

2004.00200 B

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

「微細加工技術(FIB)を応用した細胞配列化チップの創製

(H14-ナノ025)」に関する研究

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 松村 一成

平成17(2005)年4月

目次

I. 総合研究報告	
微細加工技術(FIB)を応用した細胞配列化チップの創製 -----	01
松村一成	
(資料) 研究結果の補足図	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	09
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	11

厚生労働科学研究費補助金(萌芽的先端医療技術推進研究事業)  
(総合)研究報告書

微細加工技術(FIB)を応用した細胞配列化チップの創製

主任研究者 松村一成 芝浦工業大学工学部材料工学科 講師

研究要旨

膜タンパク質のリガンド探索は創薬のキーテクノロジーであり、その中で重要な要素技術のひとつはターゲットとなる膜タンパク質をもつ細胞をチップ上に非破壊的に配列化する技術である。本研究は、加工形状や基盤材料の自由度の高いFIB(集束イオンビーム)による微細加工と化学的表面処理を組み合わせることで、細胞・ウイルスの配列化を可能にする全く新しい吸着チップの構築を目標とする。

本研究の手法によって、1) 膜成分選択的なりポソーム吸着場の構築が可能であること、2) マスクレス処理で自在に自己組織化機能分子のパターニングが可能であること、3) 凝集体のないバキュロウイルスの吸着場が形成されたこと、などが示された。すなわち、本研究の手法を用いることで高効率性と高選択性を兼ね備えたバイオコロイド吸着場を形成させることが可能であることが示された。

また、固相结合ペプチドのリポソーム吸着能の評価やカチオン性脂質リポソームの凝集・融合現象の追跡を行い、特に短鎖ペプチドに関しては、標的となる粒子径や膜成分に応じたアミノ酸配列設計を可能にするための端緒的な知見が得られた。さらに、水晶発振マイクロバランス(QCM)センサーチップの金基盤上にリポソームの配列的吸着場を生成させたバイオセンサーの試作を行なった。

これらの成果から高度に制御された細胞・ウイルス配列チップの構築に必要な基礎技術が得られた。この研究を発展させれば、医療、創薬の現場で特に重要な細胞膜上のタンパクの機能評価を劇的に容易にするブレークスルーとなると考えている。

## A. 研究目的

膜タンパク質のリガンド探索や機能解明の研究は、創薬を始めとする産業応用上極めて重要な分野である。その研究分野で必要とされる要素技術の一つである、ターゲットとなる膜タンパク質をもつ特定の細胞やウイルスを固相上に固定化するような技術は、生命科学上の手法として発展してきた。

しかしながら、その技術そのものは学術的評価・助成を受けづらいものであり、従来技術はあくまでも学術研究上の需要を満たすものであった。医薬開発に適用できるような、言い換えればシステム化が容易な細胞・ウイルス固定化技術の開発および、そのバイオチップへの応用展開は、基盤的技術であるにもかかわらず厚生労働行政の支援を必要とする分野である。

今日まで用いられてきた細胞・ウイルス固定化モチーフは膜貫通型分子や細胞接着性リガンド、特異的リガンド、金-タンパク接着、His-tag/Ni 錯体などである。しかし、これら材料平面に強固な結合因子を固定化したものでは細胞の形態変化や、対象となる膜タンパクの失活を伴う。また、「点」のみの結合因子による細胞固定化手法は、生体膜が持つ流動性により不安定である。走査型プローブ顕微鏡 (SPM) による膜タンパクの直接観察や、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサー、水晶発振マイクロバランス (QCM) センサーなどの適用を可能にするには、細胞吸着場を「面」で制御することが不可欠である。

本研究は、材料微細加工技術を用いて上記の課題を解決し、従来にない細胞・ウイルスチップの構築技術の創製を目差す。具体的には、集束イオンビーム (FIB) による材料微細加工とリンカー分子の材料表面カップリング、非特異的な細胞膜吸着分子による分子インプリントな

どを組み合わせることにより、細胞・ウイルスに影響を与えず材料上に安定に固定化する技術の確立を目標とする。

## B. 研究方法

本研究で行うウイルス・細胞固定化材料の構築法は、基盤材料に対して FIB 加工と化学修飾を組み合わせるものである。固定化対象としては、主にリポソームを用いた。研究手法は大別して i) FIB 技術を用いたリポソーム吸着場の創製と ii) 固定化に適した化学修飾モチーフの探索の 2 つであり、以下に示す。

i) は、材料表面に FIB 加工装置 (日立製作所 FB-2000A) による微細加工と材料表面の化学修飾を組み合わせる適用し、細孔内に細胞を固定化するリンカー (アンカー) 分子を導入するという工程である。この方法で、リンカー分子の密度と修飾面積を最低限度に制御することができ、かつ SPM や QCM などの分析法が適用可能な安定な細胞の配列的固定化を実現する。微細加工、微細領域の化学修飾、リポソーム (ii 項で述べる) の吸着などの各段階の結果を蛍光顕微鏡、プローブ型顕微鏡などで評価した。

ii) においてはリポソームを細胞・ウイルスの模倣体として用いた。中性リン脂質としてホスファチジルコリン (PC)、アニオン性リン脂質としてホスファチジルセリン (PS) および蛍光修飾脂質としてローダミン誘導体 Diacyl Phosphatidyl ethanolamine-N-Lissamine Rhodamine B Sulfonyl : N-Rh-PE) を用いてリポソームを作製した。リン脂質薄膜形成後、HEPESバッファー (pH 7.00) および塩化ナトリウム水溶液を使用しリポソームを作製した。

リポソームの吸着量の評価を蛍光分光光度計および QCM センサーで分析することで行っ

た。また、蛍光自動偏光分析装置を用いて、吸着時のリポソームの膜流動性を計測した。吸着モチーフとしてのオリゴペプチドは、固相合成法を用いて適宜必要な配列のものを合成した。

(倫理面への配慮)

本研究は、バイオセンサーチップに関する基盤の開発を目指したものであり、人体実験等は実施していない。また、リポソームなどの生体関連物質もすべて試薬より調製しており、実験動物等も用いていないので、倫理面の問題は無いと判断した。

### C. 研究結果

この節及び次節(D. 考察)は以下の a)-f)の項目に分けて説明する。

#### a) FIB 加工と化学修飾による膜成分選択的なリポソーム吸着場の創製

カルボキシル基をアミノ基で保護し、金蒸着したポリブチレンテレフタレート材料を基盤材料として、FIB加工装置にて加工した。100 nm $\sim$ 5  $\mu$  mなどの大きさ(深さ方向2  $\mu$  m)の方形細孔を配列的に生成した。その後細孔部分にポリリシンをカップリングさせてリポソーム吸着能を付与した。ホスファチジルコリン/ホスファチジルセリンを組成とした蛍光修飾リポソームが効率的に吸着されていることが蛍光顕微鏡観察によって示された。

この吸着場は、PC/PSという脂質組成のリポソームをターゲットにしたものである。一方、他の膜成分のリポソームとの混合系で吸着反応を実行したところ、ターゲットのリポソームが優先的に吸着されたことが確認された(資料 図1)。

