

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01692

研究課題名(和文) 表面汚染抑制と生体分子修復の両立を目指した、新規バイオ分離材料の開発

研究課題名(英文) Development of new bioseparation material aiming at both suppression of surface contamination and repair of biomolecules

研究代表者

島内 寿徳 (Shimanouchi, Toshinori)

岡山大学・環境生命自然科学学域・准教授

研究者番号：10335383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：医療マテリアルの表面汚染の原因であるタンパク質吸着を抑制するべく開発されたリン脂質ポリマー材料は、タンパク質構造の崩壊抑制や修復動作を呈しない。そこで、モデル生体膜の検討を通して、リン脂質ポリマー材料の修復動作を検討した。まず相分離特性や揺らぎ構造を利用して相境界(動的ナノ空間)を制御できた。この相境界がタンパク質の吸着と濃縮の場として機能し、タンパク質の二次元拡散と会合挙動をも制御できた。その結果、成長相としての天然状態の回復、アミロイド形成、結晶成長などを誘導できた。さらに、リン脂質ポリマー材料では、制御可能な動的ナノ空間が不足していることが修復動作の障害になっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

界面での相境界や空隙などの動的ナノ空間の制御がタンパク質の吸着と構造制御に寄与する知見は、アミロイドーシスなどのタンパク質の構造異常に起因する疾病を抑制する医療材料の開発に貢献できると期待される。また、吸着抑制と構造修復の両立を視野に入れて、長期インプラントに有用な医療材料や人工臓器の開発研究にも展開できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Phospholipid polymer materials developed to suppress protein adsorption, which is a cause of surface contamination of medical materials, do not suppress the collapse of protein structures or exhibit repair behavior. Therefore, we investigated the repair behavior of phospholipid polymer materials through the study of model biomembranes. First, we were able to control the phase boundary (dynamic nanospace) by utilizing phase separation characteristics and fluctuation structures. This phase boundary functions as a site for protein adsorption and concentration, and we were also able to control the two-dimensional diffusion and association behavior of proteins. As a result, we were able to induce the recovery of the native state as a growth phase, amyloid formation, crystal growth, etc. Furthermore, it was suggested that the lack of controllable dynamic nanospace in phospholipid polymer materials is an obstacle to their repair behavior.

研究分野：化学工学・プロセス工学

キーワード：モデル生体膜 リン脂質ポリマー タンパク質 修復 動的ナノ空間 脂質平面膜 成長相

1. 研究開始当初の背景

Quality of Life の高い長寿健康社会の実現のための技術的ブレークスルーの一つとして、半永久的体内埋め込み型医療デバイスが挙げられる。立ちはだかる問題は医療用マテリアルの表面汚染と正常細胞組織への負荷・損傷である。

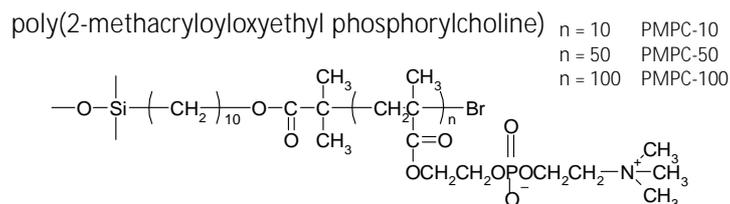
表面汚染の主な原因は、タンパク質の立体構造の崩壊に伴う「凝集核」(以降は単に「核」と呼ぶ)の発生とされる。タンパク質の崩壊自体は抑制できておらず、医療デバイス周辺の正常細胞組織の損傷などが問題となってきた。細胞膜類似構造を有するリン脂質ポリマー(MPC)が開発され、表面汚染につながるタンパク質吸着が劇的に抑制された。しかし、MPCがタンパク質構造修復機能を有していないため、吸着抑制が不十分であることが指摘されている。そこで、最近細胞のタンパク質修復機能に目が向けられるようになった。申請者のグループは早くからリン脂質からなる閉鎖系小胞(モデル細胞膜)がタンパク質の構造修復を促進することを報告したが[J. Chromatogra. B, 2000]、その機構は長らく明らかにされてこなかった。このため、モデル細胞膜と類似構造を有する MPC 界面がタンパク質構造修復に成功していない理由を今まで明からにできなかったと考えられる。

