

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14204

研究課題名(和文)"膜ゆらぎ"クロマトグラフィーの創成

研究課題名(英文)Creation of Membrane Perturbation Chromatography

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム膜に不斉認識能に着目した新規な分離・分析手法を確立した。リポソーム膜表面におけるキラル認識能を誘導・制御するために、外部場(交流電場など)を用いて不斉炭素周辺におけるナノ秩序領域における多点相互作用(例 疎水性相互作用、静電相互作用、水素結合)を制御する手法を確立した。同時に、デザインしたリポソーム膜を包埋・固定化した担体あるいはそれから Inspired した自己組織化担体を開発し、外部場を用いてキラル認識能を高度制御する新規なクロマトグラフィー・電気泳動法に展開できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We have established a novel separation and/or analysis method based on chiral recognition function of liposome membrane. First, we developed the method to control the multiple interactions (via hydrophobic interaction, electrostatic interaction, hydrogen bonds) at the asymmetric carbon around the highly-ordered region on the liposome membrane surface by designing the membrane surface. Based on these results, we finally proposed a strategy to develop new types of chromatographic or electrophoretic techniques by utilizing the liposome-immobilized matrix or hierarchical support including self-assembled surface under the external control factors (i.e. heat, AC field etc.).

研究分野：Bio-Inspired化学工学

キーワード：自己組織系 キラル分離 クロマト担体 誘電緩和 リポソーム膜 アミノ酸 医薬品

1. 研究開始当初の背景

医薬品製造プロセスの成否を握るのは、光学分割である。化学的な合成戦略では、光学異性体が混合した「ラセミ混合物」として生成物が回収される場合が多い。従来のキラル分離手法としては、(a)異性体(や塩)の溶解度差を利用した分離(晶析・抽出・沈殿など)、(b)光学活性ポリマー(合成高分子、タンパク質など)を用いたクロマト分離・膜分離、(c)光学異性体を認識する包摂化合物(CD, Calix-arene など)を用いた修飾型分離などが報告されている。一般的な傾向として、対象分子にマッチした吸着点デザインを志向しているため、分子個別のケーススタディが多く、一般的方法論は確立されていないのが現状である(表1)。

リポソーム膜は、自身がキラルな両親媒性分子(リン脂質など)から成る分子集合体である。従来から、低分子量分子(アミノ酸、ペプチドなど)の光学異性体は、リポソーム膜への配向性が異なる事が報告されている。即ち、リポソームには「キラル認識能」がある。当研究 Gr.では、リポソーム膜によるアミノ酸分子や薬剤分子のL体の吸着分離方法について一連の成果を挙げている。リポソームの分子認識機構についても検討しており、特に、初期の「誘導過程」の重要性が明らかになってきた。例えば、アミノ酸分子の場合、リポソームは弱い相互作用を介して認識対象を膜界面に集積させる事で「膜ゆらぎ」を誘起して、膜表層を分子認識に適切な秩序構造に改変し、その結果、特定のアミノ酸が吸着(分子認識過程)する事が明らかになってきている。即ち、「分子認識のための「動的な」膜界面デザイン」がカギとなる(馬越, 内閣府 NEXT プログラム, GR066 (H.22-25))(図1)。

一方で、リポソーム膜の動的特性として、相転移・誘電緩和現象が知られている。当研究 Gr はリポソーム膜場における「分子配向」と「凝縮系分子集団のゆらぎ」(図2)との相関データを体系的に蓄積している。膜ゆらぎを誘導する交流電場を外部場として選択し、リポソーム膜を固定化したマイクロ流路で異なる振幅・周波数で外部場を制御する事で、溶液置換方向に対する「膜ゆらぎ勾配」を容易に形成する事が可能である。結果、全く新しい原理の「光学分割方法」を提案できる。

