

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18279

研究課題名(和文) 協奏的な分子認識に伴う自己組織系のミクロ・マクロ特性評価

研究課題名(英文) Microscopic and Macroscopic Characterization of Self-Assembled Materials for Concerted Molecular Recognition

研究代表者

菅 恵嗣 (Suga, Keishi)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：00709800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分子認識能を有する自己組織化膜材料を合目的的に設計するための方法論について検討した。各種の蛍光プローブより得られた情報を体系的に比較する事で、脂肪酸(オレイン酸)分子集合体の集合挙動と膜特性の相関を明らかにした。脂肪酸/モノオレイン分子集合体は、巨視的にはゲルであり、微視的(ミクロ～メソスケール)には秩序高い膜場が形成されている事を明らかにした。これはCubosome集合体の特徴の1つであり、自己組織化膜を基本骨格とする材料“Cubosomalゲル”の調製手法を明らかにした。生体高分子認識において、膜場視点では脱水和が誘導され、協奏的にターゲット分子の高次構造が変化する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質膜特性について、各種の分光法やプローブ法が開発されてきた一方、情報を俯瞰につなぐための方法論は未だ不十分である。最も知見の豊富なリン脂質膜(リポソーム)を基準として、脂肪酸分子集合体や、機能性官能基修飾リポソーム、脂質膜担持Auナノ粒子など、各種の膜場特性を体系的に評価・比較した初の研究例である。生体分子の分子認識においてその推進力はエントロピー的であり、脂質膜場においては“極性環境”の制御が鍵となる。Cubosomalゲルはミクロ膜特性が制御されたバルク材料であり、pH条件を制御する事で簡便に集合挙動(相挙動)を制御できる事から、新規な“膜担持型材料”の設計として応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present research project, a novel membrane-based material has been developed. The ordered phase of self-assembled lipid membrane showed significant molecular recognition ability of L-amino acid. By using multiple fluorescent probes, various kinds of self-assembly systems were systematically characterized. In oleic acid/monoolein systems, a gel-phase like ordered membrane properties was observed (in microscopic view): these properties were common to cubic phase (cubosome) assemblies. These systems are gel states (in macroscopic view), thus they can be utilized as hierarchical membrane materials. To increase molecular recognition for protein (ex, amyloid beta) and nucleic acid (ex, tRNA), the membranes modified with phosphoserine and guanidinium ligand were effective, respectively. In their interactions between target, the membrane was dehydrated together with concerted conformational changes of target molecules.

研究分野：自己組織化膜の物理化学

キーワード：リポソーム Cubosome ゲル ミクロ膜特性 蛍光プローブ 分子認識 アミロイドタンパク質 核酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内の分子認識機構(例:抗原-抗体反応)では、ナノサイズの認識点において非共有結合が集積化されている。また、酵素反応においてはアロステリックな構造変化が基質あるいは補酵素との結合を制御し、分子認識に伴う構造変化が変換反応プロセスに大きく影響する。近年、モノづくりの関心が従来のバルクケミカルから多品種少量生産(ファインケミカル)にシフトしつつあり、分子レベルで反応・分離を達成できる単位操作が注目されている。一方、生体分子の多くは環境変化に対して脆弱であり、より温和な条件で種々の単位操作を行う必要がある。構造変性タンパク質やキラル化合物については、従来の分子分配(液-液二相系抽出)や分子篩(電気泳動、膜分離)に基づく分離操作が困難であり、これらを効率的に“識別”可能なツールの開発が注目されている。従って、ナノサイズかつテラーメイド型の分子認識点を構築する事は、次世代のバイオ技術を支える重要な課題といえる。

ナノサイズの「場」を構築する方法論の一例として、両親媒性分子の自己組織化が挙げられる。例えばリン脂質の場合、水中でベシクル(二分子膜)を形成し、その膜界面においてタンパク質や酵素の機能が制御される可能性が報告されている[Walde, et al. Chem. Commun. 2014]。自己組織系界面において創発される機能として、分子認識、生体高分子の高次構造変化、低分子化合物の変換反応がある。