2. 研究の目的

医療マテリアルの表面汚染の原因であるタンパク質吸着を抑制するべく開発された MPC 材料は、タンパク質構造の崩壊抑制や修復動作を呈しない。そこで、モデル生体膜を用いて、修復動作機構を解明し、その原理を MPC 材料に応用する。具体的には、相分離特性や揺らぎ構造を利用して動的ナノ空間を制御し、それを以てタンパク質の二次元拡散と会合挙動をも制御することを目的とする。

3. 研究の方法

相分離性脂質や MPC を基板に固定化して平面膜を作成した。ここで、MPC 材料として、PMPC10 や PMPC100 を用いた。PMPC_x の x は鎖長を表す(下図)。共有結合法により、各種タンパク質を蛍光分子で標識した。上記方法で作成した脂質膜固定化 QCM 用電極を用いてタンパク質の吸着量を求めた。また、タンパク質の界面材料との相互作用を原子間力顕微鏡(AFM)により評価した。脂質膜上のタンパク質の二次元拡散挙動を全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)で録画し、ImageJ の画像解析を行い、拡散係数を見積もった。界面上でのタンパク質の成長相を蛍光プローブで染色し、TIRFM により観察した。



4. 研究成果

本課題を、(1) タンパク質の二次元拡散性に基づく構造修復動作、(2)成長相の選択律、(3) タンパク質配向性・局在性、ならびに(4) 動的ナノ空間の寄与、(5) 動的ナノ空間に基づく成長相選択機構の議論に分けて述べる。

(1) 蛍光標識したウシ炭酸脱水酵素(CAB)を用いて、脂質膜や MPC 膜上での構造修復過程を検討した。1分子追跡法により、CAB が低拡散状態と高拡散状態を断続的に繰り返しながら、高拡散状態のときにランダムに膜から脱離する過程が観察された(図 1a)。タンパク質の二次元拡散性とその構造状態とを比較した結果、低拡散状態は主に変性状態(構造が壊れた状態)、高拡散性状態は天然状態(構造が回復した状態)に対応していることが分かった。また、MPC 膜である PMPC10 と PMPC100 を比較すると、膜上での二次元拡散距離が短く、拡散係数も天然状態に回復せず脱離することが示唆された。それゆえ、構造が壊れた CAB が膜上で構造を断続的に変性天然状態の遷移を繰り返しながら、天然状態の際

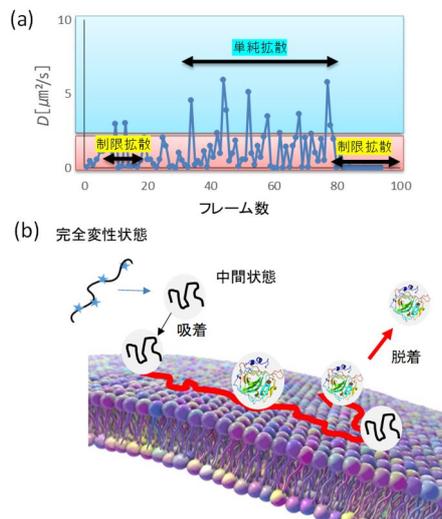


図 1 (a) 観察開始 30 分までの DPPC 二分子膜上での側方拡散係数(D)のフレーム数変化(1 フレーム = 1/7 秒), (b) 修復動作の模式図

に膜界面から脱離し、MPC の鎖長が長いほど、この動作が不利であることが分かった (図 1b) 。それゆえ、修復過程がエントロピー駆動であると考えた。

(2) タンパク質の分子内水素結合が安定であれば、成長相として天然状態、結晶状態、もしくはアモルファス状態が選ばれた。これらの相の選択律は過飽和度 (= 界面での実行濃度と溶解度との差) に依存している (図 2a) 。タンパク質は過飽和状態になった場合、まずアミロイドが出現し、次に結晶が得られ、急激な過飽和度の増大によりアモルファス状態が選ばれやすいことも明らかになった。 (図 2b) 。このように、成長相の選択には対象タンパク質の分子内水素結合安定性と過飽和度、ならびに過飽和度の変動速度が鍵になっていることが分かった。