#### b) 固相結合ペプチドのリポソーム吸着能の評価

細胞・ウイルス固定化分子の機能評価を目的として、合成オリゴペプチドの細胞膜との親和

性を検討した。ポリスチレン(PS)粒子上にFmoc法で各種配列のペプチドを合成し、蛍光修飾リポソームを、50nm、100nmなどに粒径制御して調製した。ペプチド修飾PS粒子にリポソームを吸着反応後、非吸着リポソームを蛍光分光光度計で定量することで固相ペプチドのリポソーム吸着量を決定した。短鎖ペプチドからなる吸着場はその吸着能に特徴的なリポソームの粒径依存性や、アミノ酸配列依存性が存在することが示された(資料 図 2)。

その他、脂質膜流動性、膜内のフォスファチジルセリン濃度、コレステロール濃度などの要因でリポソーム吸着能がどのように変化するかを検討した。

#### c) 基盤材料に対するプラズマ重合生膜処理とFIB加工処理によるウイルス吸着場の生成

金基板上にアセトニトリルモノマーをプラズマ重合させて膜厚100nmの重合体を形成させた。その後、FIB加工をもって5  $\mu$  x5  $\mu$ の凸部を配列的に生成させた。

得られた単純な構造のウイルス吸着場上にバキュロウイルスを滴下し、洗浄処理を行ったところ、ウイルス粒子が単層で吸着場上に固定化されていることが確認された(資料 図3)。

#### d) 短鎖ペプチドの自己組織膜生成能の付与とFIB加工法の適用

b)の結果で高い親和性を示したアミノ酸配列のペプチドを、自己組織化膜生成能を持つ長鎖チオールと複合体化させ、QCM金電極上に固定化させた。そのセンサーチップ上でリポソームの吸着現象を追跡したところ、単なる自己組織化ペプチドにくらべ非常に高い吸着能を示した。

この複合分子の膜組織能とFIB加工法を組み合わせ、金基板上に配列的な吸着場を形成させた。位置特異的なペプチド自己組織化膜の生成が蛍光顕微鏡で確認され、またこの吸着場がリポソームを配列的に固定化することも同様

に確認できた。

e) カチオン性脂質リポソームの凝集・融合現象の追跡

カチオン性脂質の自己組織化膜を細孔表面の化学修飾モチーフとして利用することを目的として、リポソームの凝集・融合反応を蛍光修飾リポソームの FRET や蛍光異方性で追跡した。すなわち、多重蛍光染色したリポソーム内の蛍光分子の FRET 現象、蛍光異方性から、リポソームの融合速度を得た。オリゴリン、オリゴヒスチジン存在下による加速効果の pH 依存性を得た。同じ反応系を蛍光顕微鏡で観察することによって、凝集・融合現象の場合分けを行なった。

f) QCM センサーチップ上にリポソーム吸着場を配列的に生成させたバイオチップを試作した(資料 図4)。センサーチップの金基板上にアセトニトリルをモノマーとしてプラズマ重合させ、高分子膜を形成させた後に FIB 加工を施して、方形状の凹部を配列的に形成させた。これに c) で用いているような吸着場を形成させるためにカチオン性脂質膜をチップ上の細孔内に生成させた、その結果を蛍光顕微鏡で確認した。

D. 考察

a) 高分子材料および導電性材料表面上にリンカー分子を結合させた微細孔を配列的に生成し、その細孔内にリポソームが吸着することが確認された。細孔という物理的形状と化学的な吸着作用を組み合わせた小胞体吸着モチーフというのは本研究で初めて成された新規の手法である。

また、脂質膜成分に対して選択性を持つような吸着能が発揮されていることも確認された。

b) 天然の膜貫通タンパク質に対する興味から、

長鎖オリゴペプチドの生体膜に対する相互作用は以前より調べられていたが、非貫通性の短鎖オリゴペプチドに対する配列網羅的な研究は今までなされていなかった。短鎖オリゴペプチドのリポソーム吸着量を検討したところ、そのアミノ酸配列依存性から、静電的吸着場を提供するリシン残基と膜貫通性を有するトリプトファン残基の共同効果による吸着効果を示していることが確認された(資料 図 2)。すなわち、短鎖オリゴペプチドの鎖端の疎水部分が半貫通的に作用するような配列設計が良好な吸着能には必要であることが明らかとなった。また、その吸着能は小胞体の粒径に依存するため、ターゲットの細胞・ウイルスの大きさもオリゴペプチドの配列設計で考慮する因子となる。

さらに対象となる細胞・ウイルスにおける脂質膜成分での知見を広げるために、フォスファチジルセリンやコレステロールの膜内濃度の影響を検討した。これらの結果から、脂質内成分や脂質膜流動性に応じた固定化分子の配列設計を行う為の知見が得られた。

c) a) では細孔という物理的形状を吸着面の増加として利用しているが、c) では基盤材料に付与した化学的吸着作用と、物理形状による凝集性の制御を組み合わせた結果を提示したものである。凝集性の高いウイルス粒子を面上に固定吸着させるのは従来困難であったが、微細加工で吸着面を区切ることで凝集体が洗浄処理で除去でき、吸着面で強く化学吸着した粒子のみが残っていることが確認された。

d) b) で検討した短鎖ペプチドを基板上に固定化する方法として、自己組織化膜形成能を持つ長鎖チオール基を複合分子として導入した。さらに、FIB 加工で有機膜を直接的に除去し、除去部分に自己組織化膜を再生することで、位置特異的な短鎖ペプチド修飾が可能である

ことを実証した。

従来、位置特異的な自己組織化膜の生成は、Whitesides が開発したソフトリソグラフィーの手法を用いるのが一般的であった。従来法は生産性に優れるが、フォトマスクを用いたマスターパターンの形成に一定の作業工程を要する。本法は、ソフトリソグラフィー法より自在性に優れておりパターンのプロトタイプ生成などに利用することができると考えている。

e) 膜融合は膜同士の吸着反応を経て進行する物であり、b)と同様に膜吸着能に対する重要な知見となった。オリゴヒスチジンがオリゴリシンに比して高い膜融合能を持つ原因は、ヒスチジン残基の膜貫通性にあると考えられる。また融合現象の pH 依存性から、静電場と膜貫通性の両者が共同的に作用することが重要であることが示された。さらに、a)で用いたオリゴリシンが膜貫通性はないものの、静電場作用からリポソーム凝集能を持つことが確認された。

f) 図 4 に示す QCM チップは、アセトニトリルをモノマーとする親水的ポリマーを母材とすることで、リポソームの非特異的な吸着を阻害し、かつ細孔内には吸着性脂質膜を形成させたものである。リポソームの基盤材料の吸着は、想定どおり阻害されたが、高効率でチップ上にリポソームを配列化させる条件は今後の検討課題として残っている。

## E. 結論

高分子材料を主とする基盤材料に対して表面化学処理（キャッピング）と FIB による微細加工を組み合わせ適用して、新規の選択性吸着場や、凝集性を制御した吸着場の生成が確認された。すなわち、このアプローチで、高効率性と高選択性を兼ね備えた細胞・ウイルス配列吸着チップの構築が可能であることを実証した。同時に、吸着場に使用す

