

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06568

研究課題名(和文) SDAモデルに基づき設計した部分フッ素化人工脂質/膜タンパク質複合体の開発

研究課題名(英文) Development of partially fluorinated lipid/membrane protein complex designed based on Stratified Dipole-Arrays model

研究代表者

高木 俊之 (Takagi, Toshiyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10248065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：人工脂質のフッ素化は、物理的・化学的な安定性を付与し、膜タンパク質の組み込みにも有用であることを示してきた。本研究において、人工脂質/膜タンパク質複合体構築に向けた高配向かつ高秩序で適度な膜流動性を有する人工脂質膜を成す部分フッ素化ジミリストイルホスファチジルコリン(Fn-DMPC)およびジパルミトイルホスファチジルコリン(Fn-DPPC)を開発した。さらにこれらの脂質を用いた膜物性および再構成膜の観察結果を詳細に評価したところ、二鎖型のリン脂質でも脂肪酸と同様にフッ素導用量に依存したSDAモデル(Stratified Dipole-Arrays model)を支持する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質を標的とした医薬品開発において、脂質・膜タンパク質複合体膜は、医薬品スクリーニングの現場に有望である。そこで、脂質・膜タンパク質複合体膜における膜タンパク質の機能を長期安定維持可能な人工脂質の開発として、フッ素導入した擬環状型脂質の開発を目指している。SDA理論に基づく含フッ素化界面活性剤設計は、人工血管材料の表面修飾剤やリポソームDDS材料や臨床診断細胞分散剤などの医療やバイオ分野領域における研究開発を加速すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Sufficient long perfluoroalkyl chains are strongly hydrophobic and more rigid than hydrocarbon ones, leading to the formation of rigid assemblies, of which properties are not suitable for membrane protein reconstitution matrices. Partially fluorinated phospholipid-based membranes, however, are greatly expected promising materials for reconstitution of membrane proteins.

In this study, we presented synthesis of phospholipids (DMPC and DPPC) having perfluoroalkyl groups of different lengths and their membrane properties. Our proposed fluorinated phospholipids designed based on Stratified Dipole-Arrays (SDA) model are considered effective to provide the mechanically stable and fluid membranes, essential for the construction of membrane protein reconstitution matrices.

研究分野：有機フッ素化学

キーワード：ペルフルオロアルキル基 人工脂質 膜タンパク質 再構成膜 バクテリオロドプシン

1. 研究開始当初の背景

フッ素導入した有機化合物は、1) 立体的因子、2) 静電的因子、3) 炭素-フッ素結合の安定性、4) 疎水性の変化により、医薬品や農薬などの生理活性や薬理効果に影響を与えることが知られている(フッ素薬学、廣川書店、1992)。すでに研究代表者は部分フッ素化脂肪酸を合成し、その単分子膜特性評価(平衡拡張圧測定)から、フッ素導入が気水界面での界面安定性を向上させ、単分子膜安定化(物理的安定性)に有効であることを示した。また、合成した部分フッ素化グリセロリン脂質からなるベシクルを作製し、水中での会合挙動からフッ素導入は膜内パッキングを密にさせ、溶質流出入を抑制することを明らかにした。さらにバイオ医薬品開発の基盤研究の位置づけとなる膜タンパク質研究において、膜タンパク質バクテリオロドプシン(bR)の再構成を試みたところ、膜タンパク質の再構成膜の構築に成功し、再構成膜中のbRは天然紫膜中と同様に三量体として組み込まれ、機能発現においてはフォトサイクルのM中間体の寿命を大きく変化させることを世界で初めて報告した。部分フッ素化人工脂質が膜タンパク質の機能を安定維持可能な脂質であり、天然脂質のフッ素化による生体適合性の損失がないことを示した。

