

令和元年6月14日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26249116

研究課題名(和文) Membrane-on-Membrane ～階層型自己組織化材料の創成～

研究課題名(英文) Membrane-on-Membrane ~Creation of Hierarchical Self-Organizing Materials~

研究代表者

馬越 大 (Umakoshi, Hiroshi)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：20311772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,900,000円

研究成果の概要(和文)：リン脂質分子の自己組織系であるリポソーム(Liposome)を活用し、膜(Membrane)界面における分子認識・変換能を顕在化させるための膜場設計について検討し、さらにはLiposome分子集合体の一つの「単位(Unit)」とする事により、従来の機能性材料とは一線を画した新しい材料(Membrano-on-Membrane (MoM))の設計戦略について提案した。一例として、マイクロ-メソスケールで“秩序高い”膜場をデザインしたり、リポソームをコアユニットとして、膜場を緻密に積層下させた階層型材料を設計する事で、L-アミノ酸に対する高いキラル分離能を有するバルク材料の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Liposome膜は、酵素に類似した分子認識・変換機能(LIPOzyme機能)を誘導する事が示されている。一連の成果は世界的に見て類のない研究であり、当研究Gr.が発信した独創的な機能性材料である。近年では生体模倣(Biomimetic)材料が多数報告されているが、結局のところ、生体系由来の機能を付与した材料に留まっている。本研究で得た一連の知見では、自己組織化膜のしなやかな構造を最大限に活用し、酵素と同様に構造ゆらぎにより認識/変換を制御しているため(Bio-Inspired)、従来にはない独創的研究といえる。さらにMoMは状態に応じて進化しうる材料であり、極めて進歩的な技術開発といえる。

研究成果の概要(英文)：In this project, a novel membranous devise (material) was developed. Membrane-on-Membrane (MoM) was hierarchically composed by self-assembled membranes. Liposome was selected as core unit of MoM, because it showed unique functions such as recognition of L-amino acid, promoting organic reaction in water, and molecular orientation of chlorophyll. In addition, the methodologies, multiple-fluorescent probe analyses, membrane surface-enhanced Raman spectroscopy, dielectric dispersion (relaxation) spectroscopy, were developed to characterize the physicochemical properties of membranes (in micro- and mesoscale). As an example of our achievements, the “ordered” membrane property plays a crucial role to improve selectivity in chiral recognition of amino acid. When the liposome possessing ordered membrane property was applied to MoM device (for example, liposome-immobilized polyacrylamide hydrogel system), the chiral recognition ability could be maintained.

研究分野：Bio-Inspired化学工学

キーワード：Membrane on Membrane リポソーム キラル認識 不斉合成 分子認識 ナノドメイン 表層水和水

1. 研究開始当初の背景

ものづくりのあり方について考えると、既存の機能性材料だけでは、人類の幸福に貢献できるのか甚だ疑問である。現在、環境汚染等により地球環境は危機に晒されている。長い年月をかけ形成された「生命圏 自然」の中に「人間」が生まれ、欲求を満たすために「人工物」が創られてきた。その人工物は、自然の循環システムから乖離した結果、“環境問題”がクローズアップされるようになった。地球環境の循環システムに組込まれた、新しいものづくりのあり方が必要であり、基礎工学的アプローチこそが問題解決に必須である。

機能材料は人工物の象徴でもある。ここでは、人間の生命と密接に関わる「人工臓器」を例に挙げたい。腎不全患者に対しては、透析器(Dialyzer)と呼ばれる人工腎臓(Artificial Kidney)が使われており、血液透析療法という治療が行われている。一般的に、人工腎臓に要求されている特性として、(1) 有害物質の選択的除去、(2) 塩・水分の調節、(3) 高い生体適合性、(4) 高いハンドリング性能などが望まれている。

人工システムと生体膜システムを比較した場合、人工膜を基盤としたシステムでは、先人の絶え間ない努力・知恵により、問題解決/改良型の高性能膜システムが完成しつつある。しかし、上記の要求項目に満たず、未だに問題が発生するのは、個々の【分子】にのみ着目した戦略に起因すると考えられる。一方、生体膜を基盤としたシステムでは、分子が【分子集合体】を形成して(一見、潜在的であるが、ストレス条件で顕在化される)高次機能を誘導し、さらにはその分子集合体が上位の【階層】(組織、器官など)を形成して、新しい機能を誘導している。(その様な一見不安定にも見える)分子集合体が創発する生体システムの特徴を活用した材料設計に戦略を構築する時期に差し掛かっていると考えられる。

