

伊藤ナノ医工学研究室
Nano Medical Engineering Laboratory

主任研究員 伊藤嘉浩 (工学博士)
ITO, Yoshihiro (Dr. Eng.)



キーセンテンス：

1. ナノ診断システムの構築
2. ナノ治療システムの構築
3. 合成生物学、進化分子工学手法による機能性分子の創製研究
4. ナノテクノロジーの基盤研究

キーワード：

人工臓器工学、医用材料、生体材料、生体機能材料、再生医工学、薬物伝達システム、ナノ表面界面、分子デバイス、生体機能関連物質、生物活性分子の設計・合成、分子イメージング、核酸医薬、遺伝子検出、核酸化学、分子センサー、マイクロアレイ・バイオチップ、ソフトナノテクノロジー、高分子科学、細胞工学、タンパク質工学、進化分子工学、コンビナトリアル・バイオエンジニアリング、微細加工、合成生物学

研究概要

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、ハイブリッド材料工学、遺伝子・タンパク質工学、微細加工工学、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. 診断用ナノ医工学

(1) マイクロアレイ・バイオチップの開発 (伊藤)

新しい光反応性基を用いた固定化材料を開発し、その性能評価を行った。特に測定系の開発と再現性高くマイクロアレイ・チップができる条件についての検討を行った。

(2) 細胞内遺伝子検出法 (鶴澤)

ルテニウム錯体のローダミン誘導体への光励起電子移動反応を利用した「細胞内における特定の位置と時間における遺伝子検出法」の開発を目指し、進化分子工学的にルテニウム錯体およびローダミン誘導体に結合するRNAアプタマーの選出をそれぞれ行った。

(3) タンパク質検出法 (鶴澤)

ターゲット分子に結合すると蛍光強度が大きく変化するペプチドプローブを進化分子工学的に開発した。具体的には、カルモジュリンに結合すると蛍光強度が100倍増加するプローブ (図1) およびペロ毒素に結合すると蛍光強度が80%減少するプローブを、進化分子工学を用いて創出した。

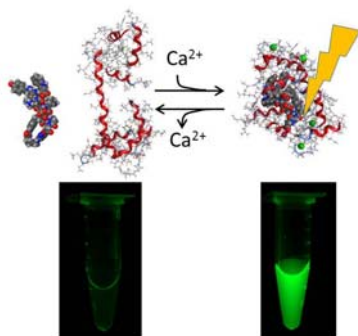


図1 進化分子工学的に開発したペプチドプローブとカルシウム結合型カルモジュリンとの結合をMDシミュレーションした結果。結合に伴う環境の変化により、ペプチドに含まれる蛍光色素が蛍光を発するようになる。

2. 治療用ナノ医工学

(1) 再生医療用幹細胞の調製 (和田、伊藤)

核移植法や遺伝子導入法による作成以外の方法論で体細胞クローン化ES様細胞の調製を目指して検討を行った。特に前田バイオ工学研究室の細川専任研究員とともに、マイクロ流路を用いた細胞融合法の開発を行い、細胞制御阻害剤を用いることで高効率な細胞融合が可能であることを見出した。また、マウスやヒトのiPS細胞を化学固定化フィーダー細胞上で培養できることを明らかにするとともに、その活性が固定化した細胞の流動性に関係することを明らかにした。

(2) 結合性成長因子の創成 (多田)

表面接着性の成長因子、サイトカインを合成し、その表面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。ヒドロキシアパタイト表面への結合能を有するタンパク質であるスタセリンに由来するリン酸化ペプチド配列を上皮成長因子 (EGF) に連結したところ、このEGF分子はヒドロキシアパタイトやチタンなどの無機材料表面への結合性を示し、接着した培養細胞の増殖を促進させることが確認された。また、無機材料表面への結合能を示すペプチド鎖を有するEGF分子を進化分子工学の手法で探索した結果、得られたEGF分子は生理活性を失うことなくチタン表面に結合できることが示された。

