



## 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)	----- 6
「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)	----- 10
「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)	----- 15
「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)	----- 19
「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)	----- 23
「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)	----- 27
「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)	----- 31
「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)	----- 35
「細胞分裂におけるアクチン骨格の収縮を制御する分子機構の解析」	
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)	----- 39
「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	-----	43
「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	-----	47
「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	-----	51
「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	-----	55
「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	-----	59
「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	-----	63
「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	-----	67
「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	-----	71
「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」		
榎田 啓 (名古屋大学・大学院工学研究科)		
19. 公募	-----	75
「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	-----	79
「高感度イオンセンサーによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価」		
合田 達郎 (東京医科歯科大学・生体材料工学研究所)		
21. 公募	-----	83
「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 健太郎 (京都薬科大学・薬学部)		
22. 公募	-----	87
「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	-----	91
「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	-----	95
「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・工学科学部)
25. 公募	-----	99
「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	-----	103
「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	-----	107
「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	-----	111
「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	-----	115
「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	-----	119
「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	-----	123
「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	-----	127
「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患治療法・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 25 年度の成果】**

##### **研究体制の整備**

平成 25 年度は総括班、計画研究班および公募研究班も含めて 31 の研究グループとなり活発な研究展開と共同研究の活性化がなされた。

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ている。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。また、WEB の活用をより活性化しつつ、研究グループ全体への情報の配信、グループ間の情報交換を速やかに行えるようにした。さらに一般社会への研究成果の公開を進めてきている。

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にしているが、共通使用の利便性を高めるために大学院博士課程学生を実験補助員として配置した。本システムの周囲には細胞培養設備を中心に、全反射蛍光顕微鏡や蛍光相関分光測定装置、正立・倒立蛍光顕微鏡など細胞内反応解析、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。実際に研究者が1-2週間滞在して、集中的に実験・研究を行うことを総合的に支援し、学会発表を行うまでに至っている。

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24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.9-12)。

平成27年7月に第4回全体会議（東京大学：参加者60名）を行い、非公開として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。第2回国際公開シンポジウム (International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013) を平成25年10月に東京（参加者75名）で開催した。海外からの招待講演者3名、国内の招待講演者4名とし、基調講演者として本学術領域の評価委員でもある東京大学片岡一則教授および Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 前会長で Uppsala University の Jöns Hilborn 教授が研究紹介された。第5回全体会議を平成26年1月（名古屋）で行った。本会議は非公開であるが、本学術領域の評価委員の名古屋大学馬場嘉信教授に参加いただき、密度の高い議論を行った。さらに、台湾、英国からの関連分野の研究者を招き、日台ナノメディシン研究セミナーを国際公開シンポジウム (5<sup>th</sup> Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine) として主催した。

関連する学協会の学会・大会にてシンポジウムを行った。日本バイオマテリアル学会では、新学術領域研究（「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」、「ナノメディシン分子科学」の4新学術領域）および科学技術振興機構の戦略的イノベーション開発プログラム (S-イノベ) との合同公開シンポジウムを企画・実現した（平成25年11月東京）。また、日本化学会化学フェスタ「技術革新の種を撒く：文部科学省科研費新学術領域が目指す未来の化学」にて化学関連新学術領域研究の一つとして、領域研究を紹介した。第51回日本生物物理学会（平成25年

10月京都)において、「個体の生物物理学-分子・細胞・個体にブリッジ- Biophysics toward In Vivo work.」のシンポジウムを共催した。さらに、ナノ学会バイオ部会国際シンポジウム(7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013)(平成25年11月北九州)を共催した。これらの学協会との連携は、本学術領域での成果を広く公開することができるとともに、関連分野の研究者との情報交換を活性化し、将来的な発展を誘起できる。

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 を積極的に開催し、平成25年度は、5回開催するに至った(開催地:東京4回、京都1回)。

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「ナノメディシン分子科学」に参加・議論する、「若手の会」を第2回「若手の会」会議(京都)(招待講演1件:京都大学秋吉一成教授)を平成25年5月に、第3回「若手の会」会議(招待講演1件:東京医科歯科大学松元亮准教授)(東京)を平成25年10月に開催した。若手の会のメンバー数は増加し、40名を超えるに至っている。

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10件)。

### 新学術領域の中間成果評価

本年度は、領域発足から2年間が経過するにあたり、中間成果評価がなされた。評価は平成25年6月に提出の中間評価報告書による書類審査、および平成25年9月に実施された中間評価ヒアリングによりなされた。審査部会における所見では、評価はAランクであった。いくつかの指摘事項を踏まえ、総括班での議論を行い、これを解消するとともに、さらに発展させて行くことが求められる。

([http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/hojyo/chukan-jigohyouka/1340465.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/hojyo/chukan-jigohyouka/1340465.htm))

### 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(熊本)
- (2) 平成25年10月:第51回日本生物物理学会(京都)「個体の生物物理学-分子・細

胞・個体にブリッジ- Biophysics toward In Vivo work.」

- (3) 平成 25 年 11 月：ナノ学会バイオ部会国際シンポジウム (7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013) (北九州)
- (4) 平成 25 年 11 月：日本バイオマテリアル学会大会 (東京) 「大型プロジェクトにみるバイオマテリアル研究の新潮流」
- (5) 平成 25 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 (富山)
- (6) 平成 26 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 5th Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine) (名古屋)

## 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、好中球内の1粒子小胞を観察し非常に高速に運動することを見出した。また、マウス内のがん腫瘍と単一がん細胞をイメージングすることができた。この研究は、がん化のメカニズム解明に役立つと期待される。

### 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、組換え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)やGFP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。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、マウス内や細胞内のナノメートル領域の分子や小器官の反応を高精度測定を行う。

### 3. 成果

**好中球内小胞の高速輸送**：これまでに我々が開発した非侵襲 *in vivo* 観察技術を用いることで、マウス耳介内において、活性化した好中球内部の小胞輸送速度は、しばしば  $4\mu\text{m}/\text{sec}$  にも達することが明らかとなった(Kikushima et al. *Scientific reports* (2013))。精製された単一のモータータンパク質(細胞質ダイニンやキネシン)の運動速度は $\sim 1\mu\text{m}/\text{sec}$ でしかないことから、これには、複数のモータータンパク質が協調して働くといった未知の機構によってなされていると予想される。

この高速小胞輸送のより詳細な特徴を明らかにするために、私は、**QD**を内包した明るい

## 計画班 A01(ア)

小胞を持つ、活性条件の良い好中球を精製する手法を編み出した。この精製した好中球内部における小胞の速度を解析したところ、マウス耳介内で観測された際と同様に、 $2\mu\text{m}/\text{sec}$ を超える高速小胞輸送が頻繁に観測されることが確認された。

このようにして精製された好中球に微小管重合阻害剤であるノコダゾールを作用させたところ、 $2\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上での高速小胞輸送が観察されなくなった。一方で、アクチンのモータータンパク質である myosin II の阻害剤である blebbistatin や、myosin II の上流で活性制御を行っている ROCK の阻害剤である Y-27632 を作用させた際にも、 $2\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上での高速小胞輸送の頻度は大きく減少することが観測された。



図 1：多くの QD を内包した明るい小胞を持つ、精製した好中球の蛍光画像。画面横幅： $35.6\mu\text{m}$ 。

**がん細胞の非侵襲 *in vivo* イメージング：** マウス内がん細胞の非侵襲 *in vivo* イメージングを行うために、厚さが  $150\sim 200\mu\text{m}$  と薄いマウスの耳介に着目し、マウス耳介を「非侵襲 *in vivo* イメージングのための生体チャンバー」と位置付け、非侵襲 *in vivo* イメージングツールとしての開発に成功した。

今年度はさらに、がん組織形成率データの信頼性を向上させるために検体数を増やし再検討を行った。なお、その際、昨年度までの KPL4-EB1-GFP, U87MG, MDA-MB-231 (WT), MDA-MB-231-GFP-tub の 4 株の他に MDA-MB-231-EB1-GFP を加え、計 5 株における接種細胞数の再検討を行った。その結果、「ある一定以上の接種細胞数があれば高確率 (100%) でゼノグラフトモデルが作製できる」という昨年度と同じ結果が得られ、データの信頼性を確認することができた。また、さらに、昨年度までは蛍光ナノ粒子 (QD) を用いてイメージングを行っていたが今年度は GFP 発現細胞 MDA-MB-231-GFP-tub 細胞を用い、耳介内のがん組織作製し、スピンドイスクタイプの共焦点顕微鏡により非侵襲下で観察したところ、細胞分裂直後と思われる GFP 発現細胞を捉えることに成功した (図 2)。さらに GFP 発現がん組織全域 (約  $2\text{mm}\times 2\text{mm}\times 0.15\text{mm}$ ) の 3 次元像を非侵襲にて捉えることにも成功した。

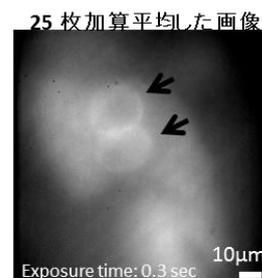


図2. GFP発現乳がん細胞由来がん組織の非侵襲 *in vivo* イメージング

## 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*

Neutrophils play an essential role in the innate immune response. We developed a new non-invasive technique for the in vivo imaging of neutrophils labeled with quantum dots, up to 100  $\mu\text{m}$  below the skin surface of mice. The quantum dots were endocytosed into vesicles in the neutrophils, allowing us to track the vesicles at 12.5 msec/frame with 15-24 nm accuracy. Most intriguingly, the vesicles containing quantum dots were transported at higher speed than the in vitro velocity of a molecular motor such as kinesin or dynein. This is the first report in which non-invasive techniques have been used to visualize the internal dynamics of neutrophils. In this symposium, I'll report recent progress in the molecular mechanism of the vesicle transport in the neutrophil.

We developed new imaging methods to visualize molecules under noninvasive condition. We focused on the ear auricle of mouse for observation of tumor cells because very thin (about 150-200 $\mu\text{m}$ ) and limited hypodermal tissue. We developed a novel xenograft model of the ear auricle with breast cancer cells in order to observe them noninvasively by spinning disk confocal (CSU) system. We injected two kinds of human breast cancer cell lines, KPL4-EB1-GFP and MDA-MB-231, into the ear auricle of SCID mice. It is known that KPL4-EB1-GFP is easily form tumor tissue at subcutaneous of mouse backs, but MDA-MB-231 is not. Tumor composed of both cells was successfully formed in mice. This indicates that the ear auricle is suitable position to form tumor. To image the molecules, specific antibodies to recognize these cells were labeled with fluorescence quantum dots and then injected to tail vein after the formation of tumor. We successfully performed real time observation of quantum dots within breast cancer cells and on its membrane under noninvasive condition.

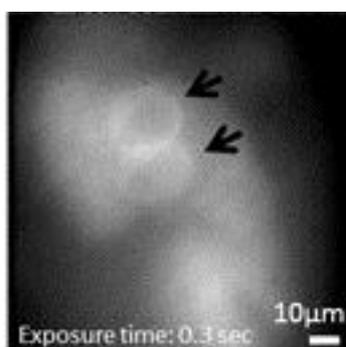


Fig1. Noninvasive imaging of MDA-MB-231-GFP-tubulin cells in tumors. Intensities of sequential 25 images in movie were averaged to reduce the noise.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Yasuhiro Suzuki\*, Chandra Nath Roy, Warunya Promjunyaku, Hiroyasu Hatakeyama, Kohsuke Gonda, Junji Imamura, Biju Vasudevan Pillai, Noriaki Ohuchi, Makoto Kanzaki, Hideo Higuchi, and Mitsuo Kaku. Single quantum dot tracking reveals that an individual multivalent 2 HIV-1 Tat-protein transduction domain can activate machinery for 3 lateral transport and endocytosis. *Mol. Cell Biol.* 33: 3039-3049 (2013).
2. Kenji Kikushima, Sayaka Kita and Hideo Higuchi\* A non-invasive imaging for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils. *Scientific reports* 3: doi:10.1038/srep01913 (2013)
3. Kaya. M. and H. Higuchi. Stiffness, working stroke and force of single myosins in skeletal muscle: Elucidation of these mechanical properties by non-linear elasticity. *Cell and Mol. life Sci.* 70: 4275-4292 (2013)
- 4.

### 総説・解説・成書

1. 樋口秀男、神原丈敏 「歩行型分子モーター、ダイニン」 パリティィ 2013. 3

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. （招待）Hideo Higuchi, Kenji Kikushima and Sayaka Kita “Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles” *Molecules view The International Symposium on Multi-Scale Muscle Mechanics.* 2013.11.7 Kitakyusyu
2. （招待）Kenji Kikushima, Sayaka Kita and Hideo Higuchi. A non-invasive technique for the in vivo tracking of high-speed vesicle transport in mouse neutrophils. *Jpn Biophysics Kyoto* 2013.10.30
3. （招待）Hideo Higuchi, Kenji Kikushima, Sayaka Kita: Noninvasive in vivo imaging of neutrophil and tumor in mouse auricles. *Dynein 2013 International Workshop*, Kobe, 11/1-4, 2013.
4. （学会）Motoshi Kaya and Hideo Higuchi Molecular properties and dynamics of single skeletal myosins designed for force generations in ensemble of myosin molecules 2013.10.28
5. （学外活動）菊島健児 日本免疫学会主催「免疫ふしぎ未来 2013」協力員
6. （学外活動）樋口秀男「細胞の謎をさぐる」東大理学部高校生のための夏休み講座 2013 東大（本郷）東京 2013.7.25 （対象 高校生・中学生）
7. （新聞）東北大学新聞 「ナノロボットを開発」 2013. 8. 4
8. （新聞）河北新報 「東北大、ナノ粒子のロボット化成功 薬剤導入技術向上に期待」 2013.6.20
9. （新聞）日刊工業新聞「東北大、ウイルス由来のペプチド利用し細胞内移動「ナノロボット」作製」 2013. 6.14

## 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、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) を用いた細胞内分子反応解析、治療を検討している。これまで、カチオン性官能基を導入した細胞内分解性 PRX を利用した細胞内への siRNA、タンパク質の導入を検討し、細胞内への取り込み、生体分子の活性発現における超分子骨格の影響を明らかとしてきた。今年度は、分解性 PRX が細胞内で分解し多数の CD を放出する点に着目し、希少難治疾患であるライソゾーム病治療への応用を検討した。

### 2. 研究の背景と目的

先天的な酵素等の変異により本来代謝されるべき脂質、糖質等がリソゾーム内に慢性的に蓄積する疾患を総称してライソゾーム病と呼び、本邦でも約 30 種類のライソゾーム病が特定疾患に指定されている。ライソゾーム病の一つであるニーマンピック病 C 型 (NPC 病) は、後期エンドソーム膜上のタンパク質 NPC1 の変異により、リソゾーム内にコレステロールの異常蓄積が起こる疾患である。近年、コレステロール包接能を有するヒドロキシプロピル化  $\beta$ -シクロデキストリン (HP- $\beta$ -CD) が NPC 病由来細胞中から過剰のコレステロールを除去することが明らかとされ、さらに HP- $\beta$ -CD を全身投与することで NPC 病モデルマウスの主要臓器中のコレステロール異常蓄積を改善し、結果として生存期間を延長することが見出された。HP- $\beta$ -CD のコレステロール除去による NPC 病治療は、現在臨床試験が日本を含めた各国で進められており、NPC 病治療薬としての期待度が非常に高い。しかし、HP- $\beta$ -CD により十分な治療効果を得るためには発症初期段階から極端に高濃度の HP- $\beta$ -CD を全身投与する必要がある。これは、HP- $\beta$ -CD が比較的分子量であるため血中投与後速やかに腎排泄されることや、血中のコレステロールやタンパク質との非特異的な相互作用によるためであると考えられる。また、高濃度の  $\beta$ -CD は溶血、急性毒性、組織障害を示すため、HP- $\beta$ -CD の治療域が限定されているといった問題がある。

このような問題を改善するため、本研究では PRX を用いた NPC 病治療を考案した。PRX は HP- $\beta$ -CD と比較して高分子量であるため、投与後速やかな腎排泄を回避できると期待される。また CD 空洞部をポリマー鎖が占めているため CD 空洞部に由来する障

## 計画班 A01 班 (イ)

害性の低減が期待される。さらに、末端に細胞内分解性結合を有する PRX は、細胞内特異的に CD を放出することでコレステロール除去が可能になると考えられる。このような PRX による NPC 病治療のコンセプトを実証するための第一段階として、本研究では NPC 病患者由来細胞に対する細胞内分解性 PRX のコレステロール除去作用について HP- $\beta$ -CD と比較検討した。

### 3. 成果

細胞内分解性 PRX として末端にジスルフィド結合を有するプルロニック P123 と  $\beta$ -CD からなる PRX を調製し、PRX 上の  $\beta$ -CD 部位にヒドロキシエチル (HE) 基を導入することで水溶性かつ細胞内分解性を有する HE-SS-PRX を設計した ( $\beta$ -CD 貫通数 : 12.9、HE 基修飾数 : 52)。比較対象として、ジスルフィド結合を持たない水溶性 PRX (HE-PRX) を合成した ( $\beta$ -CD 貫通数 : 11.3、HE 基修飾数 : 66)。

$\beta$ -CD は細胞膜からの脂質、コレステロールを引き抜くことにより溶血、細胞毒性を示すことが知られている。一方、PRX は  $\beta$ -CD 空洞部がポリマー鎖で占められているため、原理的には細胞膜からの脂質、コレステロールの引き抜きは起こさず、細胞毒性も低いと考えられる。PRX 骨格による  $\beta$ -CD の障害性低減を確認するために赤血球の溶血活性と NPC 病患者由来皮膚線維芽細胞 (NPC1 細胞) に対する細胞毒性を評価した。HP- $\beta$ -CD は低毒性の  $\beta$ -CD 誘導體として知られているものの、5 mM 以上では赤血球の溶血活性を示し、また 20 mM では細胞生存率の減少が認められた。一方、PRX は分解性結合の有無にかかわらず、20 mM 以上の濃度でも溶血、細胞毒性を全く示すことはなかった。よって、PRX の特徴的分子骨格は  $\beta$ -CD 空洞部に由来する障害性を回避できることが明らかとなった。

次に、NPC1 細胞におけるコレステロール蓄積改善効果を評価した。分解性 HE-SS-PRX、非分解性 HE-PRX、HP- $\beta$ -CD を  $\beta$ -CD 濃度 0.1 mM で NPC1 細胞と 24 時間接触させ、コレステロールの局在を Filipin 染色により観察した。HE-SS-PRX で処理した NPC1 細胞は Filipin に由来する蛍光強度が未処理 NPC1 細胞と比較して低下し、正常細胞と同程度までコレステロール蓄積が改善されていることが明らかとなった。一方、HP- $\beta$ -CD で処理した NPC1 細胞は、本実験濃度では大きな変化は認められなかった。HE-SS-PRX のコレステロール蓄積改善作用をより明らかとするため、細胞内コレステロール蓄積量の定量を行なった。コレステロール蓄積量に対する用量反応曲線より求めた HP- $\beta$ -CD の半数効果濃度は 2.6 mM であったのに対し、HE-SS-PRX の半数効果濃度は HP- $\beta$ -CD の約 1/100 である 0.024 mM であった。一方、非分解性 HE-PRX では 10 mM でも有意なコレステロール量の変化が認められなかったことより、細胞内特異的な PRX の分解と  $\beta$ -CD の放出がコレステロール蓄積改善に非常に有効であることが示唆された。

## **Analysis of biomolecules using cyto-responsive supramolecular polymers**

Nobuhiko Yui

Tomohiro Konno\*, Ji-Hun Seo, Atsushi Tamura

*Institute of Biomaterials and Bionengineering, Tokyo Medical and Dental University, Japan*

*\*Graduate School of Engineering, the University of Tokyo, Japan*

Niemann-Pick type C (NPC) disease is an autosomal recessive lysosomal trafficking disorder caused by the dysfunction of NPC1 protein, which induces the chronic accumulation of unesterified cholesterol within lysosomes of cells. This abnormal cholesterol accumulation leads to various clinical symptoms, such as progressive neurodegeneration and hepatosplenomegaly, often resulting in fatality at an early age. Nevertheless, there is currently no effective therapy for NPC disease, although various methodologies have been examined in attempt to establish NPC disease therapy. Recently, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD), a derivative of cyclic oligosaccharide, has received tremendous attention as a potential therapeutic for NPC disease. It has been revealed that the intravenous administration of HP- $\beta$ -CD reduces the cholesterol content in various organs, leading to a remarkable prolongation of the life-span of NPC disease model mice. Despite the significant therapeutic effect of HP- $\beta$ -CD, it has limited therapeutic due to its toxic effect at high concentration.

To address these drawbacks, we focused on polyrotaxanes (PRXs) that consist of  $\beta$ -CDs threaded along a polymer chain capped with a terminal bulky. Especially, we have developed biocleavable polyrotaxanes bearing terminal disulfide linkages. Herein, the biocleavable PRXs have tremendous advantages that allow them to overcome all of the problems of  $\beta$ -CDs in NPC disease therapy: (1) masking of the toxic effect of  $\beta$ -CD derivatives, as the hydrophobic cavity of  $\beta$ -CD is occupied by a polymer chain to avoid non-specific inclusions; (2) retardation of renal clearance, thus prolonging blood half-life, because of its high molecular weight in comparison with  $\beta$ -CD derivatives, and (3) the ability to release threaded  $\beta$ -CDs via cleaving the terminal linker of PRXs under intracellular environments to achieve therapeutic effect.

In this regard, the biocleavable PRXs composed of  $\beta$ -CDs threaded along a Pluronic P123 chain and a terminal bulky trityl groups via cleavable disulfide linkages were developed. The biocleavable PRXs showed negligible interaction with the plasma membrane, leading to avoiding the toxicity of  $\beta$ -CDs. Additionally, the lysosomal release of threaded  $\beta$ -CDs from the biocleavable PRXs by the intracellular cleavage of terminal disulfide linkages was found to achieve approximately 100-fold higher cholesterol removal ability from NPC disease-derived cells than HP- $\beta$ -CD. Consequently, the biocleavable PRXs is considered to be noninvasive and effective therapeutics for NPC disease.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Atsushi Tamura, Go Ikeda, Ji-Hun Seo, Koji Tsuchiya, Hirofumi Yajima, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Nobuhiko Yui. Molecular logistics using cytoleavable polyrotaxanes for the reactivation of enzymes delivered in living cells. *Scientific Reports* **3**, 2252 (2013).
2. Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui. A supramolecular endosomal escape approach for enhancing gene silencing of siRNA using acid-degradable cationic polyrotaxanes. *Journal of Materials Chemistry B* **1**, 3535-3544 (2013).
3. Izumi Fukumoto, Atsushi Tamura, Mitsuaki Matsumura, Hiroyuki Miura, Nobuhiko Yui. Sensitization potential of dental resins: 2-hydroxyethyl methacrylate and its water-soluble oligomers induce immunostimulatory effect. *PLoS One* **8**, e8254 (2013).
4. Xiaojie Lin, Tomohiro Konno, Madoka Takai, Kazuhiko Ishihara. Redox phospholipid polymer microparticles as doubly functional polymer support for immobilization of enzyme oxidase. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* **102**, 857-863 (2013).
5. Botao Gao, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. A simple procedure for the preparation of precise spatial multicellular phospholipid polymer hydrogels. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* **108**, 345-351 (2013).
6. Tatsuo Aikawa, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. Phospholipid polymer hydrogel microsphere modulates the cell cycle profile of encapsulated cells. *Soft Matter* **9**, 4628-4634 (2013).
7. Haruka Oda, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. The use of the mechanical microenvironment of phospholipid polymer hydrogels to control cell behavior. *Biomaterials* **34**, 5891-5896 (2013).
8. Xiaojie Lin, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobe conjugated with molecular beacons. *Biomacromolecules* **15**, 150-157 (2014).
9. Botao Gao, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara. Quantitating distance-dependent, indirect cell-cell interactions with a multilayered phospholipid polymer hydrogel. *Biomaterials* **35**, 2181-2187 (2014).
10. Nanako Yokoyama, Ji-Hun Seo, Atsushi Tamura, Yoshihiro Sasaki, Nobuhiko Yui. Tailoring the supramolecular structure of aminated polyrotaxanes toward enhanced cellular internalization. *Macromolecular Bioscience* in press (2014).
11. Atsushi Tamura, Masahiro Tokunaga, Yasuhiko Iwasaki, Nobuhiko Yui. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers. *Macromolecular Chemistry and Physics* in press (2014).
12. Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick type C disease. *Scientific Reports* in press (2014).

### 総説・解説・成書

1. 田村篤志, 細胞内リリース効率改善による生理活性向上を企図した分解性超分子-生体高分子複合体の設計, *バイオマテリアル-生体材料-*, **32** (1), 33-34 (2014).
2. 金野智浩, 生細胞を可逆的に固定化する細胞親和性リン脂質ポリマー-細胞固定化ポリマーマトリックス-セルコンテナ-, *バイオマテリアル研究の最前線*, 印刷中, (2014).
3. Tomohiro Konno. Cytocompatible phospholipid polymer for non-invasive nanodevice. *Intracellular Delivery vol.2*, in press (2014).

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. (特許) 田村篤志, 由井伸彦. ポリロタキサン、及びライソゾーム病に対する医薬組成物, 特願 2013-172994.
2. (受賞) 田村篤志, 由井伸彦. 細胞内特異的にシクロデキストリンを徐放可能な超分子ナノメディシンの開発とライソゾーム病治療への展開, シクロデキストリン学会 第30回シクロ

## 計画班 A01 班 (イ)

- デキストリンシンポジウム ポスター賞, 2013 年 9 月.
3. (受賞) 田村篤志. Biodegradable Supramolecular Nanocarriers for Enhancing the Intracellular Activity of Delivered Biomacromolecules, 日本バイオマテリアル学会 2013 年日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流 AWARD, 2013 年 11 月.
  4. (招待講演) Nobuhiko Yui. Hydrated molecular mobility at supramolecular surfaces dominates the fate of cellular adhesion. *International Symposium of Catalysis Research Center (CRC)*, Sapporo, Japan, February, 2013.
  5. (招待講演) Nobuhiko Yui, Atsushi Tamura. Cytoplasmic small interfering RNA delivery using cytoleavable polyrotaxanes. *The 7<sup>th</sup> International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT2013)*, Singapore, July, 2013.
  6. (招待講演) Atsushi Tamura. Supramolecular polyelectrolyte complexes for enhancing the intracellular activity of delivered biomacromolecules, *TMDU International Summer Program 2013*, Tokyo, Japan, August, 2013.
  7. (招待講演) Nobuhiko Yui, Ji-Hun Seo, Atsushi Tamura. Emerging biomaterials functions through supramolecular polyrotaxanes. *The 7<sup>th</sup> World Congress on Biomimetics, Artificial Muscles and Nano-Bio (BAMN2013)*, Jeju, South Korea, August, 2013.
  8. (招待講演) Tomohiro Konno. Cytocompatible phospholipid polymer hydrogels for cell engineering. *7th International Symposium on Nanomedicine*, Kitakyushu Japan, November, 2013.
  9. (招待講演) 金野智浩. 細胞工学・再生医療のためのバイオインターフェース設計. 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014 年 3 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 mm 精度の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新しい技術の開発を目指している。本年度、昨年度に引き続き、“Cardiac Nano-medicine”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  $\mu\text{m}$ ) と呼ばれる分子集合体であり、この長さが ~0.1  $\mu\text{m}$  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、培養細胞ならびに生きたマウスにおいてサルコメアの長さを nm の精度で測定する新たなシステムを構築することに成功し、この手法をサルコメア長ナノメトリー[sarcomere length (SL) nanometry]と命名した(学術論文: 1,2)。

### 2. 研究の背景と目的

心筋細胞(長軸:~100  $\mu\text{m}$ 、短軸:~20  $\mu\text{m}$ )では、長軸方向に~2.0  $\mu\text{m}$ 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氣的興奮が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の局所の上昇を惹起し、 $\text{Ca}^{2+}$ 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。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100 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 レベルの動きをとま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駆使することによって、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-physiology” について、異なる階層（細胞、摘出心臓、個体）において研究を行った。以下に詳細を記す。

(I) 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。サルコメア長変化の測定精度は、3 nm (カメラ速度：50 fps) であった。これは、G アクチンの直径 (~5 nm) よりも小さな値であり、世界最高のサルコメア長計測精度である。Ca<sup>2+</sup>イオノフォアにて処理を行い、Ca<sup>2+</sup>ポンプ機能を阻害した上で幼若心筋細胞を低濃度 (~10<sup>-6</sup> M) の Ca<sup>2+</sup>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。次に、AcGFP を発現させた幼若心筋細胞に電気刺激を与えた。刺激頻度を生理的なレベル (3~5 Hz) に上げると、波形が cell-SPOC に類似した。すなわち、生理的な拍動条件下、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た。さらに、この系を応用して、心不全治療薬 (omecamtiv mecarbil : OM) の薬効評価を試みた。OM を加えると cell-SPOC 時のサルコメア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、我々が開発した幼若心筋細胞の実験ならびに計測システムは、薬理学の評価系としても優れている。

(II) 摘出心臓を用いた実験：マウスより心臓を摘出し、Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬を用いて心臓の表面から心筋細胞内 Ca<sup>2+</sup>動態を観察した。その結果、心筋細胞内の Ca<sup>2+</sup>動態を捉えることに成功した。心筋組織内の複数の細胞からランダムな Ca<sup>2+</sup>ウェーブが観察され、そこに外部電極から電気刺激 (強制振動) を与えると刺激に同調した細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇 (Ca<sup>2+</sup>トランジェント) が観察された (2013 年、日本生理学会において優秀賞受賞：論文作成中)

(III) 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、 $\alpha$ -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、横紋構造が確認された。次に  $\alpha$ -actinin-AcGFP を発現させ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それぞれ ~1.7  $\mu$ m、~2.0  $\mu$ m 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  $\mu$ m のバラツキが見られた。さらに我々は、対物レンズ基部にピエゾ駆動装置を設置し、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約 20 のフェーズに分割し、対物レンズを動かしながら取得した焦点深度の異なる画像群から、各フェーズにおいて焦点の合った画像を再構築した。その結果、心臓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  $\sim 0.1 \mu\text{m}$  in SL causes a dramatic change in its contractile performance. We conducted cardiac nano-physiology studies under various conditions.

First, we developed an experimental system for simultaneous nano-scale analysis of single sarcomere dynamics and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes via the expression of AcGFP in Z-discs in neonatal cardiomyocytes of the rat. We found that following treatment with ionomycin, neonatal myocytes exhibited spontaneous sarcomeric oscillations (cell-SPOC) at partial activation with blockage of sarcoplasmic reticulum functions, and the waveform properties were indistinguishable from those obtained in electric field stimulation. Therefore, the auto-oscillatory properties of cardiac sarcomeres may be involved in the regulation of cardiac beat. Moreover, the myosin activator omecamtiv mecarbil markedly enhanced Z-disc displacement during Cell-SPOC. Our experimental system has a broad range of application possibilities for unveiling single sarcomere dynamics during excitation-contraction coupling in cardiomyocytes.

Second, we developed a novel experimental system allowing for  $\text{Ca}^{2+}$  imaging in the whole mouse heart at the cellular level. We found that randomly occurring  $\text{Ca}^{2+}$  waves and/or transients became synchronized by electric stimulation. Imaging of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the intact heart will greatly enhance our understanding of the molecular mechanisms of the excitation-contraction coupling *in vivo*.

Third, we conducted real-time imaging of sarcomeric motions in ventricular myocytes in the anesthetized mouse. We expressed AcGFP at sarcomeric Z-discs ( $\alpha$ -actinin-AcGFP) by using the adenovirus vector in the left ventricle, and measured the length of a single sarcomere at 100 fps in cardiomyocytes under a fluorescence microscope (combined with a confocal unit and a piezo objective scanner). We also recorded electrocardiogram and left ventricular pressure simultaneously with the sarcomeric motions. We found that (1) SL was  $\sim 1.7$  and  $\sim 2.0 \mu\text{m}$  during systole and diastole, respectively, and (2) it varied by  $\sim 0.3 \mu\text{m}$  in both phases even in the same myocyte. Furthermore, by moving the objective lenses in the Z-direction, our nano-positioning system enabled us to image sarcomeric motions during a cardiac cycle without out-of-focus problems. Our *in vivo* cardiac imaging system will be widely used by many researchers to gain in-depth information of the molecular mechanisms of various heart diseases.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Inoue T, Kobirumaki-Shimozawa F, Kagemoto T, Fujii T, Terui T, Kusakari Y, Hongo K, Morimoto S, Ohtsuki I, Hashimoto K, Fukuda N. Depressed Frank-Starling mechanism in the left ventricular muscle of the knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy with troponin T deletion mutation  $\Delta$ K210. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Oct;63:69-78
2. Shintani S, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Ohki T, Ishiwata S, Fukuda N. Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with  $\alpha$ -actinin-AcGFP in Z-discs. *J Gen Physiol.* 2014 (in press).