2. 研究の目的

「Designable Nano-Surface」としてのリポソーム(Liposome)の分子認識/変換能を基盤として、人工膜を「階層型にデザイン」する手法を確立する。先行研究において、以下の様なリポソームの潜在的機能について明らかにしつつある：(i)タンパク質の変性中間体を認識(相互作用)して、Nativeな構造に巻戻す、(ii)膜在性要素物質(Acyl化ポルフィリン、Acyl化His、Acyl化キレート材)の集合構造を制御して、高度な分子認識能・酵素様活性を誘導する、(iii)遺伝子発現プロセスの要素物質と相互作用してその発現量を調節する、(iv)断片化・失活したペプチドを構造変化させ、再活性化する、(v)アミノ酸の不斉認識を誘導する。これら諸現象の解明には、脂質膜場の特性解析が必須不可欠である。Liposome分子集合体を、生体膜を基盤とするシステムを創成するための一つの「Unit(単位)」とする事により、従来の機能性材料とは一線を画した新しい材料(Membrano-on-Membrane (MoM))設計の指針を明確に示す。

3. 研究の方法

「MoMシート」を基盤材料とした物質生産システムを創成する事を目的とする。シートの一単位であるリポソーム膜のナノ物性ならびに分子認識・変換機能(酵素様機能, Liposome + Enzyme → LIPOzyme 機能)に関するデータを蓄積しつつ、それを極限まで高濃度化した膜材料 MoM シートを開発し、その工学材料/医療材料としての応用の可能性について検討した。

1) MoMシート設計のための膜場分析手法

リポソームおよび各種の両親媒性物質集合体について、物理化学的な膜特性を体系的に評価するための方法論を確立した。具体的には、マルチ蛍光プローブ法、膜表面増強ラマン分光法、誘電分散解析法に基づく膜場解析を行い、ミクロ~メソスケールの膜特性を明らかにした。

2) ナノ膜材料の機能探索およびマッチング

リポソーム膜によってリクルートされる各種ペプチドの多機能性を生み出す機構について詳細に検討した。代表的な要素物質(アミノ酸、疎水化リガンド、ストレス負荷ペプチド・タンパク質、核酸など)について、リポソーム界面における分子挙動を評価するための方法論(蛍光プローブ法、ラマン分光法、他)を開発した。同時に、LIPOzymeライブラリー(LL)を創成し、各種条件下におけるリポソーム膜洗剤能の誘導のためのケーススタディを行った。

3) MoMシート(膜材料)の開発

ナノ膜「リポソーム」をバルク膜「ゲルシート」化する技術を確立するために、リポソーム膜を(a)高安定、(b)高密度、(c)有機的に固定化した各種担体(ゲル担体、セルロース系分離膜担体など)の開発を検討した。コアユニットとしてリポソームおよび脂肪酸ベシクルを選定し、バルク材料を作成するための調製条件を最適化した。さらに、材料のバルク特性/ナノ物性(膜場特性)を解析する手法(蛍光プローブ法、ラマン分光法)を明らかにした。

4) 膜材料の応用

工業利用ならびに医療利用の2種類の応用を検討した。工業利用の場合は、レアメタル・有害物質回収など、環境あるいは生体環境を修復するための物質生産プロセスへの活用を指向した研究を実施した。また、医療利用の場合は、組織培養の足場、損傷細胞の修復など、生体細胞の賦活化を主眼とにおいて検討を進めた。

4. 研究成果

●マイクロ～メソスケールの膜場特性解析手法の開発

「MoM シート」のコアユニットとなるリポソーム(もしくはベシクル膜)の基礎的な物性評価手法について、膜場を俯瞰的に評価し、その特性を体系的にまとめた。分子認識においては、秩序的な膜場構築がカギとなる。得られた知見に基づき、温和な条件(室温付近)で相転移を起こす DMPC 膜に着目し、MoM シートのコアユニットとして選定した。本研究によって確立された主な膜場解析手法は以下である。

1) マルチ蛍光プローブ法

脂質膜界面は厚み 5nm 程度であるが、膜表面は親水的($\epsilon \sim 80$)であり、膜内部は疎水的($\epsilon \sim 6$)である。配向位置の異なる複数の蛍光プローブ(DPH, Laurdan, Prodan, ANS, TMA-DPH)を活用し、得られたデータを俯瞰的にまとめる事で膜場の鉛直方向を網羅的に解析する手法を確立した[7]。本手法に基づき、ミセル、脂肪酸ベシクル、界面活性剤ベシクル、ディスク状脂質集合体(バイセル)、Cubic 相(Cubosome)等の様々な分子集合体の界面特性を得る事に成功した。

2) 膜表面増強ラマン分光法

ラマン分光法は、物質を非接触・非侵襲で解析できる優れた手法である。本来リン脂質はラマンに対する活性の低い分子であるが、金ナノ粒子と脂質を複合化させることで従来法の 100 倍以上の感度でラマン分光分析が可能となった[2]。本手法の応用例として、アミロイド分子の高感度解析にも成功している。

