すると YSK05-MEND のノックダウン活性は阻害されたことから、エンドソーム内の酸性化と正帯電によるエンドソーム膜との膜融合がエンドソーム脱出のメカニズムであることが示唆された（Sato, Hatakeyama, et al. *J. Control. Release*, 2012）

2）YSK05-MEND の in vivo 機能評価

YSK05-MEND が in vivo 環境で機能するか否か、初めに健常マウスへ静脈内投与後の肝臓における標的遺伝子のノックダウンにより評価した。その結果、従来の MEND と比較して 1/10 以下の投与量で肝臓標的遺伝子をノックダウンすることに成功した（論文投稿準備中, 特願 2012-11952）。

次に、YSK05-MEND によるがん組織への siRNA 送達と標的遺伝子のノックダウンについて評価した。初めに PEG 脂質の修飾量を検討し、血中滞留性を示すために必要な PEG 修飾は 5 mol%で十分であること見出し、5　mol%PEG 脂質修飾 YSK05-MEND（以降 PEG-MEND）を用いて検討を行った。ヒト腎細胞癌 OSRC-2 を皮下移植した担癌モデルに対して PEG-MEND を静脈内投与し、脂質エンベロープをと内封 siRNA をそれぞれ異なる核種の RI で標識し体内動態を評価した。その結果、脂質と siRNA は同じ血中半減期を示し、siRNA が脂質エンベロープに安定に封入され血中を循環していることを確認した。また siRNA を stem-loop primer qRT-PCR によって定量し、がん組織への siRNA の移行を確認した。さらに 4mg/kg の siRNA 投与量で PEG-MEND を静脈内投与し 24 時間後の腫瘍組織中の標的遺伝子 mRNA 発現量を real-time RT-PCR にて評価したところ、50-60%程度のノックダウンが確認された。この mRNA 量の減少が RNA 干渉を介していることを確認するため、rapid amplification of cDNA 5' ends (5' RACE)-PCR を行った。その結果、標的遺伝子 mRNA の減少が確かに RNA 干渉を介してることを証明した。以上より、in vivo がん組織において標的遺伝子をノックダウン可能な全身投与型 MEND の構築に成功した（Sakurai, Hatakeyama, et al. *Mol Ther*, in press）。

公募

Development of a pH-sensitive lipid nanoparticle, multifunctional envelope-type nano device (MEND) for siRNA delivery to tumors

Hiroto Hatakeyama
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

Small interfering RNA (siRNA) is thought to be a new class of medicines for cancer treatment because this can inhibit the expression and function of any genes of interest. However, naked siRNAs are easily degraded in the bloodstream by ribonuclease (RNase) and cannot pass through a cellular membrane because of its large molecular size and high hydrophilicity. The final goal of this study is the establishment of nucleic acids medicine using a liposomal nanocarrier, Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND). MEND is composed of a condensed nucleic acids core which is encapsulated in a lipid envelope. Dynamics of MEND in biological environment could be controlled by customizing lipid composition and introducing functional devices in order to deliver MEND to a target organ as well as intracellular organelle, which should lead the development of an efficient and safe delivery system for nucleic acids. To identify rate-limited steps, three-dimensional dynamics of MEND (Pharmacokinetics: PK) in target cells as well as target organs should be investigated as a function of time. The elucidation of precise and detailed dynamics could be achieved by single molecular imaging using innovative imaging probes and real-time observations. Through this study, the critical parameters which influence the dynamics and functions of MEND in intra cells and tumor microenvironment would be revealed.

We have synthesized a novel pH-sensitive cationic lipid, YSK05. A MEND including YSK05 in lipid envelope (YSJ05-MEND) showed 80-100 nm in diameter, neutral surface and high siRNA encapsulation efficiency, and apparent pKa was around 6.5. In vitro knockdown efficiency of YSK05-MEND exhibited 100-fold and 10-fold higher than that of a conventional cationic MEND and Lipofectamine2000, respectively.

The systemic administration of YSK05-MEND into mice resulted in efficient target-gene knockdown in liver (ED50: 0.06 mg siRNA/kg) in a dose-dependent manner. It is well known that the modification of a liposome with poly(ethylene glycol) (PEG) extends circulating time of period in blood and PEGylated liposomes are accumulated in tumor via the enhanced permeability and retention (EPR) effect. As expected, YSK05-MEND with modification of 5mol% PEG showed long systemic circulation and efficient tumor accumulation. Biodistribution of PEGylated MEND was determined with RI-labeled lipid and siRNA. After i.v. administration of PEGylated MEND at a dose of 3 mg/kg, target gene expression was reduced around 50% compared to the control. These results suggest that a novel pH-sensitive YSK05-MEND could be applied for in vivo delivery of siRNA to liver and tumor.

