

THE CHEMICAL TIMES

2024 No.2 (通巻272号)
ISSN 0285-2446

特集 | イオン液体

02 生命科学用の場としての水和イオン液体

東京薬科大学 薬学部 講師 藤田 恭子

07 イオン液体の界面を利用した細胞培養

国立研究開発法人物質・材料研究機構 主任研究員 上木 岳士
国立研究開発法人物質・材料研究機構 グループリーダー 中西 淳

15 生命科学におけるデザインブル溶媒「双性イオン液体」

金沢大学理工研究域生命理工学系 准教授 黒田 浩介



KANTO CHEMICAL CO., INC.

生命科学用の場としての 水和イオン液体

Perspective of Hydrated Ionic Liquids in Life Science

藤田 恭子
Kyoko Fujita

東京薬科大学 薬学部(講師)
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences (Senior Assistant Professor)

KEYWORD ▶ 自由水 束縛水 イオン構造 構造形成

はじめに

01

細胞内はタンパク質や種々の高分子が高濃度溶解している混み合いの状況(分子クラウディング環境)であるとの考え方が広く認識されている。また近年、細胞内相分離現象をはじめ、細胞内における生体分子、その他の高分子による時空間的なドラスティックな変化が多彩な機能発現や反応の進行に大きく関与していることが多数報告されている¹⁾。このような細胞内の機能発現や諸反応のいずれにも深く関与している水分子は、通常の試験管内で用いる希薄溶液(自由水)ではなく細胞内の混み合いにより周囲から様々な影響を受けた束縛水として存在すると考えられる。試験管内実験においても細胞内環境を再現するような水分子を含む場の制御が望まれるが、その方法は未だ確立されていない。

一方、融点の低い塩であるイオン液体は構造を選択することで溶媒特性をチューニング可能である。水や有機溶媒では実現できない特性を持つ溶媒として注目され、基礎研究や社会実装まで幅広い分野で発展してきた²⁾。バイオ関連では酵素反応³⁾や抽出場⁴⁾、医薬品有効成分の溶解性改善⁵⁾や輸送技術⁶⁾、薬物のイオン液体化⁷⁾などがイオン液体としての特性を活かした展開だろう。一方、水溶液中にイオン液体を添加したり、低濃度で用いる報告はイオン液体としての特性は期待できないものの、水溶液中で有機塩が生体分子に及ぼす影響も非常に興味深い。本解説ではイオン液体に添加した水分子が束縛水として存在する混み合い環境ともいえる“水和イオン液体”を場として観測される「生体分子の挙動」について紹介したい。

水和イオン液体

02

水和イオン液体はイオン液体にわずかな水を添加したものであり、自由水として振る舞う水分子はほぼ存在しないものと定義して検討を行ってきた(図1)。そのため、水和イオン液体は開放系で室温放置していても、ほとんど蒸発せず、長期間安定な液体として取り扱える。これまでに様々なイオン構造からなるイオン液体について、水の添加量を変化させて水分活性測定を行った。水と混和する親水性のイオン液体は構成イオンの大きさや極性に関わらず1イオンペアに対して水7分子程度までは、自由水はほぼ存在しない結果を得ている⁸⁾。イオン液体は添加する水の量を制御することで1イオンペアに対する水分子数を連続的に制御でき、さらに自由水/束縛水比も調整可能になる。また、1イオンペアに対する水分子数の数が同じであっても、水和イオン液体の構成イオンによって水分子の特性は変化する。例えば、後述するような生体分子の高次構造を保持した状態で直接溶解し、さら

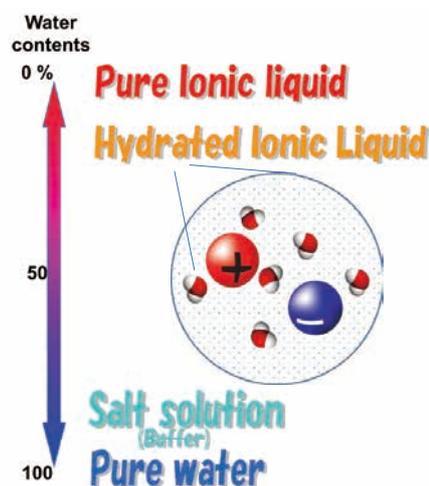


図1 水和イオン液体の概念図

に安定性の向上を示すイオン液体中では、束縛水の中でも「中間水」と呼ばれるような水が存在する解析結果が得られている。中間水は生体親和性材料の表面に存在し、材料と弱く相互作用する水に分類される⁹⁾。中間水が存在するような材料はタンパク質の吸着などが抑制され、中間水のない材料に比べて血栓の発生など抑えられることが報告されている。中間水の有無に関する評価法として示差走査熱量測定(DSC)が知られている。これまでに様々なイオン構造のイオン液体について、含水率を変化させながらこの中間水の有無についてDSC測定で検討を行ってきた¹⁰⁾。中間水が存在するイオン液体は水の構造形成能の高いコスモトロピックなイオンで構成される場合が多く、中間水の存在を示す水の低温結晶形成に由来する発熱挙動が観測される水分子数はイオン構造によって変化した。また、イオン液体の場合、報告されている生体適合性高分子と異なり発熱挙動はごく限られた水分子数でのみ観測された(図2)。水和イオン液体でも生体分子との親和性を評価するうえで、中間水の有無は大きな指標となることを示した。また、この中間水が存在するか否かを判断する方法としてNMR測定も有効な手段といえる結果が得られている¹¹⁾。中間水が観測される水和イオン液体中の水分子ピークは自由水に比べて低磁場側にシフトして観測された。

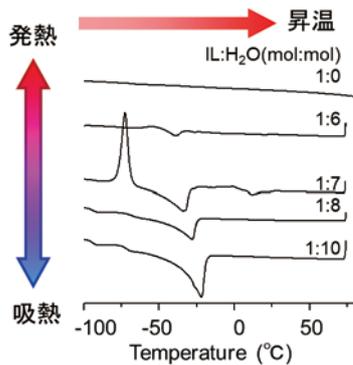


図2 イオン液体の1イオンペアに対する水分子数を変化させ示差走査熱量測定を行った結果

しかし、構成イオンによる影響は大きく、水の構造形成能が高いコスモトロピックなイオンを構成イオンにした水和イオン液体の場合、タンパク質や酵素の溶解が可能になるが、そうでない場合の多くはわずかな水分子の添加では生体分子は溶解しない。これまでに各種タンパク質や酵素、グアニン四重鎖(G4)構造を形成する核酸などの高次構造を保持したまま溶解するイオン液体として、コリニウムカチオン([ch])とリン酸二水素アニオン([dhp])からなるイオン液体を用いて、様々な報告をしてきた。このイオンの組み合わせはリン脂質膜の親水部の構造に一致しており、生命の進化の過程で選ばれてきた組み合わせが示す生体分子との親和性の高さには説得力がある。水和[ch][dhp]に高次構造を保持したまま溶解したタンパク質や核酸は熱安定性や経時的安定性が水溶液中に比べて飛躍的に向上した¹³⁾。また、存在する水分子数を調整することで、水和[ch][dhp]中での酵素反応の進行も確認されている¹⁴⁾。さらに、東京農工大学 池袋一典先生との共同研究でG4構造を形成する核酸アプタマーを用いた検討では、水和[ch][dhp]中で水溶液中と類似構造を形成するが、水分子数のわずかな変化でG4構造のトポロジーが変化することを分光学的に観測している。さらにトポロジーが異なることで、標的分子との相互作用が水溶液中に比べて強くなった結果も得られている(図3)¹⁵⁾。

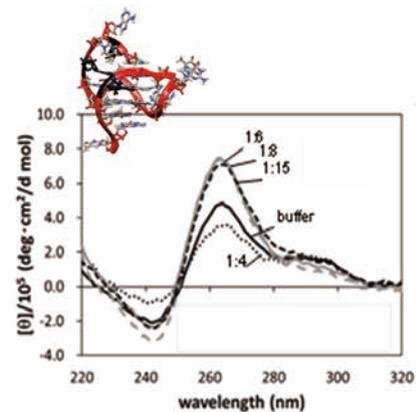


図3 1イオンペアに対する水分子数を変化させた水和[ch][dhp]中に溶解した核酸アプタマーのCD測定結果 ref15, Fig.3を改編

生体分子の溶解

03

イオン液体への生体分子の直接溶解は困難である。無理に溶解すると高次構造は変化してしまう。イオン液体と親和性の高い高分子などを生体分子の表面に化学修飾することで直接溶解が可能となり、溶解後は安定性の向上などが確認されている¹²⁾。しかし、化学修飾は煩雑な操作が必要であり、また、制御も難しい。そこで提案したのがイオン液体にわずかな水分子を混合した水和イオン液体である。

水溶性タンパク質、核酸

水和イオン液体中には自由水は存在しないが、水分子の存在により水素結合を形成して生体分子の溶解促進が期待できる。

膜タンパク質

最近、大阪大学 溝端栄一先生と名古屋工業大学 古谷祐詞先生との共同研究により、水和イオン液体の膜タンパク質の安定化溶媒としての可能性について検討を進めている。膜タンパク質は細胞膜に存在し、細胞膜内外の物質輸送や細胞間の相互作用などに関与している。しかし、その取扱いの難しさから水溶性タンパク質に比べて研究が遅れている。創薬研究ではターゲットの6割が膜タンパク質と言われ、膜タンパク質の不安定さや調整の困難さを克服する技術が望まれている。検討では、モデルタンパク質として、構造解析がされている α -ヘリックス貫通型膜タンパク質2種を用いた。アニオントランスポーターで10回膜貫通型膜タンパク質であるTehAと光駆動プロトンポンプである7回

膜貫通型膜タンパク質のバクテリオロドプシン(bR)を用いた(図4)。様々な構成イオンからなる水和イオン液体を調整して膜タンパク質を混合すると、いくつかの水和イオン液体中で二次構造を保持した溶解が確認された。イオン構造や水分子数による影響は水溶性タンパク質や後述の凝集体の溶解とは少し異なった。TehA のCD測定では α ヘリックス構造とその含有量が水溶液中と類似であることが確認され、さらにbRでは7本の α ヘリックス構造の内部に存在する発光団レチナールが水和イオン液体中に溶解後も水溶液中と類似状態で存在していることが分光学的に確認できた。さらに、光照射に伴うレチナールの異性化とそれに続くプロトン輸送に伴う構造変化も水和イオン液体中でも同様に観測された。また、TehA、bRのいずれも水和イオン液体中に溶解することで、水溶液中に比べて熱変性温度が20°C以上向上し、bRに関しては連続した光照射による光退色も抑制されることが確認されている。

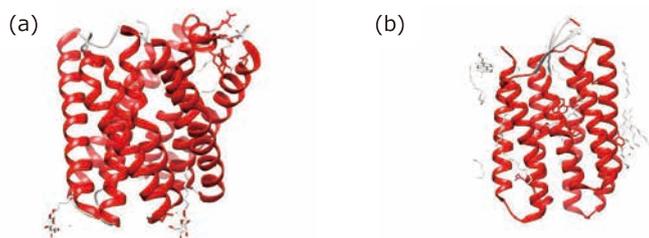


図4 TehA (a)およびbR (b)の立体構造(PDBエントリー:3M71、5B35)

