

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700401

研究課題名（和文） 精密重合を用いた細胞内動態可視化モニタリング材料の創製

研究課題名（英文） Fabrication of monitoring materials for intracellular dynamic visualization by precise polymerization

研究代表者

松野 亮介(MATSUNO RYOSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科・特任助教

研究者番号：00436536

研究成果の概要：

本研究は、1)量子ドット標識法および2)DNA 結合状態の可視化・定量化を目指した FRET 観察法の開拓を目標テーマに掲げている。1)に関しては、生体親和性のリン脂質モノマーの (MPC) 共重合体で量子ドット内包粒子を作製し、細胞内動態を観察することに成功した。2)に関しては、pH 応答性セグメントと MPC、FRET アクセプター固定部位を有する共重合体を合成し、量子ドットを内包した。この粒子は、pH に応じて FRET 効率が変化し、異なる蛍光スペクトルを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体材料・生体材料学

キーワード：生体適合材料

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子治療としてウイルスベクターを用いて細胞核内へDNAを導入するための技術が研究されてきた。既存のウイルスベクターには様々な限界があることは明らかであり、より良い人工遺伝子ベクターの開発が望まれている。しかしながら、人工ベクターではウイルスベクターに比べて核内での遺伝子発現率が劣っている。人工ベクターの開発において、ベクターの遺伝子発現率の向上などを図る一方、最適な構造を構築するには pH 変化に代表される細胞内環境を評価する

ことも必要である。しかし、動的な細胞内環境をセンシングするには、生体の免疫機構、細胞内のエンドソーム膜に内包されリソソームにより分解されるエンドサイトーシスに代表される異物排除機能を回避できる制限が設けられることになる。

このような背景から、生体内の異物排除機能を回避可能な細胞膜外から核内に至る細胞内動態の可視化モニタリング材料の創製を目指した。核となる可視化材料として着目したのが数ナノメートルサイズで可視光領域に蛍光を発する量子ドット(Q-dot)である。

Q-dotは、従来の有機蛍光プローブに比べて、蛍光寿命が長く、半値幅が狭く、直径の違いにより多色蛍光を有しているため、細胞内の微小な領域におけるイメージングモニタリング材料として最適である。しかし、Q-dotは生体適合性、機能性を有していない。表面を高機能化することにより、細胞内の微量なpH変化をポリマーブラシ鎖の膨潤収縮、固定化した蛍光物質への量子ドットからの蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)変化へと連動させ蛍光シグナルの変化として検出するpHセンシング材料へ展開する。

2. 研究の目的

高性能で発現効率の高い人工遺伝子ベクターの開発には、細胞内動態の評価が必要とされる。本研究では、表面を高機能化した量子ドット(Q-dot)標識方法およびDNA結合状態の可視化・定量化を目指した蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)観察法の開拓を行う。この2つを柱として生体内の異物排除機能を回避可能な細胞膜外から核内に至る細胞内動態の可視化モニタリング材料の創製を目的とする。

3. 研究の方法

生体分子標識ユニット、細胞類似構造を有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーの配列、構造を巧みに制御し、量子ドットの水、培養液中への分散を可能とし、細胞内への取り込みを制御する表面機能化を行った。種々の機能化方法を検討した内ここでは、両親媒性MPC共重合体による表面機能化および可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)剤を用いた量子ドットの可溶化について報告する。

(1) 量子ドット標識法

両親媒性MPC共重合体

量子ドットを内包可能なポリマーの設計・合成を行った。デザインした両親媒性MPC共重合体(PMBN)を図1に示す。合成はラジカル重合により行った。ここで、共重合体は疎水表面を有する量子ドットと相互作用する疎水部、*n*-butyl methacrylate(BMA)とMPCからなる生体適合性を有する親水部、および活性エステルにより生体分子を固定化可能な*p*-nitrophenyl-oxycarbonyl poly(ethylene glycol) methacrylate(MEONP)から形成されている。

