

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590039

研究課題名(和文) 膜タンパク質の再構成マトリックス材料となる含フッ素擬環状型人工脂質の開発

研究課題名(英文) Development of fluorinated pseudo-cyclic phospholipids as membrane protein reconstitution matrices

研究代表者

高木 俊之 (TAKAGI, TOSHIYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：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の化学安定性を向上させたジテトラデシルホスファチジルコリン二分子のアルキル鎖片端を共有結合にて二量化した擬環状型リン脂質およびアルキル鎖の一部をユニークな特性を有するフッ素で置換した擬環状型リン脂質を開発した。脂質の擬環状化およびフッ素化は適度な流動性を有する安定な二分子膜を形成することが分かった。膜タンパク質バクテリオロドプシンと擬環状型リン脂質または含フッ素擬環状型リン脂質からなる再構成膜を調整した。

研究成果の概要(英文)：Fluorinated compounds exhibit unique properties such as thermal and chemical stability, remarkable hydrophobicity and lipophobicity. Sufficiently long perfluoroalkyl segments are strongly hydrophobic and more rigid than hydrocarbon ones, leading to the formation of mechanically stable and rigid assemblies, of which properties are not preferable for membrane protein reconstitution matrices. The introduction of a partially fluorinated alkyl group into a pseudo-cyclic phospholipid is considered much effective to provide and/or control the suitable fluidity for their monolayer, which is essential for membrane protein reconstitution techniques.

研究分野：有機フッ素化学

キーワード：フッ素 人工脂質 膜タンパク質 ベシクル 擬環状脂質 バクテリオロドプシン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、膜タンパク質を標的とした医薬品開発が注目されていることから、脂質・膜タンパク質複合型バイオセンサは、特に医薬品スクリーニングの現場において有望と考えられている。特にベシクル膜の開発により、膜タンパク質再構成脂質膜を膜タンパク質自体の機能解析用のツールとしてだけでなく、バイオセンサツールとしての利用も可能である。

環状骨格を有する脂質は古細菌の膜脂質としてよく知られ、その興味深い骨格は、多くの有機合成化学者たちにより合成経路が見出され報告されてきた。しかしながら、その合成経路は多段階であり、容易に真似出来る合成手法ではないことから、通常、天然紫膜から単離精製した環状脂質が使用されている。そこで、環状脂質より簡易に合成が可能、環状脂質と同様の膜安定性を有する擬環状型脂質に注目した。

環状脂質は天然脂質の柔軟性（柔らかさ）に及ばないが、擬環状脂質は天然脂質に近い“柔らかさ”を有するという計算科学的な知見がある。また、脂質の擬環状化は、環状脂質と同様に、通例の脂質二分子膜のような疎水性コアの中心面（滑り面）での破断が回避され、これに伴う膜の構造的欠陥が減少し、その結果、膜の機械的安定性が得られることが期待できる。

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。しかしながら、ペルフルオロアルキル基の導入が二分子膜の集合体にどのような影響を与えるのかは未だ解明されていない。膜タンパク質の再構成膜として、物理的・化学的にも安定な含フッ素人工脂質が使われていない理由はここにある。フッ素化した脂質からなる集合体は天然由来の炭化水素系脂質とほぼ同様の挙動を示すが、膜流動性低下による溶質流入抑制、厚みある相間水層によるステルス性から、天然由来脂質より高い安定性の付与が期待されている。

脂質のフッ素化および擬環状化は、膜タンパク質の機能を長期安定維持可能な人工脂質として有望と考えられる。含フッ素擬環状脂質の開発は、脂質・膜タンパク質複合体を利用したバイオセンサ開発を加速度的に促進すると期待できる。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、安定人工脂質膜の設計・機能評価、膜タンパク質ハンドリング剤の設計・機能評価、人工脂質・膜タンパク質複合化、複合体の機能性基板への固定化・機能評価により、安定な脂質・膜タンパク質複合体を利用したバイオセンサの開発研究を進めている。

本研究では、擬環状脂質およびフッ素化し

た擬環状脂質を合成し、それらの集合体である二分子膜（ベシクル）の機能性評価から脂質のフッ素化および擬環状化がベシクル膜の物理的・化学的安定性とどのような相関を示すのかを明らかにし、膜タンパク質の再構成膜脂質として有用な候補化合物を見出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