業績リスト

学術論文

1. Yusuke Sato, Hiroto Hatakeyama, Yu Sakurai, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima. Single Particle Tracking Confirms A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **163**, 267-276 (2012)
2. Hidetaka Akita, Ryohei Ishiba, Hiroto Hatakeyama, Hiroki Tanaka, Yusuke Sato, Kota Tange, Masaya Arai, Kazuhiro Kubo, Hideyoshi Harashima. A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like materials as a carrier for plasmid DNA. *Adv. Healthc. Mater*. in press
3. Yu Sakurai, Hiroto Hatakeyama, Yusuke Sato, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima. Gene silencing via RNAi and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system. *Mol. Ther*. in press

総説・解説・成書

1. Yusuke Sato, Hiroto Hatakeyama, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima. Development of an efficient short interference RNA (siRNA) delivery system with a new pH-sensitive cationic lipid. *Yakugaku Zasshi* **132**, 1355-1363 (2012)
2. Takashi Nakamura, Hidetaka Akita, Yuma Yamada, Hiroto Hatakeyama, Hideyoshi Harashima. A multifunctional envelope-type nano device for use in nanomedicine: concept and Applications. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1113-1121 (2012)
3. 櫻井遊、畠山浩人、秋田英万、原島秀吉．多機能性エンベロープ型ナノ構造体による siRNA デリバリー．生体の化学 **63**, 113-119 (2012)
4. 畠山浩人、秋田英万、原島秀吉．ファインケミカルシリーズ　ドラッグデリバリーシステムの新展開 II　-核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術-　監修 : 永井恒司、岡田弘晃．　第 2 章　核酸医薬への展開　1　DDS 技術を利用した核酸医薬の開発．p19-24 (2012)
5. Hiroto Hatakeyama, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima. Polyethyleneglycol (PEG) dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes on systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. *Biol. Pharm. Bull.* In press

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

特許

1. 原島秀吉、畠山浩人、佐藤悠介、兵藤守、櫻井遊、秋田英万　「脂質膜構造体に pH 依存性カチオン性を付与する剤、それにより pH 依存性カチオン性が付与された脂質膜構造体および脂質膜構造体の製造方法」　特願 2012-11952　出願日 2012 年 5 月 25 日
2. 丹下耕太、新井将也、久保和弘、秋田英万、原島秀吉、畠山浩人、石破諒平、鵜川真実　「細胞内動態を改善したカチオン性脂質」PCT/JP2012/079160　出願日 2012 年 11 月 9 日

招待講演

1. 畠山浩人、原島秀吉.「薬物をがん細胞・血管内皮細胞へ送り分ける DDS の開発」 第 28 回日本 DDS 学会学術集会．2012 年 7 月 5 日．札幌

公募

エンドソーム脱出能チューニングによる
ウイルス様動的構造変化惹起ナノカプセルの構築

研究代表者：大阪府立大学工学研究科　原田　敦史

1. 研究の概要

薬物キャリアのエンドサイトーシスを介した細胞取込過程においてウイルス同様に二段階動的構造変化を惹起しうる高分子集合体の構築を目的として、エンドソームでの pH 低下、細胞質内の還元環境に応答する高分子材料の合成・調製を検討した。還元環境応答を目的としてジスルフィド結合で可逆的に安定化した中空ナノカプセルを調製し、その物理化学的特性の把握、細胞内での不安定化による薬物モデル放出を確認した。また、エンドソーム内での pH 変化に応答しうるポリカルボン酸の合成を行い、その応答特性制御が可能であることを確認した。