一般的にパーフルオロアルキル(Rf)基からなる化合物は、表面疎水性・高融点・低誘電率・低溶解性などの際立ったバルク物性を示すことで知られる(フッ素薬学、廣川書店、1992)。一方、フッ素はあらゆる元素の中で最大の電気陰性度を示し、C-F結合には大きな電気双極子があり、本来、親水性や高誘電率を示してもおかしくない。これら一見つじつまが合わなく見えるフッ素化合物特有のバルク物性について、Rf基を含む1分子の性質と、分子集合体としての性質を区別して議論することで統一的に理解できるSDAモデル(Stratified dipole-arrays model)を長谷川らが提案している。異なるRf鎖長を持つミスチン酸(Rf-MA)を用いたLangmuir(L)膜の界面化学的実験および赤外分光法的検証から導き出したフッ素化合物の分子配向に関するモデルである。膜タンパク質再構成膜を成す部分フッ素化人工脂質におけるバルク物性評価に対し、SDAモデルとの比較検討を行い、“フッ素”への新しい開拓ツールの礎となることを検証する。

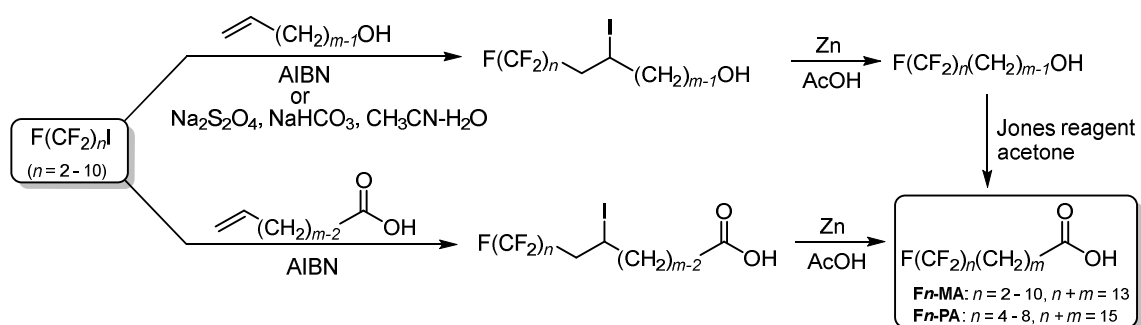
2. 研究の目的

膜タンパク質再構成膜における最適にフッ素化した炭素鎖長を有する部分フッ素化人工脂質の設計および合成、それらを用いた二分子膜の集合体の膜流動性情報は、膜タンパク質自体の機能解析を行うツールとしてばかりでなく、膜タンパク質を用いたバイオ医薬品開発の重要な基盤研究の位置づけとなる。本研究において、膜タンパク質にストレスを与えない環境、すなわち天然脂質近似の高い相溶性を付与した部分フッ素化人工脂質を開発、それらから成る人工脂質・膜タンパク質複合体の膜物性評価の知見を集積することを目的とする。

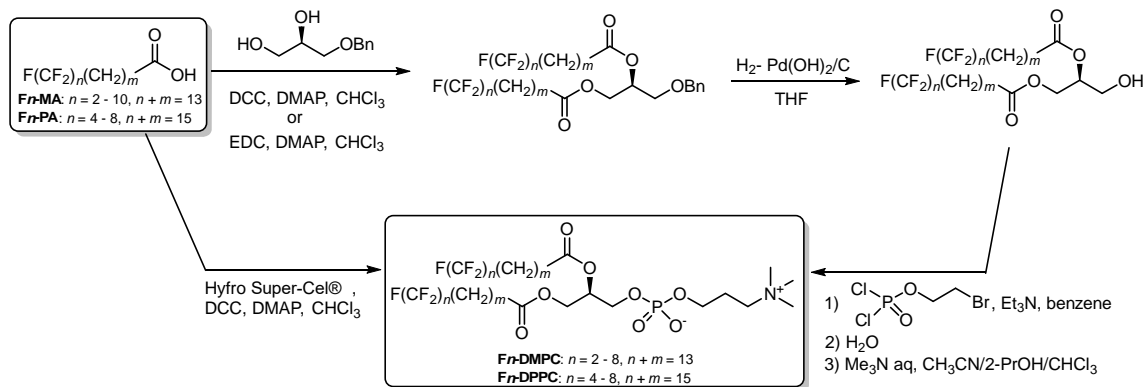
また、一般的なフッ素化合物がRf基の配向効果により二次元的に自己集合しているSDAモデルから示唆された高度のフッ素化による高い自己集積能によるフッ素化合物特有の撥油性が疎水性の膜タンパク質との相溶性の低下を引き起こす要因と考えられる。開発した部分フッ素化人工脂質/膜タンパク質複合体から得た膜物性評価をSDAモデルと比較検討する。