3) 誘電分散解析

GHz 帯の高周波誘電分散解析により、膜場における脂質分子の運動性や水和水の挙動を評価した[1]。膜界面における分子認識プロセスでは、ターゲット分子と脂質分子が相互作用する事で協奏的に表面特性を変化させる可能性を明らかにしている。

●ナノ膜材料の開発と物質分離・物質変換への応用

リポソーム膜界面における各種ターゲット分子の振舞いについて解析し、コアユニットの機能(LIPOzyme 機能)の探索ならびに最適化を行った。

1) アミノ酸のキラル吸着

リポソーム(ゲル相(秩序相))は L-アミノ酸と選択的に相互作用する機構を明らかにした[3]。L-アミノ酸(L-Trp, L-His, L-Pro)とリポソームを 48h 恒温静置する事で 90%以上が膜に吸着する事を明らかにした。一方、D-アミノ酸はほとんどリポソームに吸着しない。ラセミ溶液からリポソームを回収すれば、L-アミノ酸はリポソームと共に回収され、溶液には D-アミノ酸が残存する。ケーススタディは少ないものの医薬品(Ibuprofen, propranolol)においてもキラル選択的な相互作用がみられた事から、低分子キラル化合物の分離手法として有効と考えられる。

2) リポソーム膜場を活用する物質変換プロセス

リポソーム膜の疎水環境を活用し、水中における有機反応を検討した。相間移動触媒反応では、リポソーム系においては S 体が、カチオン性界面活性剤ベシクル系では R 体がそれぞれ選択的に得られた[8]。また、L-Pro 触媒 Michael 反応系では、R 体化合物が選択的に得られた[4]。膜界面における分子分配特性により、反応中間体と基質の配向性が制御されていると考えられ、最適な膜場設計により、選択的に目的反応物を得るためのプロセスとして活用できる。

3) 人工光合成のためのプラットフォーム設計

クロロフィル分子は天然系では光アンテナとして働く。人工的にクロロフィル分子の集合構造(J-aggregate)を再現する事は困難であったが、ディスク状脂質分子集合体(バイセル)を活用する事で J-aggregate 誘導を効率化できる事を示した[11]。J-aggregate 構造は、電子伝達や触媒反応にも活用できるため、膜場による機能性リガンドの制御として今後の展開が期待される。

●「MoM シート」の開発

リポソームおよび脂質分子集合体をコアユニットとするバルク材料「MoM シート」について、下記の設計指針に沿って開発を行った。発展型として、ポリマー骨格を必要としない自己組織化膜材料(Cubosomal ゲル[12])についても検討した。

1) リポソーム固定化ハイドロゲル

高濃度リポソーム懸濁液を汎用性の高いハイドロゲル(PAAm, アガロース)でゲル化させ、材料内部の膜場特性および物質分離特性について明らかにした[5]。ゲル内部に固定化された DMPC 膜はリポソーム同様の温度相転移挙動を示し、ラセミ溶液からの L-アミノ酸の回収を可能とした。

2) リポソーム担持クライオゲル

リポソーム懸濁液を用いてクライオゲルを調製し、その構造および機能を評価した[10]。コアユニットとして導入したリポソームはゲル骨格に埋没した状態で固定化されているにも関わらず、膜の動的な挙動(温度相転移)は維持されていた。固定する膜場をゲル相(秩序相)に保つ事で、アミノ酸のキラル分離に活用可能であり、既存の分子インプリント膜と比較して高い分離能を示した。

●医療応用ならびに工業応用

膜材料の応用例として、下記のケーススタディを行った。

1) 薬物輸送担体の開発

ここでは、リポソームに代替する薬物輸送担体として界面活性剤集合体について検討した。Span ならびに Tween を所定の比率で混合する事で集合体形状をデザイン可能であり、課題であった細胞毒性を低減できる可能性を見出した[9]。

2) 高度分離・分析プラットフォームとしての SLB 開発

基板上脂質二分子膜(SLB)を調製し、電場印加により膜タンパク質を移動させられる事を明らかにした[6]。また、荷電性脂質の SLB 電気泳動分離についても検討した。脂質電荷と相分離特性を因子とする高度な脂質分離手法として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 54 件)