2. 研究の背景と目的

生体系においては、生体高分子が的確に自己組織化した数十ナノメートルスケールの超分子集合体（ナノ集合体）が数多くみられ、環境に呼応した動的構造変化を通じて重要な生体機能の一翼を担っている。その代表例であるウイルスは、エンドサイトーシスによって細胞へ取り込まれる過程において、細胞内エンドソームにおける pH 低下をトリガーとする動的な構造変化を通じて膜融合を生起せしめ、更には、細胞質中を移動して核へと到達し、核膜孔から核内へと侵入してカプシド構造の崩壊に基づいてウイルス遺伝子を核内に放出する。このカプシドの脱離・崩壊という二段階動的構造変化が、その機能発現において重要な過程となっている。本研究は、樹状高分子とポリペプチドからなるカチオン性高分子が、ポリペプチドテイル鎖のコンフォメーション変化により高分子鎖の三次元構造が制御される効果により自発的に単分散なポリマーベシクルを形成でき、さらに、架橋構造導入により分散安定性の優れたカチオン性ナノカプセルが得られるという発見をドラッグデリバリーシステム（DDS）へ展開するものである。カチオン性ナノカプセルを可逆的結合であるジスルフィド結合により安定化し、pH 依存的な脱着挙動を発現するポリマーコーティングを行うことにより、細胞取込過程の環境変化（エンドソームにおける pH 低下及び細胞質の還元環境）をセンシングし、ウイルスのような二段階動的構造変化を惹起するナノカプセルを構築することを目的とする。特に、エンドソーム脱出能チューニングに重点をおいて研究を進め、DDS 設計の指針となるユニバーサルパラメータの導出を行う。

3. 成果

（１）細胞質の還元環境で薬物放出するナノカプセル

Polyamidoamine dendron と poly(L-lysine)からなるカチオン性高分子を水／メタノール混合溶媒に溶解させた後、メタノールを滴下することによりメタノール含率を増加させ、poly(L-lysine)鎖の coil-to-helix 転移を誘導することによりポリマーベシクルを得た。このベシクル構造を両末端にエポキシ基をもつ化合物による不可逆的安定化、Lys 残基側鎖アミノ基へ導入したチオール基間のジスルフィド結合による可逆的安定化を行い、中空ナノカプセルを得た。異なる架橋構造で安定化されたナノカプセルの還元環境下での安定性評価として、ナノカプセルの安定性へのグルタチオン濃度の影響を光散乱強度測定により評価した。不可逆的安定化を行ったものは、グルタチオン濃度の影響は認められなかったが、可逆的安定化を行ったものは、細胞質内グルタチオン濃度での不安定化が確認された。そこで、薬物モデルとして Rhodamine 6G をナノカプセルに内包させ、ナノカプセルを構成するポリマーを fluorescein で標識し、細胞への取込と薬物放出の確認をレーザー共焦点顕微鏡観察により行った（Fig. 1）。不可逆的安定化ナノカプセルではポリマーと薬物モデルが同一の分布を示したが、可逆的安定化ナノカプセルでは、薬物モデルの細胞質への放出が確認された。

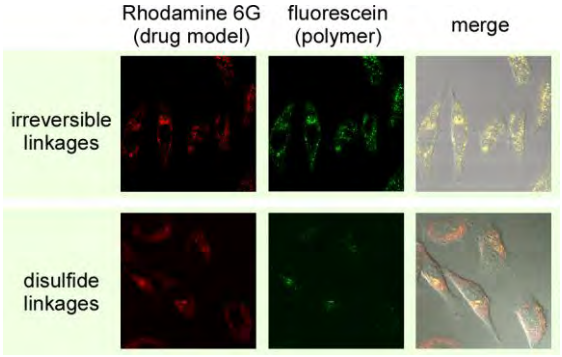


Fig.1 Confocal images of HeLa cells treated by nanocapsules.

（２）エンドソーム内で脱離する pH 応答性高分子の合成と特性解析

Polyallyamine に種々無水物を反応させることにより、側鎖構造としてサクシニル（Suc）、グルタリル（Glu）、メチルグルタリル（mGlu）、シクロヘキシル（cHex）構造をもつポリカルボン酸を得た。得られたポリカルボン酸の凝集 pH を酸塩基滴定により決定した結果、最も側鎖構造をもつ cHex は他のスペーサー構造と比べて高い凝集 pH を示した。pH 応答特性のチューニングを目的として、cHex と Suc あるいは mGlu を用い、その導入比率を変化させることにより凝集 pH を制御できることが確認された（Fig. 2）。

