

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750163

研究課題名 (和文) 光刺激応答性生体親和物質群の開発とその応用

研究課題名 (英文) Development of Photoresponsive Bioactive Molecules

研究代表者

村岡 貴博 (MURAOKA TAKAHIRO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：70509132

研究成果の概要 (和文)：

ゲル中の光照射された部分が生体活性になることを利用した細胞活動の空間制御実現を目的とした。そのために、細胞接着を促す Arg-Gly-Asp 抗原決定基を用い、その一部を光解離性保護基で保護した両親媒性ペプチドを開発した。グリシンの一部を保護したものの場合、光照射前で溶液のものが照射後にゲル化する、というゾル-ゲル転移を行う化合物、パルミトイル基-V2E2RGDS が得られた。それを用いて、光でゲル化することで細胞を空間固定し、同時に細胞接着を開始させる、という相変化を利用した細胞活動の時空間制御に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

Spatial control of cell activities has been studied with photo-responsive hydro-gels in which photo-irradiated area turns into bio-active. Peptidic amphiphiles (PAs) including Arg-Gly-Asp sequence, an epitope to induce cell adhesion, with a photocleavable protecting group has been used. In the case that glycine was protected, a PA performing solution-to-gel photo conversion, palmitoyl-V2E2RGDS, was obtained, where light-triggered cell adhesion with fixing cells in three-dimensional media by the photo-gelation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：超分子化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体認識・機能化学

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスは、細胞を保持する足場としての静的な役割の他、細胞増殖因子や接着因子などの生体活性基を持ち、細胞に対して様々な刺激を与えその活動を時間・空間の両面で制御する動的な役割も併せ持つ。この機能により、分化や増殖、接着などの細胞活動が巧みに制御されており、細胞を超えた組織の制御にも関連していると考えられている。これに着想を得、外部媒体から細胞活動をコントロールできれば、人工的に細胞伸長や組織形成を操ることができ、ひいては機能細胞を利用した「細胞材料」を作り出せると考えた。そこで本研究では、細胞を安定に保持する3次元媒体に外部刺激応答性を導入することで、生体活性度を外部刺激で自在に変化させ、細胞活動を時空間制御することを目指した。ゲル化剤に化学修飾により生体活性基を導入することで、特定の細胞活動を引き起こすことは既に実現されているが、その細胞活動をメディア内で時空間的にコントロールすることは、これまでに報告は無かった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外マトリックスで見られる「外部媒体から細胞活動を制御する」というアプローチに注目し、外部刺激応答性を利用して、様々な細胞活動の精密時空間制御を可能にする材料の開発に挑戦することとした。これにより、例えば神経細胞の伸長方向を制御し、細胞でできた電気回路の作成や、心筋細胞の接着方向を制御し、特定の形の細胞ポンプを開発することなど、機能細胞を利用した材料開発という新たな応用が広がると考えた。

3. 研究の方法

細胞や蛋白質などの生体材料を保持するメディアとして注目されている超分子ヒドロゲルに着目した。特にペプチド骨格から成るゲル化剤は生体親和性が高いことが知られることから、本研究でもその利点を活かし、ペプチドをベースとした分子設計を行うこととした。外部媒体の性質を変えるための外部刺激としては、扱いが容易で様々な応用にも適していると思われる光を用いることとした。具体的には、細胞に刺激を与える分子ユニット上に光解離性保護基を導入することで、その細胞刺激のオン・オフを切り替えることとした。細胞刺激としては細胞接着を引き起こすエピトープを用い、接着度の度合いは vinculin タンパク質の発現量で定量することとした。

4. 研究成果

まず、細胞接着を促すアルギニン—グリシン—アスパラギン酸 (RGD) 抗原決定基を用い、その一部を光解離性保護基で保護した、ゲル化剤としての両親媒性ペプチドを開発することとした。具体的には、アスパラギン酸側鎖のカルボン酸を光解離性保護基である 2-ニトロベンジルエステルで保護したものと、グリシンのペプチド主鎖骨格を形成するアミノ基上に 2-ニトロベンジル基を導入したものを合成することとした。

前者に関して、アルキル鎖としてパルミトイル基、ペプチド配列として V2E2RGDS、V3E3RGDS のものを合成したが、それらの水溶性が極めて低かったため、単離すらできなかった。そこで極性を高めた V2E3RGDS のものを合成した。この化合物の場合、水溶性は確保され、塩化カルシウム添加でゲルも形成したが、光照射後に液化した。脱保護した化合物の水溶性が高すぎたためであると考えている。以上を含む一連の結果から、アスパラギン酸のカルボン酸を保護した場合、光照射前後で化合物の極性が大きく変わるため、脱保護前後でゲルを保つことが大変困難であると考え、グリシン上に保護をかけることとした。

