

京都大学	博士（工学）	氏名	北村成史
論文題目	Design of Nanomaterial Probes for Quantitative Analysis of Biological Informations (生体情報の定量的解析を指向したナノマテリアルを基盤とするプローブ設計)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、生体内の情報をリアルタイムで定量的に解析することを目的とし、種々のナノマテリアルや機能性小分子を組み合わせたプローブの新しい設計コンセプトの提案と実際の機能についてまとめたものであって、9章からなっている。 第1章では、ガドリニウム錯体のキレーターの「剛直性」という要素に着目し、造影能に及ぼす影響を調べた。ここで、Si—O 結合により立方体構造を有するかご型シルセスキオキサン（POSS）を核とした dendritic マーを設計し合成した。POSS は剛直であり、核に POSS を導入することで硬い dendritic マーの合成が可能となる。POSS 核 dendritic マーと核がアルキル部位で置換されたポリアミドアミン（PAMAM） dendritic マーの緩和度を比較することで核が造影能に及ぼす効果について検証した。その結果、POSS 核 dendritic マーの緩和能が3倍優れていることが分かった。 第2章では、高感度で安定な MRI 造影剤の開発を目的とし、複数の SPIO を核に持つシリカコーティングコアシェル型ナノ粒子を設計した。逆ミセル法を利用した簡便な方法によって、コアシェル型のナノ粒子を合成し、遠心分離の条件検討を行うことで複数コアのナノ粒子だけを選択的に取り出すことに成功した。さらに、シリカシェルによる磁性の効果の低下を軽減する目的で、得られたコアシェル型ナノ粒子にアルカリエッチングを施した。処理後のナノ粒子は、従来の SPIO 系造影剤と比較して高い造影効果を示した。 第3章では、リガンド分子を SPIO の表面に直接修飾し、標的分子とリガンド分子間の特異的相互作用によって SPIO を凝集させた。このような系では、標的物質特異的かつ環境の変化に鋭敏で、凝集と分散の可逆的な制御が可能となる。リガンド分子としてビオチン、ヘム、DNA 等を用い、それぞれ特有の相互作用を利用して SPIO の凝集実験を行った。その結果、目視および動的光散乱粒径測定法によって凝集状態を確認することができた。また、MRI による T2 緩和測定においても緩和時間の大幅な短縮が見られ、造影効果の差としても確認できた。さらに DNA を用いた系では、酵素反応によって凝集と分散の可逆的な変化を確認することができた。これらの結果に加え、カルボン酸やリン酸など、種々の酸と SPIO との結合力の比較、定量など、基礎的知見も得られた。 第4章では、酸化還元反応による可逆的なシグナル応答を示す ¹⁹F NMR プローブの開発を目的とし、遷移金属錯体をスイッチングモジュールとして利用したプローブを設計した。POSS を核とした高フッ素化 dendritic マーを合成し、末端にフェロセンを導入した。フェロセンが酸化された状態では、常磁性緩和促進効果によってフッ素原子の緩和時間の短縮が起こり、シグナルの減少が確認できた。また、酸化剤である過硫酸アンモニウムと還元剤であるアスコルビン酸を交互に加えることで、シグナル強度のスイッチングが行えることについても確認した。			