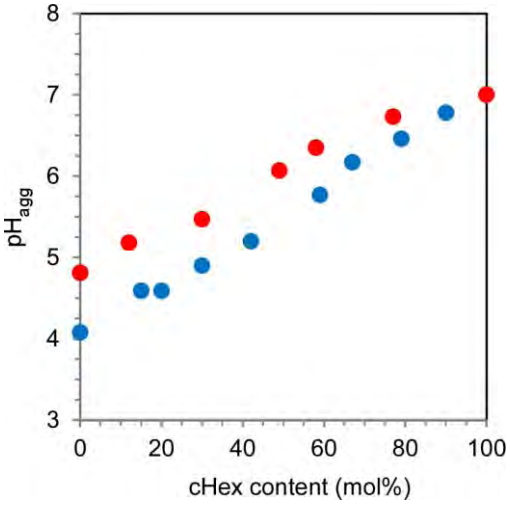


Fig. 2 Change in pH inducing aggregation with cHex content for polycarboxylates bearing cHex and Suc (blue) or mGlu (red) as spacer.

公募

Construction of nanocapsules inducing virus-like structural changes through tuning of ability of endosomal escape

Atsushi Harada
Department of Applied Chemistry, Osaka Prefecture University, Japan

In the biological system, there are various types of supramolecular assemblies with dozens of nanometers scale in which biopolymers precisely organize, and they carry the part of important biological function through the dynamic structural change in response to micro-environment. The natural virus which is the representative example makes membrane fusion through the dynamic structural change in response to pH decrease in the endosome in cells in a process taken in cells by endocytosis. Further, they move into the cytoplasm and arrive at the nucleus, and then invade from pore of nuclear membrane a nucleus and it is intranuclear and releases a viral gene based on the collapse of the capsid structure. Two step dynamic structural changes, the detachment and the collapse of this capsid, becomes an important process in the function manifestation. On the other hand, the author recently found that head-tail type polycation composed of dendritic polymer and polypeptide could spontaneously form narrowly-distributed polymer vesicles and this polymer vesicle was stabilized by introduction of cross-linkages. In this study, the author develops the nanocapsules to drug delivery system (DDS) field through virus-inspired design.

The nanocapsules destabilized in cytoplasm were prepared by stabilizing polymer vesicles formed from head-tail type polycation composed of polyamidoamine dendron head and poly(L-lysine) (PLL) tail. For the stabilization, SH groups were introduced to PLL tails, since SH groups can form disulfide bond in response to reductive environment. Successful stabilization of polymer vesicles was confirmed by dynamic light scattering measurement. Also, the destabilization of reductive environment in cytoplasm was confirmed from the change in light scattering intensity, and the entrapped molecules were immediately released under reductive environment. Further, model drug release from nanocapsules in cytoplasm was confirmed by laser confocal microscopic observation.

For the response to micro-environmental change in endosome, i.e. pH decrease, the polycarboxylates bearing various spacer structures were synthesized through the reaction between polyallyamine and various acid anhydrides including succinic (Suc), glutaric, methyl glutaric (mGlu), and cyclohexanoic (cHex) anhydrides. For the polycarboxylates bearing two types of spacers, Suc and cHex, with varying ratios, apparent pKa and aggregating pH could be controlled by the introducing ratio of Suc and cHex. By combining these polycarboxylates and nanocapsules showing reductive environment response, the authors might obtain the two step dynamic structural change in cellular uptake process like a natural virus.

公募

業績リスト

学術論文

1. Atsushi Harada, Masafumi Ono, Eiji Yuba, Kenji Kono, Titanium dioxide nanoparticles-entrapped polyion complex micelles generating singlet oxygen in the cells by ultrasound irradiation for sonodynamic therapy *Biomaterials Science* **1**, 65-73 (2013)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 原田敦史「Cancer treatment that goes further」　Chemistry World 2012 年 11 月号
2. 原田敦史「超音波照射により治療効果を発現するドラッグデリバリーシステム」大阪府立大学・大阪市立大学ニューテクフェア 2012, 2012 年 11 月
3. 原田敦史「異種高分子連結高分子電解質のポリイオンコンプレックス形成」　ゲルワークショップ イン 名古屋, 2012 年 9 月

公募

ケミカルデバイスを利用した siRNA によって誘起される分子反応の発現機構解明

研究代表者：徳島大学　大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　　南川　典昭

1. 研究の概要

生体内で起こる様々な現象は、複雑な生体分子が高度に相互作用を繰り返すことによって調節、維持されており、その相互作用様式の解明は、研究を進めていく上で極めて重要である。今回著者は、自らが開発したケミカルデバイスを用いて、近年高い注目を集める RNA 干渉（RNAi）機構における siRNA-RNAi 関連タンパク質の相互作用様式の解明を行った。その結果、センス鎖の 5’末端部において、RNAi 関連タンパク質とマイナーグルーブを介した相互作用が行われているという知見を得ることに成功した。また RNA 干渉効果の増強は、それぞれの鎖の RISC 形成量に依存することも明らかとなった。