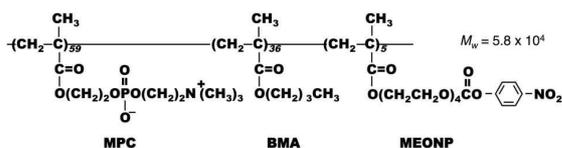


図1.PMBNの構造

次に、ジクロロメタンに分散しているQ-dot分散液をPMBN水溶液へ添加し、溶媒蒸発法によりQ-dotを内包したナノ粒子を作製した。ここでは、粒子の安定性を向上させるため、ポリ乳酸(PLA)をコアポリマーとして0.1 mg添加している。作製したナノ粒子の光学特性、粒子径などを紫外可視吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定、透過型電子顕微鏡測定等で評価した。

イメージングプローブとしての特性を調べるため、速度論的な細胞取り込み定量解析を行った。膜透過性ペプチドとして知られるオクタアルギニン(R8)を粒子表面の活性エステルを介して固定化した。このR8-PMBN/PLA/QDをHeLa細胞培地に加え(終濃度100 nM)、各時間インキュベートした。各時間の粒子濃度の定量を細胞粉碎後の蛍光スペクトル測定、また、その際の細胞取り込み機構に関して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、粒子位置の時間推移を観察した。比較として活性エステルをglycineでマスクし、最表面がリン脂質のみで覆われている粒子を作製した。粒子の模式図を図2に示す。

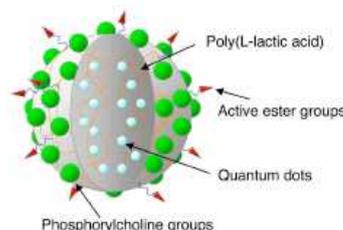


図2. 量子ドット内包ナノ粒子模式図

可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)剤を用いた量子ドットの可溶化

量子ドットを可溶化する界面活性能とその後モノマーを重合する機能の二つの機能を有するRAFT剤として2-dodecyl sulfanyl thiocarbonylsulfanyl-2-methyl propionate (DMP-Na)を合成した。構造を図3に示す。このRAFT剤の臨界ミセル濃度(CMC)を表面張力測定により評価した。CMC以上の濃度の溶液にQ-dot溶液を添加し、溶媒蒸発法によりQ-dotの水溶液中への可溶化を行った。

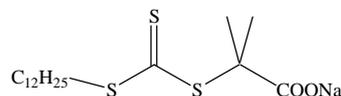


図3. RAFT剤の構造

そのQ-dotが分散している水溶液中へ任意量のMPCモノマーおよび開始剤を添加し、70でRAFT重合を行い光学特性、粒子径等を評価した。実験のスキームおよびMPCポリマーによりグラフトされた粒子の模式図を図4へ示す。

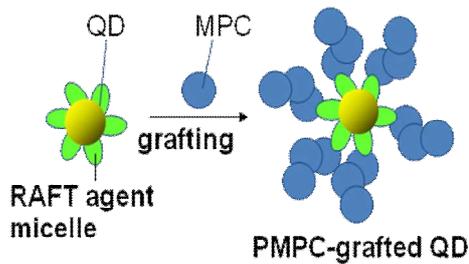


図 4. 量子ドット可溶化スキーム

(2) DNA 結合状態の可視化・定量化を目指した FRET 観察法の開拓

鎖長および分子量が制御された pH 応答性セグメントとして pKa が 7.3 付近に存在する 2-diethylaminoethyl methacrylate (DEAEMA) からなる pH 応答性セグメントを用いて、PMBN の 3 元共重合体からなるリン脂質ポリマーセグメントとのマルチブロックポリマーを RAFT 重合により合成した。量子ドット表面を溶媒蒸発法により被覆した。ポリカチオンである poly(DEAEMA) の pKa は 7.3 であるため、エンドソーム中のような pH 5 付近の環境では DEAEMA セグメントはプロトン化されるため伸びきり構造をとり、粒径が大きくなるので FRET は起こらない。一方で、細胞質中のような pH 7.4 付近の環境では DEAEMA セグメントは脱プロトン化されるため凝集構造をとり、粒径が小さくなるため、ドナー-アクセプター間の距離が 10 nm 以下となり FRET が発生する。この際の検出光の変化を測定することによりエンドソームによる取り込みに際する pH 変化を検出することが可能になると考えられる。(図 5) アクセプター蛍光色素として Alexa 594 cadaverine を活性エステルを介して固定化後、蛍光スペクトル測定により pH 変化に基づく FRET 効率変化評価を行った。

