

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700484

研究課題名(和文) 分子インテグレーション法に基づく細胞内位置モニタリング材料の創製

研究課題名(英文) Fabrication of intracellular monitoring material based on molecular integration

研究代表者

松野 亮介 (MATSUNO RYOSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科・研究員

研究者番号：00436536

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子インテグレーション法を利用した細胞膜外から内に至る細胞内位置モニタリング材料の創製を目的とする。両親媒性のリン脂質ポリマー共重合体を用いて、量子ドットを内包し、更に表面に有機蛍光分子を固定化した粒子を作製した。この粒子は、pH 変化に対応して蛍光が変化する。細胞内取り込みにおける蛍光変化を評価した結果、エンドサイトーシスの pH 変化に対応した蛍光変化を観察することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：This research goal is to fabricate intracellular monitoring material based on molecular integration. Particles consisted of amphiphilic phospholipid copolymer, quantum dots core and organic fluorescence molecule at outer surface was synthesized. The particles change the fluorescence according to pH change. As a result, the change of fluorescence of the particles was able to be detected according to pH change during endocytosis process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノバイオ、ナノ材料、量子ドット

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遺伝子を導入する手法が行われてきた。しかし、その際、ウイルスベクターが副作用として本来の病原性を表わし、がん化を引き起こす可能性が指摘されている。実際、近年注目を浴びているiPS(induced pluripotent stem cells)細胞研究においてもレトロウイルスによる遺伝子導入が行われておりこの点が危惧されている。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、より安全な人工遺伝

子ベクターの開発が望まれている。しかしながら、現状の人工ベクターではウイルスベクターに比べて遺伝子発現効率が劣っており、一コピーあたり 8100 倍の差があるといわれている。このような点から人工ベクターが細胞内をどのように移動し、どのような因子が効率を阻害するのか、すなわち、細胞内動態を解明することは重要な課題の一つである。蛍光を用いて細胞内モニタリングする研究が行われているが、従来用いられる蛍光色素の有機色素やタンパク質色素では長時間、強露光下の顕微鏡観察において消光、減光す

る問題点がある。

2. 研究の目的

本研究では、分子インテグレーション法を利用した細胞膜外から核内に至る細胞内位置モニタリング材料の創製を目的とする。核となるモニタリング材料として着目したのが数ナノメートルサイズで直径の差異により可視光から近赤外領域に蛍光を発生し、長期間の露光下においても蛍光安定性を有する量子ドット(QD: CdSe/ZnS)である。

3. 研究の方法

量子ドットの表面は疎水基で覆われており水溶液中で使用するには表面修飾を行う必要がある。ここでは二種類の手法を検討する。一つは、生体分子が固定化可能な両親媒性のリン脂質ポリマーを用いる表面修飾手法である(A)。もう一つは、界面活性剤ミセルによる量子ドットの可溶化である(B)。

(A)法では、構造の異なる二種類のリン脂質ポリマーを設計・合成した。一つ目に、設計した両親媒性リン脂質ポリマー(PMBN)の構造を図1に示す。共重合体は、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)と疎水性部位(BMA)、活性エステルにより分子を固定化可能な部位(MEONP)から構成されている。PMBNを用いて、以前に報告した方法で量子ドットを内包した粒子を作製した¹⁾。図2に粒子(PMBN/QD)の概念図を示す。本報告では、粒子径制御を試み、シークエンスを変化させた膜透過性ペプチド:オクタアルギニン(R8)、オクタグリシン(G8)、およびシークエンスを変化させたオクタペプチド(G2R6、G4R4、G6R2)を固定化して、その細胞内取り込み機能評価を行った。ここでは、この方法をA-1とする。

