

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。特にアレルギーの原因解明のための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、進化分子工学的に得られたRNAアプタマーがルテニウム錯体に結合した状態の分光学的特性を調べた。

(3) 生体分子検出法 (鶴澤・植木)

病原マーカータンパク質や生体機能低分子をターゲット分子として、それらに結合するペプチドプローブを進化分子工学的手法にて探索する系を構築した。

2. 治療用ナノ医工学

(1) 再生医療用幹細胞の調製 (Mao・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、和田協力研究員とともに、マイクロ流路を用いた細胞融合法の開発を行い、細胞内のオルガネラの移動が可能であることを見出した。また、間葉系幹細胞の培養を成長因子固定化材料上で行えることが明らかとなった。

(2) 生物模倣設計による、成長因子固定化技術の開発 (宮武)

ムール貝の水中接着機構を模倣し、成長因子を医療用素材に細胞無毒性な方法で固定化する技術の検討を行った。ムール貝の水中接着タンパク質をもとに、接着性ペプチド(adhesive peptide: AP)を設計し、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) のC末端に、遺伝子組み換え技術により導入した後、酵素反応によって更にAPを活性化して、IGF-1-APを調製した。このチタン表面への吸着性を調べたところ、野生型と比較して、5倍程度吸着性が向上した。さらに、IGF-1-APを表面に固定化したチタン材料は、固定

しない場合と比較して、細胞増殖を2倍程度増加させたことから、本手法の安全性と有効性が確認できた。

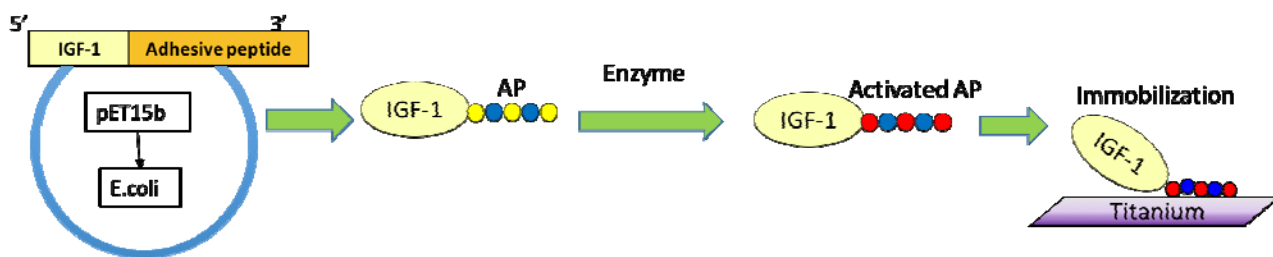


図1 IGF-1のチタン表面への固定。大腸菌でIGF-APを発現し、精製後、酵素反応により更に吸着性を活性化した。得られたIGF-1-APは、チタン表面上に活性を保ったまま、強固に吸着させることができた。

(3) ドラッグ・デリバリー・システムの開発 (上田)

親水性薬剤キャリアとして中空のチューブ状ペプチド集合体に注目し、その形状制御の検討を行った。球状のペプチド集合体を作用させることによりチューブの開口部を塞ぐことに成功しDDSキャリアとしての応用研究を行っている。実際、タンパク質および低分子薬剤を内水相に内包できることを確認した。さらにチューブ状集合体のチューブ長制御法を確立し、異なる長さのチューブ状集合体を用いて細胞取込速度とチューブ長の関係を明らかにした。細胞取込に最適なチューブ長と表面電位を有するチューブ状集合体を用いて細胞内への速やかな蛍光分子(薬物モデル)の導入に成功した(図3)。

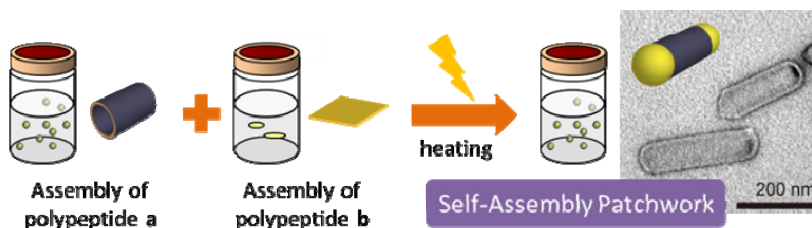


図2 中空ペプチドキャリアと金ナノ粒子キャリア

3. 合成生物学手法による機能性分子の創製研究

(1) 新しい機能性ペプチドアダプターの開発に向けたペプチド選別法の改良 (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の選別によるスーパー阻害剤、センシング分子、触媒分子等の新規機能性分子の開発を目指すにあたり、より効率的なペプチド選別法の検討を行った。リポソーム内におけるペプチド翻訳と機能評価法の検討およびマイクロビーズディスプレイ法によるペプチド選別法の検討を行った。