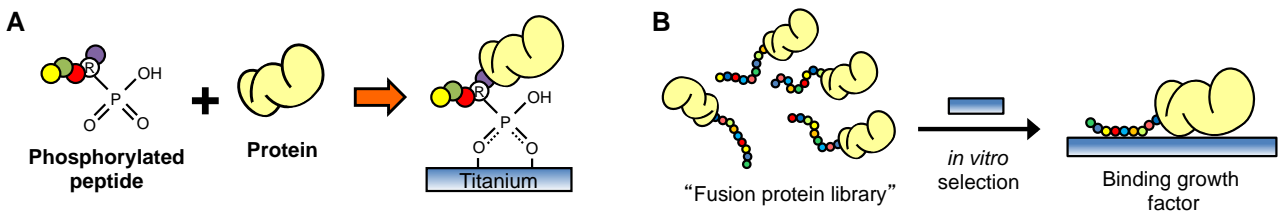


図2 結合性成長因子の作製。(A) スタセリン由来ペプチドによる成長因子の固定化、(B) 進化分子光学的手法による結合性成長因子の探索。

(3) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (上田、小林)

親水性薬剤キャリアとして中空のペプチド集合体に注目し、その形状制御の検討を行った。複数の両親媒性ポリペプチドを組み合わせて一つの集合体を調製することにより様々な形状のペプチド集合体の調製に成功した。また、回転分子や、折れたたみ分子で修飾した金ナノ粒子を開発し、細胞内への取り込みなどについて検討を行った。両親媒性ナノ粒子を調整し、siRNAの細胞内デリバリーと明確なルシフェラーゼ発現の抑制を達成した。(図3)

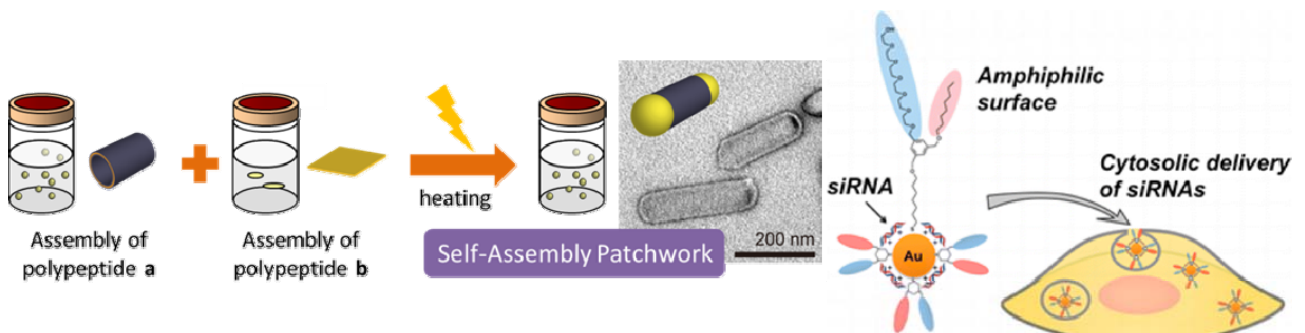


図3 中空ペプチドキャリアと金ナノ粒子キャリア

3. 合成生物学手法による機能性分子の創製研究

(1) 光応答性分子認識ペプチドアダプターの合成 (多田)

新たに側鎖にアゾベンゼンをもつアミノフェニルアラニン誘導体を用いた進化分子工学により、ターゲット分子に結合し、光に応答して吸脱着するペプチドアダプターの探索に成功し、ターゲットへの吸脱着を光制御できることが明らかとなった。進化分子工学の手法により、複数の標的分子から各々を認識する光応答性ペプチドアダプターが得られたことから、本手法が多様な標的分子に適用できる可能性が示唆された。

(2) ディスプレイ法を用いた新しいペプチドアダプターの開発 (鶴澤、多田)

非天然アミノ酸を導入したペプチドアダプターを、リボソーム・ディスプレイ法を用いて作成することができるようになり、新しい可能性としてスーパー阻害剤、センシング分子、触媒分子について検討

を行った。

(3) リボソーム高分子合成の開発 (多田)

ポリエチレングリコール (PEG) をtRNAに担持させ、無細胞翻訳系でタンパク質へ部位特異的に導入する方法に成功し、詳細な検討を行った。認識するコドンの異なるtRNAを利用することにより、鎖長の異なる複数のPEGをペプチド鎖に導入できることが確認された。

