

# 生体分子を基盤とした超分子ナノファイバーの人工細胞骨格への応用

東 小 百 合\*

## Application of Biomolecule-based Supramolecular Nanofibers to Artificial Cytoskeletons

Sayuri HIGASHI\*

For decades, the bottom-up approach of building fully synthetic cells from scratch has attracted widespread attention in quest to understand the molecular blueprint of life. However, replicating cell deformation for motility and division remains a challenge. Here, a self-assembling peptide derivative for supramolecular nanofibers was newly designed and developed as artificial cytoskeletons. *in situ* chemical synthesis of the peptide derivative enabled fiber formation under mild conditions, including inside W/O droplets.

### 1. 研究背景と目的

人工的に細胞をつくることを目指した研究が活発に進んでいる。生細胞と同様にリン脂質二重膜で覆われた直径数十  $\mu\text{m}$  の区画内 (巨大リポソーム) で、遺伝子複製~翻訳系や代謝系の一部が再現されてきた。他方では、細胞移動や細胞分裂のための細胞形状変化 (細胞変形) の誘導方法が活発に研究されている。<sup>1)</sup> 生細胞内では、特定の繊維状構造体 (= 細胞骨格) が細胞膜と相互作用することで細胞形状の維持または変形、そして走化性を獲得している。人工細胞においても天然の細胞骨格因子を用いて細胞変形の再現が試みられているものの、細胞移動や細胞分裂を誘発する細胞変形の再現

は未だ重要な課題である。本研究では巨大単層ベシクル (giant unilamellar vesicle: GUV) の変形を誘導する人工細胞骨格に化学合成した自己集合性分子を用いることで「動く人工細胞モデル」のボトムアップ構築を目指している (図1)。特定の化学構造を有する分子同士は弱い相互作用により秩序高く集まり (自己集合)、繊維状やシート状など顕微鏡で可視化できる大きさの構造体へと成長することが超分子化学としてよく知られている。これまでに我々の研究グループを含め世界中で様々な自己集合性分子が開発されており、近年では自己集合や崩壊を外部刺激 (刺激の例: 光、酵素、酸化還元、pH 等) で誘導することや、自己集合能を維持したままでの機能性分子の付加を可能とする自己集合性分子も多く報告されている。<sup>2)</sup> 天然の細胞骨格ではなく超分子ナノファイバーを人工細胞骨格として用いることで、例えば細胞変形に有効な細部骨格のサイズや繊維の直径などを詳細に知ることができると考えている。

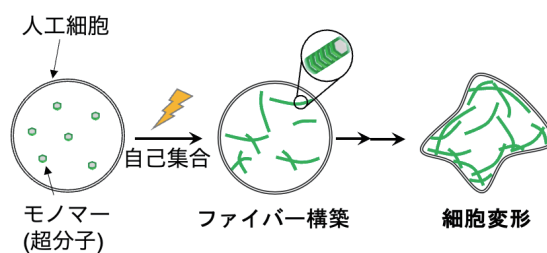


図1 本研究の概要.

### 2. 熱処理を回避した自己集合性ペプチド誘導体超分子ナノファイバーの構築

2003年にフェニルアラニン-フェニルアラニン (FF) ジペプチドが自己集合性を示すことが発見されて以降<sup>3)</sup>, FFジペプチドのN末端やC末端を誘導体化させた多種多様な自己集合性ペプチドが開発されており、本研究でもFFジペプチド誘導体を人工細胞骨格に用いた。通常、FFジペプチド誘導体の多くは水に対する分散性に乏しく、水溶液中での自己集合化には熱処理 (加熱-冷却) を必要とすることが多い。熱安定性の乏しいGUV内部での超分子ナノファイバーの構築となると、熱処理は避けたい工程である。一方で、最近では常温下での自己組織性分子の合成を起点に超分子構造体の構築まで等温下で行う *in situ*法も注目されており、当研究室でもサーモライシンの酵素反応を利用することで特定のペプチドヒドロリド誘導体から *in situ*での自己集合性分子の合成とナノファイバーの構築に成功している。<sup>4)</sup> 本研究では、水溶性の縮合剤を用いることで自己集合性FFペプチド誘導体の *in situ*化学合成および超分子ナノファイバー構築を目指した。結果と