2. 研究の目的

本研究では、自己組織化膜界面を利用して自由自在に生体分子を認識するための「場」を構築する事を目的とする。気液界面に形成される単分子膜(厚さ:約2 nm)、水溶液中の二分子膜(厚さ:約5 nm)、自己組織系の三次元ネットワーク(Cubic相など)(厚さ:~ μm)など、様々なスケールで自己組織化膜を設計する事ができる(Fig. 1)。Cubic相は膜タンパク質の結晶化技術にも応用されている一方、膜場のスケール変化に伴う物理化学的な特性(膜流動性など)については、まだまだ解明の余地がある。単分子膜ならびに二分子膜レベルでミクロな膜特性(膜流動性、ミクロドメイン形成)を評価し、分子認識によって誘発されるマクロな溶液特性(粒子凝集、ゲルネットワークによる粘度増大など)を定量的に解析する事で、協奏的な生体分子の識別分離に挑戦する。

3. 研究の方法

1) 自己組織化膜材料の調製

リン脂質膜(リポソーム)を標準として、各種の両親媒性分子集合体を調製した。脂肪酸(例:オレイン酸)はpHに応じて多様な集合体を形成する事が知られている。その性質に着目し、pH滴定法により各種の脂肪酸分子集合体を調製した。また、脂肪酸モノグリセリド(例:モノオレイン)を導入しCubic相形成条件について検討した。

2) 蛍光プローブ法による膜特性解析

各種の蛍光プローブ(DPH, Laurdan, Prodan, ANS, TMA-DPH)を活用し、ベシクル膜界面の膜特性を体系的に評価した。リン脂質膜を基準として、各種の自己組織化膜について俯瞰的に特性を比較し、さらにはラマン分光(表面増強ラマン)による直接的な膜界面解析との相対比較を行った。

3) 単分子膜解析

各種の脂質組成について、Langmuir単分子膜を形成させ、 π -A等温線測定を行った。得られた結果について、パラメータ(A_{ex} , C_s^{-1} , ΔG_{mix})を解析し、各種成分の混和性や単分子膜の安定性について評価した。

4. 研究成果

●新規な膜界面評価手法の開発

1) 膜界面における脂肪酸分子のpKa値測定

DPPC脂質に脂肪酸(オレイン酸)を添加した際の π -A等温線測定ならびに表面力測定解析を行った。本来DPPC膜は秩序相を形成する脂質であるが、オレイン酸添加により膜の秩序構造は乱れ、膜内部の疎水場が暴露される事を明らかにした。基板上に作成したDPPC/Oleic acidに分子膜のpH応答性について検討した結果、二分子膜上におけるオレイン酸分子の見かけ上のpKa値は9.1である事を明らかにした。

2) 蛍光プローブによる膜界面の静電ポテンシャル評価

蛍光プローブHHCはpH環境に応答して蛍光スペクトルが変化する。この性質を利用して、各種の正電荷リポソーム膜界面のpH環境について評価した。不飽和正電荷脂質DOTAPは膜上に均一に分散した一方、ドメイン形成性DC-Cholesterolはクラスタ構造を形成し、

ドメイン領域の電荷密度は非ドメイン領域と比較して約 6 倍である事が明らかにした。

3) マルチ蛍光プローブ法による俯瞰的な膜特性評価

蛍光プローブ DHP, Laurdan, Prodan, ANS, TMA-DPH はそれぞれ膜界面での配向位置が異なり、局所的な膜特性を反映する。ケーススタディとして、Cholesterol, Lanosterol, Ergosterol について相対比較した結果、不飽和脂質膜(DOPC)における秩序化誘導特性は Cholesterol > Lanosterol > Ergosterol であった。また、飽和脂質膜においては、リン脂質相転移温度以上において、Ergosterol は顕著な秩序化誘導特性を示す事を明らかにした。

