

「ナノシステムと機能創発」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成23年度終了研究課題－

研究総括 長田 義仁

1. 研究領域の概要

本研究領域は、ナノテクノロジーにおけるトップダウン手法の技術の高度化、精密なボトムアップ手法の駆使、あるいはそれらの手法の融合によって、要素の単なる総和や重ね合わせではない自律的、非線形的に新たな機能を生み出す(“創発する”)研究を推進し、次世代ナノシステムの構築を目指します。

具体的には、生命科学、物質科学、精密工学、電子工学、医用工学、知能情報工学などの様々な分野における、自律的機能創発のしくみの解析・解明、あるいは機能を創発するシステムのナノレベルでの設計・創製等、独創的・挑戦的な研究を対象とします。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「ナノシステムと機能創発」領域に設けた選考委員 12 名(領域発足時の領域アドバイザー)の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考は、「研究総括の募集・選考・研究領域運営にあたっての方針」に基づいて実施する。即ち、自律的機能創発のしくみの解析・解明ならびに機能創発の実現を目指したシステムのナノレベルでの設計・創製等を研究し、既存の学問領域や手法を統合・融合し独自の発想にもとづいた挑戦的な提案を求める。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考での評価および総合選考により、採用候補者を選定した。

選 考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	105 件	22 件	10 件

※採択数 10 件の内、2 件は 5 年型

備考:

- 1) 平成 20 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価を実施しない。
 - ・山内 悠輔 研究者、横川 隆司 研究者
研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。
 - ・田川 美穂 研究者、松村 幸子 研究者
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。
 - ・梅津 光央 研究者、藪 浩 研究者
東日本大震災の被災に伴う研究期間の延長措置により、今年度中に研究を終了しないため。

5. 研究実施期間

平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

6. 領域の活動状況

1) 領域会議: 7 回

平成 21 年 2 月の第 1 回領域会議から、平成 24 年 3 月の第 7 回領域会議まで、合計 7 回の領域会議を開催した。口頭とポスターによる研究者の発表が中心であるが、各回とも各研究者と総括・アドバイザーとの熱心な討論が行われ、深い研究交流が実現された。

なお、領域会議の直前(直後)に、さきがけ研究者の研究室・施設を見学して討論と研究交流を行うという本

領域独自の「研究室見学会」を5回実施し、多くの研究者とアドバイザーが参加した。

2) 研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問

・サイトビジット

長田研究総括とともに本部担当、技術参事、事務参事がさがけ研究者一期生の全研究室を訪問した。

各々の上司の先生にさがけ研究へのご理解をお願いするとともに、研究施設等を見学し、さがけ研究者から研究内容や抱負・希望等を聞き話し合った。研究者と研究総括との直接的ディスカッションは相互のコミュニケーションを良くしたほか、その後の研究展開に極めて有益であった。

・研究者訪問(技術参事)

技術参事が単独で一期生10名を訪問し、さがけに対する要望、研究推進上の様々な問題点などを聞いてその後のさがけ研究支援に活かした。

3) 研究報告会(公開):1回

・平成23年12月、学術総合センターで開催

・本年度終了一期生(3年型)6名のさがけ研究終了報告と5年型研究者2名の間接報告が実施された。

外部の方々からの質問も多く出て研究交流としても有効であった。

4) 公開シンポジウム:1回

・タイトル「次世代の物質科学・ナノサイエンスを探る」

・平成24年1月、北海道大学構内遠友学舎で実施

7. 評価の手続き

平成24年3月終了研究者4名(別紙一覧表)のさがけ研究に対する評価は、研究者の作成した終了報告書を基に、合計7回の領域会議での口頭及びポスター発表(進捗報告)と討議内容、領域アドバイザーの意見、外部発表、及び、平成23年12月の「一期生研究成果報告会」での発表などを参考にして研究総括が総合評価を行った。

(評価の流れ)

平成20年10月(研究開始)～平成24年3月(研究期間終了)

平成23年12月 研究報告会実施

平成24年2月 研究報告書提出(研究者より)

平成24年3月 研究総括による評価

8. 評価項目

- (1) 提案された研究課題の進展度と研究目標の達成度
- (2) 研究展開の独創性、適切性と妥当性
- (3) 得られた新しい知見や理論
- (4) 今後の発展性と社会的意義、科学への貢献(インパクト)
- (5) さがけ研究としての意義
- (6) その他(論文、特許、受賞など)

9. 研究結果

本研究領域では、ナノテクノロジーにおけるトップダウン手法とボトムアップ手法の駆使、あるいはそれらの融合によって新しい機能を創発する研究を対象とし、次世代ナノシステム構築を目指す幅広い研究課題が採択されている。この間の領域会議を始め様々な機会を通じて、多様な専門分野の研究者同士、ならびに、総括・アドバイザーとの活発な議論がなされ協同した研究も進み各課題で多くの斬新な成果が得られている。

以下に、第一期(3年型)研究者4名が行った研究の狙い、結果及び評価を個別に記述する。

○岩堀 健治 研究者

「温度制御自己組織化システムの設計とナノ粒子高次構造による機能発現」

本研究の目的は、フェリチンタンパク質に温度応答性のDNAタグを非対称に付加し、DNA-DNA hybridizationの温度制御によってナノ粒子三次元積層構造を自動的に作製する技術を開発して応用に結び付けることである。

研究の結果、フェリチンタンパク質に 目的 DNA を非対称修飾する技術を確認し、種々のナノ粒子を持つ

DNA 修飾フェリチンの作製が可能となり目標をほぼ達成した。さらに、蛍光発光ナノ粒子や世界初となる CPL 発光ナノ粒子、近赤外発光ナノ粒子の作製などにも成功し高く評価される。これらの研究成果により、タンパク質-ナノ粒子と光化学の融合というあたらしい研究分野への発展が期待される。

本研究を今後さらに発展させ、様々なナノ粒子を積層して多層構造メモリや太陽電池モジュールなどを構築して新機能ナノ電子デバイスの創出が期待される。

○角五 彰 研究者

「階層構造を有する ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製」

本研究の目的は、生体分子モーターを能動的に集積することで自律的に機能創発する ATP 駆動型ソフトバイオマシンを創製することである。研究の結果、生体分子モーターが能動的自己組織化される際に微小管集合体の構造を決定する因子が明らかになり、運動速度の検討から微小管集合体が単一極性を有するという知見を見出した。また、微小管集合体のうちリング状集合体を中心に検討し、フィラメント構造と回転運動方向の相関を見出し、秩序構造形成における非対称環境場の重要性を示した。さらに、嫌気チャンバーの利用により生体分子モーターの耐用時間を大幅に延長することにも成功した。本研究の発展により、自己組織化と非対称環境を組み合わせることで生体分子モーター集合体にセンチメートルオーダーの構造秩序を付与することが可能となり、未だ実現されていない高効率・高機能の ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製が近い将来実現されることが期待される。

○佐々木 善浩 研究者

「三次元人工細胞アレイからなる化学チップの創成」

本研究の目的は、人工細胞(リポソーム)をボトムアッププロセスにより三次元的に自己集積したバイオチップ(マイクロ化学チップ)を開発し、プロテオーム創薬やテーラーメイド医療への応用に向けた次世代ナノシステムを具現化することである。研究により、オリゴヌクレオチドの相補的塩基対形成を利用して三次元的に集積したリポソームの組織化が実現できることが明らかになった。リポソームの連結手法については、脂質膜の融合や膜タンパク質の組み込みなどによる方法は煩雑で制御困難であったため、新たに外部場(電場、磁場、重力場)により脂質ナノチューブを形成制御する方法を採用して脂質チューブが作製できることを示した。(本方法は技術的には未熟であるが、有機的に集積されたリポソームによるデバイス作製には適すと考えられる)

なお、本研究バイオチップを用いることでホルモン・成長因子などの伝搬を可能にし、生体での細胞間コミュニケーション等を解明することも目指していた。残されたこの課題を今後引き続き検討し科学的な知見を得ることが求められる。

○山越 葉子 研究者

「超分子型フラーレンを用いた in vivo イメージング試薬の開発」

本研究の目的は、疾患特異的に発現しているタンパク質をターゲットとした新規 in vivo イメージング剤を開発することであり、MRI 造影活性の向上、ならびに、包接化合物による内包・解離によって造影活性の On / Off をコントロールすることを目指している。研究では、二種類の MR イメージング用コントラスト試薬 (MRI-CA)、すなわち、1) 疾患部位に高い親和性を持つナノパーティクル型 MRI-CA、および、2) 疾患部位で過剰発現するタンパク質をターゲットとした MRI-CA の開発を試みた。1) の研究では試薬の合成、調製、最適化が達成でき、疾患モデルマウスの確立と in vivo MR イメージング法の確立という貴重な成果が得られ、臨床への応用も期待される。2) の研究は挑戦的課題であり試薬合成が困難で目標には達していないが、新規な分子設計など化学的に興味深い点が数々ある。

本研究をさらに進めることによって、疾患の原因或いは悪化のメカニズム研究に欠かせない試薬の創製が期待でき、目的の分子合成およびモデル動物を用いた in vivo 実験へと進めることが望まれる。

10. 評価者

研究総括 長田 義仁 (独)理化学研究所・基幹研究所 グループディレクター

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 24 年 3 月末現在)

新井 史人 名古屋大学大学院工学研究科 教授

生田 幸士 東京大学大学院情報理工学系研究科 教授

居城 邦治*1 北海道大学 電子科学研究所 教授

今堀 博	京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授
宇佐美 光雄	(株)R&V 代表取締役社長
江刺 正喜	東北大学原子分子材料科学高等研究機構 教授
須賀 唯知	東京大学大学院工学系研究科 教授
染谷 隆夫	東京大学大学院工学系研究科 教授
田口 善弘	中央大学理工学部 教授
中西 八郎	東北大学本部事務機構 監事(名誉教授)
原 正彦	東京工業大学大学院総合理工学研究科 教授
原田 慶恵	京都大学物質-細胞統合システム拠点 教授
三谷 忠興*1	JST イノベーションプラザ石川 館長
山下 一郎	奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 客員教授
渡辺 順次*1	東京工業大学大学院理工学研究科 教授

*1 平成 22 年3月～参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	1	25	26
口 頭	80	22	102
その他	13	20	33
合 計	94	67	161

※平成 24 年 2 月現在

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
4	0	4

(3)受賞等

- ・佐々木 善浩
第 19 回インテリジェント材料／システムシンポジウム 第 19 回高木賞 (H22.03.03)
- ・山越 葉子
American Heart Association 学会 Research Excellence Award 賞 (H23.03.23)

(4)招待講演

国際 9 件
国内 6 件

別紙

「ナノシステムと機能創発」領域 終了評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成24年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
岩堀 健治 (専任)	温度制御自己組織化システムの設計 とナノ粒子高次構造による機能発現 (奈良先端科学技術大学院大学)	JST さきがけ研究者 (奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 研究員)	37
角五 彰 (兼任)	階層構造を有するATP駆動型ソフトバ イオマシンの創製 (北海道大学)	北海道大学大学院理学研究院 准教授 (北海道大学大学院理学研究院 助教)	42
佐々木 善浩 (兼任)	三次元人工細胞アレイからなる化学チ ップの創成 (東京医科歯科大学)	東京医科歯科大学 生体材料工学 研究所 准教授 (東京医科歯科大学 生体材料工 学研究所 准教授)	40
山越 葉子 (兼任)	超分子型フラーレンを用いたin vivoイ メージング試薬の開発 (スイス連邦工科大学 ETH Zurich)	スイス連邦工科大学(ETH Zurich), Lecturer/Senior Scientist (ペンシルベニア大学医学部助教)	39

研究報告書

「温度制御自己組織化システムの設計とナノ粒子高次構造による機能発現」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：岩堀 健治

1. 研究のねらい

ナノ粒子はナノテクノロジーの基本的コンポーネントとして、電子デバイスを始め、光機能素子、触媒、環境、化学、化粧品、薬品、医療等、様々な分野で積極的な研究が行われている。ナノ粒子はバルク体に比べ比表面積が大きく、触媒活性や反応性が飛躍的に高いという理由からバルク体とは全く異なった興味深い現象（蛍光発光、トンネル効果、量子効果、触媒活性の増大等）を引き起こすため多くのナノ粒子が作製され、その機能開発に凌ぎが削られている。さらに、ナノ粒子は規則的に並べて精密な高次構造を作製したり、あるいは精密に配置する事で、蛍光増強作用やラマン増強作用といった今までにはない優れた機能を発揮し、様々な材料やデバイス創成への展開と新機能発現が期待される。

ナノ粒子の二次元、三次元構造の構築は、トップダウン技術を中心にナノエッチング、静電噴霧法、インクジェットナノプリンティング、収束電子ビーム、リソグラフィー、EB等を用いて、基板上にパターンを作製した後 DNA やポリマーを仲介にナノ粒子配列を作製したり、直接ナノ粒子を配置する方法がよく研究されている。一方、生体超分子のウイルスやタンパク質等のバイオテンプレートを用いた配列制御法も数少ないが報告されている。シリコン基板上へバクテリオファージの自己集合能を利用した半導体・磁性ナノ粒子の二次元、三次元構造化の研究も進められているが完全配列化が難しく、ナノ粒子集合体としてナノ配線及びリチウムイオン電池のパーツとして利用するにとどまっている。また、Bio Layer by Layer (Bio-LBL) 法によってポリマー上にナノ粒子を積み上げる方法もある。しかし、これらのどの方法にも一長一短あり、現在の技術では多大な手間と時間を要し、高価な設備が必要であり、ナノ粒子の精密高次構造とナノ配置を簡単に実現するのは難しい。