(2) バイオ直交化学による高分子修飾ペプチドの合成 (多田)

ポリエチレングリコール (PEG) によって修飾されたアミノ酸を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手法の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鎖をペプチド鎖に導入できることが確認されたほか、各PEG鎖の導入順や認識コドンの異なるtRNAの導入順により、最終的なペプチド生成量に大きな差が生じ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、基板表面粗さの影響は限定的であることを示した。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結果に基づいて素子を作製し、波面伝播を実験的に検証した。

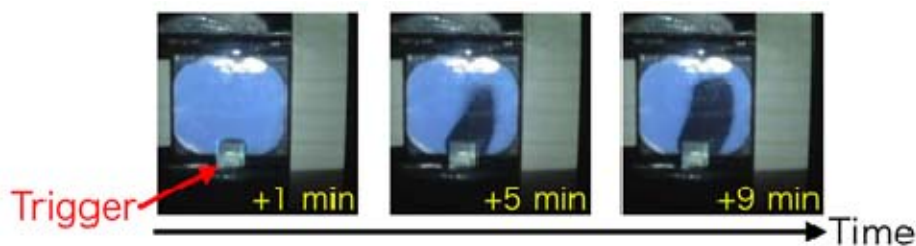


図3 熱伝播型2次元光双安定素子における波面伝播。左写真のトリガの位置に強い光を当てることでその近辺が高光透過率状態（On状態、写真では黒く見える）となり、時間とともにこの領域が広がっていく（波面伝播）。この実験で得られた波面伝播速度はシミュレーション結果とよく一致した。

(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) フラーレンナノ粒子を用いた単層型カーボンナノチューブの水中分散性 (Li, He, 伊藤, 川本)

フルーレンナノ粒子がカーボンナノチューブの水中分散剤として機能することを明らかにした。水中への分散性は、ナノ粒子がカーボンナノチューブ側面に付着することで誘起することがわかった。得られた水分散溶液を用い、フレキシブル基板へのフルーレンナノ粒子-カーボンナノチューブ複合体膜の成膜に成功し、この複合体膜が熱電変換能を有することを明らかにした。また、フルーレンナノ粒子-SWCNT 複合体へ水溶性ポリチオフェンを加えると、三元系ナノコンポジットを水中で自発的に形成した。得られ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、光電変換能を示すことがわかった。

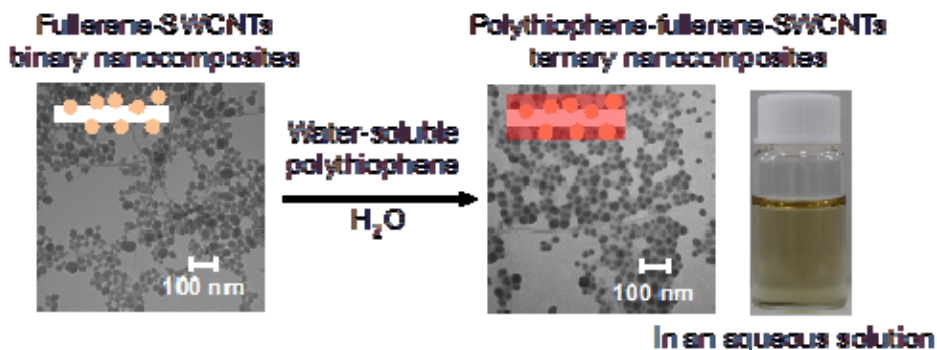


図4 ポリチオフェン、フルーレン、単層型カーボンナノチューブからなる三元ナノコンポジット

(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。また合成したポリマーが、エタノール中でカーボンナノチューブの分散剤として機能することを明らかにした。透過型電子顕微鏡観察の結果、ポリマーがナノチューブ表面に付着し、分散性を誘起することがわかった。

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 investigated the spectroscopic properties of the ruthenium complex in the bound form with a selected RNA aptamer.

(3) Biomolecule sensing (Uzawa, Ueki)

We constructed systems to select artificial probes binding to targeted biomolecules, including disease marker proteins and functional biomolecules, by using in vitro selection technique.