る化合物として短鎖オリゴペプチドやカチオン性脂質の機能評価を行い、残基の膜貫通効果と静電効果の共同効果が示された。

また、QCM センサーチップ上にリポソームの配列的吸着場を生成させたバイオセンサーの試作を行なった。

以上より、新規バイオセンサーチップの創製に必要な基盤的知見を得ることができた。

## F. 健康危険情報

特に無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kasuya, Y; Endo, M; Ogawa, H; Hirai, N; Ikeda, Y; Matsumura, K, Development of Liposome Immobilizing with Small Peptide (2) - Peptide Mobilities in Lipid Bilayer, Peptide Science (2003), 35-36

### 2. 学会発表

小山徹、安井克輝、池田泰之、○松村一成、FIB 技術を用いた高分子微細加工と応用 (1) 配列的なりポソーム吸着場の構築、第 32 回医用高分子シンポジウム要旨集 9-10

○粕谷有造、遠藤めぐみ、池田泰之、松村一成 短鎖オリゴペプチドによるリポソーム吸着場の構築 (1) リポソーム吸着能のアミノ酸配列依存性、第 32 回医用高分子シンポジウム要旨集 29-30

○菅生悠樹、脇田貴之、池田泰之、松村一成 オリゴペプチドによるリポソームの挙動制御、第 56 回コロイドおよび界面化学討論会 364-364

○松村一成、生理活性物質の人工認識・触媒系の構築-生理人類学とのかかわり日本生理

人類学会システムバイオエンジニアリング  
研究部会第1回会合、2-2

○栗生夕美子、工藤麻子、田中慎一、池田泰之、松村一成、希土類金属錯体を利用した内分泌攪乱化学物質の分解、環境ホルモン学会第6回研究発表会予稿集 450-450

○粕谷有造、遠藤めぐみ、小川洋樹、平居尚記、池田泰之、松村一成、短鎖オリゴペプチドによるリポソーム吸着場の構築(2)脂質膜におけるペプチドの運動性、第40回ペプチド討論会講演要旨集、7-7

○小山徹、町田景吾、池田泰之、松村一成、FIB 技術を用いた高分子微細加工と応用(2)形状加工と化学修飾を組み合わせたリポソーム吸着場、第25回日本バイオマテリアル学会大会要旨集、222-222

### 3. 新聞報道

2003年8月22日 日刊工業新聞 第5面  
表面に膜たんぱく質を持つ細胞基板上に固定化 細胞チップに応用へ

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許出願

出願日：平成16年1月30日

出願番号：特願2004-24622

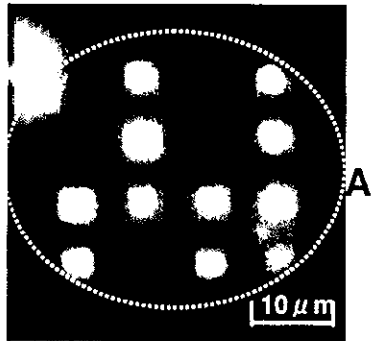
発明者：松村一成

特許出願人：学校法人芝浦工業大学

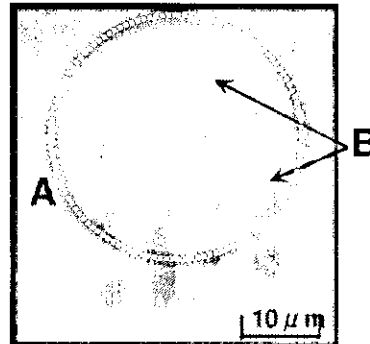
発明の名称：バイオチップの作製方法及びバイオチップ、並びに、プレ・バイオチップの作製方法及びプレ・バイオチップ



- A : アニオン性脂質膜粒子 [ フォスファチジルセリン  
Rh-PE (ex=550, em=590) ]
- B : カチオン性脂質膜粒子 [ ジアシルトリメチルアンモニウムプロパン  
NBD-PC (ex=460, em=534) ]



A粒子吸着系の顕微鏡写真  
(ex=530-550, em=590-)



A,B粒子混合物の吸着系の顕微鏡写真  
(ex=360-370, em=420-)

図1. 膜成分選択的な脂質膜粒子吸着場の顕微鏡観察結果

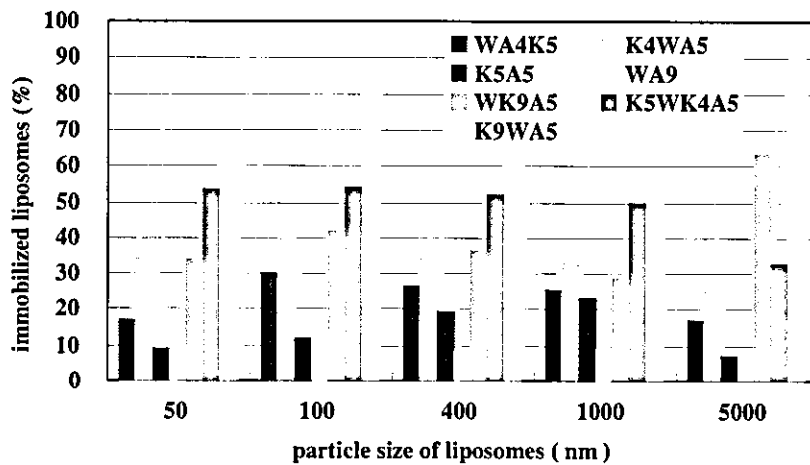
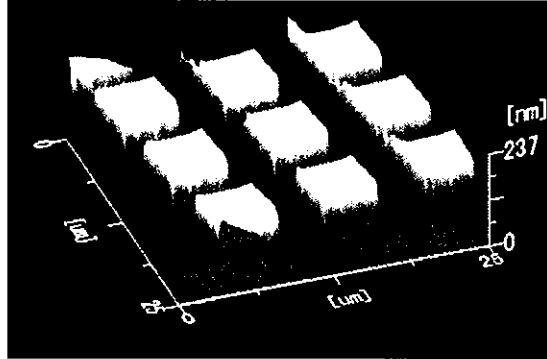
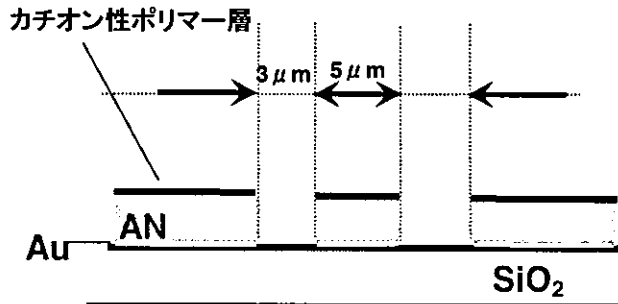
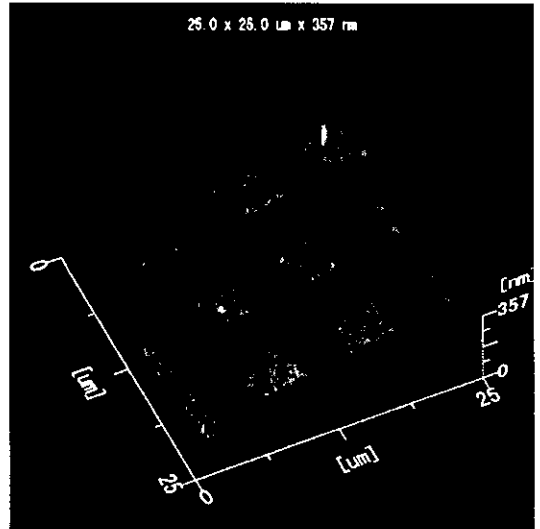