本研究の目的は、耐熱性があり直径 7 nm の内部空洞内に多種多様な 20 種類以上のナノ粒子を作製する事が可能なフェリチンタンパク質-ナノ粒子複合体に、温度応答付与を目的としてデザインされた DNA の非対称修飾を実現することにより、溶液の温度変化のみで簡単に自動でナノ粒子の高次構造構築とナノ粒子配置コントロールが可能となる、ナノ粒子ハンドリングシステムの構築である。この技術により様々なナノ粒子の高次構造が可能となり、デバイス作製に応用する事で今までのものを凌駕する新機能ナノ電子デバイスの創出が期待される。

2. 研究成果

本研究は下記の研究ステップにおける課題を達成することにより研究を推進し、作製した温度応答性を持つ DNA 非対称修飾フェリチンを用いる事で最終的に温度応答自己組織化によるナノ粒子の積層構造構築を試みた。

- (1) フェリチンタンパク質への DNA 非対称修飾法の確立
- (2) DNA 修飾フェリチン機能化のためのナノ粒子ライブラリー作製
- (3) 温度応答性 DNA タグのデザインと温度応答性フェリチンタンパク質の作製
- (4) 温度制御自己組織化によるナノ粒子三次元構造作製

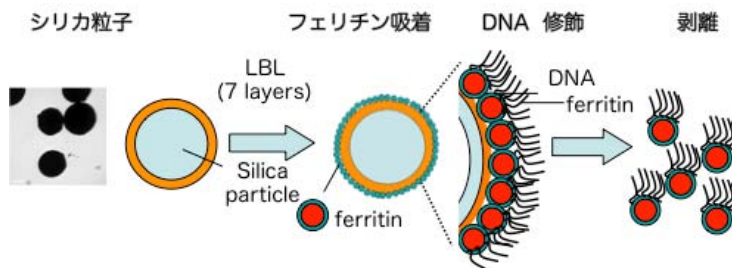


図1 DNA 非対称修飾フェリチン作製法（シリカビーズ法）

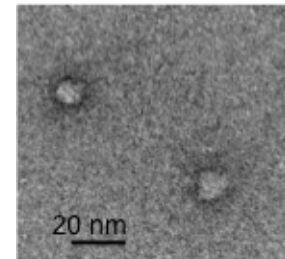


図2 DNA 非対称修飾フェリチン TEM 像

(1) フェリチンタンパク質への DNA 非対称修飾法の確立

フェリチンタンパク質を三次元に積層化するためにはフェリチンタンパク質外表面に異方性表面を作製することが必要であった。そこで、まず異なる温度で応答する 2 種類の DNA をフェリチン表面に非対称修飾するための方法の確立を行った。フェリチンタンパク質に温度応答性を持たせるためにマレイミド基を持つ DNA 鎖をデザインした(1)。次に、フェリチン外表面には通常 SH 基は存在していないため、遺伝子工学技術によりシステイン残基を 1 フェリチン分子あたり 24 個導入した遺伝子変異フェリチン（SH- フェリチン）を作製した(2)。(1)と(2)を反応溶液中 55℃で混合し、DNA のマレイミド基と SH 基を反応させることで簡単にフェリチンへの DNA 修飾ができた。さらに、表面に LBL 膜を持つ直径 5 μm のシリカ微粒子上でこの DNA 修飾反応を行う事で、フェリチン同士の立体障害を利用してフェリチンの片面のみに DNA を非対称修飾するシリカビーズ法を開発した。この方法により最終的に大量の DNA 修飾フェリチンを得ることができる DNA 非対称修飾法の確立に成功した(図 1)。作製した DNA 非対称修飾フェリチンは TEM 観察によって平均直径が 14 nm と DNA 非修飾フェリチンよりも約 2 nm 大きくなり SDS-PAGE 等により DNA の修飾も確認できている (図 2)。

(2) DNA 修飾フェリチン機能化のためのナノ粒子ライブラリー作製

DNA 修飾フェリチンに機能性を付与するために、フェリチン空洞内に種々のナノ粒子を作製し、フェリチンのナノ粒子ライブラリー作製を行った。当初の計画ではフェリチンに DNA 修飾をした後バイオミネラリゼーションによりフェリチン内部に多くのナノ

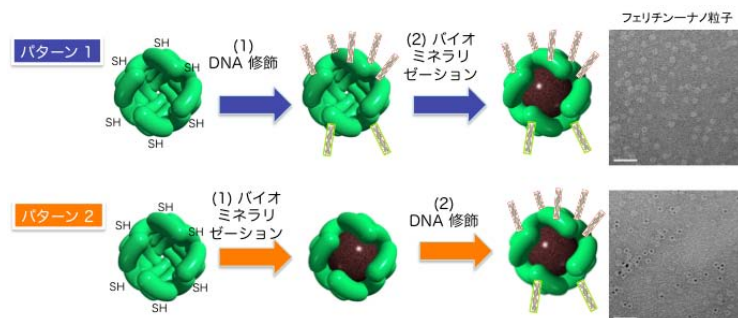


図3 フェリチンナノ粒子ライブラリー作製方法

粒子を作製する予定だったが(図3 パターン1)、表面に結合した DNA がフェリチンの表面電荷に影響を与え、ナノ粒子形成が阻害されるという知見が得られたため、方針を転換してバイオミネラリゼーション後、DNA の修飾を行いフェリチン内部にナノ粒子を作製することに成功した(図3 パターン2)。

既に作製されているナノ粒子の条件を参考に、フェリチン内部にナノ粒子を作製する最適条件を再検討し形成率を上昇させた。また、太陽電池やバイオマーカー等にも重要であると考えられる新規の蛍光及び近赤外蛍光発光ナノ粒子は詳細な条件検討を行う事で最適条件を決定し作製に成功した。その結果 Fe, Co 等の金属ナノ粒子や可視域及び近赤外域に蛍光発光する化合物半導体ナノ粒子である CdS, CuS, ZnS 等の計 6 種類以上のナノ粒子をフェリチン内部に作製することに成功した(図4)。CdS ナノ粒子を内部に保持する CdS-フェリチンは直径 7.1 nm で外側にタンパク質殻を保持しているにもかかわらず、励起波長 350 nm で 640 nm にピークを持つ赤色蛍光発光する。高分解能 TEM 観察より内部の CdS ナノ粒子は多結晶状態であることが確認され、この赤色蛍光発光は欠陥順位による発光であることも明らかにした。CuS-フェリチン複合体は直径 5.5 nm $\pm$ 0.7 nm の非常に均一なナノ粒子であり、作製したナノ粒子は XRD や EDX 及び高分解能 TEM 観察等の解析により hexagonal の CuS 結晶であった。また、ZnS-フェリチン複合体は直径 6.7 nm $\pm$ 0.4 nm の Hexagonal ZnS ナノ粒子であることを確認している。この ZnS-フェリチン複合体は近紫外側 440 nm に青色の蛍光発光する初めてのナノ粒子-フェリチン複合体である。

さらに同じ「ナノシステムと機能創発」領域のさきがけ研究者、内藤昌信博士との共同研究を行い、フェリチンタンパク質内表面の結晶核形成部位のアミノ酸の配列と立体配置を有効に利用して CdS ナノ粒子を結晶成長させることにより、化合物半導体ナノ粒子から世界で初めて円偏光性蛍光発光の測定に成功した。本成果は日本経済産業新聞等に掲載され特許取得済みである。

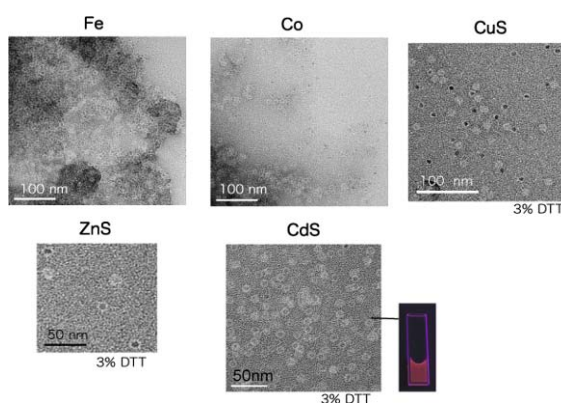


図4 作製したフェリチン-ナノ粒子複合体

(3) 温度応答性 DNA タグのデザインと温度応答性フェリチンタンパク質の作製

フェリチンタンパク質に温度応答性を持たせるために末端にマレイミド基を持ち 40℃、50℃、60℃で解離結合する 6 種類の DNA 鎖(40F, 40C, 50F, 50C, 60F, 60C DNA ; F; DNA 主鎖 C; DNA 相補鎖配列、F と C はハイブリダイズによって結合することができる DNA)をデザインした。作製したこれら 6 種類の DNA を一溶液中に混合し、溶液の温度を変化させながら 260 nm の吸光度を測定することで作製した DNA の温度応答性を確認した。その結果、温度を 20℃から 70℃の範囲で変化させた場合、39℃、47℃、57℃の 3 種類の T_m 値が確認されたため、混合した 6 本の DNA がそれぞれ独立したハイブリダイゼーションを行っている事を確認した。これらの DNA を研究成果(1)で開発した DNA 修飾法により、研究成果(2)で作製した SH 基を持つアポフェリチン或いは鉄コアを持つフェリチン (Fe-

フェリチン)に結合させることにより 40, 50, 60℃のそれぞれの温度で解離結合する 6 種類の DNA 修飾フェリチン作製を行った。この 6 種類の DNA 修飾フェリチン (40F, 40C, 50F, 50C, 60F, 60C-フェリチン)の温度応答性の確認を行った所、 上記と同様に 37℃、46℃、55℃の 3 種類の T_m 値が確認されたため、DNA を結合させたフェリチンにも同様に温度応答性があることを確認した (図 5)。さらに TEM 観察による DNA 修飾フェリチンの温度応答性観察も行い、 6 種類の温度応答性フェリチンを混合して 30℃及び 60℃で熱処理したものをそれぞれ TEM 観察した結果、60℃でフェリチンタンパク質が分散しているのが観察されたのに対し、30℃では大きなアグリゲーションが確認された。以上の結果より、6 種類の DNA を修飾した温度応答性フェリチンの作製が完了し、同時に温度応答性の確認が完了した。

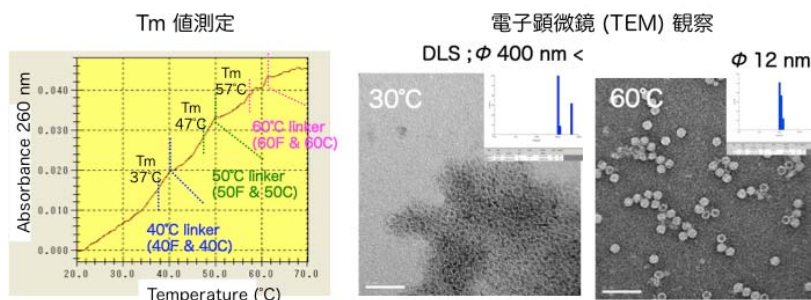


図 5 DNA 修飾フェリチンの T_m 値測定と電子顕微鏡による直接観察

(4) 温度制御自己組織化によるナノ粒子三次元構造作製

(1) ー(3) の研究ステップを通して作製した 6 種類の DNA 修飾温度応答フェリチンを用いて、温度制御自己組織化によるナノ粒子積層構造の構築を試みた。シリコン基板及び QCM 電極金基板上に LBL 膜を作製し、反応溶液を 55℃に保ち、その表面に 60℃で応答する DNA を持つフェリチン (60F-フェリチン) を結合させる。その後 60C-50F 非対称修飾フェリチンと 50C-40F 非対称修飾フェリチンを混合した溶液の温度を 20 度まで低下させることによって積層化した。この積層化は QCM 基板電極上及びシリコン基板で行い、ナノ粒子の積層化の状態は SEM と QCM 測定で行った。QCM 測定では温度変化に伴ったナノ粒子の結合量に応じた 3 段のステップが確認され、ナノ粒子が 3 層に積層されていることが示された。また、SEM 観察によりナノ粒子が重なっている様子が観察されたので、温度変化によるナノ粒子の自動積層が確認され、温度応答自己組織化システムの基礎を確立することができたと考えられる。QCM 測定により、フェリチンの各層の積層率を計算すると 1 層目、2 層目、3 層目とそれぞれ、41%, 36%, 30% と積層化はしているが積層率が若干低い状態であった。これは各層の二次元方向に空間があり、精密な三次元積層構造になっていないことを示唆している。原因として 1 層目が 41% ときれいな二次元結晶が完成していないため、精密積層が達成できていないのではないかと考えている。

本研究を通して、①フェリチンタンパク質への DNA 非対称修飾法を確立したことにより、フェリチンタンパク質をバイオテンプレートとして利用し均一ナノ粒子を作製するだけでなく、これに温度応答性というバイオ機能分子に発展させることができ利用範囲がさらに広がったと考えられる。また、②可視領域だけではなく、近赤外域に蛍光発光するナノ粒子の開発にも成功した。さらに、③さきがけ共同研究による CPL を持つフェリチン-ナノ粒子複合体の作製にも成功し、共同研究の重要性を改めて感じる事となった。

3, 今後の展開

本研究において DNA タグを有効にデザインし、非対称修飾を行う方法を開発することで温度応答性タンパク質-ナノ粒子複合体の作製と温度応答性自己組織化システムによるナノ粒子ハンドリングの基本システムは完成したと考えている。今後の展開としては以下の3つの課題を中心に研究を進めたい。

