

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20350080

研究課題名（和文） 金属被覆リポソーム「メタロソーム」の作製とマニピュレーション機能

研究課題名（英文） Preparation of Metal-coated Liposomes “Metallosomes” and Their Manipulation Function

研究代表者

菊池 純一（KIKUCHI JUN-ICHI）

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90153056

研究成果の概要（和文）：本研究では、申請者らが独自に開発した高強度の人工細胞膜「セラソーム」の構造的特徴を活かして、その表面を金属で被覆した新規の有機-無機-金属複合ナノ材料を開発し、その特異的機能の創出を目指した。その結果、ベシクル構造やディスク構造を有する脂質二分子膜を様々な金属超薄膜で被覆した人工細胞膜の作製が可能になり、これらの人工細胞膜に賦与した分子認識能にもとづく特徴的なマニピュレーション機能が発現した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we designed artificial cell membranes coated with ultrathin metallic layer as a novel hybrid nanomaterial. The metal-coated liposomal membranes were prepared by adopting electroless plating technique on the cerasomes as highly stable artificial cell membranes developed by us. We also clarified characteristic manipulation behavior of artificial cell membranes having vesicular or disk-like structure, based on the molecular recognition functionally introduced into the membranes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：自己組織化・超薄膜・複合ナノ材料・人工細胞膜・メタロソーム・セラソーム・無電解めっき・マニピュレーション機能

1. 研究開始当初の背景

脂質二分子膜の小胞体であるリポソームは、人工細胞膜としての利用が可能であり、医学や工学等への展開を目指して、生体関連化学分野を中心に基礎研究ならびに応用研究が活発に行われている。近年、我々はリポソームにセラミックス材料の構造特性を融合させた新規の人工細胞膜「セラソーム」を開発し、この複合新材料が従来のリポソーム

の欠点を補う人工細胞膜として有効であることを明らかにしてきた。例えば、セラソームはリポソームに比べて構造的に極めて安定であり、リポソームでは形態保持が困難な条件下での利用が可能である。また、セラソームの膜表面は、シリカセラミックスと類似の構造ならびに反応性を有しており、これまで世の中には存在しなかった新規の複合ナノ材料を開発できる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、セラソーム表面に形成されるセラミック層をインターフェースに用いて、脂質膜上にナノメタル構造を導入することで、新規の有機-無機-金属複合ナノ材料「メタロソーム」を開発することを目的とした。また、脂質二分子膜の自己組織化能を利用して様々な認識部位を導入することで、外部刺激に応答する人工細胞膜を作製し、その特異的なマニピュレーション機能を明らかにすることを目指した。

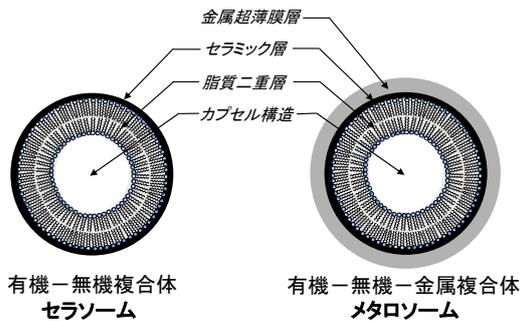


図1. セラソームとメタロソームの構造

3. 研究の方法

リポソーム型の二分子膜ベシクルに金属被覆を行うためには、膜の構造安定性が重要である。そこで、有機脂質分子から形成されるリポソームよりも、構造安定性に優れているセラソームを主に用いて実験を行った。セラソームは、頭部にトリアルコキシシリル基をもつ二本鎖型の脂質を合成し、これを水に分散することで作製した。セラソームの金属被覆は、電子材料分野の微細加工技術として近年注目されている無電解めっき法を用いて行った。作製されたメタロソームの構造・物性評価には、透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、蛍光顕微鏡による各種顕微鏡観察や、エネルギー分散型X線分光法 (EDS)、電子エネルギー損失分光法 (EELS) 等をはじめとする各種の物理化学的測定法を用いた。

4. 研究成果

(1) 金属被覆可能な人工細胞膜のデザイン

セラソームは、カプセル構造をもつ有機-無機複合ベシクルであり、その作製法については我々のこれまでの研究で明らかになっている。本研究では、この手法を用いてセラソームを作製し、セラソーム表面に形成されているシリカセラミックス構造に対して無電解めっき法を適用することで、金属超薄膜で被覆された人工細胞膜を作製した。セラソーム形成脂質としては、頭部にトリエトキシシリル基を、主鎖に分子間水素結合効果で会合安定性を与える尿素結合部位をもつ二本鎖型の脂質分子を用いたが、無電解めっきプロセスを効率よく進行させるために、金属配