4. ナノテクノロジーの基盤研究

(1) 有機分子や光デバイスにおける自己組織的秩序構造形成 (磯島)

有機低分子の真空蒸着膜中で分子がアモルファスでありながら自発的分極配向を示す現象について、分子形状に起因する「非対称サイコロモデル」によるシミュレーションを行い、半定量的に実験結果が再現できることを明らかにした。また2次元光双安定素子における状態遷移領域の伝播現象について、数値シミュレーションによって実験に向けた条件の最適化を行い、現実的な照射光強度で通常のビデオカメラでも十分観察可能な波面伝播速度が実現できることを確認した。

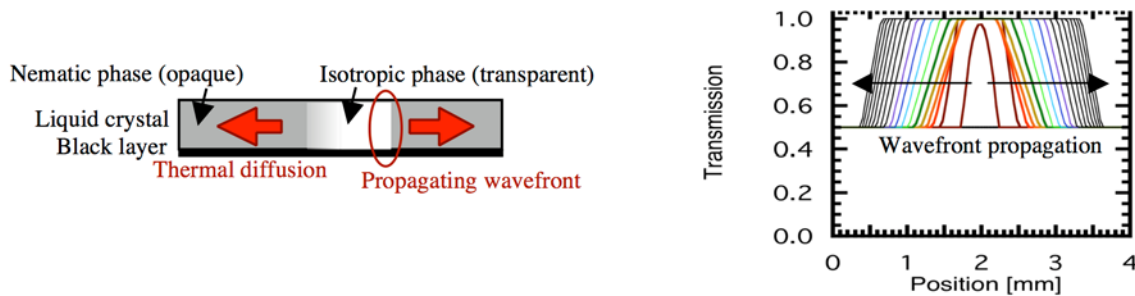


図4 左図のような断面構造の素子では光双安定性が生じ、どこか(図では中央部)に強い光パルスを当てると高透過率の”On”状態が熱拡散に伴い横方向へ伝播する。右図は透過率分布の等時間間隔スナップショットを重ね書きしたもので、波面が伝播して行く様子が分かる。

(2) 単層型カーボンナノチューブを水中で効率よく分散するペプチドアダプタマーの開発 (Li, 磯島, 伊藤, 川本)

カーボンナノチューブへ特異的に結合するオリゴペプチドをリボソーム・ディスプレイ法によって得た。得られたペプチドアダプタマーは臨界ミセル濃度以下で優れたナノチューブ分散性を示し、分散液は数ヶ月間安定であった。安定な水分散性は、ペプチドアダプタマーに含まれる芳香族性アミノ酸とカーボンナノチューブとの強いπ相互作用に由来することがわかった。

(3) pn ヘテロ接合を自発的に形成する三元系ナノコンポジットの開発 (Li, 伊藤, 川本)

フラーレン誘導体を含む水分散液へカーボンナノチューブを加えたところ、フラーレンがカーボンナノチューブ表面に付着した複合体を形成した。さらにこの複合体へ水溶性ポリチオフェンを加えると、ポリチオフェン-フラーレン-カーボンナノチューブからなる三元系ナノコンポジットを得た。ナノコンポジットは、均質なサイズと優れた水分散性を示すことがわかった。ナノコンポジットのキャスト膜を作製し疑似太陽光を照射したところ、光電流の発生が認められた。

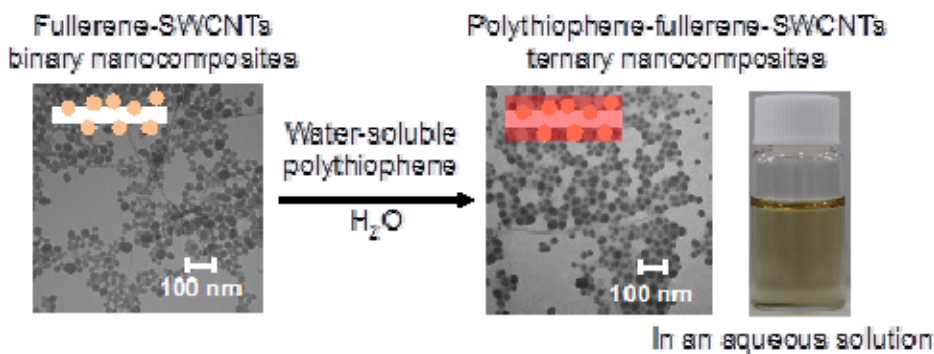


図5 ポリチオフェン, フラーレン, 単層型カーボンナノチューブからなる三元系ナノコンポジットの形成

(4) 多刺激クロミズムを示すナノ粒子の開発 (Salikolimi, 伊藤, 川本)