### 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 「Nano-imaging of sarcomeres in the heart *in vivo*」台湾-日本ナノメディシン研究会招待講演 台湾、台北、中央研究院 2013年1月14日
2. 福田紀男 「高精度分子イメージングを用いた *in vivo* 心収縮メカニズムの解析」第21回JSPPEECミーティング 招待講演 東京慈恵会医科大学 2013年5月17日
3. 福田紀男 「高精度分子イメージングによる心筋収縮機序解明」高精度分子イメージングで拓く医学新領域 招待講演 東京医科歯科大学 2013年6月11日
4. 福田紀男 「Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart *in vivo*」ナノメディシン分子科学国際シンポジウム 招待講演 東京大学 2013年10月9日
5. 小比類巻 生 「Real-time high-resolution cardiac imaging *in vivo*」第51回日本生物物理学会招待講演 京都国際会館 2013年10月30日
6. 福田紀男 「*In vivo* ナノイメージングによる心筋収縮機構の解析」第35回日本バイオマテリアル学会 特別招待講演 東京都、タワーホール船堀 2013年11月26日
7. 福田紀男 「Real-time imaging of single sarcomeres in the mouse heart *in vivo*」International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 招待講演 名古屋大学 2014年1月14日
8. 大山廣太郎 「局所熱パルス法を用いて細胞の温度感受性を解明する」第91回日本生理学会 招待講演 鹿児島大学 2014年3月17日
9. 第90回日本生理学会大会(2013年3月 東京都、タワーホール船堀) *Junior Investigator's Award* (受賞者: 広川恵里沙) 演題名: 拍動心臓における心筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  のリアルタイムイメージング 演者: 広川恵里沙、大山廣太郎、水野紅理、小比類巻 生、下澤東吾、照井貴子、福田紀男

## 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、イメージング性能の向上を目指し、多数の量子ドット (QD) を一つの 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーナノ粒子に内包する手法を確立し、高輝度化を実現した。さらに表面に結合させるオリゴペプチドの種類と組成を変化させることで、細胞内器官への分布を調節する試みを行った。

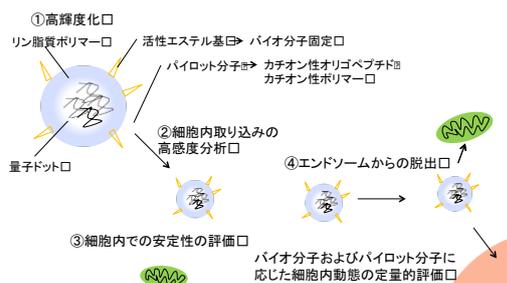


図 1. 細胞内取り込みと輸送過程を対象としたナノ粒子の創製

さらに表面に結合させるオリゴペプチドの種類と組成を変化させることで、細胞内器官への分布を調節する試みを行った。一方、細胞内における特定の反応を追跡する目的で、分子ビーコン (MB) を細胞親和型水溶性・両親媒性ポリマーに結合させて、細胞内への分子拡散による導入を達成した。

### 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 MPC 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 MPC ポリマーナノ粒子によりこれを実現した。この QD 内包 MPC 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。QD 内包 MPC 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 MPC 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 MPC 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 MPC 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 MPC ポリマーナノ粒子の選択的な細胞内輸送を目的とした。

また、新たに水溶性両親媒性 MPC ポリマーに MB を結合した分子捕捉キャリアーを合成し、細胞内への拡散現象による取り込みと、細胞内での mRNA の選択的捕捉特性に対するポリマー分子構造の影響について評価した。

### 3. 成果

活性エステル基を有する MPC ポリマーで QD を被覆したナノ粒子 (PMBN/PLA/QD) を作製した。さらに、その作製条件の検討により高輝度化を実現した。

細胞機能として特定分子の核輸送に着目し、核輸送に必要な特性をキャリアーに付与するバイオ分子の化学構造と動態の関係を定量的に評価した。細胞膜透過性ペプチドである R8 と核移行シグナルペプチドである NLS を用いて、細胞膜透過性および核移行性を PMBN/PLA/QD ナノ粒子に付与した。核まで達するには、途中段階の細胞膜透過および細胞質移行を効率よく行うことが重要となる。そこで、NLS と R8 の組み合わせおよびポリエチレンジアミン (PEI) を用いて細胞膜透過および細胞質移行の効率化を評価した。さらに、細胞質から核への移行能およびその効率を調べるために、マイクロインジェクションにより直接的に細胞質に PMBN/PLA/QD ナノ粒子を注入し、核移行能および効率化に重要な要因を評価した。NLS/R8-PMBN/PLA/QD ナノ粒子とエンドソームを共染色し、細胞に添加してから 2 時間後の CLSM 観察画像を図 2 に示す。これより、R8 の割合の増加によりエンドソームからの脱出効率が高まることがわかった。また、PEI の共固定も有効であった。核への物質送達には細胞内において NLS の機能発現が必要である。NLS に加え R8 を固定化することで、核輸送に必要な細胞膜透過性および細胞質移行能をキャリアーに付与することが可能であることが示唆される。

水溶性両親媒性 MPC ポリマーに MB を結合した分子捕捉キャリアーは、図 3 に示す構造である。MB 部位はポリマーの側鎖に結合させ、標的分子に認識能と捕捉特性を確保している。細胞内取り込みおよび細胞内 GAPDHmRNA に対して効果的に機能することが認められた。これを利用して、MB の種類を変化させ、細胞内での分子反応生成物である mRNA の解析を行う。

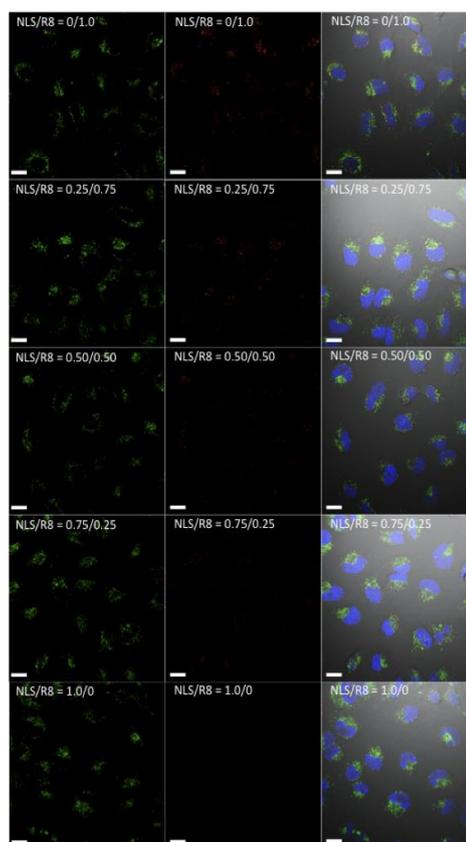


図 2. NLS と R8 を種々の仕込み比で固定化した NLS/R8-PMBN/PLA/QD ナノ粒子とエンドソームの共局在 (( 上段 ) fluorescence (PKH67) ( 中段 ) fluorescence (QD) ( 下段 ) merge (scale bar : 20  $\mu$  m), green : エンドソーム, red : NLS/R8-PMBN/PLA/QD, blue : 核)

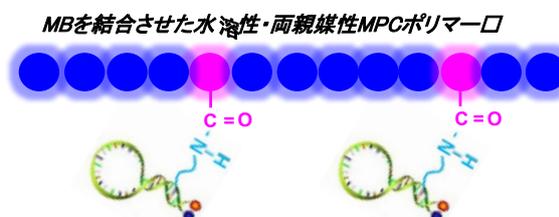


図 3. 水溶性両親媒性 MPC ポリマーに MB を結合した分子捕捉キャリアーの構造

## 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 nanoprobe were prepared using biocompatible phospholipid polymer. We have found that the polymeric nanoparticles embedding quantum dots (QDs) covered with phospholipid polymers showed resistance to cellular uptake from HeLa cells. 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. In this study, we investigate effect of oligopeptide on internalization and transportation of the nanoparticle into cells. Also, we prepared new type of nanoprobe by conjugating between the water-soluble and amphiphilic phospholipid polymer with molecular beacon (MB).

Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co-n*-butyl methacrylate (BMA)-*co-p*-nitrophenyloxycarbonyl oligooxyethylene methacrylate)s (PMBN) was synthesized. Polymer nanoparticles containing ZnS-overcoated CdSe QDs (PMBN/PLA/QD) were prepared by solvent evaporation technique. During the preparation procedure of the PMBN/PLA/QD, sonication time was one of the important factors to make higher bright fluorescence efficiency. We got good fluorescence quantum yield above 30 % was achieved. Two kinds of oligopeptide were immobilized on the surface of the PMBN/PLA/QD. That is, cell penetrating oligopeptide R8 and nuclei-transport oligopeptide NLS. Transportation into cytoplasm and cell nuclei was depended on the ratio of R8/NLS. The NLS alone, no particle did not observe in the cytoplasm, however, increment of R8 induced penetration of particle through the cell membrane.

Synthesis of a cytocompatible, noninvasive hybrid nanoprobe composed of a MPC polymer and MB; that is, poly(MPC-*co*-BMA-*co*-N-succinimidylloxycarbonyl tetra(ethylene glycol) methacrylate (PENHS))

(PMBS)-MB was carried out. The PMBS-MB is not only able to resist the nonspecific adsorption of proteins and digestion by enzymes, but can also penetrate living cells for the noninvasive monitoring of intracellular reactions. Through a series of investigations, the extracellular stability, cell membrane penetration, and availability for intracellular use were determined for the PMBS-MB. The distribution and dynamics of a biomolecule (i.e., mRNA for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) were monitored in living cells using the nanoprobe. The results show that the PMBS-MB nanoprobe is a novel and valuable tool for the real time study of biomolecules in living cells. We conclude that the MPC polymer-MBs nanoprobe will promote the development of noninvasive monitoring intracellular biomolecules and bio-reaction, can be used to deepen our understanding of basic cellular processes, and could also be applied toward the early detection, accurate clinical diagnosis, and effective treatment of diseases in the future.

## 業績リスト

### 学術論文

1. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara, A simple procedure to prepare precise spatial multicellular phospholipid polymer hydrogels, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 345-351 (2013)
2. T. Aikawa, T. Konno, K. Ishihara, Phospholipid polymer hydrogel microsphere modulates the cell cycle profile of encapsulated cells, *Soft Matter*, 9(18), 4628-4634 (2013)
3. H. Oda, T. Konno, K. Ishihara, The use of the mechanical microenvironment of phospholipid polymer hydrogels to control cell behavior, *Biomaterials*, 34(24), 5891-5896 (2013)
4. X. Lin, T. Konno, K. Ishihara, Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobes conjugated with molecular beacons, *Biomacromolecules*, 15(1), 150-157 (2014)
5. B. Gao, T. Konno, K. Ishihara, Quantitating distance-dependent, indirect cell-cell interactions by using a multilayered phospholipid polymer hydrogel, *Biomaterials*, 35(7), 2181-2187 (2014)

### 総説・解説・成書

1. K. Ishihara, H. Oda, T. Aikawa, T. Konno, Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering, *Macro Sympo*, in press (2014)

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. K. Ishihara, H. Oda, T. Konno: Controlling cellular functions in the cytocompatible phospholipid polymer hydrogels Keynote Lecture, International Conference on Regenerative Biomedical Materials (ICRBM), Wuhan, China, June 3, 2013
2. K. Ishihara, H. Oda, T. Aikawa, T. Konno: Bioinspired phospholipid polymer hydrogel system for cellular engineering, Plenary Lecture, 15th IUPAC Macromolecular Complexes Meeting (MMC-15), Greenville, USA August 15, 2013
3. 石原一彦: “ナノメディシン分子科学”, 招待講演, 第3回 CSJ 化学フェスタ 2013, 東京, 2013年10月23日
4. K. Ishihara: Cell membrane permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobes conjugated with molecular beacons, Invited Lecture, International Symposium on Nanomedicine 2013, Kita-kyushu, Japan, November 8, 2013
5. K. Ishihara, Y. Inoue: “Cytocompatible polymeric nanoparticles for nanomedicine molecular science”, Invited Lecture, 13<sup>th</sup> Pacific Polymer Conference (PPC2013), Kaohsiung, Taiwan, November 20, 2013
6. K. Ishihara, X. Lin: “Cell membrane-permeable and cytocompatible phospholipid polymer nanoprobes conjugated with molecular beacons”, Invited Lecture, The 5<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, Nagoya, Japan, January 14, 2014
7. X. Lin: *Excellent Presentation Award*, International Conference on Regenerative Biomedical Materials (ICRBM), Wuhan, China, June 5, 2013 (受賞)
8. H. Oda: *Yao Su Student Research Prize (Best Poster Presentation)*, MGH-HST summer institute, Boston, USA, August 8, 2013 (受賞)
9. B. Gao: *Award for Encouragement of Research in Materials Science*, 23th Annual Meeting of The Materials Research Society of Japan, January 17, 2014 (受賞)

## 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  
分担協力者：大阪大学基礎工学研究科 新岡宏彦

### 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、細胞膜修復時における細胞膜下のアクチン繊維修復について計測、解析を行なった。

### 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および細胞骨格弾性の定量解析、新規の高分解能細胞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

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や力学特性を *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

## A02 班 (オ)

アクチン細胞骨格の様子を解析した。浮遊細胞及び有糸分裂時における細胞表面のアクチン繊維のリモデリング過程を可視化することで力学構造物の変化を可視化することに成功し、さらに、リモデリング前後におけるヤング率の違いを解析した。

### (2)細胞膜修復時におけるアクチン骨格再生過程の解析

細胞は、細胞膜が破れることにより引き起こされる細胞外部から細胞内部への物質流入を防ぐために、細胞膜を修復する機構が備わっている。細胞膜修復は外部からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流入をトリガーとし、秒単位で脂質二重膜が修復され、その後分オーダーの時間で裏打ちのアクチン骨格が形成される。我々は微小探針を用いて細胞膜に損傷を与え、その後高速にイメージング可能な AFM を用いてアクチン骨格形成の様子をイメージングすることに成功した。また、骨格修復箇所は修復前よりもヤング率が上昇している事が定量的に示された。

### (3)新規高分解能イメージング手法の開発

生命機能(生体や細胞、生体分子の機能等)を解析するための手法としてイメージング手法は非常に強力である。新規細胞イメージング技術確立のため、光励起によって発光(蛍光)を呈し、さらに電子線励起による発光(CL:Cathodoluminescence(カソードルミネッセンス))も呈するナノサイズの蛍光プローブ作製を行なった。このようなプローブを用いて細胞の染色ができれば、電子顕微鏡観察においても蛍光顕微鏡のように分子を色で染め分ける事が可能となり、また、蛍光顕微鏡観察においてもカラーイメージングが可能となる。電子線励起においても紫外光励起においてもそれぞれ青、緑、赤色に発光する希土類添加  $\text{Y}_2\text{O}_3$  蛍光体( $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Tm}$ (青),  $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}$ (緑),  $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}$ (赤))の作製を行ない、また、それらの蛍光体を用いて細胞のCLおよび蛍光イメージングが可能であることを示した。さらに、 $\text{Tm}$ と $\text{Yb}$ を添加した  $\text{Y}_2\text{O}_3$  蛍光体( $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Tm},\text{Yb}$ )はアップコンバージョン蛍光体として知られており、生体深部への透過性の良い近赤外光励起によって発光を呈する。 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Tm},\text{Yb}$ 蛍光体を用いた高空間分解能CLイメージングおよび近赤外蛍光を用いた細胞イメージングに成功した。CL顕微鏡によるナノイメージングから、マウス等の小動物の深部イメージングまでを一つの蛍光体で実現する事が可能であると考えられる。ナノからセンチメートルレベルのスケールの異なったイメージング法をシームレスに繋ぐ、マルチスケールなイメージング法になると期待する

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

Jun Miyake

Takanori Kihara, Hirohiko Niiooka, 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) AFM allows us to specifically detect the sub-membrane cytoskeletal structures in living cells. We visualized the cytoskeletal network and its dynamic remodeling process. Upon cell detachment or during mitosis, cells possess a similar round morphology however they can be recognized based on their distinct mechanical properties as determined by AFM measurement so that mitotic cancer and normal cells are softer than suspended ones.

2) Failure to restore cell membrane disruption after injury and subsequent influx of extracellular molecules leads to rapid cell death. Identification of critical events during membrane resealing may lead to development of targeted clinical therapies. Using a novel combined Stamping-AFM technique, membrane of adhered cancer cells is slightly punctured with a Stampingneedle either on the nuclear or peripheral regions. The target area is scanned by quantitative imaging mode of AFM before and after induction of physical damage. Actin barrier formation is assessed in the injured cancer cells after poking with the Stampingneedle.

3) We propose a new imaging method using upconversion (UC) nanoprobe (NPs) that emit light via both near-infrared (NIR) light and electron-beam excitation, where UC is a process in which longer wavelength, excitation light is transduced to higher energy emission light. NIR light allow us to image deep tissue region because NIR light is insusceptible to absorption, scattering, and autofluorescence. UC phosphors described here will allow the realization of new imaging method covering the nanometer to millimeter scale, i.e., the molecular to in vivo scale.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Kihara, T., Ito, J., Miyake, J., Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy, *PLoS ONE*, **8**, e82382 (2013)
2. Yamaguchi, S., Komiya, S., Matsunuma, E., Yamahira, S., Kihara, T., Miyake, J., Nagamune, T., Transfer printing of transfected cell microarrays from poly(ethylene glycol)-oleyl surfaces onto biological hydrogels, *Biotechnol Bioeng.*, **110**, 3269-3274 (2013)
3. T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, M. Ashida, T. Nagata, T. Araki and M. Hashimoto, (\* corresponding author), High-resolution microscopy for biological specimens via cathodoluminescence and Eu- and Zn-doped  $Y_2O_3$  nanophosphors, *Optics Express*, **21**, 25655-25663 (2013)
4. 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.* **116**, 231-234 (2013)
5. 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)
6. 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.* **3**, 124-129 (2013)
7. 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.* **116**, 380-385 (2013)

### 総説・解説・成書

1. 新岡宏彦, 古川太一, 橋本守, ナノ蛍光体を用いたカソードルミネッセンスイメージング技術, 顕微鏡, Vol. 49, (2014)

### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

#### 受賞

1. Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa, Masayoshi Ichimiya, Masaaki Ashida, Tsutomu Araki, and Mamoru Hashimoto, A JSAP Young Scientist Award 2013, Multicolor Cathodoluminescence Microscopy for Biological Imaging with Nanophosphors, *Appl. Phys. Express* **4** (2011) 112402

#### 招待講演

1. 新岡宏彦, 古川太一, 福島昌一郎, 一宮正義, 三宅淳, 芦田昌明, 荒木勉, 橋本守, カソードルミネッセンス顕微鏡と光学顕微鏡の融合, 顕微鏡学会分科会バイオメディカルニューマイクروسコープ (帝京大学医学部, 2014/3/6).
2. H. Niioka, T. Furukawa, S. Fukushima, M. Ichimiya, J. Miyake, M. Ashida, A. Araki, and M. Hashimoto, Rare-earth doped  $Y_2O_3$  nanophosphors for biological cathodoluminescence imaging, International Conference on Small Science (Las Vegas, USA, 2013/12/15-18)

## 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：東京工業大学大学院生命理工研究科 丸山 厚  
分担研究者：東京工業大学大学院生命理工研究科 嶋田直彦

### 1. 本年度のハイライト成果

a) 核酸検出のためには、標的となる核酸とプローブ核酸との結合性を高める技術が必要となる。既に、カチオン性共重合体が、核酸間の結合性を高めることを明らかにしたが、共重合体に尿素基を導入することで、その活性をさらに高められる事を見出した。

b) 微量の核酸を効果的に検出するためには、PCR 法などシグナル増幅過程を内包した検出システムが必要である。シグナル増幅法として、DNA 酵素(DNAzyme)に着目し、その活性をカチオン性共重合体で高められる事を見出した。

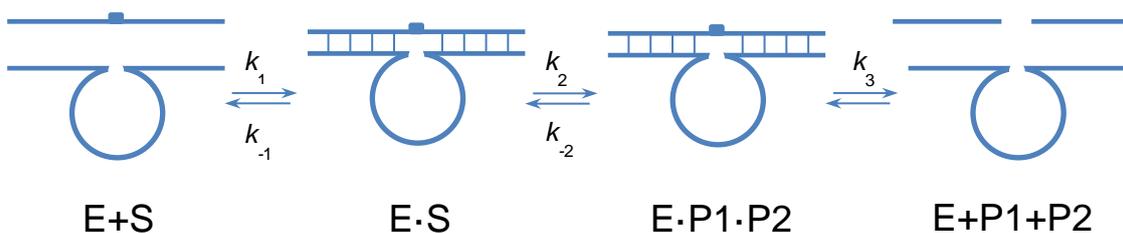
### 2. 研究の概要

メッセンジャー-RNA や microRNA などの細胞内の核酸をイメージングする手法の実現は、生体内に多種多様に存在する細胞の機能発現を理解するために有用である。また、それらを標的とした医薬により、細胞機能の調節も可能となる。細胞内核酸イメージングを実現するためには、大量に存在する夾雑核酸から、対象となる核酸と高選択的に結合する核酸プローブ技術、核酸プローブを細胞内に効率的に送達するデリバリー技術が必要となる。本年は、核酸間ハイブリダイゼーションを促す高分子材料の機能向上とそれによる DNAzyme の活性強化を検討した。

### 3. 成果

DNAzyme は、酵素活性を発現する核酸配列である。タンパク質酵素あるいは RNA 酵素(Ribozyme)に比べ、安定性が高い、調製が容易、様々な修飾が可能などの特徴がある。1994年に Breakerらにより見出された後、様々な活性を有する DNAzyme がスクリーニングされている。中でもリボヌクレアーゼ活性を有する DNAzyme に関する研究が進められ、RNA の不活性化、二価カチオンの検出などへの応用が検討されている。さらに、DNAzyme 活性を利用した核酸配列の検出へも展開されている。しかし、微量の活性を検出するためには、DNAzyme 活性のさらなる強化が必要と考えられる。

スキーム 1 に DNAzyme の反応過程を示す。低温では生成物(P1, P2)が DNAzyme(E)より解離する過程( $k_3$ )が遅く、またそれが早くなる高温では、基質(S)が E と結合し ES 複合体を形成する過程( $k_1$ )が遅くなる。つまり、ターンオーバー効率に制約が生じる。したがって、核酸ハイブリッドの解離と形成を早くする工夫、たとえば核酸シャペロン活性が DNAzyme 反応の促進には必要と考えられた。



スキーム 1 DNAzyme 反応の過程

既に、カチオン性くし型共重合体、PLL-g-Dex、が核酸ハイブリッド形成速度を高めハイブリッドを効果的に安定化することを見出している。そこで、DNAzyme 反応におけるターンオーバー過程を PLL-g-Dex で加速できると推測した。

図1にシングルターンオーバー (ST) およびマルチプルターンオーバー (MT) 条件下で、PLL-g-Dex の効果を比較した。図1は反応後の溶液を PAGE 解析した結果である。反応時間の経過と共に、基質が減少し生成物が増加していることがわかる。ST 条件では、PLL-g-Dex の有無による反応の違いは見られない。一方、MT 条件では、PLL-g-Dex 存在下で顕著に反応が早くなっていることがわかる。共重合体がターンオーバー過程を促進し、DNAzyme 活性を高めることが明らかである。

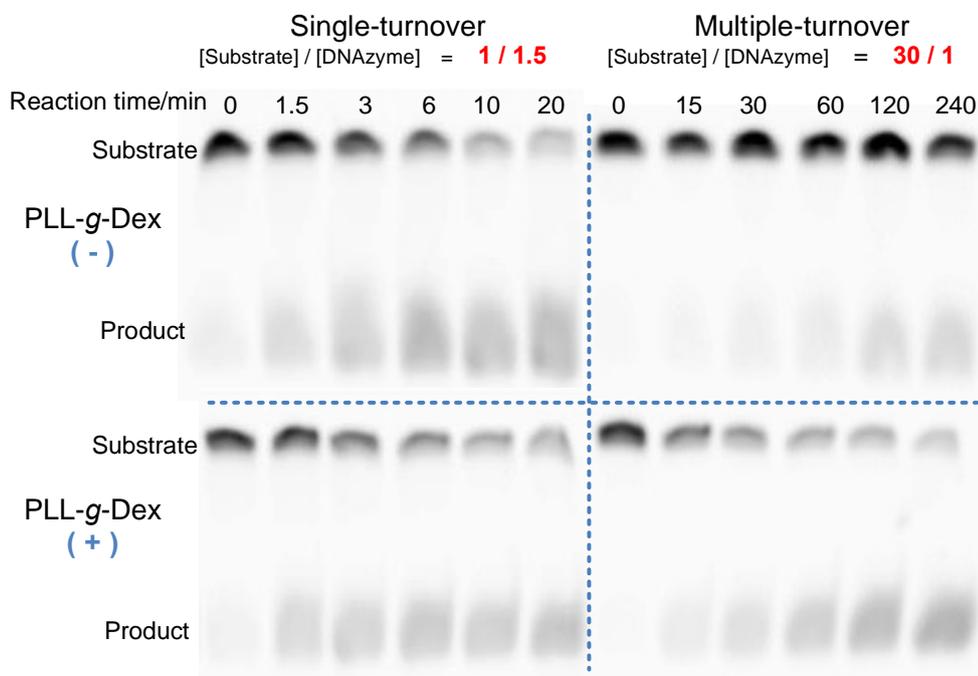


図1 シングルターンオーバーおよびマルチプルターンオーバー条件下における DNAzyme 反応に及ぼす PLL-g-Dex の影響

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

Atsushi Maruyama, Naohiko Shimada  
Dept. of Biomol. Engineering, Tokyo Inst. of Tech.

DNAzymes are DNA sequences that produce enzymatic activity. After the first example of DNAzyme was demonstrated by Breaker et al. in 1994, various types of DNAzymes having diverse enzyme activities were reported<sup>1</sup>. Among them DNAzymes having ribonuclease activity were extensively studied.

The DNAzymes were examined to inactivate target RNAs and detect divalent metal ions. Detection of DNA/RNA sequences was also demonstrated with modified DNAzymes. Further enhancement of DNAzyme activity is demanded for its practical applications, especially for nucleic acid imaging.

Low turnover efficacy caused by slow conversion of enzyme/product complex (EP) for enzyme/substrate

complex (ES) is a bottleneck of DNAzyme activity. To improve the turnover efficacy we have focused on the cationic comb-type copolymer (PLL-g-Dex) that accelerates DNA hybridization and strand exchange reactions<sup>2, 3</sup>. We assumed that the copolymer could accelerate the conversion of EP for ES to enhance overall activity of the DNAzyme.

DNAzyme reactions in the absence and presence of PLL-g-Dex were carried out under single-turnover and multiple-turnover reaction conditions. Figure 1 shows PAGE images of reaction mixtures. As increase in reaction time the band intensity of the substrate decreased and that of the product increased. Under the single-turnover conditions slight difference in reaction rate was observed in the absence and presence of the copolymer. Under the multiple-turnover conditions faster reaction was observed in the presence of the copolymer. These results indicated that the copolymer accelerate the turnover process in the DNAzyme reaction.

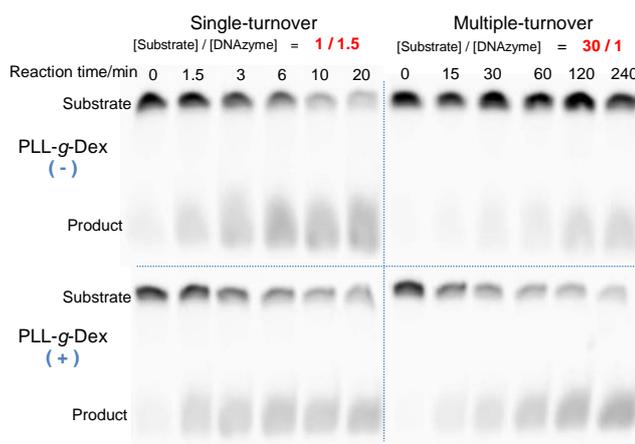


Fig. 1 The role of PLL-g-Dex in DNAzyme cleavage reaction. 25°C, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 500 nM substrate with either 750 nM DNAzyme (single-turnover reaction) or 16.7 nM DNAzyme (multiple-turnover reaction) in the presence of PLL-g-Dex or absence of PLL-g-Dex.

### References

- 1) D. A. Baum and S. K. Silverman, Cell. Mol. Life Sci., 65, 2156–2174 (2008).
- 2) W. J. Kim, T. Ishihara, T. Akaike, et al, Nucleic. Acids. Res. Suppl., 1, 151–152 (2001).
- 3) L. Wu, N. Shimada, A. Kano, et al, Soft Matter, 4, 744–747 (2008).

## 業績リスト

### 学術論文

1. S. Yusa, M. Morihara, K. Nakai, S. Fujii, Y. Nakamura, A. Maruyama, N. Shimada, Thermo-responsive liquid marbles, *Polym. J.*, in press.
2. A. Maruyama, N. Sonda, K. Yamasaki, S. Kidoaki, N. Shimada, M. Maeshiro, M. Miyazaki, Cationic comb-type copolymer excludes intercalating dye from DNA without inducing DNA condensation, *Curr. Nanosci.*, in press.
3. H. Saneyoshi, N. Yoshida, N. Shimada, A. Maruyama, Y. Ito, H. Abe, Polycation-assisted DNA detection by reduction triggered fluorescence probe towards point-of-care testing, *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 6851-6853 (2013).
4. K. Kawai, T. Majima, A. Maruyama, Detection of single-nucleotide variations by monitoring the blinking of fluorescence induced by charge transfer in DNA, *ChemBioChem.*, 14, 1430-1433, (2013).
5. M. Nishihara, K. Imato, A. Irie, T. Kanehara, A. Kano, A. Maruyama, A. Takahara, H. Otsuka, Reversibly Cross-linked Polymeric Micelles Formed by Autonomously Exchangeable Dynamic Covalent Bonds, *Chem. Lett.*, 42, 377-379 (2013), DOI:10.1246/cl.2013.377.
6. N. Shimada, M. Nakayama, A. Kano, A. Maruyama, Design of UCST Polymers for Chilling Capture of Proteins, *Biomacromolecules*, 14, 1452-1457 (2013)
7. A. Kano, Y. Taniwaki, I. Nakamura, N. Shimada, K. Moriyama, A. Maruyama, Tumor delivery of Photofrin® by PLL-g-PEG for photodynamic therapy, *J. Controlled Rel.*, 167, 315-321 (2013)

### 総説・解説・成書

1. N. Shimada, A. Maruyama, Thermoresponsive Polymers with Functional Groups Selected for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *ACS Symp. Ser.*, Vol. 1135, pp 235-241 (2013).

### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

#### 招待講演

1. Cationic Comb-Type Copolymer Enhances DNase Activity, International Symposium on Smart Biomaterials ~2nd Hoffman Family Symposium ~Date: March 24-25, 2014, NIMS, Tsukuba
2. カチオン性高分子による DNase の活性化、平成 25 年度物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究「次世代メディカル・バイオ機能材料への展開を指向した生体分子素子技術の開発」 [B-2] 拡大シンポジウム、2014 年 3 月 14 日、東北大学
3. ペプチドシャペロン材料による脂質膜構造制御、繊維学会西部支部セミナー、2013 年 10 月 31 日
4. Chilling capture of preteins using functionalized UCST polymers, 4th International Advanced Biomaterials Symposium, Changchun, China, Sep. 30,
5. 生体高分子を操るシャペロン型合成高分子設計-核酸から脂質膜まで-東京工業大学バイオマテリアルシンポジウム、2013 年 9 月 19 日、横浜、東京工業大学

#### アウトリーチ活動

1. 東工大 in 柏陽高校、2013 年 12 月 25 日、神奈川県立柏陽高校
2. 柏陽高校「進路講演会」、2014 年 3 月 17 日、神奈川県立柏陽高校

## 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、がんの原発組織や転移リンパ節の検出法と診断法の開発が鍵となる。本年度は、「X線 Computed Tomography (以下 X線 CT) と蛍光を用いたセンチネルリンパ節検出法開発」と「蛍光ナノ粒子を用いたがん組織診断法開発」に関して成果が得られた。センチネルリンパ節検出では X線 CT イメージング用造影剤としてシリカコーティング金ナノ粒子を、そして蛍光イメージング用として量子ドットを内包したシリカコーティング蛍光ナノ粒子を開発した。これらの粒子を同時に用いることにより、X線 CT と蛍光で同一のセンチネルリンパ節をイメージングすることに成功した。またがん組織診断では、診断用プローブとして量子ドットを用い、がん転移活性化因子の発現レベルを高い S/N 比で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。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。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。

がんの検出では、X線CTイメージングと蛍光イメージングを融合したリンパ節検出法の開発を試みた。一般的に消化器がんの手術前にはX線CT撮影が行われ、リンパ節の肥大化を指標に、センチネルリンパ節のがん転移診断が行われる。実際、X線CTで見つかったがん転移の疑いのあるリンパ節が手術により全て郭清されれば根治治療となる。しかし、消化器は複雑なリンパ管ネットワークを有しているため明確なリンパ経路の予測が難しい。また時としてX線CTで指摘されたリンパ節を手術中に見失う場合がある。例えば腹腔内の脂肪が多くて埋もれてしまった場合、手術中の出血が多く視野が悪い場合、あるいは別のリンパ節を当該のリンパ節と誤認するなどの場合にそれは起こり得る。このような見落としは患者の予後の悪化に直接繋がる。今回我々は金ナノ粒子をシリカコーティングしたX線CT造影ナノ粒子や複数の量子ドットをシリカコーティングした蛍光ナノ粒子を開発した。これらを同時にリンパ節トレーサーに用いることによりX線CTで術前に検出できたセンチネルリンパ節を、実際の開腹操作中に蛍光ガイ

## A03 班 (キ)

ドのもと同定・摘出するデュアルイメージング法の開発を試みた。以上により消化器がんにおいて、より高確度なセンチネルリンパ節診断の可能性が広がると期待される。

摘出されたがんの原発組織や転移リンパ節は、病理診断によって悪性度、抗がん剤奏功性、再発の可能性等が診断される。我々は昨年までに、乳がんの増殖関連因子エストロゲン受容体の発現量を、蛍光粒子を用いた免疫染色法で高精度解析する方法の開発に成功した。本年度はがん転移活性化因子Protease-activated receptor 1 (PAR1) に注目し、独自のPAR1抗体を結合させた蛍光ナノ粒子を用いたがん病理組織診断により、がんの再発危険性を予測する診断法の開発を試みた(A01 樋口班との共同研究)。

### 3. 成果

今回我々は金ナノ粒子および量子ドットをシリカコーティングすることで粒子の凝集を防ぎ分散性を高めることを狙うとともに、両粒子の大きさをほぼ同一に近づけることで生体内での粒子の分布に差が出ないことを期待した。シリカコーティングした両粒子をマウスの足背(足の甲)に注入し、24時間後にマウス下肢の皮膚切開を行い、X線CTイメージングおよび蛍光イメージングを行った。その結果、両シリカコーティングナノ粒子は、ほぼ同様の分布を示し、同一の膝窩リンパ節のデュアルイメージングを行うことに成功した。X線CTでイメージングされた膝窩リンパ節はあたかもリング構造を示すかのように不均一に造影された。先行研究において、我々はブタ胃のセンチネルリンパ節の蛍光ナノ粒子イメージングを行った結果、ナノ粒子の不均一分布は、患部に接続するリンパ管がリンパ節に流入する部位を可視化していることを明らかにしてきた。リンパ管のリンパ節への流入部は、がんが最初にリンパ行性転移を引き起こす部位であると考えられている。よってナノ粒子の不均一分布は、リンパ節内でがん転移が起こり易い部位をイメージング可能なことを示している。つまりリンパ節内のナノ粒子存在部位を詳細に調べれば、がんの診断精度向上が期待される。以上のことから、本研究のX線CTイメージングによって、センチネルリンパ節におけるナノ粒子の不均一分布を明瞭に捉えることができた意義は大きい。また、両シリカコーティングナノ粒子をマウス胃壁に注入した結果、遠隔に位置するリンパ節を含め、粒子注入部に接続する複数の同一センチネルリンパ節をデュアルイメージングすることにも成功した。

PAR1抗体が結合する蛍光ナノ粒子を用い、ヒト乳がん組織の免疫組織染色を行い、独自の画像解析技術で調べた結果、がん組織中に存在するPAR1の発現量を高精度解析することに成功した。臨床データを用いて、PAR1の発現量と再発危険性の相関性を調べた結果、5年以上無再発患者に比べ、4年以内に再発した患者では、PAR1の発現量が数倍高まっていたことが明らかとなった。またPAR1の発現量と術後再発までの期間の関係を調べたところ、PAR1発現量と再発までの時間の間に、強い相関性が見られた。今後はさらに症例数を増やし、PAR1発現量によって予測される再発危険性の分子パラメーターの導出を目指している。

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

Kohsuke Gonda

*Department of Medical Physics, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan*  
*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 sentinel lymph node detection method using both X-ray computed tomography (CT) and fluorescence imaging. Another is cancer pathological examination method with immunohistochemical test of fluorescence imaging.