●秩序高く階層的な膜材料：Cubosomal ゲルの調製

オレイン酸/モノオレイン混合系について、pH 滴定法により各種の集合体を調製し、相図にまとめた。所定の条件においてサンプルのゲル化が見られた。ラマン分光法ならびに Laurdan 蛍光プローブ法により各種集合体の膜特性を解析し、既報の知見と比較した。その結果、Cubic 相を形成する集合体では、リポソーム膜のゲル相の様に脂質分子がパッキングされており、膜界面は脱水合されている事を明らかにした。ゲル化が見られたサンプルでは Cubic 相が形成されていると考えられ、本知見に基づき各種の脂質分子より Cubosomal ゲルを調製するための方法論が明らかとなった。

●分子認識性膜材料の設計

1) 核酸分子認識

グアニジニウム誘導体を調製し、リン酸基を有する tRNA 分子の認識特性について評価した。リポソーム膜の表面電荷密度は一般的な正電荷リポソームと同程度であるが、tRNA 分子との結合乗数はグアニジニウム誘導体の方が 10 倍以上強い事がわかった。また、高温条件下で構造変化を誘導した場合、グアニジニウム誘導体リポソームは tRNA の C-G 塩基と優先的に相互作用する可能性を明らかにした。

2) アミロイド性タンパク質認識

アミロイド β タンパク質(A β)はアルツハイマー病の原因物質の1つと考えられている。脂質膜界面における A β 分子の振舞いを解析するため、脂質膜担持金ナノ粒子 (AuNP@lipid) を調製し、タンパク質 脂質間相互作用ならびに線維形成を表面増強ラマン解析により観察した。A β 認識において、負電荷脂質 phosphoserine が重要な役割を担い、膜との親和性を増大させ、持続的に線維形成を促進する可能性を明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件、主要な論文を下記に示す)

Keishi Suga, Yoko Otsuka, Kengo Yoshida, Hiroshi Umakoshi: Smart Preparation of Polydiacetylene Hydrogel Based on Self-Assembly of Tricosadiynoic Acid and 1-Oleoylglycerol (Monoolein). *J. Chem. Eng. Japan*, **52** (3), 311-316 (2019) [査読あり]

Nozomi Watanabe, Yuka Goto, Keishi Suga, Thomas K. M. Nyholm, J. Peter Slotte, Hiroshi Umakoshi: Solvatochromic modeling of Laurdan for multiple polarity analysis of dihydro-sphingomyelin bilayer. *Biphys. J.*, **116** (5), 874-883 (2019) [査読あり]

Keishi Suga, Yoko Otsuka, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Gel Phase-Like Ordered Membrane Properties Observed in Dispersed Oleic Acid/1-Oleoylglycerol Self-Assemblies: Systematic Characterization Using Raman Spectroscopy and a Laurdan Fluorescent Probe. *Langmuir*, **34** (5), 2081-2088 (2018) [査読あり]

Keishi Suga, Ying-Chen Lai, Miftah Faried, Hiroshi Umakoshi: Direct Observation of Amyloid β Behavior at Phospholipid Membrane Constructed on Gold Nanoparticles. *Int. J. Anal. Chem.*, **2018**, Article ID 2571808 (7 pages) (2018) [査読あり]

James Kurniawan, Keishi Suga, Tonya L. Kuhl: Interaction Forces and Membrane Charge Tunability: Oleic Acid Containing Membranes in Different pH Conditions. *BBA-Biomembranes*, **1859**, 211-217 (2017) [査読あり]

Keishi Suga, Atsushi Tauchi, Takaaki Ishigami, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Preferential Adsorption of L-Histidine onto DOPC/Sphingomyelin/3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol Liposomes in the Presence of Chiral Organic Acids. *Langmuir*, **33** (15), 3831-3838 (2017) [査読あり]

Jin Han, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Multi-Level Characterization of the Membrane Properties of Resveratrol-Incorporated Liposomes. *J. Phys. Chem. B*, **121** (16), 4091-4098 (2017) [査読あり]

Nozomi Watanabe, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi: Comparison of Physicochemical Membrane Properties of Vesicles Modified with Guanidinium Derivatives. *J. Phys. Chem. B*, **121** (39), 9213-9222 (2017) [査読あり]