タンパク質凝集体

次にタンパク質凝集体の溶解について紹介する。タンパク質は熱や化学的な因子により容易に変性、凝集する。また、大腸菌などを宿主としたリコンビナントタンパク質の発現は汎用技術であるが、高い確率で凝集体を形成する。このような凝集体はタンパク質本来の構造を失っているため不活性である。このような凝集体の活性の再生は一般的に高濃度変性剤を用いた可溶化後、長時間の希釈・透析により変性剤を取り除きながらリフォールディングを行うが、再生が難しい場合も多い。このような再生過程は希薄水溶液中(自由水中)で進められる。一方、細胞内ではタンパク質の再生環境は全く異なり、疎水的環境であるシャペロン内部で進行する。水和イオン液体は構成イオンと混合する水分子数の調整により、自由水が存在しない疎水的環境でありながら、水素結合を形成する疑似シャペロン環境を実現する場になると期待される。実際に、熱凝集タンパク質やリコンビナントタンパク質凝集体を変性剤を使用することなく直接溶解し、溶解後にはリフォールディング挙動の誘起を観測している。ここでは凝集タンパク質の溶解について紹介し、その後のリフォールディング挙動については次章に記載したい。

糖鎖認識タンパク質であるコンカナバリンA(Con A)の熱凝集体はCon Aを水溶液に溶解して70 °Cで10分間インキュベートすることで白色固体として得られる。遠心分離によって回収し

た白色固体を1イオンペアに水3分子になるよう調整した各種水和イオン液体中に混合し、遠心分離後の上清について蛍光測定により溶解性を評価した。また、リコンビナントタンパク質凝集体として大腸菌で発現したセルラーゼ6A(CcCel6A)凝集体は大腸菌破碎後に遠心分離によって回収し、Con Aと同様、調整した各種水和イオン液体と混合した。凝集体の溶解を検討するイオン液体にはアルキル鎖長の異なるホスホニウムカチオン、アンモニウムカチオンや、環構造の効果の有無についてイミダズリウムカチオンやピロリジニウムカチオンを用いた。アニオンはブロマイドかクロライドに統一することで、カチオンの影響について検討した(図5)。その結果、カチオンのアルキル鎖の総炭素鎖数と凝集体の溶解性に興味深い相関が得られた。凝集体は一般的にタンパク質内部の疎水性残基が表面に現れ、疎水性部分同士が集合して水溶液中で固体を形成している。そのため、疎水性環境の方が溶解性が上がると想像できるが、場の疎水性が高ければ高いほど溶解性が上がるわけではなく、疎水性が高くなりすぎると溶解度は下がる結果となった。溶解性に効果的であったのはアンモニウムやホスホニウムカチオンでアルキル鎖の総炭素数が16付近のものであった¹⁶⁾。カチオンの環構造による顕著な影響は確認されず、水溶性タンパク質の高次構造を保持した溶解に有効であったコリニウムカチオンも溶解性は低かった。一方、アニオンの影響としてブロマイド、クロライドアニオンをコスモトロピックな[dhp] アニオンに交換した結果、溶解性は向上した。さらに含水量の影響として、1イオンペアに対する水分子数が増えると溶解度は低下する結果がいずれの水和イオン液体でも得られた。このような凝集体の溶解に関する傾向は熱変性タンパク質凝集体でも大腸菌を宿主として得られたリコンビナントタンパク質凝集体でも同様であった¹⁷⁾。タンパク質凝集体の溶解には、水溶性タンパク質や膜タンパク質とはまた異なる視点からのイオン構造の選択が有効であった。

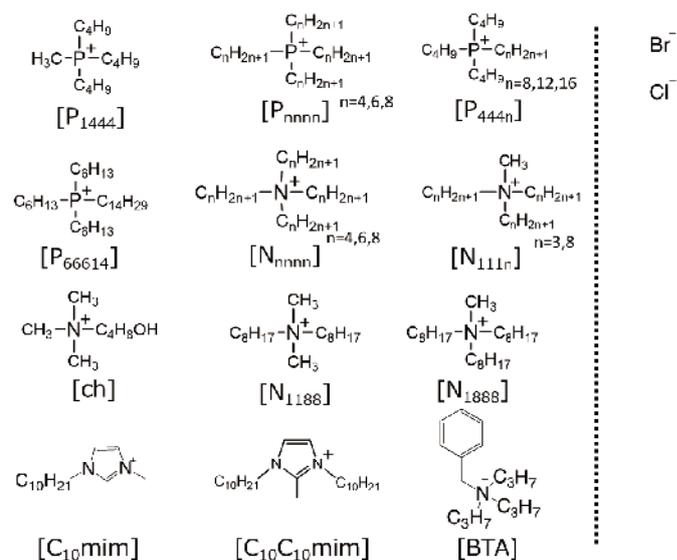


図5 凝集体溶解の検討で用いたイオン液体の構造 ref16、Fig.1を改編

リフォールディング挙動

04

前章では水和イオン液体を用いた溶解の中でタンパク質凝集体の溶解について紹介した。本章では水和イオン液体に溶解後のリフォールディング挙動について記載するが、その前に凝集体ではないが凍結乾燥サンプルを用いたリフォールディングの検討結果について紹介する。凍結乾燥は長期間保存が可能な汎用技術であり、タンパク質の凍結乾燥品の販売もある。しかし、タンパク質を凍結乾燥させる過程で活性が低下するようなダメージを受ける可能性は否めない。例えば、凍結乾燥したCon Aは緩衝液に溶解してグルコースが担持されたカラムを通すと吸着せず溶出してしまう成分が確認できる。Con Aはマンノースとグルコースを選択的に吸着するが、その結合係数はマンノースの方が3倍程度高い。グルコース担持カラムに吸着しなかった成分と、カラムに吸着後にマンノース溶出液で溶出・回収した成分について、同濃度でマンノース結合強度を比較すると前者は後者の半分以下であった。それぞれの成分を水和イオン液体に溶解し、その後、マンノース結合強度を測定した結果、いずれの成分も結合強度が増加し、さらに両成分とも同程度の結合強度となった(図6)。これは糖鎖認識能が低下していた凍結乾燥Con Aを水和イオン液体中に溶解することでリフォールディングが誘起され、糖鎖認識能が向上したためと示唆される。また、興味深いことに水和イオン液体の含水率によって糖鎖認識能の増加程度が異なった。1イオンペアに対して水3、7、15分子となるよう調整した水和イオン液体に溶解したマンノース結合能は緩衝液に直接溶解したものに比べてそれぞれ約2、1、0.5倍となった。水和イオン液体中の水分子数が多くなり自由水が存在し始めるとリフォールディングの効果はなくなることが結果から示唆された¹⁸⁾。

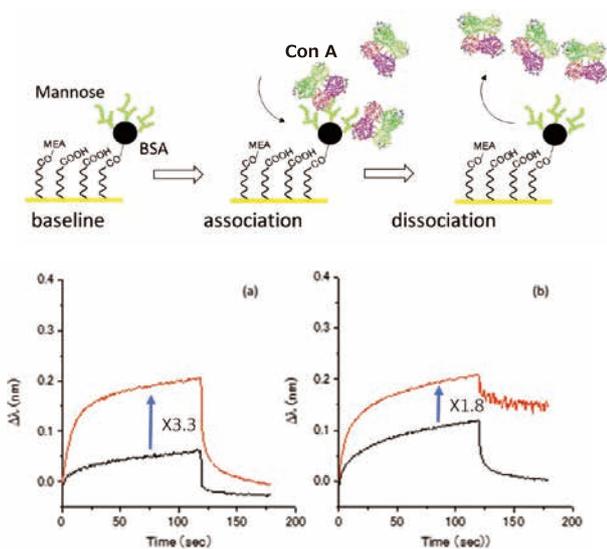


図6 水和イオン液体で処理前後のマンノース結合センサーグラム(黒ライン処理前、赤ライン処理後)
(a) グルコースカラムに吸着しなかったConA、
(b) グルコースカラムに吸着したConA
Ref18、Fig.4を改編

熱凝集Con Aについては、前述のように構成イオンと含水量を選択した水和イオン液体に高濃度に溶解する(12 mg/mL)。溶解後のCon Aについて、緩衝液で希釈後にマンノース結合能を測定した結果、結合強度の回復が確認されている¹⁶⁾。また、リコンビナント凝集CcCel6Aを用いて、水和イオン液体に溶解後の構造について蛍光スペクトル測定を行った。蛍光スペクトルではスペクトルのピーク位置によって溶解状態が予測でき、335nm付近がネイティブ類似状態、長波長シフトはアンフォールド状況、短波長シフトは凝集状態を示唆する。図7に溶解後CcCel6Aの構造が構成イオンによって大きく異なること示すスペクトルを示した。凝集CcCel6Aの高い溶解性を示したテトラブチルアンモニウムブロマイド([N4444][Br])は、溶解後も凝集体様の状態であることがスペクトルから示唆された。これに対して、[dhp]アニオンからなるイオン液体の場合、溶解後にネイティブ(water-soluble)と類似構造へリフォールディングを示唆するスペクトルが得られた。水素結合を形成しやすい[dhp]をアニオンとすることで、溶解後のリフォールディングが誘起されたと考えられる。同様に水和イオン液体中に溶解後、リフォールディングが示唆されたCcCel6Aの活性回復について検討するため、疎水性カラムを用いてCcCel6Aを緩衝液中に溶出した。回収したCcCel6Aのセルラーゼ活性について検討を行ったところ、ばらつきがあるもののネイティブと比較しても高い活性が得られた¹⁷⁾。以上のように、構成イオンを選択した水和イオン液体を用いることで凝集タンパク質の溶解とリフォールディングが可能になる結果を得ている。従来法とは異なるメカニズムによる凝集タンパク質の再生法の発展に寄与できればと期待する。

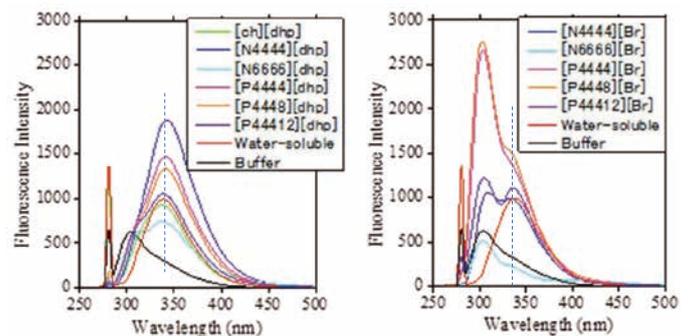


図7 リコンビナント凝集CcCel6Aを各種水和イオン液体溶解後の蛍光スペクトル
Ref17、Fig.2を改編

おわりに

05

生命科学研究用の“場”として水和イオン液体を用いる可能性について紹介した。水溶性タンパク質だけでなく膜タンパク質や核酸の構造を保持した溶解が可能であり、溶解後にはリフォールディング挙動や安定性の向上などが観測されている。また、

水和イオン液体中の水分子の数を制御することで、DNAアプタマーのトポロジー変化や分子間相互作用が変化する結果も得られている。さらに今回は割愛したが、イオン構造のデザインにより親・疎水性を調整することで温度によって水と二相分離挙動を示すイオン液体が知られているが、生体分子と高い親和性を示す水和イオン液体でもこのような挙動を示すものがある。水分子数や温度のわずかな変化により引き起こされる液相形成などの環境の変化は、時空間的にドラスティックに変化する細胞内を連想させる。水和イオン液体を制御することで細胞内の状況をシンプルに模倣するような場の形成ができないだろうか。水和イオン液体を生命科学研究用の場として、生体分子の反応や構造に大きく影響を及ぼす水分子の振り舞いを制御しながら得られる結果について理解を進めることで、細胞内の挙動理解につながることを期待したい。