To develop sentinel lymph node detection method using both X-ray CT and fluorescence imaging, we made silica-coated gold nanoparticles and silica-coated Quantum dots (QDs) nanoparticles. The silica coating was performed using a modified Stöber method based on the sol-gel method. Gold nanoparticles or QDs were mixed with tetraethylorthosilicate (TEOS)/ethanol. Then a sodium hydroxide solution (a catalyst for the sol-gel reaction of TEOS) was mixed with the solution containing gold nanoparticles and TEOS or QDs and TEOS. As silica is relatively biocompatible material, it is expected that the silica-shell prevent aggregation and allergy of core *in vivo*. Recently, sentinel lymph node diagnosis for cancer surgery is growing in importance because cancer cells metastasize to other parts of the body via lymph vessels or blood vessels. To apply these silica-coated nanoparticles to sentinel lymph node detection, we injected two kinds of nanoparticles mixture into lower legs of mice. Then X-ray CT or fluorescence imaging was performed to examine distribution of these nanoparticles at subcutaneous of lower legs. The results showed that both nanoparticles were localized to lymph node via lymph vessels. Distribution of both agents was almost correspond to each other. Therefore, dual imaging technology with silica-coated gold nanoparticles and silica-coated quantum dots might be useful for development of sentinel lymph node detection method with high accuracy and highly-quantitative sensitivity.

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 activity depends on reaction time, temperature and substrate concentration. 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. To develop new IHC with fluorescence imaging, we previously labeled estrogen receptor (ER) with immunohistochemical test using fluorescence nanoparticles and succeeded in visualizing ER expression level in breast cancer tissues. In this year, we newly targeted Protease-activated receptor 1 (PAR1) protein to investigate risk of cancer recurrence with IHC using fluorescence nanoparticles. PAR1 plays a critical role in various cancer metastases. The anti PAR1 antibody-conjugated QDs were made and applied to IHC of human breast cancer. The results showed that PAR1 expression level correlated with risk of a cancer recurrence. Therefore, this may became effective method to predict cancer recurrence after surgery with high accuracy.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Kobayashi Y, Fujisaku T, Mine E, Takezawa T, Nakagawa T, Gonda K, Takeda M, Ohuchi N. Immobilization of magnetite on core-shell particles. *International Journal on Intelligent Electronic Systems* 6: 40-45 (2012).
2. Kobayashi Y, Morimoto H, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Preparation of Gd Complex-Immobilized Silica Particles and Their Application to MRI. *ISRN Nanotechnology* 2013 (Article ID 908614): 1-6 (2013).
3. Kobayashi Y, Matsudo H, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. In-vivo fluorescence imaging technique using colloid solution of multiple quantum dots/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticle. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 66: 31-37 (2013).
4. Kobayashi Y, Ayame T, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K and Ohuchi N. Preparation of AgI/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticle colloid solution and X-ray imaging using it. *ISRN Nanomaterials* 2013 (Article ID 670402): 1-5 (2013).
5. Kobayashi Y, Morimoto H, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. Fabrication of hollow particles composed of silica containing gadolinium compound and magnetic resonance imaging using them. *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 3: 62 (2013).
6. Suzuki Y, Roy C, Promjunyakul W, Hatakeyama H, Gonda K, Imamura J, Pillai B, Ohuchi N, Kanzaki M, Higuchi H, Kaku M. Single quantum dot tracking reveals that an individual multivalent HIV-1 Tat-protein transduction domain can activate machinery for lateral transport and endocytosis. *Molecular and Cellular Biology* 33: 3036-3049 (2013).
7. Kobayashi Y, Morimoto H, Nakagawa T, Gonda K, Ohuchi N. Preparation of silica-coated gadolinium compound particle colloid solution and its application in imaging. *Advanced in Nano Research* 1: 159-160 (2013).
8. Kobayashi Y, Inose H, Nagasu R, Nakagawa T, Kubota Y, Gonda K, Ohuchi N. X-ray imaging technique using colloid solution of Au/silica/poly(ethylene glycol) nanoparticles. *Material Research Innovations* 17: 507-514 (2013).

### 総説

1. 権田幸祐、中川智彦、櫻井遊、多田寛、小林芳男、大内憲明「X線 CT イメージングへのナノ粒子造影剤の応用」東北大学医学部保健学科紀要 22 巻 2 号 61-66 (2013 年)

### 招待講演

1. 権田幸祐「ナノ粒子を用いた高精度イメージングで拓く医学・医療研究」バイオマテリアルセミナー 2013 年 5 月 2 日 筑波大学
2. Gonda K, Kobayashi Y, Ohuchi N. High Accuracy Imaging of Cancer and Peripheral Artery Disease with X-ray CT and Fluorescence. 7th International Symposium on Nanomedicine. November 7-9, 2013, Kitakyusyu.

## 細胞分裂におけるアクチン骨格の収縮を制御する分子機構の解析

研究代表者：名古屋大学医学部脳神経外科 夏目 敦至  
分担研究者：名古屋大学医学部腫瘍生物学 千賀 威

### 1. 研究の概要

細胞分裂において細胞は、短時間の間に劇的にその形態を変化させる。そのような形態変化は主に微小管とアクチン骨格の再形成や収縮によりおこなわれる。本研究において我々は、細胞分裂に関わる新規遺伝子である SHCBP1 と Supervillin(SVIL)を同定した。これらのタンパク質は分裂時に特異的にリン酸化され、ある狭い時間帯に特定の部位に局在した。そしてアクチン骨格の収縮を促進し、細胞分裂の進行を制御した。これはダイナミックな細胞骨格の形成を制御する分子機構の一端を明らかにした研究である。

### 2. 研究の背景と目的

細胞分裂において複製したDNAは均等に二つの娘細胞に分配される。その分配異常は細胞死や細胞の癌化を誘導するため、細胞分裂は多くの複雑なネットワークで制御されている。複製した染色体が両極に移動した後、その中間点に逆方向の微小管が集積した central spindle という構造が形成される。Central spindle 上には細胞分裂に必須な PLK1 や AuroraB というプロテインキナーゼや、キネシンファミリータンパク質など多くの重要な因子が集積する。PLK1 や AuroraB が central spindle 上のタンパク質をリン酸化することにより、central spindle と同じ平面上の細胞膜直下にアクチンとミオシンからなるアクチン骨格が集積する。やがて central spindle 上のタンパク質によりミオシンのリン酸化が促進され、細胞膜が収縮し細胞分裂が進行する。これらの一連の過程は多くの複雑な分子機構で制御されており、広範囲の種で保存されている細胞生物学の根本的な基本原理である。また癌などの疾患は細胞分裂の異常による染色体の不安定性が関与しており、細胞分裂の分子機構の解明は癌や他の疾患の解明にも寄与する可能性がある。我々はプロテオミクスや siRNA を用いた解析により、細胞分裂における細胞骨格を制御する新たな分子機構の解明を試みた。

### 3. 成果

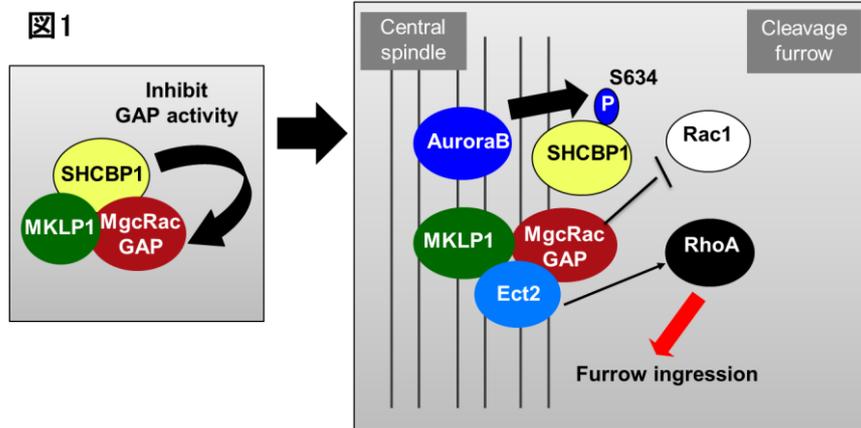
細胞分裂に関わる多くのタンパク質は分裂期にリン酸化される、もしくは発現が亢進することが知られている。そこで我々はそのようなタンパク質をデータベースを用いて探索し、細胞分裂に関わる可能性のある候補タンパク質を約 200 同定した。それらに対する siRNA を細胞に導入し、細胞分裂に異常がおきるか網羅的に解析した。その結果複数の細胞分裂に関与する遺伝子を同定し、それらのタンパク質を GFP 融合タンパク質として細胞に発現させた。そして SHCBP1 と SVIL というタンパク質が central

## A03 班 (ク)

spindle に局在することが判明した。

SHCBP1 の結合タンパク質やリン酸化を質量分析装置で検討したところ、central spindle 上にある MgcRacGAP と結合すること、また 634 番目のセリンが AuroraB によりリン酸化されることが分かった。またこのリン酸化が SHCBP1 の central spindle

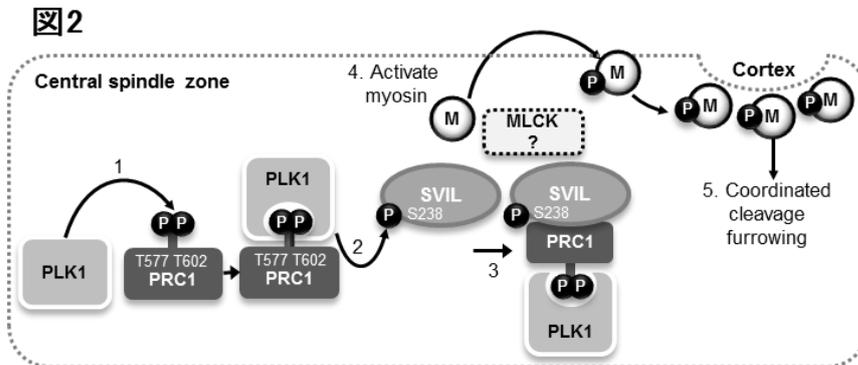
への局在を抑制することが判明した。詳細な研究の結果、SHCBP1 は AuroraB によりリン酸化されることで MgcRacGAP から分離し、その



の結果 MgcRacGAP が細胞膜上の Rac1 を不活性化し、アクチン骨格の収縮がおこり細胞分裂が進行することが明らかとなった (図1)。

SVIL は分子量 220kDa の巨大なアクチン結合タンパク質であることが知られている。SVIL の詳細な局在を検討したところ、分裂時には central spindle 上に局在することが判明した。さらに結合タンパク質やリン酸化を質量分析装置を用いて検討したところ、central

spindle 上に局在する PRC1 と結合すること、また 238 番目のセリンがリン酸化されることが分かった。このリ



ン酸化を詳細に検討したところ、PLK1 という central spindle に局在するプロテインキナーゼによりリン酸化されることが、またこのリン酸化が PRC1 との結合や SVIL の central spindle 局在に必須であることが判明した。さらに SVIL の機能を解析したところ、SVIL のリン酸化、また SVIL のミオシンとの結合領域が分裂時におけるアクチン骨格の収縮に重要であることが分かった。PLK1 によりリン酸化された SVIL は PRC1 と結合することで central spindle 上に局在し、そこでミオシンと結合することでミオシンを活性化し、アクチン骨格の収縮を誘導することが明らかとなった (図2)。

## **Novel molecular mechanisms for the regulation of actin cytoskeletal dynamics during cytokinesis**

Atsushi Natsume<sup>1</sup>

Takeshi Senga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery, <sup>2</sup>Division of Cancer Biology,  
Nagoya University Graduate School of Medicine

Cytokinesis is the final step of cell division that physically disconnects two daughter cells. After the separation of chromosomes, bundles of antiparallel microtubules, called the central spindle, are organized, and an actomyosin-based contractile ring is assembled on the inner face of the plasma membrane at the division plane. Constriction of the ring by myosin motor activity generates forces that drive the ingression of the cleavage furrow. One of the major regulatory mechanisms to ensure the accurate progression of these processes is phosphorylation by mitotic kinases, such as polo-like kinase 1 (PLK1) and the Aurora-A and Aurora-B kinases.

MgcRacGAP is localized at the central spindle and utilizes its GAP domain to inactivate Rac1 in order to induce furrow ingression in mammalian cells. We found that SHCBP1 is a binding partner of MgcRacGAP and phosphorylated at Ser634 by Aurora-B. A phosphorylation site mutant, S634A, was prematurely recruited to the central spindle and inhibited furrowing. An *in vitro* GAP assay demonstrated that SHCBP1 can suppress the MgcRacGAP-mediated inactivation of Rac1. The inhibition of Rac1 activity rescued the furrowing defect induced by S634A expression. Thus, Aurora-B phosphorylates SHCBP1 to prevent the premature localization of SHCBP1 to the central spindle and ensures that MgcRacGAP inactivates Rac1 to promote the ingression of the cleavage furrow.

PLK1 is a widely conserved serine/threonine kinase that regulates progression of multiple stages of mitosis. We found that an actin/myosin II binding protein, supervillin (SVIL), is a novel substrate of PLK1. PLK1 phosphorylates Ser238 of SVIL, which can promote the localization of SVIL to the central spindle and an association with PRC1. Expression of a PLK1 phosphorylation site mutant, S238A-SVIL, inhibited myosin II activation at the equatorial cortex and induced aberrant furrowing. SVIL has both actin and myosin II binding regions in the N-terminus. Expression of  $\Delta$ Myo-SVIL (deleted of myosin II binding region), but not of  $\Delta$ Act-SVIL (deleted of actin binding region), reduced myosin II activation and promoted defect in furrowing. Our study indicates a possible role of phosphorylated SVIL as a molecular link between the central spindle and the contractile ring to coordinate the activation of myosin II for the ingression of the cleavage furrow.

業績リスト

学術論文

1. Natsume A, Ito M, Katsushima K, Ohka F, Hatanaka A, Shinjo K, Sato S, Takahashi S, Ishikawa Y, Takeuchi I, Shimogawa H, Uesugi M, Okano H, Kim SU, Wakabayashi T, Issa JP, Sekido Y, Kondo Y. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* 2013;73:4559-70.
2. Hasegawa H, Hyodo T, Asano E, Ito S, Maeda M, Kuribayashi H, Natsume A, Wakabayashi T, Hamaguchi M, Senga T. The role of PLK1-phosphorylated SVIL in myosin II activation and cytokinetic furrowing. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 16):3627-37.
3. Asano E, Hasegawa H, Hyodo T, Ito S, Maeda M, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T. The Aurora-B-mediated phosphorylation of SHCBP1 regulates cytokinetic furrow ingression. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 15):3263-70.
4. Yamashita Y, Ito Y, Isomura H, Takemura N, Okamoto A, Motomura K, Tsujiuchi T, Natsume A, Wakabayashi T, Toyokuni S et al: Lack of presence of the human cytomegalovirus in human glioblastoma. *Mod Pathol* 2013.
5. Kato Y, Natsume A, Kaneko MK: A novel monoclonal antibody GMab-m1 specifically recognizes IDH1-R132G mutation. *Biochemical and biophysical research communications* 2013, 432(4):564-567.
6. Kaneko MK, Morita S, Tsujimoto Y, Yanagiya R, Nasu K, Sasaki H, Hozumi Y, Goto K, Natsume A, Watanabe M et al: Establishment of novel monoclonal antibodies KMab-1 and MMab-1 specific for IDH2 mutations. *Biochemical and biophysical research communications* 2013, 432(1):40-45.
7. Iwami K, Natsume A, Ohno M, Ikeda H, Mineno J, Nukaya I, Okamoto S, Fujiwara H, Yasukawa M, Shiku H et al: Adoptive transfer of genetically modified Wilms' tumor 1-specific T cells in a novel malignant skull base meningioma model. *Neuro-oncology* 2013, 15(6):747-758.

## 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 有馬 祐介

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

これまでに PEG 脂質の末端に ssDNA を結合した ssDNA-PEG 脂質が細胞—基板間や細胞同士の接着に有効であることを示してきた。その特徴を活かし、本年度は薬剤担持リポソームまたはナノ粒子を細胞へ導入させることを試みた。DNA ハイブリダイゼーションを利用して、抗酸化剤ビタミン E を担持したリポソームを血管内皮細胞内部へ効率よく導入できることが分かった。これにより、臓器移植で問題となる再灌流障害の原因の一つである、内皮細胞内部での活性酸素種の生成を抑制することができた。また、MRI 造影剤である酸化鉄ナノ粒子を脾臓内部の細胞にまで導入することができ、MRI コントラストを向上させることができた。

### 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だがそれが協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

## A03 班 (ケ)

### (1) 抗酸化剤含有リポソームの内皮細胞内部への送達による再灌流障害の軽減

再灌流障害の一因である，内皮細胞内部での活性酸素種発生を抑制するため，ssDNA-PEG-脂質を使用した薬剤の送達を試みた。抗酸化剤であるビタミン E を封入したリポソームに oligo(dA)<sub>20</sub>-PEG-DPPE を，ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に oligo(dT)<sub>20</sub>-PEG-DPPE を作用させた。両者を混合することにより，HUVEC 表面にリポソームが固定され，時間経過と共に細胞内部へ取り込まれることが分かった。また，ビタミン E 含有リポソームを HUVEC に固定後，antimycin A による酸化ストレスを与えたところ，培養時間に応じて HUVEC 内の活性酸素種生成量が減少した。

次に，ラット心臓を用いて再灌流障害の評価を行った。ラット心臓を摘出後，再灌流障害を生じさせたところ，毛細血管の膨張が見られた (Fig. 1(B))。しかし，事前に oligo(dA)<sub>20</sub>-PEG-DPPE および oligo(dT)<sub>20</sub> 修飾ビタミン E 含有リポソームを順次冠状動脈に灌流した場合，毛細血管の膨張が抑制された (Fig. 1(C))。一方，ビタミン E 含有リポソームのみを灌流した場合は抑制効果が見られなかった (Fig. 1(D))。以上より，血管内腔へビタミン E 含有リポソームを固定することで，再灌流障害を有意に抑制できることが分かった。

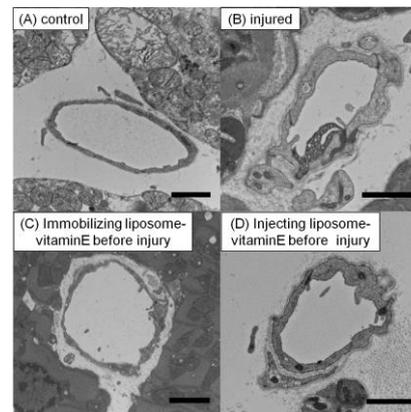


Fig. 1 再灌流障害後のラット心毛細血管の TEM 像

### (2) MRI 観察のための膵島細胞への酸化鉄ナノ粒子の標識

膵島細胞の表面を酸化鉄ナノ粒子 (SPIO) で標識することで，MRI を用いた非侵襲な観察手法の開発を目的とした。トリプシン処理で単個細胞にした膵島の細胞表面に DNA ハイブリダイゼーションを利用して SPIO 標識を行い，これを再凝集させることで SPIO 標識膵島を作製した。SPIO 標識膵島は無標識膵島と比較してその形状等に大きな変化は見られず，グルコース負荷試験においても同等のインシュリン産生能を示し，SPIO 標識や分解・再凝集による膵島機能への影響は軽微であることが示唆された。また，TEM 観察により数時間から一日の間に膵島細胞のエンドソーム内に SPIO が取り込まれている様子が見られた。さらに，膵島をアガロースゲル中に分散固定し MRI 撮像を行ったところ，SPIO 標識膵島だけが黒い影として観測され，十分な分解能で画像化できることが示された (Fig. 2)。以上のことから，膵島細胞一つずつへ SPIO 標識しその凝集体を再構築させることで，MRI のコントラストを向上させることができた。

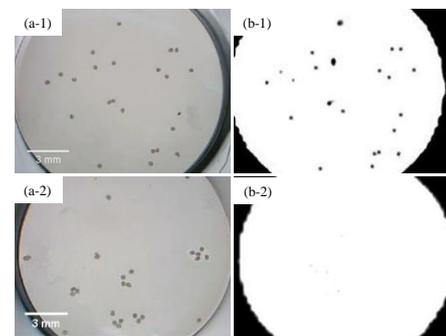


Fig. 2 (a) 膵島の顕微鏡像。(a-1) SPIO 標識 (a-2) 無処理。(b) (a) の MRI ( $T_2$  強調画像)。

## Three Dimensional Tissue Regeneration Through Multipoint Molecular Weak Association

Hiroo Iwata<sup>1</sup>

Yusuke Arima<sup>1</sup>, Yukihiro Okamoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University,

<sup>2</sup> FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevice, Nagoya University

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

Ischemia–reperfusion damage is a problem in organ transplantation. Reactive oxygen species are produced in cells by blood-mediated reactions at the time of blood reperfusion. We developed a method to immobilize and internalize antioxidants in endothelial cells, using vitamin E-loaded liposomes. The liposomes loaded with vitamin E and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were modified with PEG-lipids carrying 20-mer of deoxyadenylic acid (oligo(dA)<sub>20</sub>) and 20-mer of complementary deoxythymidylic acid (oligo(dT)<sub>20</sub>), respectively. The liposomes were effectively immobilized on HUVECs through DNA hybridization between oligo(dA)<sub>20</sub> and oligo(dT)<sub>20</sub>. The liposomes loaded with vitamin E were gradually internalized into HUVECs. Then, the cells were treated with antimycin A to induce oxidative stress. We found the amount of reactive oxygen species was greatly reduced in HUVECs carrying vitamin E-loaded liposomes. Additionally, an *ex vivo* experiment using rat heart demonstrated that damage of capillary induced by ischemia-reperfusion was efficiently reduced by pre-injection of (dA)<sub>20</sub>–PEG–DPPE and (dT)<sub>20</sub>–carrying liposome loaded with vitamin E through coronary artery.

A labeling method for islet cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIOs) based on DNA hybridization is proposed for monitoring of transplanted islets by magnetic resonance imaging (MRI). The surfaces of SPIOs were modified by via Michael reaction by reacting oligo(dA)<sub>20</sub> bearing a terminal thiol group at the 5'-end ((dA)<sub>20</sub>-SH) with maleic acid functional groups on the SPIOs. The SPIOs were immobilized on islet cells which had been pretreated with (dT)<sub>20</sub>–PEG–DPPE through DNA hybridization. Transmission electron microscopy observations revealed that SPIOs were initially anchored on the islet cell surfaces and subsequently transferred to endosomes or exfoliated with time. The SPIO-labeled islet cells could be clearly detected as dark spots by *T*<sub>2</sub>-weighted MR image, whereas non-labeled islet cells could not be detected.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Deno, S., Takemoto, N., Iwata, H. Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 350-357 (2014).
2. Kitamura, N., Nakai, R., Kohda, H., Furuta-Okamoto, K., Iwata, H. Labeling of islet cells with iron oxide nanoparticles through DNA hybridization for highly sensitive detection by MRI. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 7175-7181 (2013).
3. Konagaya, S., Kato, K., Nakaji-Hirabayashi, T., Iwata, H. Selective and rapid expansion of human neural progenitor cells on substrates with terminally anchored growth factors. *Biomaterials* 34, 6008-6014 (2013).
4. Luan, N.M., Iwata, H. Inhibition of instant blood-mediated inflammatory responses by co-immobilization of sCR1 and heparin on islets. *Biomaterials* 34, 5019-5024 (2013).

### 総説・解説・成書

1. Teramura, Y., Chen, H., Takemoto, N., Sakurai, K., Iwata, H.: Polymeric materials for surface modification of living cells. *Polymeric Biomaterials, Volume II, Medicinal and Pharmaceutical Applications of Polymers: Third Edition* (Dumitriu, S., and Popa, V., Ed.) *in press*
2. 有馬祐介：自己組織化単分子膜を用いた細胞－材料間相互作用の解析, *Colloid & Interface Communication* 37 (2013)

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 岩田博夫: Cell LEGO - 細胞から組織を作る - . MEDTEC Japan 2013 (2013. 4.25 東京) (招待講演)
2. 岩田博夫: 高分子による細胞表面の修飾と細胞の配置 - Cell LEGO - . 第 51 回関西バイオポリマー研究会(2013. 7.24 京都) (招待講演)
3. Iwata H.: Cell LEGO. Optical MEMS and Nanophotonics 2013 (2013. 8.21 Kanazawa) (招待講演)
4. 岩田博夫, 板垣 亮, Hoeffcker, I.T., 有馬祐介: ポリエチレングリコール - 脂質複合体と細胞との相互作用. 日本化学繊維研究所 第 71 回講演会 (2013. 11.12 京都)
5. 岩田博夫: 高分子による細胞表面の修飾と細胞の配置 - Cell LEGO - . 平成 25 年度第 1 回次世代バイオナノ研究会「幹細胞研究と再生医療」(2013. 11.27 大阪) (招待講演)
6. Arima, Y.: Interaction of Proteins and Cells with Model Biomaterials Surfaces, Symposium on Biorecognition and Bioseparation Engineering (Invited lecture) (2013.12.4 Kyoto)

## 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 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 製剤の開発を目指し、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て疎水性薬剤の製剤化を行った。抗体付加 PMBN ベルテポルフィンを用いた光線力学療法では、抗原を発現している癌細胞に特に高い抗腫瘍効果を示した。また、PMB を利用したベルテポルフィン製剤はリンパ節に滞留する性質があり、光線力学療法が乳癌リンパ節転移に対して有効な新規低侵襲治療となる可能性を示した。さらに NF- $\kappa$ B 阻害剤 DMEQ はナノ粒子キャリアーにより、溶解性や安定性などの問題点を克服し製剤化可能であり、臨床応用できる可能性が示された。

### 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。我々のグループでは、これまでの東京大学石原・金野研究室との共同研究により PMB や PMBN 等の生体適合性高分子両親媒性ポリマーを用い疎水性薬剤との会合体を作ることによって可溶化し、静注可能で副作用の少ない投与方法を目指して主に DDS の研究を中心に行ってきた。これらを踏まえ、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し、動物モデルを用いてその効果の確認を行うことを目的とし、本研究を企画した。

### 3. 成果

光感受性物質封入ナノ粒子を用いた光線力学療法では、PMBN と光化学反応時間が短く、長波長領域 (689nm) での吸収端を有する疎水性のポリポルフィリンオリゴマー、ベルテポルフィンを用いた。ベルテポルフィンは 488nm のアルゴンレーザーで励起し、650-700nm の波長を観察することにより、In vitro における取り込みの検討を行った。抗 EGFR 抗体を付加したベルテポルフィン封入 PMBN が、EGFR 高発現株である A431 に作用させたとき、30 分後には抗体なしの群の取り込み量の 3 倍となる。これは抗体によって細胞に封入体が定着し、細胞内への取り込みが増えていると推察さ

## 公募

れる。In vivo での取り込みは、A431 担癌免疫不全マウスに製剤を 6mg/kg の量にて投与した。抗体付加ベルテポルフィン封入 PMBN 投与群では、投与 1 時間後での腫瘍内ベルテポルフィン濃度は皮膚に比べ 9.4 倍の取り込みがみられた。一方、抗体なしの群では、その差は 3.6 倍にとどまった。腫瘍内のベルテポルフィンの濃度同士を比較すると、抗体付加の群がなしの群よりも 1.74 倍取り込まれていた。さらに 75J/cm<sup>2</sup> のレーザーを照射した実験系で、抗体付加群での腫瘍体積は、149±44.2mm<sup>3</sup>、抗体なし群は 1200±224.3 mm<sup>3</sup> であり、無治療群では 1937±285.2 mm<sup>3</sup> であった。また、抗体付加群での中間生存期間は 54 日であり、抗体なし群での 35 日、無治療群での 25.5 日に比べ有意に延長していた。

乳癌における腋窩リンパ節郭清(ALND)が予後の改善につながっているかどうか議論されており、ALND が省略可能であれば、リンパ浮腫や上肢拳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光線力学療法の有用性も検討した。PMB 製剤 4mg/kg 投与 1 時間後、腋窩リンパ節には 23.9µg/g tissue のベルテポルフィンが集積していた。治療群と非治療群では、リンパ節転移率は 12.5%と 56.3%と有意差を認めた (p=0.01)。リンパ節微小転移モデルを用いた検討において、抗体付加による上乘せ効果は見られず、PMB による可溶化製剤がリンパ節転移治療に有用であると思われた。

NF-κB は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ている。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。CMC/DHMEQ 懸濁液を用いてヒト膵癌株 AsPC1 に対して細胞増殖試験を行ったところ、DHMEQ 1, 5, 10, 20 µg/ml それぞれの濃度において、PMB/DHMEQ 製剤群が CMC/DHMEQ 懸濁液群よりも高い細胞増殖抑制効果を示した。ただし、PMB ポリマー単独では使用した範囲の濃度では細胞毒性はほとんど見られなかった。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。DHMEQ の血液中での安定性、組織内濃度及び血中滞留性を LS-MS 装置を用いて分析した結果、採取した血液に混和した時の DHMEQ の安定性には 2 群間で変化が見られなかったものの、12mg/kg の DHMEQ を担癌マウスに i.v.した実験系で、肺・肝臓などの臓器に CMC/DHMEQ 懸濁液群、癌部には PMB/DHMEQ 製剤群でより多くの DHMEQ が集積している傾向が見られた。

領域内共同研究として、マウス気管支炎モデルを作製し愛知教育大学・上野班に提供した。また、慈恵医大・福田班とも共同研究の計画・準備中である。

## Study of nano-carrier for novel DDS method

Osamu Itano

*Department of Surgery, Keio University*

The poly(MPC-co-BMA)(PMB) and poly(MPC-co-BMA-MEONP) (PMBN) can solubilize poorly soluble drugs due to its amphiphilic character in aqueous media, and these polymer showed a good cytocompatibility. In addition, the MEONP unit in the PMBN chain is an active ester unit that can immobilize proteins, including antibody. Aim of this project is that to formulate hydrophilic substance using PMB and PMBN as a nano-carrier for intravenous injection.

Photodynamic therapy (PDT) of cancer is a noninvasive optical therapeutic method in which the topical or systemic delivery of photosensitizing drugs is followed by irradiation with broadband red light. Verteporfin, a hydrophobic photosensitizer, has not yet been applied in cancer treatment despite advantages such as longer wave length and a short photosensitivity period. PMBN was conjugated with an anti-EGFR antibody and mixed with verteporfin. The fluorescence intensity in A431 cells *in vitro* was threefold higher after exposure to verteporfin-PMBN-antibody complex than after exposure to verteporfin-PMBN. 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. In addition, Verteporfin-PMB stayed in sentinel lymphnodes, and could treat metastasis on epidermis in animal model. 12.5% metastasis rate was observed in treated group while 56.3% in non-treated group.

The NF- $\kappa$ B/Rel family of transcription factors is involved in the development of cancer. This family is constitutively activated in many human pancreatic cancers. DHMEQ inhibits NF- $\kappa$ B activity by preventing nuclear translocation and has been shown anti-tumor effect. However, because of its hydrophobic property, DHMEQ has to be administered intraperitoneally or subcutaneously every day. Therefore, it is necessary to develop effective drug delivery system (DDS) of DHMEQ for clinical application. We used PMB to formulate DHMEQ and this formulation showed good stability and anti-tumor effect *in vitro* and *in vivo*. In AsPC-1 tumor-bearing mice, DHMEQ-PMB intravenous injection group (every three days) showed higher anti-tumor effect than control group (intraperitoneal injection of DHMEQ-CMC suspension, every day).

