

# 光応答性金属誘起構造体融合プラズモニック ナノワイヤーを用いた単一細胞内物質導入技術開発

猪瀬 朋子\*

## Integration of Photo-sensitive Metal-organic Frameworks and Plasmonic Nanowire Toward Intracellular Material Delivery Systems

Tomoko INOSE\*

We developed a nanowire-based single-cell endoscopy system combined with metal-organic frameworks (MOFs) for spatiotemporally controlled intracellular protein delivery. ZIF-8-coated nanowires efficiently encapsulated proteins and released them in response to pH changes. Intracellular insertion of the nanowires enabled protein delivery into HeLa cells. Further improvements, including photoresponsive MOFs, are being explored to enhance release efficiency and enable precise, light-triggered intracellular biomolecule delivery.

### 1. 研究背景

近年、細胞機能の理解と精密な制御を実現するための細胞操作技術が注目されている。特に、遺伝子やタンパク質を細胞内へ導入することで細胞機能を操作する技術は<sup>1)</sup>、細胞の動態やシグナル伝達の解明、さらには難治性疾患の治療法開発など、さまざまな応用可能性を秘めており、幅広い研究分野で利用されている。例えば、細胞内で目的のタンパク質を任意の場所およびタイミングで発現・放出できれば、単一細胞レベルでの精密な機能解析が可能となり、従来の集団解析では得られない微細な現象の解明が期待できる。現状、核酸やタンパク質の細胞内導入法としては、リポフェクション、ウイルスベクター、エレクトロポレーションなどが広く用いられている。しかし、これらの方法は、導入効率や細胞への負荷、さらには時空間的な制御といった点で限界があり、特に細胞内へタイミングや位置を精密に制御してタンパク質を送り届ける技術は十分に確立されていない。

本研究では、時空間を精密に制御して単一生細胞内へタンパク質を導入することを目指し、ナノワイヤー単一細胞内視鏡法<sup>2)</sup>と、タンパク質を効率的に包摂できる金属有機構造体 (MOF)<sup>3)</sup> とを融合させることに着目した。具体的には、任意のタイミングで単一生細胞内に物理的にアクセス可能なナノワイヤー単一細胞内視鏡法と、MOFによるタンパク質の安定な貯蔵および制御放出機能を組み合わせることで、細胞内の任意の位置・タイミングでタンパク質を放出可能な新たな技術の開発を目指した。

### 2. 実験方法

本研究で用いるタンパク質を効率的に包摂できる MOF では、MOF を構成する金属イオンと有機配位子がタンパク質表面で迅速に反応・結晶化する現象を利用している<sup>3)</sup>。このプロセスでは、タンパク質などの生体分子が核種となり、局所的に MOF が成長することで、均一かつ高効率な包摂が実現する。これにより、包摂物質の安定性向上や、pH 変化といった環境刺激に応じた包摂物質の放出が可能になると期待される。ここではまず、銀ナノワイヤー表面へタンパク質を包摂した MOF を被覆する条件最適化を行った。銀ナノワイヤーは、既報のポリオール法を参考に合成し<sup>4)</sup>、直径およそ 130 nm 程度のナノワイヤーを実験に用いた。

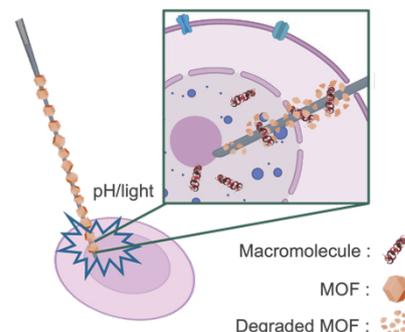


図1 MOF被覆ナノワイヤーを用いた単一細胞内物質導入。

本研究では、タンパク質導入のためのプラットフォームを確立するため、これまでタンパク質包摂に広く用いられてきた MOF の一種である ZIF-8 を用いることにした。ZIF-8 は pH に敏感であり、細胞内環境で分解することで包摂していたタンパク質を放出する特性を有する。また、タンパク質として、比較的入手しやすく蛍光顕微鏡で観察可能な、フルオレセイン担持アルブミン、ウシ血清由来 (FBSA) を用いた。

タンパク質包摂 ZIF-8 被覆ナノワイヤー作製後、ナノワイヤー単一細胞内視鏡法を用いて HeLa 細胞にナノワイヤーを挿入することで、細胞内へのタンパク質放出を試みた。本研究では、FBSA に担持するフルオレセインの蛍光を観察することで、タンパク質の細胞内放出有無を確認した。