2. 研究の背景と目的

RNA 干渉（RNAi）は、簡便、且つ強力に目的とする遺伝子のノックダウンを行えるため、タンパク質の機能を解析する生化学的なツールとしてだけではなく、様々な疾患の治療法として大きな期待を寄せられている。しかし多くの siRNA 分子が臨床試験に上がる一方で、１）標的以外の遺伝子発現を抑制するオフターゲット効果と、２）siRNA の toll-like receptor 3（TLR3；二本鎖 RNA を認識して免疫応答を誘導）を介した自然免疫応答に起因する副作用のため臨床にて使用するまでには至ってはいない。これらの欠点を回避することが、RNAi を遺伝子発現抑制の効果的なバイオ技術から画期的創薬の手法にステップアップさせるために求められている。

そこで本研究では、研究代表者が考案したケミカルデバイス（図１:デアザアデニン環の７位および３位に導入された臭素原子が、メジャーおよびマイナーグルーブの立体障害として機能）を用いて siRNA によって誘起される分子反応の発現機構解明を目的とする。具体的には、RNAi 機構において最も重要と考えられている RNA induced silencing complex（RISC）蛋白質と siRNA との分子認識機構を明らかにする。

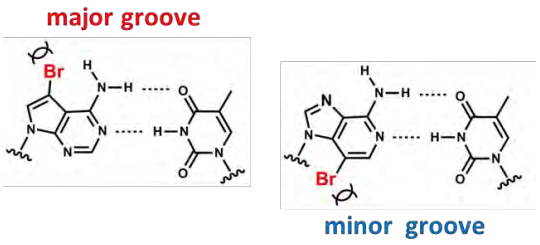


図１　ケミカルデバイス

3. 成果

別途合成した 2 種類のケミカルデバイスをウミシイタケルシフェラーゼを標的とす

る siRNA に導入し、RNA 干渉効果の測定を行った（図２　下線部赤字がケミカルデバイスの導入位置）。その結果、センス鎖の 5’末端部にマイナーグルーブに立体障害を持つ 3Br 体を導入した場合に、天然型と比較して顕著な活性の増強が見られ、一方で同じ位置に 7Br 体を導入した場合には活性の変化が見られなかった。

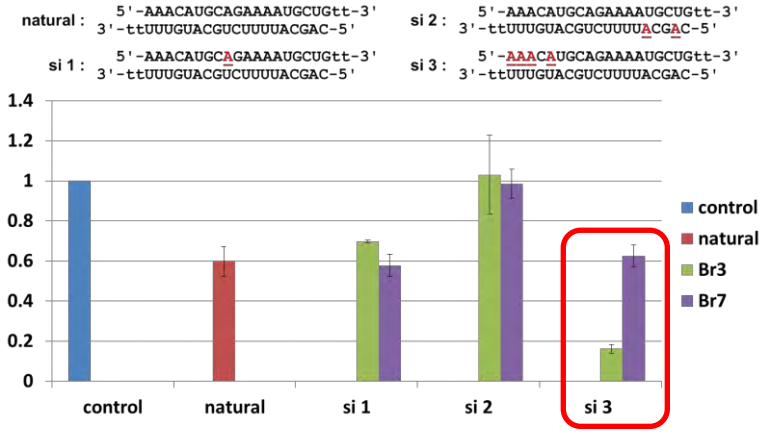


図２　修飾 siRNA による RNAi 効果

このような活性の増強が見られた要因を以下のように推測する（図３左）。まずセンス鎖の 5’末端部に突出した Br 基の立体障害により、この部位における RISC タンパク質との相互作用が阻害される。すると、センス鎖と結合できなくなった RISC タンパク質がアンチセンス鎖と結合し、それに伴いアンチセンス鎖の RISC 形成量が増大することで活性の増強につながったと考えた。そこで、センス鎖並びにアンチセンス鎖の RISC 形成量を、それぞれの鎖の RNAi 活性を基に調べた結果、アンチセンス鎖の活性の増大した siRNA においては、その活性の増大とともにセンス鎖の活性の減少が観測され、先の仮説が正しいことが明らかとなった（図３右　si3 Br3）。これらの結果は、今回使用したケミカルデバイスが、siRNA-RNAi 関連タンパク質間の相互作用様式を明らかにするうえで有用であることを示すものであり、RNAi 関連タンパク質が siRNA のマイナーグルーブ側から相互作用しているという新たな知見を得ることに成功した。