参考文献

1. S. Boeynaems, S. Alberti, N. L. Fawzi, T. Mittag, M. Polymenidou, F. Rousseau, J. Schymkowitz, J. Shorter, B. Wolozin, L. Van Den Bosch, P. Tompa and M. Fuxreiter. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 2018, 28, 420-435.
2. M. Armand, F. Endres, D. R. MacFarlane, H. Ohno and B. Scrosati. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nat. Mater.* 2009, 8, 621-629.
3. T. Itoh. Ionic Liquids as Tool to Improve Enzymatic Organic Synthesis. *Chem. Rev.* 2017, 117, 10567-10607.
4. S. P. M. Ventura, F. A. e Silva, M. V. Quental, D. Mondal, M. G. Freire and J. A. P. Coutinho. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. *Chem. Rev.* 2017, 117, 6984-7052.
5. R. Md Moshikur and M. Goto. Pharmaceutical Applications of Ionic Liquids : A Personal Account. *Chem. Rec.* 2023, 23, e202300026.
6. B. Lu, T. Liu, H. Wang, C. Wu, H. Chen, Z. Liu and J. Zhang. Ionic liquid transdermal delivery system: Progress prospects, and challenges. *J. Mol. Liq.* 2022, 351, 118643.
7. K. S. Egorova, E. G. Gordeev and V. P. Ananikov. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. *Chem. Rev.* 2017, 117, 7132-7189.
8. H. Ohno, K. Fujita and Y. Kohno. Is seven the minimum number of water molecules per ion pair for assured biological activity in ionic liquid-water mixtures?. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015, 17, 14454-14460.
9. M. Tanaka and A. Mochizuki. Effect of water structure on blood compatibility - thermal analysis of water in poly(meth)acrylate. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2004, 68A, 684-695.
10. K. Fujita, Y. Nikawa and H. Ohno. Cold crystallisation behaviour of water molecules in ionic liquids as a screening method to evaluate biocompatibility of the hydrated ionic liquids. *Chem. Commun.* 2013, 49, 3257-3259.
11. Y. Nikawa, K. Fujita and H. Ohno. Quantitative assessment of kosmotropicity of hydrated ionic liquids by nuclear magnetic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017, 19, 8148-8151.
12. H. Ohno, C. Suzuki, K. Fukumoto, M. Yoshizawa and K. Fujita. Electron transfer process of poly(ethylene oxide)-modified cytochrome c in imidazolium type ionic liquid. *Chem. Lett.* 2003, 32, 450-451.
13. K. Fujita and H. Ohno. Hydrated Ionic Liquids: Perspective for Bioscience. *Chem. Rec.* 2023, 23, e202200282.
14. K. Fujita and H. Ohno. Enzymatic activity and thermal stability of metallo proteins in hydrated ionic liquids. *Biopolymers.* 2010, 93, 1093-1099.
15. K. Fujita, T. Honda, K. Tsukakoshi, H. Ohno and K. Ikebukuro. The state of water molecules induces changes in the topologies and interactions of G-quadruplex DNA aptamers in hydrated ionic liquid. *J. Mol. Liq.* 2022, 366, 120175.
16. K. Fujita, R. Nakano, R. Nakaba, N. Nakamura and H. Ohno. Hydrated ionic liquids enable both solubilisation and refolding of aggregated concanavalin A. *Chem. Comm.* 2019, 55, 3578-3581.
17. K. Fujita, K. Kobayashi, A. Ito, S. Yanagisawa, K. Ichida, K. Takeda, N. Nakamura and H. Ohno. Improved renaturation process of aggregated recombinant proteins through the design of hydrated ionic liquids. *J. Mol. Liq.* 2023, 377, 121440.
18. K. Fujita, R. Fujii and K. Ichida. Renaturation of Lyophilized Concanavalin a Treated in Water Content Controlled Hydrated Ionic Liquids. *Appl. Sci.* 2021, 11, 57.

イオン液体の界面を利用した細胞培養

Ionic Liquids Interface for Cell Culturing

上木 岳士

Takeshi Ueki

国立研究開発法人物質・材料研究機構 (主任研究員)
National Institute for Materials Science (Senior Researcher)

中西 淳

Jun Nakanishi

国立研究開発法人物質・材料研究機構 (グループリーダー)
National Institute for Materials Science (Group Leader)

KEYWORD ▶

イオン液体

細胞培養

メカノバイオロジー

はじめに

01

接着性細胞はその生存を維持するため、基質との界面において焦点接着 (FA) を形成し牽引力を発揮する必要がある。このFAの成熟、安定化には数分から数時間のオーダーを要するため細胞培養には、硬く (細胞が界面から十分な応力が得られる) かつこのタイムスケールにおいて応力が緩和しないプラスチックシャーレのような固体材料が用いられる。これに対して近年、種々の”液体”界面にも細胞が接着し、ヒト間葉系幹細胞の選択的な神経分化¹⁾や未分化性の維持等²⁾、興味深い動態を示すことが見出され注目を集めている。液体界面では応力がミリ秒オーダーで緩和するためFAの形成は不可能そうなのに、実に奇妙な現象である。

液体界面を使った細胞培養の歴史は意外と古く、その初報は現在からちょうど60年前に遡る。Rosenbergはフッ素系液体 (FC-43, 75等) を含む各種疎水性液体界面において細胞が接着、伸展、増殖する現象を報告した³⁾。彼はこのとき「細胞は液体界面そのものに直接接着しているわけではない」と主張した。すなわち「細胞は、培地 (細胞培養に必須のタンパク質水溶液) に溶解するタンパク質成分が疎水性液体界面に集積吸着することで固体薄膜 (PNL) を形成し、そのPNLの力学/生化学的性質こそが細胞自身の接着ないしは生存を支持している」と予言した。事実、この洞察は正しく1980年代に入りKeese, Giaeverらによる入念な検討によってその存在が裏付けられた⁴⁻⁶⁾。彼らは液体界面に偶発的に形成されるPNLは力学的にとっても脆弱で細胞の接着を支持するのに不十分なケースがあることも指摘した。この問題を解決すべく、彼らはポリ(L-リジン) (PLL) のようなポリペプチ

ドあるいはウシ血清アルブミン (BSA) のようなタンパク質を疎水性液体界面に積極的に集積吸着させ、ペンタフルオロベンゾイルクロライドのような界面活性のある反応性試薬で疎水性液体界面にアンカーリングすることで、その力学的頑強性を飛躍的に向上させた⁵⁾。この方法は現在では疎水性液体界面で細胞培養を行うための界面改質 (PNLの力学強度向上のため) の手法として広く採用されている⁷⁾。

今回、我々は疎水性イオン液体 (IL) の界面を利用した細胞培養を報告する。従来、用いられてきたシリコンオイルやフッ素系液体は“無毒性で高密度、かつ培地 (水溶液) と明確な二相分離界面を形成する”という界面培養に適した性質を併せ持つが、その反面、化学構造は画一的で、選択肢の幅は狭い。このためサブフェーズに用いる液体のどのような物性が種々の界面現象、ひいては細胞の動態や運命を決定づけているか不明な点が多かった。一方、デザイナースルベントとして知られるILは液体足場材料として、原理的に無限の化学構造ライブラリを提供する。高極性でありながら水と相分離し、イオンのみからなる液体の液 | 液相分離界面は極めて特殊で、これまで検討されてきた非極性分子性液体とは一線を画したエキゾチックな培養空間を与えるであろう。本稿ではまず、界面培養に用いるIL構造を決定すべく、種々の疎水性ILに対して細胞毒性を評価した結果を報告する。次に三種類の疎水性無毒性ILの界面でヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) を培養した結果と、細胞接着を支配するIL界面におけるタンパク質の吸着挙動を、高速原子間力顕微鏡 (高速AFM) をはじめとする各種測定から検証した結果を議論する。本稿の最後では、上述のような界面改質とは異なる、全く新しいアプローチとして、ILをゲル化することで細胞挙動を制御した基礎検討の一部を示す。

イオン液体界面での細胞培養

02

2-1. 疎水性イオン液体の細胞毒性

細胞培養にIL界面を用いるに当たって、まず把握しておかななくてはならないのがIL自身の毒性である。ILの毒性に関しては数多くの研究が行われてきているものの^{8,9)}、ILの化学構造と各検体(細胞、微生物、カビ、動物など)に対する毒性を系統的に整理する考え方やILの毒性発現メカニズムは、著者らが知る限り、未だ提唱されていない。特に水溶性のILに関してはEC50, LC50のような定量データが蓄積されつつあるが、水と相分離する疎水性ILにおいては、その定量化は困難である。我々は、医療機器の生物学的評価に関するISO基準(ISO10993-5)の手法を参考に、疎水性ILの細胞毒性試験法を独自に考案、適用した。まず1 cm四方のガラス基板上にhMSCsを播種し80%コンフルエンスに到達するまで培養した。次にウェル内部をフレッシュな培地に交換し、培養環境に30 μLの疎水性IL液滴を導入、共存させたまま任意の期間、培養した。培養後、Live/Deadアッセイにより生細胞を染色、IL非共存下におけるガラス基板上的hMSCs生細胞の総接着面積で規格化した値をもってILの毒性と定義した。端的に言って、この毒性試験は培地に飽和溶解できる疎水性ILの濃度と、IL固有の細胞毒性の積を見積もっていることになる。26種類の疎水性IL(化学構造:図1(a))に対して毒性試験を1あるいは24時間行った結果を図1(b), (c)に示す。疎水性ILと細胞を24時間共存させるとイミダゾリウム系を含む種々の窒素系カチオンを

含むILは深刻な細胞毒性を示した。その一方、興味深いことにリンをカチオン中心に含むいくつかのアルキルホスフォニウム系ILは高い生存率を示した。しかもこの傾向はhMSCsに限らず、我々が試みたいいくつかのほ乳類細胞(HeLa, MDCK, A549等)についても同様であった。それぞれのILにおいて1H-NMRから飽和濃度を算出したが、その序列は毒性の結果と一致しなかった。つまり疎水性ILの毒性は自身の溶解性のみに支配されているわけではなく、各IL固有の何らかの特徴が細胞毒性を決定づけていることを暗示している。さらにそこには細胞種にも依存しない普遍的な毒性発現メカニズムが潜んでいることも示唆されたが、細胞毒性を決定づけるILの分子論的な機構は未解決で今後の課題である。

2-2. IL界面におけるhMSCsの接着・伸展

我々は細胞毒性が低かった3種類のIL、すなわち[P2,2,2,5][TFSI]、[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]を選択し、その界面に細胞を播種した。図2(a)-(d)にそれぞれのIL界面およびガラス基板上に接着した細胞の位相差画像を示す。IL界面における細胞の細胞面積、伸展度はそのカチオン構造に応じて変化した(図2(e), (f))。一般的に接着性細胞は硬い界面ではより伸展し、柔らかい界面では球状に丸まる性質を持っている。定性的に、hMSCsは[P4,4,4,1][TFSI]や[P6,6,6,14][TFSI]の界面を硬く感じており、[P2,2,2,5][TFSI]界面を軟らかく感じていそうである。続いて細胞の接着ないしはFA形成を評価するため、FAに集積する代表的なタンパク質であるビンキュリンを染色し

