

令和 2 年 12 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07883

研究課題名(和文) 膜タンパク質再構成マトリックスにおける部分フッ素化蛍光色素の開発

研究課題名(英文) Development of fluorinated fluorescent probes for membrane protein reconstitution matrices

研究代表者

高木 俊之 (Takagi, Toshiyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ分野における膜タンパク質-人工脂質複合型バイオセンサ開発の一環としてフッ素化や擬環状化した人工脂質を開発している。膜タンパク質再構成マトリックス材料としての最適な部分フッ素化人工脂質を開発するには、膜タンパク質再構成に必要な膜流動性情報、すなわち、部分フッ素化人工脂質から成る分子集合体(二分子膜)のバルク物性を得ることが最も重要である。そこで、部分フッ素化人工脂質膜物性評価に特化した蛍光色素の設計および合成を行い、新規な蛍光色素の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜や細胞内膜系に存在する膜タンパク質は、膜を隔てた物質輸送やエネルギー生産・変換等の分子認識機能以外に高次の機能も有しており、創薬分野における標的タンパク質としてのみならず、バイオリアクタ等バイオデバイスとしての産業利用が広く検討されている。膜タンパク質の利用を図るには、その機能を低下させることなく化学的・物理的に安定な疎水性脂質環境が必要であり、高疎水・疎油性である部分フッ素化脂質の有用性を評価する技術のひとつを提案した。

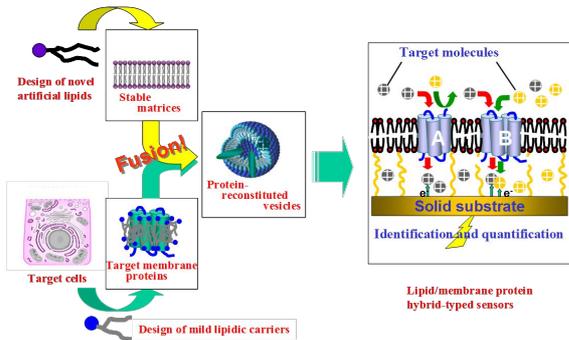
研究成果の概要(英文)：Organofluorine compounds have considerable much attention in the field of medicinal and agricultural chemistry from the view of point of their unique characteristics such as thermal and chemical stability, surface tension lowering ability, hydrophobicity and lipophobicity. We are engaged in developing partially fluorinated phospholipid membranes as membrane protein reconstitution matrices toward ultra-thin film typed biosensors. As an extension of these researches, we prepared new fluorinated fluorescent probes, and found that the lateral diffusivity in the fluorinated phospholipids bilayers observed with the probes was enough to exhibit suitable fluidity for membrane protein reconstitutions.

研究分野：有機フッ素化学

キーワード：フッ素 蛍光色素 人工脂質 二分子膜 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面における分子認識プロセスを模倣した「人工脂質/膜タンパク質から成る薄膜型センサ開発」を目指している。薄膜型センサは優れた分子認識能力、好感度、高速応答性などの特徴を有している。センサ構築のための技術課題としては脂質膜の機械的強度向上、膜タンパク質の長期機能保持、ファウリング対策などが挙げられる。人工脂質の特徴は、分子設計が容易なため、多様なライブラリーを構築できることにあり、生体脂質やその部分修飾のみならず、生体には存在しない全く新しい機能を賦与した脂質の提案も可能となる。



人工脂質/膜タンパク質から成る薄膜型センサ開発スキーム

フッ素原子はそのサイズが水素原子に次いで小さく、電気陰性度が全原子中で最大、フッ素-炭素結合エネルギーが大きい(水素-炭素結合エネルギーの約 1.2 倍)などの特徴を有している。フッ素が導入された化合物は耐熱性・耐薬品性・耐酸化性などを示し、他の原子にないユニークな物理的・化学的特徴を有することから医薬・農薬・工業の分野において非常に幅広く利用されている。

