

審査の結果の要旨

氏名 刘懿华

細胞工学において、細胞内における分子反応を解明し、それらを調節する方法の確立が要求されている。とりわけ、細胞内の pH 変化は、細胞内分子反応の調節因子として考えられており、これを追跡する手法は重要と考えられる。本研究では、細胞内へのエンドサイトーシス過程、細胞内での物質動態に着目し、その調節因子である pH 変化をリアルタイムで追跡する生体親和型ナノデバイスの創製を目的としている。具体的には、pH 変化に応答して蛍光特性が変化するポリマー分子の設計概念の提示および精密重合法に基づき、直径が 20 nm 程度の量子ドット(QD)/ポリマー複合ナノ粒子を作製している。このナノ粒子の pH 応答性と細胞内移行、細胞内動態を検討している。

本学位請求論文は 6 章から構成されている。

第 1 章では、細胞内で使用するためのナノ粒子表面に関する条件と、細胞内における pH 変化の重要性を記述している。これに基づき、本研究で使用するナノ粒子の特性を満足するポリマーの分子設計概念を提示している。

第 2 章では、ナノ粒子表面修飾ポリマーとしての条件を達成するための精密重合法について述べており、長鎖アルキル基を末端に有する可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 剤 4-cyano-4-(dodecyl-sulfanylthiocarbonyl)sulfanyl pentanoic acid によるリビングラジカル重合を実施している。機能性モノマーとして 2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate (DEAEMA) を pH 応答性ユニット、リン脂質極性基を有する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ユニット、親水-疎水性のバランスを調整するための *n*-butyl methacrylate (BMA) ユニット、および活性エステル基を有する ω -4-nitrophenyloxycarbonyl(poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP) ユニットの選択し、2 種類のブロック型ポリマー、poly(DEAEMA)-*block*-poly(MPC-*random*-BMA-*random*-MEONP) (PDbMBN) 及び poly(DEAEMA)-*block*-poly(MEONP)-*block*-poly(MPC) (PDbNbM) を合成している。また PDbMBN と PDbNbM のポリマー鎖構造は媒体の pH によって変化し、2.5 mg/mL の濃度の水中で十分に安定な多分子会合体を形成することを示している。

第 3 章では、PDbMBN と PDbNbM を用いて粒径 20-30 nm のナノ粒子 QD/PDbMBN と QD/PDbNbM の調製法について記述している。QD 表面に存在する疎水性層にポリマー末端のアルキル基が相互作用することで、QD を水媒体中において安定に分散させることに成功した。また、粒径は調製時のポリマー濃度により制御可能であることを示している。調製時の超音波照射時間を短縮することにより、QD の蛍光量子収率を損なわないことも明らかに

している。周辺の pH 変化による poly(DEAEMA)セグメントの伸長・収縮に伴い、粒径が変化することを見いだしている。

第4章では、QD と有機蛍光色素 Alexa との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象を利用し、蛍光スペクトルの pH 依存性およびその FRET 効率との関連性について記述している。Alexa を結合したナノ粒子の蛍光スペクトルは、pH に応答して変化することを確認している。この変化は、poly(DEAEMA)セグメントの pH 応答による QD と Alexa 間の距離の変化に起因することを示した。また、QD/PDbNbM-Alexa ナノ粒子は、Alexa/QD/PDbMBN よりも高い FRET 効率を示した。これは、ポリマー分子中の Alexa の位置の規定による効果で、poly(MEONP)セグメントが poly(DEAEMA)セグメントに接合されている分子構造の有効性を明らかにしている。以上より、ポリマーユニットの配列がより明確なトリブロック型ポリマー (PDbNbM) は pH 変化に鋭敏に応答する多機能ナノ粒子の表面修飾に有効であると結論している。

第5章では、QD/PDbNbM-Alexa ナノ粒子を利用した細胞内への取り込みと細胞内での動態について、FRET 現象を利用した連続的な pH 変化の追跡について記述している。ナノ粒子表面に細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) を固定化した R8-QD/PDbNbM-Alexa ナノ粒子はエンドサイトーシス経路による細胞内移行、エンドソーム内での移動、さらにエンドソームから脱出する一連の過程を、FRET 現象の変化として捉えている。これは、エンドソーム内の pH 低下と、その後のプロトンスポンジ効果によるエンドソーム破壊を連続的に観察した初めての事例であるとしている。すなわち、エンドサイトーシス経路の pH 変化を連続的に追跡することができるナノデバイスと位置付けている。

第6章は、本研究の総括である。

本研究は、細胞で生じる化学反応を小器官レベルで解明するためのナノ粒子の創製に関して、バイオマテリアル、ナノデバイスの設計概念を提案し、精密合成によりこれを達成している。この研究成果は、細胞工学における分子反応の理解と制御に関して有益な情報を提供し、今後のバイオエンジニアリング領域の発展に大きく貢献すると評価できる。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。