表1 既存のキラル分離・分析の動向

キラル分離方法	分離原理	利点	欠点
ガスクロマトグラフィー		・高理論板 ・揮発性物質の分離	・対象が限定 ・分取に不向き
液体クロマトグラフィー	キラル固定相(生体由来ポリマー、タンパク質、低分子キラル化合物)	・高理論板/高分解能 ・多数の孔用ツール	・残留溶媒 ・スケールアップに難 ・特殊固定相層が必要
超臨界クロマトグラフィー		・高分解能 ・残留溶媒少ない	・特殊操作が必要 ・連続操作に不向き
イムノアフィニティー抽出	抗体による認識	・高選択性 ・前後プロセス簡略化	・抗体の個別設計が必要 ・コスト・溶離の煩雑さ
キャピラリー電気泳動	CDによる認識	・高分解能 ・分析ツールとして最適	・CD除去 ・対象が限定
キラル分離膜	キラル固定膜素材	・操作性の高さ(迅速分離) ・分離対象の大量処理可能	・キラル分離能に改良が必要(研究段階)

2. 研究の目的

背景で述べたリポソーム膜に不斉認識能に着目した新規な分離・分析手法の確立を御

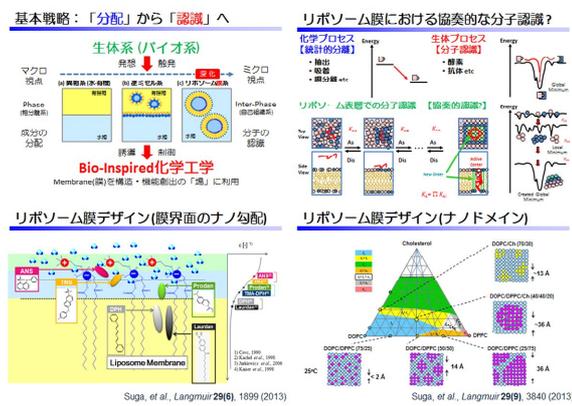


図1 リポソーム膜のデザイン性とキラル認識能誘導

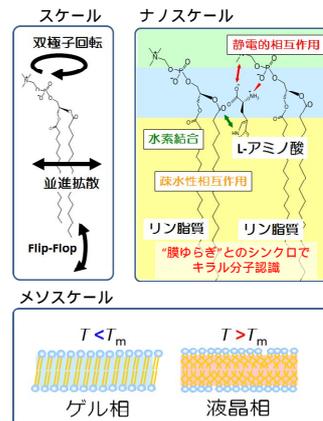


図2 リポソーム膜場凝縮系を構成する分子集団の特徴。分子集団構造のゆらぎ・揺動、それに伴う多点相互作用の組み替えが誘導されやすい特徴を有する

目標とする。リポソーム膜表層の不斉炭素周辺におけるナノ秩序領域において、静電的相互作用、疎水性相互作用、水素結合が同時に誘導されて高いキラル選択性が誘導されることを明らかにしてきた。詳細な検討により、膜ゆらぎが誘起される「(i)誘導過程」と特定分子を協奏的に吸着する「(ii)認識過程」が存在し、特に、前者がカギである事も明らかとしてきた。さらに、我々は、「誘電緩和現象」により膜ゆらぎを御する手法も確立している。そこで、本研究では、『リポソーム膜固定化マイクロ流路』を活用し、熱/電場等の『外部場』によって『膜ゆらぎ』を誘導する革新的な分離分析技術の創成を目的とする。

3. 研究の方法

予備研究で検討した結果に基づいて、前項の研究目的を達成するために必要な、以下の3項目について検討した。

(1)リポソーム膜のキラル認識：リポソームのキラル分離能力に及ぼす、外部環境(熱、電場など)の影響に系統的解析により基礎データベースを拡充する。リポソーム膜のデザイン性を検討するための各種の両親媒性分子(例 重合性脂質、水素結合性脂質など)を

対象として、「場」としてのリポソーム膜の物性を解析し、対象分子(例 アミノ酸、マンデル酸など)のキラル認識能との関連性を明らかにした。

(2)リポソーム膜固定化担体：マイクロチャンネルとの融合を想定して、リポソーム膜ゆらぎを適切に誘起させるための固定化手法を確立する。具体的には、(a)調製したリポソーム膜をそのまま固定化・包埋する方法、(b)秩序的な親疎水性界面を維持したゲル担体の調製法、(c)脂質膜をそのまま固定化したデバイスの開発について検討した。