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) Biomimetic-inspired adhesion of growth factor proteins (Miyatake)

We investigated the fixation method of growth factor on the medical materials without cytotoxicity, which is inspired by the blue-mussel adhesion in water. In the wettable glue of blue-mussel, the adhesive peptides (AP) are directly involved in the adhesion process. We, therefore, introduced an artificial AP sequence into the IGF-1 at the C-terminal by the genetic recombinant technology. The

obtained IGF-1-AP protein was further treated with an enzyme to converting to the activated form. IGF-AP protein successfully bound on the titanium surface in five times larger amount comparing to the wild-type. In addition, the IGF-1-AP promoted the cell growth ratio about two times higher, that proved it is effective without any cytotoxicity.

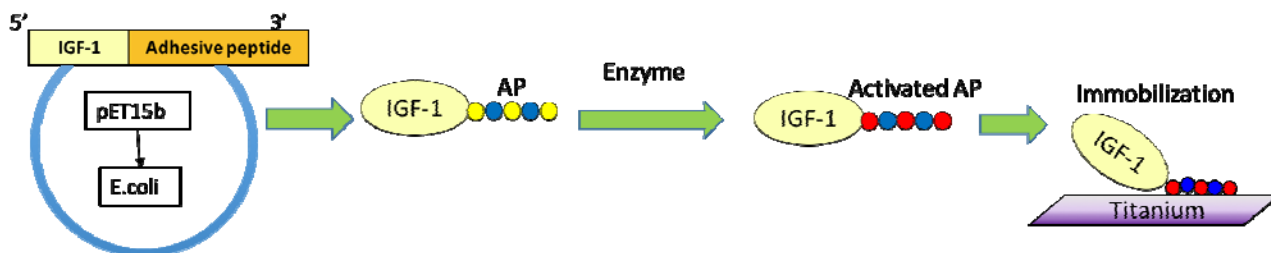


Figure 1 Adhesion of IGF-1-AP on titanium surface. After the expression of IGF-1-AP protein by *E.coli* and purification, it was further activated the treatment of an enzyme. The IGF-1-AP protein obtained found to be tightly bound on the titanium surface with keeping the bioactivity for cell growth.

(3) Drug delivery system (Ueda)

The hollow molecular assembly is a promising tool for a nanocarrier of hydrophilic and hydrophobic drugs in a drug delivery system. We prepared successfully a tubular-shaped peptidic molecular assemblies whose open mouth were capped by another peptidic assemblies from a combination of some amphiphilic polypeptides. In addition, this tubular nanocarrier can entrap not only a small drug but also a protein inside. With using this nanocarrier, we elucidated that tubes having high aspect ratio delivered drugs into cancer cell more quickly, comparing with sphere-shaped carrier. (Figure 2)

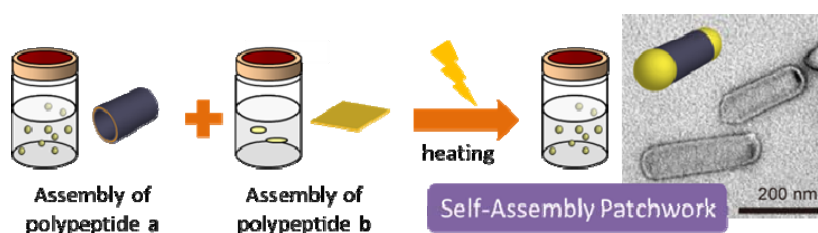


Figure 2 Tubular-shaped hollow peptidic nanocarrier

3. Creation of functional molecules by synthetic biology

(1) Development of novel in vitro selection system for creation of functional peptides (Uzawa, Tada)
Improved peptide selection systems were explored for development of functional peptides, including super-inhibitors, sensing molecular probes and molecular catalysts, based on evolutionary molecular engineering. Peptide translation and its functional analysis inside liposomes were investigated. Microbead display method was also examined for peptide selection.

(2) Peptide modification with synthetic polymers based on bioorthogonal chemistry (Tada)
Genetic PEGylation method using cell-free translation system and polyethylene glycol (PEG)-conjugated aminoacyl tRNA was minutely investigated. This method realized site-specific modification of proteins with PEG. It was found that the order of PEG chains with different length and tRNAs recognizing different codons affected final yield of the PEGylated peptide.

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. Numerical simulation based on the simple geometrical asymmetric dice model predicted that

surface roughness of the substrate does not affect molecular orientation significantly. Two-dimensional optical bistable devices were investigated in terms of propagation of state-transition area (“wavefront”). A trial device was fabricated based on numerical simulation, and wavefront propagation was experimentally observed.