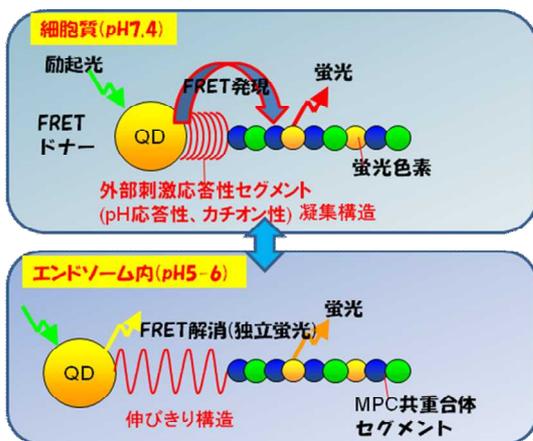


図 5. pH 変化に伴う FRET 効率変化の概念図

4. 研究成果

(1) 量子ドット標識法

両親媒性 MPC 共重合体

デザインした共重合体 PMBN451 を得た。ここで記載した数字は MPC:BMA:MEONP = 4:5:1 の組成比を意味する。溶媒蒸発法により量子ドット内包したナノ粒子 (PMBN/PLA/QD) を作製した粒子の直径は、約 20 nm であり、粒子中に 6-8 個の QD を内包していた(図 6)。また、蛍光スペクトル測定より、内包による蛍光波長に及ぼす影響はみられなかった。

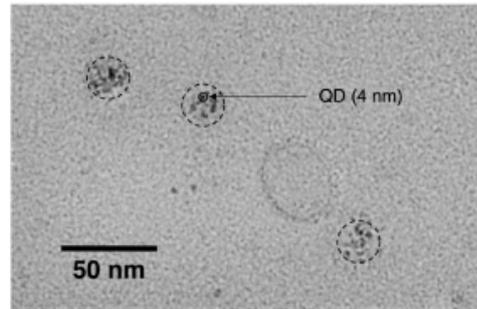


図 6. PMBN/PLA/QD の TEM 像

R8 を固定化した R8-PMBN/PLA/QD の細胞内取り込み解析結果を図 7 に示す。比較として用いた活性エステルを glycine で保護し、表面がリン脂質のみで覆われた粒子の場合、細胞には全く取り込まれなかったのに対して、R8-PMBN/PLA/QD では細胞内取り込みが数分程度から起こっていることが確認された。

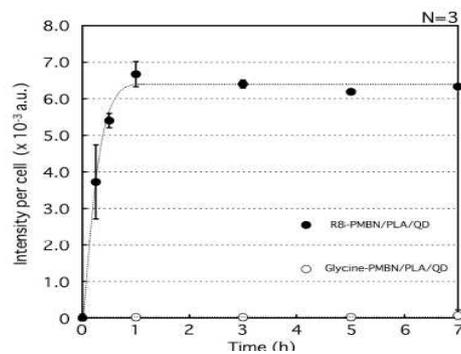


図 7. Glycine-masked 及び R8-PMBN/PLA/QD の HeLa 細胞取り込みの速度論的解析

図 8 に共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプスイメージングを示す。ここで、R8 はエンドサイトーシス経路による取り込みを行うことが知られている。5 分後には、まだ細胞膜表面へ粒子は位置しているが、1 時間後には一部が内側へ取り込まれており、3 時間後には、完全に細胞内へ取り込まれた。この結果は、この粒子を用いることによりエンドサイトーシス経路の細胞内動態をイメージングすることが可能であることを意味している。