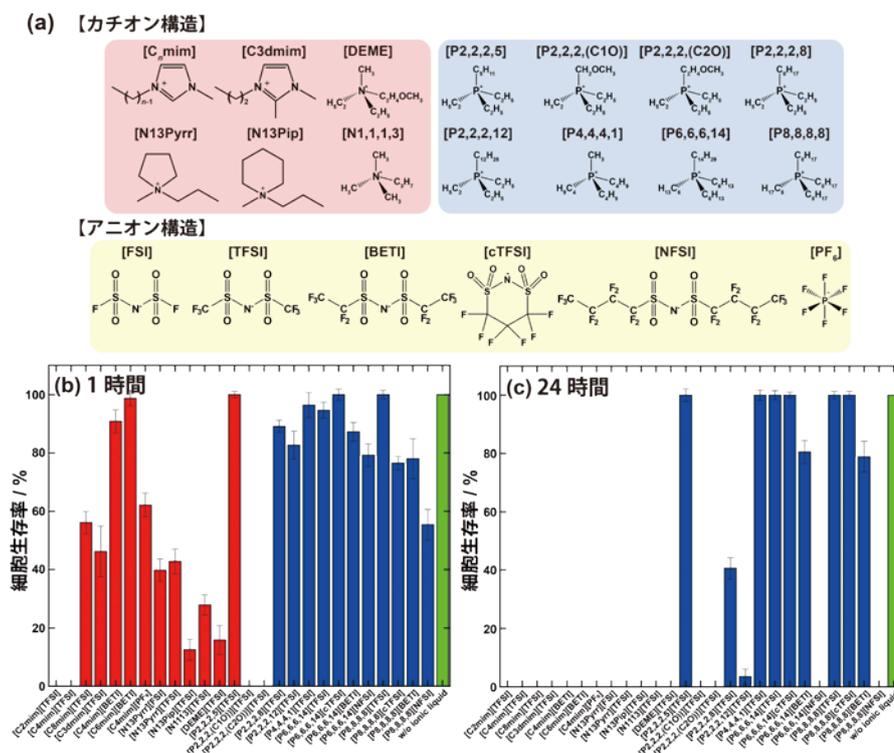


図1 (a) 本研究の細胞毒性試験に用いたイオン液体のカチオン構造とアニオン構造。(b) 1時間および(c) 24時間イオン液体共存下における細胞生存率。カチオン中心として窒素を含むものを赤、リンを含むものを青のバーで示している。イオン液体非共存下(ポジティブコントロール)は緑のバーで示している。

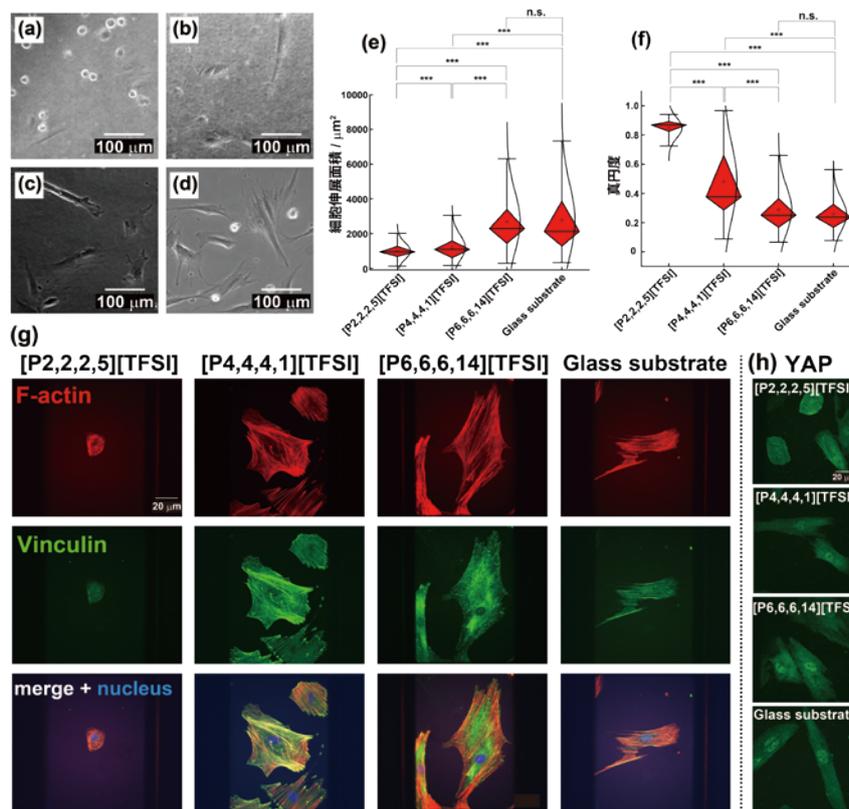


図2 (a) [P2,2,2,5][TFSI], (b) [P4,4,4,1][TFSI], (c) [P6,6,6,14][TFSI]および(d) ガラス基板上に接着したhMSCsの位相差画像。(e) 各イオン液体およびガラス基板の細胞伸展面積および(f) 真円度。(g) 各イオン液体およびガラス基板における細胞の蛍光染色画像。赤: F-アクチン, 緑: ビンキュリン, 青: 核を示している。(h) Yes Associated Protein (YAP) の蛍光染色画像。

た(図2(g))。ビンキュリンはインテグリンと呼ばれる膜タンパク質が細胞外マトリックスとアクチン線維(細胞骨格)を連結する応力集中点に集合し、細胞内外の結合そのものを強化する機能を有する。[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]では細胞の辺縁部において、アクチンの末端にビンキュリンが局在化する様子が見られ、確かにFAを形成していることがわかる。これに対して[P2,2,2,5][TFSI]ではそのような共局在は見られない。さらにYes Associated Protein (YAP) と呼ばれる細胞内タンパク質の染色を行った。YAPは細胞内におけるメカノトランスデューサーの一種であり、細胞が界面を「硬い」と認識すると核に集積化する一方、「柔らかい」と認識すると細胞質に留まる性質がある。ILごとに比較するとやはり[P4,4,4,1][TFSI]と[P6,6,6,14][TFSI]では核内に移行しているが、[P2,2,2,5][TFSI]では核への局在化はみられない(図2(h))。以上の結果から細胞の表現型はサブフェーズに用いるILの種類によって大きく異なることがわかった。すなわちhMSCsは[P2,2,2,5][TFSI]の界面を柔らかく感じており、[P4,4,4,1][TFSI]および[P6,6,6,14][TFSI]界面を硬いと認識しているようである。そこで次にIL界面に形成されるPNLのキャラクタリゼーションを行った。

2-3. IL界面に形成されるPNL

まずIL界面に形成されたPNLを原子間力顕微鏡(AFM)によって観察した(図3(a)-(c))。培地の主成分でありタンパク吸着の

モデル物質として古くから研究されている¹⁰ウシ血清アルブミン(BSA)に注目し、これを1 mg mL⁻¹溶解させたPBS水溶液に三種類の疎水性ILを接触させ、PNLを形成させた。BSAが吸着する前は極めて平坦なIL界面が観測されたが吸着後はBSA粒子が集積した、若干粗い界面に変化した。次にAFMのカンチレバーの触圧を上昇させ、形成したPNLを矩形に削り取った。平坦な液体界面との高さをPNLの厚みとして評価したところ、その厚みは[P2,2,2,5][TFSI]から[P4,4,4,1][TFSI]、[P6,6,6,14][TFSI]に構造が変化するにつれて4 nmから1.5 nmへと僅かながら薄くなる傾向がみとれた(図3(d)-(f))。BSAの短軸の長さはおおよそ3 nmと報告されていることからBSAはIL界面に単分子の層として吸着していることが示唆された。次にPNLの法線方向にAFMのカンチレバーを押しつけ、その際の応力と歪みの関係からPNLの見かけのヤング率を算出した。結果としてその値は15.0 kPa ([P2,2,2,5][TFSI])、30.6 kPa ([P4,4,4,1][TFSI])、45.9 kPa ([P6,6,6,14][TFSI])とILの構造変化に従って2~3倍も変化することが明らかになった(図3(g))。hMSCsは各IL界面のPNLの硬さに応じてその伸展度を変化させたが、PNLの見かけのヤング率の序列とこれらの結果は良く合致している。それでは細胞の表現型に強い影響を与えるPNLの力学特性はILのどのような性質を反映しているのだろうか。

Fischerらは水と相分離する種々の分子性有機液体(オクタン誘導体等)の界面で形成されるPNLの厚みと力学特性の相関を

検討した^{11, 12)}。彼らはPNLの力学特性および、その厚みは液体自身のバルク極性に依存すると結論づけた。彼らの報告によると低極性の疎水性液体(例えば*n*-オクタン)界面においては硬く、薄いPNLが形成された。タンパク質が吸着する際、界面でタンパク質の高次構造の崩壊を伴うような強い吸着変性が起きるためである。一方、比較的高極性の疎水性液体(例えばオクタノール)界面ではタンパク質は高次構造をある程度維持した状態で吸着した。その結果としてPNLは軟らかく、厚くなる。今回の場合、ILの構造が[P2,2,2,5][TFSI]から[P6,6,6,14][TFSI]に変化するに従って、PNLは硬く、薄くなった。そこで各IL界面におけるBSAの変性度合いをFT-IR ATRIによって調べてみたところ、一般的なタンパク質変性の指標であるアミドIバンド(1650 cm⁻¹付近)とアミドIIバンド(1575 cm⁻¹付近)の強度比は[P6,6,6,14][TFSI] < [P4,4,4,1][TFSI] < [P2,2,2,5][TFSI]の順序で大きくなっていった。やはり[P2,2,2,5][TFSI]界面ではあまり変性が進行せず、逆に[P6,6,6,14][TFSI]ではより変性が進行しているようである(図3(h))。それでは実際に、これら三種類のIL自身の極性はどの程度違いがあるのだろうか。我々はILの極性を表す指標としてよく用いられる $E_T(30)$ を各種ILについて評価した。その結果 $E_T(30)$ は[P2,2,2,5][TFSI]が47.4 kcal mol⁻¹、[P4,4,4,1][TFSI]が46.6 kcal mol⁻¹、[P6,6,6,14][TFSI]が45.5 kcal

mol⁻¹であった。確かに $E_T(30)$ の序列も[P2,2,2,5][TFSI] > [P4,4,4,1][TFSI] > [P6,6,6,14][TFSI]ではあるものの、その差はごく僅かで、2~3倍のPNLの固さ変化を説明するのは難しそうである。Fischerらが用いた*n*-オクタンでは $E_T(30)$ が31.1 kcal mol⁻¹、オクタノールでは48.1 kcal mol⁻¹と17kcal mol⁻¹の差があることも考慮に入れると、IL界面ではバルク極性以外のなにか別のファクターがPNL形成を後押ししているように思える。そこで次に我々はIL界面でPNLが形成されるプロセスを直接可視化し、この界面現象に迫ろうとした。

2-4. 高速AFMによるPNL形成過程の直接可視化

図4(a)-(c)にPNLが形成していく様子を各IL界面の各時間におけるスナップショットとして示す。白い点状に見えるのがBSAのタンパク粒子である。いずれの界面でも時間経過につれて界面が徐々にBSAで覆われていく様子がみとれる。興味深いことに、溶液バルクから拡散してきたBSA粒子はIL界面と接触した瞬間、吸着と同時にその動きを止めるのではなく、BSA自身が液体界面でブラウン運動した後動きを止めることがわかった。しかもそのマイクロブラウン運動のダイナミクスはILの種類に依存して変化する。図4(d)-(f)に高速AFMの画像解析によって得た液体界面のBSAの重心位置の軌跡をトレースした結果を示す。

