

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12538

研究課題名(和文) 脂質膜 - 両性電解質ポリマーの相互作用解析による新たな細胞凍結傷害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of interaction between polyampholytes and lipid membranes to reveal mechanisms of cell cryopreservation

研究代表者

濱田 勉 (Hamada, Tsutomu)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：40432140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の凍結保存は、再生医療の重要な基盤技術の1つである。本研究課題では、両性電解質ポリマーと脂質膜の相互作用に着目し、細胞凍結機構の解明および凍結保護マテリアルの開発を行った。両性電解質ポリマーに疎水性部位を導入することで凍結保護機能が向上すること、両性電解質ポリマーの温度や塩濃度による相分離特性、ポリマーの脂質膜への吸着挙動、脂質膜構造に対する静電効果などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cryopreservation of cells is one of important technologies for regenerative medicine. Here, we focus on the interaction between polyampholytes and lipid membranes to clarify the mechanism of cell freezing and develop new materials. We found the improvement of cryoprotective function by introducing hydrophobic moiety into a polyampholyte, phase diagram of the polymer, adsorption behavior of the polymer on the membrane, and electrostatic effects on membrane structures.

研究分野：ソフトマター

キーワード：バイオマテリアル 脂質2分子膜

1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞による再生医療が進展し、細胞を扱う技術開発が急がれている。その中でも、細胞の凍結保存は重要な基盤技術の1つであり、凍結機構の解明および凍結保護マテリアルの開発は重要な課題である。これまでにジメチルスルホキシド(DMSO)などの低分子保護剤が開発されているが(Lovelock et al., Nature, 183, 1394-1395, 1959) 保存できない細胞種が存在や DMSO の毒性など問題点が多く残されている。松村は近年、両性電解質ポリマー(カルボキシル化ポリリジン)が優れた細胞凍結保護機能を備えることを発見した(Matsumura et al., Biomaterials, 30, 4842-4849, 2009)。これは、細胞凍結に関する未知の傷害メカニズムの存在を意味する。

2. 研究の目的

本研究課題では、凍結・解凍に伴う細胞膜の特性変化に着目し、細胞凍結傷害のメカニズムを理解することを目的とする。濱田が研究を進めてきた細胞サイズの人工脂質膜(リポソーム)を細胞モデル系として用い、膜の状態変化を精密に計測することで凍結現象の物理化学的機構を探る。人工脂質膜とバイオマテリアルの知見を融合させることで、凍結・解凍に伴う脂質膜と両性電解質ポリマーの相互作用を解析する。これにより、新たな細胞凍結傷害メカニズムを解き明かし、より傷害の少ない保護ポリマーの新設計を目指す。

3. 研究の方法

松村らが発見した細胞凍結保護機能を備える両性電解質ポリマーの水溶液中における温度特性を明らかにする。LCST 型の相分離は多くのポリマー系で観察されているが、両性電解質ポリマーの相分離挙動に関しては未だほとんど分っていない。予備実験から、LCST 型相分離曲線がポリマー濃度や溶液の塩濃度に依存することが見つかった。これは、電解質ポリマーの静電的効果が相挙動に大きく影響することを意味する。

そして、脂質膜-ポリマー複合体の解析を行う。まず、膜表面へのポリマー吸着挙動を明らかにする。膜ドメインを形成したリポソーム表面へのポリマー局在を解析し、膜の流動性がポリマー作用に及ぼす影響を明らかにする。濱田はこれまでの研究において、ペプチドやナノ粒子がその実効的な分子サイズに依存して、膜面の吸着領域(流動性の低いドメイン、または流動性の高い非ドメイン領域)を選択することを見出している。これらの知見を基に、凍結傷害に伴う膜へのポリマー局在を解析し、ポリマーと膜の相互作用メカニズムを明らかにする。