位部位をもつ脂質を混合してセラソームを作製した。また、頭部に四級アンモニウム基を導入したカチオン性のセラソーム形成ペプチド脂質も用いた。

一方、セラソーム形成脂質と単独では二分子膜形成能をもたない短鎖の二本鎖型リン脂質を混合することで、ディスク状の有機-無機複合体を作製できることを新たに見出した。このディスクは、2種の脂質のマイクロ相分離によって形成されるが、ディスクのエッジが短鎖のリン脂質で、ディスク平面が長鎖のセラソーム形成脂質の二分子膜構造で構成されている。また、脂質の組み合わせを変えることで、ディスクのエッジがセラソーム形成脂質、平面部がリン脂質で構成することもできる。このようなディスク構造は、鎖長の異なる2種類のリン脂質からも形成され、バイセルとよばれているが、膜タンパク質等の研究に有用なモデル細胞膜として注目されている。本研究で開発したバイセル型有機-無機ハイブリッドナノディスク「シリカバイセル」は、ディスクのエッジあるいは平面部をシロキサンネットワークで構造強化しており、新たな人工細胞膜としての利用が期待できる。このシリカバイセルにも、無電解めっき法を適用することで、ディスク型の金属被覆人工細胞膜を作製することが可能である。

(2) 無電解めっき法による人工細胞膜の金属被覆と構造・物性評価

まず、金属被覆人工細胞膜の作製条件を明らかにした。Pd(II)イオンのような触媒となる金属イオンをセラソームに結合させ、これを還元剤で化学的に還元して活性化し、所定の金属イオンを含むメッキ浴に浸漬することでセラソームの金属被覆が進行した。反応種の濃度や混合比率、反応温度や反応時間を調整することで、金属超薄膜の厚みをナノメートルレベルで制御することが可能になった。セラソームを金属被覆する前後の典型的なSEM像を図2に示す。このような人工細胞膜の金属被覆は、構造安定性に優れたセラソームを用いることで可能になったが、同様な反応条件下で、従来型の二分子膜形成脂質では、ベシクル形態を保ったままの金属被覆は困難であり、メタロソーム作製におけるセラソームの優位性が明らかになった。

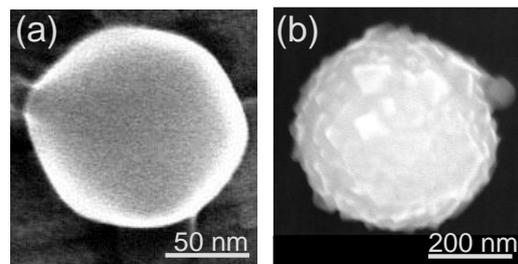


図2. セラソーム(a)とメタロソーム(b)のSEM像

セラソーム表面は、シリカセラミックスの表面と類似の構造を有しており、シリカセラミックス表面に適用できる無電解めっきによる金属被覆は、原理的にすべて行うことができる。その結果、金、銀、ニッケルをはじめ、様々な金属超薄膜の導入が可能になり、磁性合金での被覆したメタロソームも開発した。作製したメタロソームの構造評価は、TEM や SEM の電子顕微鏡観察に加えて、EDS や EELS 等の元素分析ならびに元素マッピングからも確認した。また、TEM トモグラフィーの3D画像から、メタロソームにおいてもカプセル構造が保持されていることを確認した(図3)。

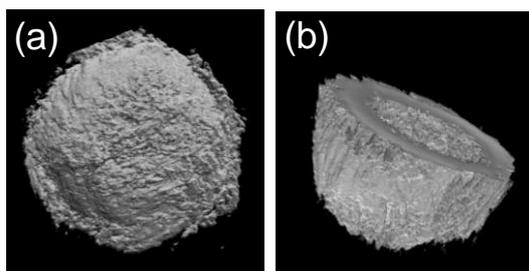


図3. メタロソームのTEM トモグラフィー像：全体像(a)と断面像(b)

