

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550091

研究課題名(和文)細胞内に導入した金属ナノ粒子のリアルタイム共焦点顕微鏡観察法の開発

研究課題名(英文) Real-time observation of metal nanoparticles internalized into a biological cell by confocal microscopy

研究代表者

藤原 一彦 (Fujiwara, Kazuhiko)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10375222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：オール化合物をアンカーとしてタンパク質により被覆した金ナノ粒子を調製し、その細胞内導入を共焦点レーザー顕微鏡を利用して検討した。調製したタンパク質被覆ナノ粒子は顕微鏡下での細胞実験に供する粒子濃度条件においては低毒性であり、その観察に影響しないことを確認した。IgGを付与したナノ粒子を用いたところ、IgGの細胞内での解離が確認できた。また、核局在シグナル配列を有するタンパク質によりナノ粒子を被覆し実験に用いたところ、ナノ粒子の核内への侵入が確認できた。

研究成果の概要(英文)： Analyses of protein localization and interactions in biological cells are very important on tumor marker targeted medical diagnostics and profiling of some series of diseases. Nanoparticles receive an enormous attention in various biomedical applications since their sizes are similar with biological molecules and structures. Gold nanoparticle (AuNP) possesses unique optical properties based on localized surface plasmon resonance (LSPR) and functionalizability with self-assembled monolayers, thus they have utilized in biosensing and gene delivery applications. We studied to develop a light-scattering microscopy to probe AuNP internalized into biological cells. The optimum condition for surface modification of AuNPs and intracellular introduction by protein coated AuNP were investigated. Resonant light scattering imaging of AuNPs in a cell was also demonstrated in this study. Cellular uptake and fate of AuNPs were analyzed.

研究分野：分析化学

キーワード：金ナノ粒子 局在表面プラズモン共鳴 光散乱 顕微鏡

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルスや病原菌等で起こる病気を除く疾患の多くは、タンパク質の機能や立体構造の変化による異常に起因している。現在タンパク質検出を行う際には、抗体を用いた微量タンパク質検出法であるイムノプロット法などの手法を用いて細胞から取り出した状態で解析が行われている。しかしタンパク質は温度や塩濃度、pH などの周囲環境の変化によって容易に変性が起こるため細胞の状態のまま測定、解析できることが望ましいといえる。よって細胞内タンパク質の動態解析は、腫瘍マーカーをターゲットにした医療診断や低分子量薬剤設計において極めて重要である。

現在主流な細胞内でのタンパク質間相互作用解析は、標的タンパク質を発光波長の異なる2種類の蛍光性タンパク質により遺伝子工学的な手法により標識化し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用することにより達成される。この手法は蛍光タンパク質間の近接距離に依存して、それぞれの蛍光タンパク質の発光強度変化を検出し、相互作用の有無を調べるものである。しかしながら、発現ベクターの調製から細胞アッセイに至るまでに長時間を要することや、蛍光タンパク質の退色などの難点がある。

一方、金ナノ粒子はその局在表面プラズモン共鳴(LSPR)により特定波長の散乱光を増強し、粒子周囲の屈折率変化をセンシングできる特性を有する。すなわち、金ナノ粒子表面へ目的タンパク質や薬剤化合物を修飾し、細胞内へ導入することで、LSPR 光散乱により、細胞内での局在位置と分子間相互作用を同時検出可能な高効率細胞アッセイが実現できる。

他方で、金ナノ粒子は粒径の増大に伴い散乱光による検出感度が向上することが知られているが、粒子表面が自己組織化単分子膜(SAM)により化学的に機能化された金ナノ粒子は粒径が10nm以下のものしか合成法が確立されていない。したがって、細胞内においてLSPR 光散乱による分子間相互作用の検出感度を増大させるには、より粒径の大きな50nm-100nm 程度の粒子径を有する機能化金ナノ粒子が必要となる。その一方で、ナノ粒子の生細胞に対する毒性は十分には知られておらず、細胞アッセイに用いるためには細胞培養に与える影響等も詳細に検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

これまでの研究においては、金ナノ粒子に対して化学修飾を施した後にその表面へタンパク質を結合させ、その生細胞への導入効率や細胞の生存率、散乱光による顕微計測を行っている。その結果、化学修飾の有無に関わらず金ナノ粒子自身が非常に低毒性であること、また、レーザー共焦点顕微鏡により細胞内へ導入した金ナノ粒子が観測可能であることを明らかにした。加えて、ナノ粒子はその凝集体の形成

により共鳴散乱を起こす波長が長波長シフトを起こすことを利用し、操作するレーザー光の波長を変えることで、細胞内での凝集状態が判別可能であることを見出した。さらには、実験に供する細胞株内では発現されないタンパク質をナノ粒子に被覆することで、ナノ粒子の細胞内導入が効率的に抑制されることを発見した。