また、ポリマーが吸着した脂質膜の凍結・解凍による応答ダイナミクスを観察し、膜の

凍結傷害に対するポリマー保護作用を明らかにする。そして、得られた結果を電解質ポリマーのデザインにフィードバックさせ、より傷害の少ないマテリアル設計を目指す。

4. 研究成果

27年度:凍結保護機能をもつカルボキシル化ポリリジンに疎水性部位を導入することで、細胞の凍結保護作用が向上することを見いだした。その際、疎水性が高いほど相分離温度が低くなることを確認した。例えば22%の高分子濃度と比較すると、アミノ基の50%を無水コハク酸でカルボキシル基に変換した両性電解質高分子では、LCSTは50であったが、炭素数一つ多い無水グルタル酸で変換した場合には45、炭素数が3つ多い3,3-ジメチル無水グルタル酸の場合、38、4つ多いブチル無水コハク酸では22であった。このLCSTと凍結保護作用の関連については引き続き調査中である。

また、メタクリル酸とジメチルアミノエチルメタクリレートの共重合により、合成した両性電解質高分子においても細胞の凍結保護効果は確認された。そのとき、ポリリジン系と同様にブチルメタクリレートオクチルメタクリレートなどの疎水性モノマーを5%程度共重合することで、さらに効果が高まることを確認した。その効果の原因として、主に細胞膜との相互作用の向上によるものである事が、リポソームとの相互作用を調べた結果分かった。本研究はBiomacromoleculesに掲載された。

28年度:ポリリジンをベースとした、両性電解質高分子を数種類作成し、その側鎖の疎水性に応じて温度応答性の相分離挙動が異なることを示した。温度や塩濃度による相図を作成し、相分離挙動が分子設計により制御できることを示した。成果はJ. Polym. Sci. Aに掲載され、表紙イメージを飾った。次に両性電解質高分子と脂質を組み合わせて、両性電解質被膜リポソームを作成した。両性電解質高分子凍結保護剤存在化で、リポソームに担持したタンパク質を細胞懸濁液に添加し、凍結解凍を行うことで、凍結濃縮作用を起こし、細胞膜への複合体の吸着および、それに伴う細胞内への移行を確認した。そのときに、両性電解質高分子添加による凍結時の方が凍結濃縮度が高く、既存の保護物質であるジメチルスルホキシドとは機序が異なることが示唆される結果となった。本成果は、Nanoscale誌に掲載され、裏表紙イメージを飾った。

また、両性電解質高分子と膜の相互作用解析を進め、両性電解質高分子の新たな機能(外来物質の膜透過)を発見している。まず細胞サイズリポソーム表面へ両性電解質高分子が吸着することを確認した。そして、相分離させたりポソーム膜面への吸着実験により、流動的な相領域に高分子が選択的に分配さ

れることが分かった。さらに、高分子の存在下において、外部から加えた微粒子がリポソーム内へ透過する現象を見出した。

この微粒子の膜透過現象のメカニズムを理解するためのモデル系として、ポリマーフリーのリポソーム膜面上における微粒子の拡散および透過ダイナミクスを解析する実験を行った。顕微鏡像の画像解析から、粒子運動の平均二乗変位を測定し、拡散係数の粒子サイズ依存性を明らかにした。膜に包まれた高吸着状態の粒子は小さい拡散係数を示すことを発見した。さらに、膜張力を印加することで、吸着粒子が膜から切り離され内部に透過する現象を確認した。

さらに、膜張力に注目し様々な膜の物理現象を調査した。結果、膜張力を増加させることで、膜の融合現象 (Fusion および Hemifusion 状態) を見出した。膜内のコレステロール濃度および温度をパラメータとする相図を構築し、Fusion および Hemifusion に必要な膜張力条件を明らかにした。膜の融合・分裂現象は膜の物質透過および輸送機能に必須のプロセスであり、その物理化学メカニズムに膜張力が重要な寄与をすることが分かった。