(3) 人工細胞膜のマニピュレーション機能

本研究で開発した人工細胞膜の新たな機能を明らかにするために、外部刺激に応答したマニピュレーション機能について評価した。まず、脂質二分子膜の表面に分子認識部位を導入することにより、人工細胞膜の集散が可逆的にできることを明らかにした。例えば、DNA鎖を有するコレステロール誘導体を膜に非共有結合的に組み込むことで、DNAの相補的分子認識を利用した人工細胞膜のマニピュレーションが可能になった。また、金属イオンの認識部位を膜表面に導入すると、金属イオンとの配位相互作用にもとづいて人工細胞膜の集散を制御することができるが、金属イオン認識能にさらに光応答性をもたせることで、人工細胞膜の集散を光シグナルで可逆的に制御することも明らかにした。セラソームは、従来のリポソームと異なり、分子サイズに依存した特異的な膜透過能を有することもわかった。一方、セラソームの表面を鉄、コバルト、ニッケルからなる磁性合金の超薄膜で被覆することによって、磁場に応答する人工細胞膜を開発し、磁気によるマニピュレーションが可能であることを実証した。

以上のように、人工細胞膜に様々な認識部位を導入することで、分子やイオン、光、磁気等の外部シグナルに応答してマニピュレーションを行えるインテリジェント分子システムを構築できることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① K. Yasuhara, T. Kawasaki, S. Okuda, S. Oshima, J. Kikuchi, Spontaneously Formed Semipermeable Organic-Inorganic Hybrid Vesicles Permitting Molecular Weight Selective Transmembrane Passage, *Chem. Commun.*, 査読有, Vol.49, No.7, 2013, pp.665-667.
DOI: 10.1039/c2cc36662b
- ② K. Yasuhara, H. Hayashi, J. Kikuchi, Thermal Stability of Synthetic Lipid Bicycles Encompassed by Siloxane Surfaces as Organic-Inorganic Hybrid Nanodiscs, *Chem. Lett.*, 査読有, Vol.41, No.10, 2012, pp.1223-1225.
DOI: 10.1246/cl.2012.1223
- ③ M. Mukai, K. Maruo, Y. Sasaki, J. Kikuchi, Intermolecular Communication on a Liposomal Membrane. Enzymatic Amplification of a Photonic Signal with Gemini Peptide Lipid as a Membrane-bound Artificial Receptor, *Chem. Eur. J.*, 査読有, Vol.18, No.11, 2012, pp.3258-3263.
DOI: 10.1002/chem.2011103552
- ④ 菊池純一, バイオ・ナノハイブリッドマテリアルの創成と分子通信デバイスとしての可能性, *化学工業*, 査読無, Vol.63, No.3, 2012, pp.182-187.
<http://www.kako-sha.co.jp/>
- ⑤ Y. Ma, Z. Dai, Y. Gao, Z. Cao, Z. Zha, X. Yue, J. Kikuchi, Liposomal Architecture Boosts Biocompatibility of Nanohybrid Cerasomes, *Nanotoxicology*, 査読有, Vol.5, No.4, 2011, pp.622-635.
DOI: 10.3109/17435390.2010.546950
- ⑥ T. Kawataki, K. Yasuhara, J. Kikuchi, Remarkable Long-Term Stability of Cerasome as an Organic-Inorganic Hybrid Nano-Container for Water-Soluble Macromolecules, *Chem. Lett.*, 査読有, Vol.40, No.5, 2011, pp.461-463.
DOI: 10.1246/cl.2011.461
- ⑦ X. Liang, X. Yue, Z. Dai, J. Kikuchi, Photoresponsive Liposomal Nanohybrid Cerasomes, *Chem. Commun*, 査読有, Vol.47, No.16, 2011, pp.4751-4753.
DOI: 10.1039/c1cc00063b
- ⑧ K. Yasuhara, Z. Wang, T. Ishikawa, J. Kikuchi, Y. Sasaki, S. Hiyama, Y. Moritani, T. Suda, Specific Delivery of Transport Vesicles Mediated by Complementary Recognition of DNA Signals with Membrane-bound Oligonucleotide Lipids,