これまでの研究を踏まえ、本申請課題では細胞内局在シグナルと呼ばれる配列を有するペプチドを金ナノ粒子表面へ化学的に結合させ、ナノ粒子の効率的な細胞内導入し、細胞内小器官への局在化を行う

金ナノ粒子の有する LSPR 光散乱を利用することで、細胞内に導入したナノ粒子の局在位置のリアルタイム共焦点顕微鏡可視化を行う

細胞内局在シグナルに加え、他のタンパク質をナノ粒子表面へ複合的に結合させ、LSPR 顕微分光測定によるタンパク質間相互作用のリアルタイム解析を行う

の3つの項目を目標として研究に着手した。

### 3. 研究の方法

これまでの免疫電子顕微鏡法などの金ナノ粒子を用いた細胞染色法においては、特異なタンパク質の吸着を利用しているが、この方法ではタンパク質が正しいコンフォメーションを保っているか確認できない。そこで本研究では化学的な制御を行うことで、正しい立体構造を保った状態でナノ粒子へタンパク質を結合させる。機能化ナノ粒子の調製の手順は次の通りである。

1. 粒子径制御が比較的容易に可能なクエン酸還元、またはヒドロキシルアミン還元(N.G. Bastus et al., *Langmuir* **2011**, 27, 11098-11105)) を利用し金ナノ粒子を調製した。本法を利用することで効率的に光散乱検出が可能な50-100nm の粒子径を有する金ナノ粒子の合成が可能である。

2. 反応性官能基を末端に持つアルカンチオール膜で粒子を被覆したナノ粒子を調製した。これまでの研究において、既報文献(K.Aslan et al, *Langmuir* **2002**, 18, 6059-6065)の手法を改良し、高収率でチオール被覆粒子を得る手法を見いだしている。

粒子の細胞内局在位置制御には細胞内局在シグナル配列を利用する。すなわち、細胞内局在シグナルペプチドそのもの、または3. 局在シグナル配列を有するタンパク質を粒子表面へ導入した。このステップにおいては反応性官能基をカルボキシル基とした場合にはアミンカップリング(G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques 2nd ed.*, Academic Press (2008))を用いるが、結合するタンパク質やペプチドに応じて利用する官能基を変化させ、反応条件もまた精査を行った。

調製した機能化ナノ粒子は細胞と共培養することにより細胞内へ導入する。導入の確認は所属機関に設置のレーザー共焦点顕微鏡(Olympus FV1000)を用いて行った。ナノ粒子の散乱スペクトルは共鳴散乱により可視部に極大を示すが、粒子の会合によりこのピークは長

波長シフトを起こす)。この現象を利用して、細胞内に導入した金ナノ粒子の細胞内での凝集状態が顕微画像から把握できることが既に確認できている。共焦点顕微観察を行うことで、細胞内での粒子の凝集状態を確認した。また実験においては HeLa 細胞を用いた。

#### 4. 研究成果

金ナノ粒子の示す細胞毒性の詳細解析

クエン酸還元法により合成した金ナノ粒子に対してタンパク質等生体分子を導入するためのアンカーとなるチオール化合物およびペプチドを修飾し、その有無の細胞毒性に対する詳細な検討を行った。

用いたナノ粒子に対しては表面修飾の有無にかかわらずほぼ同等の濃度で毒性を示すことが確認された。一方ナノ粒子の表面修飾に用いる化合物に対しても、その粒子表面への結合量を求めたうえで同等の濃度範囲での細胞毒性も検討したが、これら化合物に対しては毒性が見られなかった。

顕微観察においては今回利用したいずれのチオール化合物およびペプチドに対しても、ほぼ毒性を示さない濃度条件において実験が可能であることが確認できた。

ペプチドを介したナノ粒子へのイムノグロブリン G(IgG)の付与と IgG 結合金ナノ粒子の細胞内導入および共焦点顕微観察

末端にチオール基を有するペプチドを介し、適切なカップリング反応を行うことで金ナノ粒子表面へ IgG を導入した。IgG は抗体を構成する重要なたんぱく質であり、ナノ粒子を利用した細胞内タンパク質のターゲティングを行う上で非常に重要な分子である。

ペプチドおよび IgG のナノ粒子への結合は ATR 法を利用した赤外分光測定により確認できた。また、IgG 結合金ナノ粒子は培地内に適切な量添加することにより、共焦点レーザー顕微鏡を使用して光散乱像を観測することにより、HeLa 細胞内へ導入されることが確認できた。また、IgG に対して免疫蛍光染色を行うことにより、蛍光像の同時観察を行ったところ、ナノ粒子による光散乱像と蛍光像が必ずしも一致しないことが分かり、細胞内で IgG が脱離していることが示唆された。