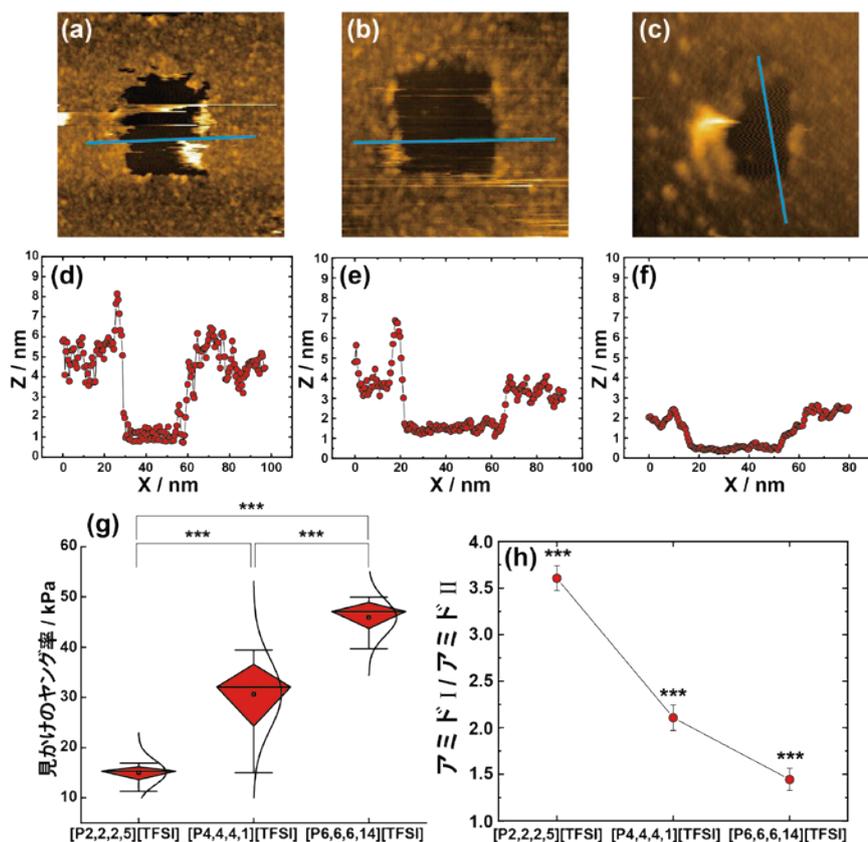


図3 (a) [P2,2,2,5][TFSI], (b) [P4,4,4,1][TFSI], (c) [P6,6,6,14][TFSI]界面に形成されたプロテインナノレイヤー(PNL)のAFM観察画像。カンチレバーの触圧を上げ、液体界面に形成されたプロテインナノレイヤーを矩形に削り取っている。(d) [P2,2,2,5][TFSI], (e) [P4,4,4,1][TFSI], (f) [P6,6,6,14][TFSI]界面に形成されたプロテインナノレイヤーの厚み。それぞれ(a)-(c)画像中の青いラインの高さプロファイルを解析している。(g) ナノインデンテーションにより測定された各イオン液体界面に形成されたプロテインナノレイヤーの見かけのヤング率。(h) 各イオン液体界面に形成されたプロテインナノレイヤーのFT-IR ATRの アミドI, アミドIIバンドの強度比から評価したタンパク質の変性度。

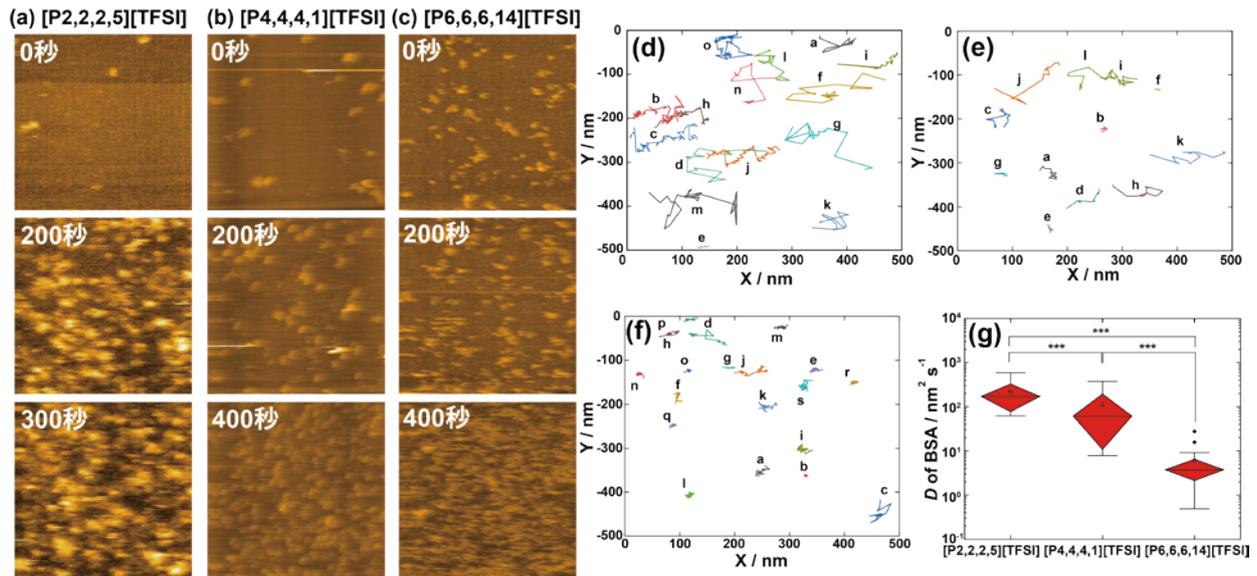


図4 高速AFM測定により観察した(a) [P2,2,2,5][TFSI], (b) [P4,4,4,1][TFSI], (c) [P6,6,6,14][TFSI]界面におけるPNLの形成過程(あるいはBSAの吸着挙動)。(d) [P2,2,2,5][TFSI], (e) [P4,4,4,1][TFSI], (f) [P6,6,6,14][TFSI]各イオン液体におけるBSAの輝点の重心変位。(g) 平均二乗変位と時間の関係から求められる各イオン液体界面におけるBSAの輝点の二次元拡散係数。

BSAの液体界面における二次元拡散はIL構造に応じて明確に変化することがわかる。そこで我々はこのダイナミクスを定量化すべく、平均二乗変位と時間の関係からBSAの二次元拡散係数を算出した(図4(g))。結論としてBSA粒子の拡散係数(D)はIL構造変化に従ってその値を1~2桁もの広範囲で変化させることがわかった($D = 1.71 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ([P2,2,2,5][TFSI]), $D = 6.18 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ([P4,4,4,1][TFSI]), $D = 3.73 \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)。この拡散係数の序列はPNLsの見かけのヤング率の序列と逆相関にあったことから、吸着初期におけるダイナミクスの違いこそが見かけのヤング率にして2~3倍にも及ぶ力学強度の差を生んでいると考えた。[P6,6,6,14][TFSI]においてはBSAが液体界面に接触した際、直ちに界面で変性が起き、内部の疎水性アミノ酸からなるタンパク質構造が露出、IL界面との間で疎水性相互作用が発生していると予想される。このタンパク質内部の疎水性アミノ酸と液体界面との引力的相互作用が二次元拡散に対する抵抗成分として働くためブラウン運動を抑制し、結果として拡散係数の低下を生じさせる。対照的に界面に接触したBSAが激しくブラウン運動する[P2,2,2,5][TFSI]ではBSAの界面変性の程度が弱く、高い拡散係数を与える。つまりIL界面において形成されるPNLの力学特性は必ずしもバルクの極性だけで決まるわけではなく、ILの配向を反映した界面の極性環境が強い影響を与えるということである。

最近、西らは3つの長鎖アルキル(オクチル基)と1つのメチル基からなるIL(トリオクチルメチルアンモニウム トリフルオロメタン sulfon イミド: [N8,8,8,1][TFSI])と水が形成する界面における[N8,8,8,1]カチオンの配向を調べた¹³⁾。[N8,8,8,1]カチオンは、オクチル基よりも極性の高いメチル基を水との二相分離界面に向ける傾向があり、その界面はよりメチル基リッチにな

ることを突き止めた。今回の系で考えると[P6,6,6,14][TFSI]においては、カチオン構造に含まれるアルキル鎖はいずれも長いため、[N8,8,8,1]カチオンとは異なり、水のような高極性液体界面でも長鎖アルキルリッチな界面を与えると想像できる。逆に[P2,2,2,5][TFSI]や[P4,4,4,1][TFSI]ではカチオン構造中にエチル基あるいはメチル基を含むため[P6,6,6,14][TFSI]の界面よりは極性が高く、水相に適した、タンパク質がソフトに吸着する界面が露出していると考えられる。バイオマテリアル界面のサイエンスでは古くからポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスフォルルコリン)¹⁴⁾やポリスルフォベタイン¹⁵⁾のような、構成カチオンとアニオン間の距離が比較的短い双性イオン型構造の高分子界面が優れた抗タンパク質吸着性を示すことから、抗血栓性材料、抗タンパク吸着コーティング材料として研究されてきた。チャージを帯びた界面におけるタンパク吸着現象においては、比較的制限された狭い空間でのカチオン/アニオンの共存、イオン間距離、あるいは界面のイオン性¹⁶⁾やイオン配向のような概念を導入することによって、ダイナミクスまで含めたタンパク吸着メカニズムと平衡構造の定量的理解に繋がるかもしれない。ちなみに低極性のフッ素系液体(パーフルオロオクタン:PFO)界面においても同様の高速AFM観察を試みたが、PNLの形成はBSAを系中に導入した直後、瞬時に完了した。つまりPFO界面ではBSAが液体界面に接触すると同時に(全くブラウン運動を起こさず)界面変性して膜化するため、その形成プロセスを捉えることは今回の高速AFMの時間分解能では不可能であった。裏を返すとPNL形成プロセスはIL相当の高極性界面であったからこそなし得た、通常の液体界面では可視化が極めて困難な自然現象だったということである。

高速AFMによる検討を続けていったところ、我々はPNLがセ

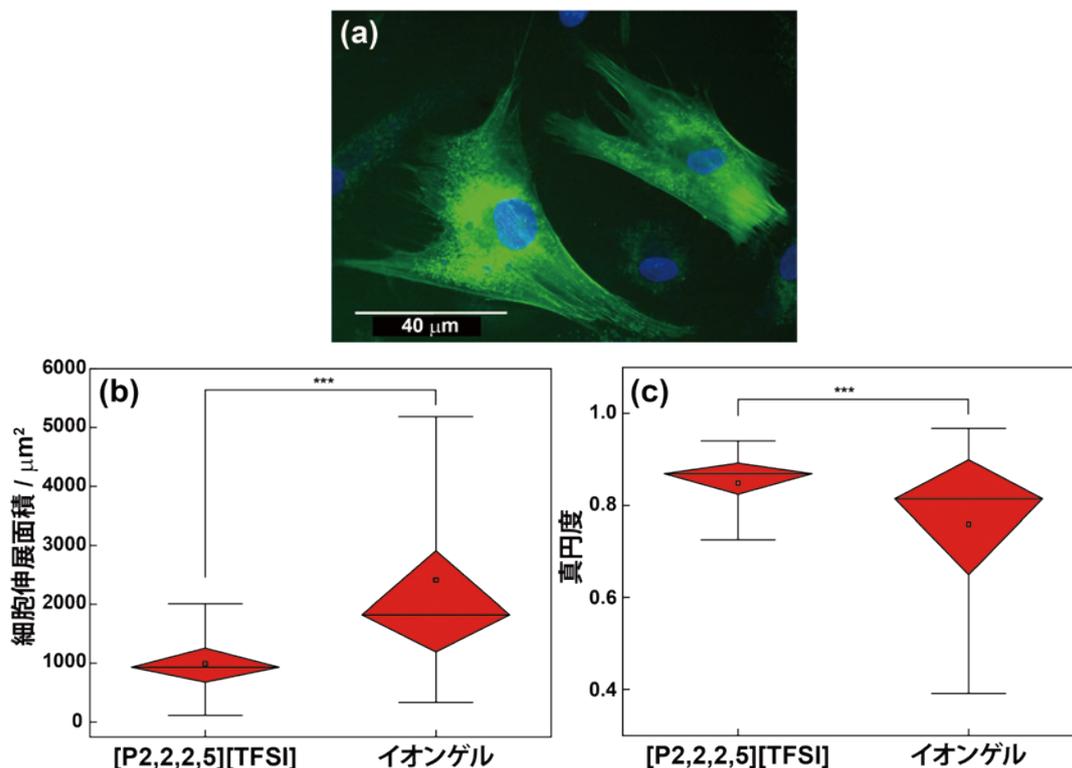


図5 (a) [P2,2,2,5][TFSI]とP(nBuMA)からなるイオンゲル界面におけるLife-Act GFPを発現させたhMSCsの伸展の様子。[P2,2,2,5][TFSI]の液体界面および[P2,2,2,5][TFSI]からなるイオンゲル界面における(b) 細胞伸展面積および(c) 真円度。