公募

## 業績リスト

学術論文

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）

松田祐子 the11th NMMS seminar @甲南大学 (2014.3.18)

## 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 岩崎 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いる。これらを化学的に修飾し、生きた細胞への非天然機能の付与と生体膜画分を担持したポリマー材料の合成を試みた。細胞膜糖鎖のシアル酸残基にメタクリロイル基を誘導し、これとチオール基をもつ温度応答性ポリマーを複合化した。温度刺激による細胞凝集の制御や糖タンパク質の回収に成功した。さらに、細胞由来の糖タンパク質を組み込んだポリマーゲルの調製も行った。

### 2. 研究の背景と目的

細胞の内外を隔てている細胞膜は膜タンパク質がモザイク状に組み込まれたリン脂質二分子膜より構成され、その表面は糖鎖に覆われている。糖鎖は複数種の単糖が連なった多様性に富む構造をもち、受容体機能、情報交換機能、接着機能など細胞のあらゆる生物機能を担っている。天然の糖鎖を模倣することにより、高度な生物機能を備えたバイオマテリアルを獲得できると考えられるが、有機化学的な合成手法によって天然の糖鎖を忠実に再現することは依然として困難である。これまでにバイオマテリアルとして利用されている糖鎖ポリマーの多くは、単一の単糖から構成されるホモ多糖や糖鎖のごく一部の構造を再現したものにすぎず、天然に見られる複雑な糖鎖を組み込んだバイオマテリアルの調製方法については、未だ十分に検討されていない。そこで、天然糖鎖の材料化を目指し、生きた動物細胞の表層にポリマー合成に有用な重合性官能基を誘導した。

### 3. 成果

動物細胞の糖鎖末端にはシアル酸(Neu5Ac)と呼ばれる糖残基が点在している。シアル酸の生合成は、ウリジン二リン酸(UDP)-*N*-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)から5段階の連続反応を経て合成される。この糖鎖改変技術をバイオマテリアル設計に利用することにより、細胞種に基づいた極めて特殊性に富むバイオマテリアルを創出できると考え、新たなManNAc誘導体、*N*-メタクリロイルマンノサミン(ManMA)を合成した。

牛胎児血清を含むRPMI1640培地に所定濃度のManMAを添加し、この培地中で急性前骨髄性白血病細胞(HL-60)を3日間培養した。HL-60を培地で3回洗浄した後、末端にSH基を持つポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM-SH)を含む無血清培地に移し、ここにラジカル前駆体のIrgacure2959を加え4℃で15分間光照射した。

HL-60表面には恒常的にシアル酸残基を持つP-セレクトリン糖タンパク質リガンド1(PSGL-1)が存在する。PNIPAM-SHを反応させたHL-60のPSGL-1をウエスタンブロッティング法で追跡した(Fig. 1)。未処理のHL60細胞では120 kDa付近にPSGL-1のバンドが確認された(レーン2)。また、ManMA処理をしてPNIPAM-SHを反応させなかったもの

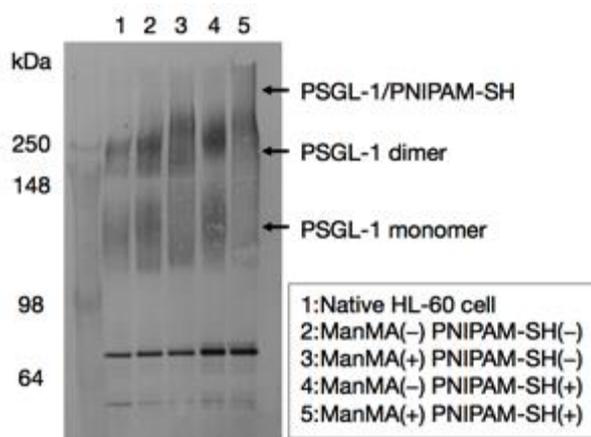
## 公募

と、ManMA の処理をせず、PNIPAM-SH を反応させたものでは PSGL-1 の分子量は全く変化しなかった(レーン 3, 4)。一方, ManMA 処理後に PNIPAM-SH を反応させた細胞では, PSGL-1 の分子量の顕著な上昇が認められた(レーン 5)。このことから, PSGL-1 と PNIPAM-SH が化学的に結合していることがわかり, ManMA 処理された細胞の糖鎖にはメタクリロイル基が誘導され, 化学的にこの官能基を修飾できることが示された。

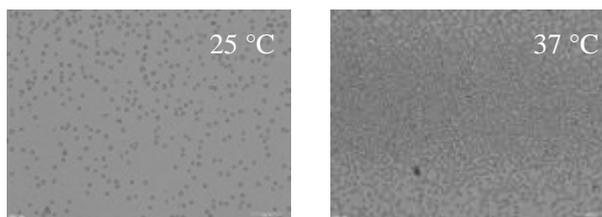
PNIPAM は 31 °C 付近で下限臨界溶液温度 (LCST) 型の相転移挙動を示すポリマーである。ポリマーを修飾した後, 温度を変化させて細胞の状態を観察した (Fig. 2)。LCST 以下の温度では, 細胞は個々に分散しているのに対し, LCST 以上では細胞が凝集した。細胞表面の PNIPAM 鎖が疎水的になり, 細胞の凝集を誘起するのりの役割を果たした結果である。

細胞表面に存在している糖鎖および糖タンパク質は生化学分野においてその有用性が極めて高いことが古くから認識されているものの, 化学的に合成することが困難であったり, また, 糖タンパク質に至っては, そもそも溶解性が低く, 脂質二分子膜中に存在していないと沈殿, 凝集してしまうため, その機能評価は一部のものに過ぎず, マテリアルとしての利用は十分に進められていない。

続いて細胞懸濁液と細胞溶解バッファーを所定の割合で混合し細胞を溶解した。不溶分を遠心分離処理により完全に沈降させ上澄みを回収し, ウェスタンブロット解析により, PSGL-1 に対する抗体を作用させた。ManMA を含まない通常培地中で培養された細胞の溶解液の解析結果では, PSGL-1 の単量体および 2 量体のバンドが確認された。これに対し, ManMA を添加した培地中で培養された細胞では, 高分子量側にスメアー状のバンドが確認され, ネイティブのバンドは薄くなった。このことより, PNIPAM-SH が PSGL-1 に複合化されていることがわかる。さらに, 先に調製した細胞溶解液に少量の PNIPAM を添加し, 溶液の温度を 37 °C に加温したところ, 白色の沈殿が認められた。上澄みを捨て, 新たに細胞溶解バッファーを添加し, 冷却して沈殿を溶解した。通常の培地で培養した細胞溶液からは, PSGL-1 に由来するバンドが完全に消失した。一方, ManMA を添加した細胞より採取した溶解液では, PNIPAM-SH と複合化した PSGL-1 に由来するスメアー状のバンドのみ確認され, ネイティブ由来のバンドは消失した。この結果より, PNIPAM-SH と複合化した糖タンパク質を温度刺激により回収できることを明らかにした。



**Fig.1** Western blot analysis data showing PSGL-1 antibody reactive bands.



**Fig.2** Temperature-assisted aggregations of PNIPAM-immobilized HL-60 cells.

## Imaging and model analysis of molecular function in cells

Yasuhiko Iwasaki

*Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, Japan*

In order to introduce alternative functions into mammalian cells and control them under ambient conditions, poly(*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAM) was immobilized on the cell surface. Cellular aggregation could be regulated by temperature change. In addition, separation of PNIPAM-conjugated glycoproteins was successfully performed.

PNIPAM was polymerized by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. The GPC results showed that  $M_n$  of PNIPAM was  $1.2 \times 10^4$  with a polydispersity of 1.16. Thiol termination of the resulting polymer (PNIPAM-SH) was generated by treatment with ethanolamine. *N*-Methacryloyl mannosamine (ManMA, 5 mM) was in contact with HL-60 cells for 3 days to deliver methacryloyl groups to the carbohydrates of the cells. RPMI-1640 medium containing 2.5 wt% thiol-terminated PNIPAM and 0.05 wt% Irgacure 295920 was added to the cells after which the tissue culture dish was exposed to  $743 \mu\text{W cm}^{-2}$  UV light (365 nm) for 15 min at 4 °C. The viability of the cells was preserved even after the immobilization with PNIPAM. The thermoresponsive nature of the PNIPAM-immobilized cells was determined by phase-contrast microscopic observation. At 25 °C, the cells were homogeneously scattered. This is the ordinary nature of non-adhesive HL-60 cells. In contrast, cellular aggregation occurred at 37 °C, which is a temperature higher than the LCST of PNIPAM.

Oligosaccharides are attached to various proteins embedded in the plasma membrane or directly to lipids. We then confirmed the formation of PNIPAM-glycoprotein conjugates and separated them using the thermoresponsive nature of PNIPAM. When PNIPAM was immobilized on ManMA-treated cells, an anti-PSGL-1 reactive band with a higher molecular weight was observed and the original bands from monomeric and dimeric PSGL-1 were faded. In contrast, a molecular weight increment of PSGL-1 was not observed for non-treated cells. This result indicates that PNIPAM is immobilized on PSGL-1 through the thiol-ene reaction. The thermal treatment was performed after the immobilization of PNIPAM on the ManMA-treated cells. When the lysate was warmed to 37 °C, precipitation formed. Only a smear band due to molecular weight increased PSGL-1, which is conjugated with PNIPAM, was identified and native bands of PSGL-1 were completely diminished. Furthermore, any anti-PSGL-1 reactive band was not observed from the lysate of native cells after the thermal treatment.

## 公募

## 業績リスト

### 学術論文

1. Iwasaki Y\*, Sakiyama M, Fujii S, Yusa S. Surface modification of mammalian cells with stimuli-responsive polymers. *Chem. Commun.* **2013**;49:7824-7826.
2. Goda T\*, Tabata M, Sanjoh M, Uchimura M, Iwasaki Y\*, Miyahara Y\*. Thiolated 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine for antifouling biosensor platform. *Chem. Commun.* **2013**;49:8683-8685.
3. Tamura A, Tokunaga M, Iwasaki Y, Yui N\*. Spontaneous assembly into pseudopolyrotaxane between cyclodextrins and biodegradable polyphosphoester ionomers. *Macromol. Chem. Phys.* **2014**:in press.

### 総説・解説・成書

1. 岩崎泰彦. 糖鎖改変技術による細胞表面の修飾と機能化. バイオマテリアル. 印刷中.

### その他(報道, 受賞, 特許, 主な招待講演, 活動など)

1. 日本油化学会 オレオサイエンス賞(平成25年9月)
2. 合同研究発表会(新学術4領域共催)を開催(平成25年11月)
3. 第35回日本バイオマテリアル学会大会 ハイライト講演(平成25年11月)

## 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：愛知教育大学 上野 裕則

### 1. 研究の概要

今年度は主に病気や疾患を持ったマウスを作成し、疾患の細胞運動パラメータを得ることを目標とした。これは、疾患によって破綻する細胞運動を定量的に記録・解析することで、将来的には疾患の分子機構解明や病気の診断にも応用したいと考えている。今年度の研究成果として、気管支炎モデルマウスの作成に成功し（慶応義塾大学、松田祐子先生との共同研究）、また、水頭症や気管繊毛に異常を示すノックアウトマウスの作成にも成功した（大阪大学、濱田研究室篠原助教との共同研究）。さらに、精子の鞭毛運動にも研究範囲を広げ、鞭毛運動の解析や構造解析も行うことができた。

### 2. 研究の背景と目的

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ているため、繊毛運動の異常は様々な疾患に関わる。申請者は昨年、ナノスケールの蛍光粒子を用い、マウス気管組織の繊毛運動の定量化（波形、振幅、周波数）、及び気管内腔組織表面の流体を高精度（7-9nm の空間分解能）で解析する系を確立し、さらにクライオ電子線トモグラフィ法により繊毛内部の3次元構造を明らかにすることにも成功した。しかし、これらはすべて健常のマウスを使った研究であった。今年度は主に病気や疾患を持ったモデルマウスを作成し、昨年開発した同様の系で解析を行い、健常マウスから得られたデータとの比較を行いたいと考えた。これは、通常繊毛運動の定量データを基に、病気による繊毛運動の変化から、疾患による運動破綻のプロセスを数値で導き出し、将来的には疾患の分子機構解明や病気の診断にも応用したいと考えている。

### 3. 成果

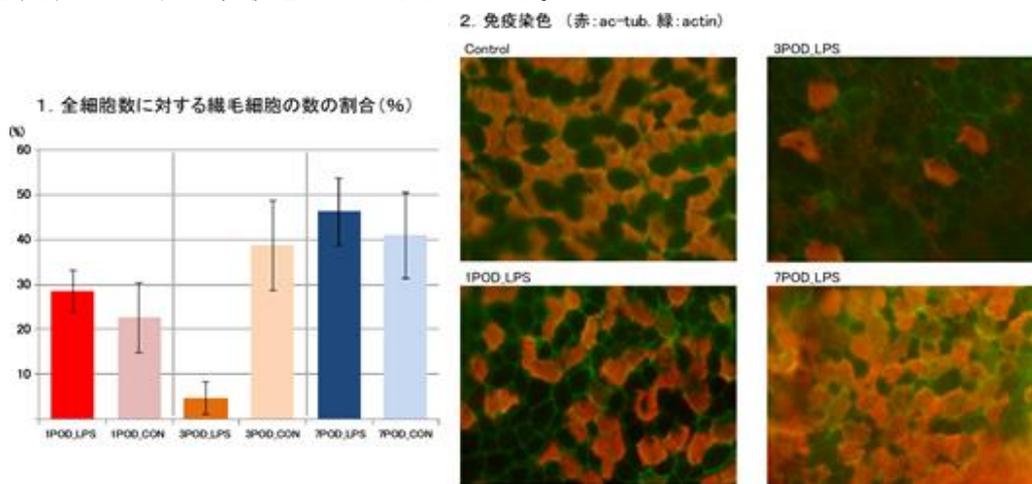
本年度は気管支炎モデルマウスの作成、繊毛の構成分子のノックアウトマウスの作成、精子鞭毛の構造解析を行った。以下、それらの具体的な成果について記述する。

#### 1. 気管支炎モデルマウスの作成

リポ多糖（LPS）をマウスの気管内腔に噴霧し、1日後、3日後、7日後にパラホルムアルデヒドで固定後、アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫染色法によって気管組織の繊毛を可視化した。また、蛍光ファロイジンを用いてアクチン繊維を可視化し気管内腔組織の形態観察も同時に行った。その結果、LPS噴霧し1日後のマウスではほとんど変化が見られなかったのに対して、3日後では繊毛が抜け落ち、繊毛の観察される細胞の数は大きく減少していた（下図1）。LPS噴霧後7日目のマウスでは繊毛

## 公募

を持った細胞の数は回復していたものの、繊毛の長さが短くなり、未だ気管の炎症の効果が残っていることが分かった（下図2）。今後は、この気管支炎モデルマウスを用いて、昨年開発した繊毛運動の高精度解析、流体解析、及びクライオ電子線トモグラフィー法による繊毛の内部構造の3次元構造解析を行う予定である。この研究は慶應義塾大学医学部の松田祐子助教との共同研究である。

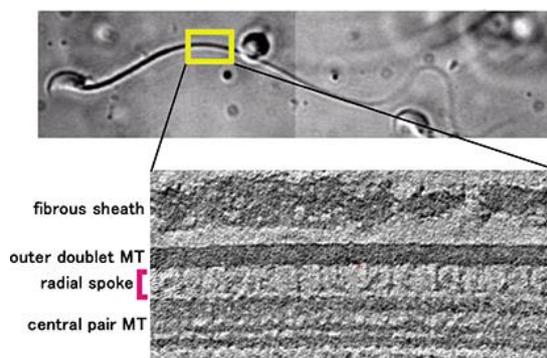


### 2. 繊毛内構成物質遺伝子のノックアウトマウスの作成

近年のプロテオミクス解析によって、繊毛内構成分子は約300程あることが分かっている。しかし、それぞれの分子がどのような機能を持っているかについては分かっていない。本研究では、繊毛内構成分子の遺伝子を欠失したノックアウトマウスを作成し、その表現系を詳細に解析することによって、繊毛疾患の分子機構を解明しようと考えた。その結果、ある遺伝子を欠失したノックアウトマウスでは、水頭症を発症し、さらに気管の繊毛運動に異常が起こることが分かった。現在、繊毛内のどの構造に異常が現れるかをクライオ電子線トモグラフィー法を用い、気管繊毛内部の3次元構造解析を行うことによって明らかにしたいと考えている。この研究は大阪大学濱田研究室、篠原恭介助教と共同で研究を進めている。

### 3. 精子の鞭毛運動と鞭毛内部の3次元構造解析

精子は生殖に関わる細胞であり、精子の運動異常は不妊症などの病気に関わる。本研究ではマウスの精子鞭毛の運動を詳細に解析するとともに、精子鞭毛内部の3次元構造をクライオ電子線トモグラフィー法によって解析した。運動性の解析の結果、精子の中片部分と尾部では運動の周波数や波形が異なっていることがわかった。さらに精子鞭毛の3次元構造解析にも成功した（右図）。今後さらに詳細な構造解析が期待される。



## **Molecular mechanism of a ciliary disorder by bio-nano-imaging**

Hironori Ueno  
Aichi University of Education

Mucociliary clearance on the surface of the tracheal lumen is an important component of lung defense against dust mites and viruses. Fluid on the surface of the tracheal lumen flows from the lungs to the larynx as a result of effective ciliary motion. Though we developed the methods for nano-scale kinetics of ciliary motion and the three dimensional axonemal structure in the last year, we still don't know an influence of the disease such as bronchitis on ciliary function.

In this study, we examined the development of bronchitis mouse model using lipopolysaccharide (LPS) spray. In order to verify the LPS effect on respiratory cilia, we examined the immunofluorescence staining using anti-acetylated tubulin antibody, and also we stained actin filaments using phalloidin conjugated fluorescence to verify the cell shape in model mouse. Though respiratory cilia were remained on the ciliated cells after a day as the control experiment, most of them were missing from the ciliated cell after three days, whereas most of respiratory cilia were recovered on the ciliated cell after seven days. However, recovered cilia didn't have appropriate length. They seem to be shorter than it of the normal cilia.

Next, we also developed the knockout mice missing a gene of the ciliary components. The mice have abnormalities related to ciliary defects such as hydrocephalus. We will try to examine the ciliary motion using nano-precision imaging technic and the three dimensional structure by cryo electron tomography to clarify the missing component in cilia.

Finally, we are now examining the analysis of motion using high speed camera and three dimensional structure of mouse sperm flagella using cryo electron tomography. We already obtain the waveform and three dimensional structure of the sperm flagella, and compare with it of respiratory cilia to analyze the relationship between the structure and waveform of cilia and flagella.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

該当なし。

#### 著書

該当なし。

#### 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**, Khanh Huy Bui, Takuji Ishikawa, Yohsuke Imai, Takami Yamaguchi, Takashi Ishikawa  
An alternative force generation of dimeric dynein in cilia revealed by cryo-electron tomography  
Dynein2013, Kobe, Japan, November 2, 2013
2. **Hironori Ueno**, Takuji Ishikawa, Khanh Huy Bui, Kohsuke Gonda, Takami Yamaguchi, Takashi Ishikawa  
Nano-imaging of ciliary motion and structure by light and electron microscopy  
ナノメディシン分子科学国際シンポジウム  
東京大学本郷キャンパス 山上会館 2013年10月8-10日

##### 国内学会

1. **上野 裕則**  
気管繊毛ダイニンの軸糸内における構造変化  
日本機械学会 バイオエンジニアリング講演会（ワークショップ講演）  
東北大学 片平キャンパス 2014年1月12日
2. **Hironori Ueno**  
Ciliary motion and the three dimensional structure of mouse respiratory cilia  
日本生物物理学会 タイトル（新学術「ナノメディスンの分子科学」共催）  
「個体の生物物理学-分子・細胞・個体にブリッジ」 “Biophysics toward *In Vivo* work”  
京都国際会議場 2013年10月30日
3. **上野 裕則**  
高精度分子イメージングを用いた気管繊毛の運動と構造のナノ解析  
NMMS 第6回セミナー 東京医科歯科大学 2013年6月11日
4. **上野 裕則**  
気管の繊毛運動の定量化と3次元構造解析  
ナノメディシン分子科学 第2回 若手の会  
京都大学再生医科学研究所、2013年5月31日～6月1日
5. **上野 裕則**  
気管繊毛外腕ダイニンの3次元構造とヌクレオチドによる構造変化  
日本顕微鏡学会 大阪 2013年5月20-22日
6. **上野 裕則**、フイ ブイ、石川 尚、石川 拓司、山口 隆美  
気管繊毛外腕ダイニンの3次元構造とヌクレオチドによる構造変化  
第65回 日本細胞生物学会 ウィンク愛知、2013年6月19-21日

## 光増感によるエンドソーム脱出の分子科学

研究代表者：岡山大学大学院自然科学研究科 大槻高史

### 1. 研究の概要

細胞内への物質導入において細胞のエンドソーム内に溜まってしまふ物質を細胞質に移行させる方法として、光増感剤の利用に基づく光依存的エンドソーム脱出法が知られている。本研究では、この方法において利用可能な光増感剤の探索に基づいて、緑色光、赤色光、および近赤外光による効率的な光依存的エンドソーム脱出を可能にした。さらには、本手法で利用可能な光増感剤に求められる性質として、光照射時の一重項酸素( $^1O_2$ )生成の効率に関係していることを、 $^1O_2$ 生成量子収率の測定および $^1O_2$ 生成の阻害剤を用いた細胞実験により明らかにした。

### 2. 研究の背景と目的

エンドサイトーシス経路を経由する動物細胞内への物質導入法において、目的物質の多くがエンドソームに閉じ込められてしまふ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。これはキャリア分子とキャリア分子により運ばれる物質と光増感剤とを同時に細胞培養液に加え、これら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、多数の種類的光増感剤について調べる必要がある。

筆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、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. *Bioconjug. Chem.*, 2011)。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、蛋白質に付加できる色素群の中から緑色光、赤色光、近赤外光にそれぞれ応答する光増感剤の探索を行うとともに、PCI法において光増感剤に求められる性質の解明に取り組んだ。

### 3. 成果

#### 1) 光誘導 RNA 導入法に利用可能な光増感剤の探索

PCI 法の例として光誘導 RNA 導入法を基準とし、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した。具体的には、光誘導 RNA 導入法で用いる RNA キャリア蛋白質に様々な光増感剤候補物質を共有結合させて、光応答性 RNA キャリアのバリエーションを作製した。ここでは、緑色光（波長 530–550 nm）により励起できる 8 種類、赤色光（590–645 nm）により励起できる 8 種類、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、緑色、赤色および近赤外域の色素の中からそれぞれ 2–3 種類ずつ有効な光増感剤を見つけることができた。さらには、選び出された光増感剤を、光応答性 RNA キャリア以外の新規光応答性分子（光応答アポトーシス誘導分子）の設計に適用し、同様に利用可能であることを実証した。

#### 2) PCI 法において光増感剤に求められる性質の解明

光増感剤候補物質に励起光をあてたときの蛍光量子収率 ( $\Phi$ )、 $^1O_2$  生成量子収率 ( $\Phi_\Delta$ )、を測定した。また、およそその熱生成に関するパラメータ ( $1 - \Phi - \Phi_\Delta$ ) 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、照射による RNA の細胞質内拡散（エンドソーム脱出）の度合いを調べた。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いと最も相関の高いパラメータを探し出した結果、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 2）。さらには、 $^1O_2$  生成の阻害剤を用いた細胞実験により、照射時の  $^1O_2$  生成がエンドソーム破壊に関係していること確認された（図 1）。

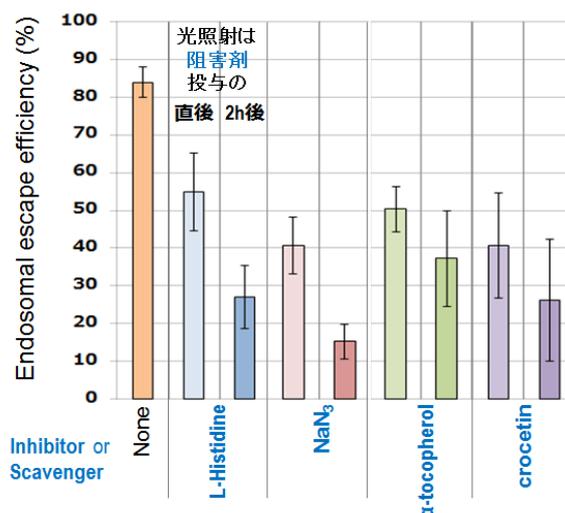


図 1.  $^1O_2$  生成の阻害剤を用いた細胞実験

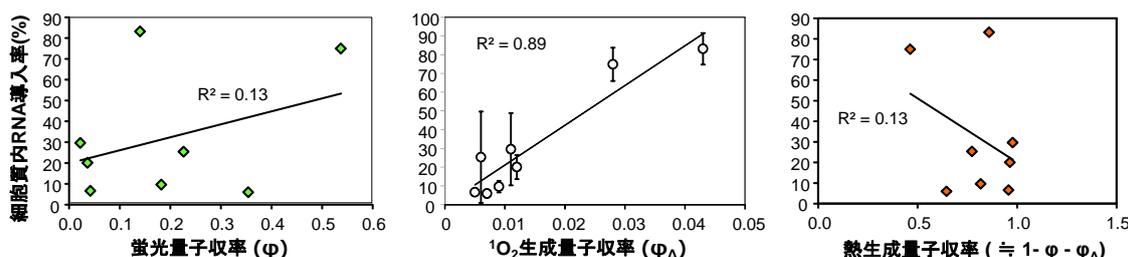


図 2. 光誘導 RNA 導入法における光増感剤の性質と細胞質内 RNA 導入（エンドソーム破壊）効率の相関

## Mechanism of light-dependent endosomal escape of photosensitizing molecules

Takashi Ohtsuki

*Department of Biotechnology, Okayama University, Japan*

Intracellular delivery of macromolecules such as proteins and nucleic acids is important for therapeutic and biological applications. Thus many delivery strategies have been studied. However, sometimes an inefficient transfer of macromolecules to the cytosol often occurs due to their endosomal entrapment. 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. In the photo-dependent cytosolic RNA delivery method (Ohtsuki et al., *J. Control. Release*, 2009) that is one of the PCI strategies, an RNA carrier protein bearing a photosensitizer moiety are used. The localization of the “small” photosensitizer is strongly affected by the “large” RNA carrier protein. Thus, by using this system, we can discuss only “photosensitizing reaction” and the factor of “cellular localization” can be ignored.

First, we screened fluorescent dyes 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 ( $\Phi$ ),  $^1\text{O}_2$  generation quantum yield ( $\Phi\Delta$ ) 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  $^1\text{O}_2$  generation quantum yield of the photosensitizer in the hydrophobic solvent was highly related to the endosomal escape efficiency. Moreover, an intracellular RNA delivery experiment using  $^1\text{O}_2$  inhibitor and  $^1\text{O}_2$  scavenger suggested that photo-dependent  $^1\text{O}_2$  generation is necessary for photo-dependent endosome disruption.

業績リスト

学術論文

1. Matsushita-Ishiodori, Y., Morinaga, M., Watanabe, K., Ohtsuki, T., Near-infrared light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule. *Bioconjug. Chem.* 24, 1669–1673 (2013)
2. 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)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Takashi Ohtsuki, “Light-directed RNAi using a photosensitive carrier molecule” International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, 2013年10月8日
2. 大槻高史「光で細胞機能を操る」テラヘルツと生命科学融合による革新的イノベーションワークショップ、2013年12月5日
3. 大槻高史「光に応答する生体機能分子」バイオマテリアル学会 第2回中四国ブレインストリーミング、2014年2月28日

## 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

本研究では、生きた単一細胞内において mRNA を定量解析する方法を開発するとともに、細胞内の mRNA 分解過程を実時間で追跡することによりそのメカニズムを解明することを目的とした。前年度までに開発した蛍光相関分光法 (FCS) によるアンチセンスプローブの拡散速度解析に基いたプローブの解離定数および標的 mRNA 濃度の定量法を、siRNA により分解を誘導した GAPDH mRNA の定量追跡へと応用した。その結果、初めて単一生細胞内において mRNA が分解する過程を捉える事に成功した。また、mRNA 定量的追跡法を用いてマウス初期胚内の遺伝子発現変化を捉えられたことから、本法の応用性の高さを確認した。

### 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、プロセッシング、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。

一方、既存の細胞内 mRNA の解析法としては、標的 RNA に蛍光タンパク質等と相互作用することのできるタグ配列を挿入する方法が一般的であるものの、この場合ネイティブに発現している内在性 mRNA を標的にすることができないこと、また蛍光タンパク質により、本来 mRNA が受ける複雑な制御（翻訳抑制や RNA 分解等）を受けにくくなってしまふという問題が報告されていた。

このことから、本研究では細胞質において mRNA の発現量変化や振る舞いをとらえるため新規 mRNA 検出・定量化法を開発して mRNA を標的とした細胞機能を操作する基盤技術の創成を目指した。また、これを用いて細胞内における mRNA 分解のダイナミクスを解明することを第二の目的とした。

### 3. 成果

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した。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、これに相補的なアンチセンスプローブを設計及び調製した。Cy3 により蛍光標識した 20 塩基程度のアンチセンス 2'-O-methyl RNA プローブをマイクロインジェクションにより COS7 細胞の細胞質に導入し、ネイティブに発現している標的 mRNA にハイブリダイズさせた。その蛍光を蛍光顕微鏡により観察した後、蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) により解析した。FCS 測定により得られたアンチセンスプローブの自己相関関数を解析したところ、細胞内において、プローブは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。更に、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。次に、FCS による mRNA 定量解析法を用いて、siRNA 依存的な選択的 mRNA 分解過程の追跡を行った。まず、GAPDH mRNA を標的とした siRNA を受託合成により調製した。一定時間 siRNA を作用させた後に GAPDH mRNA を定量したところ、siRNA 作用時間依存的な mRNA 濃度の減少が確認された。続いて、プローブを導入した同一生細胞に対して、繰り返し mRNA 定量解析を行った。FCS 解析の繰り返しによる mRNA 発現量の追跡では、照射レーザー強度や顕微鏡上における培養条件など最適化を行った。この結果、無作用の細胞においては mRNA 濃度の有意な変化は観察されなかったのに対し、siRNA を作用させた細胞内においては、添加後 40-70 時間において mRNA が時間とともに減少している様子を捉えた。

次に、本 mRNA 定量解析法の有用性を示すために、mRNA 発現量が劇的に変化し、さらにそれが分化に重要な意義を有する現象として発生初期過程を選択し、マウス胚内の発生進行に伴う mRNA 発現量変化の検出を試みた。マウスより摘出した受精卵に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、一定時間培養したのち、FCS により細胞質および核内においてプローブの自己相関関数を取得した。これを解析した結果、培養細胞と同様に、アンチセンスプローブは GAPDH mRNA との結合型と解離型の二成分を含んでいるのに対し、対照プローブでは解離型として検出された。さらに、受精直後の一細胞期から二細胞期までを追跡したところ、核内において受精直後は mRNA はほとんど発現していないのに対し、二細胞期においては核内において mRNA レベルが上昇していた。一方、細胞質においては発生過程の進行に関わらず一定量検出された。この結果は、受精直後の胚内では遺伝子発現が抑制されており、細胞質に残存する母性 mRNA のみを有すること、また第一分裂前後から胚性遺伝子の転写が開始される事を示しており、本法により胚性・母性転移 (Maternal-to-zygotic transition, MZT) を実時間にて捉えられることを明らかにした。

## 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 regulation through various step of processing throughout the cell. Direct observation of endogenous mRNA in living cells promises a significant comprehension of these refined regulation. Recently a number of fluorescent probes for mRNA have been developed including our fluorescent linear antisense probe. However, quantitative analysis of intracellular mRNAs has been difficult. In this study, fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was used to quantify the hybridization reaction of target mRNA with fluorescent antisense probes. When antisense probes hybridize with mRNA, which forms large complexes with various RNA binding proteins, they have slower diffusion constants than unbound probes which is in a free state. Antisense 2'-*O*-methyl RNA probes for GAPDH mRNA labeled with Cy3 were microinjected into the cytoplasm of COS7 cells and the fluorescence intensity of confocal volume was analyzed by FCS. As we expected, probes hybridized with mRNA showed slower diffusion times than those of unbound probes. Two fractions having different diffusion times were observed, suggesting that we could detect both antisense probes-mRNA hybrid and unbound probes. The fraction ratios of bound and unbound probes were different among cells, reflecting the different concentration of expressed endogenous GAPDH mRNA ranging from 32.0 nM to 109 nM with an average of 71.7 nM. This novel method to quantify endogenous mRNAs in single living cells is helpful in monitoring and characterizing endogenous mRNA, especially under regulations. Then we next applied this method to the observation of mRNA decay in living cells. Time-lapse quantitative analysis of GAPDH mRNA during siRNA-mediated RNA interference allowed the monitoring of mRNA decay in live cells for the first time. These results indicated that our method will be powerful tool for monitor the gene activity in real time.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Brandon M. Kenwood, Janelle L. Weaver, Amandeep Bajwa, Ivan K. Poon, Frances L. Byrne, Beverley A. Murrow, Joseph A. Calderone, Liping Huang, Ajit S. Divakaruni, Jose L. Tomsig, Kohki Okabe, Ryan H. Lo, G. Cameron Coleman, Linda Columbus, Zhen Yan, Jeffrey J. Saucerman, Jeffrey S. Smith, Jeffrey W. Holmes, Kevin R. Lynch, Kodi S. Ravichandran, Seiichi Uchiyama, Webster L. Santos, George W. Rogers, Mark D. Okusa, Douglas A. Bayliss, Kyle L. Hoehn, Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane, *Molecular Metabolism*, in press.

### 総説・解説・成書

1. 岡部弘基, 「蛍光性ポリマー温度センサーを用いた生細胞内の温度測定とイメージング」, 実験医学, Vol. 31 No. 11 (7), (2013), p1799-1805.
2. 岡部弘基, 「観るだけでなく測る: 定量的イメージングによる細胞機能解析」, バイオイメージング, Vol. 22 No. 1 (2013), p2-9.

### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. 岡部弘基, 第17回酸素ダイナミクス研究会, 「生細胞内の温度イメージング」, 弘前大学医学部, 弘前市, 2013年8月3日(招待講演).
2. 岡部弘基, “Imaging of temperature in a living cell using a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy”, 19th International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences", ドイツ ベルリン, 2013年9月6日.
3. 岡部弘基, “Real-Time Monitoring of mRNA Decay in Living Cells”, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013 (NMMS2013), 東京大学, 東京, 2013年10月8日.
4. 岡部弘基, “Real-Time Monitoring of mRNA Decay in Living Cells”, Biophysical Society 58th Annual Meeting, 米国 サンフランシスコ, 2014年2月18日.