3. 研究の方法

膜タンパク質の機能を長期安定維持可能なフッ素導入した人工脂質の開発として、部分フッ素化人工脂質の合成経路の確立を行った。生体膜モデルである脂質二分子膜に利用されているジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC) およびパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を基本骨格とした。まず、部分フッ素化ジミリスチルホスファチジルコリン (F_n -DMPC: $n=2\sim 8$) およびジパルミトイルホスファチジルコリン (F_n -DPPC: $n=4\sim 8$) の原料となる部分フッ素化ミリスチン酸 (F_n -MA: $n=2\sim 10$) およびパルミチン酸 (F_n -PA: $n=4\sim 8$) を下記の通り合成した。



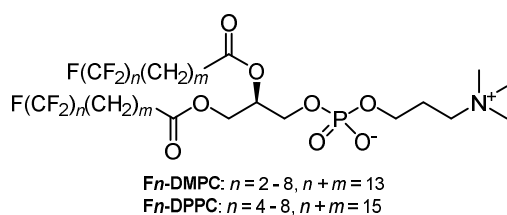
引き続き、合成した F_n -MA および F_n -PA を出発原料とし、 F_n -DMPC および F_n -DPPC をそれぞれ、下記の通り合成した。また、最終生成物の純度が非常に重要であることから、物性測定の一つである示差走査熱量測定 (DSC) の結果を基に最終生成物または中間体の精製プロセスを検討し、最終生成物の高純度化を目指した。



次に、合成した部分フッ素化人工脂質ライブラリー (F_n -DMPC および F_n -DPPC) を用いた物性評価として DSC 測定を行った。さらに、これらと膜タンパク質研究において利用されることが多いバクテリオロドプシン (bR) とから成る再構成膜の作製を試みた。引き続き、脂質・膜タンパク質複合体 (bR/ F_n -DMPC および bR/ F_n -DPPC) の膜物性評価 (蛍光スペクトル、紫外可視スペクトルおよび円二色性スペクトル測定) を行った。また、各 bR 再構成膜の熱安定性についても評価した。

4. 研究成果

種々の条件検討により確立した合成経路を基に、部分フッ素化ジミリストイルホスファチジルコリン (F_n -DMPC: $n=2\sim 8$) およびジパルミトイルホスファチジルコリン (F_n -DPPC: $n=4\sim 8$) からなる人工脂質ライブラリーを作製した。出発原料の変更、各ステップの合成条件および精製条件の最適化を行うことで、グラムスケール合成経路を提案した。また、最終生成物の高純度化においては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) や再結晶法などを組み合わせた精製条件の最適化も行い、ノウハウ技術を蓄積した。



	T_m ()	H(kJ mol ⁻¹)	S(J mol ⁻¹ K ⁻¹)
DMPC	24.4	18.9	63.7
F2-DMPC	6.8	27.9	99.4
F4-DMPC	5.8	23	82.4
F6-DMPC	19.9	11.5	39.2
F7-DMPC	45	14.1	44.28
F8-DMPC	64.4	8.2	24.2

部分フッ素化脂質 (F_n -DMPC および F_n -DPPC) を用いた再構成膜の評価用モデル膜タンパク質としてバクテリオドプシン (bR) の大量調製を行い、随時調製可能な状態で大量保管した。大量調製した bR を用いた再構成膜 (bR/ F_n -DMPC および bR/ F_n -DPPC) の調製に成功し、それらの機能評価 (安定性評価など) を検討し、Rf鎖長の違いによる再構成 bR の構造や光機能中間体の挙動を比較した。