この場合、ペプチド主鎖上のアミノ基に保護基を導入し2級アミンとするため、当然ペプチドカップリングの反応性は落ちた。そのため、通常の TBTU 等の縮合剤を用いた固相合成法では合成が難しかった。しかし酸フッ化物や酸無水物を用いることで合成法を確立することができた。そこで、アルキル鎖としてパルミトイル基、ペプチド配列として V2E2RGDS の両親媒性ペプチドを合成したところ、興味深いことに光ゾルーゲル転移を示した。つまり、光照射前の保護基がかかった状態では水溶液であるものが、光照射により保護基を解離させると、ヒドロゲルを形成した。350nm 光を 250W で 45 分室温で照射した場合、98%の変化率で光反応が進行したことが、高速液体クロマトグラフィーによる解析から明らかとなった。光反応の進行は、吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトル変化、および質量分析から確認した。円偏光二色性スペクトルでこの光反応を追跡したところ、ベータシート構造にゆらいするバンドの強度が、光照射にともない増加した。このことは、光反応に伴いベータシートが形成されることを示唆しており、ベータシート形成によるナノファイバーの伸長がゲル形成に起因していると考えられる。

線維芽細胞をパルミトイル基—V2E2RGDS ゲル化剤水溶液に加え、同様の光照射を行った場合でもゾルーゲル転移を示した。これにより、線維芽細胞の細胞接着性が変化してい

るのではないかと期待し、vinculin の発現量を調べたところ、光照射前後で発現量はおよそ 2 倍増加していた。つまり、光照射による RGD の出現、および系のゲル化により細胞接着が引き起こされたこととなる。これにより、光を用いた細胞活動の制御と空間固定に成功した。

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 2 件)

1. 村岡貴博, 嶋建也, 濱田勉, 森田雅宗, 高木昌宏, 金原数

Mimicking Multipass Transmembrane Proteins: Synthesis, Assembly and Folding of Alternating Amphiphilic Multiblock Molecules in Liposomal Membranes
Chemical Communications
47, 194–196, 2011 年, 査読有

2. 村岡貴博, Chung-Yan Koh, Honggang Cui, Samuel I. Stupp
Light-Triggered Bioactivity in Three Dimensions
Angewandte Chemie International Edition
48, 5946–5949, 2009 年, 査読有

[学会発表] (計 27 件)

1. 嶋建也, 村岡貴博, 濱田勉, 森田雅宗, 高木昌宏, 金原数

Function of Photoresponsive Alternating Amphiphilic Compound in Phospholipids
日本化学会第 92 春季年会

2012.3.27

神奈川

口頭発表

2. 河崎俊一, 村岡貴博, 安達皓太, 金原数
構造化 PEG 分子の合成とその性質 (2)

日本化学会第 92 春季年会

2012.3.25

神奈川

口頭発表

3. 村岡貴博, 安達皓太, 宇井美穂子, 河崎俊一, 柘尾豪人, 白川昌宏, 金原数

構造化 PEG 分子の合成とその性質 (1)

日本化学会第 92 春季年会

2012.3.25

神奈川

口頭発表

4. Shunichi Kawasaki, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Kouta Adachi, Kazushi

Kinbara

Development of a structured PEG molecule for protein manipulation

グローバル COE サマースクールシンポジウム

2011.8.18

仙台

口頭発表

5. Tatsuya Shima, Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara

Development of Amphiphilic Oligomers Adopting Higher-Order Structures in a Lipid Membrane

グローバル COE サマースクールシンポジウム

2011.8.18

仙台

口頭発表

6. 村岡貴博

Mimicking Multipass Transmembrane Proteins: Folding and Assembly of Alternating Amphiphilic Multiblock Molecules in Liposomal Membranes

7th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments

2011.6.11

滋賀

口頭発表

招待講演

7. 佐川貴志, 菊地由宇, 福岡創, 井上裕一, 高橋泰人, 村岡貴博, 金原数, 石島秋彦

リアルタイムビデオナノ計測とコンピュータ制御されたレーザー照射により明らかに
なる、大腸菌の走化性誘引物質への応答時間
第 11 回東北大学多元物質科学研究所 研究発表会

2011.12.8

仙台

ポスター発表

8. 嶋建也, 村岡貴博, 濱田勉, 森田雅宗, 高木昌宏, 金原数

交互両親媒性化合物の二分子膜中での立体構造と機能

第 60 回高分子討論会

2011.9.28

岡山

口頭発表

9. 河崎俊一, 村岡貴博, 宇井美穂子, 安達皓太, 金原 数

構造化 PEG 分子の開発とタンパク質マニピュレーションへの応用

平成 23 年度 化学系学協会東北大会

2011.9.17

仙台

ポスター発表

10. 嶋建也, 村岡貴博, 濱田勉, 森田雅宗, 高木昌宏, 金原数

交互両親媒性化合物の二分子膜中での立体構造と機能

平成 23 年度化学系学協会東北大会

2011.9.17

仙台

ポスター発表

ポスター賞受賞

11. Nabanita, Sadhukhan, 村岡貴博, 宇井美穂子, 金原 数

タンパク質操作のための分子ライブラリー構築

平成 23 年度 化学系学協会東北大会

2011.9.17

仙台

ポスター発表

12. Takashi Sagawa, Yu Kikuchi, Hajime Fukuoka, Yuichi Inoue, Hiroto Takahashi, Takahiro Muraoka, Kazushi Kinbara, Akihiko Ishijima

