

浜地 格

京都大学大学院工学研究科・教授

動的応答特性を有するナノ構造体の構築と精密バイオ機能化

§1. 研究実施の概要

本研究では、(1) 細胞／組織バイオイメージングを目指したボトムアップ型ナノ構造体の創製、(2) トップダウンと連携した細胞固定・制御を目指したソフトマテリアルの開発を目標に研究を進めている。(1) に関しては、前年度、新しく見いだした ^{19}F -NMR/MRI のオフオンスイッチング原理、すなわち、特定の蛋白質が存在する場合にのみ、 ^{19}F -NMR がオン状態になる自己集合型のナノプローブに関して、その応答機構の解明に取り組んだ。具体的には、炭酸脱水酵素(CA)のターゲットとして、そのリガンドとフッ素部位とを繋ぐスペーサー構造を種々検討することにより、オフオン応答以外に、最初からオン状態のものや CA を添加してもシグナルが出ないオフオフ応答のものを作製し、それらの応答性がナノメートルサイズの自己集合会合体の安定性と密接な相関があることを見いだした。(2) に関しては、これまでに開発して来た超分子ヒドロゲルのナノファイバーとしてのユニークな特徴としてその流動性の高さを明らかにするとともに、両親媒性分子や蛋白質、ナノ粒子などの物質輸送のための超分子ナノレールとしての可能性を実証することに成功した (Nature Communications, 2010 に掲載)。これらは細胞固定化のためのソフトマテリアルとして優れた特性に結びつくこと期待される。さらに、前年度新しく見出した約 $50\ \mu\text{m}$ 径のコアシェル型のヒモ状の超分子集積体について、それを利用した超分子集積体のパターンニング、及びそれを鋳型とする組織構築を行った。具体的には、ヒモ状超分子集積体を基板状に配列化させたり、あるいは自己支持的に空中にブリッジさせる配列化させることに成功した。これらのハンドリング性は超分子材料を組織作製に応用する上で重要であると考えられる。さらに、コア内部の超分子集積体中に細胞、あるいは高分子材料を内包、あるいは合成、成長させることに成功し、ヒモ状の超分子集積体を組織形成のための足場として利用できることを示した。

§ 2. 研究実施体制

(1) 浜地グループ

- ① 研究分担グループ長: 浜地 格 (京都大学工学研究科、教授)
- ② 研究項目
細胞機能を評価可能なプローブ分子の開発
細胞内包を指向した刺激応答性超分子ヒドロゲルの開発と機能化

(2) 竹内グループ

- ① 研究分担グループ長: 竹内 昌治 (東京大学 生産技術、准教授)
- ② 研究項目細胞内包マイクロゲルの開発
超分子集合体のマイクロ加工

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

本研究では、(1) 細胞／組織バイオイメーシングを目指したボトムアップ型ナノ構造体の創製、(2) トップダウンと連携した細胞固定型ソフトマテリアルの開発を両輪として、(1) に関しては、浜地グループが主体的に研究を担い、(2) に関しては、浜地／池田のナノ材料を竹内グループの MEMS 技術および細胞操作手法と組み合わせることによって研究を効率的に進めている。

本年度は、特に(1) に関して、前年度に発見したこれまでにない新しい MRI シグナルスイッチング原理：ナノサイズの自己集合型ナノクラスターの蛋白質選択的な崩壊に伴う $^{19}\text{F-NMR}$ シグナルのスイッチングと $^{19}\text{F-MRI}$ の turn-on イメーシングのスイッチングメカニズムの詳細を解明する研究を進めた。具体的には、イメーシングプローブは、(i) 特定のタンパク質／酵素を認識できるリガンド部位、(ii) 自己組織化能を担う部位および(iii) F核を組み込んだ化合物からなる。炭酸脱水酵素 (CA) のターゲットとするリガンドを種々の異なるスペーサー構造でつないだ化合物を合成し、その $^{19}\text{F-NMR}$ の挙動と会合体形成の相関を検討した。その結果、オフオン応答以外に、最初からオン状態のものや CA を添加してもシグナルが出ないオフオフ応答のものが見いだされ、それらの応答性がナノメートルサイズの自己集合会合体の安定性と密接な相関があることが示された。すなわち、会合体形成能が低い場合は、最初からオン状態となり蛋白質添加でも変化が見られない。一方、会合体の安定性が高すぎる場合は、蛋白質を添加しても数百ナノメートルサイズの会合体が崩壊せず、CA を添加してもシグナルが出ないオフオフ応答であった。その中間のバランスをもったナノ会合体が、理想的なオフオン応答性プローブとなることを実証した。これらの結果は、今後種々の蛋白質を標的としたプローブの分子設計に有益な知見を与えるものと考えられる。