図2. 各種オリゴペプチドのリポソーム吸着反応のリポソーム粒径依存性

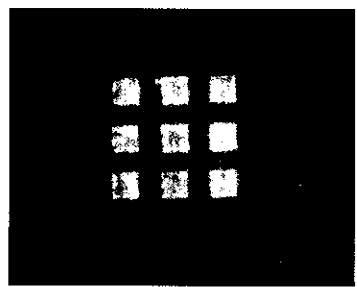
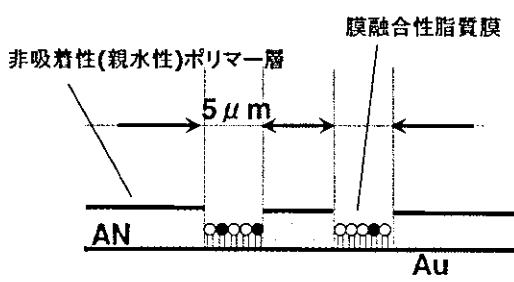
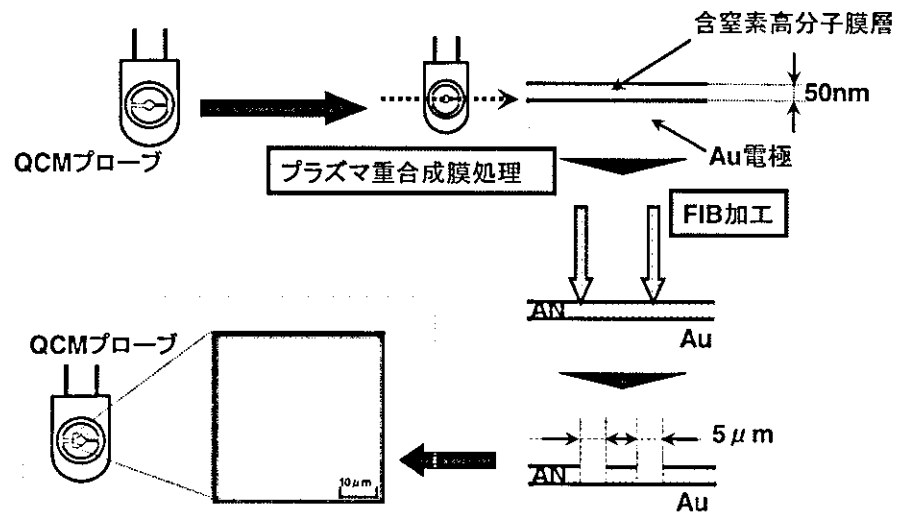


FIB加工形状観察像



バキュロウイルス吸着処理後のAFM観察像

図3. プラズマ重合・FIB加工によるウイルス吸着場の構築



凹部脂質膜の蛍光顕微鏡観察 (ex=530-550, em=590-)

図4. リポソーム吸着場を持つ新規QCMセンサーチップの作成スキーム

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍・雑誌

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kasuya, Y; Endo, M; Ogawa, H; Hirai, N; Ikeda, Y; Matsumrua, K	Development of Liposome Immobilizing with Small Peptide (2) - Peptide Mobilities in Lipid Bilayer	Ueki, M.	Peptide Science	The Japanese Peptide Society	Osaka, Japan	2003	35-36

## 学会発表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小山徹、安井克 輝、池田泰之、松 村一成	FIB技術を用いた高分 子微細加工と応用 (1) 配列的なりポソーム吸 着場の構築	第32回医用高分子 シンポジウム講演 要旨集		9-10	2003
粕谷有造、遠藤め ぐみ、池田泰之、 松村一成	短鎖オリゴペプチドに よるリポソーム吸着場 の構築(1)リポソーム 吸着能のアミノ酸配列 依存性	第32回医用高分子 シンポジウム講演 要旨集		29-30	2003
菅生悠樹、脇田 貴之、池田泰之、 松村一成	オリゴペプチドによ るリポソームの挙動 制御	第56回コロイドお よび界面化学討論 会 講演要旨集		364-364	2003
松村一成	生理活性物質の人工 認識・触媒系の構築・ 生理人類学とのかか わり	日本生理人類学会 システムバイオエ ンジニアリング研 究部会会合		2-2	2003
栗生夕美子、工 藤麻子、田中慎 一、池田泰之、 松村一成	希土類金属錯体を利用した内分泌攪乱化 学物質の分解	環境ホルモン学会 第6回研究発表会 要旨集		450-450	2003
小山徹、町田景 吾、池田泰之、 松村一成	FIB 技術を用いた高 分子微細加工と応用 (2) 形状加工と化学 修飾を組み合わせた リポソーム吸着場	第25回日本バイオ マテリアル学会大 会予稿集		222-222	2003

粕谷有造、徳田優子、平居尚記、池田泰之、松村一成	短鎖オリゴペプチドによるリポソーム吸着場の構築(3)ペプチドの脂質膜局在位置と吸着能	第57回コロイドおよび界面化学討論会要旨集		66-66	2004
水戸裕、田森紘一、池田泰之、松村一成	Bisphenol-A 分解反応系におけるシクロデキストリンの効果	環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集		409-409	2004

## Development of Liposome Immobilizing with Small Peptide (2) – Peptide Mobilities in Lipid Bilayer

Yuzo Kasuya<sup>1</sup>, Megumi Endo<sup>2</sup>, Hiroki Ogawa<sup>2</sup>, Naoki Hirai<sup>2</sup>, Yasuyuki Ikeda<sup>1</sup>,  
Kazunari Matsumura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Material Science and Engineering, Shibaura Institute of Technology, Tokyo 108-8548, Japan, <sup>2</sup>Department of Material Science and Engineering, Faculty of Engineering, Shibaura Institute of Technology, Tokyo 108-8548, Japan

*The amount of dyed liposome bound to the small amphiphilic peptides on the polymer beads was determined. Both hydrophobic and hydrophilic segments contribute to the activity of immobilizing liposome, but cause different liposome size dependence. The fluorescence polarization measurements confirmed that the peptide increased fluidity of liposome membrane according to its binding activity.*

### Introduction

Transmembrane receptor proteins, which bind ligand molecules for biological role, are intensively studied in respect of pharmaceutical and medical application. The presence of lipid bilayer environment is essential for preserving membrane protein structure integrity and their function. Therefore, it is focused to develop immobilizing techniques of lipid vesicle as plasma membrane mimics on a solid support [1, 2]. These techniques are applicable to analytical devices incorporating cell, controlled drug release systems, and bioreactor using cell aggregates. We studied liposome immobilizing activities of small peptides synthesized on polystyrene support.