水中で自発的にナノ粒子を形成する導電性ポリマーを開発し、様々な外場刺激に対してクロミズム応答を示すことがわかった。ポリマー溶液へ徐々に水を加えると、溶液の色が黄色から紫色へと変化した。この溶液を加熱すると粒子の色が可逆的に変化する事がわかった。さらに、酸、塩基を加えても粒子の色の変化を生じることを明らかにした。

(5) 固相熱脱離反応を示す導電性ポリマーの開発 (He, 伊藤, 川本)

側鎖に熱脱離基を導入した親水・疎水性を示す導電性ポリマーを合成した。得られたポリマーは汎用溶媒に可溶であり、基板への成膜が可能であった。得られたフィルムを加熱すると溶媒に不溶な膜へ変化した。熱重量分析、赤外吸収スペクトルの結果より、不溶化は固相中で側鎖の熱脱離反応を生じ、溶解性が変化したためであることがわかった。

Key Sentences :

1. Development of Nano Diagnostic Systems
2. Development of Nano Therapeutic Systems
3. Creation of Functional Molecules by Synthetic Biology and Molecular Evolutionary Engineering
4. Fundamental Investigation on Nanotechnology

Keywords :

Artificial Organ Engineering, Medical Materials, Biomaterials, Biofunctional Materials, Regenerative Medical Engineering, Drug Delivery System, Nano Surface and Interface, Molecular Device, Bio-Related Compounds, Design and Synthesis of Bioactive Molecules, Molecular Imaging, Nucleic Acid Drugs, Gene Detection, Nucleic Acid Chemistry, Molecular Sensor, Microarray Biochips, Soft-Nano Technology, Polymer Science, Cell Engineering, Protein Engineering, Molecular Evolutionary Engineering, Combinatorial Bioengineering, micro-Fabrication, Synthetic Biology

Outline

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, micro-fabrication technology, and nanotechnology to synthesize new materials and the systems for development of regenerative medicine, artificial organs, drug delivery systems, nano-medicine, biochips, bioelectronics, artificial enzymes, and artificial antibodies.

1. Medical Engineering for Diagnosis

(1) Development of microarray biochip (Ito)

In order to develop a new diagnostic system using micro-array biochip, we synthesized new photo-immobilizable polymers and evaluated the performance as an immobilizing matrix. This year we focused on the reproducible manufacturing the photo-immobilization system.

(2) Nucleic acid sensing in living cells (Uzawa)

Aiming for harnessing the photo-induced electron transfer from a ruthenium complex to rhodamine derivative to detect a specific gene at certain position and time in vivo, we selected RNA aptamers for a ruthenium complex and a rhodamine derivative using in vitro selection method.

(3) Protein sensing (Uzawa)

Using in vitro selection technique, we developed probes which change the emission intensities upon binding to their specific targets; the calmodulin binding probe enhances its fluorescence upon binding to calmodulin (Figure 1), whereas the verotoxin binding probe decreases its fluorescence upon binding to verotoxin.

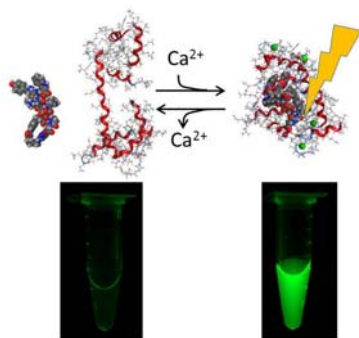


Figure 1 The complex structure of the developed peptide and calcium-bound calmodulin was simulated by MD. The developed peptide containing a fluorogenic molecule emits fluorescence upon the binding to the calcium-bound calmodulin.