(3) 外部刺激応答性：各種の外部場に対する膜場の応答性について検討した。高周波ネットワークアナライザーを利用した誘電分散解析法に基づいて、膜場と外来性分子が共存する条件における誘電緩和スペクトルのデータを明らかにした。項目(1)を検討した膜場のうち、特に、外部刺激応答性が有効であったものを選択し、誘電緩和現象と各種物性(例 水和など)とキラル認識能、相互の関係性について検討した。

4. 研究成果

前項(1)~(3)について検討した上で、最終段階で“膜ゆらぎ”クロマトグラフィーの妥当性を検証した。各項目に関する研究成果を以下にまとめた

(1)リポソーム膜のキラル認識：膜ゆらぎクロマトグラフィーの根幹をなす現象は、膜自身が誘導するキラル認識能であるため、重点的に検討を進めた。特に、低分子量分子(L-His や Ibuprofen)の場合、(1)膜表面のマイクロドメイン性や(2)その安定性(架橋性ドメイン)を制御することでキラル選択性が改善できることを示した。また、(3)対象分子(L-His など)の第3分子(キラル有機酸など)を共存させ、膜界面での分子集合構造を適切に制御することにより、キラル性能を制御できることを示した。特に、(4)水素結合性膜場(例 スフィンゴミエリン)ならびに一般的脂質との不均一膜場においても、同様の効果が確認されたうえで、膜表面の水和水・構造水の関連性が示唆された。以上の知見に基づいて、膜構成分子・外来性分子の物性を基盤とした上で、膜場の垂直方向・水平方向の特性をデザインし、副次的に形成される水和層の効果を活用して、キラル認識能を制御できることを示した。

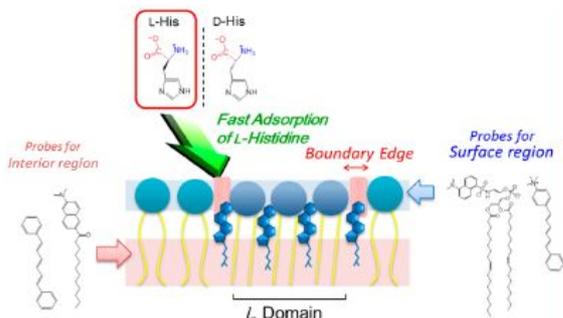


図3 不均一リポソーム膜のキラル認識能

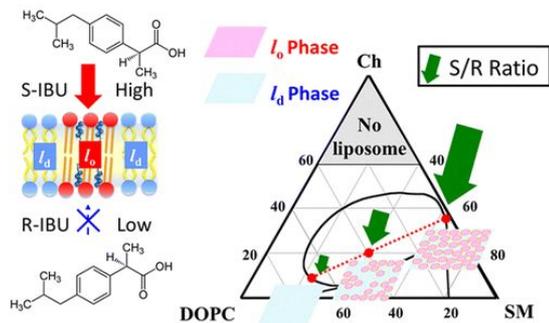


図4 デザイン膜場による薬剤分子のキラル認識能

なお、本申請課題では対象としなかったが、別プロジェクトにより膜場における「キラル変換(不斉合成)」機能も誘導されることを世界に先駆けて発見された。鍵は、「反応基質あるいは反応中間体分子構造の分子認識」にあり、本申請課題で明らかにした方法論と共通している(一部、非公表データ)。副次的に得られた研究成果を詳細に検討することにより、本申請課題で狙った膜ゆらぎ活用型「分離・分析」の概念に「反応/変換」を融合できると期待される。

(2)リポソーム膜固定化担体：前項で述べたように、デザインしたリポソーム膜場が誘導するキラル認識能を分離担体へ活用するために、「膜場」を保持する各種分離・分析担体の開発に取り組んだ。検討項目(1)との連携性を維持するために、(a)リポソーム膜をそのまま固定化する方法について検討した。具体的には、リポソーム包埋ハイドロゲルならびにリポソーム包埋クライオゲルである。リポソーム懸濁液の水溶液をゲルで包埋して固定化する方法、あるいは、高空隙率ハイドロゲル(クライオゲル)にリポソームを固定化する方法を検討し、適切なリポソーム膜を固定化