## フォトリック 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

多くの電化製品や機械では組み込み型のマイクロプロセッサにより電子制御が行われる。これと同様に、生体を構成する細胞系の計測や制御に対しても、その場で機能する組み込みナノプロセッサは有効であると考えられる。本研究では、光と DNA の特性を活用し、分子の計測、情報の処理、物理応答の三つの機能を集積化したフォトリック DNA プロセッサの開発を行っている。今年度は、ナノプロセッサのプログラミングに利用可能な、外部光信号による FRET 伝達の経路選択系を構築した。また、並列局所的なナノプロセッサ駆動のため、回折限界以下の光スポットのアレイを生成することができた。ナノプロセッサの物理応答の実装手法として、励起エネルギーの熱変換による DNA 放出機構の機能を示した。

### 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 は結合や構造変化を高い精度で予測・制御することが可能であり、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。ただし、分子のみの実装方式では分子系外部とのインターフェース機能が不足し、細胞形態等の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、細胞系は階層性をもったシステムであり、その理解には、さまざまなスケールでの情報を統合的に利用する仕組みが求められる。

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リック 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。その有望な実装方式である DNA スキャットホルド論理は、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、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により演算を実行する。本研究では、適切な時間、場所において所望の機能を得るプログラム可能性の実現のため、外部光信号により実行する演算を適宜設定可能な方式を開発する。また、核酸機能の活性化制御へ適用して性能を評価し、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

DNA スキャットホルド論理による演算をプログラムする手法として、アクティベータ分子を用いた FRET の光制御系を2つ組み合わせ、制御光の波長によるFRETエネルギー伝達の経路選択技術を構築した。図 1 に示すように、同一の DNA 構造体上に5つの蛍光分子を配置する。Alexa568 が共通のドナーとなっており、これより左側の系1と右側の系2のアクセプタ Cy5.5 および Cy5 の活性を、それぞれ対応するアクティベータ(Cy3 および Alexa405)を介して制御する。

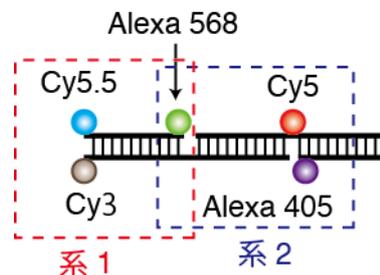


図 1 FRET 伝達経路選択系

Cy5.5 のみを活性化したときには系 1、Cy5 のみを活性化したときには系 2 への経路が選択される。左右の系を順次アクティベートして各アクセプタからの蛍光強度を測定したところ、活性化した側の出力蛍光強度が高くなった。これは制御光の波長に依存して FRET 経路を選択できたことを示している。左右に異なる演算系を埋め込むことにより、外部信号による演算切り換えが実現できる。

ナノプロセッサを外部光でプログラムすることの利点は、同一ハードウェア(DNA)の遠隔操作により特定の時間・場所で所望の処理を実行できることにある。しかし、光をレンズで単純に集光する場合には、回折限界で制限されたサイズの単一の光スポットしか得られず、複数の極微小領域での制御に適さない。そこで、光の位相分布変調により、回折限界よりも小さな光スポットを多数生成することを試みた。位相分布設計は、反復最適化アルゴリズムに独自の拘束条件を導入して行った。一例として、「IPG」の形状のスポットアレイ生成の実験結果を図 2 に示す。サブ回折限界のさまざまなスポットアレイの生成を確認した。この技術の適用により、空間並列かつ領域限定的にナノプロセッサを駆動することが可能となる。



図 2 スポットアレイ生成結果

ナノプロセッサの出力は、レポーター分子の励起エネルギーとして得られる。このエネルギーは、蛍光放射による外界への情報伝送以外に、分子環境内での分子の機能制御にも利用できる。例えば、エネルギーの熱変換により、近傍の DNA を変性(放出)できると考えられる。そこで、Black Hole Quencher(BHQ)を用いた局所的熱エネルギーの発生による DNA 放出について検討した。放出対象のDNAとBHQを修飾した相補鎖 DNA で二本鎖を作製する。この機構を鎖交換反応に適用したところ、光照射によりBHQを励起すると反応速度が向上した(図3)。この結果は、BHQからの熱エネルギーがDNA反応に寄与しており、ナノプロセッサの出力としてのDNA放出が可能であることを示している。

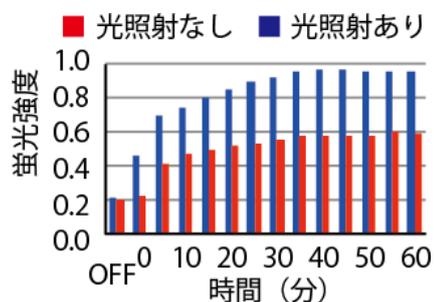


図 3 鎖交換反応における蛍光強度

## **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. As a solution 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.

DNA scaffold logic is a computing method 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 programming in the DNA scaffold logic, we developed a scheme for optical switching of FRET paths. The system consists of a common donor and two pairs of an acceptor and an activator. Because the energy transfers to activated acceptors, FRET path can be controlled by activating one of the acceptors selectively using external light with different wavelengths. Experimental results demonstrated that the output of the system was changed depending on the state of activation of the acceptors. This method can be applied to switch executed operations. To achieve such control of nanoprocessors in parallel and in local volumes, generation of suitable light patterns is important. We investigated a method for generating an array of light spots whose size was smaller than that determined by diffraction limit. An original algorithm was created to design phase modulation distributions for that purpose. Experimental results confirmed that a variety of sub-diffraction-limit spot arrays were generated in accordance with the design result.

We also constructed a method to activate a specific DNA by releasing it based on photothermal effect using black hole quenchers (BHQs) as a physical action in nanoprocessors. Double-stranded DNA composed of a strand modified with BHQs and its complimentary strand was prepared. This system was incorporated into a strand exchange reaction to confirm the validity. The reaction rate increased when the BHQs were excited to produce thermal energy. This result indicates that the thermal energy from the BHQs contributes to release and activate the specific DNA.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

##### 総説・解説・成書

1. Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Hirotsugu Yamamoto, Kenji Yamada, Jun Tanida Photonic DNA nano-processor: a photonics-based approach to molecular processing mediated by DNA Nanophotonic Information Physics, M. Naruse Ed., Chapter 4, pp. 91-113 (2014)
2. 小倉裕介 「オリゴ DNA の使い方」 光学 42, 519-520 (2013)

##### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Yusuke Ogura, Ryo Fujii, Takahiro Nishimura, Yuki Kazayama, Jun Tanida, "Optically programmable molecular information processing," The 3rd Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2013), Daejeon, Nov. 18, 2013. (Invited speaker)
2. Yusuke Ogura, Yuki Kazayama, and Jun Tanida, "Optofluidic DNA computation using holographic optical tweezers," International Workshop on Holography and related technologies (IWH2013), 15b-1, Hokkaido, Oct. 15, 2013. (Invited speaker)
3. Takahiro Nishimura, Yuki Kazayama, Yusuke Ogura, Jun Tanida, "Optical manipulation of liquid-based microreactors in optofluidic DNA computation," Optical trapping applications 2013, TW5D.4, Hawaii, Apr. 17, 2013. (Invited speaker)
4. 小倉裕介 大阪大学総長奨励賞（研究部門） 2013年8月2日

## 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、細胞と同程度の大きさを有する物理的空間を人工的に作り出し（フェムトリットル空間）、その中で生じる酵素反応のカイネティクスを解析することで *in vivo* における分子クラウディング効果の再現と検証を行った。これまでに再現性などの問題があった実験系を改善することで、フェムトリットル空間における各種パラメータを取得するとともに、単一の核を扱った研究へ応用するなど、新しい研究への展開を図った。

#### 2. 研究の背景と目的

細胞 1 個が有する体積は、動物細胞で約 2 pL ( $2 \times 10^{-12}$ L)、バクテリアでは約 2 fL ( $2 \times 10^{-15}$ L) であり、このような極微小空間内で様々な化学・生化学反応が時空間的に制御された形で行われている。このような「超精密機械工場」ともとれる細胞を人工的に再現した系を構築し、生命機能の本質にせまるべく、これまでに微細加工技術により数十  $\mu\text{m}$  角の細胞程度、もしくは数百 nm 角のミトコンドリアをはじめとしたオルガネラ程度の空間場を作製し、分子の拡散が極度に制限された空間内で生化学反応がどのような影響を受けるのかを酵素反応速度を通じて解析を行ってきた。また、このような微小空間を用いた系と同時に、分子クラウディング剤を用いて細胞内環境を再現した系でも同様の実験を行い、比較検討することで、反応体積の制限が生化学反応に関わる各種パラメータ取得を目指した。

本年度は、初年度に確立してきた  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) の実験系の改善とともに、分子クラウディング剤を用いたバルク系での検討、さらにはマイクロチャンバーデバイスの新しい利用法として、単離した核を解析する「場」として試みた。また、領域内共同研究として、名古屋大学の榎田先生とモレキュラービーコンを用いた核膜経由の物質輸送機構に関する検討を進めた。東京大学の石原先生・井上先生とは、MPC ポリマーで被覆された量子ドットの脂肪細胞由来幹細胞に対する毒性試験を行った。

#### 3. 成果

これまで  $\beta$ -gal の基質として FDG (di-*O*- $\beta$ -galactoside) を用いて酵素反応速度の測定

## 公募

を行ってきたが、これにはいくつかの問題点があった。ひとつは FDG が  $\beta$ -gal により加水分解されて Fluorescein が生成する過程は 2 段階反応であり、中間体である FMG (mono-*O*- $\beta$ -galactoside) もわずかではあるが蛍光を発すること、また 2 段階反応であるため、Fluorescein の生成に時間がかかることなどがあった。マイクロ・ナノチャンバーデバイスを用いた 1 分子酵素反応速度解析においては、測定時間の延長に従う蛍光の褪色が測定精度に大きな影響を与えることから、短時間で生じる 1 段階反応の結果を即時に計測できる系の方が望ましいため、基質を FDG から TG- $\beta$ Gal (2-Me-4-OMe TokyoGreen *O*- $\beta$ -galactoside) に変更することとした。その結果、酵素反応測定 5 分程度でも、十分な蛍光強度すなわち最大の酵素反応速度に達したため、これまでよりも精度の高い測定が可能となった。

バルク系の実験としては、これまでは分子クラウディング剤として PEG8000 や PEG20000 などを用いてきたが、PEG そのものが水の活性を低下させたり、酵素分子と相互作用を生じる可能性を否定できなかったため、Ficoll (平均分子量 400) を用いて酵素反応速度への影響について検討を行ったが、PEG を用いた際のような顕著な代謝回転数  $V_{\max}$  の低下やミカエリス定数  $K_M$  の増加といった傾向は見られなかった。このことから、PEG そのものが水の活性に影響を与えることで酵素活性に間接的に影響を与えていることを明らかとした。

このような単一酵素分子を扱った実験の他に、新しいマイクロチャンバーデバイスの利用法として、細胞から単離した「核」を単一核レベルで各チャンバーへ配置することにより、核膜を介した物質輸送機構解明の実験に利用できないか検討を進めた。細胞として、白血病細胞株である HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) を用い、核単離試薬 (Nuclei EZ Prep, Sigma-Aldrich 社) を用いて核を単離することで、GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)の mRNA が核膜を介してどのようなカイネティクスで移行しているのかをモレキュラービーコンを用いて検出した。設計したモレキュラービーコンに相補的な配列をもつオリゴマーとランダム配列を有するオリゴマーや細胞から抽出した total RNA を添加したところ、蛍光の回復が確認された。(名大・榎田先生との共同研究)

また、MPC ポリマーで被覆された量子ドットの脂肪細胞由来幹細胞に対する毒性試験 (生存試験、増殖試験) を行った結果、特に量子ドット濃度上昇に伴う毒性は観察されず、逆に好意的に働いている例も見られた。これは、表面を被覆している MPC ポリマーに修飾されたアルギニンの影響が、量子ドットからの漏出するカドミウムの影響を上回った可能性が考えられる。(東京大学・石原先生、井上先生との共同研究)

以上、本新学術領域における公募研究、さらには領域内共同研究を通して、フェムトリットル空間で生じる酵素反応に関する各種パラメータを取得するとともに、新しい生化学反応 (核膜輸送機構) への展開を行い、ナノ粒子のナノメディシンとしての臨床応用を視野に入れた毒性評価を行うことで、ナノメディシンの新しい展開に寄与した。

## **Development of femto-liter space devices mimicking intracellular environment and its application for biochemical reaction**

Noritada Kaji and Yoshinobu Baba

*Department of Applied Chemistry, Nagoya University, Japan*

Micro and nanometer-scale chamber array on a chip becomes a powerful new tool for bioanalysis since it could stochastically capture and measure biomolecules at a single molecule level. This experimental concept was introduced and elucidated by Prof. Noji at 2005 and applied for single molecule enzymology and measurements of ATP synthesis by F1-ATPase. This kind of small science inspires us proceed a next step of micro and nanofluidic research since at nearly the same time we had developed nanospace-based nanopillar array chips for high-speed DNA and protein separation. Our fundamental interests are how reaction-space size affects an enzyme activity and how small space we could extrapolate enzyme kinetics in small space from old enzyme kinetic data in bulk. So we have measured a single  $\beta$ -galactosidase activity in various sizes of micro and nanochambers, from 5  $\mu\text{m}$  to 500 nm cubic, and found that the activity gradually decreased according to its chamber size. Because the specific surface area increases according to the decrease of the chamber volume, non-specific adsorption might be a factor to suppress the activity. However, several experiments including surface coating and repetition of the enzyme capturing elucidated that non-specific adsorption is not a major factor affecting the activity. To discuss these unexpected results of the enzyme activity in the small cavity, molecular crowding effect which confine the diffusion of enzyme molecules and change water activity in bulk was also investigated.

Another application of micro and nanochamber array was for a single nucleus analysis. In the field of gene delivery systems, it is still unknown that virus vector showed much higher transportation efficiency of plasmid DNA from cytoplasm to nucleus in contrast to non-virus vectors. To improve gene transportation efficiency, which directly lead to increase transfection efficiency, gene transportation mechanism through nucleus membrane should be cleared. But unfortunately there are no experimental protocol to quantitatively evaluate the transportation efficiency through the nucleus membrane. So, in this study, nuclei were extracted from cells by gentle detergent treatments and captured into a PDMA or PMMA microchamber at a single nucleus level. After the confirmation of capturing a single nucleus into a microchamber, nucleotides and nuclear membrane stained nuclei, transportation of mRNA by molecular beacon were observed.

These micro and nanochamber-based experimental system would bring a new insight of a single molecule science.

## 業績リスト

### 総説・解説・成書

1. 松尾保孝, 加地範匡, 畠山浩人, 渡慶次学, 小暮健太朗, 馬場嘉信, 原島秀吉 「Nano packaging が拓く次世代核酸医療」 表面, 広信社. 51: 1-14 (2013)
2. 加地範匡, 「精密にサイズ制御したナノ空間内での分析化学」 化学と教育, 日本化学会. 61: 290-291. (2013)
3. 岡本行広, 加地範匡, 湯川博, 林衆治, 「量子ドットによる in vivo イメージング. 最先端メディカルエンジニアリング」 名古屋大学最先端メディカルエンジニアリング編集委員会, 一粒書房: 68-72. (2013)

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

#### 招待講演

1. N. Kaji, High speed and highly sensitive biomolecule measurements by nanopillar- and nanopore-based nanobiodevices. 17th KAST International Symposium on "The Multi-Omics and Nano Biotechnology for Human Disease Research". Seoul. (2013)
2. N. Kaji and Y. Baba, Nanobiodevices-based single biomolecule and single cell analysis for cancer diagnosis/therapy and stem cell therapy LAB-ON-A-CHIP ASIA 2013. Singapore. (2013)

#### 口頭発表

1. 加地範匡, 小山諒, 安井隆雄 and 馬場嘉信 マイクロチャンバーを用いた単一核解析法の解析. 日本分析化学会第 62 年会. 大阪. (2013)
2. N. Kaji and Y. Baba, Micro and nanochamber array chip for a single nucleus and protein analysis. 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (NMMS2013). Tokyo. (2013)
3. N. Kaji, T. Yasui and Y. Baba, Micro and nanochamber array chip for a single cell, nucleus, and protein analysis. International Conference on Small Science (ICSS 2013). Las Vegas, NV. (2013)

## 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 檜田 啓

### 1. 研究の概要

RNA が持つ生体機能が次々に明らかになりつつあることから、近年生細胞における RNA の動態解析が注目されている。我々はこれまでに RNA を高感度に検出可能なインステムモレキュラービーコン (ISMB) の開発に成功している。本研究では高感度かつ酵素耐性を持つ ISMB を開発し、これを用いた生細胞内における RNA の蛍光イメージングを目指している。今年度は Cy3 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) を用いた細胞内イメージングについて検討を行った。また、修飾核酸を利用することによって ISMB の酵素耐性を向上させることに成功した。

### 2. 研究の背景と目的

細胞内における様々な RNA の動態 (局在性・発現量) 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。そのため、細胞内において RNA を可視化するプローブが求められている。このようなプローブにモレキュラービーコン (MB) があるが、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。昨年度は Cy3 を複数導入した ISMB を開発し、高感度に RNA を検出可能であることを明らかにした。本年度はこれを用いた細胞内 RNA イメージング及び ISMB に対する酵素耐性の付与について検討を行った。

### 3. 成果

#### 2'-OMe RNA を用いた酵素耐性型 ISMB の開発

従来用いてきた ISMB は DNA で構成されているため、細胞内に導入した際に核酸分解酵素によって分解される可能性があった。ISMB が分解された場合、偽陽性シグナルとなり RNA を正確に検出することが困難となる。そこで、本研究では 2'-OMe RNA を末端に導入した ISMB を合成し、その検出能及び

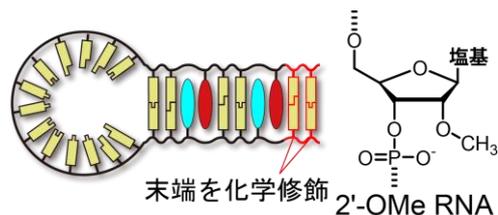


図1 酵素耐性型 ISMB の模式図と 2'-OMe RNA の化学構造

## 公募

酵素耐性について検討を行った。具体的には 2'-OMe RNA に着目し、これを末端に導入した ISMB を合成した(図1)。2'-OMe RNA は RNA の 2'位が保護されているために、核酸分解酵素による分解を受けにくいことが知られている。この 2'-OMe RNA を末端に 2 mer ずつ導入した ISMB についてまず RNA 検出能を検討したところ、従来型 ISMB と同程度の S/B 比(シグナル/バックグラウンド比)を示すことが分かった(図2)。細胞溶解液中での蛍光発光を観察することによって酵素耐性を評価した。その結果、DNA のみで構成される ISMB に対して 2'-OMe RNA 修飾 ISMB は酵素による分解が 1/2 程度に抑制されることが明らかとなった。

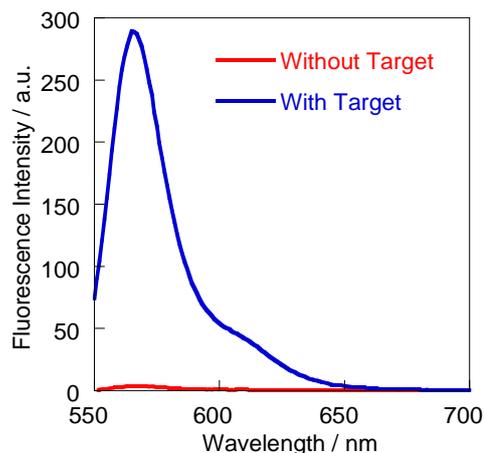


図2 2'-OMe RNA を導入した ISMB によるターゲット RNA の検出

### ISMB を用いた内在性 mRNA イメージング

これまでに Cy3 複数導入 ISMB を用いて固定化された細胞において強制発現した GFP の mRNA のイメージングに成功している。しかしながら、強制発現した系では細胞内における局在性が変化する可能性があった。そこで、ISMB を用いた細胞内在性 mRNA のイメージングについて検討を行った。ターゲットとしては Xbox 結合タンパク質(XBP1)の mRNA とした。この mRNA は小胞体に局在することが知られている。実際に固定化された HeLa 細胞に対し ISMB を導入し共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した(図3)。その結果、核周囲から ISMB の Cy3 の発光が観察された(図3中央)。また、小胞体に局在することが知られているジスルフィドイソメラーゼ(PDI)の免疫染色を行った(図3左)。ISMB と免疫染色による発光が一致したことから、XBP1 mRNA は小胞体に存在していることが明らかとなった(図3右)。以上のことから、ISMB を用いて固定化した細胞における内在性 mRNA を検出できることがわかった。

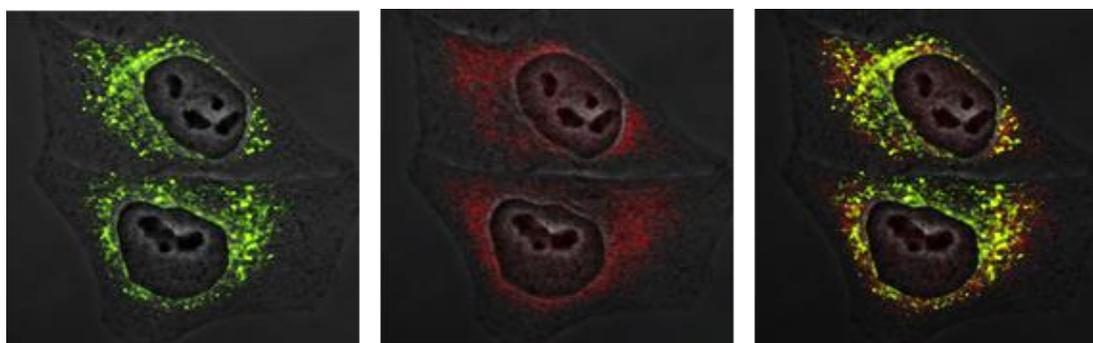


図3 ISMB による XBP1 mRNA の検出結果。(左) PDI免疫染色 (中央) Cy3 発光 (右) 重ね合わせ画像。

## **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* RNA imaging. Last year, we synthesized ISMB tethering multiple Cy3 fluorophores and quenchers (Nitro Methyl Red), which showed high detection ability both with DNA and RNA. We also applied this ISMB to visualize GFP mRNA, which was transcribed from plasmids, in fixed HeLa cells. This year, we synthesized ISMB modified with 2'-OMe nucleotides to suppress nuclease digestion in cell. We also applied ISMB tethering Cy3 to visualize endogenous mRNA in fixed cells.

Digestion of MB is one of most severe problems in cell imaging because emission from free fluorophores causes false-positive signals. ISMB, which is composed of DNA, could also be digested *in vivo*. In order to suppress nuclease digestion, two 2'-OMe nucleotides were incorporated at each terminus of ISMB. It is reported that 2'-OMe group suppressed enzymatic digestion by nuclease. ISMB with 2'-OMe group showed almost the same S/B (signal/background) ratio compared with ISMB composed only of DNA. We also evaluated nuclease resistance by measuring emission intensity of ISMB in cell lysate. Fluorescence intensity of ISMB-2'-OMe was half that of ISMB-DNA. Accordingly, incorporation of 2'-OMe group strongly suppressed nuclease digestion.

In this study, we aimed to visualize endogenous mRNA in fixed cells. We synthesized ISMB targeting mRNA of X-Box binding protein (XBP1). When ISMB was added to fixed HeLa cells, emission from Cy3 was observed at specific foci. We also performed immunofluorescent staining with antibody against protein disulfide isomerase (PDI), which is localized in the endoplasmic reticulum. Merged image clearly demonstrated that XBP1 mRNA is also localized in the endoplasmic reticulum, which is consistent with previous reports. Accordingly, endogenous mRNA in fixed cells was successfully visualized with ISMB.

業績リスト

学術論文

1. Hiromu Kashida, Naofumi Higashiyama, Tomohiro Kato, Hiroyuki Asanuma, Evaluation of intrinsic spectroscopic properties of chromophore assemblies by shielding with cyclohexyl base pairs within a DNA duplex. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 6191-6197 (2013)

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. Hiromu Kashida, Outstanding Oral Presentation Award, The 40<sup>th</sup> International symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013年11月14日
2. 榎田啓 「非天然分子による疑似塩基対を利用した機能性核酸の創製」 日本化学会第63回進歩賞 2014年3月（予定）
3. 榎田啓 「人工塩基対の開発による機能性核酸の創製」 九州地区高分子若手研究会・夏の講演会（招待講演） 2013年7月5日、北九州
4. 榎田啓 「非天然分子による疑似塩基対を利用した機能性核酸の創製」 日本化学会第94春季年会（受賞講演） 2014年3月29日（予定）、名古屋大学

## 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

生命活動の維持において、酵素反応やシグナル伝達、転写制御などのタンパク質間相互作用が重要な働きを担っている。これらの相互作用は、希薄系と濃厚系で反応性が変動する場合があることが知られている。例えば、多種類の生体分子が高濃度に溶解した分子クラウディング状態にある細胞内の環境下では、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、細胞内の固液界面に焦点を当て、分子クラウディングが反応挙動に及ぼす影響を調べてきた。今年度は分子クラウディング剤の種類・固定化抗原の配向性および可動性が、拡散速度および複合体形成速度などの動力学に大きな影響を与えることを見出した。

#### 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、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

表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析装置および解析プログラムは自作品を用いた。SPR センサーチップの金蒸着表面に自己組織化単分子膜 (SAM) 処理を行った。HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-COOH およびエチレングリコール鎖 (EG) を分子内に有する HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>3</sub>OH と HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-EG<sub>6</sub>-OCH<sub>2</sub>COOH を混合した溶液を用いて 2 種類の SAM (SAM-COOH, SAM-EGCOOH) を作製した。この分子末端のカルボキシル基を水溶性カルボジイミドおよび *N*-ヒドロキシスクシンイミドで活性化した。固定化する抗原として EGF (rhEGF-AF, Wako) と EGF-His (遺伝子導入大腸菌を培養後、抽出・精製)、抗体として抗 EGF 抗体 (MAB636, R&D System) を用いた。EGF 固定基板は、活性化した基板を 10 μg/mL の EGF 溶液に浸漬して作製した。EGF は分子中に複数存在するアミノ基を介して活性基と結合することで非秩序に固定化される。EGF-His 固定基板は、活性化した基板を 10 mM *N*-(5-amino-1-carboxypentyl) iminodiacetic acid 溶液に浸漬して、表面に NTA 基を導入し、40 mM NiSO<sub>4</sub> 溶液を用いて Ni<sup>2+</sup> を NTA 基にキレートした後、10 μg/mL の EGF-His 溶液に浸漬して作製した。

ポリエチレングリコール (PEG 600, Wako, Mw = 8300)、dextran 70 (dextran, 東京化成, Mw = 70,000)、Ficoll PM70 (Ficoll, GE Healthcare, Mw = 70,000) を Dulbecco's Phosphate Buffered Saline に 0~10 wt% の濃度で溶解し、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上に流し、SPR を用いて固定化抗原と抗体の結合・脱離過程を追跡した。

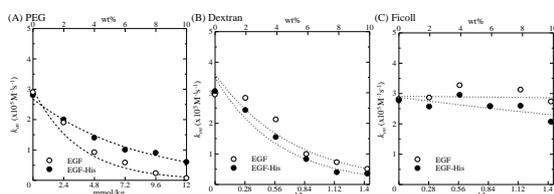


図 1. SAM-COOH 上での抗 EGF 抗体結合速度定数。クラウディング剤 (A) PEG、(B) dextran、(C) Ficoll。

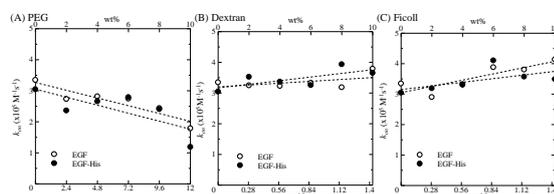


図 2. SAM-EGCOOH 上での抗 EGF 抗体結合速度定数。クラウディング剤 (A) PEG、(B) dextran、(C) Ficoll。

EG 鎖の可動性により、SAM-EGCOOH は固定化抗原が向きをある程度自由に変えることができ、これよりクラウディング環境下での EGF と抗 EGF 抗体との結合反応について、固定化抗原の向きが固定化されている SAM-COOH と異なると予想された。そこで、SPR 分析法を用いて、この結合反応について動力学解析を行った。これまでに報告した SAM-COOH の結果 (図 1) では、結合速度定数 ( $k_{on}$ ) はクラウディング剤の濃度が高くなるにつれて低下し、その程度はクラウディング剤の種類によって異なっていた。これは、クラウディング剤が抗体の移動を妨害するからであると考えられた。今回報告する SAM-EGCOOH の結果 (図 2) では、 $k_{on}$  の低下は PEG 溶媒において観察されたが、その減少量は SAM-COOH と比べて緩やかとなった。また、また、dextran 溶媒と Ficoll 溶媒においては、 $k_{on}$  の変化は小さく、若干の増加傾向が示唆された。このことは、表面に固定化された抗原の可動性が分子クラウディング環境下において  $k_{on}$  の低下を抑制することを示し、また、 $k_{on}$  を少しながら増加させる可能性を示唆した。

以上のように、分子クラウディング剤の種類および固定化抗原の可動性が、拡散速度および複合体形成速度などの動力学に大きな影響を与えることが示唆された。

## 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 macromolecular crowding is that macromolecules are dissolved at high concentrations. In the environment of molecular crowding, excluded volume effects of macromolecules alter activities of particular proteins, and then these reaction rates are subject to influence. There are a number of reactions at the microscopic solid-liquid interfaces in the internal of cells. The aim of this study is to analyze the molecular crowding effect on protein interactions at solid-liquid interfaces. We used here a surface plasmon resonance (SPR) analytical method for antigen-antibody interactions at an interface under macromolecular crowding conditions.

As a model surface, we prepared SAM-COOH and SAM-EGCOOH for surface-immobilization of antigen. SAM-COOH, as a monolayer of HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-COOH, forms a rigid layer. And SAM-EGCOOH, as a mixed-monolayer of HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-OCH<sub>2</sub>COOH and HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-(OCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OH, forms flexible tethers on a rigid layer. EGF and EGF-His were used as an immobilized antigen. After introducing and activating of carboxyl groups on the SPR chips, EGF or AB-NTA was immobilized. The NTA introduced chips were treated with Ni<sup>2+</sup>, and EGF-His was immobilized by chelating His-tag to Ni<sup>2+</sup>-NTA. On SAM-COOH, immobilized EGF was non-oriented, but EGF-His was oriented. On SAM-EGCOOH, EGF and EGF-His were immobilized with a flexible linker EG. Poly(ethylene glycol) (PEG; Mw = 8300), dextran (Mw = 70,000), and Ficoll (Mw = 70,000) were used as a crowding agent at a concentration of 0, 2, 4, 6, 8, and 10 wt% in phosphate buffered saline.

The association and dissociation processes of anti-EGF antibody on the EGF immobilized surfaces under crowding environment were measured by SPR. From these results, we obtained association rate constants ( $k_{on}$ ). On SAM-COOH,  $k_{on}$  decreased with an increase in the concentration of the crowding agent. On SAM-EGCOOH,  $k_{on}$  decreased with an increase in the concentration of PEG, however this trend was not obvious than on SAM-COOH. And, in Dextran and Ficoll medium,  $k_{on}$  did not decrease clearly but rather slightly increased.

It was suggested that the crowding agents and the mobility of the immobilized antigen affect the kinetics of such antigen-antibody interactions.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

#### 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）

1. 平田伊佐雄、加藤功一 “Effect of molecular crowding on the dynamics of protein-protein interactions at solid/liquid interfaces” 第46回広島大学歯学会総会 (2013)
2. 平田伊佐雄、加藤功一 「固液界面における抗原-抗体反応に及ぼす分子クラウディングの影響」 第42回医用高分子シンポジウム (2013)
3. Isao Hirata, Koichi Kato. “Effect of molecular crowding on the dynamics of antigen-antibody interactions at solid/liquid interfaces” International Symposium on Nanomedicine Molecular Science in Nagoya (2014)

## 高感度イオンセンサーによるナノ細胞毒性とナノメディシンの評価

公募班 東京医科歯科大学 合田達郎

### 1. 研究の概要

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試みた。また、バイオミメティクス技術を用いて、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し、半導体型センサーによって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・特異的に検出した。

### 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。そこでバイオミメティクス技術とバイオセンサーを組み合わせて、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. 本年度の成果

炎症マーカーであるヒト C-反応性タンパク質 (CRP) は、炎症部位特異的に作用して補体活性化と自然免疫応答を増強するが、血中を循環する CRP がどのように炎症組織細胞を区別して認識するかという作用機構は不明である。生体分子の病巣特異的な活性化機構はイオン・温度・pH 変化といった物理化学的微小環境変化や細胞膜自身の形質変化が引き金になることに着目し、 $\text{Ca}^{2+}$  を介した CRP とその受容体である細胞膜リン脂質のホスホリルコリン (PC) 基との相互作用の解明をおこなった。ここで、バイオミメティクス工学と高感度バイオセンシング技術を融合し、細胞膜界面における微小環境を人工的に再構築したセンサープラットフォームを用いて、CRP 分子の活性化機構に関する物理化学的パラメータを明らかにした (図 1)。一つ目の  $\text{Ca}^{2+}$  が CRP に充填されて初めて CRP は PC 基と結合し、二つ目の  $\text{Ca}^{2+}$  が CRP に取り込まれると PC 基との親和性がさらに数倍高まることが明らかとなった (図 2)。これは、血中の遊離カルシウムイオン濃度が 1.2 mM であることを考慮すると、血中を循環する CRP には  $\text{Ca}^{2+}$  が一つしか結合していないことになる。したがって、局所的  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高い

## 公募

組織では、血中の CRP はその部位に優先的に結合するということになる。つまり、炎症や感染症が発生した組織において  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇することによって、血中を循環する CRP を呼び込み、炎症部位特異的に自然免疫機構活性化させるという仮説が立てられる。また、溶液中の pH の低下というイオン微小環境変化も CRP-PC 間の相互作用を変化させることが明らかとなった。溶液の pH を 7.4 から 6.5 に変化させると、生理  $\text{Ca}^{2+}$  濃度において CRP と PC 表面との親和性はおよそ 10 倍高くなった。一方で、溶液の pH を 6.5 から 5.5 に変化させると、逆に親和性が低くなった。つまり、CRP はわずかに酸性化しているイオン微小環境において選択的に結合することが考えられる。これは、炎症組織や感染症組織では、一般的に代謝活性が亢進して代謝産物が増加することによって組織 pH 環境が弱酸性化することに一致しており、炎症組織が CRP を呼び込む機構として提案できる。さらに、微小環境の pH は CRP の PC 表面に対する親和性を変化させるのみならず、PC 表面に結合した CRP のその後の役割をも決めることが明らかとなった。PC 表面に結合した CRP に補体因子である C1q を作用させたところ pH5.5-7.4 の範囲において CRP は C1q をリクルートした。一方で、PC 表面に結合した CRP に組織構成タンパク質であるフィブロネクチンを作用させると pH5.5 においてのみ結合し、pH6.5-7.4 の範囲においては認識しなかった。つまり、CRP の細胞膜表面での活性化は幅広い pH 環境において補体活性化を誘起するが、細胞外マトリクス因子による組織再建は酸性 pH 環境においてのみ起こることが判明した。

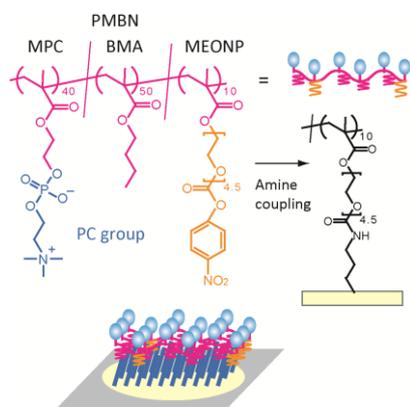


図 1. 細胞膜を模倣したバイオミメティック界面の構築。

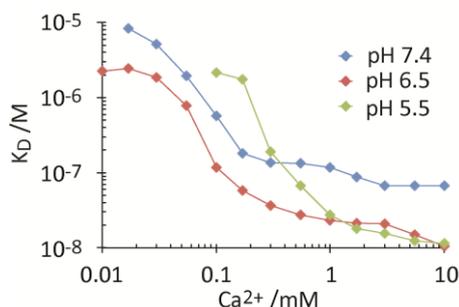


図 2. イオン微小環境での CRP と PC 表面の解離定数

## Evaluating nanobiotechnology-related medicines using sensitive ion-sensitive field-effect transistors

Tatsuro Goda

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

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.