- Supramol. Chem.*, 査読有, Vol.23, No.3-4, 2011, pp.218-225.
DOI: 10.1080/10610278.2010.521835
- ⑨ 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.*, 査読有, Vol.9, No.7, 2011, pp.2397-2402.
DOI: 10.1039/c0ob00918k
- ⑩ K. Yasuhara, S. Miki, H. Nakazono, A. Ohta, J. Kikuchi, Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Bicelles – Lipid Bilayer Nanodiscs Encompassed by Siloxane Surfaces, *Chem. Commun.*, 査読有, Vol.47, No. 16, 2011, pp.4691-4692.
DOI: 10.1039/c1cc10254k
- ⑪ Z. Cao, Y. Ma, X. Yue, S. Li, Z. Dai, J. Kikuchi, Stabilized Liposomal Nanohybrid Cerasomes for Drug Delivery Applications, *Chem. Commun.*, 査読有, Vol.46, No.29, 2010, pp.5265-5267 (2010).
DOI: 10.1039/b926367e
- ⑫ M. Hashizume, H. Horii, J. Kikuchi, M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, Effects of Surface Carboxylic Acid Groups of Cerasomes, Morphologically Stable Vesicles Having a Silica Surface, on Biomimetic Deposition of Hydroxyapatite in Body Fluid Conditions, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 査読有, Vol.21, No.1, 2010, pp.11-19.
DOI: 10.1007/s10856-009-3829-7
- ⑬ Y. Sasaki, Y. Shioyama, W.-J. Tian, J. Kikuchi, S. Hiyama, Y. Moritani, T. Suda, A Nano Sensory Device Fabricated on a Liposome for Detection of Chemical Signals, *Biotechnol. Bioeng.*, 査読有, Vol.105, No. 1, pp.37-43.
DOI: 10.1002/bit.22521
- ⑭ M. Mukai, K. Maruo, J. Kikuchi, Y. Sasaki, S. Hiyama, Y. Moritani, T. Suda, Propagation and Amplification of Molecular Information using a Photo-responsive Molecular Switch, *Supramol. Chem.*, 査読有, Vol.21, No.3-4, 2009, pp.284-291.
DOI: 10.1080/10610270802468439
- ⑮ Z.-F. Dai, W.-J. Tian, X.-L. Yue, Z.-Z. Zheng, J.-J. Qi, N. Tamai, J. Kikuchi, Efficient Fluorescence Resonance Energy Transfer in Highly Stable Liposomal Nanohybrid Cerasome, *Chem. Commun.*, 査読有, No.15, 2009, pp.2032-2034.
DOI: 10.1039/b900051h
- ⑯ 菊池純一, ハイブリッド人工細胞「セラソーム」の創成とその展開, *未来材料*, 査読無, Vol.8, No.6, 2008, pp.51-57.
<http://www.nts-book.co.jp/mirai/bn2008.html>
- ⑰ 橋詰峰雄, 佐々木善浩, 寺島崇, 小松孝禎, 菊池純一, DNA をテンプレートとしたセラソーム集積構造の構築, *高分子論文集*, 査読有, Vol.65, No.6, 2008, pp.421-426.
<http://dx.doi.org/10.1295/koron.65.421>
- ⑱ D. Minamida, S. Okada, M. Hashizume, Y. Sasaki, J. Kikuchi, N. Hosoito, T. Imori, Creation of Magnetic Cerasomes through Electroless Plating and Their Manipulation Using External Magnetic Fields, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 査読有, Vol.48, No.1-2, 2008, pp.95-101.
DOI: 10.1007/s10971-008-1757-5
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 安原主馬, 大島匠平, 菊池純一, 有機-無機ハイブリッドベシクルの分子ふるい機能とバイオナノリアクターへの応用, 日本化学会第93春季年会, 2013年3月23日, 滋賀県草津市.
- ② J. Kikuchi, Cerasomes as an Organic-Inorganic Nanohybrid Material, The International Symposium on Preparative Chemistry of Advanced Materials 2012, 2012年9月14日, Shenyang, P.R. China.
- ③ 安原主馬, 奥田静代, 大島匠平, 菊池純一, セラソームの半透膜機能とその制御, 第61回高分子学会年次大会, 2012年5月29日, 神奈川県横浜市.
- ④ K. Yasuhara, H. Hayashi, S. Kitazato, J. Kikuchi, Organic-Inorganic Hybrid Bicelles: Lipid Bilayer Nanodiscs Stabilized with Siloxane Surface, International Association of Colloid and Interface Scientists (2012), 2012年5月14日, 宮城県仙台市.
- ⑤ 安原主馬, 林宏樹, 中園元, 菊池純一, 脂質二分子膜を有する有機-無機ハイブリッドナノディスクの形成とバイオ応用, 第5回バイオ関連化学シンポジウム, 2011年9月12日, 茨城県つくば市.
- ⑥ K. Yasuhara, J. Kikuchi, Organic-Inorganic Hybrid Bicelles as Supramolecular Scaffolds for Reconstitution of Membrane Proteins, 6th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, 2011年7月3日, Brighton, UK.
- ⑦ J. Kikuchi, Cerasomes: A New Family of Artificial Cell Membranes with Ceramic Surface, 26th Philippine Chemistry