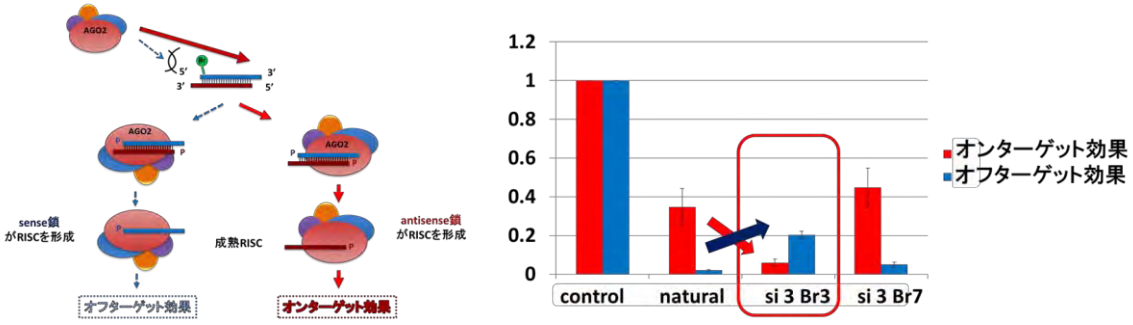


図３　ケミカルデバイスの影響と両鎖の RNAi 効果

公募

Elucidation of molecular reaction by siRNA using a chemical device

Noriaki Minakawa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, Japan

The interaction of nucleic acids with proteins such as enzymes and transcription factors plays a central role in numerous biological processes including the regulation of gene expression. Since this interaction occurs in a strict and specific manner, an understanding of how proteins bind structurally to nucleic acids is critical in determining the mechanisms of the biological process. In addition, this information is expected to provide clues for the development of nucleic acids–based therapeutics, such as short-interfering RNAs (siRNAs) and aptamers.

In order to elucidate molecular interaction between siRNA and RNA induced silencing complex (RISC) proteins, I developed a chemical device consisting of a set of 3-bromo-3-deazaadenine and 7-bromo-7-deazaadenine nucleosides (Figure 1). The 3-bromo substituent is expected to act as steric hindrance of a minor groove of siRNA duplex. On the other hand, the 7-bromo substituent is expected to act as that of a major groove.

With these considerations in mind, I introduce a set of chemical device into the siRNA, and evaluated its RNAi activity. As a result, no alteration was observed when the chemical device was introduced into central position of sense strand (Figure 2, si1). On the other hand, either 3-bromo or 7-bromo substituent at 5'-end of the antisense strand suppressed their RNAi activity (si2), which would be arising from modification of seed region. Drastic difference was observed when the chemical device was introduced into the 5'-end of the sense strand (si3). RNAi activity, while that possessing 7-bromo derivatives showed equal RNAi activity to natural siRNA. From these results, it can be concluded that modification of the minor groove at the 5'-end of the sense strand is critical for molecular interaction between siRNA and RISC proteins to enhance its RNAi activity.