京都大学	博士（工学）	氏名	北村成史
第5章では、固体状態では NMR シグナルがブロード化して感度が低下することに着目し、プローブの動作原理への応用を図った。シリカナノ粒子上にリン酸ジエステル結合を介して高フッ素化デンドリマーを固定化した。粒子上にデンドリマーを固定した状態と、リン酸加水分解酵素を添加した状態とで ^{19}F NMR を測定してシグナル強度を比較した。その結果、デンドリマーが粒子上に固定された状態では ^{19}F NMR シグナルを発せず、酵素反応が進行するに従ってプローブの ^{19}F NMR シグナルが増大する様子が観測された。 第6章では、第5章の原理を利用して、さらに蛍光法との同時測定を行うバイモダル型のプローブの合成を行った。ケージド化したフルオレセインをリンカーとして用い、フッ素化デンドリマーをナノ粒子上に固定化して分子回転を抑制する。この状態では ^{19}F NMR シグナルが検出されないのと同時に、フルオレセインの発光も強くクエンチされる。酵素反応によってフッ素化デンドリマーとフルオレセインがともに水中に放出されることで、分子回転が回復して ^{19}F NMR シグナルと蛍光シグナルが同時に増大する系となった。 第7章では、ジスルフィド結合を介してフッ素化デンドリマーをシリカナノ粒子上に導入したものを合成し、これをプローブとした。GSSG、β-NADPH 存在下、GR を加えた場合でのシグナルの強度変化を調べたところ、酵素濃度の増加に従ってシグナルの回復速度が増加する様子を確認した。この結果から、本研究のプローブが GR 活性の定量に利用可能であることがわかる。 第8章では、ジオールリンカーを介してリン酸でケージド化したフルオレセインを主鎖に有するポリマーを合成した。このプローブは、リン酸加水分解酵素により、末端から順に分解された。反応の進行とともにフルオレセイン由来の蛍光が増加することが確認された。この蛍光強度の増加分をグラフから計算し、作成した検量線をもとに、得られたポリマーによる細胞破碎液の酵素活性の定量を行ったところ、紫外可視吸収スペクトル測定による従来法と良好な一致を示した。 第9章では、ジスルフィド結合を持つ化合物をリンカーとして用いて、GSH に応答して分子放出を行う POSS ネットワークポリマーを合成することを目的とした。縮合剤として DMT-MM を用いて架橋度の異なるジスルフィドリンカー含有 POSS ネットワークポリマーを合成した。得られたポリマーの水中での分子取り込み能を評価したところ、ネットワークの内部に分子を強く保持した。さらに、色素分子を取り込ませたポリマー水溶液に、GSH を加えたところ、ジスルフィド結合が開裂して分子を放出する様子が蛍光強度変化および動的光散乱法から確認できた。 以上、本研究では種々のナノマテリアルを機能性小分子と組み合わせることで、標的物質を特異的に認識して定量性のある測定を行うプローブの合成法を確立した。また、これらのプローブの設計コンセプトは、一般性が高く、様々な標的物質に対して広く利用可能であることが分かった。これらの結果は、分子生物学、医学研究においても非常に有用であると考えられ、材料化学、生化学およびナノテクノロジーの分野の技術進展に有用な知見を与えるものである。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、生体情報の定量的解析を行うための分子プローブの合成を目的として、ナノマテリアルを基盤とした新たな設計指針について検討を行っている。得られた結果の概要は以下の通りである。

Gd イオンの運動性が錯体造影剤の感度向上に大きく寄与することから、キレーターの「剛直性」という要素に着目し、造影能に及ぼす影響を調べた。剛直な立方体構造を有するかご型シルセスキオキサン (POSS) を核とした dendritic マーを合成し、ポリアミドアミン (PAMAM) dendritic マーとの比較を行った結果、緩和能が 3 倍優れていることが分かった。

酸化鉄ナノ粒子 (SPIO) は、凝集することで、MRI の造影能が増強されることが知られている。そこで、複数の SPIO を核に持つシリカコーティングコアシェル型ナノ粒子を設計し合成した。得られたナノ粒子は複数のコアを内部に有する効果で、従来の SPIO 系造影剤と比較して高い造影効果を示した。また、非共有結合性の相互作用を利用する系を利用し、特定の物質を認識して MRI の造影能が変化するシステムも構築した。これらの系では、MRI による T2 緩和測定においても緩和速度の大幅な増加が見られ、造影効果の差としても確認できた。

^{19}F NMR は、 ^1H NMR と同程度の感度、生体内でバックグラウンドノイズがほとんどない、環境応答に鋭敏、というように、生体内反応追跡プローブの測定手法としての応用が期待できる。そのシグナルの制御方法として、2 つの手法を開発した。

固体状態では NMR シグナルがブロード化して感度が低下することに着目した「分子運動の制御を利用する手法」と、常磁性金属錯体による「常磁性緩和促進を利用した手法」の 2 つのコンセプトである。いずれの手法においても、効果的な NMR シグナルの強度のスイッチングを行い、 ^{19}F NMR におけるシグナルの強度変化を追跡することで、生体反応の進行度、速度の測定を行うことが可能となった。

また、蛍光法において、フルオレセインを主鎖に有するポリマープローブの開発を行った。ケージド化したフルオレセインをポリマーの主鎖に導入した分子設計とすることで、リン酸加水分解酵素を認識して末端から順に分解して蛍光発光を示すポリマーを合成した。従来の側鎖型のプローブの欠点の一つであったシグナルの定量的困難さを、末端から分解する主鎖型として反応速度を一定にすることで克服することができた。

さらに、ジスルフィド結合をリンカーとして POSS を三次元に結合したネットワークポリマーを合成し、還元型グルタチオンを認識して蛍光色素を放出するプローブの合成を行った。酸化還元反応によって可逆的に構造を変化させるポリマーが得られた。

以上、本論文は生体情報の定量的解析を行うためのプローブを合成する上での新たな設計指針を与え、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 23 年 8 月 12 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。