

伊藤ナノ医工学研究室

Nano Medical Engineering Laboratory

主任研究員 伊藤 嘉浩
ITO, Yoshihiro

当研究室では、化学的手法と生物工学的手法を融合させた「バイオものづくり」の方法論の確立と、それによる機能性材料の開発を目指している。方法論として、コンビナトリアル・ケミストリー、進化分子工学、高分子工学、有機合成化学、核酸科学、バイブリッド材料工学、遺伝子・タンパク質工学、微細加工学、ナノテクノロジーなどの手法を駆使して新しい材料、方法論を生み出し、その性能を評価するとともに、再生医療、遺伝子診断、遺伝子治療、ナノメディシン、バイオチップ、バイオエレクトロニクス、人工酵素、人工抗体、バイオマテリアルへの応用展開を図っている。

1. 再生医療、ナノメディシンのためのバイオマテリアル

(1) 再生医療用幹細胞の体外増幅基材の開発 (伊藤、Gong*1、川守田*3)

マウス、サルの胚性幹(ES)細胞を体外で未分化状態を保ったまま増幅できる基材の開発を、マウス繊維芽細胞や不死化したヒト羊膜上皮細胞を化学固定した後、凍結乾燥保存して調製することに成功した。ES細胞は、通常の培養法と同様にコロニーを形成した増殖でき、未分化性を維持していることがわかった。ES細胞を培養する簡便な方法としての展開してゆきたい。

(2) 再生医療用融合タンパク質の創成 (伊藤、北嶋*3、櫻木*3)

組織接着性の成長因子、サイトカインをタンパク質工学でいくつか作成し、その材料接着性、組織接着性の評価を行うとともに細胞増幅の促進を評価した。特に本年度は、フィブリンに結合して活性をもつ新しい融合タンパク質の合成に成功した。

(3) 光固定化法を用いたマイクロアレイ・チップの開発 (伊藤、和田、松平*2、続*3)

自己抗原をマイクロアレイ固定化したバイオチップの作成を行い、自己免疫疾患診断用としての性能の評価を従来の測定法との相関として行った。自動化学発光測定器を作成し、実際の患者サンプルを用いた測定も行い評価した。自動化測定器による測定時間の制御についても検討した。

2. 機能性核酸の創製研究

本研究では、有機合成化学、コンビナトリアル化学、進化分子工学の手法を用いて新しいテラーメイド機能性核酸を生み出すことを目指す。

(1) 光応答性分子認識核酸デバイスの合成 (伊藤、阿部、神明*2、劉*4)

伊藤細胞制御化学研究室との共同研究で、側鎖にアゾベンゼンをもつヌクレオチドの合成を行った。現在、このヌクレオチドからの酵素によるオリゴ核酸合成を検討中。この過程が可能であれば、進化分子工学の適用が可能になる。本年の結果をもとに、光に反応してターゲット分子に吸着するオリゴ核酸の進化分子工学による合成を、次年度以降で行ってゆく。

(2) 有機合成用触媒の開発 (伊藤、阿部、阿部奈保子*2、劉*4、内山*5)

オリゴ核酸から部位特異的や光学活性化化合物の有機合成のためのテラーメイド型触媒の選別を行う。本年は、大阪府立大学藤井郁夫研究室との共同研究で、エステル加水分解の遷移状態アナログを結合するDNAの選別を検討した。選別されたDNAは化合物特異的に加水分解反応を触媒することが期待できる。

(3) 化学的DNA連結反応を用いた生細胞内遺伝子検出法 (伊藤、阿部、王瑾*1、古川*5、近藤*5)

DNAプローブに化学反応基を修飾することにより、鋳型配列特異的に2つのDNAプローブの化学的連結反応を起こすことができる。本反応を用いて、遺伝シグナルの検出・増幅に成功した。さらに、細胞内イメージングのための新規蛍光化合物を合成した。

(4) 化学合成核酸によるRNA干渉技術 (伊藤、阿部、阿部奈保子*2)