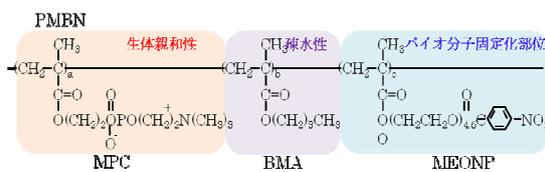


図1. PMBNの化学構造

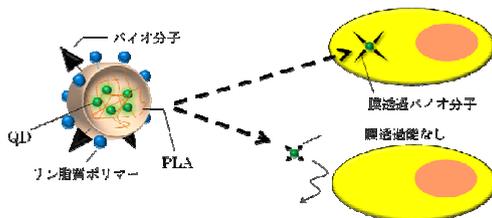


図2. PMBN/QDの概念図

二つ目は、図3に示す共重合体を設計・合成し、量子ドットをコアとする粒子を作製し

た。この粒子を用いて、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した細胞内取り込み評価を行った。図4に粒子とFRET検出の概念図を示す。共重合体は、鎖長と分子量分布を制御可能なRAFT重合により合成しており、pH応答セグメントであるDEAEMAの長さを制御している。ここでpoly(DEAEMA)は、pKaが7.3付近に存在し、エンドサイトーシスにおける7.4から5.0への変化に対応する。つまり、エンドソーム中のようなpH5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、表面の蛍光分子と量子ドットの距離が大きくなるのでFRETは起こらない。一方で、細胞質中のようなpH7.4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、距離が小さくなるため、ドナー-アクセプター間の距離が10nm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。アクセプター蛍光色素としてAlexa 594 cadaverineを固定化後、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。ここでは、この方法をA-2とする。

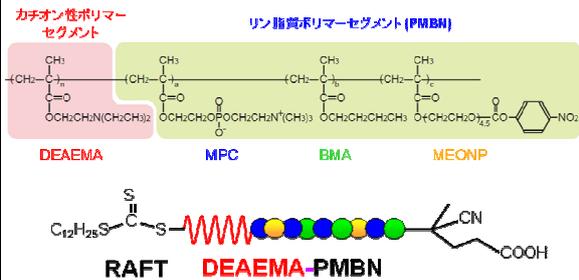


図3. DEAEMA-PMBNの化学構造

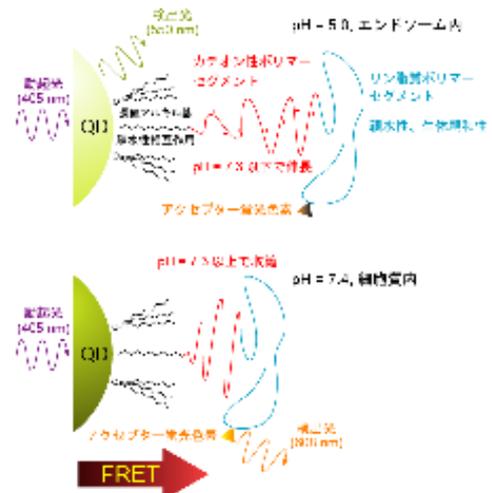


図4.pH依存性FRET検出メカニズム

(B)法では、マイケル付加を用いて、MPCと種々の炭素鎖長のアルキルチオールから

なる界面活性剤を合成した。触媒として2級アミンを4 mol%用いた。図5にスキームを示す。これらの両イオン性界面活性剤を用いて量子ドットの可溶化を試みた。

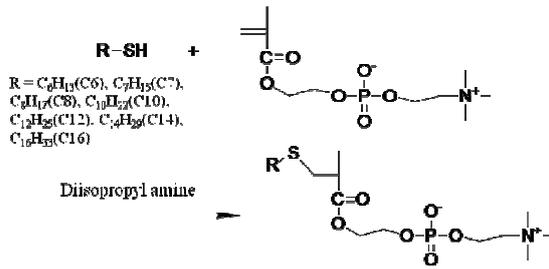


図5. マイケル付加のスキーム

4. 研究成果

A-1 法では、数平均分子量(Mn)が 1.0×10^4 程度のポリマーを合成した。これは、後藤らが合成した Mn が 6.0×10^4 程度のポリマーで約 20 nm の粒子を作製時よりも分子量が小さい。その結果、光散乱測定や原子間力顕微鏡 (AFM) から粒子径は約 8 nm 程度であった。おおよそ量子ドット 1-2 個が粒子の中に存在する計算となる。また、QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子の光学特性は QD 内包前後で変化しないことも確認した。次に、PMBN/QD の表面に MEONP ユニットの活性エステルを介して各種ペプチドを固定化し、HeLa 細胞へ取り込まれるかどうかを観察し、細胞による非特異的な取り込みに対する耐性を有しているか評価した。図6に各種ペプチドを固定化した粒子と2時間インキュベート後のHeLa細胞の共焦点レーザー顕微鏡像を、図7にR8-PMBN/QDの場合のz軸方向断面図を示す。また、図8に、細胞内に取り込まれたQDの蛍光強度測定結果を示す。以上の図より、R8-PMBN/QDは、核を除いた部分に蛍光が観察されているため、細胞に取り込まれ細胞質に局在することが確認された。それ以外のシーケンスのペプチドでは膜透過性は低く、細胞内に定強度の蛍光しか検出されなかった。メカニズムとしてアルギニンに由来する表面電位などが影響していると考えられるがまだ確証は得られていない。取り込み結果は、粒径 20 nm の QD 内包リン脂質ポリマーナノ粒子を用いた細胞膜透過試験の結果と一致した。よって粒径が 8 nm であっても非特異的な取り込みに対する耐性を有し、バイオ分子の動態を正確に評価することが可能である。この粒子は、毒性がなく長時間にわたる細胞内取り込み観察が可能である。蛍光が細胞質内で点在していることから取り込み経路がエンドサイトーシスによるものであることが示唆された。