バイオ材料としてのフッ素化界面活性剤は、非フッ素化界面活性剤(天然物を含む)に比べて化学的・界面化学的に安定で、リポソーム膜としては著しい低透過性と長期血中循環性を示し、リポソーム型ドラッグデリバリーシステム(DDS)において有望な材料とされている。その主体であるペルフルオロアルキル鎖は高い疎水性のみならず、生体分子との相互作用も乏しいため、膜タンパク質の構造・機能への侵襲性が低い基材になり得ると考えられ、膜タンパク質の可溶化・再構成基材としての利用、さらにはリポソーム膜への機能賦与やタンパク質二次元結晶場などへの応用が期待される。

フッ素化界面活性剤として部分フッ素化脂質に着目し、その特長と実用上の問題を踏まえ、部分フッ素化リン脂質を用いた膜タンパク質再構成基材、さらにその展開として部分フッ素化リン脂質-膜タンパク質複合型バイオセンサの構築基材を提案することを目標に種々の部分フッ素化脂質の設計および合成とその膜特性について検討している。

## 2. 研究の目的

脂質へのフッ素導入は脂質膜の物理的および化学的な強度を増すための有効な手段と位置付け、フッ素の持つ撥水性が水溶液中での強固な集合体構築に寄与すると考えている。さらにフッ素化脂質への生体親和性の賦与は最も重要であるが、生体親和性は主に親水部に寄ること、フッ素導入した脂質はフッ素の原子径が水素原子とほぼ同じこと、から生体親和性が失われていないものと考えている。

一般にペルフルオロアルキル化合物におけるペルフルオロアルキル鎖は疎水性が高く剛直で炭化水素鎖との相互作用に乏しい。また、ペルフルオロアルキル鎖の内部回転障害により結晶質になり易いことが知られている。炭化水素系(天然)リン脂質の疎水鎖へのフッ素導入において、その導入量によっては機械的安定性が向上しながらも、扱い難い剛直な脂質/水集合構造を形成し、リポソームへの応用に対して分子設計上の制限が生じる可能性がある。

膜タンパク質再構成基材としての利用を想定していることから、生体膜脂質と同程度の疎水鎖長を有するリン脂質へのフッ素導入に関する検討を行い、種々の膜物性評価から最適な部分フッ素化リン脂質を見出すことを目的としている。

最適な人工脂質・膜タンパク質複合体構築に向けた高配向秩序で適度な膜流動性を有する人工脂質膜を創製するため、部分フッ素化人工脂質から成る分子集合体(二分子膜)の基盤情報(膜流動性)を取得すべく新規な部分フッ素化蛍光色素を開発する。

## 3. 研究の方法

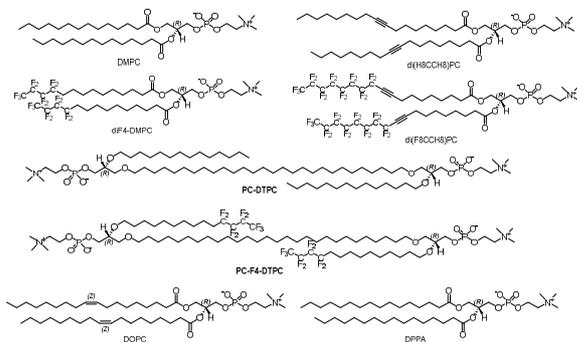
炭化水素系リン脂質および部分フッ素化リン脂質を購入または合成し、それらの二分子膜を作製し、膜物性評価(示差走査熱量測定、顕微鏡観察、X線回折、蛍光プローブ観察など)を行った。また、新規に設計・合成した蛍光プローブによる評価も併せて行った。

リポソーム膜調製は、ナスフラスコに目的の脂質を入れ、クロロホルムに溶解後、エバポレーターによりクロロホルムを留去させ脂質フィルムを作製後、引き続き下記操作により脂質懸濁液を作製した。

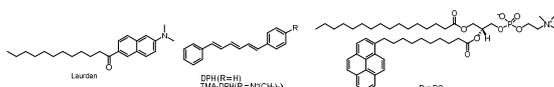
- 脂質/ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)(95:5)混合薄膜を 10 mM MOPS 緩衝液(pH 7.0)により水和膨潤させ、続く凍結脱気処理(液体窒素/40、5回繰り返す)により調製した。