化学修飾を加えることにより、生体内安定性の高いRNA分子を合成した。さらに、合成したRNA分子を用いてRNA干渉効果の最適化を検討している。

3. ソフトナノテクノロジーの基盤研究

(1) BZ反応で自励振動する分子材料の研究 (伊藤、上田*1)

東京大学大学院工学系研究科吉田亮研究室と共同で、自励化学反応として知られるBZ反応の触媒であるルテニウム錯体をもつ温度応答性高分子のナノレベルの振動現象を物理化学測定により明らかにするとともに微細加工による新しい自励振動システムの構築を行った。

(2) 生体不活性表面を創出する両性高分子の合成 (伊藤、続*3)

ヒスチジンを含むビニルモノマーと疎水性モノマーを共重合し、疎水性材料へ吸着性の高分子を合成した。合成した高分子の基材表面への吸着、吸着表面へのタンパク質の結合を検討した。

(3) 各種材料のナノ表面修飾 (伊藤、櫻木*3、蓮田*4)

光反応性基をもつポリエチレングリコール誘導体を合成し、チタン、ガラス、およびプラスチック表面への光固定化を行った。光固定化処理を行った材料表面へはタンパク質や細胞の吸着が抑制された。

(4) 表面傾斜材料 (伊藤)

ガラス表面をシランカップリング処理をした後、エキシマー紫外線を照射することにより、表面加水分解を行った。照射時間を変

えることにより親水・疎水の傾斜を作ることができた。傾斜表面での疎水性表面から親水表面への水滴の移動について定量的な評価を行った。

(5) 機能性ペプチドを創製する試験管内選択システムの開発 (伊藤、和田)

コンビナトリアルペプチドライブラリーと無細胞翻訳系ディスプレイ法により新たな試験管内ペプチド選択システムを開発した。そして、このシステムを用いて特定の遷移金属イオンにのみ高い親和性を示す人工ペプチドを選択し、それらの特異的機能について評価を行った。

*1 協力研究員、*2 協力技術員、*3 客員研究員、*4 訪問研究員、*5 研修生

In this laboratory the aim is to create new functional materials by a new method which will be developed by combination of chemical and biotechnological methodology. We use combinatorial chemistry, molecular engineering, polymer engineering, hybrid materials engineering, gene and protein engineering, microfabrication technology, and nanotechnology to synthesize new materials and the systems for development of regenerative medicine, artificial organs, drug delivery systems, nanomedicine, biochips, bioelectronics, artificial enzymes, and artificial antibodies.

1. Biomaterials for regenerative medicine and nano-medicine

(1) Development of biomaterials for *ex vivo* expansion of stem cells for regenerative medicine.

Materials for expansion of mouse and monkey embryonic stem (ES) cells without differentiation were developed. Mouse fibroblast cell and human amnion epithelial cell, which was immortalized by telomerase, were chemically fixed by formaldehyde or glutaraldehyde and they were freeze-dried. The treated cells enhanced the growth of mouse or monkey ES cells without differentiation. The treated cells will contribute a new convenient culture system of ES cells.

(2) Synthesis of fusion protein for regenerative medicine.

Cell-adhesive growth factor proteins or cytokines were prepared by protein engineering and they were complexed with artificial matrix. The binding and growth enhancement activities were investigated. In this year fibrin-adhesive growth factor was newly developed and it was demonstrated that the new growth factor bound to the substrate and enhance the growth of around cells.

(3) Development of photo-immobilized microarray chip

Various types of auto-antigen were covalently micro-arrayed on a chip by using photo-immobilization technique for diagnosis of auto-immune diseases. Automated measurement machine was developed and patient sera was measured by this machine. The measurement time was also investigated.

2. Creation of functional oligonucleotides

In this issue, development of new types of tailor-made biofunctional oligonucleotides was aimed by organic synthesis and combinatorial bioengineering method.