Secondly, we have created an *in vitro* condition that mimics the progression of inflammation/infection on a sensing platform to investigate how biomolecular dynamics changes by the local ionic microenvironments. A novel concept underlies the use of engineered phosphorylcholine (PC) polymer as an alternative receptor for the human acute phase protein *C-reactive protein* (CRP) on eukaryotic cell-membrane. In addition, we replicated the local ionic microenvironments of a pathogenic site by using a conducting polymer-based organic bioelectronic ion pump (OEIP) that can deliver  $[Ca^{2+}]$  and  $[H^+]$  with a well-defined, spatiotemporal control. Since  $Ca^{2+}$ -dependent binding of CRP to the engineered PC surface models the interactions occurring on the cell membrane, the biomimetic interface allows the binding constants to be determined. These values denote why the serum CRP level needs to be elevated for 100- to 1000-fold in acute-phase. Moreover, our data reveal the local ionic microenvironment to be an essential parameter in transforming the CRP binding kinetics, indicating a hidden mechanism on site-selective activation of circulating CRP in damaged tissue. Under conditions promoting active binding, we further show the recruitment of both *complement component 1q* (C1q) and the tissue-constructing protein *fibronectin* (FN), demonstrating the initiation of innate immune response as well as the wound healing process triggered by the CRP activation.

業績リスト

学術論文

1. Tatsuro Goda\*, Miyuki Tabata, Mai Sanjoh, Mai Uchimura, Yasuhiko Iwasaki and Yuji Miyahara, "Thiolated 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine for an Antifouling Biosensor Platform", *Chem. Commun.*, **2013**, 49(77), 8683-8685. DOI: 10.1039/C3CC44357D
2. Tatsuro Goda, Ankit Balram Singi, Yasuhiro Maeda, Akira Matsumoto, Masaki Torimura, Hiroshi Aoki and Yuji Miyahara, "Label-free Potentiometry for Detecting DNA Hybridization using Peptide Nucleic Acid and DNA Probes", *Sensors*, **2013**, 13(2), 2267-2278. DOI: 10.3390/s130202267.

総説・解説・成書

1. 田畑美幸, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二, "機能性ナノ界面を有するバイオトランジスタ, Biotransistor with Functional Nanointerface Containing Biomolecules", 電気学会論文誌 E, IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, **2013**, 133(11), B314-B319, DOI: 10.1541/ieejsmas.133.B314

その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

招待講演

- ・ Tatsuro Goda, Kozue Masuno, Nobuyoshi Kosaka, Takahiro Ochiya, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Label-free electrical detection of exosomal microRNAs using microelectrode array. NanoBio FIRST International Symposium between Sweden and Japan, Tokyo 2013.

活動

- ・ 2012年1月～2014年3月：カロリンスカ研究所，客員研究員

ホームページ

- ・ <http://www.tmd.ac.jp/bsr/index.html>

## 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 小暮健太郎

### 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。昨年度、微弱電流によって外来物質がエンドサイトーシスで取り込まれること、さらに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ている。今年度は、これらの知見に基づき、微弱電流による細胞内変化について検討を行い、アクチン脱重合や細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入、細胞内輸送の亢進が誘導されることを見出した。

### 2. 研究の背景と目的

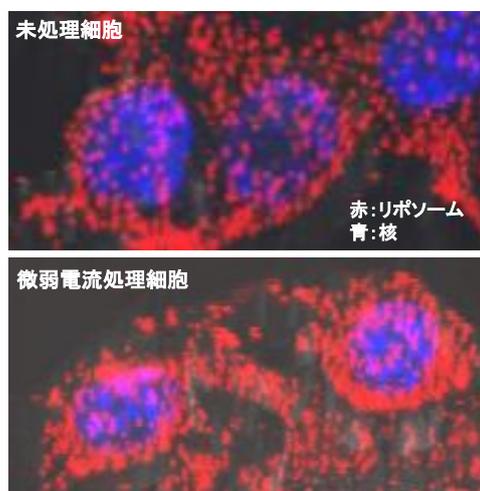
我々はこれまでに、イオントフォレシス（微弱電流による経皮薬物送達促進技術）により siRNA や CpG オリゴ核酸など親水性高分子を皮膚内（in vivo）に効率よく浸透させるとともに、高い RNAi 効果や抗腫瘍免疫反応を誘起することに成功している（Kigasawa et al., Int. J. Pharm (2010), Kigasawa et al., J. Control. Release (2011)）。強力な電圧によって一過的に細孔を形成させるエレクトロポレーションと異なり、イオントフォレシスは非常に微弱な電流を負荷することで、非侵襲的に皮膚組織内に低分子薬物を送達する方法として知られている。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（ $0.3\text{mA}/\text{cm}^2$  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。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。昨年度の検討において、微弱電流によって種々のシグナル伝達系が活性化されることで、エンドサイトーシス関連タンパク質が活性化され、エンドサイトーシスが誘起されることでナ

## 公募

ノ粒子などが取り込まれることが明らかになった。今年度は、さらなる情報の取得を目的として、微弱電流による細胞内変化について検討を行った。

### 3. 成果

昨年度の検討結果から、微弱電流処理によってエンドサイトーシスが誘起され、細胞外から核酸の取り込みが促進されることが明らかになったことから、他の物質に対しても同じ効果が得られるのかについて検討を行った。すなわち、領域内共同研究者である大阪府立大学原田敦史准教授が開発した PEG 化酸化チタン内包ナノ組織体の細胞取り込みに対する微弱電流処理の影響を検討したところ、PEG 修飾のため細胞内取り込みが低い粒子が、微弱電流処理によって著しく多く細胞内に取り込まれることが見出された。また、京都工業繊維大学の田中直毅准教授が開発した線維化ペプチドキャリアーにおいても、微弱電流処理によって細胞内取り込みが著しく促進されることが明らかとなった。これらのことから、微弱電流刺激は、核酸に限らず多様な外来物質の細胞内取り込みを促進することが確認された。一方、微弱電流処理した細胞において、種々のシグナル伝達系が活性化されていたことから、何らかのメディエーターが介在していると予測し、タンパク質リン酸化への関与が予想される細胞内  $Ca^{2+}$  の変化について検討を行ったところ、微弱電流処理＋ナノキャリアー(カチオン性リポソーム)存在下において細胞内  $Ca^{2+}$  量の上昇が認められた。このことから、微弱電流処理によって細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入することで、Protein Kinase C 等の細胞内のリン酸化酵素が活性化され、種々のタンパク質がリン酸化され、エンドサイトーシスが誘起されることが推察された。そこで、細胞をナノキャリアー共存下で微弱電流処理した時における線維化アクチンの脱重合を検討したところ、微弱電流処理によって細胞内線維化アクチンが減少することを見出した。細胞骨格タンパク質である線維化アクチンの重合・脱重合は、エンドサイトーシス誘起に関与することから、微弱電流刺激が細胞骨格を変化させることでエンドサイトーシスを誘起することが示唆された。このことを確かめるため、微弱電流処理下での蛍光ラベル化したナノ粒子(カチオン性リポソーム)の短時間における細胞取り込みを評価した。電流処理のないコントロール条件下においても、カチオン性のため細胞親和性の高い蛍光ナノ粒子は多く取り込まれていたが、微弱電流処理によって、より多くのリポソームが取り込まれることが確認された。さらに、微弱電流処理下では、取り込まれたリポソームの多くが、短時間に細胞内の核周辺にまで到達することが明らかになった。このことから、微弱電流処理によって、エンドサイトーシスが誘起され多くの外来物質が細胞内に取り込まれるとともに、エンドソームとして取り込まれた物質の細胞内輸送が著しく亢進することが示唆された。



## **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<sup>2</sup> for 1 hr) on the mouse dorsal skin, indicating that siRNA was delivered into the cytoplasm via electric stimulus. Previously, we found that imperceptible electric stimulus (IES) 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. Recently, we found that cellular entry mechanism was endocytosis, and phosphorylation of versatile proteins including cell signaling-related proteins was stimulated by IES by exhaustive analysis of protein phosphorylation in the cells treated with imperceptible electricity. In the present study, we confirmed that IES enhanced cellular uptake of various nanomaterials, such as PEGylated nanoparticles, developed by collaborators. Moreover, we found that IES induced Ca<sup>2+</sup> influx and depolymerization of filamentous actin in the cells. In addition, intracellular trafficking of liposomes internalized by IES-induced endocytosis was enhanced by IES treatment. In conclusion, it was suggested that endocytosis and intracellular trafficking were enhanced by IES via depolymerization of filamentous actin and Ca<sup>2+</sup>-influx.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Susumu Hama, Yuki Kimura, Aya Mikami, Kanako Shiota, Mao Toyoda, Atsushi Tamura, Yukio Nagasaki, Kiyoshi Kanamura, Kazuaki Kajimoto, Kentaro Kogure. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J. Biol. Chem.* 289, 2450-2456 (2014).

#### 総説・解説・成書

1. 小暮健太郎、気賀澤郁、濱 進、梶本和昭. 第 4 章第 1 節[4]〈3〉バイオ・生物製剤の非侵襲的な経皮 DDS 技術. 「DDS 製剤の開発・評価と実用化手法」(株)技術情報協会 pp210-214(2013).

#### その他(報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

1. Kogure K, Hama S, Kigasawa K, Kajimoto K. Noninvasive and effective transdermal delivery of functional macromolecules by iontophoresis. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) 2013 (Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, Korea, 2013 年 11 月 21 日-22 日)
2. 小暮健太郎. イオントフォレシスによる高分子物質の経皮送達メカニズム. 第 5 回経皮投与製剤 FG シンポジウム (東京) ,2013 年 11 月 28 日.

## 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

細胞内においては、領域に依存した局所的な分子ネットワークが形成されることで細胞形態などの機能が制御されると考えられる。本研究では神経細胞の軸索形態の制御に着目し、局所的な分子の活性の変化が細胞構造の安定性を制御する過程をモデル化する。本年度は分岐軸索のタイムラプス解析により、局所的な軸索の伸長・退縮、キネシン分子の軸索内分布、微小管の動態を定量的に解析することで、軸索パターンニングにおいて各枝の伸長・退縮の決定に関わる新たな細胞内分子反応過程を導出した。

### 2. 研究の背景と目的

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細胞から伸展した後に分岐することにより、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、その詳細な機序については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。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。さらに、キネシンを介した輸送方向の制御には微小管の翻訳後修飾を含む多様性が関与することが示唆されている。

前年度までの研究により、標識したキネシンのモーター領域(K5H-GFP)の軸索内分布を解析することにより、軸索内において分岐に依存した積極的なK5H-GFPの分配制御が存在し、K5H-GFPが多く存在する枝ほど長い傾向があることを示した。この結果はキネシンを介した軸索内輸送の制御に依存して分岐軸索パターンが調節される可能性を示している。本年度の研究において神経細胞の長時間蛍光タイムラプス観察によりK5H-GFPの分布と軸索形態の時空間的变化を解析し、相関するパラメーターを解明することを試みた。さらに、分岐軸索における局所的な微小管の違いを明らかにし、軸索分岐パターンを制御する新たな細胞内システムを描出することを目的とした。

### 3. 成果

#### ・ キネシン依存的輸送と局所的軸索の安定性の関連

長時間多点タイムラプスイメージングにより、K5H-GFP の分布と軸索分子の伸長速度ならびに退縮速度を複数の観察点で定量的に解析した。解析の結果、各軸索分枝における K5H-GFP の蛍光強度と軸索分枝の伸長量には明確な関連が得られなかった一方、K5H-GFP の蛍光強度と退縮量に明瞭かつ有意な負の相関が見られた。K5H-GFP の相対強度 0.05 未満の分枝では退縮量が 0 - 6  $\mu\text{m/hr}$  間でばらつきが見られるのに対し、それ以上の殆どの分枝で退縮量は 1.2  $\mu\text{m/hr}$  以下であった。即ち、軸索の局所的な安定性の制御にキネシンを介した物質輸送が関与する可能性が示された。

#### ・ 分岐軸索における局所的な微小管安定性の検出

キネシンは直接的、または微小管制御因子の輸送を介して間接的に微小管の動態を制御しうると考えられる。キネシンの分布と軸索分枝の長さの相関より、分岐した枝毎の微小管の安定性を GFP-tubulin を用いた光褪色後傾向回復法 (FRAP) により解析した。隣接した軸索長短枝間で FRAP 解析を行ったところ短枝では解離反応速度  $K_{\text{off}}=0.0366/\text{s}$  に対し長枝では  $K_{\text{off}}=0.0126/\text{s}$  と約 3 倍の反応速度の違いが検出された。このことから、同一軸索内でも各枝に置いて微小管の動態は大きく異なり、長枝では微小管も安定であることが示された。

#### ・ 分岐軸索における微小管翻訳後修飾の解析

チューブリンのチロシン化/脱チロシン化は微小管の安定性に依存し、安定な微小管ほど脱チロシン化の割合が高いとされている。単離小脳顆粒神経細胞を用いて分岐軸索での局所的な微小管の修飾を定量的に解析するため低密度培養法を確立した (Kubota K *et al.*, *Brain Res.* 2013)。抗チロシン化チューブリン抗体および抗脱チロシン化チューブリン抗体により単離小脳顆粒神経細胞を解析した結果、短い分枝では長い分枝と比較して有意にチロシン化チューブリンの割合が高いことが明らかになった。この結果は前述の光褪色後傾向回復法による結果と一致しており、また、分岐点の近傍 10 $\mu\text{m}$  付近でもその差が検出された。軸索分枝間のキネシン輸送の選択性がチューブリンのチロシン化に依存するという結果も得られおり、局所的な微小管の安定性の違いが各軸索分枝におけるキネシンの量を調節すると考えられる。本研究のこれまでの結果から、軸索分岐パターンを制御する細胞内システムとして Fig. 1 に示すような微小管の安定性とキネシンの輸送制御を介した機構の存在が推察される。

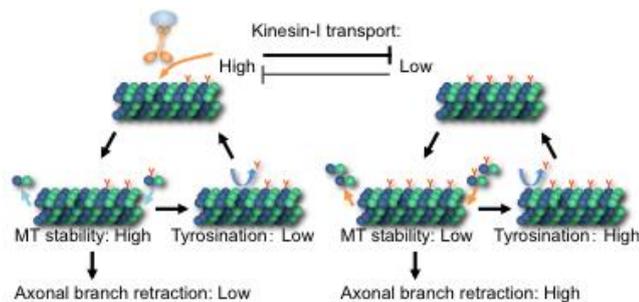


Fig. 1 本研究課題の結果から推測される、キネシンの輸送効率を介した軸索分岐パターン制御の分岐モデルの概要

## **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. However, it is not fully understood about the system coordinating complicated cellular event, such as neuronal morphogenesis. It will be important to understand the systems that regulate 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 has been reported that the motor domain of kinesin (K5H) is accumulated in axon in hippocampal neurons. In addition, 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. In this project, we analyzed the signal intensity of K5H-GFP in each branched axonal terminal and found that 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. In the present study, we performed long-term multipoint time-lapse imaging of branched axons and analyzed the growth/retraction of each axonal branch. By quantitative analysis of obtained time-lapse images, we found that axonal branch which contain high ratio of K5H-GFP show lower retraction value (less than 1.2 $\mu$ m/hr, whereas it varied between 0 – 6 $\mu$ m/hr in the branches that have lower ratio of K5H-GFP). On the other hand, there is no clear correlation between growth value and K5H-GFP signal intensity. Next, we asked if the microtubule stability is different between longer axonal branch and shorter axonal branch. Neurons are introduced with tubulin-GFP vector and subjected to the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. We found that in shorter axonal branches, microtubule turnover is faster than that in the longer axonal branches ( $K_{off}=0.0366/s$  vs  $K_{off}=0.0126/s$ ). Consistently, immunocytochemical analysis revealed that tyrosinated tubulin which is known to mark the unstable microtubule is indeed significantly abundant in shorter axonal branches.

Collectively, these results demonstrate the novel intracellular system that control axonal branch pattern by locally regulating the kinesin-dependent axonal transport.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Kenta Kubota, Takeshi Seno and Yoshiyuki Konishi. A low-density culture method of cerebellar granule neurons with paracrine support applicable for the study of neuronal morphogenesis. *Brain Res.* **1539**:15-23 (2013)

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

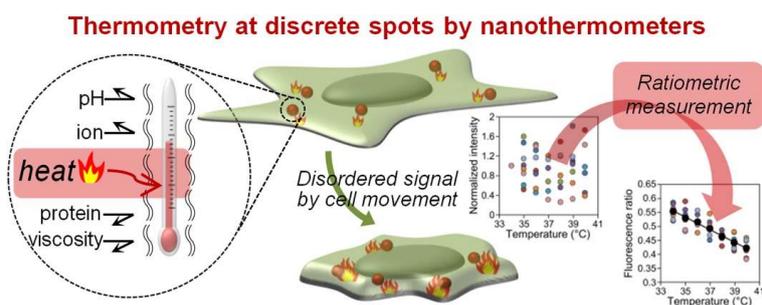
1. Yoshiyuki Konishi, Takeshi Seno, Kenta Kubota, Narumi Sakae and Hiroki Takada. Local regulation of molecular reactions in maintaining axonal morphology. 7<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine, Kitakyushu, 11/7-9 (2013)
2. 小西慶幸 「分子から脳機能まで：科学とその応用」石川県立工業高校, 2/21 (2014)

## 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 鈴木 団

### 1. 研究の概要

「レシオ型ナノ温度計」の開発を行った（レシオ；2つの値の比率）。蛍光顕微鏡を用いる他の観察・計測手法と高い親和性があり、一般的な生・医学研究の手法と併用可能な方法である。温度に応答する「Eu-TTA」という蛍光色素（A）と、応答しない「Rhodamine 101」という蛍光色素（B）を混ぜて、一つの粒子の中に閉じこめた。そのAとBの値の比率A/B（レシオ）を測ることで、レシオと温度を一对一に対応させた。またレシオは顕微鏡の焦点ずれに影響されなかった。外部環境に依存せず、温度だけ測ることも本開発の特徴の一つである。



### 2. 研究の背景と目的

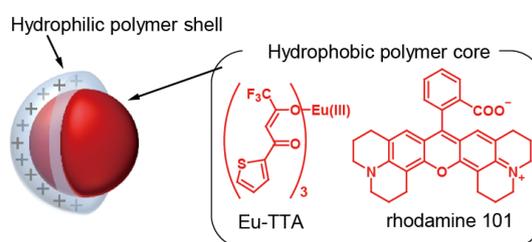
細胞生物学的、発生生物学的な研究においては、生きた細胞や個体を用いた実験系でしか答えることのできない疑問が、非常に多くある。そのような問いにアプローチするためには、生きた細胞の中で、細胞分裂、細胞内小器官の輸送、タンパク質の働きや相互作用のようなダイナミックな過程を、連続して計測する必要がある。一方、細胞の中には細胞内小器官、水溶性タンパク質、細胞骨格などがひしめき合って存在し、希薄な水溶液系とはまるで異なる環境を細胞内に作り出している。さらに、運動や情報伝達といった細胞機能にともなって、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、イオン強度、pH、タンパク質濃度などといった細胞内の環境が、細胞内の各箇所でも時間的にも空間的にも変動している。

本研究では、細胞内で温度の変化だけに感受性を持ち、十分な空間分解能と時間分解能のあるような、細胞内の温度を測定するプローブを新規に開発すること、またプローブに適した計測系を構築することを目的とした。

### 3. 成果

細胞内で温度を計測するプローブが完成し、レシオ型温度計プローブとして論文発表を行った (Takei *et al.* 2014)。

温度感受性のある蛍光色素 Eu-TTA と温度感受性の無い蛍光色素 Rhodamine 101 を一つのポリマーナノ粒子へ同時に封入し、個々の粒子でレシオ計測できるナノ粒子型蛍光温度計プローブとした。二種の色素の蛍光強度比 (レシオ) を計算することで、レシオ値と温度とを一対一に対応づけられる。色素が外界から隔離されることで、pH (4-10)、イオン強度 (KCl 0-500 mM)、タンパク質濃度 (BSA 0-45 wt%)、粘性 (1-220 cP) といった広い範囲で影響を受けず、しかし温度だけに応答することが確認された。また、粒子の焦点ずれによる測定誤差が、レシオ測定でキャンセルできることも光学顕微鏡下で示された。位置決め精度は数 nm、本観察条件下での温度分解能は 0.5°C だった。本ナノ温度計をヒト由来培養ガン細胞である HeLa 細胞へ応用し、動く細胞内でも温度計測できることが示された。平常時には、細胞内外の温度は同等であった。一方、カルシウムイオンフォアを用いて HeLa 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を強制的にあげると、それぞれの細胞内で時間的、空間的に不均一な温度ダイナミクスが観測され、また細胞全体では  $\text{Ca}^{2+}$  上昇と温度上昇との間に正の相関があった。これは、ここで見られた発熱の熱源は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存して活性化するものであることを示唆する。



## Development of walking nano-\*meters

Madoka Suzuki

*Organization for University Research Initiatives, 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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.

In this fiscal year 2013, we completed the development of a ratiometric nanothermometer (RNT) for intracellular temperature measurement in real-time. Both the thermo-sensitive fluorophore,  $\beta$ -diketonate chelate europium (III) thenoyltrifluoroacetate, and the thermo-insensitive fluorophore, rhodamine 101 that was used as a self-reference, are embedded in a polymeric particle that protects the fluorophores from intracellular conditions. We showed that the ratiometric measurement of single RNT spots was independent of the displacement of the RNT along the Z-axis. The temperature was successfully determined at the location of each RNT under a fluorescence microscope regardless of the dynamic movement of living cells. To illustrate the novelty of the spot-by-spot intracellular thermometry, we followed the temperature change in individual RNT spots in a single HeLa cell together with the  $\text{Ca}^{2+}$  burst induced by the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore, ionomycin. The temperature increased differently among different spots, implying heterogeneous heat production in the cell. In some spots, we showed that the temperature gradually decreased, while in others it remained high. There was a positive correlation between the average temperature elevation within a cell and the increase in  $\text{Ca}^{2+}$ . This result suggests the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration-dependent activity and/or number of heat sources.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Yoshiaki Takei, Satoshi Arai, Atsushi Murata, Masao Takabayashi, Kotaro Oyama, Shin'ichi Ishiwata, Shinji Takeoka and Madoka Suzuki A Nanoparticle-Based Ratiometric and Self-Calibrated Fluorescent Thermometer for Single Living Cells *ACS Nano* **8(1)**, 198-206 (2014)

### 総説・解説・成書

1. 鈴木団、大山廣太郎、石渡信一 「歩くナノ温度計」 *生物物理*, **53(3)**, 158-159 (2013)

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 早稲田大プレスリリース「水中で触れずに細胞の中の温度を測れるレシオ型ナノ温度計を開発 ミクロンサイズの温度変化を測定するナノ温度計の手法を発展」 2014年1月17日朝日新聞
2. 日経産業新聞「水中の細胞温度 触れず正確測定 早大が装置開発」 2014年1月21日
3. マイナビニュース「早稲田、水中で触れずに細胞の温度を測定する「レシオ型ナノ温度計」開発」 2014年1月28日
4. 鈴木団 「一匹の細胞で温度を扱うこと&擬似組織系で細胞の力学負荷応答を見ること」 「細胞機能究明の最前線3」理研セミナー、東京 (2013)
5. Madoka Suzuki "Temperature measurement in the scale of single cell with fluorescent temperature reporters" MBI Seminar, Mechanobiology Institute, National University of Singapore, Singapore (2013)
6. Madoka Suzuki "Single cell-scale thermometry by fluorescent temperature reporters" 7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM 2013), Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan (2013)
7. 鈴木団 「蛍光顕微鏡を用いた単一細胞スケールの温度計測」 第91回日本生理学会大会 鹿児島 (2014)
8. Madoka Suzuki "Microscopic thermometry in a living cell by fluorescent nanoprobes" Japan-A\*STAR Advanced Diagnostics Forum, Singapore (2014)

## 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、ペプチドナノファイバーを用いた抗原デリバリーシステムの開発に取り組んだ。本年度は、線維長の異なるナノファイバーを作製し、線維長が細胞取り込みに与える影響を評価した。その結果、線維長の長いナノファイバーはエンドサイトーシス機構で取り込まれるのに対して、短いナノファイバーは細胞膜を直接透過して細胞内へと取り込まれることを明らかにした。

### 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。一方で近年、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、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、 $\beta$ -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異方性キャリアとして選択した。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した。具体的には、 $\beta$ -シートナノファイバー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）に与える影響について詳細な評価を行った。特に本年度は、線維長の異なるナノファイバーを作製し、線維長が細胞取り込みに与える影響を評価した。

### 3. 成果

#### $\beta$ -OVA-EG<sub>12</sub> ナノファイバーの線維長制御

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) に抗原配列 (SIINFEKL) と親水性鎖 (オリゴエチレングリコール, 12mer) を導入した $\beta$ -OVA-EG<sub>12</sub> ペプチドを設計した。この $\beta$ -OVA-EG<sub>12</sub> ペプチドと蛍光基を導入した $\beta$ -OVA-EG<sub>12</sub>-FAM ペプチド

## 公募

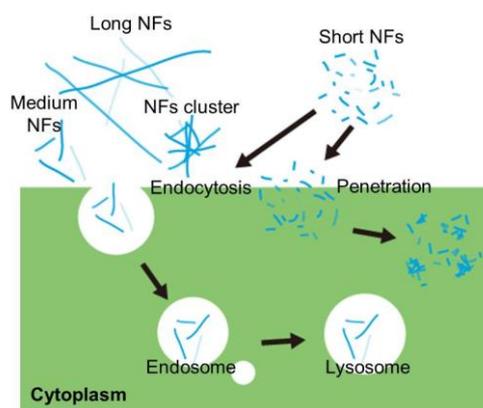
を PBS 中 1:19 のモル比で混合し、60°C で 24 時間インキュベートすることでおよそ数  $\mu\text{m}$  オーダーの長さを持つ蛍光ラベル化 $\beta\text{-OVA-EG}_{12}$  ナノファイバー (NFs) を調製した。さらに、この NFs 分散液を孔径 1.2、0.45、0.20、0.02  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターで濾過することで、それぞれ  $810 \pm 460$ 、 $280 \pm 210$ 、 $120 \pm 90$ 、 $40 \pm 20$  nm の平均線維長を持つ NFs を作製した。

### 線維長が細胞取り込みに与える影響

線維長の異なる 4 種類の $\beta\text{-OVA-EG}_{12}$  NFs (810、280、120、40 nm) を用いて、線維長の違いが細胞取り込みおよびその経路に与える影響を評価した。具体的には 4 種類の NFs を PBS 中で RAW264 細胞に取り込ませ、その取り込み量をフローサイトメーターにより評価した。さらに、無血清培地 (FBS (-)) および血清含有培地 (FBS (+)) 中での取り込み試験を行い、培地中の成分が $\beta\text{-OVA-EG}_{12}$  NFs の取り込みに与える影響について評価した。PBS、FBS (-) 中での取り込み

は多い順に  $280 \text{ nm} = 120 \text{ nm} > 40 \text{ nm} > 810 \text{ nm}$  であった。一方で、FBS (+) 中での細胞取り込みは線維長に因らずほぼ一定の値を示し、一樣に取り込み量が少なかった。以上より、NFs の細胞取り込みはその線維長に依存することが確認された。

次に、線維長の異なる NFs (810、280、120、40 nm) の細胞取り込み経路を調べることを目的として、エンドサイトーシス阻害剤が細胞取り込みに与える影響について評価した。 $\text{NaN}_3$  溶液中で 30 分プレインキュベートした RAW264 細胞に、各線維長の NFs を終濃度  $50 \mu\text{M}$  で 30 分取り込ませ、洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。エンドサイトーシス阻害条件下において、120、280、810 nm の NFs を取り込ませた場合、蛍光は主に細胞表面からのみ観察され、内部からの蛍光は観察されなかった。この結果より、120、280、810 nm の NFs は主にエンドサイトーシス経路で取り込まれていることが示された。一方、興味深いことに 40 nm の NFs はエンドサイトーシス阻害条件下においても確かに細胞内に取り込まれていることが認められた。以上の結果より、線維長の違いは NFs の細胞取り込み経路に大きく影響を与えることが示された (Fig. 1)。言い換えると、NFs の線維長によって、取り込み経路を合目的的に制御することが可能であることが示された。さらに、小角 X 線散乱、赤外分光、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡により、 $\beta\text{-OVA-EG}_{12}$  NFs の構造解析を詳細に行ったところ、NFs はフィラメント状ミセルのような円柱構造ではなく直方体構造をもち、親水性面と疎水性面の両方をもつ特殊な表面をもつことが示唆された。このような両親媒性の表面構造が $\beta\text{-OVA-EG}_{12}$  NFs の細胞取り込みに影響を与えていると考えられる。



**Figure 1.** Schematic illustration of cellular uptake pathway for  $\beta\text{-OVA-EG}_{12}$  nanofibers (NFs) with different length.

## **Novel Bio-function of Antigen-loaded Peptide Nano-assemblies 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  $\beta$ -sheet peptide nano-assemblies as carriers. The preparation of antigenic peptide-loaded nanofibers by self-assembly of  $\beta$ -sheet peptide containing T-cell epitope and hydrophilic block, and their cellular uptake are reported.

The building block peptides consisted of four minimum essential elements, and were designed as a simple model for the construction of antigenic peptide-loaded nanofibers. They were composed of a  $\beta$ -sheet forming block (FVIFLD;  $\beta$ ), an antigen block ( $^{257}$ SIINFEKL $^{264}$ ; OVA $_{49-57}$ ), a flexible-linker block (GSG), and a hydrophilic block (oligo(ethylene glycol); oligo(EG) $_{12}$ ). The  $\beta$ -OVA-(EG) $_{12}$  solution in PBS was incubated at 60 °C for 24 hours, nanofibers with a length of a few micrometer were formed. The length of  $\beta$ -OVA-EG $_{12}$  was controlled to  $810 \pm 460$ ,  $280 \pm 210$ ,  $120 \pm 90$ , and  $40 \pm 20$  nm by extrusion through membrane filters with pore diameter 1.2, 0.45, 0.20, and 0.02  $\mu$ m, respectively. We investigated the effect of nanofiber length on their cellular uptake by RAW264 cells and the cellular internalization pathway. The amount of cellular uptake was significantly affected by the length of the nanofibers. Interestingly, the short nanofibers with a length of 40 nm was internalized by non-endocytosis pathway, in contrast that the longer nanofibers with a length of 120 nm – 800 nm via endocytosis pathway. The size-regulated peptide nanofibers are expected to be useful as a novel delivery carrier of antigenic peptides into cytoplasm of antigen-presenting cells.