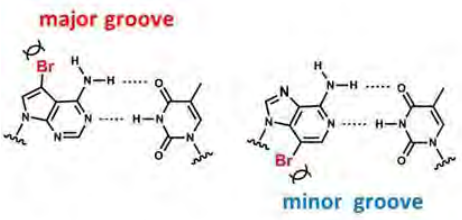


Figure 1. Structures of chemical device

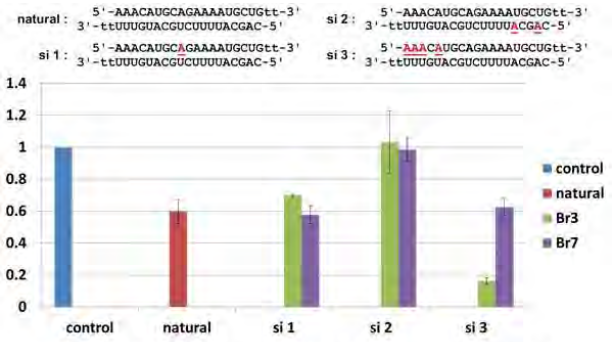


Figure 2. Sequence and RNAi activity of siRNA

公募

業績リスト

学術論文

2.　論文執筆中

総説・解説・成書

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

公募

細胞内分子環境の化学模倣系の構築とそれを用いたテロメア核酸プローブの開発

研究代表者：甲南大学フロンティアサイエンス学部　三好　大輔

1. 研究の概要

数億年にもわたり、生体分子は細胞内の環境で機能するために進化してきた。さらに、生体分子は周辺環境に極めて敏感である。そのため、細胞内の生体分子の物性を定量理解するためには、その分子環境を考慮する必要がある。そこで本研究では、細胞内環境因子である「分子クラウディング」に着目し、細胞内環境を化学模倣した実験系を構築した。さらに、この実験系における細胞のがん化を制御するテロメア DNA の構造を定量解析したところ、長鎖のテロメア DNA が四重らせん構造が数珠状に連結した高次構造を形成していることがわかった。

2. 研究の背景と目的

細胞内は、非常に高濃度の生体分子（400 g/L）が存在する分子クラウディングにある。一方、通常の生化学実験は、1 g/L 以下の希薄な濃度で遂行される。このような試験管での実験条件は、細胞内環境を反映していない。そこで本研究では、細胞環境の化学模倣を試み、その環境におけるテロメア DNA の高次構造を解明することを試みる。この知見をもとに、テロメア DNA の立体構造に対するリガンドの開発も遂行する。

3. 成果

遺伝情報の保持と継承には、DNA の標準構造である二重らせん構造が必要である。しかし近年では、非標準的な DNA の構造が、遺伝情報の発現や疾患の発症を制御していることが明らかになりつつある。非標準構造を形成する代表的な塩基配列が、グアニンに富んだ（G リッチ）塩基配列である。染色体末端のテロメアの G リッチ配列は、四重らせん構造を形成して、細胞寿命時計として機能する。そのため、細胞内でテロメアなどの G リッチな配列が、どのような構造を、どの程度の熱力学的安定性で形成しているかを解明する必要がある。そこで平成 24 年度では、分子クラウディング状態を試験管内で再現し、テロメア DNA が形成する四重らせん構造とその熱力学的安定性を定量的に解析することを試みた。以下に、得られた成果を記す。

（1）長鎖テロメア DNA が分子クラウディング環境で形成する高次構造

染色体末端に存在するテロメア DNA の鎖長は、100 ~ 200 塩基程度であ。しかし、これまでの研究では、1 つの四重らせん構造を形成できる短鎖配列のみがモデルとして使用されてきた。例えば、ヒトテロメアは、$(GGGTTA)_n$ (n = 10 ~ 30)であるのに対し、通常の研究では、$(GGGTTA)_4$ を用いる。そこで本研究では、長いテロメア DNA (n = 4 ~ 20)を用いて、分子クラウディング環境における高次構造と熱力学的安定性を検討した。その結果、長鎖テロメア DNA は、四重らせん構造をユニットとして、連結したような数珠構造を形成していることが示された。さらに、緩衝溶液中（希薄溶液中）と緩衝溶液にポリエチレングリコールを添加した分子クラウディング中での数珠構造の熱力学的諸量を算出したところ、四重らせん構造ユニットを連結しているリンカー部分が形成する構造と水和サイトが、数珠構造の熱力学的安定性を制御していることが示された。これらの成果は、医薬品開発やイメージングにおいて重要であることから、米国化学会誌（*J. Am. Chem. Soc.*当該号の表紙として掲載され（図 1）、Spotlights on Recent JACS Publications でも紹介された。

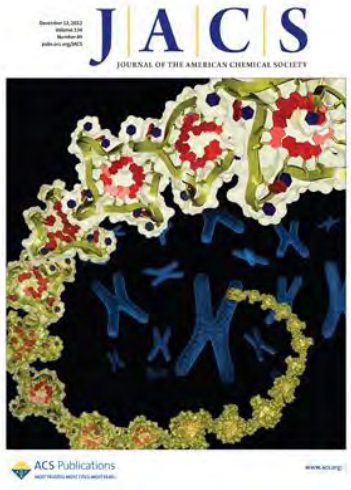


Fig. 1 The beads-on-a-string structure of the long telomeric DNA.

