

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05558

研究課題名(和文) ナノディスクテクノロジーを凌駕する新規含フッ素リン脂質平面膜の創製

研究課題名(英文) Development of partially fluorinated phospholipid bilayer membrane

研究代表者

園山 正史 (Sonoyama, Masashi)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：40242242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：現代の生命科学における最も重要な研究対象の1つである膜タンパク質の構造や機能を解析するための基盤技術の1つとして、リン脂質の疎水鎖末端にフッ素原子を導入した新規部分フッ素化リン脂質の開発を行った。リン脂質二分子膜の構造や性質がフッ素原子導入量に大きく依存して顕著に変化すること、部分フッ素化リン脂質膜中においてもモデル膜タンパク質が天然状態に類似した構造や働きを有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Novel partially fluorinated phospholipids have been developed for structural and functional analysis of membrane proteins in vitro. The partially fluorinated phospholipids showed membrane properties and structure significantly different from the corresponding unfluorinated ones. And it has been demonstrated that a model membrane protein in the partially fluorinated phospholipid bilayer adopts natively like structure and function.

研究分野：生体分子科学

キーワード：リン脂質 作用 フッ素化 膜タンパク質 パーフルオロアルキル基 脂質二分子膜 タンパク質-脂質相互

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は現代の生命科学における最も重要な研究対象の1つであるにもかかわらず、*in vitro*における実験上の様々な困難のために、構造や機能に関する情報が十分に得られているものは、水溶性タンパク質に比べて圧倒的に少ない状況である。この状況を克服するための1つの基盤技術として、膜タンパク質を失活することなく再構成し、種々の物理化学的および生化学的手法による膜タンパク質の解析を可能とする新たな脂質分子集合体の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

アルキル鎖の全水素原子をフッ素原子に置換したパーフルオロアルキル (Rf) 基を疎水鎖末端に導入した両親媒性分子が際立った性質を示すことが、近年明らかになりつつある。そこで本研究では、*in vitro*における膜タンパク質の構造・機能解析を行うための新たな脂質分子集合体に資する脂質分子として、Rf 基を疎水鎖末端に導入した部分フッ素化リン脂質アナログ分子群を開発することを第一の目的とした。また、部分フッ素化脂質からなる二分子膜の物性・構造を種々の物理化学的計測法により調べることを第二の目的とした。さらに、既存の有用な脂質分子集合体の1つであるナノディスクとの比較を念頭に、再構成したモデル膜タンパク質の高次構造や熱安定性、機能発現機構の解析から、脂質分子の部分フッ素化が膜タンパク質の構造・機能に及ぼす効果を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 生体内に多く見られる C16 のアシル鎖をもつ Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を基本構造とする部分フッ素化アナログ分子群 (Fn-DPPC, 下図) のグラムスケールでの合成を行った。具体的には先ず高木らの方法に従い、パーフルオロアルキルアイオダイドと ω -不飽和アルカノールからラジカル付加反応により合成した部分フッ素化パルミチン酸アナログ分子を、グリセロホスホコリンに DCC-DMAP エステル化させることにより、部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC を合成した。

(2) 得られた部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC の懸濁液を調製し、示差走査熱量測定 (DSC) により脂質二分子膜の熱物性を調べた。また、脂質二分子膜の構造を調べるために、高エネルギー物理学研究機構のフォトンファクトリーにおいて、放射光を用いた X 線回折実験を行った。

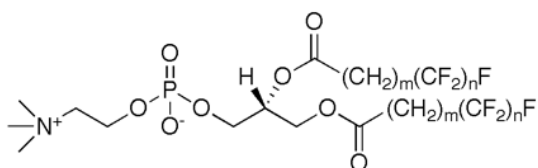


図. DPPC の部分フッ素化アナログ分子群 (Fn-DPPC) の化学構造 ($n+m=15$, $n=4,6,8$)

(3) 部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC からなる二分子膜の膜タンパク質機能場としての性質を探るために、膜タンパク質再構成実験を行った。膜タンパク質再構成法は、既報に従った。また再構成した膜タンパク質の構造と機能については、それぞれ円二色性 (CD) およびレーザーフラッシュホトリシスを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) グリセロホスホコリンに部分フッ素化パルミチン酸アナログ分子群を DCC-DMAP エステル化させる、ステップ数を大幅に削減した合成法を用いることにより、グラムスケールでの Fn-DPPC の合成を行った。その結果、F4-DPPC および F6-DPPC では、約 30% の収率で部分フッ素化リン脂質が得られた。しかしながら、この合成法では F8-DPPC は十分な量を得ることができなかったため、高木らが考案した、グリセロールを用いた従来のホスファチジルコリン合成法を用いて合成を行ったところ、他の部分フッ素化リン脂質と同じレベルの収率で十分な試料量の F8-DPPC が得られた。