(1) ナノ粒子積層構造構築の精密化

温度応答性自己組織化システムによるナノ粒子積層は成功したが、研究成果(4)で示したようにフェリチン-ナノ粒子複合体の1層目の吸着率が低いため(約41%)、ナノメートルオーダーでの精密な三次元積層構造の作製が難しいことが明らかになった。そこで、一層目のナノ粒子の吸着率を上昇させ、正確なナノ粒子の精密構造を作製するために、フェリチン分子間の静電相互電荷のコントロールや吸着方法、基板表面の改善を行い、精密積層構造の構築とナノ配置のために1層目の作製をコントロールする。この達成にともない、積層構造構築において未達成であるフェリチン-ナノ粒子間距離の制御を温度応答性DNA タグの長さを変えることによって達成を目指す。

(2) 作製されたナノ粒子三次元構造の利用と応用

本システムを用いて作製された三次元ナノ粒子構造を利用して、実際に多値メモリや太陽電池モジュール等の積層構造を含んだ電子デバイスの構築を行い、電子デバイスの特性評価を行い、本システムの有効性とナノ粒子の精密ナノ配置によるデバイスの性能改善効果と新機能の判定を行う予定である。

また、DNA 修飾したフェリチン-ナノ粒子複合体はナノ粒子の三次元構造構築のみならず、基板上に作製したDNA配線やDNA折り紙等を設計図として用いることで、フェリチン-ナノ粒子複合体のシリコン基板上へのナノ配置や、選択配置を行うことで、DNAのハイブリダイズを利用した電流値の変化を検出するバイオセンサーやアモルファスシリコン結晶作製技術による低温液晶作製技術、グラフェンナノデバイスへの展開も予定している。

(3) バイオミネラリゼーションを生かした新規ナノ粒子の作製と応用

研究成果(2)においてDNA修飾フェリチンを機能化するために、多くの興味深い新規のナノ粒子-フェリチン複合体の作製を行った。作製した新規の化合物半導体ナノ粒子やCPL蛍光発光をするCdSナノ粒子、近赤外蛍光ナノ粒子等の新規ナノ粒子の特徴をより詳細に検討し、電子デバイス分野はもちろん、化学触媒、医療、バイオ等を含めた異分野への展開を行うとともに、解明が進んだナノ粒子作製メカニズム(バイオミネラリゼーション機構)に基づき、磁性ナノ粒子、バイメタルナノ粒子、ドーピングナノ粒子等の新規ナノ粒子の作製および結晶制御ナノ粒子への発展を通じた新機能ナノ粒子の作製を行いたいと考えている。

4, 自己評価

本研究を通して、フェリチンタンパク質にDNAを非対称修飾する技術は確立し、種々

のナノ粒子を持つ DNA 修飾フェリチン作製が可能となった。計画していたこれらの技術の達成により、ナノ粒子の三次元構造を作製することが可能となり、本研究の大きな目標であった温度制御自己組織化システムの設計とナノ粒子高次構造作製についてはほぼ実現できたと考えている。

DNA 修飾フェリチン内部への新ナノ粒子を作製研究では、研究全体を通してバイオミネラル化のメカニズム解明が進んだ。さらに改良 SCRY (slow chemical reaction system) により、溶液条件（特に S イオンの濃度と溶液 pH）をコントロールすることで、6 種類以上の新規ナノ粒子の作製が可能となり本法の汎用性が証明されるとともに、蛍光発光ナノ粒子や CPL 発光ナノ粒子、近赤外発光ナノ粒子などの予想以上の多様なナノ粒子の作製に成功した。これらの成果は今後、電子デバイス、医療、触媒化学などの分野へのタンパク質-ナノ粒子複合体の活用とさらなる発展が期待されるはずである。

また、当初の研究計画では考えられなかったいくつかの問題点も明らかになった。例えば、研究成果 (2) において、当初はフェリチンに DNA を修飾した後、内部にナノ粒子を作製する予定であったが、この方法ではフェリチン表面電荷の違いが原因で難しい事がわかり、ナノ粒子を作製後 DNA を修飾する方法に変更した。このような研究途中で発生した予想外の問題点はアプローチ方法の工夫を行う事で問題の解決を行い、同時に有益な知見を得ることができた。

残された今後の課題としては、ナノ粒子の積層構造の構築において、現段階ではナノ粒子積層の精密性があまりよくないため、当初の計画にあった DNA リンカーの長さによるナノ粒子間隔の制御とナノ粒子積層構造構築による機能測定の部分が未達成である。しかし精密性の改善点と対処法が明らかになってきたので、今後の研究により未達成部分を早急に進めることが可能になるはずである。また、研究全般を通して DNA 修飾フェリチンの回収量がまだ少なく実験の律速段階になることがあったため、今後、回収方法のスケールアップとシステム改良の余地もあると考えている。

また、本さがけ研究、「ナノシステムと機能創発」における領域会議がきっかけとなり、全く分野が異なる研究者と共同研究を行う機会に恵まれた。その結果 CPL 蛍光発光する世界初のフェリチン-CdS ナノ粒子複合体の作製に成功したことは想定外の素晴らしい成果である。この成果によりタンパク質-ナノ粒子と光化学の融合というあたらしい研究分野への更なる発展が期待され、さがけ研究における共同研究の重要性を改めて感じる成果となった。

本研究の実施により得られた、タンパク質への DNA 修飾方法、温度制御自己組織化システムやナノ粒子積層構造、多くの新規フェリチン-ナノ粒子複合体等の成果は、タンパク質-無機物の複合体に温度応答性のような有用な機能性を保持させるための重要な指針となり、今後、バイオ融合マテリアルが多くの分野において研究利用されるための礎を築くとともに、新機能創成に結びつくと考えられる重要な基礎的研究成果であると考えている。今後、本研究成果の益々の発展が期待される。

5. 研究総括の見解

DNA を非対称修飾することにより、温度変化によるフェリチンナノ粒子の高次構造形成と配置制御可能なシステム構築、およびその応用を目指した。

岩堀氏はシリカビーズ上における立体障害を利用して、フェリチンの片面のみに DNA を非対称修飾するという新技術を確立し、この DNA 非対称フェリチンを大量に合成することにも成功した。この研究成果を通して 6 種類の DNA 修飾温度応答フェリチンを作製し、目的とする温度制御ナノ粒子積層構造構築にも成功した。

また、フェリチン内部に Fe, Co 等の金属ナノ粒子や蛍光発光化合物半導体ナノ粒子 (CdS, CuS, ZnS 等) を作製することに成功した。同氏はこの結果を発展させ、CPL 蛍光発光する世界初のフェリチン-CdS ナノ粒子複合体を本領域さきがけメンバーとの共同研究により作製した。この成果は、タンパク質ナノ粒子と光化学の融合という新しい分野への発展が期待され、高く評価されよう。

今後、本研究を発展させて、多層構造を含んだメモリや太陽電池モジュール等、電子デバイスの構築と制御、デバイス化への可能性を引き続き検討してほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kenji Iwahori, Rie Takagi, Naoko Kishimoto, Ichiro Yamashita, A size controlled synthesis of CuS nano-particles in the protein cage, apoferritin, *Mater. Lett.*, **65**, pp. 3245-3247 (2011)
2. Bin Zheng, Mutsunori Uenuma, Kenji Iwahori, Naoya Okamoto, Y. Ishikawa, Yuki Haru Uraoka and Ichiro Yamashita, Sterically controlled docking of gold nanoparticles on ferritin surface by DNA hybridization, *Nanotechnology*, **21**(4), pp. 045305 (2010)
3. Naito Masahiro*, Kenji Iwahori*, Atsushi Miura, Midori Yamane, Ichiro Yamashita, Circularly Polarized Luminescent CdS Quantum Dots Prepared in Protein Nanocage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, pp. 7006 -7009 (2010)
*equal corresponding author
4. Ichiro Yamashita, Kenji Iwahori, Kumagaya Shinya, Ferritin in the Field of Nano-Devices, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1800**, pp. 846-857 (2010)
5. Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita, Size-controlled one-pot synthesis of fluorescent semiconductor nanoparticle, cadmium sulfide, in an apoferritin cavity, *Nanotechnology*, **19**, pp. 495601 (2008)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

PCT/JP2009/56060

発明者: 岩堀健治、内藤昌信

発明の名称: 円偏光発光性ナノ微粒子

出願人: 科学技術振興機構 (JST)

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

出願日: 2009 年 3 月 26 日

特願 2008-088945

発明者: 岩堀健治、内藤昌信

発明の名称: 円偏光発光性ナノ微粒子

出 願 人: 科学技術振興機構 (JST)
国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学
出 願 日: 2008 年 3 月 29 日

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

岩堀健治

タンパク質-ナノ粒子複合体による新機能発現とナノ電子デバイス作製

Characterization of protein-nano-particles and fabrication of nano-electronic devices

第 63 回日本生物工学会大会 (2011. 9. 26) 東京 他

著作物

岩堀健治、山下一郎

生体物質を用いた金属ナノドット形成 (現代表面科学シリーズ第 4 巻) 表面新物質創成

共立出版 (株) pp. 125-139 (2011)

岩堀健治、村岡雅弘、山下一郎

バイオナノプロセスによるデバイス作製

ナノバイオテクノロジー新しいマテリアル、プロセスとデバイス—

シーエムシー出版, pp. 194-204 (2009)

岩堀健治、山下一郎

タンパク質ナノテンプレートを用いた蛍光発光ナノ粒子の作製と特徴

メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収

—新元素戦略の新しいキーテクノロジー—

シーエムシー出版, pp. 166-174 (2009)

他

新聞発表/プレスリリース

岩堀健治、内藤昌信

奈良先端科学技術大学院大学・科学技術振興機構

「ナノ粒子をタンパク質内部で合成」

2010 年 8 月 30 日 日本経済産業新聞 12 面 他

研究報告書

「階層構造を有する ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製」

研究期間：平成 20 年 10 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

研究者：3503 角五 彰

1. 研究のねらい

生体のシステムはその構成要素が高次の階層構造を作り上げることで高度な機能を発現している。例えば骨格筋や心臓などの構成要素は分子モーターであるアクチン・ミオシンというナノオーダーサイズのタンパク質分子である。構成要素となるこれらの分子だけではダイナミックな運動やポンプなどの機能を果たすことができない。生体内ではこれらの分子が繊維状の集合体をつくり、それらが配向してサルコメアという筋節となり、さらに筋繊維、筋原繊維とスケールを上げるとともに高次の階層構造が付与されていく。このように高次に渡る秩序構造を持つことではじめて生体システムの高度な機能発現が可能となる。その機能は構成要素の単なる総和とは明らかに異なっている。このような非線形的な機能発現は創発といわれ、生体システムの持つ最大の特徴である。生体システムに見られる階層構造は各々の構成要素が ATP や GTP などの化学エネルギーを消費しながら能動的な自己組織化により作り上げられる。生体の運動システムの主な構成要素には上に挙げたアクチン以外にチューブリンというタンパク質分子も含まれる。興味深いことにこれらの要素は全ての真核生物に存在し、しかも種間での保存性が非常に高いことが知られる。このことは階層構造の組み立て原理があらゆる生き物で共通であることを示唆している。

本研究では生体運動システムの構成要素であるアクチン/ミオシン、チューブリン/キネシンをマシンやデバイスのビルディングブロックとして捉え、これらを能動的に自己組織化させながら集積することで、数マイクロから数十マイクロに及ぶバンドル状、リング状などの多分子集合体の創成を目指す。

研究課題

1) 能動的自己組織化原理に基づく生体分子モーター高次元集積法の確立

エネルギー(ATP)散逸系で生体分子モーター間の相互作用を制御することで多様な高次元集合体集積法の確立を目指す。

2) 生体分子モーター高次元集合体の創発機能発現とその機構解明

課題 1) で創製した生体分子モーター高次元集合体を ATP 依存的に運動発現させるとともに発現機能を構造の観点から考察する。

上記課題が達成されるとこれまで実現されたことのない高効率・高機能な ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製が可能となる。これらは生体適合性が期待されることや ATP をエネルギー源としていることから生体内で利用可能なアクチュエーターとしても期待できる。また階層構造と運動機能における創発との関係を調べることで生体動力システム特有の非線形現象を理解できると期待される。

2. 研究成果

課題：生体分子モーター能動的自己組織化法の確立（チューブリン/キネシン系）

チューブリンモノマーから構成される微小管は円筒状の構造を有し、生体内では細胞骨格として細胞の形態支持、また分子モーターであるキネシンとともに機能することで細胞内での物質輸送、細胞分裂時の紡錘糸形成などに関与している。このキネシンを固定した基板上で極性をもった微小管は ATP 共存のもと一方方向に滑り運動を発現する。本研究ではこの滑り運動を利用しながら微小管を能動的に集積していくことを着想した。微小管同士に引力相互作用を持たせるため、ビオチン(Bt)およびストレプトアビジン(St)を微小管表面に修飾する。Bt-St 間の強い相互作用によりキネシン上で滑り運動する微小管はある距離まで近づくと自発的に集合体を形成する (Figure 1)。