2. Therapy by nano medical engineering

(1) Preparation of stem cells for regenerative medicine (Wada, Ito)

In order to prepare reprogrammed cells derived from somatic cells, some methods were investigated using cell fusion of embryonic stem cells with somatic cells. Microfluid system was developed for cell fusion with Drs. K. Hosokawa at Bioengineering Laboratory of RIKEN. We found that the fusion efficiency was enhanced by a cell-regulating inhibitor. It was also indicated that chemically fixed feeder cells supported the growth of mouse and human iPS cells with keeping undifferentiated state. We found the fixed cell activity depended on the cell membrane fluidity.

(2) Synthesis of fusion protein for regenerative medicine (Tada)

Surface-binding growth factors and cytokines were designed and characterized by measuring binding affinity to the surface and cell proliferation activity. Phosphorylated peptide sequence derived from statherin protein, known for its high affinity to hydroxyapatite surface, was conjugated with epidermal growth factor (EGF). This modified EGF showed high binding property to hydroxyapatite and titanium surfaces and induced cell growth in in vitro culture. Another binding EGF, selected by evolutionary molecular engineering method, also bound to titanium surface without severe activity loss.

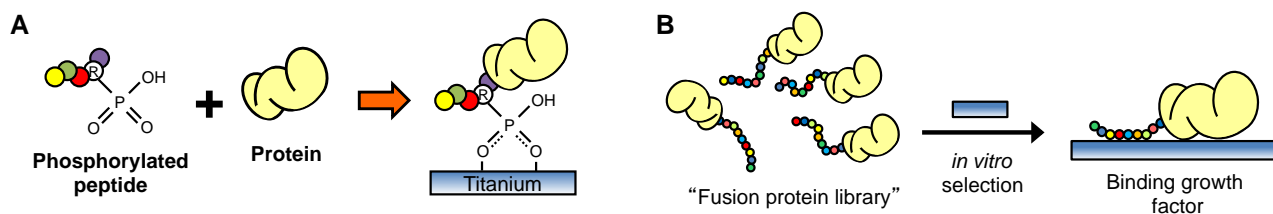


Figure 2 The Design of surface-binding growth factors. (A) Immobilization of epidermal growth factor (EGF) with phosphorylated peptide derived from statherin protein. (B) In vitro selection of binding growth factors based on evolutionary molecular engineering.

(3) Drug delivery system (Ueda, Kobayashi)

The hollow molecular assembly is a promising tool for a nanocarrier of hydrophilic drugs in a drug delivery system. We prepared various peptidic molecular assemblies having complex morphologies by preparing from a combination of some amphiphilic polypeptides. In addition, gold nanoparticles bearing amphiphilic surface modification ligands were prepared and the level of cellular uptake was examined. Cellular delivery of siRNA and apparent gene suppression of luciferase was achieved with the aid of amphiphilic gold nanoparticles as carrier of siRNA. (Figure 3)

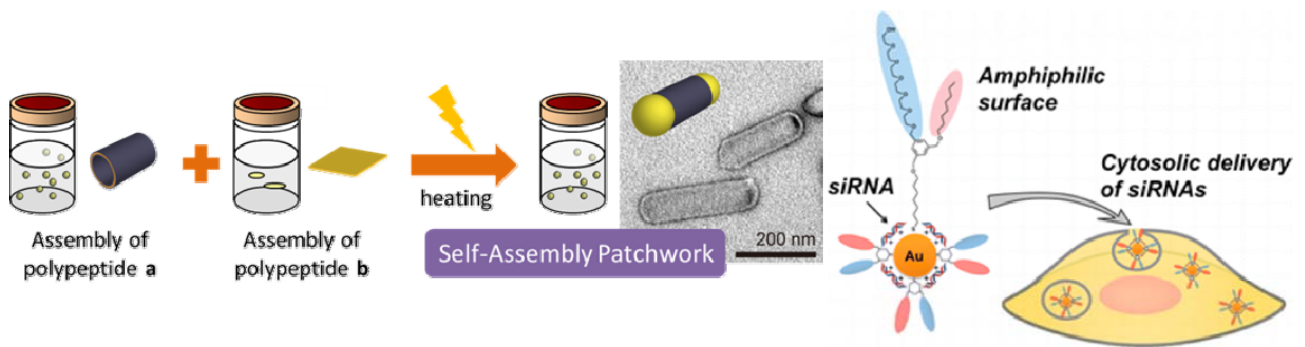


Figure 3 Hollow peptide carrier and gold nanoparticle carrier

3. Creation of functional molecules by synthetic biology

(1) Synthesis of photo-responsive aptamers (Ito, Tada)

Nobel peptide aptamers with photoresponsive molecular recognition were successfully selected with evolutionary molecular engineering using azobenzene-aminophenylalanyl tRNA. The selected peptides showed different binding affinity to each target based on photo-irradiation.