### Results and Discussion

We prepared liposome dyed with lipid/Rhodamine B conjugates to quantify the binding of the vesicle to the peptide-modified solid support. Fig.1 depicts the amount of immobilized liposome on the various peptide-modified solid supports determined by a centrifugation assay. The typical peptides which have a Trp residue and several Lys residues show high liposome binding activity. The liposome size dependence of the amount of immobilized liposome has a bell-shape between 50 nm and 1000 nm, and a maximum appears around 100 nm. In contrast, the amount of liposome

immobilized by the K5A5 peptide which has no Trp residue increases monotonously according to the particle size of liposome.

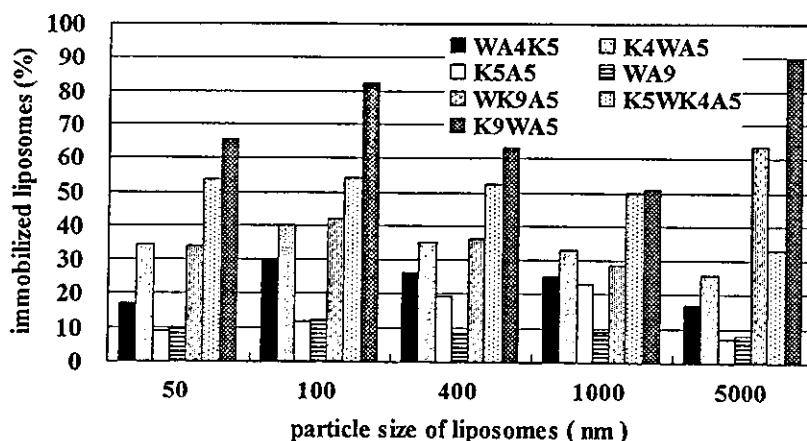


Fig. 1. Dependence of amount of immobilized liposomes on particle sizes.

The fluorescence polarization assay showed that the mobilities of Trp residue in the anchoring peptides decreased in liposome solution. Further more, the liposome membrane fluidity was increased by these peptides (Fig. 2). There was a positive correlation between the fluidity increase and the immobilizing activity.

These results show that liposome binding ability and its particle size dependence can be controlled by a contribution of both hydrophobic and electrostatic forces. Single-pass transmembrane peptides are potent liposome immobilizing motifs which are designed corresponding to the targeting biomembrane.

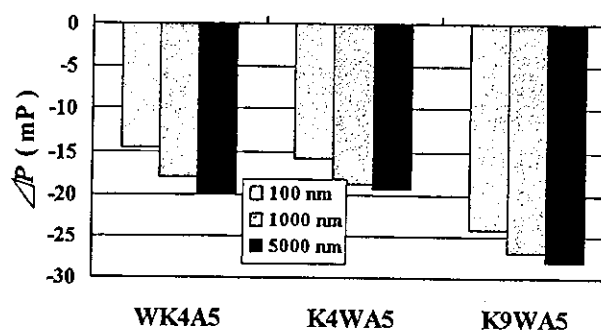


Fig. 2. Fluorescence polarization change of lipid/Rhodamine B conjugate in liposome induced by the immobilizing peptides.

#### References

1. Percot, A., Zhu, X. X., Lafleur, L. (2000) *Bioconjugate Chem.*, **11**, 674-678
2. Hara, M., Yuan, H., Miyake, M., Iijima, S., Yang, Q., Miyake, J. (2000) *Materials Science and Engineering C.*, **13**, 117-121

## 5) FIB 技術を用いた高分子微細加工と応用

### — 配列的なリポソーム吸着場の構築 —

(芝浦工業大学工学部) ○小山 徹、安井克輝、池田 泰之、松村 一成

e-mail : m203103@sic.shibaura-it.ac.jp

電話 : 03-5476-2416 FAX : 03-5476-3161

#### 1. 緒言

膜タンパク質のリガンド探索や機能解明の研究は、創薬を始めとする産業応用上極めて重要な分野である。その研究分野で必要とされる技術の一つである、ターゲットとなる膜タンパク質をもつ特定の細胞やウイルスを固相上に固定化するような技術は、すでに様々な展開がはかられている。さらなる固定化技術の高度化が膜タンパク質などの細胞機能解析デバイスの構築の為に要望されている。

細胞やウイルスを個数や位置を制御して材料表面上に固定化し、バイオチップとして構築するには、生体分子を結合因子とする特異的相互作用、非特異的な材料-生体膜の相互作用、細胞・ウイルスのマクロ形状と材料形状の作用のいずれの制御も不可欠である。本研究は、集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)による材料微細加工技術と高分子の化学修飾を組み合わせることでこれらの制御を可能にし、従来にはない細胞・ウイルスチップの構築技術の創製を目指すものである。

FIB加工によるスパッタリングでは機械加工によるマクロ的応力が発生せず、100nm程度の精度で凹部位の加工が可能である。また、導電性を与えればどのような材料に対しても適用が可能であり、汎用性のある加工法である。このような特徴を生かして、Fig 1のように微細加工と化学修飾を繰り返すことで、高機能な吸着場を構築することができると考えている。今回は、これらの技法でアニオン性リポソームの配列的吸着場の構築を行ったことを報告する。

#### 2. 実験方法

本研究では、基板材料にポリエステル系高分子材料であるポリブチレンテレフタレート(PBT)を使用した。表面のカルボキシル基をエチレンジアミンでカップリングし、金蒸着した基盤材料を、FIB加工装置を用いて加工した。100nm×100nm、1×1μm、5×5μmなどの大きさ(深さ方向~2μm)の方形細孔を配列的に生成した。凹部位に存在するPBT末端カルボキシル基にポリリシン(p-Lys)をカップリングさせてリポソーム吸着能を付与した。

リポソーム吸着場が生成されたことを確認するために、ホスファチジルコリン/ホスファチジルセリンを組成とし、ローダミン部分分子を持つ脂質で蛍光修飾したリポソームやオクタデシル化シリカ(ODS)粒子などを吸着させた後、蛍光顕微鏡観察、走査型プローブ顕微鏡観察を行った。また、微細加工および化学修飾を行った各段階での材料表面の官能基を確認するために、カルボキシル基には4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc)、アミノ基には5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Succinimidyl Ester Mixed Isomer (CFSE)の2種の蛍光ラベル化剤を用いて修飾し、蛍光顕微鏡観察を行った。

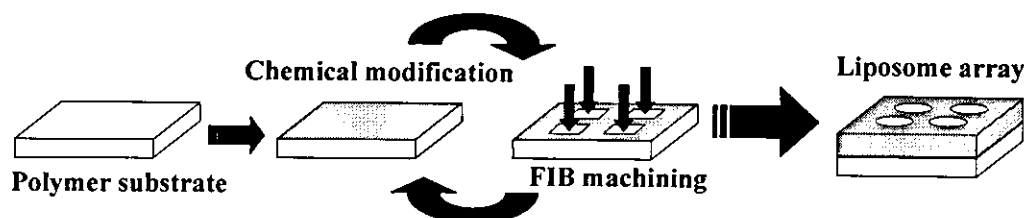


Fig. 1 リポソームの配列的吸着場作製過程

### 3. 実験結果及び考察

上述した方法によって構築したリポソーム吸着場に対して、粒径  $1\mu\text{m}$  のアニオン性リポソーム、粒径  $5\mu\text{m}$  アニオン性脂質膜組織化 ODS 粒子のいずれも吸着することが確認された。Fig.2 には、ODS 粒子を吸着させた PBT 基板を蛍光顕微鏡により観察した写真を示し、Fig.3 では、走査型プローブ顕微鏡による PBT 基板の表面形状を示す。Fig.2、Fig.3 は同一試料であり 9 つの FIB 加工部位中 4 つの ODS 粒子が確認できる。プローブ型顕微鏡観察のために材料表面上に固定化した小胞体は、多くの場合扁平した形状になるが、この吸着場では細孔内で通常の形として観察することが可能になると考えられる。