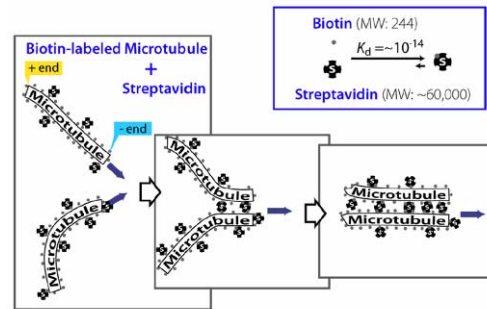


Figure 1. Schematic illustration of the active self-organization of MTs

次に、微小管の能動的自己組織化における微小管密度(チューブリン濃度換算)、Bt-St 修飾比の影響について検討した (Figure2)。微小管の集合体形成は運動開始直後から観察され4時間後にはBt-St 修飾比率、チューブリン濃度に応じて様々な形態(バンドル状、ネットワーク状、リング状)の集合体が形成されることがわかった。またリング状の微小管集合体はバンドルとネットワーク形成条件の間で特異的に現われていることもわかった。バンドルやリング状の微小管集合体の並進あるいは回転する速度(約 30 nm/s)は集積化する前のビオチン修飾微小管1本の速度(約 27 nm/s)とほぼ同程度であることから集合体が単一極性を有するものと考察された。これは、相反した極性を持つフィラメントが能動的自己組織化過程で排除されていくためであると考えられる。リング状集合体のサイズは直径 1 μ m から 40 μ m と広く分布することがわかった (Figure 3)。リングの速度はサイズにほとんど依存しないことがわかった。

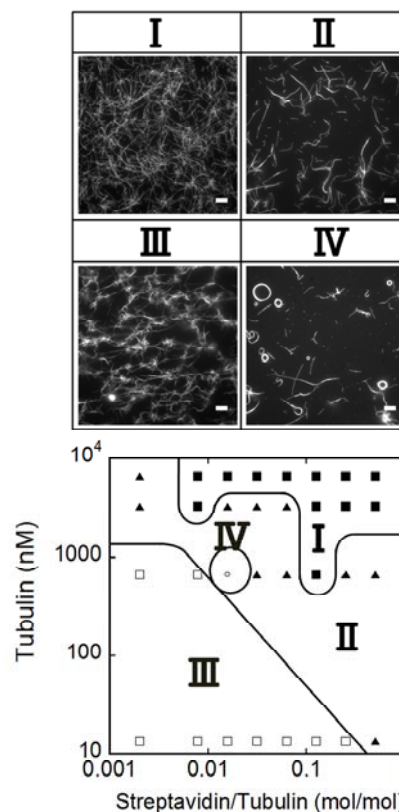


Figure 2: FM image and phase diagram for the morphology of MTs assemblies after 4h of active self-organization on the kinesin-fixed surface. Effect of the streptavidin and tubulin concentration on the morphology of MTs assembly. I: network, II: Bundle, III: Single filament, IV: Ring.

また、リングは2次元平面内で回転しているため回転方向に対して対称性が生じる。形成されたリングでは左回転(93%, n=222)：右回転(7%, n=16)と大きな差が生じることがわかった。透過型電子顕微鏡(TEM)観察により左回転が優勢に観察されたリング系では主に左巻き螺旋構造を有する微小管により構成されていることが推測された。これより回転方向の優勢と微小管のフィラメント構造に何らかの相関があることが示された。

課題：リング状微小管集合体の回転方

向制御。次に微小管の構造(プロトフィラメント数(PF))に着目しリング状の微小管集合体の回転方向の制御を目指した。系統的な研究の結果、微小管の重合時のインキュベーション時間に依存し回転方向の優先性が変化すること

がわかった(Figure4)。同時にインキュベーション時間に伴うPF数の増加が観察され、これより微小管の螺旋構造変化(左巻き→右巻き)が推測された(Figure 5)。

またGTPの非加水分解アナログ(GMPCPP)を用いた微小管の能動的自己組織化により、曲げ剛性も集合体の構造形態に大きく影響することがわかった。このようにフィラメントレベルの構造が集合体の構造形態さらに集合体の運動性に大きく影響してくることがわかった。非平衡系でエネルギー散逸的に構築される構造体は環境の変化にも自律的に応答したリモデリングが可能であると推測される。

課題：リング状微小管集合体のサイズ制御。

これまで得られたリング状微小管集合体の直径サイズはnm～数十 μm と大きな分散性がある。リング状微小管集合体そのものをビルディングブロックとして利用する際にはサイズの分散性を抑える必要がある。試行の過程で、能動的自己組織化を気液界面で行うとリングサイズの揃ったリング状微小管集合体を得ることがわかった。そこで気液界面でMotility assayを可能にするシステムを構築し新たな生体分子モーター集積法を確立した(未発表)。

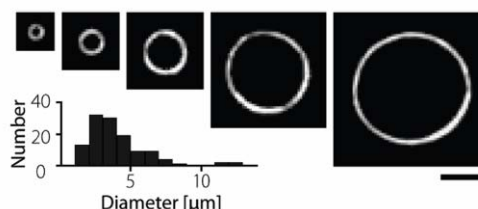


Figure 3. Size distribution and motility assay of aggregated MTs in ring-shape. (a) Images of ring-shaped MT bundles with various sizes and their size distribution: scale bar, 5 μm .

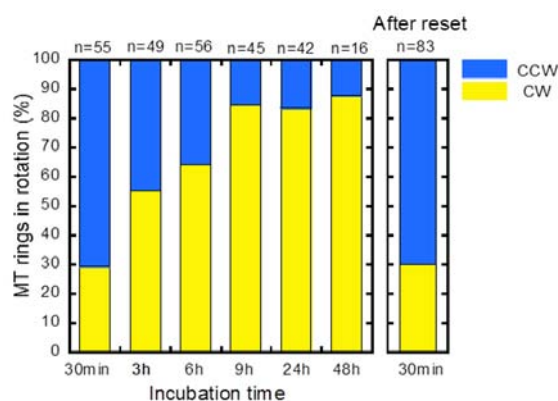


Figure 4. Effect of incubation time of MTs formation on the preferential rotation of MTs ring formed by Active Self-Organization on kinesin-fixed surface.

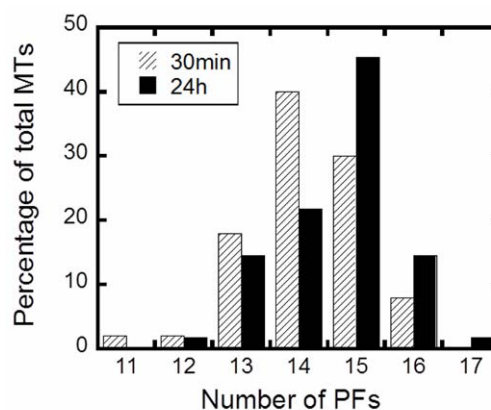


Figure 5. Distribution of PFs number of MTs prepared by 30 minutes (shadow) (n=50) and 24 hours (dark) (n=55) incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$.

Figure 6 はキネシン上で ATP に依存して滑り運動している微小管へ気液界面を接触させたときに観察される微小管の蛍光イメージである。気液界面に接触している微小管がリング状の集合体を形成していることが確認される。今回、得られたリング状集合体のサイズを評価したところ、平均直径が約 $1.8\mu\text{m}$ 、標準偏差が約 $0.4\mu\text{m}$ となり、これは気液界面を利用しない能動的自己組織化法で作成したリング状集合体(平均直径が約 $3.9\mu\text{m}$ 、標準偏差が約 $2.2\mu\text{m}$)と比べサイズ、分散性ともに小さいことがわかった。また本系におけるリング状微小管集合体の収率は気液界面法で 50% と非常に効率が良いこともわかった(能動的自己組織化法では 0.4%)。また微小管のリング形成過程を *in situ* でかつリアルタイムでの観察に初めて成功した。

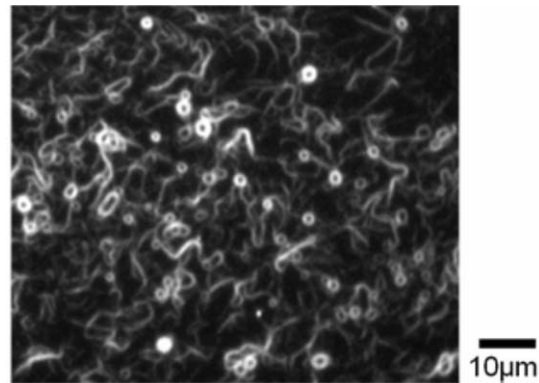


Figure 6. Typical morphology of MT assemblies formed at the air-buffer interface. The image was captured under fluorescence microscope. Scale bar: $10\mu\text{m}$.

課題：微小管集合体の秩序構造形成における非対称重合場の効果。

生体システムは、非平衡かつ非対称な環境で秩序構造を形成し維持している。自己組織化過程における時空間情報も高次構造形成には必要不可欠なものであると考えられる。こ

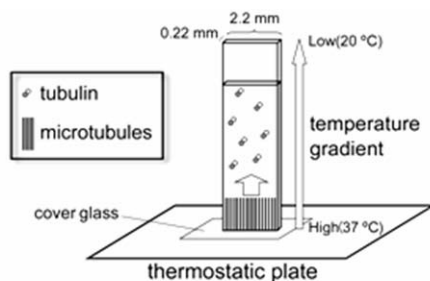


Figure 7. Schematic illustration of the experimental setup for preparing highly oriented MTs by using asymmetric polymerization conditions induced by a temperature gradient in a confined space

のような解釈の基、温度勾配を用いた非対称的な重合場で配向微小管集合体の作成を試みた。Figure 7 に示すように高濃度のチューブリンが入ったキャピラリー ($2.2\text{mm} \times 0.22\text{mm} \times 25\text{mm}$) に温度勾配をかけると下端から長軸に沿って強い複屈折が現れることがわかった (Figure 8)。

蛍光顕微鏡でキャピラリー内を評価すると配向した微小管集合体が観察された。さらに配向微小管集合体に GFP-キネシンを相互作用させ ATP 存在下で GFP-キネシンの運動方向

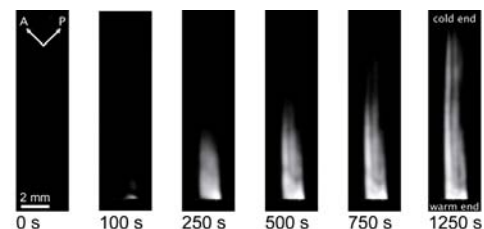


Figure 8 Cross-polarizing microscopic images of the MT assembly prepared using a temperature gradient in a confined space.

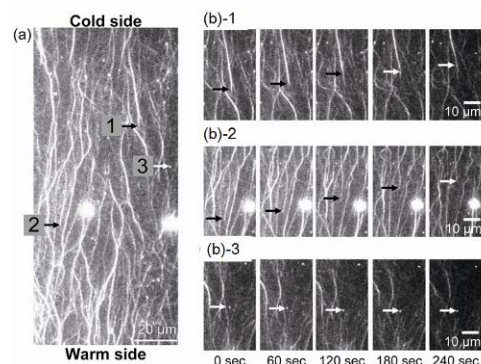


Figure9. Motility of GFP-kinesins on the MT assembly. (a) FM image of GFP-kinesins on MTs. (b)-1 and (b)-2, Enlarged fluorescence images of GFP-kinesins moving toward the cold end. (b)-3 GFP-kinesins moving toward the warm end along the MT tracks.

を追跡するとその多く（90%）が上端に向かうことがわかった（Figure 9）。キネシンは微小管の+端方向へと運動するため、微小管はプラス端を上方に向け配向していることがわかる。このように自己組織化と非対称環境を組み合わせることで生体分子モーター集合体にセンチメートルオーダーの構造秩序を付与することが可能となった。

課題：生体分子モーター能動的自己組織化法の確立（アクチン/ミオシン系）

アクチン/ミオシンは筋肉の主要構成成分である。これらの分子はイオン強度に応じて分散・凝集状態を変化させる。アクチン/ミオシンから成る凝集体はアクトミオシンと呼ばれる。アクトミオシンの凝集過程に剪断応力を印可しながら縮合剤(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)で架橋することで繊維状のアクトミオシングルが得られる（A Kakugo et. al. Adv. Mater 2003）。本課題では得られるアクトミオシングルを ATP 依存的に収縮・弛緩させながら能動的に自己配向させることを目指した。Figure 10 は ATP 添加直後から収縮するアクトミオシングルのタイムラプス像である。

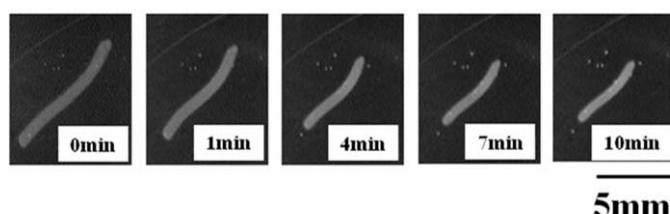


Figure 10. Time-lapse images of AM gel shrinking upon the addition of 5 mM ATP

アクトミオシングルは主に長軸方向を収縮させながら 10 分後には収縮前の 70%の長さになる。収縮率の時間依存性を未架橋アクトミオシン(Native)とアクトミオシングル(Gel)で比較する

と、ゲル化により収縮率が 4%程度、初期収縮速度が 200%程度増加していることが分かった。また化学架橋されたアクトミオシングルは繰り返し収縮・弛緩に耐えられるほどの力学強度を有することが分かった。さらにアクトミオシングルの収縮速度は収縮・弛緩を繰り返すことで増加することも明らかとなった(Figure11)。図 11 ではアクトミオシングルの収縮速度は 6%/min (First run)から 15%/min(Second run)へと増加している。偏光顕微鏡

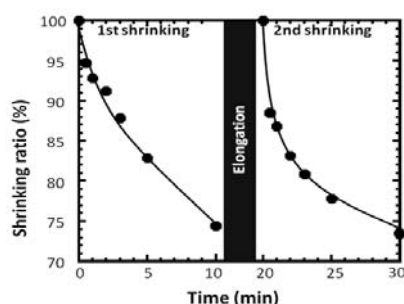


Figure 11 Time profile of repeat shrinking of AM gels upon the addition of ATP. The AM gels were stretched for 10 min to their original lengths in low-

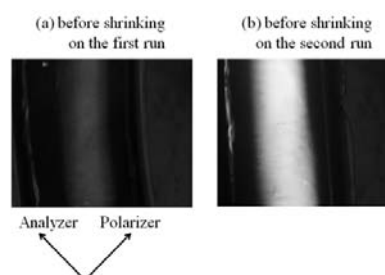


Figure 12. Polarized light microscopic (PLM) images of AM gels (a) before shrinking in the first run and (b) before shrinking in the second run.