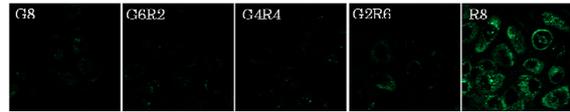


図6. 各種ペプチド固定化粒子のHeLa細胞内取り込み

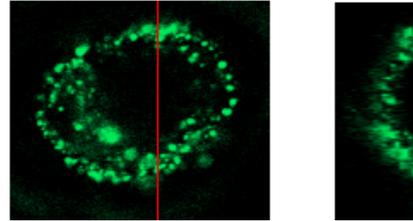


図7. R8-PMBN/QDのHeLa細胞内取り込みのz軸方向断面図

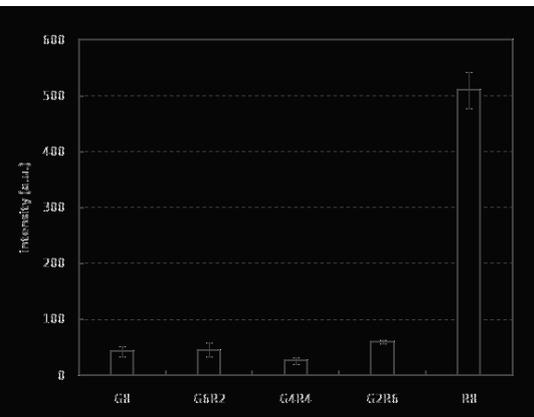


図8. HeLa細胞内の蛍光強度

A-2 では、ポリマーの各組成比が DEAEEMA : MPC : BMA : MEONP = 0.55 : 0.24 : 0.20 : 0.01、分子量 Mn = 3.3×10^4 , Mw/Mn = 1.2 の共重合体を合成した。この共重合体を用いて、前述の概念図のように量子ドットを内包した。異なる pH 溶液中での蛍光スペクトル測定の結果を図9に示す。550 nm 付近は量子ドット、620 nm 付近は Alexa 由来のシグナルである。pH7.06 と 7.45 を境に強度比が変化した。これは、共重合体のカチオン性部位が、pH に応じて膨潤・伸縮し、量子ドットと有機色素との距離が変化する、相関して FRET 効率が変化するためと考えられる。pKa が 7.3 付近にあることから、そのような変化が推測される。

この粒子を細胞培養液中に添加し、細胞内取り込みにおける蛍光変化を評価した。結果を図10に示す。取り込み前は黄色を示し、取り込み後のエンドソーム内(pH5.0程度)では緑色の蛍光が観測された。420分後には、再び黄色の蛍光が強く観測された。この現象は、詳細な検討が必要ではあるが、エンドサイトーシス経路による取り込みを介して最後にエンドソーム脱出したためだと考えられる。以上、新規モニタリング材料により、