(3) 液体秩序相 (l_o) と液体無秩序相 (l_d) に相分離する膜のタンパク質の吸着挙動を検討した。たとえば DOPC/DPPC 系の場合、DOPC と DPPC 単独で異なる吸着量を示す。混合後の脂質膜は両者の混合比に比例しておらず、最大吸着量を示す混合比が存在し、過剰吸着が見られることが分かった (図 3a) 。この過剰吸着の原因を探るべく、蛍光標識タンパク質を調製し、膜表面の吸着分布を TIRFM により可視化した結果、 l_o 相と l_d 相の相境界に優先的に配向したタンパク質に起因することが可視化された (図 3b) 。また、糖鎖脂質は l_d 相から固相 (s_o) に相分離する形で糖鎖脂質の領域を形成する。この場合、CAB やリゾチウムは s_o 相に優先的に配向した (図 3c) 。これらの状態では成長相は (2) に従い選択されることが分かった。

一方、MPC 膜の場合、吸着量は PMPC10 > PMPC100 であった。これは水和構造が大きいほど、吸着過程と一体となる脱水過程が熱力学的な障壁になっているからだと考えられる。

(4) MPC や種々の脂質分子からなる脂質平面膜中で形成される動的ナノ空間の生成状況に規則性があるかを検討した。ここで、動的ナノ空間として、相境界や膜中の空隙 (kink) が挙げられる。(3)と同様、蛍光標識した CAB、リゾチウム、ならびに $A\beta$ を利用した。相分離性脂質平面膜上で 2 次元拡散特性を追跡した結果、 l_o 相ではほとんど動かず、 l_d 相では相境界に移行後捕捉されることが分かった (図 4a) 。特に液晶相から相境界に捕捉される割合がゲル相からの捕捉割合よりも大きいことが見いだされた。興味深いことに、タンパク質の吸着により、さらなる相分離が誘起され、相境界の増大が見られる場合もあった (動的ナノ空間の生成) 。次に MPC 材料でも検討した結果、MPC 鎖長が長いほど、二次元拡散の領域が制限され、互いに会合しにくくなることが示唆された (図 4b,c) 。これは動的ナノ空間の消滅とみなすことができる。平均二乗変位 MSD