を用い収縮後のアクトミオシングルを観察したところ大域に複屈折性が発現していることが分かった(Figure12)。これはアクトミオシングルに配向秩序が形成されていることを示唆するものである。このようにアクトミオシングルを ATP 依存的に収縮・弛緩させることで能動的に自律配向させることに成功した。

課題：生体分子モーターの耐用時間評価と延長化。

生体分子モーターの実用化に向け耐用時間の延長が重要な課題となる。生体分子モーターは熱や圧力変化、表面物性、浸透圧、pHなどの物理的、化学的あるいは分解酵素などの生化学的要因により構造変化し、運動にかかわる機能を失う。また活性酸素種（ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドイオン、一重項酸素等）による酸化変性も機能失活に関わる。これまで生体分子モーターの *in vitro* motility assay にはグルコースオキシダーゼとカタラーゼを組み合わせた酵素系の活性酸素種の除去システム（スカベンジャー）が一般に用いられてきた。これは活性酸素種の元となる酸素そのものを除去するシステムである。しかし、このスカベンジャーでは過酸化水素などのより強い酸化剤が発生することなどから効果は数時間程度しか持続しないものであった。本課題では嫌気チャンバー(ICS)を導入することで生体分子モーターの耐用時間の延長を目指した。Figure13 に ICS の概略図を示す。耐用時間は ICS 内でキネシン・微小管系の Assay セルを構築しその運動持続性から評価した。従来の酵素系では数時間後には完全に運動が停止してしまうのに対し ICS 内では 10h 後でもほぼ 100% 近くの微小管が運動しているのが確認された。微小管の運動性は最長 8 日間まで持続可能であることがわかった。このように生体分子モーターの耐用時間を数時間程度から一週間近くまで延長することに成功した。

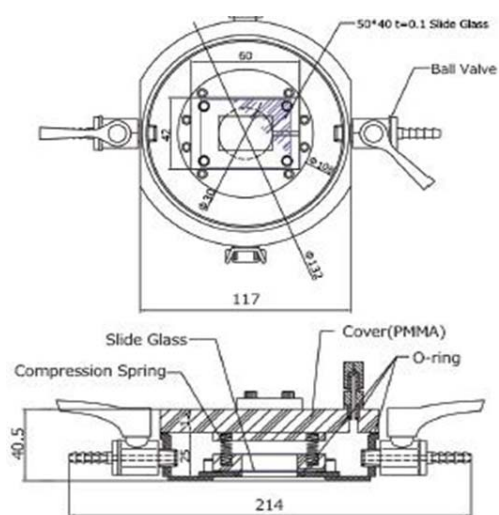


Figure 13. Design of inert chamber. Numbers in the figure indicate distance in mm.

3. 今後の展開

構造と機能との相関をさらに詳しく調べていくことで生体システムの階層構造の役割や機能創発現象についても新たな見解を与えると期待している。今後、分子モーターの自己組織化を時空間的にも制御することでさらに高次の階層構造を有する集合体を作り上げていく予定である。また ATP をエネルギー源とすることから生体環境に近い条件で駆動する高効率な運動素子としても期待される。今後は物質やエネルギー供給の許される非平衡系の特徴を生かした自己修復型運動素子の創製を目指していきたい。

4. 自己評価

生体分子モーターの能動的自己組織化における微小管集合体の構造決定因子を明らかにした。リング状集合体に焦点を絞り、フィラメント構造と回転運動方向との相関を示した。秩序構造形成における非対称環境場の重要性を示した。生体分子モーター集合体の自律配向特性を見出した。新規課題を設定し、生体分子モーターの耐用時間を大幅に延長した。

これらの成果から、当初の目的に対し概ね達成できたと評価した。

5. 研究総括の見解

生体システムの高度な機能発現は、高次にわたる秩序構造を持つことではじめて可能となる。その機能は構成要素の単なる総和とは明らかに異なっている。このような非線形的な機能発現は創発といわれ、そのメカニズムを解明することは、本領域の最重要課題である。

本研究では生体運動システムの構成要素であるアクチン/ミオシン、チューブリン/キネシンをビルディングブロックとして捉え、これらを自己組織化させながら集積することで、数マイクロから数十マイクロに及ぶ多分子集合体運動素子の創成を目指している。

角五氏は微小管集合体の並進あるいは回転する速度は集積化する前の微小管 1 本の速度（約 27 nm/s）とほぼ同程度であることから、集合体が単一極性を有するという重要な知見を見出した。これは、相反した極性を持つフィラメントは能動的自己組織化過程で排除されていくためではないかと考察された。またインキュベーション時間に伴う微小管の螺旋構造変化（左巻き→右巻き）や、GTP の非加水分解アナログ（GMPCPP）を用いた曲げ剛性変化も集合体の運動形態に大きく影響を与えることを示した。さらに、キャピラリー内で配向した微小管集合体の多く（90%）が上端に向かうことから、微小管はプラス端を上方に向け配向していること、アクトミオシンゲルを ATP 依存的に収縮・弛緩させることで能動的に自律配向させることなど数々の重要な知見をあきらかにした。

自己組織化と非対称環境を組み合わせることで生体分子モーター集合体にセンチメートルオーダーの構造秩序を付与することが可能となり、しかも、自己組織化に伴う、運動性変化を対応させたことは創発という現代科学のもっとも重要な課題解明の契機となるもので高く評価されよう。上記課題が引き続き進展することにより、これまで実現されなかった高効率・高機能の ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製が可能となることも将来期待される。

6. 主な研究成果リスト

- 1) Kakugo, A.; Tamura, Y.; Shikinaka, K.; Yoshida, M.; Kawamura, R.; Furukawa, H.; Osada, Y.; Gong, J. "Formation of Well-Oriented Microtubules with Preferential Polarity in a Confined Space under a Temperature Gradient" *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131, 18089-18095.
- 2) Kawamura, R.; Kakugo, A.; Osada, Y.; Gong, J. "Selective Formation of a Linear-Shaped Bundle of Microtubules" *Langmuir* 2010, 26, 533-537.
- 3) Kabir, A.; Inoue, D.; Kakugo, A.; Kamei, A.; Gong, J. "Prolongation of the Active Lifetime of a Biomolecular Motor for in Vitro Motility Assay by Using an Inert Atmosphere" *Langmuir* 2011, 27, 13659-13668.
- 4) Kakugo, A.; Kabir, A.; Hosoda, N.; Shikinaka, K.; Gong, J., "Controlled Clockwise-Counterclockwise Motion of the Ring-Shaped Microtubules Assembly"

Biomacromolecules 2011, 12, 3394-3399.

5) Tamura, Y.; Kawamura, R.; Shikinaka, K.; Kakugo, A.; Osada, Y.; Gong, J.; Mayama, H. "Dynamic self-organization and polymorphism of microtubule assembly through active interactions with kinesin" *Soft Matter* 2011, 7, 5654-5659.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

著書

1)角五彰、龔劍萍「ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製」、『未来を動かすソフトアクチュエータ-高分子・生体材料を中心とした研究開発-』、シーエムシー出版、第 31 章 p322-331 (2010)

2)角五彰、龔劍萍 超分子サイエンス&テクノロジー -「生体分子モーターの集積化と機能化 - ATP 駆動型バイオマシンの創製 - 」 p869-879 (2009)

解説総説

1) Kabir, A. ; Kakugo, A. ; Sada, K. ; Gong, J. Osada, Y. "How to Integrate Biological Motors towards Bio-Actuators Fueled by ATP" *Macromolecular Bioscience* 2011, 11, 1314-1324.

2) 井上大介、角五彰、龔劍萍「生体分子モーターの動的自己組織化が生むエキゾチック機能」化学工業7月号、第62巻、7号、1-5

3)角五彰、龔劍萍「人工生体組織の創製に向けた取り組み」-生物物理10月号、第50巻5号 244-247 (2010)

4)角五彰、龔劍萍「ATP駆動型のゲル運動システム」、未来材料、vol18, No8, 40-44 (2009)

研究報告書

「三次元人工細胞アレイからなる化学チップの創成」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：佐々木善浩

1. 研究のねらい

シリコンやガラス基板などから作製される極めて小さなチップ上に、分析、合成、抽出などの化学プロセスを集積する化学チップ作製技術の開発は、ゲノミクス、プロテオミクス、マイクロマシニングなどの研究分野の中核をなすものであり、近年、その動向が注目を集めている。例えば、バイオや環境分野における超微量分析やハイスループットスクリーニング技術の実現、環境に負荷の小さいデバイスやベッドサイド臨床検査の開発、さらにはこれらを利用した新市場の開拓など、技術面、社会面、産業面からのニーズは高く活発な研究が行われている。しかしながら今後、これらの化学チップ技術をプロテオーム創薬やバイオインフォマティクスなどの生命科学分野にさらに積極的に展開する上では、ガラスやシリコンなどに代わり、生体分子に対し親和性が高く、例えば膜タンパク質などを効率的に集積しうる新規のバイオデバイスの開発が必要不可欠である。この観点から、デバイス作製のための材料として生体膜モデルなどとして盛んに研究が行われている人工細胞膜(リポソーム)に着目した。人工細胞膜は、遺伝子やタンパク質などをはじめとする様々な生体分子を効率よく集積するための動的な特性を有する超分子基板であり、高分子・無機材料からなる静的な基板にかわる第三のバイオ基板として有用であると考えられる。

以上の背景をもとに、本研究では、ボトムアップ的な手法とトップダウン的な手法とを融合させることで人工細胞膜(リポソーム)が連結された三次元人工細胞アレイを作製し、これを自己集積型バイオチップへと展開することを目指した。具体的には、オリゴヌクレオチドの相補的塩基対形成を利用した人工細胞からなるマイクロアレイの構築、さらにこれらの人工細胞膜をネットワーク化するための手法の確立を目指した。

2. 研究成果

オリゴヌクレオチドによるリポソーム集積構造の構築

人工細胞アレイ作製のための予備的検討として、DNA による水溶液中でのリポソームの集積挙動について検討した。具体的には、リポソームの脂質二分子膜への疎水性アンカーとして機能する疎水性のコレステリル基を修飾した DNA によりリポソームを標識し、相補的塩基対形成によるリポソームの集積を行った。その結果、異なる配列を有する DNA でラベルした二種類のリポソーム(粒径 100 nm)を混合し、この溶液に相補性を有するリンカーDNA を添加すると、リポソームが選択的に会合することが動的光散乱測定などから明らかになった。ここで、リンカーDNA の添加量を変化させることで、リポソームからなる会合体の粒径を制御することも示された。また、示差走査型熱量分析により、この会合挙動について検討を行ったところ、リポソームがその形態を保ったまま集積していることも明らかとなった。

同様の原理を用い、固体基板上へのリポソームの集積挙動について検討した。その結果、相補的塩基対形成に基づき DNA でラベルしたリポソームがその内水相を保持したまま DNA

を修飾した基板に集積しえることが確認された。この集積挙動の時間変化ならびに集積量を、水晶発振子マイクロバランス法により定量的に評価した。また、ここで用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列は任意かつ容易に変化させることができる。そこで、複数の疎水化 DNA とリンカーDNA を組み合わせると、基板に対して水平方向並びに垂直方向にリポ

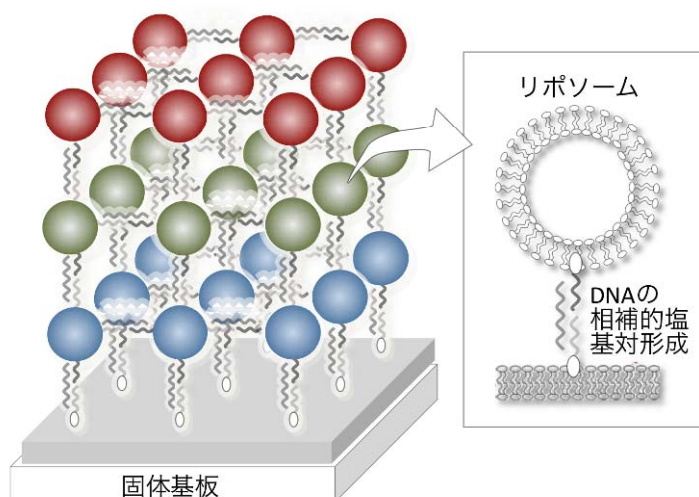


図 1. DNA の分子認識に基づき基板上に作製される三次元リポソームアレイの模式

ソームを集積できることも示された。以上の結果から、これらの手法により図 1 に示すように、リポソームが融合することなくその形態を保ったまま、三次元方向に密に集積したリポソームアレイを作製できることが明らかとなった。