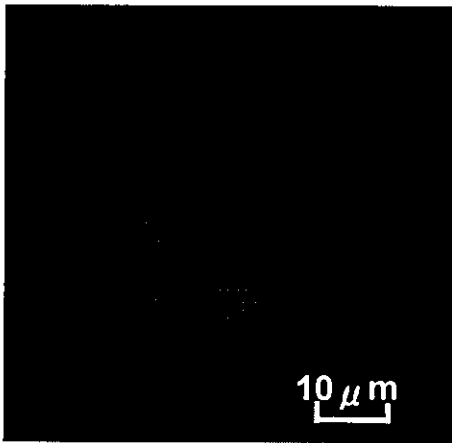


Fig. 2 PBT の FIB 加工部位及び吸着粒子の  
蛍光顕微鏡写真

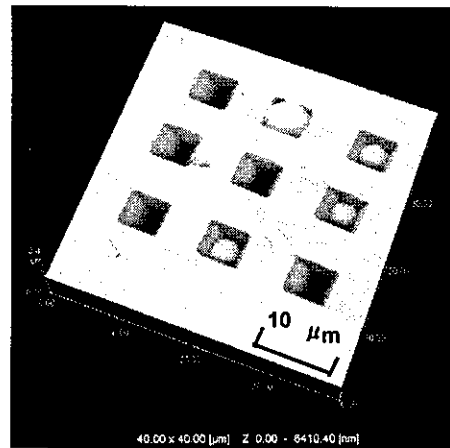


Fig. 3 PBT の FIB 加工部位及び吸着粒子の  
走査型プローブ顕微鏡写真

アミンカップリング後、FIB 加工行い Br-Mmc による修飾を行った  $10\mu\text{m}$  四方の凹部位を Fig.4 に示す。Br-Mmc の青色蛍光により、FIB 加工部位にカルボキシル基の存在を確認できる。凹部の化学修飾の効率化とその定量分析は今後の検討課題である。

これらの結果は基盤材料として PBT を用いたものであるが、その他に導電性ガラス基盤材料に対しても同様なリポソーム吸着場の構築が可能であり、光学的観察の自由度を持つ細胞チップへの応用が期待される。

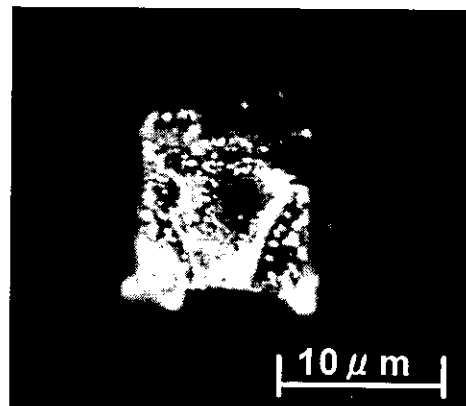


Fig. 4 Br-Mmc 修飾した FIB 加工部  
位の蛍光顕微鏡写真

### 4. 結論

高分子材料表面上にリポソーム固定化分子を結合させた微細孔を配列的に生成し、その細孔内にリポソームが吸着することが確認された。細孔という物理的形狀と化学的な吸着作用を組み合わせた小胞体吸着モチーフという手法は、FIB を加工法として用いることで可能となったものである。今後さらに様々な基盤材料に本法を適用し、グラフト重合や高分子膜コーティング、インプリント技術を応用することで、多彩な細胞チップの構築への発展が可能であることが示唆される。



# 14) 短鎖オリゴペプチドによるリポソーム吸着場の構築

## リポソーム吸着能のアミノ酸配列依存性

(芝浦工業大学工学部) ○粕谷 有造、遠藤 めぐみ、池田 泰之、松村 一成

e-mail m203102@sic.shibaura-it.ac.jp

電話 03-5476-2416 FAX 03-5476-3161

### 1. 緒言

近年、脂質小胞体の高分子基板およびゲル表面への固定化に関する研究<sup>1),2)</sup>に注目が寄せられている。膜組織、膜機能を保持した状態での基板上へ固定化技術は、細胞解析デバイス、ドラッグデリバリーシステム、バイオリアクター等の幅広い分野において非常に有用な技術となる。その要素技術として、特異的なリガンドによる吸着場の構築技術と共に、脂質膜そのものをターゲットにした非特異的な固定化技術が重要である。脂質膜貫通性分子は様々なものが提案されており、今後は膜組織に対する影響や固定化能を自在に分子設計できることが望まれている。

我々は、脂質小胞体の高分子上への固定化モチーフのモデル分子として短鎖オリゴペプチドを用い、ポリスチレン固相上のペプチドとリポソームとの吸着現象を定量した。用いたペプチドの配列は、静電場としてリシン、疎水性領域としてアラニンおよびトリプトファンの3種のアミノ酸から構成されているものである。粒径を制御した各種リポソームを用いて固相上ペプチドのリポソーム吸着能を調べ、これらのアミノ酸の残基数や配列の依存性を検討した。

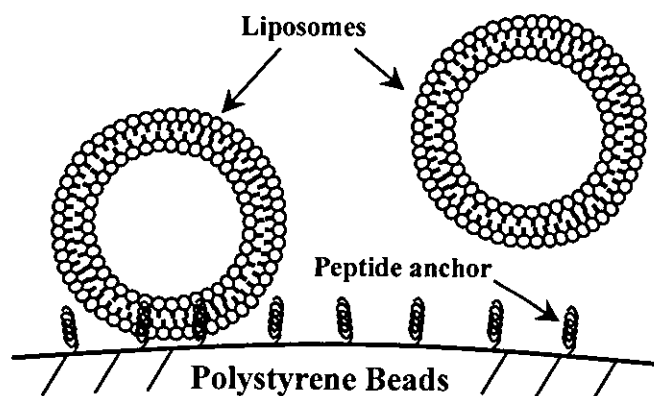


Fig.1 Schematic representation of immobilized liposomes on the peptide-modified polymer