して、図2に示したように自己集合性FFペプチド誘導体として凝集誘起発光 (aggregation-induced emission: AIE) 色素<sup>5)</sup>をFFのN末端修飾したMeO-Ind-FF-OMeの*in situ*合成および超分子ナノファイバーの構築に成功した(図2)。詳細な結果は割愛するが、基質濃度の検討およびチオフラビンTを用いた臨界凝集濃度(CAC)の測定、HPLCを用いた縮合反応進行度の評価も行なった。重要な点として、MeO-Ind-FF-OMeナノファイバーはAIE特性を有することから、440 nmの照射下で510 nm付近に極大蛍光波長を有する蛍光性超分子ナノファイバーであることも確認された。なお、有機溶媒中で化学合成したMeO-Ind-FF-OMeを水溶液中へ熱分散させることや超分子ナノファイバーの構築には至らなかった(熱処理前後で析出状態に変化なし)。したがって、MeO-Ind-FF-OMeナノファイバーの構築にはMeO-Ind-F-OHとF-OMe・HClの*in situ*化学合成アプローチが最適であると考えられる。そして、MeO-Ind-FF-OMeナノファイバーは3次元ネットワーク構造を形成することで水を多く含むヒドロゲル状態を示したことから、細胞やバイオ医薬などを内包できる生体材料への応用も可能と考えている(図2下)。

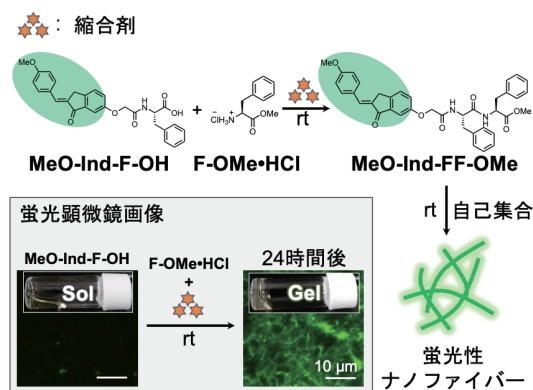


図2 上: MeO-Ind-FF-OMeの*in situ*化学合成を起点とした超分子ナノファイバー構築スキーム, 下: 反応前後の試料溶液の写真および蛍光顕微鏡画像。

### 3. 油中水滴内での蛍光性人工細胞骨格の構築

人工細胞骨格としての応用を目指し、油中水滴内でのMeO-Ind-FF-OMeの*in situ*化学合成および超分子ナノファイバーの構築を試行した。その結果、図3のように直径数十μmの油中水滴内でMeO-Ind-FF-OMeナノファイバーネットワークの構築が確認された。観察のしやすさから、カバーガラスに吸着した油中水滴を観察したため、MeO-Ind-FF-OMeナノファイバーの構築による油中水滴の動的な挙動については現時点で確認できていない。その一方で、一部の油中水滴内ではMeO-Ind-FF-OMeナノファイバーが界面付近に局在している様子が見られた点については興味深く、今後も詳細に追究したい。

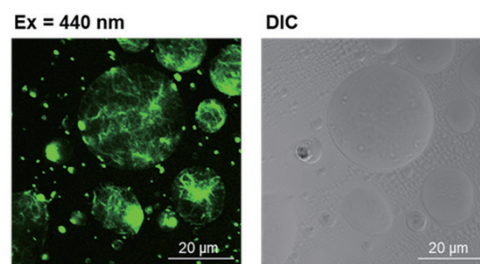


図3 油中水滴内での人工細胞骨格の蛍光顕微鏡画像。

### 4. 結論と今後の展望

本研究では、低分子化合物の自己集合による超分子ナノファイバーを人工細胞骨格として応用することを目指している。そのためには、超分子モノマーの自己集合が室温下で穏やかに進行する手法が必須と考えた。そこで、水溶性の縮合剤を用いることで水溶液中でのMeO-Ind-FFの*in situ*化学合成および超分子ナノファイバー(巨視的にはヒドロゲル形成)の構築方法を確立した。MeO-Ind-FFナノファイバーは、AIE特性を有することから特定励起波長下で自ら蛍光を発することも蛍光顕微鏡観察などから確認された。この蛍光性超分子ナノファイバーは油中水滴内でも*in situ*化学合成を経由して構築された。今後は、GUV内でも上記と同様に蛍光性超分子ナノファイバーが構築される条件を確立するとともに、GUVの変形条件について脂質膜の最適化を行う。

### REFERENCES

- 1) C. Bastiaan and J. C. M. van Hest, *Accounts of Chemical Research*, **50** (2017) 769-777.
- 2) S. Panja and D. J. Adams, *Chemical Society Reviews*, **50** (2021) 5165-5200.
- 3) M. Reches and E. Gazit, *Science*, **300** (2003) 625-627.
- 4) Y. Shintani, M. Ikeda, *et al.*, *Chemistry—A European Journal*, **28** (2022) e202104421.
- 5) J. Luo, B. Z. Tang, *et al.*, *Chemical Communications*, (2001) 1740-1741.