ネットワーク化のための脂質ナノチューブの作製

脂質ナノチューブによるリポソームの有機的な連結を行った。脂質ナノチューブを作製する手法はこれまでもいくつか報告されているが、脂質ナノチューブによりリポソームを連結しこれを容易にアレイ化する技術は確立されていない。本研究で目的とする人工細胞アレイをネットワーク化するための脂質ナノチューブ作製法に求められる条件としては、(1) 多くの脂質膜系に適用可能であること、(2) 安価かつ容易な操作で作製可能であること、(3) 伸長方向を容易に制御できること、などがあげられる。上述の条件を満たす脂質ナノチューブの形成手法の確立を目的として、ナノ微粒子をリポソームに内包し、このナノ微粒子を電場により泳動させることで、電場方向に脂質チューブを作製する手法を開発した。具体的には、負電荷を有する数十から数百 nm の粒径を有するラテックスナノ粒子を内包した巨大リポソームを、アビジン-ビオチン相互作用を用いて固定化し、このリポソーム固定化基板に電圧を印可することで、ナノ微粒子の電気泳動に基づき脂質ナノチューブが形成されることを見いだした(図 2)。これら脂質チューブ形成のメカニズムなどについて、脂質の種類や電圧強度などの諸パラメーターが及ぼす効果を網羅的に検討するため、脂質チューブ形成挙動の定量化を試みた。その結果、電極形状や、ジャイアントリポソームの固定化法等を改良することで、電圧強度に依存した脂質ナノチューブの形成挙動を制御しうることを見いだした。

他の外部場を用いた場合にもこの微粒子の流動による脂質ナノチューブ作製が可能である。荷電微粒子のかわりに磁性微粒子をジャイアントリポソームに内包させ、電磁石もしくはネオジム磁石で磁性微粒子を泳動させた場合にも同様の脂質ナノチューブ形成がみられた。さらに、慣性力(遠心力)により微粒子を泳動させた場合においても脂質ナノチューブの作製が可能であった。以上の結果から、何らかの外部場によりリポソームに内包された微粒子を泳動させることによる脂質ナノチューブ作製手法の一般性が示された。

脂質ナノチューブによりリポソームアレイをネットワーク化しバイオチップに応用するためには、得られるアレイの安定性などを考慮すると何らかの形でアレイを固定化するアプローチが重要である。このような観点のもと、アビジン-ビオチンではなくアガロースゲル中にリポソームを固定化した。この系においても、同様に微粒子の泳動を行うことで、脂質ナノチューブが作製できることを明らかにした。さらにここで作製される脂質ナノチューブがゲル中に固定化されたりリポソームを確かに連結していることも示された。

上述の系に加え、脂質ナノチューブ形成の定量評価の際に、サンプル調製や外部場印可などに伴う液体の流動の効果を検討する中で、微小流路中で一定のせん断流を生じさせることが可能なマイクロチャンバーを用いることによっても脂質ナノチューブが作製できることを見いだした。具体的には、ibidi社製スライドガラスチャンバーを用いアビジン-ビオチン相互作用により固定化されたジャイアントリポソームに 0.3 mL/min 程度のせん断流を与えることで脂質ナノチューブを極めて効率的に作製しうることを明らかにした。またここで得られる脂質ナノチューブが確かに内水相を有して

いることも示された。この結果は、その方向が完全に規制された中空の脂質ナノチューブを脂質の種類を問わず極めて容易に作製できる手法を初めて確立した点で興味深い。Bio-MEMS などのように、従来型のシリコン、ガラス基板を用い、トップダウン手法により生体適合型の化学チップを作る研究が盛んに行われている。また、DNA、タンパク質などの生体分子そのものをアレイ化することで、マイクロチップを開発する研究も国内外において多く行われている。ごく最近では、インタクトなリポソームを集積したリポソームアレイを、ナノスケールのコンテナとして用いる研究も行われている。例えば、トップダウン的な手法により、人工細胞としてのこれらリポソームを連結したリポソームネットワークをつくる研究も報告されている。しかしながら、いずれの手法においても高価な装置、熟練したテクニック、希少な生体試料等を必要とする。この点に関して、比較的安価で多彩な物性を容易にチューニングすることが可能なナノ微粒子を用い、電場、磁場印加などのトップダウン手法に基づくナノ粒子の泳動現象と、脂質分子のボトムアップ的な自己組織化能とをうまく組み合わせることでバイオチップ作製のためのリポソームネットワークアレイを構築できることを明らかにした本結果は有用であるといえる。

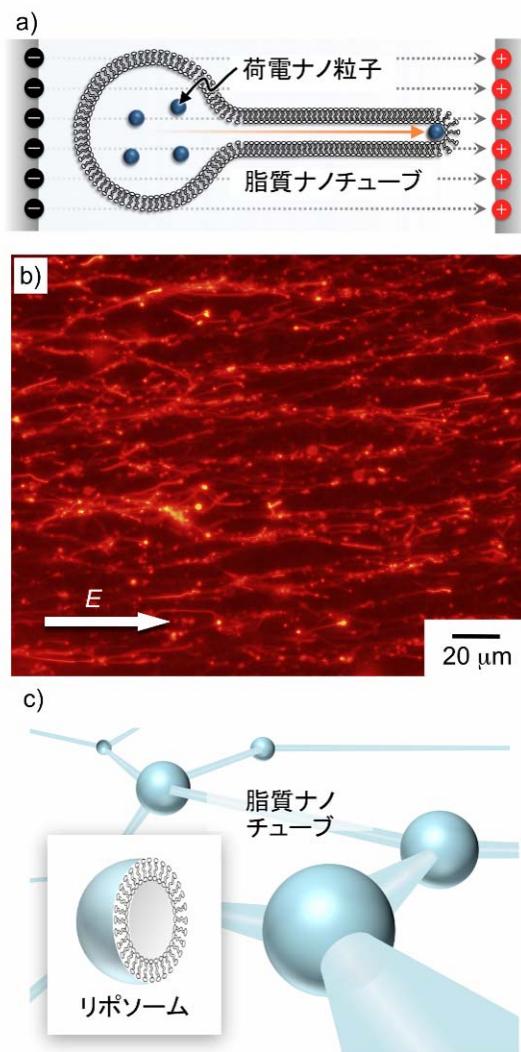


図 2. 電場により形成される脂質ナノチューブ形成の模式図 (a) 蛍光顕微鏡観察像 (b) ならびにリポソームネットワークの概念図 (c) .

3. 今後の展開

これまでの研究を踏まえ、プリント基板などを用いてさらにその空間構造が制御された脂質ナノチューブネットワーク系を構築する。また、細胞とのコミュニケーション手法の一つとしての脂質ナノチューブによる細胞内物質輸送システムの実現、さらにこの手法を用いた革新的な細胞機能性手法の確立を目指す。デバイス化の上ではさらなる脂質ナノチューブおよびネットワークの安定化は必要不可欠である。この観点のもと、ヒドロゲル中のリポソームならびに脂質膜を安定化する手法として、多糖からなるナノゲルを用いる手法を別途開発している。この手法を本リポソームネットワーク系に展開し、さらにその構造が安定化された脂質ナノチューブを作製し現実のデバイス応用を目指したい。

4. 自己評価

当初の目標では、三次元的に人工細胞(リポソーム)を配置し、これを自在に連結することを目指して研究を開始した。三次元的なリポソームの組織化については当初の計画どおりに研究が進み期待した結果が得られた。リポソームの連結手法については、当初、脂質膜の融合や、チャネル型の膜タンパク質などの生体分子の組み込みによる方法を提案していたが、その手法の煩雑さや制御の困難さなどから、当初計画していたような結果が得られなかった。代替手法として、当初の研究計画においては想定していなかった「外部場による脂質ナノチューブの形成制御」という全く新しい手法を確立した。この手法は、自己組織化のみによるリポソーム間連結の完全な制御という観点では未だ技術的に未熟であるが、その手法の簡便さ、リポソームを形成する物質を問わない手法の一般性、脂質ナノチューブを形成させるための外部場の多様性(電場、磁場、重力場)などから当初予定していた有機的に集積されたリポソームによるデバイス作製というアウトプットを得る点では方法論として有用であり、今後の展開が期待される。

5. 研究総括の見解

オリゴヌクレオチドの相補的塩基対形成を利用してマイクロアレイの構築、さらにこれらをネットワーク化し、三次元人工細胞を模倣したアレイを作製し、自己集積型バイオチップへと展開することを目指している。

佐々木氏は、リポソームの脂質二分子膜への疎水性アンカーとして機能するコレステリル基修飾 DNA を用いてリポソームを標識し、相補的塩基対形成によるリポソームの集積を行い、リポソームが融合することなくその形態を保ったまま、三次元方向に密に集積したリポソームアレイを作製できることを明らかにした。次に、ナノ微粒子をリポソームに内包し、このナノ微粒子を電場により泳動させることで、電場方向に脂質チューブを作製する手法を開発した。

当初、リポソームの脂質膜の融合やチャネル型の膜タンパク質などの生体分子の組み込み法を提案していたが、研究者自身も述べているようにその手法の煩雑さや制御の困難さなどから、当初期待した結果が得られなかった。「外部場による脂質ナノチューブの形成制御」は、そのための代替手法である。生体においては、ホルモン、成長因子などの拡散型メッセンジャー物質の伝搬を行うことではじめて細胞間のコミュニケーションが可能となり、それを目指すという提案であるが故に、本提案が賛否両論の末採択されたという経緯があったことをふまえる

と、総括としては、その可能性をあらゆる方向から忍耐強く検討してほしかったというのが率直な気持ちである。結果、リポソームアレイや、脂質ナノチューブが現時点で作りっぱなしの印象を与えてしまうのは否めない。興味深い課題提案であるゆえに、目的としたことを今後も引き続き、継続発展してほしいと切に願う。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Y. Sasaki, Y. Shioyama, W.-J. Tian, J. Kikuchi, S. Hiyama, Y. Moritani, T. Suda, "A Nanosensory Device Fabricated on a Liposome for Detection of Chemical Signals", *Biotechnol. Bioeng.*, **105**, 37-43 (2010).
2. Y. Sasaki, K. Abe, K. Akiyoshi, "Construction of a 3D-liposomal array for Biochip Applications", *Nanobio-Interfaces in Relation to Molecular Mobility*, 97-102 (2010)
3. Y. Sasaki, M. Mukai, A. Kawasaki, K. Yasuhara, J. Kikuchi, Switching of the Enzymatic Activity Synchronized with Signal Recognition by an Artificial DNA Receptor on a Liposomal Membrane, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2397-2402 (2011).
4. K. Yasuhara, Z. Wang, T. Ishikawa, J. Kikuchi, Y. Sasaki, Y. Moritani, S. Hiyama, T. Suda, Specific delivery of transport vesicles mediated by complementary recognition of DNA signals with membrane-bound oligonucleotide lipids, *Supramol. Chem.*, **23**(3,4), 218-225 (2011).
5. Y. Sekine, K. Abe, A. Shimizu, Y. Sasaki, S. Sawada, K. Akiyoshi, Shear flow-induced nanotubulation of surface-immobilized liposomes. *RSC advances*: DOI: 10.1039/C2RA00629D (2012).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 佐々木善浩, 秋吉一成

発明の名称: 脂質構造体の製造方法

出 願 人: 東京医科歯科大学大学

出 願 日: 2011/2/28

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. 佐々木善浩, 阿部慶太, 秋吉一成. バイオ応用のための三次元リポソームアレイの構築. 第 59 回高分子討論会, 札幌, 2010 年 9 月 (依頼講演)
2. Sasaki Y. Self-assembled liposomal array for biochip applications. International Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering, Beijing, China, Jun, 2011 (Invited)
3. Sasaki Y, Abe K, Kikuchi J, Akiyoshi K. Fabrication of artificial cell array for creation of biochip. International Symposium on Nanobio-Interfaces Related to Molecular Mobility, Tokyo, Japan, November, 2009. (Invited)
4. 佐々木善浩, 秋吉一成. 生体膜トンネルナノチューブ、その生物学的機能と材

料化学への展開, 化学, 67, 68-69, 2012.

5. 第 19 回高木賞, 佐々木 善浩、阿部 慶太、秋吉 一成, “バイオチップ作製へ向けた三次元リポソームアレイの構築”, 第 4 回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウムおよび第 19 回インテリジェント材料／システムシンポジウム, 東京, 2010 年 3 月.