### 2. 実験方法

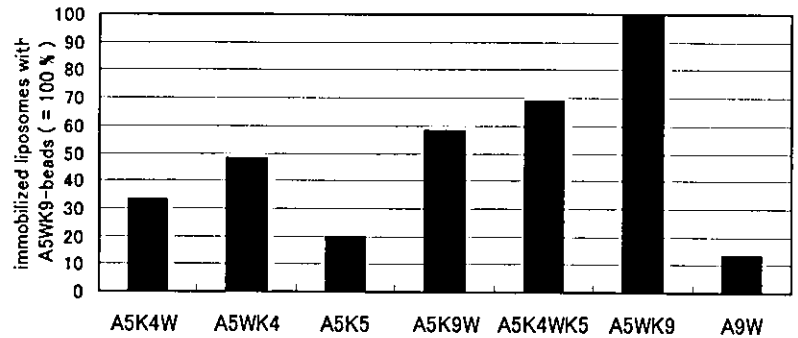
本研究で使用したオリゴペプチドは、Fmoc法で各種配列を固相合成し、ポリスチレン固定相に保持したまま脱保護したものを用いた。リポソームはホスファチジルコリンを主成分とし、ホスファチジルセリンおよび蛍光誘導体リン脂質を加えたものを用い押出法にて粒径を50、100、400、1000、5000 nmに調製した。また、粒径5000 nmのオクタデシル化シリカゲル粒子表面に脂質膜類似層を形成させたもの(脂質膜 ODS 粒子)に関して、リポソームとの比較として吸着評価を行った。ペプチド固定ポリスチレン粒子にリポソームを吸着反応後、非吸着リポソームを蛍光分光光度計で定量することで固相ペプチドのリポソーム吸着量を決定した。

### 3. 実験結果および考察

ペプチド固定ポリスチレン粒子に吸着したリポソームの各アミノ酸配列への吸着量比をFig.2に示す。今回検討したペプチドの中で、最もリポソームを吸着したアミノ酸配列は、固相-A5WK9-NH<sub>2</sub>(以下同様)であった。他の配列ではリシン残基が少なく、またトリプト

ファン残基が先端に位置するペプチドほどリポソーム吸着量が減少する傾向となっている。

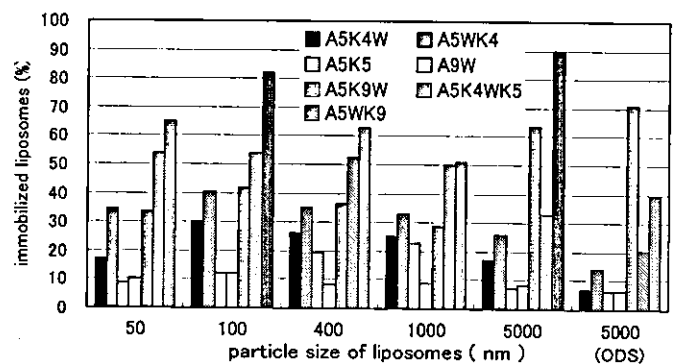
トリプトファン残基を有さない A5K5、およびリシン残基が存在しない A9W に対しては、リポソーム吸着量は著しく低い値を示し、リポソーム固定化能に関して、静電場を形成するリシン残基と最大の疎水基であるトリプトファン残基が協奏的に作用していることが示された。また、ペプチド中トリプトファン残基の位置



**Fig.2 The amount of immobilized liposomes on peptide-modified beads**

で明確にリポソームの吸着量が変化することは、単貫通性の短鎖ペプチドを膜固定化モチーフとして用いることで、ペプチドの脂質膜内、脂質膜外部分の配列設計による吸着能制御が可能であることを示している。

各アミノ酸配列において、リポソーム粒径の相違による吸着量を Fig.3 に示す。リシン残基、トリプトファン残基の両方を配列に有しているペプチドにおいては、リポソーム粒径が 1000 nm までは 100 nm を頂点とした依存性を示した。一方、トリプトファン残基が存在しない A5K5 アミノ酸配列ペプチドに関しては、50 nm から 1000 nm と粒径の増大に伴って吸着量が増加するという異なった依存性を示した。5000 nm および脂質膜 ODS 粒子に関してはそれらの依存性の傾向からは外れる結果となった。



**Fig.3 Dependence of immobilized liposomes on particle sizes**

リポソームの脂質膜は、粒径によって

その流動性や静電的環境が変化する。アミノ酸の配列によって、ペプチド・リポソーム吸着の粒径依存性が変化したことは、ペプチドの疎水性部分と親水性部分のそれぞれのリポソーム固定化に対する寄与度が膜組織の違いによって変化していることを示している。

#### 4. 結論

本研究で、固相上ペプチドによるリポソーム吸着能のアミノ酸配列依存性やリポソーム粒径依存性を明らかにした。これらの結果は、ターゲットとなる脂質膜に応じて脂質膜固定化ペプチドを de novo 設計し、さらに固定化能を制御できる可能性を示唆している。また、各種配列のオリゴペプチドにおける脂質二重膜内部での安定性、およびリポソーム粒径の変化で生じる膜流動性を蛍光偏光測定による解析を行い報告する予定である。

#### 参考文献

- 1) Masayuki, H.; Huiqing, Y.; Masao, M.; Sadayo, I.; Qing, Y.; Jun, M. : *Materials Science and Engineering C*, 13, ( 2000 ), pp. 117-121
- 2) Percot, A.; Zhu, X, X.; Michel, L. : *Bioconjugate Chem*, 11, ( 2000 ), pp. 674-678

### 1. 緒言

ペプチドは膜タンパク質として脂質二重膜内に存在して機能を示す他、脂質二重膜そのものに対する機能分子としても注目されている。また、リポソームの膜融合技術に関する研究はドラッグデリバリーシステム、細胞機能の解析、トランスフェクションによる遺伝子治療等の幅広い分野において注目を集めている。膜融合機構の解明において、リポソームは比較的単純な構造であるため有用なモデルとなる材料である<sup>1,2)</sup>。今回、より高度なリポソームの融合挙動の制御を目指し、各種オリゴペプチド存在下でのリポソームの膜融合を追跡した。

### 2. 実験方法

中性リン脂質のホスファチジルコリン(PC)を主成分とし、押し出し法により粒径100nmのリポソームを作製し、またそれに酸性リン脂質のホスファチジルセリン(PS)を添加したアニオン性リポソーム、塩基性脂質の1,2-ジミリスチル-3-トリメチルアンモニウムプロパン(DMTMAP)を添加したカチオン性リポソームを調整した。それらのリポソーム融合反応を分子量の異なるオリゴヒスチジン(p-His290:平均分子量 39200、p-His140:平均分子量 20000)やオリゴリシン(p-Lys9:平均分子量 1880)などの存在下で、各種pH(6.0-8.0)にて追跡した。膜融合反応の進行度は、蛍光修飾脂質(NBD-PC、Rh-PE)のFRETを蛍光分光光度計で経時に測定することにより評価した<sup>1)</sup>。

### 3. 実験結果及び考察

pH6.0におけるオリゴペプチド、アミノ酸存在下での各種リポソームの膜融合進行度をFig 1に示す。反応系中のアミノ酸残基濃度を一定の条件で、10分後の蛍光強度を図示したものであり、一般的に調査の対象として用いられるオリゴリシンよりもオリゴヒスチジンの効果が高いことが示されている。塩基性ペプチドは、アニオン性リポソームの凝集を促し、それに伴う融合誘起効果も最も顕著なものであるが、中性リポソームの膜融合に対しても顕著な効果を示す。逆にカチオン性リポソームはそれ自身、高い融合活性を示すが、オリゴヒスチジンにより、膜融合性を抑止される傾向が示された。また、オリゴヒスチジンは重合度が高いほど融合を強く活性化し、オリゴリシンの重合度依存性とは異なった挙動を示している。これらの結果に加え、膜融合挙動のpH依存性から、オリゴペプチドのリポソーム融合効果は静電的なリポソーム凝集能以外の要因が比較的大きいことが示されている。