### 3. 実験結果 -タンパク質包摂 ZIF-8 被覆ナノワイヤーの作製と細胞内タンパク質導入-

単一生細胞内にナノワイヤーを挿入する際は、細胞への侵襲性を低減するため、ナノワイヤーの直径を約 150 nm に抑える必要がある。ここでは、まずナノワイヤー表面に適切なサイズで ZIF-8 を被覆する条件を最適化するため、ZIF-8 を構成する有機配位子である 2-methylimidazole (2-mIm) と金属イオン  $Zn^{2+}$  を、異なる比率でナノワイヤーと混

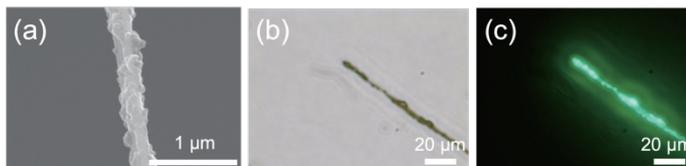


図2 タンパク質包摂 ZIF-8 被覆ナノワイヤーの (a) SEM 像, (b) 透過像, (c) 蛍光像 (励起光 488 nm).

合した。その結果、金属イオンと有機配位子を 1:32 の比率で混合することで、SEM 測定により銀ナノワイヤー表面に比較的均一に ZIF-8 が被覆されることを確認した (図 2(a))。さらに、反応中に FBSA を添加したところ、FBSA 由来の蛍光がナノワイヤー全体から観察され、ナノワイヤー上に均一にタンパク質が包摂された状態で ZIF-8 を被覆できる条件が最適化されたことが示された。一方、ZIF-8 被覆後のナノワイヤーの直径は約 300 nm であり、より薄い ZIF-8 被覆を実現するための条件検討を継続している。具体的には、1-methylimidazole (1-mIm) が ZIF-8 の結晶サイズを小さくするモジュレーターとして機能することが報告されており<sup>5)</sup>、現在、1-mIm の混合条件を検討中である。

続いて、得られた FBSA 包摂 ZIF-8 被覆ナノワイヤー (AgNW@FBSA@ZIF-8) の pH 応答特性を調べた。具体的には、pH7.2 の緩衝溶液、および酸性条件にあるオルガネラを模倣した細胞内環境として pH 6.0 の緩衝溶液中にナノワイヤーを浸漬し、浸漬 10 分後のナノワイヤーの FBSA 蛍光強度を確認した。その結果、pH7.2 および pH6.0 のいずれの条件においても、ナノワイヤー上の蛍光強度が減少する様子が確認された。このことから、作製した AgNW@FBSA@ZIF-8 は pH 応答性を示し、ZIF-8 の分解に伴い、ナノワイヤーからタンパク質が徐々に放出されることが示唆された。

最後に、現時点で得られた最も細い AgNW@FBSA@ZIF-8 を HeLa 細胞に挿入し、細胞内でのタンパク質放出が可能かどうかを確認した。その結果、ナノワイヤーを細胞内に約 25 分間挿入した際に、細胞内のナノワイヤー挿入部位から FBSA 由来の蛍光が観察されたことから、開発したナノワイヤーを用いることで細胞内へタンパク質を導入できることを示すことができた。一方、現時点では細胞内の pH 環境を利用して ZIF-8 が徐々に分解するのを待つ必要があるため、放出効率が低く、細胞内への挿入時間も長いという課題がある。今後は、光応答性 MOF をナノワイヤー表面に被覆する条件を最適化することで、より効率的なタンパク質放出を可能にするための改良を進める予定である。

### 4. まとめ、今後の展望

本研究では、ナノワイヤー単一細胞内視鏡法と、タンパク質を効率的に包摂できる金属有機構造体 (MOF) を融合させ、特に ZIF-8 を用いてナノワイヤー表面にタンパク質を包摂し、単一生細胞内に放出可能であることを示した。一方、現時点では細胞内への放出効率が非常に低いため、今後、ナノワイヤー技術を用いた高効率なタンパク質導入を実現するためのさらなる改良が必要である。現在、光応答性 MOF をナノワイヤー表面に被覆することを試みており、これにより光刺激によって放出タイミングを精密に制御し、かつ高効率な細胞内タンパク質放出を実現することを目指している。また、技術が確立した後は、タンパク質にとどまらず、mRNA など他の生体関連物質の導入も実現することで、単一細胞レベルでその機能を精密に制御できる技術へと発展させることが期待される。

### REFERENCES

- 1) B. B. Mendes, *et al.*, *Nat. Rev. Methods Primers*, **2** (2022) 24.
- 2) G. Lu, *et al.*, *Adv. Mater.*, **26** (2014) 5124.
- 3) K. Liang, *et al.*, *Nat. Commun.*, **6** (2015) 7240.
- 4) R. L. S. Tan, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **138** (2016) 10770.
- 5) M. Wiebcke, *et al.*, *Chem. Mater.*, **23** (2011) 2130.