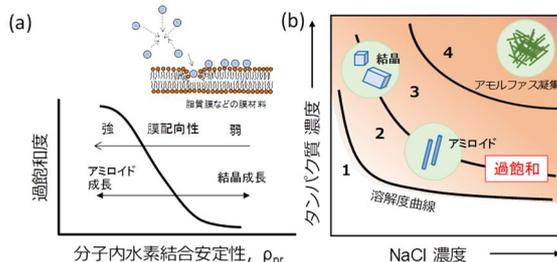


図 2 成長相のダイアグラム。(a) NaCl 濃度-タンパク質濃度、(b) 過飽和度-分子内水素結合安定性。

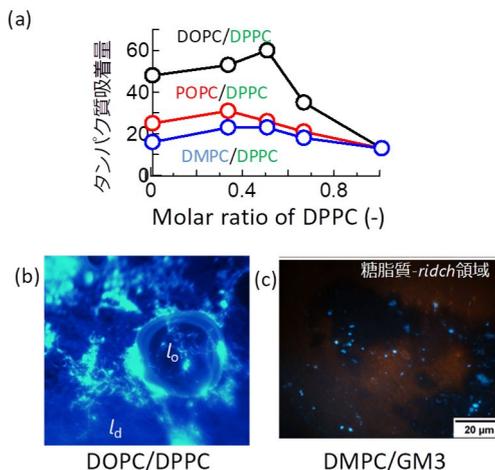


図 3 (a) X + DPPC 系脂質膜への $A\beta$ 吸着量に対する脂質混合比依存性。相転移温度差: DOPC/DPPC > POPC/DPPC > DMPC/DPPC。脂質平面膜上での DAC 標識 $A\beta$ や Lys の局在性に関する TIRFM 像: (b) DOPC/DPPC と (c) DMPC/ ガングリオシド GM3。ここで DOPC、DMPC、POPC はジオレオイルホスファチジルコリン、ジミリスチルホスファチジルコリン、パルミトイル-オレオイルホスファチジルコリンのこと。

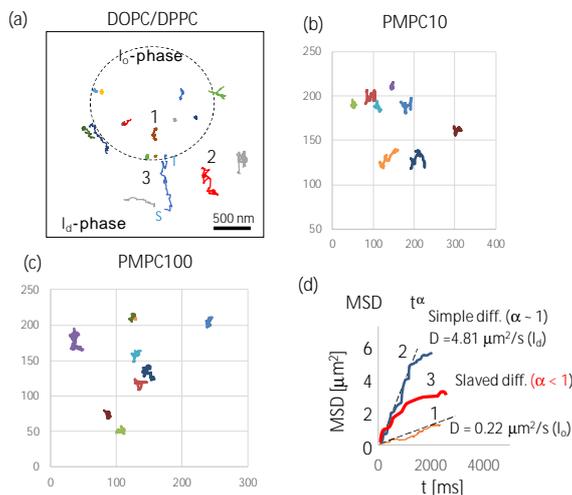


図 4 蛍光標識 $A\beta$ の二次元追跡: (a) DOPC/DPPC、(b) PMPC10、(c) PMPC100。破線は相境界。(d) 平均二乗変位 MSD の時間変化。指数 a は異常指数と呼ばれ、 $a > 1$ のとき促進拡散、 $a = 1$ のとき単純拡散、 $a < 1$ のとき制限拡散である。

の時間依存性からも相境界への捕捉が制限拡散として確認された(図 4d)。この挙動は $A\beta$ が相境界に捕捉されて動きが抑制されたことを表している。また $A\beta$ 以外でも認められ、上記の推測を補強するものと考えられる。

(5) これらのタンパク質が相境界(動的ナノ空間)を構造修復の場として利用するメカニズムを議論した。その結果、分子量(分子サイズ)や分子内水素結合安定性 ρ_{pr} が動的ナノ空間への配向に関係することが示唆された。この二つの因子は、それぞれが天然状態やアミロイドを成長相として選択する因子として関わることも示唆された(図 5)。アミロイドを成長相とするタンパク質について、さらに α -シヌクレイン、アポリポタンパク質、トランスサイレチンなども検討した結果、これらのタンパク質の ρ_{pr} は核形成速度と相関できることが示された(図 5 右)。また、相境界がアミロイド形成のための濃縮に寄与していることも図 3 と同じ方法論で確認できた。それゆえ、動的ナノ空間である相境界や空隙の生成消滅がタンパク質の濃縮に深く関わっていると考えられる。一方、PMPC10 や PMPC100 の場合、アミロイドの核形成速度は遅く、天然状態への回復速度も遅いことから、タンパク質の吸着や濃縮がいずれも抑制されたことに起因すると考えた。これは PMPC 材料界面での動的ナノ空間そのものが分散しているため、相境界のような動的ナノ空間の密集化が誘起されないためであると考えられた。