エンドサイトーシス経路の pH 変化に対応した蛍光変化を観察することが可能であった。

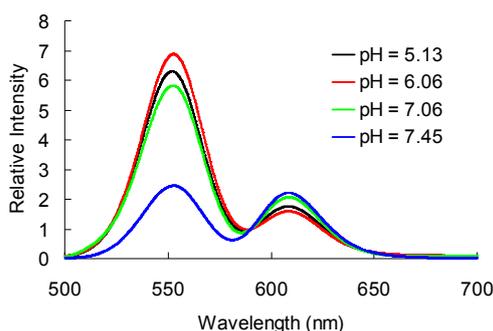


図 9. 蛍光スペクトルの pH 依存性

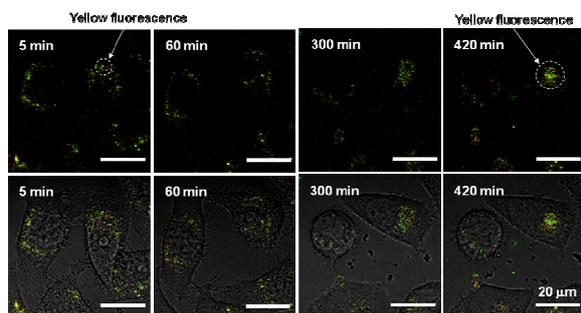


図 10. 細胞内取り込み中の共焦点レーザー顕微鏡像

(B)法では、マイケル付加反応を用いて、リン脂質モノマーとアルキルチオール化合物からなる界面活性剤のライブラリを構築した。表面張力測定より水中でミセルを形成していることが確認された。このミセルを用いて量子ドットを水中へ可溶化した。粒子径はおおよそ 6 nm 以下であった。紫外可視吸収スペクトルから定量した量子ドット可溶化量を図 11 に示す。いずれの炭素鎖長においても、高い可溶化量を示した。市販の界面活性剤よりもその可溶化能が高いことが分かった。この手法は、表面がリン脂質で覆われているため細胞内のプローブとして用いることは出来なかったが、非特異的なバイオ分子吸着が抑制されるためマイクロチップ流路などの流速可視化プローブへの応用が期待される。

以上、種々の手法を用いて、量子ドットを内包した細胞内位置モニタリング材料の創製を行った。核内へ至るモニタリングを達成することはできなかったが、この点に関しては、核内移行シグナルを粒子表面に共固定することにより検討を行う。

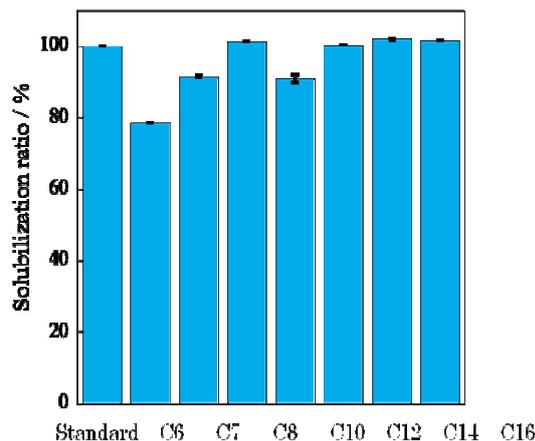


図 11. 新規双イオン性界面活性剤による量子ドット可溶化量

参考文献

1) Y. Goto et al., *Biomacromolecules*, 9, 3252-3257 (2008).

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 1 件)

① R. Matsuno, K. Takami and K. Ishihara, Simple Synthesis of a Library of Zwitterionic Surfactants via Michael-type Addition of Methacrylate and Alkane Thiol Compounds, *Langmuir*, 査読有、26、2010、13028-13032

[学会発表] (計 7 件)

1. 松野亮介、Phospholipid Polymer-Based Surface Modification on Quantum Dots for Bioimaging、8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers (FBPS2009)、2009/5/23、東レ研修センター、三島

2. 松野亮介、細胞内取り込み促進機能ペプチド担持量子ドット内包リン脂質ポリマーナノ粒子の創製と細胞内イメージング、平成 21 年度繊維学会年次大会、2009/6/10、タワーホール船堀

3. 松野亮介、マイケル付加を用いたホスホリルコリン型両性界面活性剤の合成と可溶化特性評価、第 58 回高分子討論会、2009/9/16、熊本大学

4. 松野亮介、Surface Modification of Quantum Dots using Phospholipid Polymers Aiming for Bioimaging Probe、The 1st FAPS Polymer Congress、2009/10/23、名古屋国際会議場

5. 松野亮介、Michael-type addition of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine with thiol compounds for preparing biocompatible

molecules、Nanobio-Zurich、2010/8/26、Zurich、Switzerland

6.松野亮介、マイケル付加を利用したホスホリルコリン化合物ライブラリの構築、第59回高分子討論会、2010/9/15、北海道大学（北海道）

7.松野亮介、マイケル付加反応を用いたホスホリルコリン化合物ライブラリーの構築、第32回日本バイオマテリアル学会大会、2010/11/29、グランドプリンスホテル広島（広島）

〔その他〕

ホームページ等

<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・研究員

研究者番号：00436536