(2) Development of novel *in vitro* selection system for creation of functional peptides (Uzawa, Tada)

In vitro selection system of functional peptides was investigated by ribosome display technology and combinatorial peptide libraries containing non-natural amino acids. By this method, new super-inhibitor, sensing molecular probe, and molecular catalyst were being developed.

(3) Ribosomal synthesis of polymers (Tada)

Genetic PEGylation method using cell-free translation system and polyethylene glycol (PEG)-conjugated aminoacyl tRNA was investigated. This method realized site-specific modification of proteins with PEG. PEG chains with different length were successfully incorporated in single peptide by using aminoacyl tRNAs recognizing different codons.

4. Fundamental investigation on soft nanotechnology

(1) Self-organization phenomena in organic molecular films and optical devices (Isoshima, Ito)

Spontaneous polar molecular orientation in vacuum-evaporated organic thin films was investigated. Based on the simple geometrical "Asymmetric dice model", numerical simulation was performed and the results semi-quantitatively agreed with the experimental results.

Two-dimensional optical bistable devices were investigated in terms of propagation of state-transition area ("wavefront"). Numerical simulation was performed and it was shown that the wavefront propagation is experimentally achievable with ordinary light source and video camera.

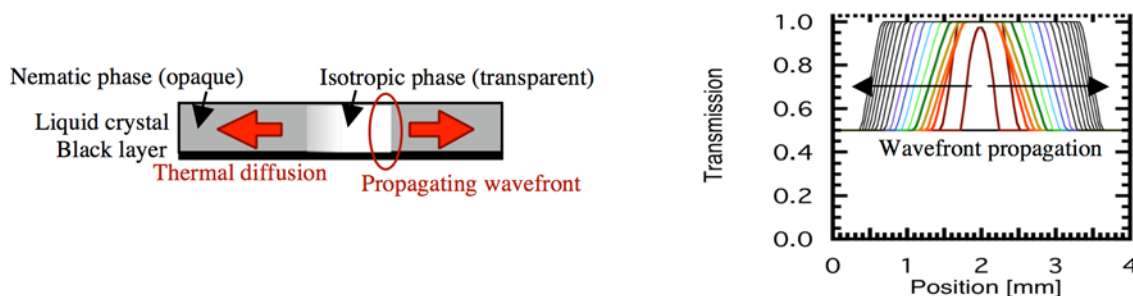


Figure 4: (left) Schematic cross-sectional diagram of an opto-thermal bistable device, in which the front of high-transmission ("On") area propagates along with thermal diffusion. (right) Superimposed snapshots of optical transmission distribution in the device by 1 sec interval. Turn-on wavefront propagation can be observed.

(2) Development of a peptide aptamer showing well-dispersion of single-walled carbon nanotubes

(SWCNTs) in water (Li, Isoshima, Ito, Kawamoto)

The peptide aptamer with high binding affinity to SWCNTs was obtained by a ribosome display. The resultant aptamer exhibited dispersion behavior below the critical micelle concentration. The dispersion of aqueous solution was essentially unchanged for several months. Stable dispersion under the low concentration was due to strong π - π interaction between aromatic amino acids in the peptide aptamer and SWCNTs.

(3) Self-assembled formation of ternary nanocomposites with pn heterojunction (Li, Ito, Kawamoto)

The ternary nanocomposites were formed in water when the water-soluble polythiophene was added to the binary composites of fullerenes and SWCNTs. The resultant nanocomposites showed the uniform size with a good dispersive ability in water. The drop-casting film of the ternary composites exhibited photocurrent response using a solar simulator.