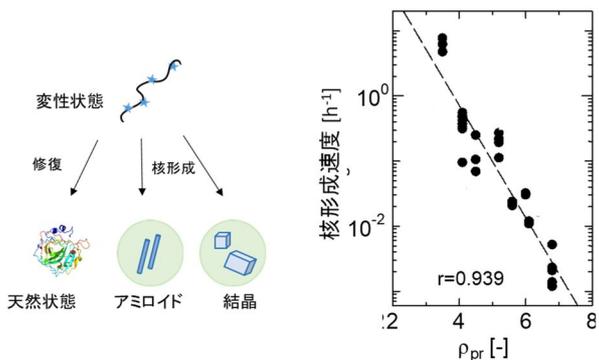


図 5 分子内水素結合の安定性と核形成速度の比較。ここではアミロイドの核形成速度について示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Shimanouchi, Y. Sano, K. Yasuhara, Y. Kimura	4. 巻 1870
2. 論文標題 Amyloid aggregates induced by -cholesteryl glucose-embedded liposomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBA-Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2022.140816	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 T. Shimanouchi, M. Iwamura, S. Deguchi, Y. Kimura	4. 巻 11
2. 論文標題 Fibril growth behavior of amyloid beta on polymer-based planar membranes: Implications for the hydration and entanglement of polymers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Science	6. 最初と最後の頁 4408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app11104408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 島内寿徳	4. 巻 47
2. 論文標題 高分子支持膜上でのアミロイド形成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 21-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 T. Shimanouchi, M. Iwamura, Y. Sano, K. Hayashi, M. Noda, Y. Kimura	4. 巻 1872
2. 論文標題 Classification of binding property of amyloid to lipid membranes: Membranomic research using quartz crystal microbalance combined with the immobilization of lipid planar membranes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2023.140987	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 7件）

1. 発表者名 島内寿徳、上田将大、脇本雅也、木村幸敬
2. 発表標題 相分離性脂質膜上のアミロイド ペプチドの分布特性と線維化への影響
3. 学会等名 膜シンポジウム, 0-108
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内海俊哉、島内寿徳、木村幸敬
2. 発表標題 脂質膜上でのリゾチウムの核形成・成長過程に及ぼす糖脂質の影響
3. 学会等名 膜シンポジウム, P45-S
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshinori Shimanouchi, Yuga Ogawa, Keita Hayashi
2. 発表標題 Intact immobilization of liposomes on the solid surface based on the interaction between graphene oxide and pyrene
3. 学会等名 IVC-22, Wed-K1-2 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masahiro Ueda, Toshinori Shimanouchi, Yukitaka Kimura
2. 発表標題 Accumulation and fibrillation behavior of amyloid peptide from Alzheimer's disease on phase-separated lipid membranes
3. 学会等名 IVC-22, P01A-2 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石祐大, 島内寿徳, 木村幸敬
2. 発表標題 脂質膜上でのタンパク質の並進拡散特性に及ぼす分子量の影響
3. 学会等名 化学工学会第87年会 (PE314)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島内寿徳, 板東佳宏, 木村幸敬
2. 発表標題 亜臨界水乳化法によるポリマーナノカプセル調製と蛍光物質漏出評価
3. 学会等名 化学工学会第87年会 (N322)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島内寿徳, 小川雄河, 林啓太, 木村幸敬
2. 発表標題 酸化グラフェン薄膜を用いた intact なリポソーム固定化法の開発
3. 学会等名 膜学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Shimanouchi, Y. Shiraishi, Y. Kimura
2. 発表標題 Refolding of carbonic anhydrase from bovine on lipid membranes
3. 学会等名 ICOM2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島内寿徳, 内海 俊哉, 木村幸敬
2. 発表標題 脂質膜上でのリゾチウムの結晶化に及ぼす糖脂質の影響
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Shimanouchi, S. Utsumi, Y. Kimura
2. 発表標題 Effect of glycolipids on Lysozyme crystallization
3. 学会等名 ICSST2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Shimanouchi, M. Ueda
2. 発表標題 Amyloid phase in the interfacial crystallization using phospholipids and polymers
3. 学会等名 ICSST2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Shimanouchi, Y. Shiraishi, Y. Kimura
2. 発表標題 Analysis of refolding process of proteins on lipid planar membranes
3. 学会等名 JVSS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Shimanouchi
2. 発表標題 Self-assemblies of amyloid beta peptides on glycolipid-embedded membrane
3. 学会等名 JVSS2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 島内寿徳	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)情報機構	5. 総ページ数 360
3. 書名 晶析操作の実務	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------