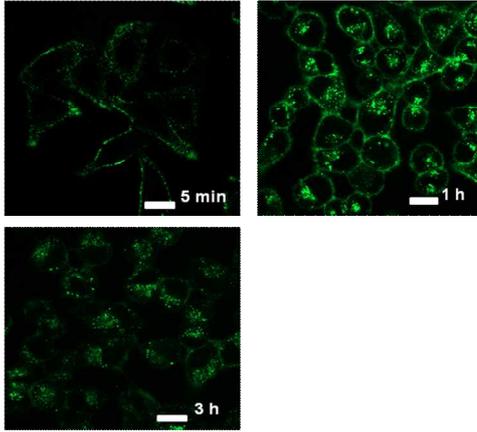


図 8 タイムラプスイメージング

可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)剤を用いた量子ドットの可溶化

DMP-NaのCMCは表面張力測定結果により 1.0×10^{-3} Mであった。また、CMC以上の濃度において、DMP-NaによりQ-dotを可溶化できることが分かった。その溶液中で、MPCを重合した後の蛍光スペクトルを図9に示す。また2時間後の粒子のTEM像を図10に示す。グラフトによる表面修飾が、2-4時間後にも蛍光ピークに影響を与えていないことが確認され、また、粒子形状にも影響を与えていないことが分かった。

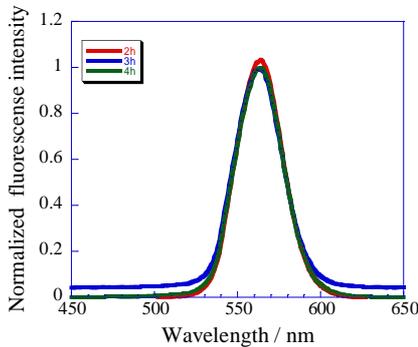


図 9. PMPC-grafted QD の蛍光スペクトル

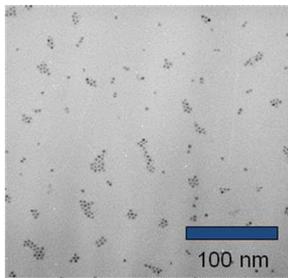


図 10. PMPC-grafted QD の TEM 像

この粒子は、末端のカルボキシル基を利用して生体分子を固定化可能であり、イメージングプローブとして潜在性を有している。

(2) DNA 結合状態の可視化・定量化を目指した FRET 観察法の開拓

合成し精製した PMBN451 の数平均分子量は、12,200 であった。続いて、pH 応答性セグメントである DEAEMA を重合し、PDbMBN を合成した。数平均分子量は、23,700 であった。ドナーである量子ドットを共重合体のコアとなるように内包し、粒子表面へ FRET アクセプター分子 Alexa 594 cadaverine を固定化した。作製した粒子を異なる pH(5.0-7.4)の緩衝溶液に添加すると、pH に応じて pH 応答セグメントの鎖長が伸縮するため FRET 効率が変化し、異なる蛍光スペクトルを示した。結果を図 11 に示す。560 nm 付近のピークは FRET ドナー-Q-dot に起因しており、610 nm 付近のピークは FRET アクセプター-Alexa 594 に起因するピークである。また、pH とピーク強度の関係をプロットしたものを図 12 に示す。強度比を pH6.6 前後で変化が起こっていることが分かる。

これは、エンドサイトーシスで生じる微小な pH 変化が検出可能性を有している。細胞内での観察には至っていないが、量子ドットラベルした DNA を用いることによりその詳細解析に適用できると考えられる。