- [1] T. Shimanouchi, N. Yoshimoto, A. Hiroiwa, K. Nishiyama, K. Hayashi, H. Umakoshi: Relationship between the Mobility of Phosphocholine Headgroup and the Protein-Liposome Interaction: A Dielectric Spectroscopic Study. *Colloid Surf. B*, 116, 343-350 (2014)
- [2] K. Suga, T. Yoshida, H. Ishii, Y. Okamoto, D. Nagao, M. Konno, H. Umakoshi: Membrane Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (MSERS) for Sensitive Detection of Molecular Behaviour of Lipid Assemblies. *Anal. Chem.*, 87, 4772-4780 (2015)
- [3] T. Ishigami, K. Suga, H. Umakoshi: Chiral Recognition of L-Amino Acid on Liposome Prepared by L-Phospholipid. *ACS Appl. Mater. Interf.*, 7, 21065-21072 (2015)
- [4] M. Hirose, T. Ishigami, K. Suga, H. Umakoshi: Liposome Membranes as a Platform for L-Pro-Catalyzed Michael Addition Reaction of trans- β -Nitrostyrene and Acetone. *Langmuir*, 31, 12968-12974 (2015)
- [5] T. Ishigami, K. Sugita, K. Suga, Y. Okamoto, H. Umakoshi: High Performance Optical Resolution with Liposome Immobilized Hydrogel. *Colloid Surf. B*, 136, 256-261 (2015)
- [6] Y. Okamoto, Y. Tsujimoto, H. Umakoshi: Electrophoretic Separation Method for Membrane Pore Forming Proteins in Multilayer Lipid Membranes. *Electrophoresis*, 37, 762-768 (2016)
- [7] T. T. Bui, K. Suga, H. Umakoshi: Roles of Sterol Derivatives in Regulating the Properties of Phospholipid Bilayer Systems. *Langmuir*, 32, 6176-6184 (2016)
- [8] F. Iwasaki, K. Suga, Y. Okamoto, H. Umakoshi: Liposomes Can Achieve Enantioselective C-C Bond Formation of an α -Amino Acid Derivative in Aqueous Media. *ACS Omega*, 2, 91-97 (2017)
- [9] K. Hayashi, H. Iwai, T. Kamei, K. Iwamoto, T. Shimanouchi, S. Fujita, H. Nakamura, H. Umakoshi: Tailor-made Drug Carrier: Comparison of Formation-dependent Physicochemical Properties within Self-assembled Aggregates for an Optimal Drug Carrier. *Colloid Surf. B*, 152, 269-276 (2017)
- [10] Y. Hiramure, K. Suga, H. Umakoshi, J. Matsumoto, K. Shiomori: Preparation and Characterization of Poly-N-isopropylacrylamide Cryogel containing Liposomes and Their Adsorption Properties of Tryptophan. *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn.*, 25, 37-46 (2018)
- [11] S. Taguchi, K. Suga, K. Hayashi, M. Yoshimoto, Y. Okamoto, H. Nakamura, H. Umakoshi: Aggregation of Chlorophyll a Induced in Self-Assembled Membranes Composed of DMPC and DHPC. *Colloid Surf. B*, 175, 403-408 (2019)
- [12] K. Suga, Y. Otsuka, K. Yoshida, H. Umakoshi: Smart Preparation of Polydiacetylene Hydrogel Based on Self-Assembly of Tricosadiynoic Acid and 1-Oleoylglycerol (Monoolein). *J. Chem. Eng. Japan*, 52, 311-316 (2019)

他 42 件

〔学会発表〕(計 185 件)

うち国際会議における招待講演：11 件，国内シンポジウムにおける招待講演：10 件

〔図書〕(計 14 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 件)
該当なし
- 取得状況 (計 件)
該当なし

〔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

研究分担者氏名：菅 恵嗣
ローマ字氏名：Keishi Suga
所属研究機関名：大阪大学
部局名：大学院基礎工学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：00709800

研究分担者氏名：島内 寿徳
ローマ字氏名：Toshinori Shimanouchi
所属研究機関名：岡山大学
部局名：環境理工学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：10335383

研究分担者氏名：林 啓太
ローマ字氏名：Keita Hayashi
所属研究機関名：奈良工業高等専門学校
部局名：物質化学工学科
職名：講師
研究者番号（8桁）：10710783

研究分担者氏名：岡本 行広
ローマ字氏名：Yukihiko Okamoto
所属研究機関名：大阪大学
部局名：大学院基礎工学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：50503918

研究分担者氏名：中村 秀美
ローマ字氏名：Hidemi Nakamura
所属研究機関名：奈良工業高等専門学校
部局名：物質化学工学科
職名：教授
研究者番号（8桁）：70198232

研究分担者氏名：塩盛 弘一郎
ローマ字氏名：Koichiro Shiomori
所属研究機関名：宮崎大学
部局名：工学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：80235506

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：石上 喬晃
ローマ字氏名：Takaaki Ishigami
研究協力者氏名：岩崎 文彦
ローマ字氏名：Fumihiko Iwasaki
研究協力者氏名：廣瀬 正典
ローマ字氏名：Masanori Hirose
研究協力者氏名：田口 翔悟
ローマ字氏名：Shogo Taguchi
研究協力者氏名：渡邊 望美
ローマ字氏名：Nozomi Watanabe

※科研費による研究は、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。