- 脂質に 100 mM になるように MilliQ 水を加え、ボルテックスミキサーにより懸濁させた後、30 で 1 時間超音波処理することによって調整した。

## ・各種脂質



## ・各種蛍光プローブ



リン脂質/水二成分系の相構造を偏光顕微鏡観察により決定した。

示差走査熱量 (SEIKO DSC-6100, 昇温速度 1 /min) 測定により得られるゲル液晶相転移から転移エンタルピー ( $\Delta H$ ) および転移エントロピー ( $\Delta S$ ) を算出し、評価した。

脂質重量分率における相構造の各種寸法 (ラメラ構造の場合、膜厚、層間水厚、分子専有面積など) は、相平衡後 (~24 時間、 $25 \pm 1$  ) X 線回折 (Rigaku RAXIS-IV, 1.2 kW,  $\lambda$ : 0.1542 nm) 測定値から Luzzati 法により算出し、評価した。

リン脂質二分子膜の膜内秩序性および流動性の評価は、各種蛍光プローブをリポソーム膜に標識 (脂質 : 蛍光プローブ = 250:1~500:1 (mol/mol) の比率) することにより、膜内配向秩序性の指標である定常蛍光異方性 ( $\lambda_{ex}$ : 360 nm,  $\lambda_{em}$ : 430 nm) および膜内側方拡散性の指標である excimer/monomer の蛍光強度比  $I_E/I_M$  ( $\lambda_{ex}$ : 350 nm,  $\lambda_{em}$ : 370 nm ( $I_M$   $\lambda$ : 412 nm ( $I_E$ ))) を測定した。

## 4. 研究成果

これまでに開発した人工脂質の物性測定から、フッ素化および擬環状化により脂質膜の安定性を向上することが分かり、さらに膜タンパク質の再構成膜として必要な流動性を損失させていないことも分かった。流動性評価において、本研究にて開発した部分フッ素化蛍光色素も十分に利用できることが分かり、部分フッ素化人工脂質膜の評価系を確立することが出来た。

疎水鎖内に三重結合を有するリン脂質は気水界面で液体膨張単分子膜を形成し、フッ素導入量の増加に伴い安定性も向上する。ま

た、リン脂質/水系の構造特定として、飽和リン脂質では室温域にて剛直なラメラ結晶を形成するにもかかわらず、三重結合を有するリン脂質ではラメラ液晶を形成し、ミエリン形やベシクルのような柔構造を室温域で生成することが分かり、膜タンパク質の再構成上非常に有望であると言える。

ペルフルオロブチル基を有するジミリストイルホスファチジルコリン (diF4-DMPC) は、非フッ素化のジミリストイルホスファチジルコリンよりゲル液晶相転移温度が低くなる。しかしながら、転移エンタルピーは大きい。また、ペルフルオロオクチル基を有するジミリストイルホスファチジルコリン (diF8-DMPC) のゲル液晶相転移温度はジミリストイルホスファチジルコリンより高い結果を得た。ペルフルオロアルキル鎖同士の間隔がペルフルオロアルキル鎖長と密接に関係していると考えている。これらペルフルオロ化合物のバルク物性は、長谷川らが提唱 (*ChemPlusChem*, 2014, **79**, 1421-1425) した多層双極子アレー (Stratified Dipole-Arrays, SDA) モデルを基に考察することで説明が可能である。

三重結合を有するフッ素化 (ペルフルオロオクチル基含有) および非フッ素化リン脂質は低含水率領域 (水重量分率 0.1 以下) では逆ヘキサゴナル液晶となるが、過剰水存在下では、三重結合を有するフッ素化リン脂質は非フッ素化リン脂質よりも極性基近傍における水和量が約 40% 大きい。過剰水存在下での三重結合を有するフッ素化リン脂質は、非フッ素化リン脂質よりも分子専有面積が大きく、膜疎水領域中心に局在するペルフルオロアルキル鎖が膜内パッキングを支配していることを示唆した。また、三重結合を有するフッ素化リン脂質は、フッ素化脂質特性の安定性に加え、室温で容易に流動性ある液晶膜を形成する。従って、三重結合の導入は、フッ素化および非フッ素化リン脂質共に流動性あるラメラ液晶を形成し、容易にリポソームに転換するが、フッ素化リン脂質の水和膨潤性は低いことが認められた。しかし、膜内分子面積は大きく、よって平衡水和量自体は高かった。二重結合の代わりに三重結合の導入やフッ素化したリン脂質は、リポソーム膜基材としてドラッグデリバリーシステム分野への利用や膜タンパク質の再構成基材として有望であると期待できる。

