

「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出」  
平成 20 年度採択研究代表者

平成 21 年度 実績報告
------------------

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jing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、前年度までに得られた特定の蛋白質を試験管や細胞、個体で選択的にケミカルラベリングできる化合物の知見(Nature Chemical Biology, 2009 に掲載)を基にして、特定の蛋白質が存在する場合にのみ、 $^{19}\text{F}$ -NMR がオン状態になる自己集合型のナノプローブの開発に成功した。具体的には、炭酸脱水酵素(CA)のターゲットとするリガンドをトシルアミドでつないだ化学プローブは水中で数百ナノメートルサイズの球状自己組織体を形成し、このために  $^{19}\text{F}$ -NMR がオフであるが、CA が共存するとリガンド部分が CA と結合することによって、これが崩壊しシグナルがオンとなるというこれまでに知られていない新原理であることを明らかとした。更に興味深いことに、このオフオンスイッチングは赤血球細胞内に局在する炭酸脱水酵素に対しても可能であり、 $^{19}\text{F}$ -MRI として細胞レベルでの CA のイメーjingにも応用できることを実証した(Nature Chemistry, 2009 に掲載)。(2)に関しては、ロジックゲートタイプのマルチ刺激応答性ゲル化剤の開発に成功し、DDS マトリックスとしての応用を検討した。複数の刺激に対する論理応答物質放出が達成され、特異的な環境に応答した薬物放出システムにつながると期待される(JACS, 2009 に掲載)。さらにヒドロゲルの刺激応答性と強度を追求し、マイクロ光加工が可能かつ温和な刺激で融けるヒドロゲルを創製した。このゲルをテンプレートに細胞内包ゲルをマイクロスケールで自在に加工するめどを付けた。さらに、ヒドロゲルのマイクロ加工として、マイクロゲルファイバーの作成に着手した。実際に作成したゲルファイバーは、コア層およびシェル層の二層構造を有するヘテロなゲルファイバーである。これにより、異種材料よりなるヒモ状の構造体を得るための基礎技術を確立した。実際に、シェル層に高強度を有するポリマーヒドロゲルを用い、コア層に超分子ナノ繊維

を安定に内包することに成功した。興味深いことに超分子ナノ繊維の集積構造を詳細に検討したところ、サブミクロン径の超分子ナノ繊維がマイクロゲルファイバー長軸方向に配列成長していることが確認された。したがって、層流中における超分子構造の配向成長が確認された。さらに、配向した超分子ナノ繊維内では分子流動特性を有することが確認された。

## § 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、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

## § 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、前年度に手がかりとして得られていた蛋白質選択的な化学ラベリングを基にして、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 シグナルのオフオンスイッチングと  $^{19}\text{F}$ -MRI イメージングへの適用というこれまでにない新しい MRI シグナルスイッチング原理の発見に成功した<sup>1)</sup>。具体的には、イメージングプローブは、(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)種々の官能基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トシルアミドでつないだ化合物は、水中で数百ナノメートルサイズの会合体を形成すること、またこれが CA 共存下では崩壊し1:1の酵素プローブ複合体となることを、AFM、DLS、濁度測定、 $^{19}\text{F}$ -NMR などから明らかとした。この現象は、精製タンパク質だけでなく、血清中、さらには赤血球細胞内に局在する炭酸脱水酵素に対しても可能であり、 $^{19}\text{F}$ -MRI イメージングへも適用できることを確認した。さらに興味深

いことに、リガンド部位を変換することにより、スイッチングオンを引き起こすタンパク質が代わること、すなわちリガンドを選べば特定タンパク質を標的としたイメージングが可能となる可能性を、試験管レベルの実験で実証した。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、親水部にリン酸基を導入することで、多様な刺激 (pH,  $\text{Ca}^{2+}$  イオン, 光, 温度, 濃度) に応答してゲル-ゾル転移を起こすことを明らかにした。面白いことに、酸性かつ  $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下で作成したゲルは、塩基と EDTA の二つの刺激が両方存在するときのみゾル化することを見出した。これは AND 応答と定義できる。さらに、初期状態と刺激を選ぶことで、合計4個の論理応答(AND, OR, NAND, NOR)が実現できた<sup>2)</sup>。特異的な環境に応答する能動的薬物放出システムの開発・応用に発展できると期待される。また、ヒドロゲルのマイクロ加工として、マイクロゲルファイバーの作成に着手した。作成したマイクロゲルファイバーは、直径 100  $\mu\text{m}$  程度のコア層およびシェル層の二層構造を有するヒモ状構造体である。このマイクロゲルファイバーのシェル層にアルギン酸-Ca ゲルを利用し、ピンセットで操作できる十分な強度を有することを確認した。また、そのコア層にリン酸ゲル化剤-Ca ゲルからなる超分子ナノ繊維を安定に内包することに成功した。興味深いことに、コア層に内包された超分子ナノ繊維が高度に配向していることを見出した。従って、マイクロ流路を利用することで、特異な高次構造を有するゲル構造体を創出できることを示すことができた。さらに配向した超分子ナノ繊維は、流動性を有する構造体を形成していることが分かった。上述のマイクロファイバーは水中での作成・ハンドリングが可能であり、水を媒体としたグリーンな機能性材料プロセス開発および生体材料との共存に適した構造体構築の可能性が見えてきた。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ・論文詳細情報

1. Self-assembling nano-probes displaying off/on  $^{19}\text{F}$  NMR signals for protein detection and imaging. Yousuke Takaoka, Takashi Sakamoto, Shinya Tsukiji, Michiko Narazaki, Tetsuya Matsuda, Hidehito Tochio, Masahiro Shirakawa, Itaru Hamachi, *Nature Chemistry*, **1**, 557-561 (2009) DOI: 10.1038/NCHEM.365
2. Supramolecular Hydrogel Exhibiting Four Basic Logic Gate Functions To Fine-Tune Substance Release. Harunobu Komatsu, Shinji Matsumoto, Shun-ichi Tamaru, Kenji Kaneko, Masato Ikeda, Itaru Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5580-5585 (2009) DOI: 10.1021/ja8098239

3. Quenched Ligand-Directed Tosylate Reagents for One-Step Construction of Turn-On Fluorescent Biosensors. Shinya Tsukiji, Hangxiang Wang, Masayoshi Miyagawa, Tomonori Tamura, Yousuke Takaoka, Itaru Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9046–9054 (2009) DOI: 10.1021/ja902486c
4. Three-Dimensional Axisymmetric Flow-Focusing Device using Stereolithography. Yuya Morimoto, Wei-heong Tan, Shoji Takeuchi, *Biomed. Microdevices*, **11**, 369–377 (2009). doi:10.1007/s10544-008-9243-y

**(4-2) 知財出願**

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)