また、膜とポリマーの主な相互作用は静電的なものであり、膜面内の脂質分子の分布状態である相分離構造に対する静電効果を理解することは重要な課題である。不飽和脂質と飽和脂質の混合膜の相分離に対する静電効果を理論モデルにより説明した。膜厚をパラメータとするランダウ型自由エネルギーを相分離の自由エネルギーと組み合わせ、相図を構築した。そして、温度や水溶液中の塩濃度に対する依存性を明らかにした。これらの膜の基礎物性に関する研究成果は、今後の高分子と膜の相互作用を設計するためのベースとなる。

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7件)

1. Y. Suzuki, K. H. Nagai, A. Zinchenko, T. Hamada, Photo-induced fusion of lipid bilayer membranes, *Langmuir*, 査読有り, Vol.33(2017), pp.2671-2676, doi: 10.1021/acs.langmuir.7b00448
2. E. Das, K. Matsumura, Tunable phase-separation behavior of thermoresponsive polyampholytes through molecular design, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.*, 査読有り, Vol.55(2017), pp.876-884, doi: 10.1002/pola.28440
3. K. Shigyou, K. H. Nagai, T. Hamada,

Lateral diffusion of a submicron particle on a lipid bilayer membrane, *Langmuir*, 査読有り, Vol.32(2016), pp.13771-13777, doi:10.1021/acs.langmuir.6b02448

4. N. Shimokawa, H. Himeno, T. Hamada, M. Takagi, S. Komura, D. Andelman, Phase Diagrams and Ordering in Charged Membranes: Binary Mixtures of Charged and Neutral Lipids, *J. Phys. Chem. B*, 査読有り, Vol.120(2016), pp. 6358-6367, doi:10.1021/acs.jpccb.6b03102
5. S. Kawasaki, T. Muraoka, T. Hamada, K. Shigyou, F. Nagatsugi, K. Kinbara, Synthesis and Thermal Responses of Polygonal Poly (ethylene glycol) Analogues, *Chemistry-An Asian Journal*, 査読有り, Vol.11(2016), pp. 1028-1035, doi:10.1002/asia.201501381
6. R. Rajan, F. Nagashima, K. Matsumura, Towards a Molecular Understanding of the Mechanism of Cryopreservation by Polyampholytes: Cell Membrane Interactions and Hydrophobicity, *Biomacromolecules*, 査読有り, Vol.17(2016), pp 1882-1893, doi: 10.1021/acs.biomac.6b00343
7. S. Ahmed, S. Fujita, K. Matsumura, Enhanced Protein Internalization and Efficient Endosomal Escape Using Polyampholyte-Modified Liposomes and Freeze Concentration, *Nanoscale*, 査読有り, Vol.8(2016), pp.15888-15901, doi:10.1039/C6NR03940E

[学会発表](計5件)

1. 瀧田勉, 人工細胞モデルの構築と動態制御, 分子系の複合電子機能第181委員会第25回研究会, 2016/12/02, 東京大学本郷キャンパス(東京都・文京区)
2. 瀧田勉, 人工細胞モデルから探る膜と粒子の相互作用メカニズム, 2016/11/17, 名古屋市立大学大学院薬学研究科(愛知県・名古屋市)
3. 瀧田勉, 細胞サイズ空間で創発する膜とコロイドの動的カップリング, 2016/09/22, 北海道教育大学 旭川校(北海道・旭川市)
4. S. Ahmed, K. Matsumura, Exploring the intracellular pathways of lysozyme protein using polyampholyte modified liposomes and freeze concentration

method, 2016/05/18-2016/05/22, 10th
WBC, Montreal (America)

5. R. Rajan, K. Matsumura, Development of Structurally Analogous Cryoprotective Synthetic Polyampholytes and Elucidation of Mechanism, 27th European Conference on Biomaterials(ESB2015), 2015/08/30-2015/09/03, Krakow(Poland)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱田 勉 (HAMADA TSUTOMU)
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技
術研究科・准教授
研究者番号：40432140

(2)研究分担者

松村 和明 (MATSUMURA KAZUAKI)
北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技
術研究科・准教授
研究者番号：00432328

(3)連携研究者

(4)研究協力者