研究報告書

「超分子型フラーレンを用いた *in vivo* イメージング試薬の開発」

研究期間：平成 20 年10月～平成24年3月

研究者：山越 葉子

1. 研究のねらい

In vivo において疾患を特異的に検出する目的で、二種類の超分子構造を有する MR イメージング用のコントラスト試薬 (MRI-CA) の開発を試みた。

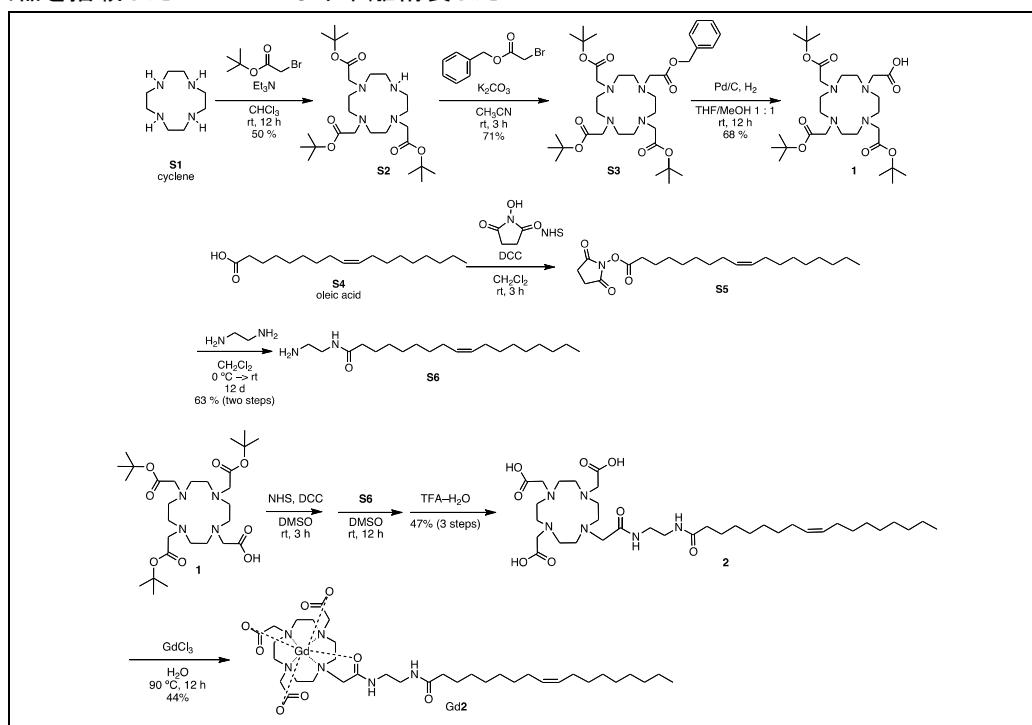
2. 研究成果

2. 1 疾患部位に高い親和性を有するナノパーティクル型 MRI-CA

多くの循環器系疾患の直接的原因ともなるアテローム生動脈硬化症の *in vivo* 検出を目的として、アテロームに高い親和性を有する低密度性リポタンパク質 (low-density lipoprotein, LDL) を MR 活性型プローブで修飾し, *in vivo* 試験に用いた。

2. 1. 1 MRI 活性プローブの合成

インターカレーションにより LDL を修飾する MR 活性型プローブとして、臨床で日常的に使われている MRI プローブのうち、毒性の高い Gd^{3+} の解離が比較的少ない DO3A 誘導体を合成した (Scheme 1)。すべての中間体の構造は 1H -, ^{13}C -NMR, MS, IR など分光学的に完全にキャラクタライズし, UV-Vis 検出不可能な最終化合物 (2 および **Gd2**) は, Nano Quantity Analyte 検出器を搭載した HPLC により単離精製した。



Scheme 1. Synthesis of MR-active probe (**Gd2**) and its precursor (**2**).

2. 1. 2 MRI 活性型ナノパーティクルの調製とキャラクタリゼーション

2. 1. 2. 1 直接インターカレーションによるナノパーティクル (Particle A) の修飾: 上記のように合成した Gd2 を用いて, 直接的に LDL の脂質膜へのインターカレーションを試みた (Figure 1). LDL は Children Hospital of Philadelphia の Lund-Katz 教授の研究室で健康なドナーから繰り返し遠心により精製されたフレッシュなヒト LDL を, 透析後用いた. インターカレーションは, PBS(-) 中, 室温, 2 時間の条件で行った.

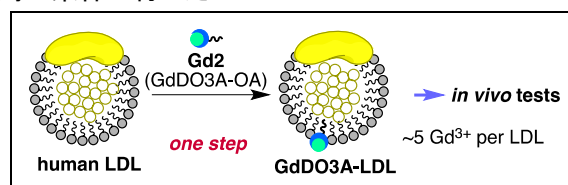


Figure 1. Schematic illustration of LDL-modification with Gd2 by one-step intercalation (Particle A).

結果, 一定の割合で Gd2 を LDL にロードする事に成功した. ICP-MS データからほぼ LDL 一つに Gd^{3+} が 5 個ロードされ, DLS データからアグリゲーションする事なくナノパーティクルが精製した事が示された. これを用いて, *in vivo* 投与実験および, MR イメージング実験を進めると共に, 更に高い効率で Gd^{3+} をロードさせるためのパーティクル修飾の最適化を行った.

2. 1. 2. 2 インターカレーション後の Gd^{3+} キレーション反応によるナノパーティクル (Particle A) の調製: LDL 粒子当りの Gd^{3+} のロード量を向上させ, より効率よいエンハンスメントを得るため, LDL 修飾を, 水溶性の高い 2 を先に LDL へインターカレートさせてから, 次いで Gd^{3+} キレーション反応を行う手順 (Figure 2) に変えて最適化を行った. Gd^{3+} キレーション反応に伴い, 余剰のフリーの Gd^{3+} が LDL 表面上に存在する事が予測されるため, それを別の強力なキレート剤 tropolone で沈殿させ, 除去した. 調製した Gd^{3+} 修飾型 LDL は DLS 測定と CryoTEM 測定 (Figure 3, Paul Scheer 研究所の Ishikawa 博士の協力による) の結果, アグリゲーションが見られなかった. 詳細な最適化の結果, LDL 一粒子当たり, 200 Gd^{3+} のロードが可能となり, これを用いて, *in vivo* 投与実験および, MR イメージング実験を行う事とした.

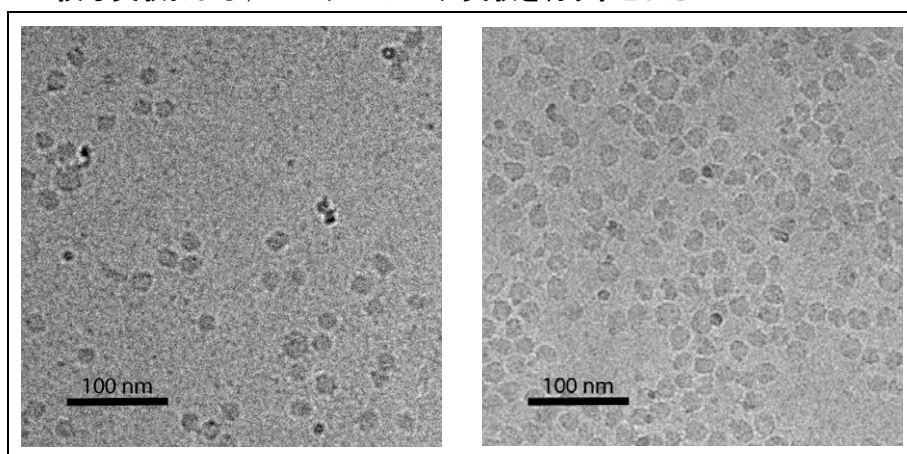


Figure 3 CryoTEM images of particle B nanoparticles (left) and intact LDL (right). The nanoparticles exist as dispersed single particles in buffer in both images. (The small dark spots in images are ice crystals generated during sample preparation.)

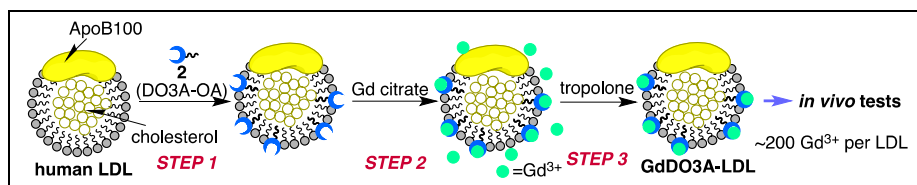


Figure 2. Schematic illustration of LDL-modification with **2** by intercalation and subsequent chelation reactions (**Particle B**).

2. 1. 3 *in vivo* 投与試験

モデルマウスとしては、University of Pennsylvania, Department of Pharmacology の FitzGerald 教授の協力のもと、ApoE ノックアウトマウス (*ApoE*^{-/-}) および LDL ノックアウトマウス (*LDL*^{-/-}) に数ヶ月間高脂肪飼料を与えた動脈硬化疾患モデルマウスを作成し、用いた。すべてのプロトコールは、University of Pennsylvania, Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) に申請後許可されたものを用いた。

2. 1. 3. 1 Particle A を用いた投与試験: PBS(-)中に調製した **Particle A** を *ApoE*^{-/-} 尾静脈から投与した。コントロールとして低分子型 GdDO3A 化合物である ProHance®を投与した。一日後、各々のマウスから、動脈組織を取り出し、Gd³⁺量を定量するために、ICP-MS 測定に供した。結果、Table 1 に示すように、ProHance®投与群から取り出した動脈組織からは、Gd³⁺は有意に検出されなかったが、**Particle A** 投与群では、有意な Gd³⁺の集積が見られた。この結果から、LDL が Vehicle として Gd³⁺を動脈硬化疾患部位へ運搬している事が示された。

Table 1 The accumulation of Gd³⁺ in the aorta of *apoE*^{-/-} mice receiving **Gd2-loaded LDL (Particle A)** versus ProHance®

Tracer injected	Dose of Gd ³⁺ [μmol Gd/kg]	Dry wt of aortic tissue	Gd ³⁺ content by ICP-MS [ppm]
Gd2-loaded LDL	0.16*	8.3 mg	0.073
Prohance®	11.6	5.1 mg	undetectable

* Estimated based on the ICP-MS result of labeled LDL.

2. 1. 3. 2 Particle B を用いた投与試験: 前項2. 1. 3. 1に示した方法と同様にして、**Particle B** をモデルマウス、*ApoE*^{-/-}および *LDL*^{-/-}に投与した。コントロールとしては非疾患マウスである C57BL/6j に同様の試験を行った。投与 72-96 時間後、各々のマウスから動脈組織を取り出して、ICP-MS 測定に供した。結果、Table 2 に示すように、非疾患マウスの動脈組織からは、0.32 ppm 程度の量の Gd³⁺が検出されたのみであったのに対して、疾患モデルマウス *ApoE*^{-/-}からは 5.4 ppm, *LDL*^{-/-}からは、6.8 ppm の高濃度の Gd³⁺が検出された。この結果から、調製した Gd³⁺ラベル型 LDL ナノパーティクルは、疾患モデルマウスにおいて動脈硬化症組織に集積し、イメージング剤として機能する事が、大きく期待された。

Table 2. Quantification of the Gd³⁺ content in artery segments of mice injected with **Particle B**¹

	Mouse models		
	<i>ApoE</i> ^{-/-} (n=7)	<i>LDLr</i> ^{-/-} (n=12)	C57BL/6j (n=4)
Tissue dry weight [mg]	0.24 ± 0.14	0.30 ± 0.14	0.45 ± 0.26
Gd ³⁺ content [ppm]	5.4 ± 3.9 ^{2,3}	6.8 ± 3.0 ⁴	0.32 ± 0.44

¹ The data are presented as mean ± stdev.

² $p = 0.44$ from the Student's *t*-test comparing Gd³⁺ content in atheromas of *ApoE*^{-/-} vs *LDLr*^{-/-} mice.

³ $p = 0.014$ when comparing the Gd³⁺ content in atheromas of *ApoE*^{-/-} versus C57BL/6j mice.

⁴ $p = 1.04 \times 10^{-5}$ when comparing the Gd³⁺ content in atheromas of *LDLr*^{-/-} versus C57BL/6j mice.

2. 1. 4 *in vivo* MR イメージング試験

2. 1. 4. 1 **Particle A** を用いた MR イメージング試験: *In vivo* MR イメージングは、ペンシルバニア大学医学部の Zhou 教授と共同で、ペンシルバニア大学 Small Animal Imaging Facility 内の Varian Direct Drive コンソールと、horizontal bore (ID = 33 cm) 9.4 T magnet を用いて行った。quadrature volume ¹H coil (ID = 3.5 cm, length = 8 cm) を 40 gauss cm⁻¹ までグラジエント磁場をかけられる gradient coil に挿入し、用いた。疾患モデルマウス *ApoE*^{-/-} はイソフラン麻酔下、温風により 36.5 °C に保たれたコア内で、心電図および呼吸をモニター下、イメージングされた。投与前にプレスキャンを行った後、尾静脈より **Particle A** の投与を行い、30, 100, 220 分後にマウスの MR イメージングを行った (Figure 4)。

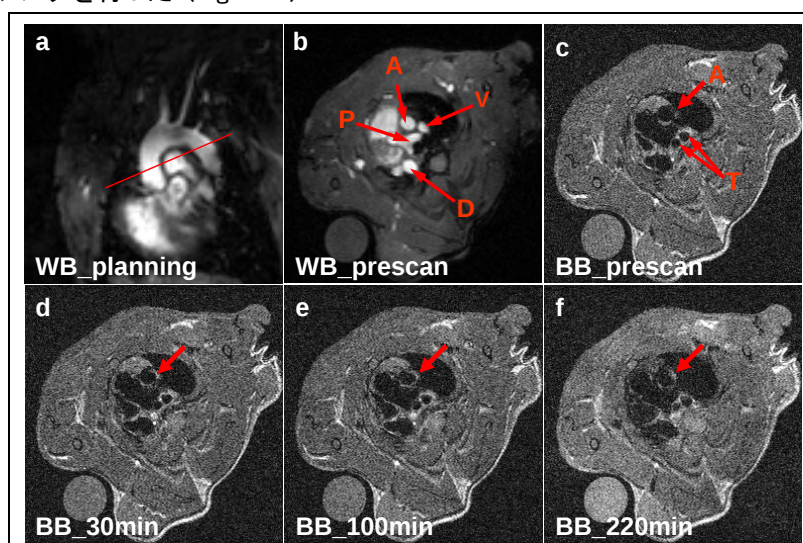
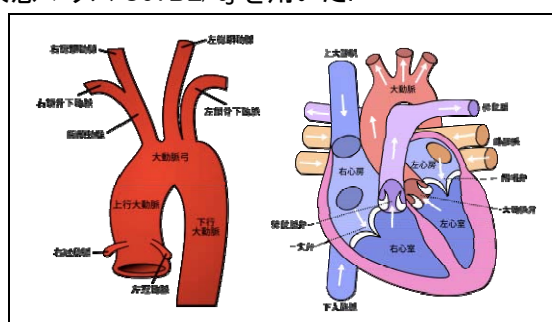


Figure 4 *In vivo* MR imaging of atherosclerosis in an apoE^{-/-} mouse model (a) A scout image showing the slice selection parallel to the red line; (b) A white blood image enabling the ascending aorta (A), descending aorta (D), pulmonary artery (P), and vena cava (V) to be identified; (c) a black blood image pre-contrast (T: trachea); and black blood images; (d) 30 min; (e) 100 min; (f) 220 min post administration of Gd₂-loaded LDL (**Particle A**). FOV = 26 × 26 mm, matrix size = 256 × 192, slice thickness = 0.5 mm.