Keishi Suga, Dai Kondo, Yoko Otsuka, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Characterization of Aqueous Oleic Acid/Oleate Dispersions by Fluorescent Probes and Raman Spectroscopy. *Langmuir*, **32** (30), 7606-7612 (2016) [査読あり]

Keishi Suga, Nozomi Watanabe, Hiroshi Umakoshi: Effect of Stearylguanidinium-Modified POPC Vesicles on the Melting Behavior of tRNA Molecules. *J. Phys. Chem. B*, **120** (25), 5662-5669 (2016) [査読あり]

Keishi Suga, Kei Akizaki, Hiroshi Umakoshi: Quantitative Monitoring of Microphase Separation Behaviors in Cationic Liposomes Using HHC, DPH, and Laurdan: Estimation of the Local Electrostatic Potentials in Microdomains. *Langmuir*, **32** (15), 3630-3636 (2016) [査読あり]

Tham Thi Bui, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi: Roles of Sterol Derivatives in Regulating the Properties of Phospholipid Bilayer Systems. *Langmuir*, **32** (24), 6176-6184 (2016) [査読あり]

[学会発表](計 55 件, 国内シンポ(Oral 12 件, Poster 22 件), 国際会議(Oral 5 件, Poster 16 件))

[化学工学会研究奨励賞] 菅 恵嗣: Cubosomal ゲルの作製・評価方法の開発とその応用に関する研究, 化学工学会第 84 年会, 芝浦工業大学, 東京, 2019 年 3 月 13-15 日

[依頼講演] 菅 恵嗣: 膜表面増強ラマン法(MSERS)を活用するリン脂質膜における分子挙動解析手法の開発, 2018 年日本表面真空学会学術講演会, 神戸国際会議場, 兵庫, 2018 年 11 月 19 日-21 日

[招待講演] Keishi Suga: Development of fatty acid-based self-assembly platform: ~ from nano capsule to hydrogel~, 2018 KosFoST International Symposium and Annual Meeting, BEXCO, Busan, Korea, Jun 27th-29th (2018)

[招待講演] Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi: Development and Characterization of Fatty Acid Assembly ~ From Nano Capsule to Hierarchical Gel ~, 2017 Agricultural Biotechnology Symposium (Theme: Delivery and Controlled Release of Food Bioactives), Center for Food and Bioconvergence (CFB), Seoul National University, Seoul, Korea, Nov 9th (2017)

[若手口頭講演賞] 菅 恵嗣, 川上 良介, 吉田 智洋, 岡本 行広, 馬越 大: 膜表面増強ラマン分光法の開発 ~ 金ナノ粒子を活用する高感度脂質膜分析 ~, 第 68 回コロイドおよび界面化学討論会, 神戸大学, 兵庫, 2017 年 9 月 6-8 日

[優秀講演賞(学術)] 菅 恵嗣, Tham Thi Bui, 明崎 慧, 岡本 行広, 馬越 大: Multi-Focal Characterization for Micro-Phase Separation Behavior of Liposome Membrane, 第 97 回日本化学会春季年会, 慶應義塾大学, 神奈川, 2017 年 3 月 16 日-19 日

[依頼講演] 菅 恵嗣, 馬越 大: ソフトマター界面の秩序構造を活用するキラル医薬品/RNA の分離, 第 22 回関西地区分離技術講演会, 大阪市立大学, 大阪, 2016 年 12 月 9 日 (Oral) 依頼講演

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.membranome.jp/B-ICE/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 明崎 慧
ローマ字氏名 : Kei Akizaki
研究協力者氏名 : プイ ティタム
ローマ字氏名 : Tham Thi Bui
研究協力者氏名 : 渡邊 望美
ローマ字氏名 : Nozomi Watanabe
研究協力者氏名 : 大塚 葉子
ローマ字氏名 : Yoko Otsuka
研究協力者氏名 : ファリド ミフタ
ローマ字氏名 : Faried Miftah
研究協力者氏名 : ライ インチェン
ローマ字氏名 : Ying-Chen Lai

※科研究による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。