膜タンパク質を標的とした医薬品開発において、脂質・膜タンパク質複合型バイオセンサは、医薬品スクリーニングの現場に有望である。そこで、脂質・膜タンパク質複合型バイオセンサ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た。

(1) 含フッ素擬環状型脂質の開発として、擬環状型脂質およびそれらのフッ素化体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) において、アルキル鎖結合部位の化学的安定性が向上したエーテル結合体を有するジテトラデシルホスファチジルコリン (DTPC) を基本骨格とした。2分子の DTPC において、グリセロール部位の1級アルコールに結合したアルキル鎖端同士が共有結合した擬環状型脂質 (Pseudo-DTPC; PC-DTPC) を合成した。さらにそれらの含フッ素化擬環状脂質 (PC-F-DTPC) の合成も行った。

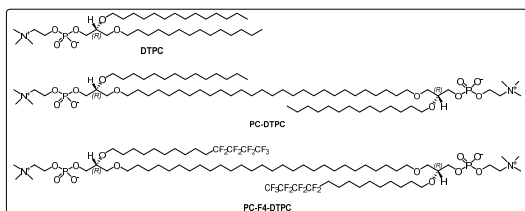
(2) 合成した脂質の膜物性評価から、脂質・膜タンパク質複合型バイオセンサ膜に有用な人工脂質候補を見出す。

合成した脂質 (DTPC、PC-DTPC および PC-F4-DTPC) を用いた物性評価として DSC 測定を行った。次に、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/DTPC、bR/PC-DTPC および bR/PC-F4DTPC) 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

(1) PC-F-DTPC 合成に向け、まず合成経路の確立に向け、合成経路探索を行った。一定期間で多種類の PC-F-DTPC を合成するため、出来る限り同じ中間体を利用する合成経路開発を目指した。

種々の条件検討の結果、PC-F-DTPC を合成可能な経路を確立するに至った。一例ではあるが、ペルフルオロブチル (F4: F(CF<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) 基およびペルフルオロオクチル (F8: F(CF<sub>2</sub>)<sub>8</sub>) 基の導入した擬環状型化合物に成功している。DTPC、PC-DTPC および PC-F4-DTPC の構造式を次に示す。



(2) DTPC、PC-DTPC および PC-F4-DTPC の DSC 測定によりゲル-液晶相転移温度を観察した。PC-DTPC のゲル-液晶相転移温度は、DTPCより20 以上高温の50 付近に観測された。また、PC-F4-DTPC では生理的温度付近にゲル-液晶相転移が観察された。従って、擬環状(二量体)化は転移温度および転移エンタルピーを2 倍程度上昇させるが、擬環状型脂質のフッ素化はゲル-液晶相転移温度を生理的温度まで下降させることが分かった。

膜内部の流動性変化に鋭敏な蛍光色素であるジフェニルヘキサトリエンを用いた蛍光異方性測定を行った。その結果、PC-DTPC におけるアルキル鎖の動きが擬環状化により制限されていることからゲル-液晶相転移温度が上昇したと考えられるが、熱転移後のPC-DTPC の流動性は十分に高く(DTPC に匹敵する流動性を保有)、膜タンパク質の再構成基材として利用できることが分かった。

DTPC、PC-DTPC および PC-F4-DTPC へのbR の再構成は、既報告条件であるDMPC へのbR 再構成法に準じて行った。その結果、いずれの脂質においても高い収率で再構成膜が得られることが分かった。

得られたbR 再構成膜(bR/DTPC、bR/PC-DTPC および bR/PC-F4DTPC) の円二色性スペクトル測定から、いずれのbR 再構成膜もゲル相において、bR は天然紫膜と類似した三量体を形成し、液晶相では解離した単量体になることが分かった。

bR 再構成膜(bR/DTPC、bR/PC-DTPC および bR/PC-F4DTPC) の熱安定性評価においては、加熱前後の可視紫外スペクトル測定を行い、bR の変性割合の変化を観察した。熱安定性は、擬環状化およびフッ素化により向上することを見出した。

含フッ素擬環状型脂質(PC-F-DTPC など) は二本鎖型脂質に比べ、bR をより天然に近い状態で再構成することが可能、擬環状(二量体)化後も適度な膜流動性を保持可能、熱安定性が向上する、ことが分かった。従って、含フッ素擬環状化脂質が膜タンパク質再構成脂質膜として有用であり、膜タンパク質のin vitroでの機能解析用基材として利用、引いてはバイオセンサツールの基材としての利用も期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5 件)