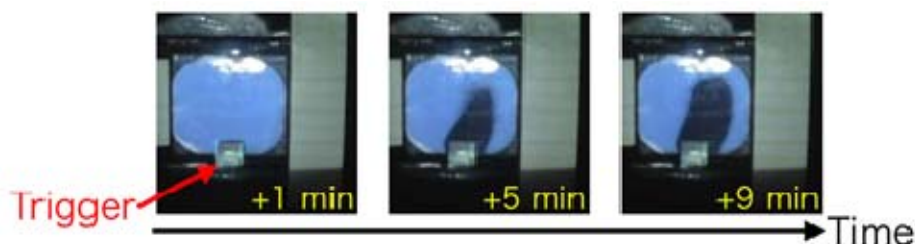


Figure 3 Experimentally observed wavefront propagation in a thermal-type 2D optical bistable device. Strong light was irradiated at the place shown by the red arrow, and the device turned on nearby to the high optical transmission state (black area in the photographs). The on area expanded with time. Wavefront propagation velocity obtained from this experiment was consistent with the numerical simulation result.

(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) Aqueous dispersion of single-wall carbon nanotubes using fullerene nanoparticles (Li, He, Ito, Kawamoto)

We found that fullerene nanoparticle acts as a dispersant of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) in water. Aqueous dispersion properties were induced by adsorption of the nanoparticles with the sidewall of SWCNTs. The fullerene nanoparticle-SWCNT composite film on a flexible substrate was obtained using the dispersed solution and showed thermoelectric behavior. Furthermore, self-assembled formation of ternary nanocomposites was obtained in water when the water-soluble polythiophene was added to the binary composites of fullerene nanoparticles and SWCNTs. The drop-casting film of the ternary composites exhibited photoelectric conversion behavior using a solar simulator.

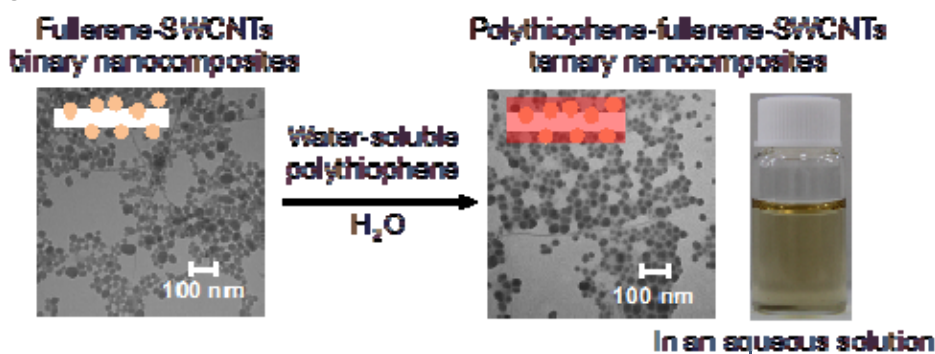


Figure 4 Formation of the ternary nanocomposites composed of polythiophene, fullerene, and SWCNTs.

(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. The obtained polymer showed a dispersant of SWCNTs in ethanol. The dispersion properties were observed by adsorption of the polymer at the surface of SWCNTs using transmission electron microscope.

Principal Investigator

伊藤 嘉浩 Yoshihiro ITO

山中 恭子 Kyoko YAMANAKA

Research Staff

磯島 隆史 Takashi ISOSHIMA
宮武 秀行 Hideyuki MIYATAKE
植木 雅志 Masashi UEKI
川本 益揮 Masuki KAWAMOTO
鵜澤 尊規 Takanori UZAWA
上田 一樹 Motoki UEDA

Sivakumar Maliapan PONNURENGAM

多田 誠一 Seiichi TADA

何 盼 Pan HE

Liping ZHU

小林 謙也 Kenya KOBAYASHI

Baiju Govindan NAIR

毛 宏理 Hongli MAO

Nandakumar AVANASHIAPPAN

Students

Thoa Thi Thanh TRAN

Si Yoon SEO

Shin Hye PARK

周 小越 Xiaoyue ZHOU

Qingmin ZANG

三輪 拓也

Hadjer SALMI

Chen ZHANG

Roopa DHARMATTI

Morteza MAHMOUDISABER

孫 健 Kon SON

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

江上 舞 Mai EGAMI

Binata JODDAR

樋口 亜紺 Akon HIGUCHI