公募

## 業績リスト

### 学術論文

1. Tomonori Waku, Yuichi Kitagawa, Kazufumi Kawabata, Saki Nishigaki, Shigeru Kunugi, Naoki Tanaka Self-assembled  $\beta$ -sheet Peptide Nanofibers for Efficient Antigen Delivery *Chem. Lett.* **42**, 1441-1443 (2014)

## 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、刺激の受容・応答、細胞内伝達の開始経路、などの現象で重要である。組換え膜タンパク質を挿入した人工界面により細胞膜機能の再構成をする手段の実現を試みている。細胞サイズの脂質2分子膜ベシクル（巨大リポソーム）に、膜受容体などの膜タンパク質を搭載したバキュロウイルス粒子を膜融合させ、膜機能をモデル膜に付与することを試みた。今年度は、昨年度に引き続き人工細胞系構築に適したリポソーム作製法の検討を行い、本研究で作出した膜受容体インテグリンをそのリポソーム膜に組込んだ。関連して、巨大リポソームを用い、内水相へのタンパク質封入の効率化、シグナル経路下流の膜酵素の組み込み実験、にも取り組んだ。

#### 2. 研究の背景と目的

巨大リポソーム膜に、細胞情報の受容／応答を行う膜タンパク質の一群（膜貫通受容体・細胞骨格など）からなるナノ分子システムを構築・研究することをめざしている。人工細胞モデルとして巨大リポソームに目的の膜タンパク質を（複数）組み込むには、タンパク質の発現・精製、可溶化、2分子膜への再構成、というステップが必須であった。代表者らが発明した「組換えバキュロウイルス膜融合によるプロテオリポソーム作製法」（特許 5266459（平 25. 5. 17）、US8563291 B2 の関連技術）では、cDNA 情報を利用し昆虫培養細胞で発現した組換え膜タンパク質をバキュロウイルス出芽粒子 (budded virus, BV) に搭載された形で回収し、リン脂質膜へ膜融合させることで組み込める。昨年度に引き続き、今年度は、巨大リポソーム膜への膜受容体組込の直接観察、関連技術のリポソーム内水相への物質封入の特性調査、などにより本手法の可能性を広げることがをねらう。最終目標として特にインテグリンを中心とする経路に着目し、人工細胞システムを設計する。具体的には、従来の静置水加法に加え、界面通過法（張合せ法、droplet-transfer 法）で調製した巨大リポソームを用いて BV の膜融合特性を調べた。さらに、膜タンパク質組込可視化、エフェクター活性評価、タンパク質封入を検討した。

### 3. 成果

組換え BV 感染 Sf9 細胞の培養上清からショ糖密度勾配遠心分離により、正常粒子と異常粒子（脱核粒子）の 2 画分に BV を分別回収、エンベロープを蛍光標識（R18）した。界面通過リポソーム（calcein で内水相標識）と BV との膜融合の pH 依存性を共焦点顕微鏡で調べ、融合曲線を得、膜融合に BV のもつ融合誘起因子 GP64 の活性が関わることを確認した。正常粒子と異常粒子の融合能の比較も行った（投稿準備中）。組換え膜タンパク質の逐次組み込みへ活用しやすくなった。

膜受容体を構成するプロテオリポソーム調製の可視化確認も進展した。蛍光タンパク質タグ FP (TagRFP、TagGFP2 等) を同じ読み枠で繋いだ膜タンパク質遺伝子を組換えたウイルスを作り、回収した組換えタンパク質の BV への搭載と、膜融合によるリポソーム膜への組み込み、を可視化確認できる。末端に FP を融合した膜貫通タンパク質遺伝子を複数組換え、BV として回収、蛍光、ウエスタンブロットにより発現を確認した (GP64 (N 末)、GPCR (ADRB2、CRHR1)、ADCY6、ITGA2、ITGA3、ITGB1 (以上 C 末))。pH(4-5) 処理で GP64 を活性化し、BV を巨大リポソームへ膜融合、CRHR1、ADCY6、ITG の膜への組み込みを直接観察した (図) (論文業績 2 および投稿準備中)。

本方法により受容体膜経路の終端に位置するエフェクタータンパク質の 1 つ、ADCY6 (cAMP 合成酵素) の構成を行った。基質封入リポソームと出芽ウイルス粒子とを融合させ得たプロテオリポソームを用い活性を検出した (論文業績 2)。

界面通過法と異なり封入効率の低い静置水和法は、しかし、安定な脂質 2 分子膜をもつ巨大リポソームを得る簡便法として、今なお有用性・重要性が高く、封入効率を高める研究が広くなされている。水和時の pH を目的タンパク質の pI を跨ぎ調節し脂質膜への結合を促すことで、内水相封入の効率化が可能であることを明らかにした (論文業績 1)。今後の課題として、①培養方法やプロモーター改変による BV 発現タンパク質量の検討、②受容体上下流の関連因子の相互作用系の構築、がある。さらに、組み込まれた膜タンパク質機能に特徴的な膜のダイナミクスを引き出せるか、挑戦する。細胞外基質に見立てた環境におけるペプチドリガンドとインテグリン  $\alpha$ 、 $\beta$  再構成膜との相互作用の解析、内水相への FERM タンパク質封入と再構成リポソーム膜との相互作用の解析、などを行えるモデル実験系の構築に引き続き取り組む。

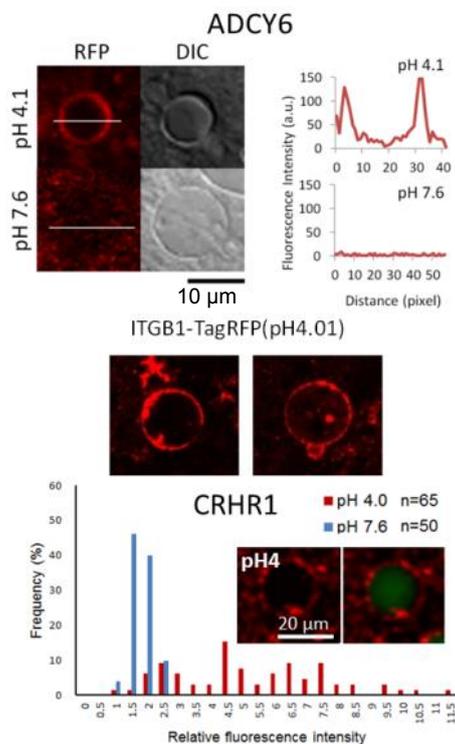


図. 膜タンパク質構成巨大リポソーム

## **Reconstitution of nanomachinery 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 membrane proteins are important because extracellular signals are received and transmitted with the proteins on the interfaces. To investigate such biochemical and biophysical functions, giant liposomes (giant unilamellar vesicles (GUVs)), which have cell-sized diameters, have been used recently for reconstitution of cell membrane proteins as artificial cell systems. Particularly, researchers have a great interest in reconstitution of biological functions that would be expressed by multi-component protein systems related to cell-cell and cell-matrix communications. Transmembrane protein receptors are also interesting because of their work in transfer of cell signal molecules over such biological membrane interfaces. In the present project, we attempt to GUV-based artificial cell systems in which recombinant membrane proteins are reconstituted into a functional bio-nanomachinery. We have here selected model transmembrane proteins including G protein coupled receptors (GPCR), extracellular matrix receptors (integrin (ITG)  $\alpha/\beta$ ) or membrane enzyme effectors (adenylate cyclase (ADCY)) for the present demonstration. We used our novel method based on a baculovirus (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV)) /insect cell (Sf9) gene expression system that would enable us to prepare proteo-GUVs containing such desired recombinant membrane proteins.

First, we examined membrane fusion between baculovirus budded-virus particles (BVs) and droplet-transferred GUVs through direct observation on single GUVs using a confocal laser scanning microscope (CLSM) and obtained the fusion profiles of both intact and capsid-free BVs that showed the membrane fusion was caused by their GP64 activated under acidic conditions (pH 4-5). Second, we demonstrated that fluorescent protein-tagged (TagRFP, TagGFP2) transmembrane proteins were incorporated into membranes of giant liposomes that were generated using the droplet-transfer method or the gentle hydration (natural swelling) method; GP64 (in N-terminus) and GPCR (ADRB2, CRHR1), ADCY6, ITGA2, ITGA3 and ITGB1 (in C-termini) were directly observed on GUV membranes using CLSM. In addition, we verified enzymatic activities of recombinant ADCY incorporated to giant liposomes. Finally, we developed a procedure for efficient entrapment of proteins into inner phases of GUVs generated with the gentle hydration by switching pH of hydration solutions around the pI of such target proteins. The improvement would be of use to reconstitution of artificial membrane models.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Takahiro Shimizu, Takaaki Mori, Masahiro Tomita and Kanta Tsumoto pH Switching That Crosses over the Isoelectric Point (pI) Can Improve the Entrapment of Proteins within Giant Liposomes by Enhancing Protein-Membrane Interaction *Langmuir* **30**, 554-563 (2014)
2. Takaaki Mori, Koki Kamiya, Masahiro Tomita, Tetsuro Yoshimura and Kanta Tsumoto Incorporation of Adenylate Cyclase into Membranes of Giant Liposomes Using Membrane Fusion with Recombinant Baculovirus-Budded Virus Particles *Biotechnol. Lett.* in press (2014) (DOI: 10.1007/s10529-014-1485-6)

### 総説・解説・成書

1. 湊元幹太 「人工細胞システム構成に役立てたい組換えプロテオリポソーム技術」 日本化学会・生体機能関連化学部会ニュースレター **28**, 15-18 (2014)

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

1. 湊元幹太 「組換えバキュロウイルスを用いた膜蛋白質の人工脂質膜ベシクルへの再構成」平成 25 年 4 月 27 日分子ロボティクス研究会定例会 (2013)
2. 湊元幹太「少数要素から構成する人工細胞ベシクルを用いた膜シグナル伝達モデル実験系の開発」第 86 回日本生化学会大会 シンポジウム (生体膜の動態から見える新たな膜生物学) (2013)
3. Kanta Tsumoto 「Baculovirus-Liposome Membrane Fusion for Construction of Artificial Cell Models Based on Giant Lipid Vesicles」2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (NMMS2013) (2013)
4. Kanta Tsumoto, Misako Nishigami, Takaaki Mori and Masahiro Tomita 「Cell-Sized Liposomes: Basic Structures for Mimicking Cell Systems」7th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2013) (2013)
5. 湊元幹太「タマゴでつくる人工細胞：リポソームの話」平成 25 年 11 月 14 日 愛知県立津島高等学校 出前授業 (2013)
6. 湊元幹太、富田昌弘「命を見ようーバナナから DNA を取り出してみよう」平成 25 年 11 月 16-17 日 青少年のための科学の祭典 2013 第 11 回三重大学大会 ブース出展(2013)
7. 湊元幹太「巨大組換えプロテオリポソームによる人工細胞モデル構築の試み」平成 25 年 12 月 13 日 神戸大学 理学・化学専攻創製光分子科学セミナー (2013)
8. 湊元幹太「多要素細胞膜シグナル伝達経路を構成した人工膜系の新規構築と機能評価」平成 25 年 9 月 3 日 平成 26 年 2 月 15 日 物質・デバイス領域共同研究拠点特定研究分子分解能解析に基づくバイオ分子集積・ソフト界面構築と細胞操作技術への応用 [B-5] 研究集会(2013, 2014)
9. 湊元幹太「Giant Liposome」平成 26 年 3 月 3 日 三重大学医学部附属病院 IVR 科セミナー

## 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の厳密な制御に有効な「タンパク質担持材料（タンパク質－高分子複合体）」において、基材に担持させたタンパク質の細胞への作用に関して理解できていない部分が数多い。そこで、生物学的評価と分光学的評価を併用して、基材担持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。これまでに仮説として言われてきた、シグナル伝達の連続性・継続性とそれに伴う効率的な細胞制御について実験的に立証することができた。加えて、担持タンパク質は、徐々にではあるが、細胞内へ取り込まれていること、そして、取り込まれることにも大きな意義があることを突き止めた。

### 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、担持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、タンパク質担持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、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受容体に結合後、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、2つの見解が大きく乖離している。この点は、担持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）といった担持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た。

### 3. 成果

#### 基材担持タンパク質の表面の状態

モデルとして用いた表皮増殖因子キメラタンパク質 (EGF-His) 担持表面を原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した (Fig. 1)。その表面は、微細な凹凸が密に配列しており、その凸部の直径が、EGF の長軸方向の断面直径と類似する値であった。よって、これまで、MicroBCA から求めたタンパク質表面密度 ( $349 \pm 22 \text{ ng/cm}^2$ ,  $3.38 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ ) から予想してきたように、EGF-His がアンカーリングにより密に配列していると考えられる。また、エリプソメトリー測定から、膜厚が  $1.89 \pm 0.01 \text{ nm}$  と分かり、EGF-His は単層であると示唆された。

この二つの結果から、基材担持タンパク質は、単層でかつアンカーリングにより密に配列していると結論付けられた。

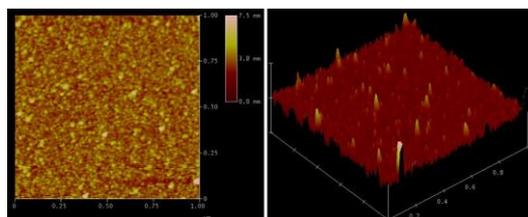


Fig. 1. AFM images of the substrate immobilized with EGF-His.

#### 受容体と相互作用した担持タンパク質の追跡

昨年度までに、シグナル伝達の連続性・継続性に関して生物学的評価系を用いて立証してきた。特記すべき点として、EGF 受容体のリン酸化によるシグナル伝達の評価において、培養 4 日の細胞においてリン酸化量が大幅な減少する傾向が見られた点である。その現象が意味するものは何か、つまり、取込み阻害がシグナル伝達継続性につながっているが最終的には取込まれることによってシグナル量が減少しているのかを調べるべく、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) や共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (CLSM) により担持 EGF-His の追跡を行った。

Fig. 2A および 2B●に示されるように、培養 21 h まででは、ほぼ減少が認められなかったのに対し、それを過ぎると明確な担持タンパク質の基材からの脱離が認められた。一方で、細胞を播種せず培養液中に存在させた場合では、ほぼ脱離は見られなかった (72 h で 1.5% 脱離)。

共焦点レーザー蛍光顕微鏡により、細胞内の A594-EGF-His の有無について追跡したところ、培養 2 日後あたりから、細胞内で赤色蛍光の輝点が観察され始め、その輝点が時間経過と共に増加することが分かった。これらの結果から、徐々にではあるが、細胞内へ担持 EGF-His は取込まれていることが判明した。

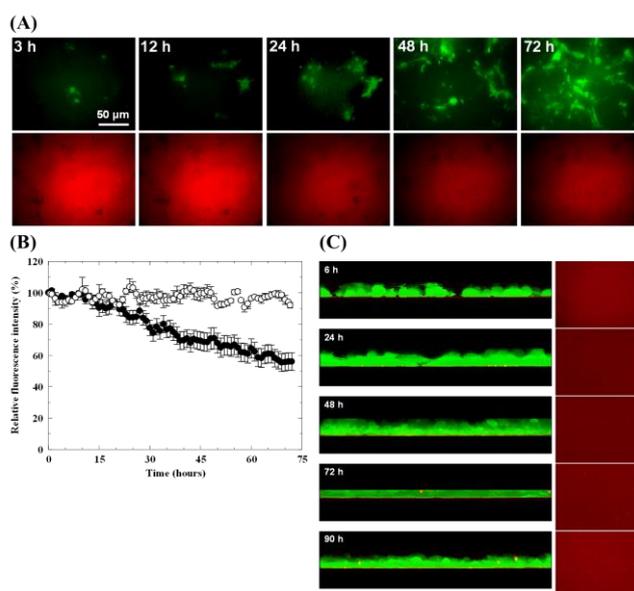


Fig. 2. (A) TIRFM images of EGFP-NSPCs (upper) and surface-immobilized A<sub>594</sub>-EGF-His (bottom). (B) Relative fluorescence intensity (RFI) of surface-anchored A<sub>594</sub>-EGF-His. We analyzed a RFI of A<sub>594</sub>-EGF-His incubated with (●) and without (○) cells in the medium. (C) CLSM images of EGFP-NSPCs (green) and A<sub>594</sub>-EGF-His (red). Left: cross-sectional images of X-Z axes, Right: Z-sectional images of substrate surface (red: A<sub>594</sub>-EGF-His).

## **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 function 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 can regulate growth and differentiation of various stem cells by applying the characteristics of chimeric proteins. However, the action mechanism of the immobilized proteins isn't understood 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] *Biomaterials* 29, 4403-4408 (2008), [2] *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 efficiently 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) fused with oligohistidine (His) were used as the model proteins (EGF-His). Moreover, 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). Neural stem/progenitor cells (NSPCs) were used as a model stem cells for the assay concerning signaling transduction with surface-immobilized EGF. In this year, I investigated about surface characterization of EGF-His immobilized to substrate using MicroBCA analysis, atomic force microscopy, and ellipsometry measurement. And the detachment of EGF-His from the surface and the internalization of detached EGF-His into cells were evaluated using TIRFM and CLSM. From these results, it was shown that cells continuously received the signal from surface-anchored EGF-His. However, surface-anchored EGF-His were gradually detached by receptor, and finally internalized into the cells.

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. Chirag Gujral, Yuta Minagawa, Kurumi Fujimoto, Hiromi Kitano and Tadashi Nakaji-Hirabayashi. Biodegradable Microparticles for Strictly Regulating the Release of Neurotrophic Factors. *J. Control. Release*, **168**, 307-316 (2013)

#### 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、Gujral Chirag、北野博巳、藤本くる美、皆川雄太、(シンポジウム招待講演) キメラタンパク質担持材料を用いた細胞機能の精密制御 ～キメラタンパク質製バイオマテリアルの創製～、『第 26 回 日本動物細胞工学会 2013 年度大会』、シンポジウム 3 No. 1、ホテルフジタ福井、2013 年 7 月 19 日

##### 【学会での成果発表】

1. ○中路 正、井上祐貴、石原一彦、基材に担持したタンパク質の作用機序の理解、『第 62 回高分子学会年次大会』、1Pg115、京都国際会館、2013 年 5 月 29 日
2. ○中路 正、藤本くる美、古川彩希、北野博巳、井上祐貴、石原一彦、タンパク質担持バイオマテリアルの細胞制御メカニズムの理解と高機能医用材料への展開、『第 62 回高分子討論会』、1W15、金沢大学角間キャンパス、2013 年 9 月 11 日

##### 【活動】

1. 中路 正 日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会（富山大学）開催 2013 年 12 月 16 日

## 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旨し、細胞機能を人の手で操作するためには、その存在と活性の程度を検出することは非常に重要である。我々は、その見えない酵素の存在および活性状態を細胞機能を損なわずに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きた。今年度は、昨年度までに詳細に検討した自己集合型ナノプローブの構造と活性の相関関係を基にした研究の展開として、レシオ型の蛍光ナノプローブの開発とその機能評価などをおこなった。

#### 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。我々はこれまでに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、自己集合型ナノプローブの開発に成功している。<sup>[1-3]</sup> 昨年度は、この構造と活性の相関関係を詳細に評価することで、自己集合型ナノプローブの合理的設計法を提案することに成功した。殊に導入する置換基の疎水性置換基定数により集合状態を予測することも可能となった。<sup>[3]</sup> そこで、本年度は、その知見を基にして、(その 1)モデル酵素としてエステラーゼを標的としたレシオ型蛍光ナノプローブの設計及び機能評価をおこなった。また、(その 2)先の指標を基に光分解性保護基を導入した自己集合型ナノプローブが、光照射によって pH 計測能を回復する細胞内 pH プローブとして機能することを新たに見出した。(その 3)また別戦略としてこれまでに報告していたレシオ型蛍光プローブ<sup>[2]</sup>が有していた問題点を解決した新規誘導体の合成及び機能評価をおこなった。

### 3. 成果

#### (その1) エステラーゼ応答型蛍光ナノプローブ

昨年度までの構造活性相関の結果を基に、疎水性置換基として蛍光色素を導入した2種類のレシオ型ナノプローブを設計した。このナノプローブは、どちらも集合状態と分散状態の違いを色調変化によって検出できるが、一方はエステラーゼに応答して分散するが、もう一方はエステラーゼには応答しない。これらのナノプローブを実際に培養細胞に対して投与し、それぞれのナノプローブの蛍光を追跡したところ、エステラーゼ応答型は、細胞内全体に分散状態を示唆する蛍光パターンが観察された。一方で、非応答型では細胞内にマクロピノソームを示唆する顆粒状の集合状態を示唆する蛍光パターンが観察された。この結果を基に、北海道大学の中林孝和准教授と共に多光子励起蛍光寿命イメージングシステム(FLIM)を用いた集合体状態の評価についても検討をおこない、良好な結果を得ている。

#### (その2) 光刺激により活性化される蛍光 pH プローブの開発

先の構造活性相関を基に集合状態を形成すると予測された光分解性保護基を導入した自己集合型ナノプローブを開発した。光分解性保護基は、特定の波長の光によって脱保護することができるため、外部刺激として光を用いることで基本骨格とした蛍光色素が有する機能(pH 計測能)を回復することが期待された。実際に設計した自己集合型ナノプローブは、光照射前には自己集合体を形成しており、無蛍光でありながら、光照射をおこなうことで蛍光性を回復し、pH プローブとして利用できることが明らかとなった。また細胞内においても期待される pH 応答能を示すことが確認された。

#### (その3) 幅広い pH 環境中で用途可能な酵素活性検出用レシオ型蛍光プローブの開発<sup>[4]</sup>

これまでに SNARF 蛍光の色調変化がフェノール性水酸基へのプロトンの脱着に起因することに着目し、SNARF を基本骨格としたレシオ型酵素活性用蛍光プローブを報告している。<sup>[2]</sup> この戦略においては、フェノール性水酸基の  $pK_a$  が重要であるため、中性から塩基性条件下でしか利用できないという制約があった。そこで、 $pK_a$  を産生側にシフトさせた新たな SNARF 誘導体を設計・合成することで、その問題を解決した。この新規誘導体を用いて作成したレシオ型酵素活性評価用蛍光プローブは、酸性から塩基性まで幅広い pH 領域で酵素活性(一例としてニトロ還元酵素)を評価可能であった。

(その他) 岡山大学 大槻高史教授と大阪府立大学原田敦史准教授との領域内共同研究が進行中であり、良好な結果を得ている。

[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., *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 1663 (2011).

[2] E. Nakata, et al., *Chem. Lett.*, **39**, 734 (2010).

[3] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014).

[4] 中田栄司 他, 特願 2013-58923

## Development of self-assembled fluorescent nano-probe for detecting enzymatic activity in living cells

Eiji Nakata

*Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Japan*

In the field of nanomedicine molecular science, the enzymatic activity is one of the useful parameter to understand the condition of living system. And also, it is very important as the trigger of medicinal and biological agents. Thus, the methodology to monitor enzymatic activities in living system are very important. Among them, 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 biomolecules such as enzyme are therefore important for fluorescence imaging. 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.<sup>[1]</sup> The mechanism underlying the fluorescence off/on switching is based on the lactone formation under a hydrophobic condition. A certain kind of derivatives formed self-assembly in an aqueous condition and existed as the lactone form. We explored the structure-activity relationship of the derivatives and developed a rational design strategy for self-assembled fluorescent nano probes.<sup>[2]</sup> Based on the knowledge, the ratiometric fluorescent nano probes which could be monitored esterase activity, as the model enzyme, in the living cells were designed. In addition, we focus on developing the fluorescent pH nano probe activated by photo-irradiation. The designed fluorescent pH nano probe could work in living cells effectively. And more, new types of ratiometric fluorescent probe to monitor enzyme activity such as nitroreductase were designed. By using these results in combination, we would like to rationally design a ratiometric fluorescent nano probe for specific enzyme in the cell.

[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). [2] E. Nakata, et al., *RSC Adv.*, **4**, 348 (2014).

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. \***Eiji Nakata**, Yoshihiro Yukimachi, Yoshiji Nazumi, Maki Uwate, Hideaki Maseda, Yoshihiro Uto, Toshihiro Hashimoto, Yasuko Okamoto, Hitoshi Hori and Takashi Morii  
“A novel strategy to design latent ratiometric fluorescent pH probes based on self-assembled SNARF derivatives”  
RSC Adv., 2014, 4, 348
2. Tien Anh Ngo, **Eiji Nakata**, Masayuki Saimura, Tsutomu Kodaki, Takashi Morii  
“A protein adaptor to locate a functional protein dimer on molecular switchboard”  
Methods, in press

#### 総説・解説・成書

1. **中田 栄司** 「SNARF 誘導体の自己集合化戦略に基づいた外部刺激応答性のレシオ型蛍光 pH プロブの開発」ナノ学会会報 Vol. 12, No. 2, 2014

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

##### 受賞

1. **中田 栄司** 7th International Symposium on Nanomedicine(ISNM2013) Best Poster Award  
“A rational design strategy to design latent ratiometric fluorescent pH probes based on self-assembled SNARF derivatives”

##### 招待講演

1. **Eiji Nakata**, 2013.12.09, EPFL, switzerland  
“A novel strategy to design latent ratiometric fluorescent pH probes based on self-assembled SNARF derivatives”
2. **Eiji Nakata**, Takashi Morii, 2014.1.09, Kyoto University, Japan  
“Molecular Switchboard: Assembling Multiple Proteins on DNA Origami”

##### 特許

1. 特願 2013-58923 「セミナフトローダフルオル誘導体および蛍光プロブ」出願人 国立大学法人京都大学, 発明者 中田 栄司, 森井 孝 出願日 平成 25 年 3 月 21 日

##### アウトリーチ活動

1. 第 18 回エネルギー理工学研究所公開講演会にて研究紹介, 京都大学宇治キャンパス, 平成 25 年 5 月 11 日
2. 高校生（三重県立上野高等学校）への研究紹介, 京都大学宇治キャンパス, 平成 25 年 11 月 21 日

## 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

本年度は、代表的な自家蛍光分子である NADH について、細胞内環境変化に伴う蛍光変化の機構を検討した。吸収および蛍光の外部電場効果および媒質依存性の測定から、細胞内における NADH の蛍光スペクトルの位置および蛍光寿命の変化は、タンパク質との相互作用に伴う NADH 周囲の誘電環境変化として説明できることがわかった。NADH の自家蛍光を用いて、細胞内環境変化に伴う NADH とタンパク質との相互作用の変化・NADH 周囲の誘電環境の変化を定量的に検出できることを示唆している。

### 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) と生体内に元から存在する蛍光物質の蛍光 (Autofluorescence, 自家蛍光) を組み合わせた自家蛍光寿命イメージング (AFLIM) によって、細胞内の様々なパラメーターの定量測定を行うことを目的とする。蛍光寿命の定量性を用いることによって、AFLIM による無染色の細胞内環境イメージング測定を行うことができる。また自家蛍光寿命の変化の機構の解明を行い、自家蛍光を用いた細胞内環境の定量評価を目指す。さらに、領域内共同研究として、機能性色素分子の蛍光寿命を測定し、発光機構の解明・新たな細胞内センシングの可能性などについて検討した。

### 3. 成果

NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide) の AFLIM を用いた細胞内環境計測を提案し、細胞内 pH, がん細胞, アポトーシスのその場検出などを検討している。NADH によるセンシングでは、NADH の蛍光が周囲の環境に対して敏感であることを用いており、例えば、細胞内の蛍光スペクトルは水溶液中に比べて約 10 nm 短波長シフトし、細胞内の蛍光寿命は水溶液中より約 10 倍長くなる。しかし、NADH の蛍光変化の機構は不明であり、定量的な考察を行うことができない。本研究では、NADH の吸収および蛍光の外部電場効果および媒質依存性の測定から、NADH の蛍光挙動の変化の機構を考察した。

NADH の蛍光スペクトルと蛍光寿命の媒質依存性を Fig. 1a と b にそれぞれ示す。横軸として溶媒の極性パラメーターである  $E_T(30)$  を用いている。溶媒の極性が増加 ( $E_T(30)$  の値が増加) するにつれて、蛍光寿命は短くなり、極性環境が NADH の無輻射緩和速度を増加させることがわかる。また、蛍光位置は極性の増加によって長波長シフトしてい

る. この結果は, 細胞内での NADH の蛍光挙動の変化は, NADH 周囲の誘電環境によることを示唆している. 細胞内でタンパク質と結合した NADH は, 周囲をアミノ酸残基で取り囲まれた構造を示す. そのため, NADH 周囲の環境は, 極性の低い疎水性溶媒と同様の環境になる. このいわゆる溶媒効果のために, タンパク質と相互作用しながらも, 蛍光は短波長シフトし, 蛍光寿命は増加したと考えられる.

媒質依存性の結果は, 電場効果の測定からも支持される. NADH に  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$  の外部電場を印加し, 吸収・蛍光スペクトルの外部電場による変化成分(電場吸収および電場蛍光スペクトル)を測定した. NADH の電場吸収スペクトルから光励起に伴う双極子モーメントの変化を求めることができ, 励起状態は基底状態と比べて電荷移動(Charge Transfer, CT)性が大きく, 双極子モーメントの値が約 4 D 大きくなることがわかった. 電場蛍光スペクトルは, 電場による蛍光消光が観測された(Fig. 2). 450 nm 付近に極大を示す蛍光バンドの強度が外部電場によって減少し, 外部電場との相互作用によって蛍光寿命が減少することがわかる. この結果は, 蛍光寿命の媒質依存性と一致し, 励起状態の CT 性によって, 静電的な相互作用による蛍光変化が観測されたと考えられる.

本結果は細胞内での NADH の蛍光変化の原因の一つに, NADH 周囲の誘電環境変化があることを示している. タンパク質と結合することによって, NADH の周囲は極性の低い疎水的な環境になる. 水中と比べて細胞内で蛍光寿命が増加するのは, アミノ酸残基の疎水性効果であると考えられる. Fig. 2 より,  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$  の印加に対して蛍光寿命が約 0.02% 減少することから, 蛍光寿命( $\tau_F$ ), 蛍光寿命の電場変化( $\Delta\tau_F$ ), NADH 周囲の電場( $F$ )との間には以下の式が成り立つ.

$$\Delta\tau_F / \tau_F \approx -4|F|^2 \times 10^{-4}$$

ここで  $F$  の単位は  $\text{MV cm}^{-1}$  であり, 変化量は電場の 2 乗に比例することを用いている. 細胞内での蛍光寿命の増加が, すべて静電的相互作用によるとした場合, 水中(0.3 ns)から細胞内(1.2 ns)での NADH 周囲の局所電場の減少は, 上式より約  $40 \text{ MV cm}^{-1}$  と見積もることができ, 水和による局所電場の大きさとオーダーで一致した. この結果は, NADH の自家蛍光を用いて, 細胞内環境変化に伴う NADH とタンパク質との相互作用の変化・誘電環境の変化を定量的に検出できることを示唆する.

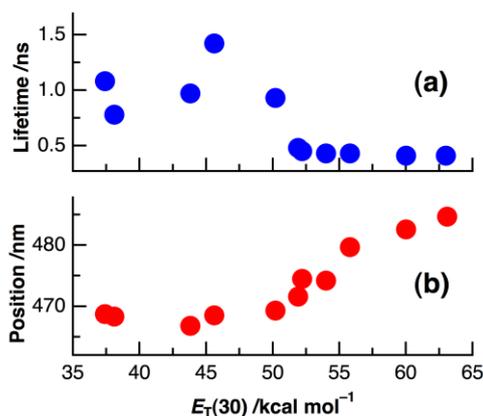


Fig. 1. Plots of fluorescence lifetime (a) and fluorescence position (b) of NADH against  $E_T(30)$ . The first moment was used as fluorescence position.

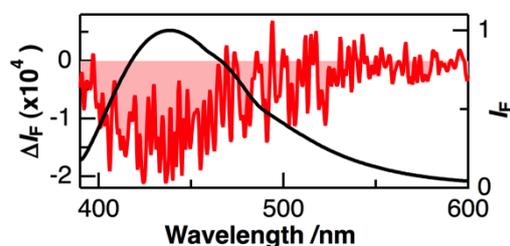


Fig. 2. Fluorescence (solid line) and electrophotoluminescence (shaded line) spectra of NADH in a PVA film with an excitation wavelength of 360.5 nm. The applied field strength was  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$ .

## 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 environments using multi-photon autofluorescence lifetime imaging. We have previously shown that the autofluorescence lifetime of NADH that is a representative autofluorescent chromophore became shorter with increasing intracellular pH, indicating that pH in a cell can be evaluated by the fluorescence lifetime of NADH without dye labeling. However, the mechanism of the change in the fluorescence properties of NADH with cellular environments remains unresolved. In the present period, therefore, we have measured the external-electric-field effects on absorption and fluorescence spectra of NADH to explore the possibility that polar environments induce the change in the fluorescence properties of NADH. It is found that the fluorescence lifetime of NADH is markedly affected by the application of an electric field. The magnitude of the field-induced decrease in the fluorescence lifetime is  $\sim 0.02\%$  at  $0.7 \text{ MV cm}^{-1}$ . This result indicates that the polar environment around NADH markedly affect the fluorescence properties of NADH. NADH exists as free and protein-bound state in cells. NADH in protein-bound state is surrounded by amino acid residues of a polypeptide, and these residues produce local electric field for embedded NADH. The magnitude of the local electric field depends on the interaction between NADH and the enzyme, and the change in the fluorescence properties with cellular environments can be considered to reflect the change of the polar environment around NADH that is caused by the interaction with amino acid residues in the enzyme. The present study therefore indicates that the measurement of the fluorescence of endogenous NADH is useful to clarify the change in the interaction between NADH and the enzyme accompanied by physiological processes. Since the magnitude of the change is proportional to the square of the field strength, the field-induced change in the fluorescence lifetime ( $\Delta\tau_F$ ) of NADH may be estimated by the following equation:  $\Delta\tau_F / \tau_F \sim -4|\mathbf{F}|^2 \times 10^{-4}$ , where  $\tau_F$  is the fluorescence lifetime at zero field, and  $|\mathbf{F}|$  is in  $\text{MV cm}^{-1}$ . If the difference of the fluorescence lifetime in cells ( $\sim 1.2 \text{ ns}$ ) and in water ( $\sim 330 \text{ ps}$ ) is only due to the change in the local electric field affecting NADH, the reduction of the magnitude of the electric field from water to cells is estimated to be  $\sim 40 \text{ MV cm}^{-1}$ , which is consistent with the theoretical evaluation of the difference of the local electric field in a protein and in water.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Takakazu Nakabayashi, Md. Serajul Islam, Liming Li, Masahide Yasuda and Nobuhiro Ohta  
Studies on External Electric Field Effects on Absorption and Fluorescence Spectra of NADH  
*Chem. Phys. Lett.* in press. (DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2014.01.035>)

### 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* 53 (2013) 166.
2. 中林孝和, 太田信廣「ラベルフリー細胞内自家蛍光寿命イメージング研究の進展」*化学と工業* 67 (2014) 262.

