

2019 年 5 月 7 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点  
平成30年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：東北大学大学院工学研究科

職名：教授

氏名：山本 雅哉

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： 細胞膜アンカー型ペプトイド被覆金ナノクラスターを用いた細胞標識技術の開発
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 有馬 祐介（2018年 4月～10月）  
永樂 元次（2018年 11月～）
3. 研究期間：平成30年4月1日～平成31年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

低細胞毒性かつ安定な標識を実現する細胞標識技術を開発することを目的として、研究期間に次の3点について検討を行った。すなわち、**研究成果①安定な細胞膜アンカー技術の開発**、**研究成果②生体適合性をもつ金ナノクラスターの合成**、**研究成果③細胞膜アンカー技術の細胞標識ならびに細胞接着への応用**である。研究期間を通じて、細胞膜アンカー能をもつペプチドの合成に成功し、それらが細胞標識や細胞接着に利用できることを示唆する結果を得た。以下に、それぞれの詳細について述べる。

**研究成果①安定な細胞膜アンカー技術の開発**

これまで、コレステロールなどの脂質や、それらの脂質にポリエチレングリコール(PEG)などの高分子を結合させた分子が細胞膜アンカー分子として利用されてきた。これらの分子は、容易に合成できるが、細胞膜から1日以内に遊離するという問題がある。より長期間の観察を実現するためには、安定な細胞膜アンカー技術の開発が必要不可欠

である。研究代表者は、細胞膜に安定にアンカーされる  $\alpha$ ヘリックス構造と細胞膜の親水部にある負電荷と相互作用するカチオン性のアミノ酸配列とからなる 6K ペプチド (KKAAALAAAAALAAWAALAAAKKKK) を Fmoc 固相合成法により合成し、質量分析ならびに円偏光二色性に基づき、目的分子の合成を確認した。次に、6K ペプチドに対して、その細胞膜アンカーの安定性について、分子動力学計算 (MD 計算) に基づく自由エネルギー計算、示差走査熱量測定および等温滴定型カロリメトリーによるエネルギー測定により、それぞれ検討した。MD 計算の結果、6K ペプチドの細胞膜アンカーに対する自由エネルギー変化  $\Delta G$  は約 -140 kcal/mol であることがわかった。一方、エネルギー測定の結果、6K ペプチドと人工脂質とが相互作用することによって、発熱ピークが観察され、エネルギー的にも 6K ペプチドの細胞膜アンカーが示唆された。

一方、同様の配列をもつペプチドの合成を試みたが、反応が進行せず、目的の配列からなる細胞膜アンカー型ペプチドを合成することができなかった。この問題については、今後、さらなるペプチドに対する合成条件の検討が必要である。

### 研究成果②生体適合性をもつ金ナノクラスターの合成

テトラクロリド金(III)酸を金に還元することによって、金ナノクラスターの液相合成を試みた。還元によって得られる金ナノクラスターに対して、そのサイズ制御のため、メチル基の置換位置が異なるメチルベンゼンチオールをリガンドとして用いて加熱することによって、有機系においてサイズフォーカシングを行った。リガンド濃度や温度などの反応条件を変化させて合成した金ナノクラスターについて、質量分析、動的光散乱、透過型電子顕微鏡、ならびに紫外可視分光による評価を行った。その結果、いずれの反応条件についても金ナノクラスターではなく、直径数十 nm の金ナノ粒子が形成されていることがわかった。そこで、リガンドとして PEG チオールを用いて、水系においてサイズフォーカシングを行ったところ、直径約 2 nm の金ナノクラスターを合成することができた。一方、得られた金ナノクラスターについて、蛍光特性を調べたところ、イメージングに必要となる発光特性を得ることができなかった。この問題については、今後、さらなる金ナノクラスターに対する合成条件の検討が必要である。

### 研究成果③細胞膜アンカー技術の細胞標識ならびに細胞接着への応用

研究成果①で示した細胞膜アンカー能をもつ 6K ペプチドについて、培養皿に接着させた HeLa 細胞ならびに間葉系幹細胞 (MSC) に対する細胞標識、および 6K ペプチドを固定化したガラス基板への MSC の細胞接着について、それぞれ検討した。

細胞標識について、FITC 標識した 6K ペプチド溶解させたリン酸生理食塩水 (PBS) を用いて、接着した細胞を 30 分間処理後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、全ての細胞が標識されていることがわかった。また、標識 1 日後においても、細胞が標識されていることがわかった。この結果は、従来の PEG 脂質を用いた細胞標識では 1 日以内に PEG 脂質が遊離することから、6K ペプチドは、より安定に細胞膜アンカーされることを示唆している。一方、HeLa 細胞では、FITC 標識 6K ペプチドがドッ

ト状に観察され、エンドサイトーシスされていることを示唆する結果を得た。FITC 標識した 6K ペプチドの PBS 中での会合の有無や細胞標識条件など、さらなる検討が必要であることがわかった。

次に、細胞膜アンカー技術を利用した細胞接着について検討した。まず、ピランハ液を用いて洗浄したガラス基板表面を、スクシンイミド基をもつシランカップリング剤で処理した。導入したスクシンイミド基に対して L-システインを反応させることにより、チオール基を導入した。一方、6K ペプチドの N 末端に対してヘテロバイファンクショナル試薬を用いてマレイイミド基を導入した。このマレイイミド基とチオール基とを反応させることにより、6K ペプチドの N 末端をガラス基板表面に共有結合で固定化した。得られた基板に対して、FTIR 測定を行ったところ、ガラス基板に対して 6K ペプチドが固定化されていることがわかった。得られた 6K ペプチド固定化ガラス基板に対して、無血清培地中に懸濁させた MSC を加えて 2 時間後に位相差顕微鏡を用いて観察したところ、細胞接着が確認できた。一方、ガラス基板のみでは、細胞接着はわずかであった。以上のことから、6K ペプチドの細胞膜アンカーを利用して細胞を接着させることが可能であることがわかった。今後、細胞凝集体やオルガノイドなど、より高次の細胞組織体について、細胞膜アンカー技術を利用した固定化が可能であるかを検討する予定である。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

該当なし