(2) $n=4,6,8$ のそれぞれの脂質膜懸濁液のゲル-液晶相転移挙動を、DSC により調べた。その結果、炭化水素鎖のみからなる DPPC に比べて、F4-DPPC ではゲル-液晶相転移温度 (T_m) が 20 °C 近く低下した。ところが Rf 基を伸長した F6-DPPC の T_m は F4-DPPC に比べて大きく上昇し、DPPC よりわずかに低いことがわかった。さらに長い Rf 基を導入した F8-DPPC は著しく高い T_m を示した。このような T_m の際だった Rf 鎖長依存性は、部分フッ素化 Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) アナログ分子群の脂質膜懸濁液において観測されたものに極めて類似しており、部分フッ素化リン脂質が示す興味深い性質であると考えられる。

DSC 測定から得られたゲル-液晶相転移の熱力学量を比較したところ、転移エンタルピーおよび転移エントロピーについて、F4-DPPC は DPPC よりも大きな値を示すのに対し、F6-DPPC および F8-DPPC ではいずれも小さな値となった。これらの特徴は、長い Rf 基が剛直ならせん構造を形成し、短い Rf では平面ジグザグ構造をとることと深く関係していると推測される。

(3) Fn-DPPC 二分子膜の構造解析を行うため、放射光 X 線回折測定を行った。いずれの部分フッ素化リン脂質においても、広角領域では、DSC の測定から得られた T_m よりも低い温度ではアシル鎖のパッキング由来の微細構造を有する回折ピークが見られたのに対し、 T_m より高温側では 1 本のブロードなピークに変化した。これらの回折ピークの温度変化は、DSC から求めた T_m がゲル-液晶相転移温度であることを示している。

いずれの Fn-DPPC においても、小角領域には十分に高次の回折ピークを測定することができた。求められた電子密度分布から Fn-DPPC 二分子膜モデルを構築した結果、長い Rf 鎖長を有する部分フッ素化リン脂質では、脂質二分子膜内部のアシル鎖の構造が、Rf 基が短い場合に比べて大きく異なることがわかった。今後構造モデルを精密化し、さらに詳細に検討することにより、DSC 測定から明らかになった部分フッ素化リン脂質二分子膜の際だった Rf 鎖長依存性の起源が明らかになると期待される。

(4) 膜タンパク質機能場としての部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC 二分子膜の性質を探るために、脂質膜への膜タンパク質再構成実験を行った。膜タンパク質については、先ずこれまでに非フッ素化リン脂質において十分な知見のあるバクテリオロドプシン (bR) を用いた。DPPC と同様の方法で bR の再構成を試みたところ、十分に高い収率で再構成試料が得られた。得られた再構成 bR の高次構造を円二色性 (CD) スペクトルにより調べた結果、天然紫膜中で形成されている bR 三量体に由来する可視 CD パターンが観測された。また、光機能中間体の挙動を調べるために、可視光励起のレーザーフラッシュホトリシス実験を行った。その結果、Fn-DPPC 膜中の bR は天然紫膜類似の光サイクルを有することがわかった。以上の結果から、部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC からなる脂質二分子膜は、膜タンパク質の機能発現の場として有用であり、*in vitro* における膜タンパク質の構造・機能解析を可能とする基盤技術の 1 つになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. T. Shimoaka, M. Sonoyama, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, T. Hasegawa, Study of Perfluoroalkyl Chain-Specific Band Shift in Infrared Spectra on the Chain Length, *Journal of Physical Chemistry A*, 121(44), 8425-8431, 2017, 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpca.7b08940
2. Y. Yokoyama, H. Tanaka Hikaru, S. Yano, H. Takahashi, T. Kikukawa, M. Sonoyama, K. Takenaka, Spontaneous Stacking of Purple Membranes during Immobilization with Physical Cross-linked Poly(vinyl alcohol) Hydrogel with Retaining Native-like Functionality of Bacteriorhodopsin, *J. Appl. Phys.* 204701, 2017, 査読有
DOI: 10.1063/1.4984070
3. Y. Okamoto, T. Morita, T. Takagi, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, R. Tero, Lateral Diffusion and Molecular Interaction in a Bilayer Membrane Consisting of Partially