リポソーム膜に標識した蛍光プローブの蛍光異方性測定からは 5~60 の範囲で三重結合を有するフッ素化および非フッ素化リン脂質は共に相転移が認められず、この範囲でのラメラ液晶相は安定と言える。一方、膜内配向秩序性は三重結合を有する非フッ素化リン脂質が通常の液晶相リン脂質膜と同程度に対し、フッ素化リン脂質は結晶相リン

脂質膜に匹敵する程度に高い。また、excimer/monomer 蛍光強度比からは、10~50 の範囲で三重結合を有する非フッ素化リン脂質膜は二重結合を有するジオレオイルホスファチジルコリン膜と同程度の高い側方拡散性(流動性)を示した。一方、三重結合を有するフッ素化リン脂質膜は、蛍光プローブから得られたゲル膜の様相とは異なり、低いながらも有る程度の流動性を示すことが認められた。非フッ素化のリン脂質膜内に比べ、フッ素化リン脂質膜内の配向秩序性は液晶膜としては著しく高が、側方拡散性は低い。しかしながら、膜タンパク質再構成に必要な流動性を有していることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3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. 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
  3. T. Shimoaka, Y. Tanaka, N. Shioya, K. Morita, M. Sonoyama, H. Amii, T. Takagi, T. Kanamori, T. Hasegawa, Surface properties of a sigle perfluoroalkyl group on water surfaces studies by surface potential measurements, *Journal of Colloid Interface Science*, 483, 353-359, 2016, 査読有  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.08.055>
- ### 〔学会発表〕(計30件)
1. 下赤 卓史、園山 正史、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、ラマン分光法によるパーフルオロアルキル鎖のねじれ構造解析、日本化学会第 98 春季年会、千葉県、2018/3/23
  2. 田丸 翠允、茂木 俊憲、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、園山 正史、部分フッ素化脂質膜中蛍光プローブの運動性と膜構造との関連、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2017、群馬県、2017/12/7
  3. 柳 瑶美、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熱的相転移：パーフルオロアルキル鎖長が脂質二分子膜の構造に与える影響、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2017、群馬県、2017/12/7
  4. 宮崎 真哉、土田 直之、茂木 俊憲、菊川 峰志、高木 俊之、高橋 浩、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、エーテル型部分フッ素化リン脂質膜中に再構成した膜タンパク質バクテリオロドプシンの吸収波長と構造の変化、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2017、群馬県、2017/12/7
  5. 黄瀬 隆磨、塩谷 暢貴、下赤 卓史、森田 康平、園山 正史、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、枝 和男、長谷川 健、フッ素系自己組織化単分子膜の構造が表面撥水性に与える影響、第 40 回フッ素化学討論会、鳥取県、2017/11/14
  6. 柳 瑶美、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
  7. 柳 瑶美、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
  8. 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
  9. 柳 瑶美、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
  10. 黄瀬 隆磨、塩谷 暢貴、下赤 卓史、森田 康平、網井 秀樹、園山 正史、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、部分フッ素化ミスチン酸単分子膜の分子パッキングが表面撥水性に与える影響、日本化学会第 97 春季年会、神奈川県、2017/03/18