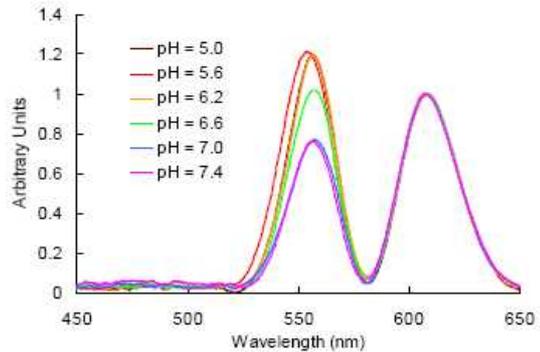


図 11. 蛍光スペクトルの pH 依存性

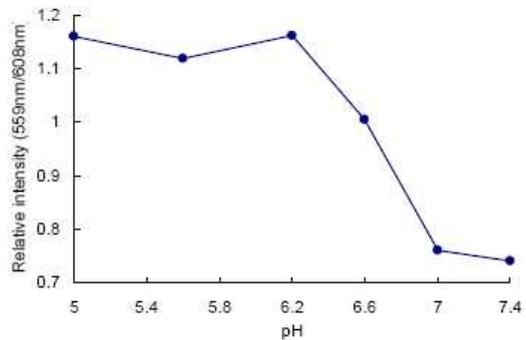


図 12. ピーク強度比と pH の関係

主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Ryosuke Matsuno, Yusuke Goto, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, Controllable Nanostructured Surface Modification on Quantum Dot for Biomedical Application in Aqueous Medium, J. Nanosci. Nanotechnol. 9 358-365 (2009) 査読有
- (2) Yusuke Goto, Ryosuke Matsuno, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, Artificial Cell Membrane-covered Nanoparticles Embedding Quantum Dots as Stable and Highly-sensitive Fluorescence Bioimaging Probe, Biomacromolecules 9(11) 3252-3257 (2008) 査読有
- (3) Yusuke Goto, Ryosuke Matsuno, Tomohiro Konno, Madoka Takai, and Kazuhiko Ishihara, High-sensitive Analysis of Oligopeptide-Induced Cell Penetration Using Phospholipid Polymer Nanoparticles Containing Quantum Dots, Trans. Mater. Res. Soc. Jpn, in press. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) 松野亮介, Intracellular probe quantum dot based on molecular integration, NANOBIO SEOUL 2008, 2008 年 10 月 31 日、Yonsei University, Seoul
- (2) 松野亮介, 細胞内イメージングを目指した表面機能化量子ドットの作製、分子情報生命科学スクーリング 2008, 2008 年 9 月 29 日、理化学研究所
- (3) 松野亮介, RAFT 剤およびリン脂質ポリマーミセル可溶化量子ドットを用いたバイオイメージング、第 57 回高分子学会討論会、2008 年 9 月 25 日、大阪府立大学
- (4) 松野亮介, 細胞内プローブとしての新規生体親和性量子ドット、第 37 回医用高分子シンポジウム、2008 年 7 月 29 日、東京医科歯科大学
- (5) 松野亮介, Well Defined Phospholipid Polymer Grafting over Quantum Dot using RAFT Polymerization, 8th World Biomaterials Congress(WBC), 2008 年 5 月 31 日、アムステルダム
- (6) 松野亮介, Preparation of quantum dot with well-defined and biocompatible phospholipidpolymer shell by RAFT polymerization, The 10th pacific polymer conference, 2007 年 12 月 4-7 日、神戸国際会議場
- (7) 松野亮介, 表面にリン脂質ポリマー層を

有する量子ドットの作製と生体環境下におけるイメージング、日本バイオマテリアル学会、2007 年 11 月 26-27 日、大阪・千里ライフサイエンスセンター

- (8) 松野亮介, Preparation of bioaffinity nanoparticles with well-defined structure for molecular diagnosis, 2007 年 10 月 31 日-11 月 2 日、UCLA
- (9) 松野亮介, ナノ構造制御したリン脂質ポリマーブラシ層を有するバイオナノ粒子、第 56 回高分子学会討論会、2007 年 9 月 19-21 日、名古屋工業大学
- (10) 松野亮介, リン脂質ポリマーを用いた水溶性量子ドットの創製、生命科学ネットワーク、2007 年 9 月 15 日、東京大学

〔その他〕

<http://www.mpc.t.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

松野 亮介(MATSUNO RYOSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科・特任助教

研究者番号: 00436536