ルフヒーリング能力を兼ね備えている事実を見出した。2-3項で示したようにPNLにカンチレバーで矩形の穴を開け、その後、BSAを導入した。BSAは露出した液体界面にみるみるうちに再吸着していき、PNLは数分で元の状態に戻った。このプロセスをよく観察すると、既に吸着したBSAの上には、BSAが新たに積層していかないことがわかった。つまりこの直接観察もIL界面のPNLがモノレイヤーであることを支持している。ここまでの考察からBSAは疎水性アミノ酸をIL界面に向けて吸着しており、その反対の水溶液方面には吸着に用いられなかった親水性アミノ酸を向けていると予想できる。水溶液方面に曝された親水性アミノ酸は、水溶液バルクから界面に向かって拡散、接近してくるBSAに対して排除体積効果やイオン反発等の斥力的相互作用を発揮し、二層目以降の積層吸着を妨げるのであろう。また、これら一連の結果はIL界面においてBSAのような球状タンパク質が、その高次構造を、ある程度保ったまま二次元に濃縮可能であることを示している。この濃縮効果は吸着に深刻なタンパク変性を伴うPFOのような無極性／疎水性液体の界面では起こりえない。このような現象を利用すれば、例えば酸化還元酵素のような機能性タンパク質を配列することで高感度なセンサー等に適用ができるかもしれない。IL界面へのタンパク質吸着現象は基礎学術的に未踏であり、同時に材料工学的にも大きなポテンシャルを秘めている。

2-5. イオンゲルを利用した細胞培養

ここまでに液体界面における細胞の表現型は、その界面に形成されるPNLの力学特性に大きく依存することを示した。しかし、液体界面に形成されるPNLはタンパク質の自発的な物理集合からなる極薄の構造体であるため、実は力学的にかなり脆弱である。液体へのタンパク質アンカーリングによるPNLの力学補強は、液体界面における細胞接着を安定化させる優れた手段であることは本稿の冒頭で紹介したとおりである。さて、ここでは界面修飾によるPNL改質とは異なるアプローチで、細胞伸展の安定化ないしは表現型の制御に成功した結果を示す。キーポイントになったのは、ILの高分子(ゲル)に対する高い溶解(膨潤)性である¹⁷⁾。三種類のILおよび細胞培養によく用いられるフッ素系液体の典型例としてPFOと、パーフルオロデカリン(PFD)の各種汎用ビニルポリマーに対して溶解性試験を行った結果を表1に示す。PFOやPFDでは高分子を溶解させることはできなかったが、その一方ILはポリメタ(ア)クリル酸類や一部のポリアクリルアミド類など広範な高分子構造に対して優れた溶解性を示した。我々はその中でもポリ(メタクリル酸n-ブチル) (PnBuMA) モノマーがこれら三種類のILに溶解、重合後も均一透明性を維持することに注目し、架橋剤としてエチレングリコール二メタクリル酸(EGDMA) 共存下、重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を用いたラジカル重合反応を行うことにより化学架橋イオンゲルを合成した。これをイオンゲル足場材料として細胞

培養に利用した際のhMSCsの様子を**図5(a)**に示す。[P2,2,2,5] [TFSI]液体界面で培養したときと状況は大きく異なり、ILをゲル化することで細胞自身がよく伸展するようになることがわかる。液体界面とゲル界面で培養したときの細胞伸展面積と真円度をプロットすると、伸展度は明らかに大きくなる(**図5(b), (c)**)。イオンゲルと膨潤に用いるILが、その界面環境においても同一か否かは議論の余地があるものの、界面(すなわちPNL)そのものに手を加えることなく、疎水性の液体を高分子(網目)と複合化し、その力学特性をチューニングすることで細胞の表現型を変調させた新しい方法論といえる。我々はILの中で温度等の外部刺激に応じて溶解性を変化させる高分子も既に見出している。メカノバイオロジーの研究分野では細胞に対して所望のタイミング、時空間領域でメカニカルストレスを与えるハイドロゲル細胞足場材料の設計も一つの潮流になっている。今後、ILに対する優れた高分子の溶解性や、高分子(ゲル)の相転移現象を利用した力学特性の変化やスイッチングにも挑戦していきたい。

め、環境に拡散していかない。さらにIL足場は使用後に水洗、真空乾燥、乾熱滅菌まで行うことができるためリユース可能な環境に優しい液体足場として、その利用価値は極めて高いと考えられる。基礎学術の面でも、IL界面における細胞の振る舞い(伸展、増殖、分化等)はもとより、液体界面へのタンパク質の吸着現象自体、食品・化粧品・農産物等に関わる重要な現象である。「水と相分離するが高極性」という希有な特徴が盛り込まれたILの界面現象はまだ未解決な問題も多く、生物化学や高分子科学、バイオマテリアルだけでなく、分光計測、計算化学など異分野研究者を巻き込んだ大きな展開が望めるものと確信している。

おわりに

03

今回我々は、新しい細胞培養プラットフォームとしてILの界面を用いる試みを紹介した¹⁸⁾。ILはイオンのみを構成成分としているが水と相分離する。このため従来、液体界面の細胞培養のサブフェーズとして用いられてきた分子性液体とは質的に異なる分子環境を与える。特に液体界面培養の鍵を握るPNLの形成過程の直接観察まで含めた詳細なキャラクタリゼーションから、ILの界面ないしは、その特殊環境における細胞動態の特徴を浮き彫りにした。

世界最速で高齢化が進む我が国で幹細胞を用いる再生医療工学の確立は不可欠である。液体界面培養においては、液体材料の変形性や高い操作性を活かした分散エマルジョン培養への応用展開を見据えた研究が進められている。このようなoil-in-waterエマルジョン培養系が実現可能になれば、従来のプラスチックディッシュを用いた二次元培養系と比べて有効な幹細胞資源の培養効率(体積当たりの培養表面積)を圧倒的に引き上げることができる¹⁹⁾。マイクロデバイス内でのフロー型培養系に加え、濾過による細胞の分離・回収によるオートメーション化など従来のプラスチック材料ではなしえない新しい技術革新への期待が膨らむ。本材料をMEMS技術と組み合わせれば、小型かつ高効率化が実現され、脱プラスチックや低炭素化社会に適合した培養技術としての展開も望める。デジタルトランスフォーメーションの旗印の下、自動化への転換が著しいバイオ産業では全プロセスのライン化が可能な液体細胞培養は合目的である。その一方、界面培養が可能な液体として古くから検討されてきたフッ素系液体は近年、その自然環境下における極めて低い化学的分解性が懸念され、「永遠の化学物質」あるいは「PFAS (PFOS, PFOA) 問題」としてクローズアップされている。今回、足場に用いたILは分子性液体と異なり蒸気圧を持たず水溶性も低い

参考文献

1. X. Jia, K. Minami, K. Uto, A. C. Chang, J. P. Hill, J. Nakanishi, and K. Ariga. Adaptive Liquid Interfacially Assembled Protein Nanosheets for Guiding Mesenchymal Stem Cell Fate. *Adv. Mater.* 2020, 32, e1905942.
2. X. Jia, J. Song, W. Lv, J. P. Hill, J. Nakanishi, and K. Ariga. Adaptive liquid interfaces induce neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through lipid raft assembly. *Nat. Commun.* 2022, 13, 3110.
3. M. D. Rosenberg. "Cell surface interactions and interfacial dynamics." *Cellular control mechanisms and cancer.* Amsterdam: Elsevier, 1964, 146-164.
4. I. Giaever and C. R. Keese. Behavior of cells at fluid interfaces. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 1983, 80, 219-222.
5. C. R. Keese and I. Giaever. Cell growth on liquid interfaces: Role of surface active compounds. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* 1983, 80, 5622-5626.
6. C. R. Keese and I. Giaever. Cell growth on liquid microcarriers. *Science.* 1983, 219, 1448-1449.
7. D. Kong, L. Peng, M. Bosch-Fortea, A. Chrysanthou, C. V. J. Alexis, C. Matellan, A. Zarbakhsh, G. Mastroianni, A. Del Rio Hernandez, and J. E. Gautrot. Impact of the multiscale viscoelasticity of quasi-2D self-assembled protein networks on stem cell expansion at liquid interfaces. *Biomaterials.* 2022, 284, 121494.
8. C. W. Cho, T. P. T. Pham, Y. Zhao, S. Stolte, and Y. S. Yun. Review of the toxic effects of ionic liquids. *Sci. Total Environ.* 2021, 786, 147309.
9. N. Abramenko, L. Kustov, L. Metelytsia, V. Kovalishyn, I. Tetko, and W. Peijnenburg. A review of recent advances towards the development of QSAR models for toxicity assessment of ionic liquids. *J. Hazard. Mater.* 2020, 384, 121429.
10. Y. F. Yano. Kinetics of protein unfolding at interfaces. *J. Phys.: Condens. Matter.* 2012, 24, 503101.
11. J. Bergfreund, P. Bertsch, and P. Fischer. Adsorption of proteins to fluid interfaces: Role of the hydrophobic subphase. *J. Colloid & Interf. Sci.* 2021, 584, 411-417.
12. J. Bergfreund, M. Diener, T. Geue, N. Nussbaum, N. Kummer, P. Bertsch, G. Nystrom, and P. Fischer. Globular protein assembly and network formation at fluid interfaces: effect of oil. *Soft Matter.* 2021, 17, 1692-1700.
13. K. Ishii, T. Sakka, and N. Nishi. Potential dependence of the ionic structure at the ionic liquid/water interface studied using MD simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021, 23, 22367-22374.
14. Y. Iwasaki and K. Ishihara. Cell membrane-inspired phospholipid polymers for developing medical devices with excellent biointerfaces. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2012, 13, 064101.
15. S. Jiang and Z. Cao. Ultralow-fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Adv. Mater.* 2010, 22, 920-932.
16. K. Ueno, H. Tokuda, and M. Watanabe. Ionicity in ionic liquids: correlation with ionic structure and physicochemical properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 1649-1658.
17. R. Tamate and T. Ueki. Adaptive Ion-Gel: Stimuli-Responsive, and Self-Healing Ion Gels. *Chem. Rec.* 2023, e202300043.
18. T. Ueki, K. Uto, S. Yamamoto, R. Tamate, Y. Kamiyama, X. Jia, H. Noguchi, K. Minami, K. Ariga, H. Wang, and J. Nakanishi. Ionic liquid interface as a cell scaffold. *Adv. Mater.* 2024, 2310105.
19. L. Peng and J. E. Gautrot. Long term expansion profile of mesenchymal stromal cells at protein nanosheet-stabilised bioemulsions for next generation cell culture microcarriers. *Mater. Today Bio.* 2021, 12, 100159.