Fluorinated Phospholipids, *Langmuir*, 32(41), 10712-10718, 2016, 査読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02874

4. S. Kawatake, Y. Umekawa, S. Matsuoka, M. Murata, M. Sonoyama, Evaluation of Diacylphospholipids as Boundary Lipids for Bacteriorhodopsin from Structural and Functional Aspects, *Biochim. Biophys. Acta*, 1858(9), 2106-2115, 2016, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.06.006
5. T. Shimoaka, Y. Tanaka, N. Shioya, K. Morita, M. Sonoyama, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, T. Hasegawa, Surface Properties of a Single Perfluoroalkyl Group on Water Surfaces Studied by Surface Potential Measurements, *J. Colloid Interface. Sci.*, 483, 353-359, 2016, 査読有
DOI: 10.1016/j.jcis.2016.08.055
6. 園山正史, 膜タンパク質研究への展開をめざした部分フッ素化リン脂質膜の開発, *オレオサイエンス*, 16(3), 137-143, 2016, 査読有
<http://www.jocs-office.or.jp/mokuji/somokuji2016.pdf>

〔学会発表〕(計 25 件)

1. 柳瑠美, 高橋浩, 茂木俊憲, 高木俊之, 網井秀樹, 長谷川健, 金森俊之, 園山正史, 第 7 回日本生物物理学会関東支部会, 東京都, 2018/03/13
2. M. Sonoyama, Membrane Properties of Partially Fluorinated Amphiphilic Molecules with Different Perfluoroalkyl Chain Lengths, Gunma International Symposium 2018(招待講演)(国際学会), 群馬県, 2018/01/18
3. T. Yanagi, H. Takahashi, T. Motegi, T. Takagi, H. Amii, T. Hasegawa, T. Kanamori M. Sonoyama, Thermotropic Phase Transition Behavior of Partially Fluorinated Dipalmitoylphosphatidylcholines Thermotropic Phase Transition Behavior of Partially Fluorinated Dipalmitoylphosphatidylcholines, Gunma International Symposium 2018(国際学会), 群馬県, 2018/01/17
4. 柳瑠美, 茂木俊憲, 高橋浩, 高木俊之, 網井秀樹, 長谷川健, 金森敏幸, 園山正史, 部分フッ素化ジパルミトイルホスファチジルコリンのパーフルオロアルキル鎖長に依存した脂質二分子膜の構造と相転移挙動, 第 40 回フッ素化学討論会, 鳥取県, 2017/11/14
5. 園山正史, パーフルオロアルキル基を疎