リアルタイムビデオナノ計測とコンピュータ制御されたレーザー照射により明らかになる、大腸菌の走化性誘引物質への応答時間

第 49 回 日本生物物理学会

2011.9.16

兵庫

口頭発表

13. 河崎俊一, 村岡貴博, 宇井美穂子, 安達皓太, 金原数

構造化 PEG 分子の開発とタンパク質マニピュレーションへの応用

第 5 回バイオ関連化学シンポジウム

2011.9.13

つくば

ポスター発表

14. 嶋建也, 村岡貴博, 濱田勉, 森田雅宗, 高木昌宏, 金原数

交互両親媒性化合物の二分子膜中での立体構造と機能

第 5 回バイオ関連化学シンポジウム

2011.9.12

つくば

口頭発表

15. 村岡貴博

Mimicking Multipass Transmembrane Proteins: Folding and Assembly of Alternating Amphiphilic Multiblock Molecules in Liposomal Membranes

日本化学会

2011.3.28

神奈川大学 (神奈川県)

口頭発表

招待講演

16. 嶋建也, 村岡貴博, 金原数

交互両親媒性化合物の二分子膜中での立体構造と機能

日本化学会

2011.3.26

神奈川大学 (神奈川県)

口頭発表

17. 安達皓太, 村岡貴博, 金原数

構造化されたオリゴエチレングリコールの合成

日本化学会

2011.3.26

神奈川大学 (神奈川県)

口頭発表

18. Takahiro Muraoka, Tatsuya Shima, Tsutomu Hamada, Masamune Morita, Masahiro Takagi, Kazushi Kinbara

高次構造を有する両親媒性マルチブロックオリゴマーの開発

平成 22 年度 附置研究所間アライアンスによる ナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト 成果報告会

2011.3.7

仙台

ポスター発表

19. 安達皓太, 村岡貴博, 金原数

構造化されたオリゴエチレングリコールの合成

第 13 回生命化学シンポジウム

2011.1.7

仙台

ポスター発表

20. 嶋建也, 村岡貴博, 濱田勉, 森田雅宗, 高木昌宏, 金原数

高次構造を有する両親媒性オリゴマーの開発

第 13 回生命化学シンポジウム

2011.1.7

仙台
ポスター発表

21. Tatsuya Shima, Takahiro Muraoka,
Kazushi Kinbara
Development of Amphiphilic Oligomers
Adopting Higher-Order Structures in a
Lipid Membrane
The 2010 International Chemical Congress
of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)
Hawaii, USA
2010.12.17
ポスター発表

22. Kota, Adachi, Takahiro Muraoka,
Kazushi, Kinbara
Synthesis of Structured Oligoethylene
Glycols
The 2010 International Chemical Congress
of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)
Hawaii, USA
2010.12.17
ポスター発表

23. Takahiro Muraoka, Chung-Yan Koh,
Honggang Cui, Samuel I. Stupp
Photo-Conversion of Higher-Order
Structures Composed of Peptide
Amphiphiles and Its Biological Application
The 2010 International Chemical Congress
of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010)
Hawaii, USA
2010.12.16
口頭発表

24. 村岡貴博, 嶋 建也, 濱田 勉, 森田 雅宗,
高木 昌宏, 金原 数
高次構造を有する両親媒性オリゴマーの開
発
第10回東北大学多元物質科学研究所 研究
発表会
2010.12.1
東北大学 (宮城県)
ポスター発表

25. 村岡貴博
光反応をトリガーとする分子内・分子間での
動きの変換と伝達
日本化学会
2010.3.28
近畿大学 (大阪府)
口頭発表
招待講演

26. 嶋 建也, 村岡貴博, 金原 数
高次構造を有する両親媒性オリゴマーの開
発

日本化学会
2010.3.26
近畿大学 (大阪府)
口頭発表

27. 村岡貴博
光応答性基を用いた両親媒性ペプチドの高
次構造制御
高分子学会 東北支部 研究発表会
2009.11.19
弘前大学 (青森県)
口頭発表
招待講演

6. 研究組織
(1) 研究代表者
村岡 貴博 (MURAOKA TAKAHIRO)
東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：70509132

(2) 研究分担者
()

(3) 連携研究者
()