11. 下赤 卓史、園山 正史、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、パーフルオロアルキル化合物が示す鎖長に依存する CF 伸縮振動バンド特有のシフト、日本化学会第 97 春季年会、神奈川県、2017/03/17
12. 柳 瑶美、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のアシル鎖長変化が膜タンパク質バクテリオロドプシンの四次構造と光サイクルに与える影響、第 6 回日本生物物理学会関東支部会、東京都、2017/03/13
13. 柳 瑶美、高木 俊之、茂木 俊憲、高橋 浩、網井 秀樹、菊川 峰志、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アナログ分子群の合成と膜物性の解析、第 16 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、茨城県、2017/01/31
14. 宮崎 真哉、土田 直之、茂木 俊憲、高木 俊之、高橋 浩、菊川 峰志、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、エーテル型部分フッ素化リン脂質膜中において特異的にみられる膜タンパク質バクテリオロドプシンのサーモクロミズム、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2016、群馬県、2016/12/13
15. 柳 瑶美、高木 俊之、高橋 浩、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、長谷川 健、部分フッ素化ジパルミトイルホスファチジルコリンアナログ分子群の合成と膜物性の解析、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2016、群馬県、2016/12/13
16. 堀越 未希、森田 康平、茂木 俊憲、高木 俊之、高橋 浩、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、Mixing behaviors in the binary membrane of DMPC and its partially fluorinated analogues with different perfluoroalkyl chain lengths、第 54 回日本生物物理学会年会、茨城県、2016/11/26
17. 橋本 麻美、村井 裕佳、吉野 賢、森田 康平、菊川 峰志、高木 俊之、高橋 浩、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、Structural stability of bacteriorhodopsin in partially fluorinated analogs of DMPC with different perfluoroalkyl chain lengths、第 54 回日本生物物理学会年会、茨城県、2016/11/26
18. 宮崎 真哉、土田 直之、高木 俊之、茂木 俊憲、高橋 浩、菊川 峰志、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、Thermochromism of bacteriorhodopsin partially fluorinated di-o-tetradecylphosphocholine vesicles、第 54 回日本生物物理学会年会、茨城県、2016/11/26
19. 下赤 卓史、田中 悠基、森田 康平、園山 正史、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、単一のパーフルオロアルキル基が示す界面物性、第 39 回フッ素化学討論会、佐賀県、2016/09/30
20. 柳 瑶美、茂木 俊憲、高橋 浩、網井 秀樹、菊川 峰志、高木 俊之、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、2016/09/29
21. 黄瀬 隆磨、下赤 卓史、森田 康平、園山 正史、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、部分フッ素化ミリスチン酸の分子凝集に与えるカドミウムイオン添加の影響、第 39 回フッ素化学討論会、佐賀県、2016/09/29
22. 下赤 卓史、泉 直毅、田中 悠基、園山 正史、網井 秀樹、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、パーフルオロアルキル鎖特有の連成振動を考慮したラマンバンドの帰属、第 39 回フッ素化学討論会、佐賀県、2016/09/29
23. 柳 瑶美、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
24. 長谷川 健、下赤 卓史、田中 悠基、森田 康平、園山 正史、高木 俊之、金森 敏幸、Physical Characters of Perfluoroalkyl Group Induced by Dipole Moment、第 25 回日本 MRS 年次大会、神奈川県、2015/12/08
25. 柳 瑶美、橋本 麻美、高木 俊之、高橋 浩、菊川 峰志、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、パーフルオロブチル基を導入したジアシルホスファチジルコリンの膜物性と再構成バクテリオロドプシンの構造・光サイクルに対するアシル鎖長の影響、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2015、群馬県、2015/12/05
26. 橋本 麻美、村井 裕佳、吉野 賢、森田 康平、菊川 峰志、高木 俊之、高橋 浩、網井 秀樹、金森 敏幸、園山 正史、アシル鎖末端を鎖長の異なるパーフルオロアルキル基に置換した DMPC アナログ脂質、日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会 2015、群馬県、2015/12/05

27. T. Moteji, T. Takagi, T. Kanamori, M. Sonoyama, R. Tero, Anomalous fluorescence emission at artificial lipid bilayer of partially fluorinated phosphatidylcholine, The Irago Conference 2015、愛知県、2015/10/23

研究者番号：10248065

(2)研究分担者  
( )

28. 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、疎水鎖末端をパーフルオロアルキル基に置換した DMPC 二分子膜のゲル-液晶転移挙動と構造、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、鹿児島県、2015/09/10

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

29. 田中 悠基、下赤 卓史、森田 康平、園山 正史、高木 俊之、金森 敏幸、長谷川 健、結晶相によるパーフルオロアルキル化合物の凝集構造の違い：Langmuir 膜の表面電位測定による解析、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、鹿児島県、2015/09/10

研究者番号：

30. 園山 正史、吉野 賢、村井 裕佳、森田 康平、高木 俊之、高橋 浩、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 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島県、2015/06/24

〔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：  
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)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・  
生命工学領域・創薬基盤研究部門・主任研究員