（2）四重らせん構造の物性を決定する非塩基対部位における構造―水和相関

染色体には極めて多様な塩基配列をもつ G リッチな四重らせん構造を形成できる部位が存在する。そこで連続するグアニンの数と、それを連結するループの長さを系統的に変化させ、その全体構造とその熱力学的安定性を希薄環境と分子クラウディング環境で検討した。その結果、ループ部位に強固なスタッキング相互作用が形成されると、四重らせん構造の熱力学的安定性が増大した。さらに、ループ部位のスタッキング相互作用は、水素結合が可能な官能基を配向化させ、新たな水和サイトを形成することが示された。これらの結果から、四重らせん構造全体の脱水和が抑制され、分子クラウディングによる安定化が小さくなることが見出された。このような核酸構造の非塩基対部位における、構造―水和相関は、これまでに例がなく、核酸化学の基礎的知見として有用であることから、米国化学会発行の、*J. Phys. Chem. B* 誌当該号の表紙（図 2）として掲載された。

Fig. 2 The energy-hydration relationship of G-quadruplex.

公募

Structure and function of telomere DNA under cell-mimicking condition

Daisuke Miyoshi

FIRST (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology) and FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University, Japan

The termini of eukaryotic chromosomes contain telomeres, which are composed of tandemly repeated long guanine-rich (G-rich) sequences. The G-rich strand can form G-quartets of four guanines. An array of G-quartets stacking with each other results in a highly stable structure called a G-quadruplex, which protects chromosomes from being recognized as DNA strand breaks and from end-fusing and fraying. Moreover, there are more than 300,000 G-rich sequences in human whole genome with various lengths and nucleotide sequences.

Most biochemical and biophysical studies of G-quadruplexes have been carried out in dilute solutions. However, the intracellular environment is highly crowded due to the presence of high concentrations of biomolecules (up to 400 g/L), leading to molecular crowding conditions. It has been demonstrated that molecular crowding critically affects the G-quadruplex in a number of ways. However, there have been no studies of long telomeric DNA under molecular crowding conditions. Moreover, it is still not known how molecular crowding affects the conformation and thermodynamics of G-quadruplexes.

We studied the structure and thermodynamics of long telomeric DNAs under molecular crowding conditions and found that the long telomeric DNAs formed intramolecular G-quadruplexes under the conditions and that their topology depend on the cation species and molecular crowding conditions. Thermodynamic analysis showed that the effect of molecular crowding on the thermodynamic stability of the structure was reduced for longer telomeric DNAs. A hydration study further demonstrated that the interior of a G-quadruplex unit is dehydrated, whereas the space surrounding the TTA linker between two units is more hydrated upon structure folding. These results allow us to propose that the linkers between G-quadruplex units have an important influence on the stability of the entire structure of long telomeric DNAs.

Moreover, we systematically investigated the effects of loop length on the conformation, thermodynamic stability, and hydration of DNA G-quadruplexes under molecular crowding conditions. Structural and osmotic pressure analyses, and thermodynamic parameters demonstrated that G-quadruplexes with fewer stacking interactions within the loops not only destabilized the G-quadruplexes but also released a larger number of water molecules upon folding. These results showed that the stacking interactions within the loops determined the thermodynamic stability and hydration of the whole G-quadruplex.

公募

業績リスト

学術論文

1. Takeshi Fujimoto, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi Thermodynamics - Hydration Relationships within Loops that Affect G-Quadruplexes under Molecular Crowding Conditions *J. Phys. Chem. B* (**Highlighted as the cover**), **117**, 963-972 (2013)
2. Haiqing Yu, Gu Xiaobo Gu, Shu-ichi Nakano, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto The beads-on-a-string structure of long telomeric DNAs under molecular crowding conditions *J. Am. Chem. Soc.* (**Highlighted as the cover**), 134, 20060-20069 (2012)

総説・解説・成書

1. Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto 「Specific Binding of Anionic Porphyrin and Phthalocyanine to the G-quadruplex with a variety of in vitro and in vivo applications」 *Molecules*, **17**, 10586-10613 (2012)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Spotlights on Recent JACS Publications「Telomeres: Like Beads on a String」 2012 年 12 月 12 日
2. 三好大輔　細胞内模倣環境におけるテロメア DNA の構造安定性とテロメラーゼ酵素の機能　ナノとバイオの最先端研究セミナー　九州大学　2012 年 5 月（招待講演）

他、国際学会発表　8 件、国内学会発表　4 件（新学術領域での会議も含む）