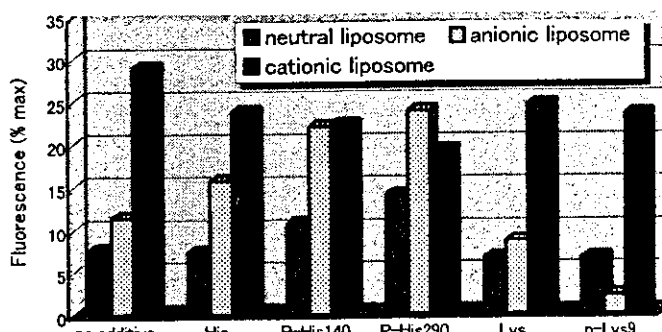


Fig 1 Fusogenic activity of liposome induced by oligopeptide and amino acids determined by measuring FRET between NBD-PC and Rh-PE

### 4. 結論

各種条件下でオリゴヒスチジン、オリゴリシンのリポソーム融合に対する誘起作用を評価した。これらの結果より、静電的なリポソーム凝集効果以外の、膜融合に対する各種アミノ酸残基の効果を評価した。その結果を定量するために、各種ペプチド及びアミノ酸存在下での脂質二重膜の流動性を自動蛍光偏光測定にて解析を行い報告する予定である。

### 参考文献

- 1) Subhash C. Basu ; Manju Basu : *Liposome Methods and Protocols*, HUMANA PRESS, (2002), pp. 31-48
- 2) H. Ti Tien ; Angelica Ottova-Leitmannova : *MEMBRANE BIOPHYSICS AS VIEWED FROM EXPERIMENTAL BILAYER LIPID MEMBRANES*, Elsevier Science B.V. (2000), pp. 221-282

すごう ゆうき・わきた たかゆき・いけだ やすゆき・なつむら かずなり、芝浦工業大学工学部材料工学科、TEL 03-5476-2416、FAX 03-5476-3161、e-mail : m203104@sic.shibaura-it.ac.jp

## 希土類金属錯体を利用した内分泌攪乱化学物質の分解

○粟生夕美子<sup>\*</sup> 工藤麻子<sup>‡</sup> 田中慎一<sup>‡</sup> 池田泰之<sup>\*</sup> 松村一成<sup>‡</sup><sup>\*</sup>芝浦工業大学 大学院 工学研究科, <sup>‡</sup>芝浦工業大学 工学部

【目的】従来、低毒性であると考えられていたビスフェノール A(BPA)が、早期暴露においては有毒な物質へと代謝される可能性があるという報告がされており、環境中への放出を未然に防ぐ為の除去方法の確立が急務となっている。本研究では生体にとって安全性が高く、また、機能の発現に特別な装置を必要としないという観点から、4価のセリウム金属錯体である硝酸アンモニウムセリウム(IV)(<sup>IV</sup>CAN)に着目し、<sup>IV</sup>CANを用いたBPAの分解について実験的に評価を行った。

【実験方法】BPAを基質濃度  $5 \times 10^{-4}$  mol/l の純水:アセトニトリル(95:5 v/v)溶液中、各種金属イオン( $5 \times 10^{-3}$  mol/l)存在下で室温にて反応を行った。<sup>IV</sup>CAN 溶液に基質溶液を加えることで反応開始とし、反応時間 4h までの経時変化を HPLC で追跡した。HPLC 分析は、前処理としてカチオン交換カラム(東ソー TOYOPAK IC-SP S)で金属イオンを除去した後、ODS 逆相カラム、無勾配溶離液(純水:アセトニトリル(6:4 v/v))を用いて行った。

【結果及び考察】基質である BPA は<sup>IV</sup>CAN 存在下で、速やかに分解され約 4 時間で 80%減少した。基質濃度の経時変化は擬一次速度反応プロットに良好に適合し、その分解速度は  $k=1.40 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$  であり、半減期は 123min であった。分解物の主成分は、HPLC の保持時間と FAB-MS 分析によって、*p*-Hydroxyacetophenone であることが同定された。*p*-Hydroxyacetophenone は反応時間 2h 以降減少していることから、分解反応は逐次的であることが示唆される。

Ce(III)イオンなど 3 価の希土類イオンを用いた反応では BPA の現象が全く見られなかった。また、Ce(IV)が水酸化物を形成する中性条件においても BPA の分解が進行しなかったことから、金属イオンによる BPA の速やかな分解は Ce(IV)イオンに特異的なものであり、フェノール基の Ce(IV)に対する配位結合を経て進行しているものと考えられる。以上の結果より、Ce(IV)を用いて、BPA の効率的な人工分解系の構築に成功した。発表では、副生成物や反応経路に関する知見も報告する予定である。

## Degradation of The Endocrine Disrupter using Rare Earth Metal Complexes

○Yumiko Awai, Asako Kudou, Shinichi Tanaka, Yasuyuki Ikeda, Kazunari Matsumura

Shibaura Institute of Technology, Shibaura Tokyo 108-8548, Japan

We have focused attention on Cerium(IV) diammonium nitrate (<sup>IV</sup>CAN) has advantages: it is safety for living organism and it has no special device to expression of function. In this study, we report the effective degradation by <sup>IV</sup>CAN to Bisphenol A (BPA) which has endocrine disrupting action.

The deionized water: Acetonitrile (95:5 v/v) solutions that containing BPA ( $5 \times 10^{-4}$  mol/l) and <sup>IV</sup>CAN ( $5 \times 10^{-3}$  mol/l) are prepared and analyzed for their change with the lapse of time by reversed phase HPLC. Accordingly, we detected only a Ce(IV) has the remarkable activity for degradation.

Substrate (BPA) was decomposed in presence of <sup>IV</sup>CAN so smooth and decreased 80% for 4h. And that's decomposition rate is  $k=1.40 \times 10^{-2} \text{min}^{-1}$  and half-life is 123min. The base of decomposition product is identified as *p*-Hydroxyacetophenone by HPLC and FAB-MS.

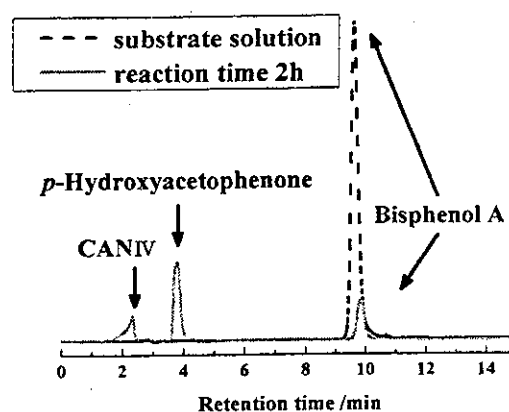


Fig 1 Reversed phase HPLC patterns for the degradation of BPA by CANIV ( $5 \times 10^{-3}$  mol/l) at r.t.: The broken line (substrate solution), the gray line (t=2h).