局在シグナル配列を有するタンパク質の金ナノ粒子表面への付与と細胞内導入

核局在シグナル(NLS)配列を有するタンパク質を用いることにより、金ナノ粒子の細胞内器官のターゲティングを検討した。ナノ粒子を培地内に導入後の細胞内のナノ粒子存在位置の時間変化を光散乱像により観測したところ、時間に依存して細胞質内の粒子濃度は増大し、さらに核内へ送達されることが確認できた。また、細胞内の粒子数が一定に達したのちに培地内の粒子を除いたところ、細胞内の粒子数は減少し、排除されていく様子が確認できた。

#### 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 4 件)

Fumiyuki Takasaki, Kazuhiko Fujiwara, Yasushi Nakajima, Taku Nishikawa, Hyuma Masu, Mamoru Imanari, Yuki Hidaka, Nobuaki Ogawa

A monomeric  $[\text{Zr}(\text{CO}_3)_4]^{4-}$  complex in an ammonium zirconium carbonate aqueous solution studied by extended X-ray absorption fine structure, Raman and nuclear magnetic resonance spectroscopy

Dalton Transactions 2015 ;44(2):645-652

Fumiyuki Takasaki, Kazuhiko Fujiwara, Yasushi Nakajima, Taku Nishikawa, Nobuaki Ogawa

Nanometer-sized Polynuclear Cluster and Oxide Nanocrystal Formation via Aging-condition-dependent Hydrolysis of Zirconium Oxychloride

2014; 43(2-2):196-198

Takenori Tanno, Takahiro Oohashi, Ikumi Katsumata, Noriko Katsumi, Kazuhiko Fujiwara, Nobuaki Ogawa

Terahertz spectra of 1-cyanoadamantane in the orientationally ordered and disordered phases

Philosophical Magazine Letters 2014; 94(1):25-29

Takenori Tanno, Takahiro Oohashi, Ikumi Katsumata, Noriko Katsumi, Kazuhiko Fujiwara, Nobuaki Ogawa

Estimation of water content in coal using terahertz spectroscopy

Fuel 2013; 105:769-770

〔学会発表〕(計 11 件)

藤原 一彦・田中 未都・小川 信明  
局在表面プラズモン共鳴センサに利用する金ナノ粒子固定化表面状態の詳細検討  
第73回分析化学討論会(北海道大学函館キャンパス)

岩崎 史始・藤原 一彦・小川 信明

ゲル濾過クロマトグラフィーによるタンパク質結合金ナノ粒子分離法の開発

日本分析化学会第62年会(近畿大学東大阪キャンパス)

永野 友貴・藤原 一彦・小川 信明

ペプチド被覆金ナノ粒子の細胞毒性の検討

日本分析化学会第62年会(近畿大学東大阪キャンパス)

小田島 拓哉・日登 圭宣・藤原 一彦・小川 信明

細胞内に導入したペプチド修飾金ナノ粒子の存在状態の解析

日本分析化学会第62年会(近畿大学東大阪キャンパス)

藤原 一彦・高橋 優斗・小川 信明

熱処理による金ナノ粒子の形状・粒子径再構成とその局在表面プラズモン共鳴センサへの応用

第74回分析化学討論会(日本大学工学部)

永野 友貴・藤原 一彦・小川 信明

化学修飾金ナノ粒子の HeLa 細胞に対する毒性  
の検討

第74回分析化学討論会(日本大学工学部)

桑原 幸穂・藤原 一彦・小川 信明

金ナノ粒子特異的結合能を有する還元型免疫  
グロブリン G の調製と金ナノ粒子への表面修飾

第74回分析化学討論会(日本大学工学部)

小田島 拓哉・藤原 一彦・小川 信明

ペプチド自己組織化膜を介した金ナノ粒子表面  
への抗体分子導入

第74回分析化学討論会(日本大学工学部)

永野 友貴・藤原 一彦・小川 信明

金ナノ粒子の HeLa 細胞への毒性と細胞内導入  
量との相関

日本分析化学会第63年会(広島大学東広島キ  
ャンパス)

小田島 拓哉・藤原 一彦・小川 信明

ペプチド自己組織化膜を介したタンパク質結合  
金ナノ粒子の調製と細胞内導入

日本分析化学会第63年会(広島大学東広島キ  
ャンパス)

桑原 幸穂・藤原 一彦・小川 信明

還元型免疫グロブリン G により表面修飾を施し  
た金ナノ粒子の HeLa 細胞への細胞内導入の  
検討

日本分析化学会第63年会(広島大学東広島キ  
ャンパス)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 一彦 (FUJIWARA KAZUHIKO)

秋田大学・工学資源学部・准教授

研究者番号：10375222