生命科学におけるデザインブル溶媒 「双性イオン液体」

Designable solvents “Zwitterionic liquids” in life sciences

黒田 浩介
Kosuke Kuroda

金沢大学理工研究域生命理工学系(准教授)
Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University (Associate professor)

KEYWORD ▶ 双性イオン液体 凍結保存 薬剤溶解

はじめに

01

生命科学において、最も高頻度で使用される非水溶媒は、ジメチルスルホキシド(DMSO)である(図1)。DMSOは毒性が比較的 low、[難溶性薬剤の溶媒][細胞の凍結保存剤]として長らく使われている。しかし、DMSOは“有機溶媒の中では低毒性”にすぎず、例えば1~2%の添加でも細胞へダメージを与える。さらに、0.1%のような低濃度の添加でも細胞の機能に悪影響を及ぼす。しかし、現在に至るまでDMSOの代替品は探索されていない。その理由として、“有機溶媒は既に研究し尽くされており、DMSOより低毒性な溶媒が存在する”という発想が欠けていたことが挙げられる。

ここで我々はイオン液体¹⁾に注目した。しかし、イオン液体は基本的に毒性が高く、細胞に対しては使用できないものが多い^{2, 3)}。その一方で2017年に我々は、大腸菌への毒性が低い“双性イオ

ン液体(OE₂imC₃C, 構造は図2)”を開発し、セルロース系バイオエタノールの高効率生産を達成した⁴⁾。さらに、この双性イオン液体が大腸菌だけでなく、動物細胞に対しても低毒性であることを明らかにした。この双性イオン液体は、DMSOに代わる生命科学用の非水溶媒、すなわち[難溶性薬剤の添加溶媒]および[細胞の凍結保存剤]として使用できることが分かった。本稿はこの生命科学的应用について紹介する。

OE₂imC₃Cの毒性

02

2-1. 細胞毒性

OE₂imC₃Cを含む培地で24時間、ヒト線維芽細胞(hNF-1)を培養した結果、毒性が低いことが分かった。その毒性は、DMSOよりも低かった(図3)⁵⁾。例えば、10% (w/v) OE₂imC₃C水溶液中で培養した場合、細胞の生存率は約80%だったが、10% (v/v) DMSO水溶液中では生存率が35%だった。同様の傾向は、他種のヒト線維芽細胞やマウス線維芽細胞でも観察された。



図1 生命科学の非水溶媒

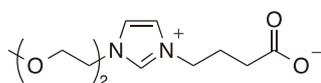


図2 低毒性な双性イオン液体OE₂imC₃Cの構造

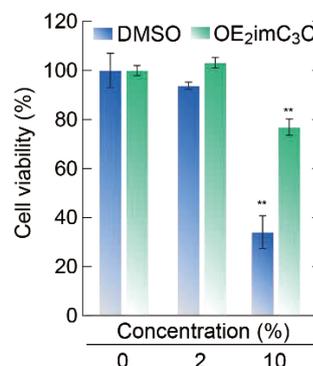


図3 2% DMSO(左)もしくは OE₂imC₃C (右)中で24時間培養した後のヒト線維芽細胞の生存率。
*DMSOは% (v/v), OE₂imC₃Cは% (w/v)。以下同様。

細胞の機能に対する影響も検討した。DMSOは細胞周期を停止させるが、 OE_2imC_3C は細胞周期に影響を与えなかった⁵⁾。また、DMSOはiPS細胞などの幹細胞の分化を誤誘導する⁶⁾。DMSOを2% (v/v)添加すると、未分化マーカー*Nanog*の発現量の減少が確認された(図4)。一方、 OE_2imC_3C を2% (w/v)添加した場合、未分化マーカーの発現量が維持され、iPS細胞が未分化状態を維持できていることが示唆された⁵⁾。

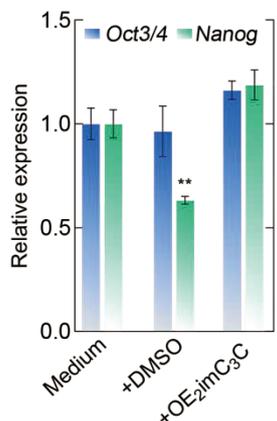


図4 2% DMSOもしくは OE_2imC_3C 中で培養したiPS細胞における未分化マーカー(Oct 3/4, 左;Nanog, 右)発現量。

2-2. イオン液体の毒性メカニズムと、双性イオン液体が低毒性な理由

典型的なイオン液体は毒性が高い。毒性の指標のひとつとして EC_{50} がある。 EC_{50} とは、被験物質(イオン液体)を添加しない場合と比べ、細胞の増殖が半分になるときのイオン液体濃度である(= EC_{50} が高いほど毒性が低い)。たとえばIPC-81細胞を用いたときの $[C_8mim]Cl$ (図5左)の EC_{50} は、わずか0.002 wt%である⁷⁾。このことは、1Lのペットボトル中に耳かきわずか1、2杯の $[C_8mim]Cl$ を添加すると、IPC-81細胞の増殖を阻害することを意味する。メタノールの EC_{50} がおよそ5 wt%⁷⁾であることと比較しても $[C_8mim]Cl$ の毒性が高いことは明らかである。これを利用して逆に、イオン液体を抗がん剤や殺菌剤として利用するという

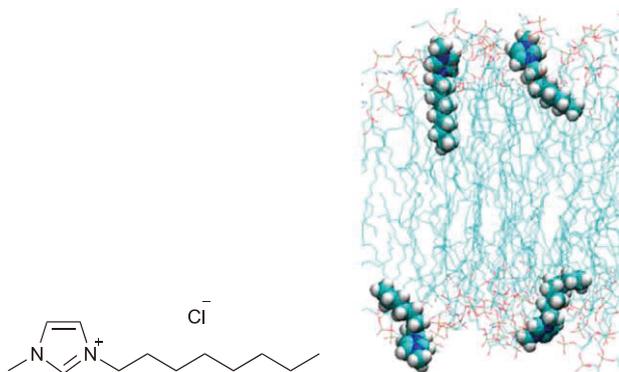


図5 (左) $[C_8mim]Cl$ の構造、(右)細胞膜と、挿入された $[C_8mim]^+$ カチオン。Adapted with permission from the literature (*J. Phys. Chem. B*, 2014, 118, 10444-10459). Copyright 2014 American Chemical Society.

報告も多数出版されている⁸⁻¹⁰⁾。

イオン液体の毒性メカニズム¹¹⁾のひとつとして、「カチオンアルキル鎖が細胞膜に挿入され、細胞膜が破壊される」ことが知られる(図5右)。カチオンアルキル鎖の挿入は、次に示す2段階のステップで起こる。①イオン相互作用により、カチオンが細胞膜ヘッドグループのリン酸基へ接近する。②疎水性相互作用により、カチオンアルキル鎖が細胞膜アシル基(長鎖アルキル基)と強く相互作用し、細胞膜へ挿入される。そのため、以上のメカニズム①もしくは②のいずれかを抑制することで低毒性化できると考えられる。我々は、極性の高い官能基であるアニオン部位をカチオンアルキル鎖の末端に導入し、上記②の疎水性相互作用を抑制した。これが、現時点で判明している「双性イオン液体が低毒性な理由」である。DMSOとは異なり、 OE_2imC_3C は細胞内部へ浸透しないことも示されており、これが細胞の機能を阻害しない理由であると考えられる。

2-3. ゼブラフィッシュへの毒性

ゼブラフィッシュ胚への毒性評価を行った(図6)。ゼブラフィッシュ胚に5% (v/v)のDMSOを添加した場合、27匹中23匹が死亡し、残る4匹も奇形を示した。それとは対照的に、5% (w/v)の OE_2imC_3C を添加した場合、総て生存し、奇形を示さなかった。このことから、生体においても OE_2imC_3C の安全性が確認された⁵⁾。



図6 5% DMSOもしくは OE_2imC_3C 中で発生したゼブラフィッシュ胚の様子と生存率。

難溶性薬剤の添加溶媒としての OE_2imC_3C

03

3-1. OE_2imC_3C への薬剤の溶解

17種類の薬剤について、 OE_2imC_3C または OE_2imC_3C 水溶液への溶解性を調査した。1 wt%の薬剤を溶液に添加し、常温および80℃で攪拌し、薬剤が溶解するかを確認した。その結果、図7に示されているように、一部の薬剤が溶解したことが確認された⁵⁾。DMSOには溶解しない薬剤(アデノシン3'-リン酸など)や、DMSOと水の両方に溶解しない薬剤(ブレドロン酸一水和物、インスリン)が OE_2imC_3C に溶解した。これにより、双性イオン液体が難溶性薬剤の添加溶媒として有用であることが示された。

次に、非水溶性の抗がん剤であるシスプラチンに焦点を当てた。シスプラチンは、DMSOに溶解した場合にその抗がん作用が失われることが知られている。しかし、 OE_2imC_3C に溶解した場合、シスプラチンの抗がん作用が維持された(図8)。これらの結果から、シスプラチンの抗がん効果を維持できる低毒性溶媒を開発できた⁵⁾。

3-2. 天然の双性イオンへの薬剤の溶解

OE₂imC₃Cは低毒性だが新規化合物であり、人体への安全性についての証拠は未だない。そのため、既に食品添加物などとして使用されている天然の双性イオンに焦点を当て、トリメチルグリシンとL-カルニチンを調査した。これら2つの双性イオンは固体だが、高濃度の水溶液として使用することで、いくつかの疎水性薬剤を溶解できた。さらに、OE₂imC₃Cと同じく、シスプラチンの抗がん作用を維持したまま溶解できることも明らかにした¹²⁾。

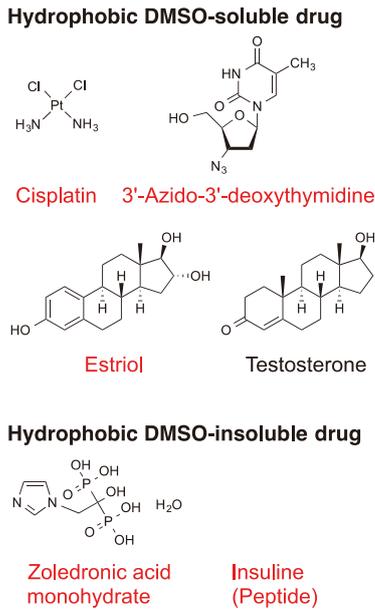


図7 溶解を検討した薬剤分子の例。OE₂imC₃Cへ溶解した薬剤は赤で名称を表記してある。

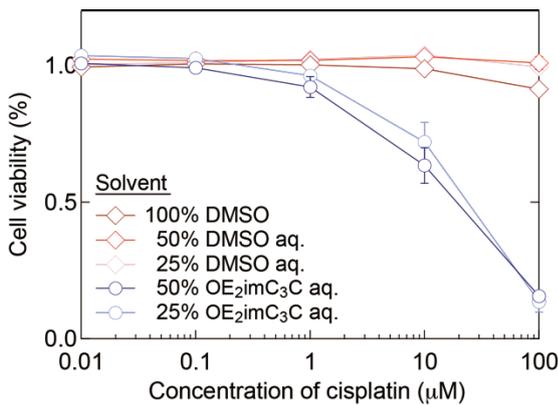


図8 OE₂imC₃C水溶液、DMSO水溶液中へ溶解したシスプラチンを投与した後のヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231)の生存率。aq.: 水溶液

凍結保存剤としてのOE₂imC₃C

4-1. OE₂imC₃Cによる細胞の凍結保存

5% (w/v)のOE₂imC₃C水溶液を使用し、細胞を-85°Cで凍結保存した。9種の細胞のうち、5種は効果的に凍結保存できた⁵⁾。このときの凍結保存効率は、市販の凍結保存剤 (Culture Sure、富士フィルム和光純薬株式会社) を使用した場合と遜色なかった (図9)。市販の凍結保存剤は、数十年にわたり最適化された複雑な混合物 (DMSO、アルブミンタンパクなどで構成) である。そのため、OE₂imC₃Cを超純水に溶かすだけで同等の性能を示したことは驚嘆に値する。一方、残りの4種の細胞については、OE₂imC₃C水溶液ではうまく凍結保存できなかった (図10、DMSO非添加のサンプルを参照)。そのため、OE₂imC₃C以外の双性イオンを17種類合成し、最適な双性イオンを探した。しかし、上記4種の細胞を効果的に凍結保存できる双性イオンは見つからなかった¹³⁾。