結果、10 分後、220 分後にわずかではあるが、ascending aorta (Figure 4 中、A で示された部位) に有意なエンハンスメントが見られた。これは疾患部位と一致しており、用いた **Particle A** が疾患

検出に役立つ事が示唆された。視覚的により明確なイメージングを可能とするため、更に LDL 当りの Gd^{3+} のロード量を向上させた LDL ナノパーティクルを用いる事が有用であると考えられた。また、本試験においては、組織のイメージングを確実に同一の箇所で行うために、マウスをマグネット内で麻酔したまま 220 分後まで放置したが、この時間がマシンタイムの兼ね合い、動物愛護法の制約からもほぼ限界と言えた。

2. 1. 4. 2 Particle B を用いた MR イメージング試験: 高い Gd^{3+} ロード量を有する Particle B を、モデルマウス *ApoE^{-/-}* に投与し、MR イメージング試験を行った。前項と同様、Zhou 教授と共同にて、同一の装置を用いた。より長時間のスパンでの実験を行うため、投与前のプレスキャンを行った後、一度装置からマウスを取り出し、投与後 24, 48, 96 時間後、MR イメージングを行った。コントロールとしては、非疾患マウス C57BL/6j を用いた。



参照:動脈, 心臓の組織 (Wikipedi より転載)

結果、コントロールマウスでは有意なエンハンスメントが見られなかったのに対し、*ApoE*^{-/-}においては、顕著なエンハンスメントが見られた(Figure 5h). 特に、Figure 5b, c に示されるように、投与後 24, 48 時間後に、brachiocephalic artery (BA, 腕頭動脈)部位において、視覚的に明らかなエンハンスメントが見られた。更に、Figure 5f, g には、投与後 48, 96 時間における、pulmonary trunk (PT, 肺動脈) 部位におけるエンハンスメントが示される。

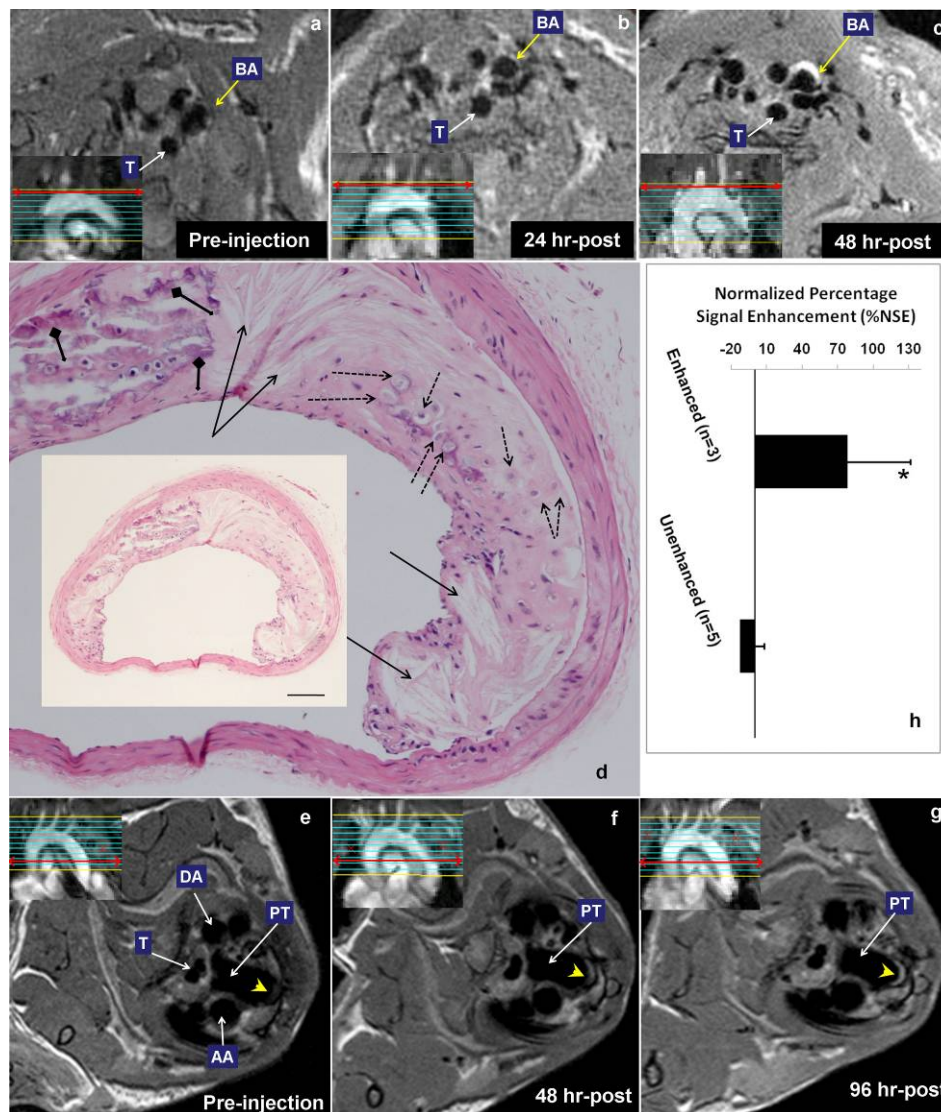


Figure 5. *In vivo* MR imaging results and histopathological findings in *ApoE*^{-/-} mice injected with **GdDO3A-LDL**. T = trachea, BA = brachiocephalic artery, AA = ascending aorta, DA = descending aorta, PT = pulmonary trunk. (a-c) Images obtained at pre- and 24 and 48 hours post-injection of **GdDO3A-LDL** into an *ApoE*^{-/-} mouse demonstrate enhancement of an atheroma in the wall of the BA (image c). (d) Cellular components of the atheroma visualized in image c (inset: the entire H&E stained cross-section). Major features of the atheroma include macrophages (dotted arrows), areas containing crystallized cholesterol (arrows), and calcium deposits as a cellular dark purple band (arrows with diamond head). Scale bar = 100 μ m. (e-g) Images from a separate mouse that show enhancement of the pulmonary trunk at 48 and 96 hours post-injection as compared to pre-injection. The inset images in a-c and e-g are scout images in the coronal view where the thoracic aorta and its three branches are clearly shown; the branch on the left is the BA. The red line in the scout images indicates the axial plane of the image shown in the same panel. (h) Signal enhancement estimated from MR images by the formula below using the chest muscle as a reference ($p = 0.01$ comparing enhanced versus unenhanced arteries by the Student's *t*-test). $\%NSE = 100\% \times ((I_{wallpost} / I_{musclepost}) / (I_{wallpre} / I_{musclepre}) - 1)$

イメージングに用いた疾患モデルマウスから動脈組織を取り出し、通常の染色法（ヘマトキシリン&エオシン法）を用いた組織切片の観察を行ったところ、MR イメージングにおいてエンハンスされた部位と同一の部位において、コレステロールクリスタル、form cell、マクロファージなどが

観察され (Figure 5d), この結果から、動脈硬化疾患部位が特異的にイメージングにおいてエンハンスされていたと言う事が示された。

2. 2 疾患部位において過剰発現するタンパク質をターゲットとした MRI-CA

—非公開の研究成果の項目へ—

3. 今後の展開

LDL ナノパーティクル型 MRI-CA は、究極的には患者本人の血液から精製した LDL を修飾し、再びイメージング剤として投与する事で、感染性、或いは、免疫毒性の問題をクリアする事ができる。その点で、臨床に比較的早く持つて行く事も可能ではないかと考えられる。他方、フラーレン型 MRI-CA に関しては、全く新規な試薬であるため、実際の人間への応用を考えるとかなり長期的に先になると思われる。しかし、新規な分子設計などには化学的には興味深い点もあり、また、疾患特異的なタンパク質を実験動物レベルで *in vivo* に検出できたら、疾患の原因或いは悪化のメカニズム研究に欠かせない試薬となる点で、重要であると考ええる。後者の試薬に関しては、まだ合成途上でその評価も未決であるが、引き続き研究を続け、分子合成およびモデル動物を用いた *in vivo* 実験へと進める予定である。

4. 自己評価

本研究においては、疾患特異的な *in vivo* MR イメージング法開発の目的で、(1)ナノパーティクル型コントラスト試薬 (MRI-CA) と、(2)ペプチド型 MRI-CA の開発に取り組んだ。前者の研究においては、試薬の合成、調製、最適化まで進める事ができ、それを用いた *in vivo* 実験にも成功した。後者の研究に関しては分子が全くの新規であるため合成に手間がかかり、分子の完成に近いとはいえ、到達はしていない。その点で、この研究は未完成であると考ええる。しかし、前者の研究を進めた事で、疾患モデルマウスの確立、*in vivo* MR イメージング法の確立と言った、申請者にとって新規な分野を開拓できた点で、非常に有益であったと考える。

研究の進度が遅れたのは、(1) 開始当初所属していたペンシルバニア大学と JST の間での契約が知財を巡ったディスカッションに伴い研究費の支給が遅れた、(2) 自己都合であるが、研究期間内に、アメリカの大学からスイスの大学に異動する事になったため、ラボの再立ち上げと学生の獲得に時間がかかった、という要因があるが、自分自身も仕事が速い方ではないという点が一番大きかったと思われる。しかし、ともに研究を進めている共同研究者や学生たちはプロジェクトに多大な興味を示してくれているため、その点ではスムーズに事が運んだのではないと思う。

5. 研究総括の見解

In vivo において疾患を特異的に検出する目的で、超分子構造を有する二種類の MR イメージング用のコントラスト試薬 (MRI-CA)を開発することが研究のねらいである。すなわち、① 疾患部位に高い親和性を有するナノパーティクル型 MRI-CA、および、② 疾患部位において過剰発現するタンパク質をターゲットとした MRI-CA(非公開の研究成果)である。

ここでは①について記述する。②については、ある時期を経過してから、内容評価できるものと考えている。

多くのアテローム性動脈硬化症の *in vivo* 検出を目的として、アテロームに高い親和性を有する低密度性リポタンパク質 (low-density lipoprotein, LDL) を MR 活性型プローブで修飾し、さらに Gd^{3+} の解離が比較的少ない DO3A 誘導体を合成して *in vivo* 試験に用いた。その結果、有意な Gd^{3+} の集積が見られ、LDL が Vehicle として Gd^{3+} を動脈硬化疾患部位へ運搬している事が示された。投与後 24, 48, 96 時間後に、brachiocephalic artery (BA, 腕頭動脈) 部位において、視覚的に明らかなエンハンスメントも見られた。

LDL ナノパーティクル型 MRI-CA は、患者本人の血液から精製した LDL を修飾し、再びイメージング剤として投与する事によって感染性や免疫毒性の問題をクリアする事ができるという点では、臨床に比較的早く持っていく事も可能ではないかと期待される。他方、②に関しては、全く新規な試薬であるため、人間への応用を考えるとかなり長時間を要すると思われるが、新規な分子設計など化学的には興味深い点が数々あり興味深い成果が得られている。また、疾患特異的なタンパク質を実験動物レベルで *in vivo* に検出できたら、疾患の原因或いは悪化のメカニズム研究に欠かせない試薬となる可能性を秘めている点でも興味深い。①においては、試薬の合成、調製、最適化まで進め、*in vivo* 実験にも成功しすぐれた研究として評価できよう。②についても、まだすべての合成が完成段階にいたっていないものの、高度の合成技術を要する新規化合物の創製が期待でき、引き続き本課題の研究を続け、分子合成およびモデル動物を用いた *in vivo* 実験へと進めてほしいと考える。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yamakoshi, Y.*; Lowell, A. N.; Woods, M.; Paulose, B.; Nakao, Y.; Zhang, H.; Liu, T.; Lund-Katz, S.; Zhou, R.*: LDL-based nanoparticles for contrast enhanced MRI of atheroplaques in mouse models. *Chem. Comm.* **2011**, 47, 8835–8837.

(2) 特許出願

特になし。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Research Excellence Award from American Heart Association (Nov. 3rd 2011)
2. ETH grant (Oct. 2011–present)
3. Swiss National Foundation, research project grant (Apr. 2012–)