- 水鎖末端に導入した部分フッ素化リン脂質ライブラリーの開発と *in vitro* 膜タンパク質研究への展開, フルオラス科学研究会第 10 回シンポジウム(招待講演), 東京都, 2017/10/13
- 田丸翠允, 茂木俊憲, 園山正史, 蛍光プローブの回転運動に基づいた部分フッ素化リン脂質二重膜の局所的流動性の評価, 第 68 回コロイドおよび界面化学討論会, 兵庫県, 2017/09/07
 - 柳瑤美, 堀越未希, 茂木俊憲, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 長谷川健, 金森敏幸, 園山正史, 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, 第 44 回生体分子科学討論会, 秋田県, 2017/06/23
 - 園山正史, 吉野賢, 橋本麻美, 茂木俊憲, 菊川峰志, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 金森敏幸, 部分フッ素化リン脂質を用いた *in vitro* 膜タンパク質研究の展開, 日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会, 北海道, 2017/06/08
 - 園山正史, 部分フッ素化リン脂質の *fluorophilic effect* を利用した *in vitro* 膜タンパク質研究の展開, 日本薬学会第 137 年会(招待講演), 宮城県, 2017/03/25
 - 柳瑤美, 茂木俊憲, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 金森敏幸, 園山正史, 部分フッ素化ジパルミトイルホスファチジルコリンの膜物性におけるパーフルオロアルキル鎖長依存性, 日本化学会第 97 春季年会, 神奈川県, 2017/03/18
 - M. Horikoshi, K. Morita, T. Motegi, H. Takahashi, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, M. Sonoyama, Mixing Behaviors in the Binary Membrane of DMPC and Its Partially Fluorinated Analogues with Different Perfluoroalkyl Chain Lengths, 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(BSJ2016), 茨城県, 2016/11/26
 - M. Hashimoto, Y. Murai, M. Yoshino, K. Morita, T. Kikukawa, T. Takagi, H. Takahashi, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, Structural Stability of Bacteriorhodopsin in Partially Fluorinated Analogs of DMPC with Different Perfluoroalkyl Chain Lengths, 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(BSJ2016), 茨城県, 2016/11/26
 - T. Motegi, R. Tero, T. Takagi, H. Takahashi, H. Amii, T. Kanamori, M. Sonoyama, Investigation of Fluorescence Emission from Dye-lipid in Partially Fluorinated Lipid Bilayer, 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(BSJ2016), 茨城県, 2016/11/25
 - M. Sonoyama, Preferential Localization of Bacteriorhodopsin in Binary Lipid Bilayer Composed of Dimyristoylphosphatidylcholine and Its Partially Fluorinated Analog, 13th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2016)(招待講演)(国際学会), 宮城県, 2016/10/11
 - 吉野賢, 橋本麻美, 村井裕佳, 森田康平, 柳瑤美, 茂木俊憲, 菊川峰志, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 長谷川健, 金森敏幸, 園山正史, 新規部分フッ素化リン脂質ライブラリーの構築: 膜タンパク質バクテリオロドプシン研究への応用, 第 39 回フッ素化学討論会, 佐賀県, 2016/09/30
 - 柳瑤美, 茂木俊憲, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 金森敏幸, 園山正史, 新規部分フッ素化リン脂質ライブラリーの構築: 二本鎖脂質の熱物性におけるパーフルオロアルキル鎖長依存性, 第 39 回フッ素化学討論会, 佐賀県, 2016/09/30
 - 園山正史, パーフルオロアルキル基を含むリン脂質を用いた *in vitro* 膜タンパク質研究の展開, 第 16 回日本蛋白質科学会年会(招待講演), 福岡県, 2016/06/07
 - 柳瑤美, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 金森敏幸, 園山正史, アシル鎖末端をパーフルオロアルキル基で置換した部分フッ素化ジパルミトイルホスファチジルコリンの合成と膜物性の解析, 日本化学会第 96 春季年会, 京都府, 2016/03/27
 - M. Sonoyama, M. Yoshino, K. Morita, K. Kanayama, Y. Murai, M. Hashimoto, M. Horikoshi, H. Takahashi, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, T. Kikukawa, Development of Partially Fluorinated Phospholipids: Physicochemical Characterization of Lipid Bilayer and Reconstituted Membrane Protein Bacteriorhodopsin, The 5th International Conference on Element Innovation (国際学会), 群馬県, 2015/11/30
 - M. Sonoyama, Structural and Functional Properties of Membrane Protein Bacteriorhodopsin in Partially Fluorinated Phospholipid Bilayer, The Twelfth

International Conference on Flow Dynamics(招待講演), 宮城県, 2015/10/27

21. 橋本麻美, 村井裕佳, 森田康平, 高橋浩, 網井秀樹, 菊川峰志, 高木俊之, 金森敏幸, 園山正史, 疎水鎖末端をパーフルオロアルキル基に置換した DMPC 脂質二分子膜中の膜タンパク質の構造・機能・安定性 1. パーフルオロアルキル基によるバクテリオロドプシンの安定化, 第 9 回分子科学討論会, 東京, 2015/09/18
22. 堀越未希, 吉野賢, 金山賢治, 森田康平, 高橋浩, 網井秀樹, 菊川峰志, 高木俊之, 金森敏幸, 園山正史, 疎水鎖末端をパーフルオロアルキル基に置換した DMPC 脂質二分子膜中の膜タンパク質の構造・機能・安定性 2. DMPC を含む二成分系混合膜におけるバクテリオロドプシンの分配挙動, 第 9 回分子科学討論会, 東京, 2015/09/18
23. M. Sonoyama, Development of Novel Partially Fluorinated Phospholipid Membrane for Biophysical Studies of Membrane Proteins, 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(BSJ2015) (招待講演), 石川県, 2015/09/14
24. 園山正史, 部分フッ素化リン脂質ライブラリーの開発~膜タンパク質の構造・機能解析への応用を目指して~, 第 39 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(招待講演), 大分県, 2015/09/10
25. 園山正史, 吉野賢, 村井裕佳, 森田康平, 菊川峰志, 高木俊之, 高橋浩, 網井秀樹, 金森敏幸, 膜タンパク質研究のための部分フッ素化リン脂質ライブラリーの開発, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取県, 2015/06/26

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

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

○取得状況 (計 0 件)

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

[その他]

<http://biomolsci.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園山 正史 (SONOYAMA, Masashi)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号 : 4 0 2 4 2 2 4 2

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし