

「プロセスインテグレーションに向けた高機能ナノ構造体の創製」
平成 20 年度採択研究代表者

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／組織バイオイメーキ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目標に研究を進める。(1) に関しては、(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) 種々の官能基を組み込んだ化合物の効率的な合成ルートを確認した。その中で、炭酸脱水酵素のターゲットとするリガンドをトシルエステルでつないだ化学プローブがタンパク質表面に共有結合によってラベル化する興味深い機能を持つことを発見した。これを利用して ^{19}F 核種を官能基プローブとして炭酸脱水酵素に導入すると ^{19}F -NMR の化学シフトがリガンド結合に依存して変化することを見いだした。更に興味深いことに、このラベル化は赤血球細胞内に局在する炭酸脱水酵素に対して、およびマウス体内の赤血球でも可能であることを示すことができた。(2) に関しては、細胞制御などに適用するために超分子ヒドロゲルへの新たな機能性付与の検討を進め、無機多孔体であるMCMを組み込んだヒドロゲルドロップレットの創製に成功した。またロジックゲートタイプのマルチ刺激応答性リン酸型ヒドロゲルを新規に設計合成し、その開発の目処を得た。また、竹内グループで開発されたヒドロゲルカプセルの作成法を応用することで、リン酸型ヒドロゲルのカルシウム応答性を利用した超分子ヒドロゲルカプセルの開発に成功した。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

本研究では、(1) 細胞／組織バイオイメーキ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、今後の発展の手がかりとなる重要な知見が得られた。

特定のタンパク質を細胞や組織、個体などでイメージングするために、以下の3つの部品からなる化学プローブの合成ルートを確認し、その中の一つに関してタンパク質認識の選択性を調べた。即ちプローブは、(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)種々の官能基を組み込んだ化合物からなる。その中で、炭酸脱水酵素のターゲットとするリガンドをトシルエステルでつないだ化学プローブがタンパク質表面に共有結合によってラベル化する興味深い機能を持つことを発見した¹⁾。これを利用すると、蛍光プローブや¹⁹F核種を官能基プローブとして炭酸脱水酵素に導入することが可能であった。また精製タンパク質を用いた実験で、¹⁹F-NMRの化学シフトがリガンド結合に依存して変化することを見いだした。次に、この共有結合ラベル化が、赤血球細胞内に局在する炭酸脱水酵素に対して、可能かどうかを確認した。このために赤血球内で反応を行い、それを破砕にしてゲル電気泳動で分析する方法と、赤血球をそのまま¹⁹F-NMRで解析する二つの手法を用いた。いずれの結果も、赤血球細胞内でラベル化が良好に進行していることを示した。さらに、興味深いことに、このラベル化反応がマウス体内の赤血球でも可能であることを、ゲル電気泳動分析で示すことができた。今後、このプローブの特性およびこの戦略の一般性を検証する実験へと進む予定である。

(2)に関しては、細胞制御などに適用するために超分子ヒドロゲルへの新たな機能性付与の検討を進めた。具体的には、無機多孔体であるMCMを超分子ヒドロゲルドロップレットに組み込み、そのアニオン交換特性と超分子ファイバーの疎水性化合物取り込み機能を組み合わせることによって、酸性化多糖などの生理活性ポリアニオン種のセンシングが可能なMCM/酵素/超分子ゲルハイブリッドの創製に成功した²⁾。この知見は、MCMが超分子ゲル中で基質担持のためのナノドメインとして機能することを示すものであり、今後の細胞固定化などに応用できると期待される。また、浜地グループで開発したカルシウム濃度依存型超分子ゲル(リン酸型ヒドロゲル)を利用して、これまで竹内グループで開発している3次元マイクロ流路(AFFD: Axisymmetric Flow-Focusing Device)中で、均一径のカプセル構造を形成する検討を開始した。得られたヒドロゲルカプセルは刺激応答性カプセルとして細胞内包など今後の展開が期待される。さらにこれらの超分子ゲルと、アルギン酸ゲルやアガロースゲルなどの既存の高分子ゲルとを混在させた環境でカプセル化することも可能であることが分かってきた。比較的強度の高い超分子ゲルや、生体材料との共存に適したゲル構造体を創出できる可能性が見えてきた。

3. 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、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、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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo Shinya Tsukiji, Masayoshi Miyagawa, Yousuke Takaoka, Tomonori Tamura, and Itaru Hamachi *Nature Chemical Biology*, 2009, in press.
2. MCM-Enzyme-Supramolecular Hydrogel Hybrid as a Fluorescence Sensing Material for Poly-anions of Biological Significance Atsuhiko Wada, Shun-ichi Tamaru, Masato Ikeda, Itaru Hamachi *Journal of the American Chemical Society*, 2009 in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)