(2) に関しては、本年度は、細胞制御などに適用するために超分子ヒドロゲルが自己組織化的に形成するナノファイバーの特徴に関して、興味深い知見を得た。これまでに開発して来た超分子ヒドロゲル繊維に比較的高い流動性が保持されていることを、FRAP 実験（蛍光退色回復法）から明らかにし、この流動性ナノファイバー上で、電荷をもった両親媒性分子の局在の偏りを電場によって制御できること、またファイバー上に結合した蛋白質やナノ粒子が、ブラウン運動によってファイバー上を移動できることを顕微鏡観察で実時間観測し、一次元ブラウン運動が、ナノファイバーの流動性によって規定されることを初めて明らかとした (Nature Communications, 2010 に掲載)。これらは、種々の物質輸送のために超分子ナノレールとしてゲル繊維が利用できる可能性を示唆するものであり、細胞固定化と細胞制御のためのソフトマテリアルとして優れた特性に結びつくこと期待される。さらに、前年度新しく見出した約 50 μm 径のコアに超分子集積体を内包したコア-シェル型のヒモ状組織について、その長さおよびハンドリング性の評価、さらに異方的な超分子集積体を鋳型とする組織構築について検討した。本超分子集積体は、その周囲にシェルとしてアルギン酸カルシウムゲルを有するため、容易にピンセットなどで取り扱うことが可能である。そこで、サンプルをディッシュから取り上げ、長さ計測を行った。その結果、1 m 以上の長さを有することを明らかとした。また、共焦点顕微鏡を利用して、内部の超分子集積体を蛍光観察したところ、サブミクロン径のファイバーが 1 cm の距離で連続的な構造を有することを確認した。以上の結果より、本研究で得た超分子集積体はマクロに長い連続的な組織を形成しており、全長は長さ 1 m 以上の異方的な構造を有することが示唆された。さらに本ヒモ状組織の応用展開として、高い機械的強度を利用したパターンニングについて検討した。具体的には、得られたヒモ状の超分子集積体をガラス基板上へパターンニングする、流路中に保持することで複雑なパターンに配置する、あるいは自己支持的に空中にブリッジして配列化させるなどのハンドリング性を有し、任意の配置が可能であることを確認した。上述の結果は、これまで強度が弱く取り扱いの困難であった超分子材料において、容易に取り扱うことを可能とするものであり、応用展開を行う上で重要と考えられる。得られたヒモ状組織に機能を付与するため、その内部を利用した展開を行った。まず、コア内部の超分子集積体中に細胞を内包してヒモ状の構造を得ることに成功し、その生存を確認した。次に、ヒモ状の超分子集積体内部の疎水性空間を利用した導電性高分子の合成についても検討を行った。その結果、これまで取り扱いや配向化が困難であった導電性高分子を長距離で配向化し、かつハンドリングできる材料として単離することに成功した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- ① 発行済論文数(国内(和文) 0 件、国際(欧文) 3件):

② 未発行論文数(“accepted”、“in press”等)(国内(和文) 0 件、国際 (欧文)0 件)

● 論文詳細情報

1. Supramolecular hydrogel capsule showing prostate specific antigen-responsive function for sensing and targeting prostate cancer cell Masato Ikeda, Rika Ochi, Atsuhiko Wada, Itaru Hamachi, *Chemical Science*, 1,491-498 (2010) (DOI: 10.1039/c0sc00278j)
2. Disassembly-Driven Turn-On Fluorescent Nanoprobes for Selective Protein Detection, Keigo Mizusawa, Yoshiyuki Ishida, Yousuke Takaoka, Masayoshi Miyagawa, Shinya Tsukiji, Itaru Hamachi, *Journal of the American Chemical Society*, 132, 7291-7293 (2010) (DOI: 10.1021/ja101879g)
3. Fluidic Supramolecular Nano- and Microfibres as Molecular Rails for Regulated Movement of Nanosubstances, Shun-ichi Tamaru, Masato Ikeda, Yusuke Shimidzu, Shinji Matsumoto, Shoji Takeuchi, Itaru Hamachi, *Nature Communications*, 1, 20 doi: 10.1038/ncomms1018 (2010) (DOI: 10.1038/ncomms1018)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)