1. T. Hasegawa, T. Shimoaka, N. Shioya, K.

Morita, M. Sonoyama, T. Takagi, T. Kanamori, Stratified Dipole-Arrays Model Accounting for Bulk Properties Specific to Perfluoroalkyl Compounds, ChemPlusChem, 79 (10), 1421-1425, 2014, 査読有

2. 高木俊之、馬場照彦、金森敏幸、バイオ材料としての部分フッ素化脂質膜の開発、ファルマシア、50 (1)、49-53、2013、査読無
3. M. Yoshino, T. Kikukawa, H. Takahashi, T. Takagi, Y. Yokoyama, H. Amii, T. Baba, T. Kanamori, M. Sonoyama, Physicochemical Studies of Bacteriorhodopsin Reconstituted in Partially Fluorinated Phosphatidylcholine Bilayers, J. Phys. Chem. B, 117-18, 5422-5429, 2013, 査読有
4. H. Takahashi, M. Yoshino, T. Takagi, H. Amii, T. Baba, T. Kanamori, M. Sonoyama, Non-ideal mixing of dimyristoylphosphatidylcholine with its partially fluorinated analogue in hydrated bilayers, Chem. Phys. Lett., 559, 107-111, 2013, 査読有
5. M. Yoshino, H. Takahashi, T. Takagi, T. Baba, K. Morita, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, Effect of Partial Fluorination in the Myristoyl Groups on Thermal and Interfacial Properties of Dimyristoylphosphatidylcholine, Chem. Lett., 41, 1495-1497, 2012, 査読有

〔学会発表〕(計2 2 件)

1. 土田直之、高木俊之、高橋浩、菊川峰志、吉原利忠、飛田成史、金森敏幸、園山正史、二量体化したエーテル型リン脂質の膜異方性および透過性解析、日本化学会第95 春季年会、千葉県、2015/03/26
2. 土田直之、高木俊之、高橋浩、菊川峰志、吉原利忠、飛田成史、金森敏幸、園山正史、エーテル型リン脂質の二量体化が膜物性・膜タンパク質バクテリオロドプシンに与える影響、日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、群馬県、2014/12/08
3. 吉野賢、高橋浩、森田康平、高木俊之、網井秀樹、金森敏幸、園山正史、High stability of two-dimensional crystal of reconstituted bacteriorhodopsin in partially fluorinated phosphatidylcholine、第52 回日本生物物理学会年会、北海道、2014/09/25
4. 土田直之、高木俊之、菊川峰志、高橋浩、金森敏幸、園山正史、Effect of partial fluorination on structure and