(1) Synthesis of photo-responsive molecular recognition oligonucleotides

Nucleotide containing azobenzene in the side chain was synthesized. Now oligonucleotide synthesis using the synthesized nucleotide was investigated by transcription reaction of enzymes. If this is possible, the nucleotide will be applied for *in vitro* selection.

(2) Development of catalysis for organic synthesis

By using the combinatorial bioengineering tailor-made catalysis for site-specific or optically active organic synthesis was aimed. For this purpose oligonucleotide binding to transition state analogue is now being *in vitro* selected.

(3) DNA chemical ligation method for sensing nucleic acids living cells

DNA probes ligate in the presence of target oligonucleotide without any enzymes or reagent, where probes have reactive functional groups. We successively applied the DNA chemical ligation method for sensing and amplifying target oligonucleotide. Recently, we developed new fluorescent compound for imaging gene expression in living cells.

(4) RNA interference method using chemically modified RNA molecule

Chemically modified RNA molecule showed good tolerance against enzymatic degradation. The RNA molecule is quite useful for clinical applications.

3. Fundamental investigation on soft nanotechnology

(1) Self-oscillating polymer material

Poly(N-isopropylacrylamide) containing ruthenium complex was synthesized and the nano-level of oscillation in the solution was investigated by physical chemical methods. By micro-fabrication techniques a new self-oscillating system was developed.

(2) Synthesis of polyzwitterion for bioinert surface

By copolymerization of vinyl monomers containing histidine residue and hydrophobic moiety, a polymer adhesive to hydrophobic surfaces were synthesized. The adsorption of synthesized polymer to various materials and protein adsorption onto polymer-coated materials were investigated.

(3) Nano surface modification of various materials

Polyethylene glycol derivative containing photo-reactive residue was synthesized and the polymer was photo-immobilized onto titan, glass, and plastic surfaces. The immobilized surface reduced the adhesion of cells and adsorption of proteins.

(4) Surface gradient material

Glass surface was treated with alkyl silane and irradiated with excimer ultraviolet light to be surface hydrolyzed. By adjusting irradiation time, the gradient surface was prepared. A water droplet moved on the gradient surface from hydrophobic to hydrophilic and the movement was quantitatively investigated.

(5) Development of novel *in vitro* selection system for creation of functional peptides

In vitro selection system of functional peptides was newly developed by cell-free display technology and combinatorial peptide libraries. By use of this system, we selected artificial peptides that could bind to transition metal ions with specific affinities and tried to characterize the functionalities of their peptides.

Staff

Head

Dr. Yoshihiro ITO

Members

Dr. Akira WADA

Dr. Hiroshi ABE

Dr. Jiansheng GONG*¹

Dr. Jin WANG*¹

Dr. Masanori UEDA*¹

Dr. Xiuping JIANG*¹

Mr. Hiroshi JINMEI*²

Ms. Naoko ABE*²

Mr. Takahiro MATSUDAIRA*²

Ms. Reiko TAKEUCHI*³

Ms. Satoko TAMAI*³

*¹ Contract Researcher

*² Contract Technical Scientist

*³ Temporary Employee

in collaboration with

Prof. Akira SUWA (Tokai Univ.)

Prof. Hitoshi KOHSAKA (Tokyo Medical and Dental Univ.)

Prof. Ryo YOSHIDA (Univ. Tokyo)

Dr. Yukishige ITO (Synth. Org. Chem. Lab.)

Visiting Members

Mr. Hirokazu HASUDA (KAST)

Dr. Makoto SAKURAGI (KAST)

Ms. Makiko KAWAMORITA (KAST)

Dr. Mingzhe LIU (JSPS)

Dr. Takashi KITAJIMA (KAST)

Dr. Takehiko ISHII (Univ. Tokyo)

Ms. Saki TSUZUKI (KAST)

Trainees

Mr. Atsushi UCHIYAMA

Mr. Kazuhiro FURUKAWA

Ms. Yuko KONDO