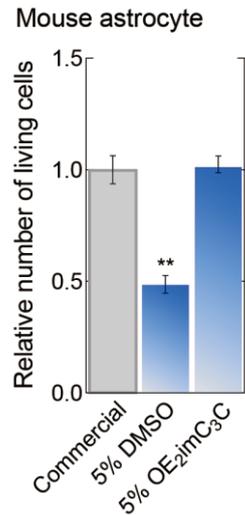


図9 各溶液を利用して凍結保存した後のマウスアストロサイト細胞の生存率。(Commercialは市販の凍結保存剤) **: p<0.01

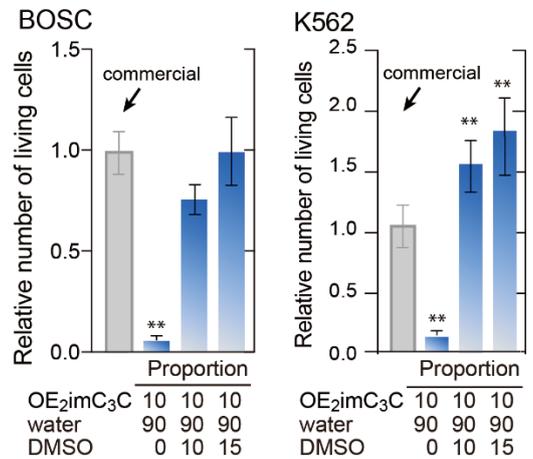


図10 OE₂imC₃C溶液、OE₂imC₃C/DMSO混合溶液を用いて凍結保存した後のBOSC細胞、K562細胞の細胞生存率 **: p<0.01 (Commercialは市販の凍結保存剤)

原因を分析するため、 OE_2imC_3C による凍結保護メカニズムを分析した。細胞が凍結時に傷害を受ける理由は、細胞の「外」と「内」で氷晶が形成され、物理的にダメージを受けるためである。 OE_2imC_3C は水との相互作用が強く、細胞の外側の氷晶形成を抑制していることが分かった。しかし、 OE_2imC_3C は細胞内に浸透しないため、細胞の内部に関しては直接的に氷晶形成を抑制できない。詳細な調査の結果、 OE_2imC_3C の添加による浸透圧上昇によって、細胞内が脱水され、間接的に細胞内での氷晶形成が抑制されていた¹³⁾。したがって、 OE_2imC_3C でうまく凍結保存できない細胞は、細胞内での脱水が不足していることが示唆された。

4-2. OE_2imC_3C + DMSO混合溶液による細胞の凍結保存

前述の通り、 OE_2imC_3C は細胞内に直接浸透せず、細胞内の氷晶を直接的に抑制することはできない。このため、従来の研究方針からは外れるものの、細胞内に浸透する凍結保存剤、すなわちDMSOを OE_2imC_3C 水溶液に添加した。その結果、上記4種の細胞についてもうまく凍結保存できた(図10)。さらに、凍結に対して弱い細胞(K562、OVMANA)も効果的に凍結保存できた。この結果について、分子動力学シミュレーションを用いて詳細に検討したところ、 OE_2imC_3C がDMSOの毒性を軽減している可能性も示唆された¹³⁾。

4-3. OE_2imC_3C + DMSO混合溶液による細胞塊(スフェロイド)・組織の凍結保存

スフェロイドは生体定着性が高いなどの特長をもつため、再生医療の生体材料として重要である。しかしその一方で、スフェロイドの凍結保存は難しいことが知られ、適した凍結保存剤が求められている。

4-2.で開発した OE_2imC_3C + DMSO混合溶液は、スフェロイドの凍結保存に対しても有効であった(図11)。スフェロイド専用の凍結保存剤は市販されていないため、市販の凍結保存剤との比較は難しい。しかし少なくとも、分散細胞用の市販の凍結保存

剤よりも、 OE_2imC_3C + DMSO混合溶液は効率良くスフェロイドを凍結保存できた。さらに、マウス・ヒト腫瘍組織の凍結保存に対しても OE_2imC_3C + DMSO混合溶液は有効であった¹⁴⁾。

おわりに

05

我々は、低毒性溶媒 OE_2imC_3C を「細胞の凍結保存剤」および「非水溶性薬剤の溶媒」として提案した。双性イオン液体はDMSOの代替溶媒としても使用できるが、DMSOが使用できない(またはDMSOでは不十分な)場合に特に有用であると考えられる。たとえば、以下のような場合に有効であると想定される。

- ① 細胞が未分化である場合。
- ② 薬剤がDMSOに溶解しない(溶解度が低い)場合。
- ③ DMSOでは細胞の凍結保存効率が十分ではない場合。

これらを含め、多彩な問題を解決することにより、双性イオン液体が生命科学界の基礎を広く押し上げていくことを期待している。

また、この研究は学際的な挑戦でもある。双性イオン液体には多くの応用可能性がある一方で、我々の発想力には限界がある。本稿を読んで、「双性イオン液体を使用するとこんなことができる!」と考える方がいらっしゃれば、ぜひご連絡いただきたい。

最後に、「双性イオン液体」という単語についても注記しておく。液体の双性イオンは種類が少なく、まだあまり研究が進んでいない。そのため、その単語自体が正式に確立されていない。英語でも同様であり、zwitterionic liquidなのかliquid zwitterionなのか定まっていない。日本で同様の研究を行っているのはおそらく、藤田先生(上智大学)のグループ¹⁵⁾と我々のグループだけであり、さらに藤田先生の科研費の報告書(2015年)にて「双性イオン液体」という単語が見つかったため、この表現を使用させていただいた。

謝辞

本研究は、ACT-X「生命と化学」(JST)、A-STEPトライアウトタイプ(JST)、スーパーハイウェイ事業(JST)、科研費学術変革領域研究(B)、基礎生物学研究所 共同利用研究、金沢大学 先魁プロジェクト2020、2022によって支援されたものです。ゼブラフィッシュ毒性は小林功准教授(金沢大)に、浸透圧測定は田中大介 資源保存ユニット長(農研機構)に、分子動力学シミュレーションは宇都卓也准教授(宮崎大)にご協力いただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、図表の一部は生化学第94巻 pp298-301(2022)より転載しております。

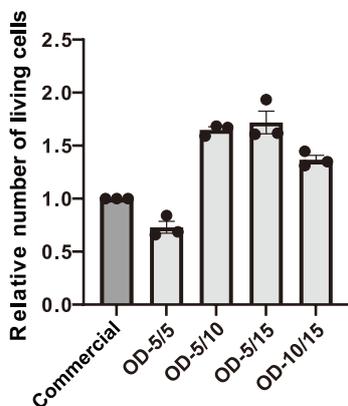


図11 OE_2imC_3C /DMSO混合溶液を用いて凍結保存した後の555細胞スフェロイドの細胞生存率。OD-5/5は OE_2imC_3C /DMSO/水 = 5/5/90 (w/w/w)を示す。(Commercialは市販の分散細胞用の凍結保存剤)

参考文献

1. T. Welton. Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem Rev* 1999, 99, 2071-2083
2. D. Zhao, Y. Liao, and Z. Zhang. Toxicity of ionic liquids. *CLEAN - Soil, Air, Water* 2007, 35, 42-48
3. S.M. Lee, W.J. Chang, A.R. Choi, and Y.M. Koo. Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean J Chem Eng* 2005, 22, 687-690
4. K. Kuroda, H. Satria, K. Miyamura, Y. Tsuge, K. Ninomiya, and K. Takahashi. Design of wall-destructive but membrane-compatible solvents. *J Am Chem Soc* 2017, 139, 16052-16055
5. K. Kuroda, T. Komori, K. Ishibashi, T. Uto, I. Kobayashi, R. Kadokawa, Y. Kato, K. Ninomiya, K. Takahashi, and E. Hirata. Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences. *Commun Chem* 2020, 3, 163
6. S. Chetty, F.W. Pagliuca, C. Honore, A. Kweudjeu, A. Reznia, and D.A. Melton. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nat Methods* 2013, 10, 553-556
7. J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczobutt, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, and B. Jastorff. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and *wst-1* cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004, 58, 396-404
8. J. Gravel, and A.R. Schmitzer. Imidazolium and benzimidazolium-containing compounds: From simple toxic salts to highly bioactive drugs. *Org Biomol Chem* 2017, 15, 1051-1071
9. A.R. Dias, J. Costa-Rodrigues, M.H. Fernandes, R. Ferraz, and C. Prudencio. The anticancer potential of ionic liquids. *ChemMedChem* 2017, 12, 11-18
10. J. Pernak, K. Sobaszekiewicz, and I. Mirska. Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chem* 2003, 5, 52-56
11. G.S. Lim, J. Zidar, D.W. Cheong, S. Jaenicke, and M. Klähn. Impact of ionic liquids in aqueous solution on bacterial plasma membranes studied with molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B* 2014, 118, 10444-10459
12. R. Kadokawa, T. Fujie, G. Sharma, K. Ishibashi, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata, and K. Kuroda. High loading of trimethylglycine promotes aqueous solubility of poorly water-soluble cisplatin. *Sci Rep* 2021, 11, 9770
13. Y. Kato, T. Uto, D. Tanaka, K. Ishibashi, A. Kobayashi, M. Hazawa, R.W. Wong, K. Ninomiya, K. Takahashi, E. Hirata, and K. Kuroda. Synthetic zwitterions as efficient non-permeable cryoprotectants. *Commun Chem* 2021, 4, 151
14. T. Ishizaki, Y. Takeuchi, K. Ishibashi, N. Gotoh, E. Hirata, and K. Kuroda. Cryopreservation of tissues by slow-freezing using an emerging zwitterionic cryoprotectant. *Sci Rep* 2023, 13, 37
15. M. Yoshizawa-Fujita, T. Tamura, Y. Takeoka, and M. Rikukawa. Low-melting zwitterion: Effect of oxyethylene units on thermal properties and conductivity. *Chem Commun* 2011, 47, 2345-2347

キーワード解説

■ メカノバイオロジー

生命現象や病態における物理的な「力」の役割を研究する学問分野で、核酸やタンパク質などに注目する従来の分子生物学を補完するものとして注目を集めています。

■ 双性イオン液体

カチオンとアニオンの両方を同一分子内に持つイオン液体です。薬剤の溶解剤や凍結保存剤として、生体試料を保存する新規の非水溶媒としても期待されています。

イオン液体

特徴

難揮発・難燃性

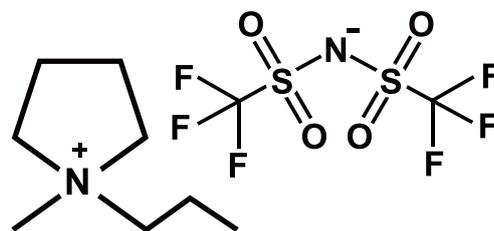
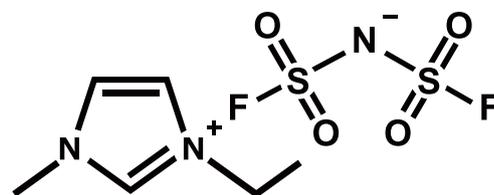
蒸気圧がほとんどない

高い熱安定性

液体温度範囲が広い

優れた電気化学特性

イオン伝導性が高い



受託合成

ご依頼・
ご相談



検討・
お見積り



ご注文



合成



納品



当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL

<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL

<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。

 関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

E-mail : chemiti-info@kanto.co.jp 編集責任者：菅 孝剛

2024年4月発行