F_n -DMPC ($n=2\sim 8$) および F_n -DPPC ($n=4\sim 8$) を用いた膜物性および再構成膜の評価において、得られた実験結果を詳細に解析したところ、炭素鎖長4個分がフッ素化された F4-DMPC と F4-DPPC において非常に興味深い結果が得られた。すなわち、F4-DPPC では脂質膜の相転移により二次元結晶が崩れ、bR が単量体に解離する点において F4-DMPC とは異なることが分かった。さらに脂質膜の熱物性 (DSC: 示差走査熱量測定) では大きな違いは見られないが、bR との再構成膜では振る舞いには違いが生じ、フッ素化していない脂質 (炭化水素系脂質) に近い特徴を示す結果を得た。また、フッ素化した炭素鎖長が6個以上の F_n -DMPC ($n \geq 6$) では脂質膜の安定性が向上し、さらに bR の再構成膜においても bR 三量体の熱安定性が著しく向上することが分かった。特に bR/F8-DMPC では、70度近い高温でも相転移前後で共に三量体を保持したことから、非常に安定な構造をとることが示唆された F8-DMPC は本来の膜タンパク質の構造および機能を保持できる優れた脂質であると考えられる。

部分フッ素化ジミリストイルホスファチジルコリン (F_n -DMPC) およびジパルミトイルホスファチジルコリン (F_n -DPPC) を用いた膜物性および再構成膜の評価において、二鎖型のリン脂質でも一鎖型の分子の場合と同様に SDA モデルを支持する結果が得られた。脂質膜中の bR の挙動の観察は、部分フッ素化人工脂質の基盤技術開発において重要であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baba Teruhiko, Takagi Toshiyuki, Sumaru Kimio, Kanamori Toshiyuki, Dewa Takehisa, Nango Mamoru	4. 巻 198
2. 論文標題 Membrane properties of ether-type phosphatidylcholine bearing partially fluorinated C18-monoacetylenic chains and their applicability to membrane protein reconstitution matrices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111459 ~ 111459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2020.111459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Teruhiko, Takagi Toshiyuki, Sumaru Kimio, Kanamori Toshiyuki, Dewa Takehisa, Nango Mamoru	4. 巻 198
2. 論文標題 Membrane properties of ether-type phosphatidylcholine bearing partially fluorinated C18-monoacetylenic chains and their applicability to membrane protein reconstitution matrices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111459 ~ 111459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2020.111459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Yasunori, Yano Shunsuke, Kurita Riku, Karasawa Morise, Tanaka Hikaru, Takahashi Hiroshi, Kikukawa Takashi, Sonoyama Masashi, Takenaka Koshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Effects of salt and gel network structures on purple membrane stacking in hydrogels immobilized with poly(vinyl alcohol)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 014701 ~ 014701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0032546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi Tamami, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Kikukawa Takashi, Amii Hideki, Sonoyama Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparison of two different partially fluorinated phosphatidylcholines with the perfluorobutyl group on thermotropic properties of the bilayer membrane and reconstituted bacteriorhodopsin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 395 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-019-00540-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Kohei, Horikoshi Miki, Yanagi Tamami, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Amii Hideki, Hasegawa Takeshi, Sonoyama Masashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Thermotropic Transition Behaviors of Novel Partially Fluorinated Dimyristoylphosphatidylcholines with Different Perfluoroalkyl Chain Lengths	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba Teruhiko, Takagi Toshiyuki, Sumaru Kimio, Kanamori Toshiyuki	4. 巻 227
2. 論文標題 Effect of the fluorination degree of partially fluorinated octyl-phosphocholine surfactants on their interfacial properties and interactions with purple membrane as a membrane protein model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104870 ~ 104870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2020.104870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 SONOYAMA Masashi, TAKAGI Toshiyuki, TAKAHASHI Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Partially Fluorinated Phospholipid Bilayer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 310 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kise Ryuma, Fukumi Aki, Shioya Nobutaka, Shimoaka Takafumi, Sonoyama Masashi, Amii Hideki, Takagi Toshiyuki, Kanamori Toshiyuki, Eda Kazuo, Hasegawa Takeshi	4. 巻 92
2. 論文標題 Fluorous Property of a Short Perfluoroalkyl-Containing Compound Realized by Self-Assembled Monolayer Technique on a Silicon Substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 785 ~ 789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20180356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimoaka Takafumi, Sonoyama Masashi, Amii Hideki, Takagi Toshiyuki, Kanamori Toshiyuki, Hasegawa Takeshi	4. 巻 123