- Congress, 2011 年 4 月 13 日, Cebu, Philippine.
- ⑧ K. Yasuhara, S. Miki, J. Kikuchi, Fabrication of Well-defined Organic-Inorganic Hybrid Nanodiscs by the Self-assembly of Organoalkoxysilane Lipid, The 2011 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010 年 12 月 16 日, Honolulu, USA.
- ⑨ H. Nakazono, S. Miki, K. Yasuhara, J. Kikuchi, Self-assembly Directed Formation of Lipid Bilayer Nanodiscs Stabilized by Siloxane Network, 18th International Symposium on Surfactants in Solution, 2010 年 11 月 16 日, Melbourne, Australia.
- ⑩ K. Yasuhara, S. Miki, J. Kikuchi, Formation of Organic-Inorganic Hybrid Bicelles and Their Characteristics, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science, 2010 年 9 月 20 日, 千葉県千葉市.
- ⑪ J. Kikuchi, K. Yasuhara, K. Xu, T. Kawataki, Metallosomes: Nanohybrid Vesicles with Organic, Ceramic and Metallic Layers, International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals 2010, 2010 年 7 月 8 日, 京都府京都市.
- ⑫ K. Yasuhara, J. Kikuchi, Bio-inspired Molecular Communication System Based on Molecular Recognition on Artificial Cell Membrane, 5th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, 2010 年 6 月 9 日, 奈良県奈良市.
- ⑬ 王忠華, 伊藤裕志, 安原主馬, 菊池純一, シグナル応答性分子スイッチを用いる人工膜輸送システム, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 17 日, 熊本県熊本市.
- ⑭ 三木章平, 安原主馬, 菊池純一, 自己組織化による有機-無機ハイブリッドナノディスクの形成, 日本ブルーゲル学会第 7 回討論会, 2009 年 7 月 30 日, 京都府京都市.
- ⑮ J. Kikuchi, Z.-H. Wang, K. Yasuhara, S. Hiyama, Y. Moritani, T. Suda, Design of an Artificial Membrane Traffic System for Molecular Communication, 4th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, 2009 年 6 月 22 日, Maastricht, Netherlands.
- ⑯ 菊池純一, 王忠華, 向井理, 安原主馬, 檜山聡, 森谷優貴, 須田達也, 人工細胞を用いるメンブレントラフィックシステムの構築, 第 5 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2009 年 5 月 30 日, 栃木県宇都宮市.
- ⑰ 菊池純一, ナノハイブリッド材料としての金属被覆人工細胞膜「メタロソーム」の構造特性, 京都・先端ナノテク総合支援ナノテクシンポジウム, 2008 年 12 月 12 日, 奈良県生駒市.
- ⑱ 菊池純一, 錯体化学とバイオサイエンスの接点—人工細胞膜上での動的錯形成と機能発現—, 九州錯体化学懇談会総設 40 周年記念シンポジウム, 2008 年 11 月 1 日, 福岡県福岡市.
- ⑲ 菊池純一, 谷峰, 南田大樹, 伊森徹, 金属被覆人工細胞膜「メタロソーム」の構造特性, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008 年 9 月 18 日, 神奈川県横浜市.
- ⑳ 谷峰, 菊池純一, 伊森徹, 有機-無機-金属ナノハイブリッドベシクル「メタロソーム」の作成と構造変化, 日本ブルーゲル学会第 6 回討論会, 2008 年 7 月 31 日, 愛知県名古屋市.
- [図書] (計 3 件)
- ① J. Kikuchi, K. Yasuhara, Transmission Electron Microscopy (TEM), in “*Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*”, Vol. 2, P. A. Gale, J. W. Steed, eds., John Wiley & Sons, Chichester, 2012, pp.633-645.
- ② 橋詰峰雄, 佐々木善浩, 菊池純一, 三次元集積化ナノハイブリッド材料としてのセラソーム, 「*ナノハイブリッド材料の開発と応用*」, シーエムシー出版, 2011, pp.134-144.
- ③ J. Kikuchi, K. Yasuhara, Cerasomes: A New Family of Artificial Cell Membranes with Ceramic Surface, in “*Advances in Biomimetics*”, A. George, ed., InTech, Rijeka, 2011, pp.231-250.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 純一 (KIKUCHI JUN-ICHI)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授
研究者番号: 90153056

(2) 研究分担者

安原 主馬 (YASUHARA KAZUMA)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教
研究者番号: 90545716
田原 圭志朗 (TAHARA KEISHIRO)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教
研究者番号: 50622297