### 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, 2013年度日本分光学会北海道支部シンポジウム 2014年1月, 札幌  
「蛍光寿命イメージングを用いた細胞観測の展開」
2. 中林孝和, 分光イノベーション研究会第2回シンポジウム 2013年11月, 大阪  
「分光技術を用いて細胞内の環境を探る-蛍光寿命からのアプローチ-」
3. 中林孝和, ニコンイメージングセンター・ナノテクノロジープラットフォーム学術講演会  
2013年11月, 札幌「分光技術を用いて細胞内の環境を探る-蛍光寿命イメージング-」

#### (分担著書)

1. 中林孝和, 光化学の事典 -誰でもわかる光化学の初歩- (朝倉書店) 印刷中.  
「細胞イメージング」
2. 中林孝和, 発光の事典 (朝倉書店) 印刷中. 「アップコンバージョン,  
励起状態ダイナミクス, 蛍光寿命イメージング, 金属表面での radiative decay engineering」
3. Nobuhiro Ohta and Takakazu Nakabayashi, Natural Biomarkers for Cellular Metabolism: Biology,  
Techniques, and Applications (Taylor & Francis Books) in press. "Intracellular Autofluorescent  
Species: Structure, Spectroscopy, and Photophysics"

#### (アウトリーチ活動)

1. 中林孝和, 北海道教育大学函館校にてナノメディシン分子科学研究の紹介 2013年11月,  
函館

## 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臓器の標的細胞の中にまで届ける必要があり、効率的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が必須であり、標的臓器として肝臓や癌組織における DDS の活性や動態に大きな影響を及ぼす因子・パラメータを同定することで、革新的なナノ粒子創製と肝疾患治療やがん治療への応用を目指す。昨年度合成に成功した pH 応答性脂質 YSK を組み込んだ MEND (YSK-MEND) を用いて、肝臓における活性に影響を及ぼす因子を同定し、最適化された YSK-MEND により肝特異的 miRNA の制御やヒト C 型肝炎ウイルス治療に成功した。

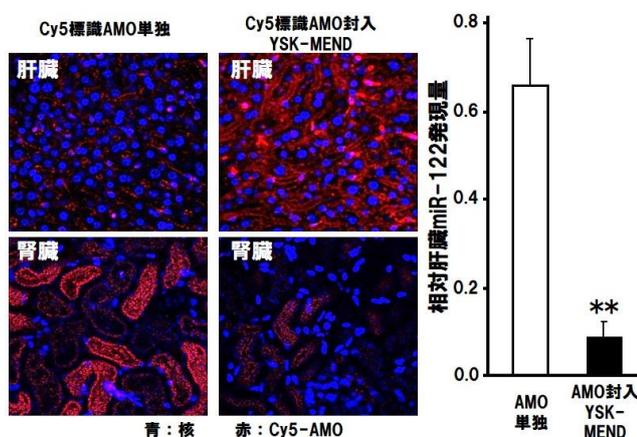
### 2. 研究の背景と目的

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、生命科学に不可欠なテクノロジーであるとともに、siRNA による疾患関連遺伝子の発現制御の治療への応用が期待されている。また、タンパク質をコードしない non-coding RNA の一つである microRNA(miRNA)は遺伝子の転写後発現調節に関与し多彩な生命現象を制御していることが明らかとなっている。この miRNA は一本鎖化学修飾型 RNA (anti-miRNA oligonucleotide:AMO) を用いることで制御可能であり、こちらも医薬への応用が期待されている。しかし、siRNA や AMO のような機能性核酸は負電荷の水溶性高分子で、そのままの形で生体に投与されても局所投与以外では、目的とする臓器の細胞の中には到達できない。従って、これら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への移行、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。本研究では、本学術領域において開発される優れたイメージング技術と組み合わせることが可能な核酸送達システムとして pH 応答性 YSK-MEND の開発を行い、肝臓や癌組織への送達において DDS が備えるべきパラメータを検討し、さらに肝疾患治療への応用を行った。

### 3. 成果

#### 1. anti-miRNA oligonucleotide (AMO) 搭載 pH 応答性 YSK-MEDN による肝臓への AMO 送達と機能評価

徳島大学南川典昭教授(公募班)らによって開発された 2'-OMe-4'-thio-RNA は標的 RNA 配列と高い親和性を示し、かつ生体内における安定性に優れた RNA である。この 2'-OMe-4'-thio-RNA を用いて、肝臓特異的 miR-122 に対する AMO122 を合成し、AMO122 を封入した YSK-MEND による肝臓への AMO 送達を試みた。従来 AMO はフリーの形で投与されているがほとんどが腎臓から排泄されるため、50 mg/kg という非常に高投与量で肝臓における miR-122 阻害効果が報告されている。一方、YSK-MEND へ AMO122 を封入することで効率的に肝臓へ送達することが可能となり(図左側)、1mg/kg という低投与量でも miR-122 発現量を低下させることが可能であり(図右側)、またそれに伴う血中コレステロール濃度の低下も観察され、肝疾患治療への応用の可能性が示された(Takahashi M, et al. *Nucleic Acids Res.* (2013), [Hatakeyama H, et al. \*J. Control. Release\* \(2014\)](#))。



#### 2. YSK-MEND による siRNA の肝臓への送達と C 型肝炎治療への応用

YSK-MEND の肝臓への送達効率に及ぼす MEND の物性の検討より、粒子径は 60~80 nm 程度、また脂質膜表面の pKa は 6.4 付近が最も肝臓の標的遺伝子のノックダウン効率に優れており、効率よく siRNA を送達可能であることが示唆された。上記検討により最適化された YSK-MEND の肝臓における 50% ノックダウン可能な投与量 ED50 は 0.06mg/kg であり、非常に低い投与量でノックダウンが可能であった。そこで、最適化された YSK-MEND を用い肝炎治療への応用を試みた。ウイルス性肝炎は、肝臓の線維化や肝硬変を経て高い確率で肝癌を発症する。そこで YSK-MEND にヒト C 型肝炎ウイルス(HCV)に対する siRNA (東京都臨床医学研究所 小原道法先生教授より供与)を搭載し、治療効果を検討した。ヒト肝臓キメラマウスに HCV を接種後、6 週間持続感染 HCV 肝炎モデルを作成し、HCV-siRNA 封入 YSK-MEND を尾静脈より投与したところ、肝臓における HCV コアタンパク質の消失が見られ、血清の HCV mRNA の2週間以上の持続的な抑制を観察し、肝炎治療効果が示された。以上より YSK-MEND はウイルス性肝炎治療への応用の可能性が示唆された(Watanabe T, [Hatakeyama H, et al. submitted](#))。また最適化 YSK-MEND は腎細胞癌皮下移植担癌モデルにおいて、標的遺伝子をノックダウンすることに成功した。今後は癌治療の応用に向けた YSK-MEND の開発を進め予定である。

## **Development of a pH-sensitive lipid based nanoparticle for nucleic acids delivery to liver and tumor**

Hiroto Hatakeyama

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Japan

Small interfering RNA (siRNA) and is thought to be a new class of medicines because this can inhibit the expression and function of any genes of interest. MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that influence diverse biological functions by regulating gene expression post-transcriptionally. The regulation of miRNA is also thought to be a potential mean to treat diseases. However, these functional nucleic acids show poor biodistribution due to their molecular weight and hydrophilicity and less function as it is. Therefore, drug delivery systems should be a key technology to realize nucleic acids therapy. We developed a lipid based nanoparticle, Multifunctional Envelope-type Nano Device (MEND) with pH-sensitive YSK lipid (YSK-MEND). Investigation of three-dimensional dynamics of MEND (Pharmacokinetics: PK) in target cells as well as target organs should identify rate-limited steps to deliver the cargo efficiently into target cells. The aim of this study is identification of the critical parameters which influence the dynamics and functions of YSK-MEND in intra cells and liver and tumor microenvironment and application of YSK-MEND for liver disease and tumor therapy.

The critical parameters of YSK-MEND for efficient knockdown in liver were identified. According to the information, optimized YSK-MEND was systemically administered into mice which resulted in efficient target-gene knockdown in liver (ED50: 0.06 mg siRNA/kg). Anti-miRNA oligonucleotide (AMO) composed of 2'-OMe-4'-thio-RNA developed by Prof. Minakawa (The University of Tokushima) shows high affinity with target sequence and stability in biological condition. AMO against liver specific miR-122 (AMO122) was encapsulated in optimized YSK-MEND. The YSK-MEND(AMO122) significantly inhibited miR-122 expression in liver and reduced plasma cholesterol level for 2 weeks after i.v. injection (Hatakeyama H, et al. *J. Control. Release* (2014), Takahashi M, et al. *Nucleic Acids Res.* (2013)).

We also applied optimized YSK-MEND for hepatitis C virus (HCV) treatment. siRNA against HCV developed by Prof. Kohara (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science) encapsulated YSK-MEND showed efficient knock down of HCV core protein in liver in HCV infected chimeric mice carrying human hepatocytes. Furthermore, the treatment of YSK-MEND showed long-term suppression of serum HCV mRNA level. These show the possibility of YSK-MEND for liver disease treatment (Watanabe T, Hatakeyama H, et al. submitted).

The optimized YSK-MEND also induced efficient gene knockdown in tumor in kidney cancer xenograft model. YSK-MEND could be applied for tumor treatment.

## 業績リスト

### 学術論文

1. Takahashi M, Yamada N, Hatakeyama H, Murata M, Sato Y, Minakawa N, Harashima H, Matsuda A. In vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* **41**,10659-10667 (2013)
2. Sakura Y, Hatakeyama H, Sato Y, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD modified liposomal-siRNA system. *J. Control. Release* **173**, 110-118 (2014)
3. Hatakeyama H, Murata M, Sato Y, Takahashi M, Minakawa N, Matsuda A, Harashima H. The systemic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice. *J. Control. Release* **173**, 43-50 (2014)
4. Tamaru M, Akita H, Kajimoto K, Sato Y, Hatakeyama H, Harashima H. An apolipoprotein E modified liposomal nanoparticle: Ligand dependent efficiency as a siRNA delivery carrier for mouse-derived brain endothelial cells. *Int. J. Pharm.* in press

### 総説・解説・成書

1. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. The Polyethyleneglycol Dilemma: Advantage and Disadvantage of PEGylation of Liposomes for Systemic Genes and Nucleic Acids Delivery to Tumors. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 892-899 (2013)

### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

該当なし

## 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細胞質内薬物モデルリリースを確認した。抗癌剤としてドキソルビシンをナノカプセルに封入し、細胞質内リリースによる制癌活性を *in vitro* 細胞実験で確認した。

### 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

これまで検討してきた polyamidoamine dendron と poly(L-lysine) からなるカチオン性高分子 (PAMAM dendron-PLL) が水/メタノール混合溶媒中で形成するポリマーベシクルの 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ナノカプセルについてキャリア特性を評価した。カチオン性蛍光色素 (Rhodamine 6G) を内相に封入した場合に、ナノカプセルのカチオン性架橋 PLL 膜との静電反発によりリリースが著しく抑制され、細胞内還元環境 (高グルタチオン濃度) でのナノカプセル不安定化を通したリリースが促されることが確認されてきた。そこで、制癌剤であるドクソルビシン (DOX) を用いて、ナノカプセルからのリリース特性の評価と細胞生存率評価を行った。

ジスルフィド結合安定化 (SS-linked) ナノカプセル、不可逆架橋安定化 (X-linked) ナノカプセル、free DOX の種々 pH 条件におけるリリースを透析法により評価した。Free DOX はただちに透析膜外にリリースされることが確認された。SS-linked, X-linked ナノカプセルはほぼ同様のリリース挙動を示し、いずれの pH においてもリリース速度は極めて遅いが、pH 7.4 の方が、pH 6.5, 6.0 に比べて若干早くリリースされることが確認された。この違いは、DOX のアミノ基の pKa が 7 付近であることに起因していると考えられ、pH 6.5, 6.0 では DOX のアミノ基がプロトン化しているため、ナノカプセル膜へ分配されにくくなるため、リリース速度がより遅くなったと考えられる。

DOX の効果として、HeLa 細胞の細胞生存率を MTT assay により評価した。種々 DOX 濃度のサンプルを 4 時間接触させた後、種々時間における IC<sub>50</sub> を決定した (Fig. 1)。X-linked ナノカプセルは、評価を行った DOX 濃度範囲でいずれの培養時間においても有意な細胞生存率の低下が観測されなかった。これに対し、SS-linked ナノカプセルは、6, 12 時間では X-linked ナノカプセルと同様であったが、24 時間では free DOX に比べて一桁高い IC<sub>50</sub> 値を決定された。これは細胞への取込量の違いによるものであると考えられる。また、free DOX に比べて遅れて細胞生存率の低下が観測されたことは、DOX が 8~24 時間の間に細胞質でナノカプセルからリリースされたことを示唆するものである。

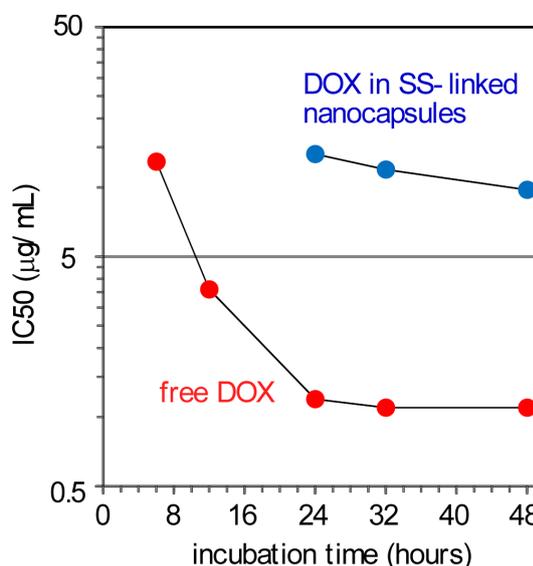


Fig. 1 Change in IC<sub>50</sub> values for free DOX and DOX in SS-linked nanocapsules.

## **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, thiol group was introduced to lysine residue in PLL tail, since thiol groups can form disulfide (SS) bond in response to reductive environment. Model compounds, rhodamine 6G and fluorescein, were loaded in to SS-linked nanocapsules, and the release property from the nanocapsules was evaluated by dialysis method. Interestingly, cationic rhodamine 6G was almost no release from the nanocapsules due to effective electrostatic barrier of SS-linked PLL membrane. Cationic rhodamine 6G could not distribute into the SS-linked PLL membrane, and it might be difficult to release to outer phase. From such property of the SS-linked nanocapsules, doxorubicin (DOX) was selected as drug for the evaluation using the cultured cells. The viability of HeLa cells treated by free DOX and DOX in SS-linked nanocapsules was evaluated by MTT assay at varying DOX concentration and incubation time. At relatively short incubation time, DOX in SS-linked nanocapsules did not show a decrease in the cell viability. However, when samples incubated with the cells for enough time period, DOX in SS-linked nanocapsules could exhibit comparable anticancer effect in the case of considering the cellular uptake amount of DOX. This suggests that SS-linked nanocapsules destabilized at cytoplasm and DOX was released from the nanocapsules.

業績リスト

学術論文

1. Atsushi Harada, Ryota Matsuki, Shin-ichi Ichimura, Eiji Yuba, Kenji Kono Intracellular Environment-Responsive Stabilization of Polymer Vesicles Formed from Head-Tail type Polycations Composed of Polyamidoamine Dendron and Poly(L-lysine) *Molecules* **18**, 12168-12179 (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「非侵襲治療のための酸化チタン内包高分子ミセル開発」大阪府立大学・大阪市立大学 新技術説明会, 2013年10月

## 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

生体内現象は、生体分子が高度に相互作用することにより調節、維持されており、その相互作用様式の解明は、生命現象を理解する上で極めて重要である。研究代表者は、自らが開発したケミカルデバイスを用いて、RNA 干渉機構における siRNA-RNAi 関連タンパク質の相互作用様式の解明に取り組み、siRNA センス鎖の 5'末端部におけるマイナーグループを介した相互作用様式を明らかにしてきた。今年度は、この一般性を評価するとともに、siRNA により誘起される自然免疫応答の要因となる toll-like receptor 3 (TLR3) との相互作用様式の解明を試みた。その結果、TLR3 は二本鎖 RNA の末端付近のマイナーグループと相互作用することにより自然免疫応答を誘導していることが示され、TLR3 と siRNA の相互作用様式の新たな知見を得ることに成功した。

#### 2. 研究の背景と目的

RNA 干渉 (RNAi) は、簡便、且つ強力に目的遺伝子のノックダウンを行えるため、様々な疾患の治療法として大きな期待が寄せられている。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 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応用に至ってはいない。これらの欠点の回避は、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必要不可欠である。

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プの立体障害として機能) を用いて siRNA

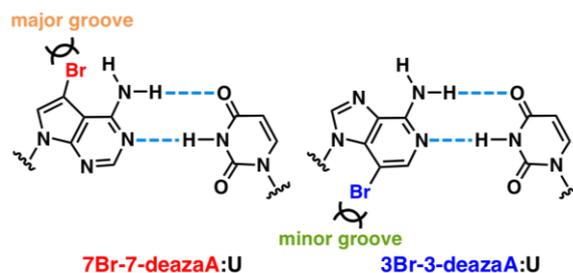


図1: ケミカルデバイス

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、1) オフターゲット効果の低減へ向け、RNA induced silencing complex (RISC) 蛋白質と siRNA との分子認識機構、2) 自然免疫応答の回避へ向け、TLR3 と siRNA との分子認識機構を明らかにする。

### 3. 成果

**(1) RISC と siRNA との分子認識機構**：細胞内に導入された siRNA はまず、5'末端のリン酸化を経て、Argonate2 (Ago2) を中心としたタンパク質群と RLC (RISC loading complex) を形成する。この RISC の形成過程は、siRNA 二本鎖のどちらの鎖を RISC に取り込むかを決定しており、オフターゲット効果の程度を左右する。研究代表者はこの RISC 形成の分子認識機構を明らかにするために、ケミカルデバイス (3-Br-3-deazaA 体 (3Br-deA) と 7-Br-7-deazaA 体 (7Br-deA)) を導入した各種 *Renilla luciferase* 標的 siRNA を合成し、Ago2 と siRNA のマイナーグループ側での相互作用の存在を明らかにしてきた (平成 24 年度)。

平成 25 年度は、この傾向の一般性を検証するため、用いる細胞種を NIH/3T3 細胞 (マウス由来) から HeLa 細胞 (ヒト由来) に変更して解析を行い、siRNA センス鎖 5'末端部でのマイナーグループを介した同様の相互作用を観察した (図 2)。さらに異なる遺伝子を標的とした siRNA を別途合成し、ケミカルツールの導入により得られる相互作用様式の知見は、異なる配列間においても一般性があることを確認した。

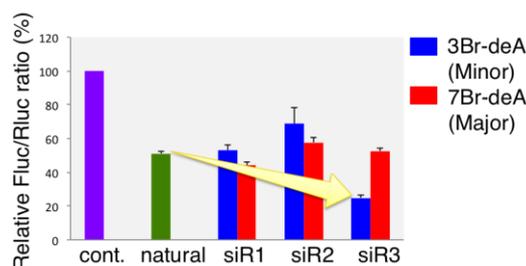


図2: siRNAの修飾様式とHeLa細胞におけるRNAi効果

**(2) TLR3 による siRNA の分子認識機構**：上述のように申請者が開発したケミカルツールが核酸-蛋白質間相互作用様式解明に有用であることが示された。そこで続いてこれを自然免疫応答誘導の要因である TLR3 による siRNA の分子認識機構解明に利用することにした。TLR3 強制発現 HEK293 細胞にケミカルデバイスを導入した各種 siRNA を導入し、誘導される自然免疫応答をアルカリフォスファターゼ (SEAP) アッセイにより評価した。その結果、センス鎖 5'末端部に 3Br を導入した siRNA (siR3-3Br-deA) で自然免疫応答が軽減されることが明らかとなった (図 3)。これにより TLR3 は二本鎖 RNA の末端付近のマイナーグループと相互作用することによって自然免疫応答を誘導していることが示され、TRL3 と siRNA の相互作用様式の新たな知見を得ることに成功した。

上述のようにケミカルデバイスを導入した siRNA は、その導入位置によって RNAi 効果と TLR3 を介した自然免疫応答に大きな変化が現

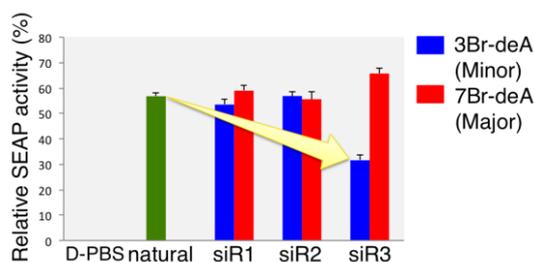


図3: TLR3を介した自然免疫応答の評価

れた。この実験結果により siRNA に導入したケミカルデバイスが二重らせん構造のメジャーグループあるいはマイナーグループの立体障害として機能し、核酸-蛋白質間の相互作用様式解明に極めて有用なツールであることが示された。

## 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 siRNAs and aptamers.

In my previous report, I described about the utility of the chemical device consisting of a set of 3-bromo-3-deazaadenine (3Br-deA) and 7-bromo-7-deazaadenine (7Br-deA) nucleosides (Figure 1), to elucidate molecular interaction between siRNA and RNA induced silencing complex (RISC) proteins. In this year, I confirmed the generality of previous insights about this interaction using different cells and sequence.

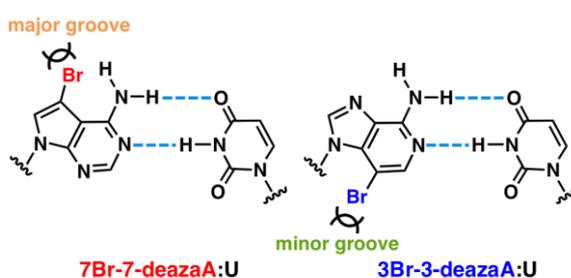


Figure 1; Structures of chemical device

With these successful results in hand, I also investigated molecular interaction between siRNA and toll-like receptor 3 (TLR3), which recognizes dsRNA and stimulates innate-immune response. I evaluated this response using the siRNA consisting of a set of chemical device and HEK293 cells forcibly expressing TLR3 by SEAP reporter assay. As a result, no alteration was observed when the chemical device was introduced into central position of sense strand and 5'-side of antisense strand (Figure 2, siR1 and siR2). On the other hand, drastic attenuation of SEAP response was observed when the 3Br-deA was introduced into the 5'-end of the sense strand (Figure 2, siR3). 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 TLR3 protein to reduce its innate-immune stimulation.

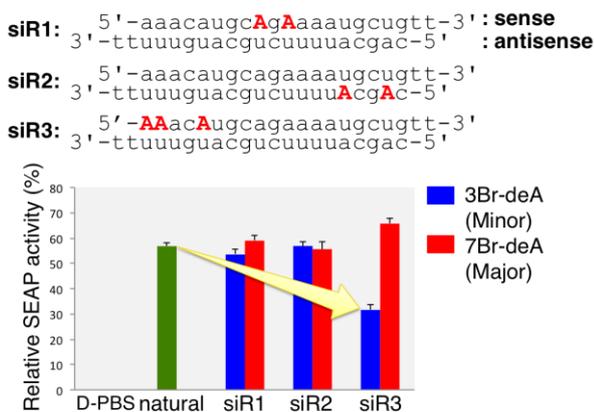


Figure 2; Sequence and innate-immune response induced by siRNA-TLR3 complex

## 公募

### 業績リスト

#### 学術論文

1. H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Sato, M. Takahashi, N. Minakawa, A. Matsuda, H. Harashima, The systematic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice. *J. Control. Release*, **2014**, *173*, 43–50.
2. M. Takahashi, N. Yamada, H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Seto, N. Minakawa, H. Harashima, A. Matsuda, In vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside-modified anti-microRNA oligonucleotides and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. *Nucleic Acids Res.*, **2013**, *41*, 10659–10667.

#### 総説・解説・成書

無

#### その他（報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など）

無

## 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

無機分子や合成分子と比較して、生体分子の際立った分子物性の違いに周辺環境依存性がある。酵素活性が、温度、pH、イオン、活量等に大きく依存するのはその典型である。そのため、細胞内の生体分子の物性を理解するためには、分子環境の考慮が必要である。そこで本研究では、①DNA が存在する細胞核内を化学模倣した実験系を構築した。②さらに本実験系を用いて、細胞核内で機能する酵素（テロメラーゼ）阻害剤の機能を予測できることを見出した。また、③全く新しい分子骨格をもつテロメア核酸プローブの開発もできた。このように、当初の研究計画を達成できた。

### 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。また、DNA が存在する細胞核内には、染色体が存在し、二重らせん構造を形成している DNA そのものが大量に存在している。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おらず、医薬品やプローブ等の機能分子が、細胞核内でも試験管内と同様の活性を示すことが可能かどうかは定かではない。そこで本研究では、細胞環境の化学模倣を試み、複雑な分子環境にある細胞質内や細胞核内で活性を示す機能分子を設計する指針を得ることを試みる。また、当初の目的に従い、細胞内で重要な役割を果たすことが知られている DNA 四重らせん構造を蛍光検出できる新たな分子プローブを開発することも試みる。

### 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。

本研究では、四重らせん構造に特異的に結合する化合物に着目し、(1) 細胞核内で特異的にテロメア DNA に結合するリガンドの開発、及び(2) DNA 四重らせん構造に結合して強く蛍光発光する化合物、の開発を進めた。課題(1)により、合目的なテロメラーゼ活性阻害剤の開発が可能になり、新規抗がん剤のリード化合物に繋がる。課題(2)は、細胞内外における DNA 四重らせん構造の検出やイメージングに繋がる。

## 公募

以下に、それぞれの課題について得られた成果を示す。

### (1) 細胞核内でも特異的にテロメア DNA に結合するリガンドの開発

細胞核内は、分子クラウディング状態で、ゲノム DNA も存在する。この環境を化学模倣し、様々な電荷や官能基、基本骨格をもつ低分子化合物と DNA 四重らせん構造の親和性を解析したところ、広い  $\pi$  平面をもち、負電荷をもつ化合物が特異的に DNA 四重らせん構造と結合することが見出された。一方、核酸構造リガンドとして、これまでの報告例のほとんどを占める正電荷をもつ化合物は、細胞核内模倣環境で、四重らせん構造と結合できないことが示された。

さらに興味深いことに、上述の正電荷をもつ化合物と負電荷をもつ化合物の細胞模倣環境下でのテロメラーゼ阻害効果は、がん細胞や正常細胞に対する増殖抑制効果と相関があった。すなわち、本研究で構築した化学模倣実験系は、細胞核内の機能分子の活性や副作用の予測に有用であることが示唆された (図 1)。



図 1. 本研究で構築した細胞核内模倣実験系

### (2) DNA 四重らせん構造に結合して強く蛍光発光する化合物の開発

DNA 四重らせん構造リガンドはがん診断マーカーとしても有用である。DNA 四重らせん構造リガンドは、ゲノムが形成する二重らせん構造には全く結合しないことが必要である。さらに、結合をシグナルに変換することも必要である。本研究では、四重らせん構造の新たな分子物性として、グアニン塩基の高い疎水性に着目した。四重らせん構造のグアニン四量体 (G-カルテット) と、その上下にあるループ領域は、芳香族塩基が集積し、高い疎水性を有している。このような疎水性ポケットに結合し、強く発光する物質に、タンパク質線維に対する蛍光プローブがある。

様々なタンパク質線維プローブと DNA 四重らせん構造の親和性を検討したところ、チオフラビン T

(ThT 図 2 上) が、DNA 四重らせん構造と結合することで蛍光発光を数百倍にも増強することが示された。さらに、二重らせん構造をはじめ、他の DNA が形成する構造では全く蛍光を発光しないことも示された。また、結合機構と結合に伴う発光機構を提唱できた (図 2 下)。

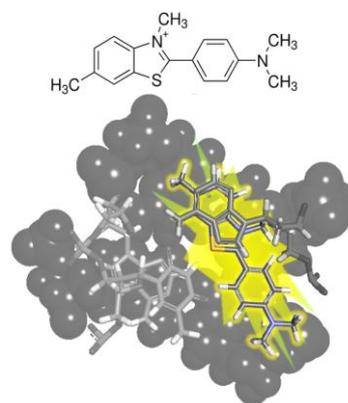


図 2. ThT (上) と G-カルテット (VDW モデル) に結合した ThT の模式図 (下)

## 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 eukaryotic chromosomes contain telomeres, which are composed of 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. Importantly, the G-quadruplex formation of telomere DNA protects from elongation by telomerase, which leads to immortalization of cells. In fact, most of cancer cells overexpress telomerase and have longer telomere regions, in comparison to normal somatic cells. Therefore, G-quadruplex ligands have been developed as anticancer reagents and as G-quadruplex probes. Here we focused on two projects: (1) Properties of the G-quadruplex ligands under cell mimicking conditions to obtain quantitative parameters which are useful for rational design of G-quadruplex ligands, functioning in living cell nucleus. (2) We further attempted to develop a new G-quadruplex ligand which can show bright fluorescence emission upon the complex formation with G-DNA G-quadruplexes even in the presence of excess double-stranded DNA molecules.

### **(1) Properties of the G-quadruplex ligands under cell mimicking conditions:**

G-quadruplex-binding and telomerase-inhibiting capacities of G-quadruplex ligands were examined under a cell nuclei-mimicking condition including excess double-stranded DNA ( $\lambda$ DNA) and molecular crowding cosolute (PEG 200). It was found that the cell nuclei-mimicking condition is effective to predict capacities of G-quadruplex ligands in the cell. In addition, the antiproliferative effect of an anionic copper phthalocyanine (Cu-APC) on normal cells was smaller than that on HeLa cells, indicating that the cell nuclei-mimicking condition is also useful to predict side effects of ligands.

### **(2) Development of a new G-quadruplex ligand with bright fluorescence signal:**

we investigated the binding mechanism of Thioflavin T (ThT) with the human telomere DNAs. Fluorescence titrations and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses demonstrated that each G-quadruplex unit cooperatively binds to several ThT molecules. ThT brightly fluoresces when a single ligand is bound to the G-quadruplex and is quenched as ligand binding stoichiometry increases. Both the light-up signal and the dissociation constants are exquisitely sensitive to the base sequence and to the G-quadruplex structure. These results are crucial for rational design of G-quadruplex ligands.

## 業績リスト

### 学術論文 (4 件)

1. H. Yaku, T. Murashima, H. Tateishi-Karimata S. Nakano, D. Miyoshi and N. Sugimoto Study on Effects of Molecular Crowding on G-quadruplex-ligand Binding and Ligand-mediated Telomerase Inhibition *Methods* **64**, 19-27 (2013).
2. Valerie Gabelica, Ryuichi Maeda, Takeshi Fujimoto, Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto, and Daisuke Miyoshi Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe Thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex *Biochemistry* **52**, 5620-5628 (2013).
3. Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Daisuke Miyoshi, and Naoki Sugimoto A Highly Sensitive Telomerase Activity Assay that Eliminates False-Negative Results Caused by PCR Inhibitors *Molecules* **18**, 11751-11767 (2013).
4. Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Daisuke Miyoshi, and Naoki Sugimoto In Vitro Assays Predicting of Telomerase Inhibitory Effect of G-Quadruplex Ligands in Cell Nuclei *J. Phys. Chem. B in press* (2014) DOI: 10.1021/jp410669t (Highlighted as the cover).

### 総説・解説・成書 (2 件)

1. Shu-ichi Nakano, Daisuke Miyoshi, and Naoki Sugimoto Effects of Molecular Crowding on the Structures, Interactions, and Functions of Nucleic Acids *Chem. Rev. in press* (2014).
2. グラフェンと生体分子を用いたバイオセンサー バイオサイエンスとインダストリー (B&I) (バイオインダストリー協会) *in press* (2014).

### その他 (報道、受賞、特許、主な招待講演、活動など)

#### 招待講演 (4 件)

1. 三好大輔 細胞模倣環境における DNA 四重らせん-リガンド相互作用 2 東京農工大学大学院生命工学専攻 講演会 (東京農工大学) (2013 年 4 月)
2. 三好大輔 DNA-グラフェン相互作用の定量解析による新規バイオセンシングプラットフォームの開発 BioJapan 2013 World Business Forum (パシフィコ横浜) (2013 年 10 月)
3. 三好大輔 細胞模倣環境における核酸の構造と安定性 第 7 回 NMMS セミナー (東京工業大学) (2014 年 1 月)
4. 三好大輔 細胞内外で機能する核酸分子の設計開発 日本生物工学会第 104 回醗酵学懇話会 (辰馬本家酒造株式会社) (2014 年 2 月)

他、本年度学会発表 14 件 (下記の領域内共同研究発表を含む)

#### 特許 (1 件)

1. 三好大輔 前田龍一 核酸鎖の四重螺旋構造の検出方法 特願 2013-199029 (2013)

#### 受賞など (2 件)

1. 三好大輔 一般財団法人バイオインダストリー協会 化学・生物素材研究開発奨励賞 (2013)
2. 丸山 厚、嶋田直彦、三好大輔、杉本直己「パラレル型 DNA 二重鎖形成に対するカチオン性くし型共重合体の効果」が第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (タワーホール船堀 (東京) 2013/11) に於いてハイライト講演に選出された

#### 活動 (4 件)

1. 三好大輔 東京農工大学での講演会でナノメディシンの紹介を行った (2013 年 4 月)
2. 三好大輔 兵庫県立舞子高等学校で行った模擬講義の際にナノメディシンの紹介を行った (2013 年 12 月)
3. 三好大輔 日本生物工学会第 104 回醗酵学懇話会でナノメディシンの紹介を行った (2014 年 2 月)
4. 第 11 回 NMMS セミナーを開催した (2014 年 3 月開催予定)

## 公募

### 領域内共同研究成果の発表 (4件)

1. 三好 大輔、丸山 厚、真野 美津紀、上田 侑美、前田 龍一、中野 修一、杉本 直己 RNA 四重らせん構造を特異的に安定化する細胞浸透圧調節分子 第7回バイオ関連化学シンポジウム 名古屋大学 2013/9
2. Daisuke Miyoshi, Atushi Maruyama, Yu-mi Ueda, Naohiko Shimada, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto Thermodynamics of non-canonical DNA structures in the presence of polylysine copolymers with hydrophilic graft chain The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry Kanagawa University 2013/11
3. 丸山 厚、嶋田直彦、三好大輔、杉本直己 パラレル型DNA二重鎖形成に対するカチオン性くし型共重合体の効果 第35回日本バイオマテリアル学会大会 タワーホール船堀 (東京) 2013/11 (ハイライト講演)
4. 三好大輔、上田侑美、丸山厚、嶋田直彦、杉本直己 生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(57)くし型のカチオン性共重合ポリマーによって誘起されるDNA構造スイッチ 第94回日本化学会春期年会 名古屋大学 2014/03 (予定)

### その他 (1件)

1. 2014年3月14日発刊の Journal of Physical Chemistry B (volume 118, issue 6) の表紙に研究成果が掲載された (予定)