- photointermediates of bacteriorhodopsin reconstituted in dimerized Di-o-tetradecylphosphatidylcholine vesicle、第 52 回日本生物物理学会年会、北海道、2014/09/25
5. 森田康平、高橋浩、網井秀樹、高木俊之、金森敏幸、長谷川健、園山正史、パーフルオロアルキル基を導入した Dimyristoylphosphatidylcholine 二分子膜の物性・構造、第 8 回分子科学討論会、広島県、2014/09/21
  6. 土田直之、高橋浩、高木俊之、金森敏幸、園山正史、二量体化した Di-O-Tetradecylphosphatidylcholine の熱物性および膜異方性解析、第 65 回コロイドおよび界面化学討論会、東京、2014/09/03
  7. 森田康平、高橋浩、網井秀樹、園山正史、高木俊之、金森敏幸、長谷川健、DMPC アシル鎖末端へのパーフルオロアルキル基導入による膜物性への効果、第 65 回コロイドおよび界面化学討論会、東京、2014/09/03
  8. M. Yoshino, K. Morita, T. Takagi, H. Takahashi, T. Kikukawa, T. Kanamori, M. Sonoyama, A Biophysical Study of Partially Fluorinated Phosphatidylcholine: Membrane Physical Properties and Reconstitution of Bacteriorhodopsin into Its Liposome, 2014 International Biophysics Congress, Australia, 2014/08/05
  9. 園山正史、吉岡聡、土田直之、高木俊之、高橋浩、菊川峰志、金森敏幸、A Biophysical Study of Bacteriorhodopsin in Pseudocyclic Phosphatidylcholine Liposome, 第 51 回日本生物物理学会年会、京都、2013/10/2
  10. 吉野賢、金山賢治、菊川峰志、高木俊之、高橋浩、横山泰範、網井秀樹、金森敏幸、園山正史、Low affinity of bacteriorhodopsin to partially fluorinated phosphatidylcholine in reconstituted membrane, 第 51 回日本生物物理学会年会、京都、2013/10/2
  11. 吉野賢、菊川峰志、高橋浩、高木俊之、横山泰範、網井秀樹、金森敏幸、園山正史、リン脂質リポソームに再構成したバクテリオロドプシンの構造・機能に対するアシル鎖部分フッ素化の影響、第 64 回コロイドおよび界面化学討論会、名古屋、2013/09/18
  12. 吉野賢、金山健次、高橋浩、高木俊之、菊川峰志、横山泰範、網井秀樹、金森敏幸、園山正史、部分フッ素化リン脂質を含む二成分系リン脂質混合膜における膜タンパク質バクテリオロドプシンの分配挙動、第 40 回生体分子科学討論会、大阪、2013/06/08
  13. 吉野賢、金山健次、菊川峰志、高木俊之、高橋浩、馬場照彦、金森敏幸、園山正史、部分フッ素化ホスファチジルコリン小胞に再構成されたバクテリオロドプシンの液晶相における分子集合体、第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、2012/09/24
  14. 園山正史、吉野賢、菊川峰志、高橋浩、高木俊之、馬場照彦、金森敏幸、新規部分フッ素化リン脂質の膜タンパク質研究への応用、新学術領域「揺らぎと生体機能」「水と ATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水-生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」、大阪、2012/09/14
  15. 吉野賢、高橋浩、高木俊之、馬場照彦、森田康平、網井秀樹、金森敏幸、園山正史、ホスファチジルコリン脂質膜の物性・構造に対するアシル鎖へのフッ素原子導入効果、第 6 回分子科学討論会 2012 東京、東京、2012/09/12
  16. T. Takagi, T. Kanamori, Application of Novel Partially Fluorinated Phospholipid: Indium-mediated Radical Addition of Perfluoroalkyl Iodide in Water, 20th International Symposium on Fluorine Chemistry, Kyoto, 2012/07/24
  17. 吉野賢、高木俊之、菊川峰志、高橋浩、馬場照彦、金森敏幸、園山正史、新規部分フッ素化リン脂質に再構成したバクテリオロドプシンに対する脂質フッ素化の影響、第 39 回生体分子科学討論会 2012、宮城県、2012/06/08
  18. 高木俊之、金森敏幸、膜タンパク質再構成膜としての部分フッ素化脂質の開発：In を用いたペルフルオロアルキル基導入反応、日本薬学会第 132 年会、北海道、2012/03/30
  19. M. Yoshino, T. Kikukawa, T. Takagi, Y. Yokoyama, H. Takahashi, T. Baba, T. Kanamori, M. Demura, M. Sonoyama, Structure and Function of Bacteriorhodopsin Reconstituted into Partially Fluorinated Phosphatidylcholine Liposome, 第 5 回公開国際シンポジウム「揺らぎが機能を決める生命分子の科学」、奈良県、2012/01/07

(3)連携研究者  
なし

20. 高木俊之, 膜タンパク質モデルを用いた部分フッ素化脂質の開発, 日本フッ素化学会 研究講演会 2011(群馬), 群馬県, 2011/10/31
21. 吉野賢、菊川峰志、横山泰範、高木俊之、高橋浩、出村誠、馬場照彦、金森敏幸、園山正史、 Reconstitution of bacteriorhodopsin into partially fluorinated phosphatidylcholine liposomes, 第49回日本生物物理年会、兵庫県、2011/09/16
22. 上治瑛、吉野賢、高橋浩、高木俊之、馬場照彦、金森敏幸、園山正史、新規部分フッ素化リン脂質 1,2-Di(14,14,14,13,13,12,12,11,11-nonafluorotetradecanoyl)-glycero-3-phosphorylcholine 二重膜の熱物性と膜の安定性、第5回バイオ関連化学シンポジウム、茨城県、2011/09/13

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：擬環状脂質化合物  
発明者：高木俊之、園山正史、金森敏幸  
権利者：国立研究開発法人・産業技術総合研究所、国立大学法人・群馬大学  
種類：特許  
番号：特願 2014-048051  
出願年月日：H26/03/11  
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高木俊之 (TAKAGI TOSHIYUKI)  
独立行政法人・産業技術総合研究所・  
幹細胞工学研究センター・主任研究員  
研究者番号：10248065

### (2)研究分担者

なし