2. 論文標題 Raman Optical Activity on a Solid Sample: Identification of Atropisomers of Perfluoroalkyl Chains Having a Helical Conformation and No Chiral Center	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 3985 ~ 3991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.8b11613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiroshi, Yoshino Masaru, Morita Kohei, Takagi Toshiyuki, Yokoyama Yasunori, Kikukawa Takashi, Amii Hideki, Kanamori Toshiyuki, Sonoyama Masashi	4. 巻 1861
2. 論文標題 Stability of the two-dimensional lattice of bacteriorhodopsin reconstituted in partially fluorinated phosphatidylcholine bilayers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 631 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2018.12.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiroshi, Takagi Toshiyuki, Sonoyama Masashi	4. 巻 44
2. 論文標題 Synthesis, Membrane Structure and Physical Properties of Partially Fluorinated Phospholipids, and Prospects of Their Use for Membrane Protein Research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 50 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.44.50	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Masashi Sonoyama
2. 発表標題 Partially Fluorinated Phospholipid Membrane
3. 学会等名 58th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳留 俊・野村 舞・林 史夫・杉山 成・松岡 茂・村田 道雄・園山 正史
2. 発表標題 ヒト脳細胞由来脂肪酸結合タンパク質 FABP の脂質二重膜を介した脂肪酸結合親和性解析
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤紋音・徳留俊・林史夫・菊川峰志・白石充典・園山正史
2. 発表標題 Nanodiscに単離したバクテリオロドプシン三量体の光サイクルと安定性
3. 学会等名 日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Shimoaka, M. Sonoyama, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, T. Hasegawa
2. 発表標題 Raman optical activity specifically found on solid samples of perfluoroalkyl compounds having helical conformation and no chiral center
3. 学会等名 International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹木菜々子、高木俊之、高橋浩、園山正史
2. 発表標題 フッ素化したエーテル型脂質dihexadecylphosphatidylcholineの合成と熱物性の解析
3. 学会等名 第9回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川原るい、高木俊之、高橋浩、菊川峰志、網井秀樹、園山正史
2. 発表標題 擬環状エーテル型脂質のフッ素化が膜物性および膜タンパク質の構造・機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第42回フッ素化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳瑤美、高木俊之、高橋浩、網井秀樹、長谷川健、金森敏幸、園山正史
2. 発表標題 パーフルオロアルキル鎖長に依存した部分フッ素化リン脂質二分子膜の相転移挙動
3. 学会等名 第18回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yoshino, H. Takahashi, Y. Yokoyama, T. Takagi, H. Amii, T. Kanamori, M. Kikukawa, M. Sonoyama
2. 発表標題 Thermal Stability of the Hexagonal Lattice Packing Structure of Bacteriorhodopsin in Partially Fluorinated Phospholipid Bilayers 59th International Conference on the Bioscience of Lipids
3. 学会等名 59TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE BIOSCIENCE OF LIPIDS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下赤卓史、園山正史、網井秀樹、高木俊之、金森敏幸、長谷川健
2. 発表標題 パーフルオロアルキル鎖特有のねじれ構造に起因するアトロプ異性体のラマン分光イメージング法による識別
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田康平、柳珠美、堀越未希、高木俊之、高橋浩、網井秀樹、茂木俊憲、金森敏幸、長谷川健、園山正史
2. 発表標題 部分フッ素化リン脂質二分子膜の熱物性
3. 学会等名 第41回フッ素化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下赤卓史、園山正史、網井秀樹、高木俊之、金森敏幸、長谷川健
2. 発表標題 パーフルオロアルキル鎖のねじれ構造に起因するアトロプ異性のラマン分光法による識別
3. 学会等名 第41回フッ素化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Yanagi, H. Takahashi, T. Takagi, H. Amii, T. Motegi, T. Hasegawa, T. Kanamori, M. Sonoyama
2. 発表標題 Thermotropic Phase Transition Behavior and Structural Properties of Partially Fluorinated Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer
3. 学会等名 Asian Biophysics Association Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Yanagi, H. Takahashi, T. Takagi, H. Amii, T. Motegi, T. Hasegawa, T. Kanamori, M. Sonoyama
2. 発表標題 Structure and Thermotropic Phase Transition Behavior of Perfluoroalkyl-Containing Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer
3. 学会等名 The 6th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋吉一成、園山正史、富田泰輔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 624
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	園山 正史 (Sonoyama Masashi) (40242242)	群馬大学・大学院理工学府・教授 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------