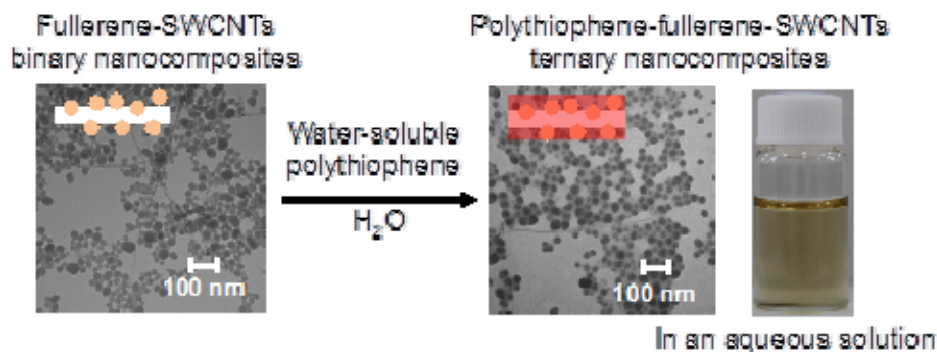


Figure 5 Formation of the ternary nanocomposites composed of polythiophene, fullerene, and SWCNTs.

(4) Development of multichromic nanoparticles (Salikolimi, Ito, Kawamoto)

We investigated multichromic behavior of nanoparticles composed of the conducting polymer in organic solvent-water mixtures. Change in color of the nanoparticles occurred from yellow to purple if amount of water increased. The resultant purple solution also exhibited reversible change in color by heat. Furthermore, the nanoparticles in the solution showed change in color, resulting from acid and base reactions of the conducting polymer.

(5) Development of conducting polymers showing thermal cleavage reactions in the solid state (He, Ito, Kawamoto)

Synthesis of hydrophilic and hydrophobic conducting polymers containing thermal cleavage segments was investigated. The polymers exhibited good solubility in common solvents and film-formation properties on substrates. When the polymer films were heated, the resultant film was insoluble in any solvents. From the results of thermogravimetric analysis and infrared spectroscopy, origin of change in the solubility was due to removal of the terminal groups by the thermal cleavage reaction in the solid state.

Principal Investigator

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

Research Staff

磯島 隆史 Takashi ISOSHIMA

鵜澤 尊規 Takanori UZAWA

川本 益揮 Masuki KAWAMOTO

上田 一樹 Motoki UEDA

北嶋 隆 Takashi KATAJIMA

和田 健一 Ken-ichi WADA

Sivakumar Maliapan PONNURENGAM

多田 誠一 Seiichi TADA

王 偉 Wei WANG

何 盼 Pan HE

Liping ZHU

小林 謙也 Kenya KOBAYASHI

Baiju Govindan NAIR

Students

Yasodha MANANDHAR

Thoa Thi Thanh TRAN

Si Yoon SEO

Shin Hye PARK

周 小越 Xiaoyue ZHOU

Xi YANG

Qingmin ZANG

Yue ZHOU

三輪 拓也

Hadjer SALMI

Chen ZHANG

Assistant and Part-timer

小布施 聖 Sei OBUSE

湯本 晶子 Akiko YUMOTO

佐藤 祐子 Yuko SATO

Visiting Members

長田 義仁 Yoshihito OSADA

田代 英夫 Hideo TASHIRO

相垣 敏郎 Toshiro AIGAKI

常田 聡 Satoshi TSUNEDA

吉田 靖弘 Yasuhiro YOSHIDA

居城 邦治 Kuniharu Ijiro

山村 雅幸 Masayuki YAMAMURA

小畠 英理 Eiry KOBATAKE

木賀 大介 Daisuke KIGA

阿部 洋 Hiroshi ABE

原 雄介 Yusuke HARA

中村 真理子 Mariko NAKAMURA

孫 泰一 Tae il SON

章 培標 Peibiao ZHANG

劉 明哲 Mingzhe LIU

佐野 健一 Kenichi SANO

新倉 謙一 Kenichi NIIKURA

畠田 昌至 Masashi HATADA

江上 舞 Mai EGAMI

Binata JODDAR

樋口 亜紺 Akon Higuchi