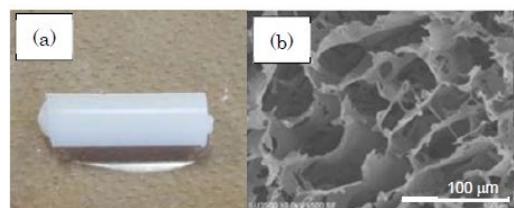


図5 リポソーム膜固定化クライオゲル担体

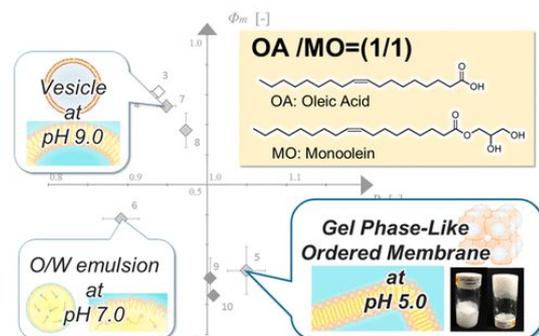


図6 共連続構造を有する Cubosomal ゲル担体

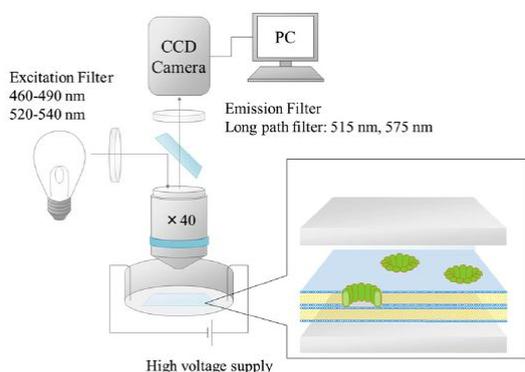


図7 脂質膜固定化担体を用いた電気泳動システム

した担体を開発した。各種のゲル担体のキラル分離能を評価した結果、キラル分子(例 L-Trp など)の選択的吸着挙動を維持したままであることが可能とされた。これを分離担体として活用することで、リポソーム膜ゆらぎを活用する高選択的な分離が実現可能であると期待される。さらに膜表面の分子認識点を大面積化するために、並行して(b)Cubosomal ゲル担体の開発にも取り組んでいる。秩序高い新疎水性界面ならびにヘキサゴナル構造を維持したままマクロゲルが形成された材料であり、材料内部で水性連続層を維持すると考えられており、ラマン分光分析・マルチ蛍光プローブ解析などを複合的に適用して、間接的な証左が得られている。上記のゲル材料が低分子量分子(例 アミノ酸)のキラル認識能を有する事も明らかにしている(非公表データ)。詳細な検討が必要であるが、自己組織化構造をマクロ材料レベルで維持できる材料であるため、将来的には、膜ゆらぎ型分離・分析のコア材料となる可能性が高い。さらには、具体的な分離・分析デバイスを想定して、(c)固体材料表面への脂質膜の固定化についても検討した。各種膜物性を考慮することにより、2分子膜構造を有する平面膜を固定化したデバイス材料の調整に成功している。以上のように、同一理念に基づき、異なる3種類の固定化担体の開発に成功した。

(3)外部刺激応答性: カギは誘電緩和現象にある。誘電分散スペクトル解析を主軸としつつも、マルチ蛍光スペクトル解析法・時間分解蛍光スペクトル解析法などを利用して、各種リポソームの外部刺激応答性について検討した。総合的にはリポソーム膜の刺激応答性には、リポソームを構成する分子・外来性分子の揺動を端緒にして有機される「膜場」(分子集合構造)の揺動が重要であり、それが如実に顕在化するのには「リポソーム膜表面層の水和構造」であることを示した。特に、水素結合性脂質から成る膜場で顕在化されやすい傾向が見られた。従来より、スフィンゴミエリン(SM)脂質膜は分子間水素結合により、強固なドメインを形成することが知られていた。脂質分子間の水素結合形成に伴って、膜内部がさらに脱水され、付随して膜表面層の

水和水が増大する可能性を明らかにした。外来分子とリポソーム膜との相互作用では、水和水の組み替えにより発生するエントロピーが自発的な界面吸着の駆動力となる。従って、SM脂質を含むナノドメインを形成させることにより、キラル分子などの選択性が向上することが期待される。また、膜表面層の水和水は1-5GHzの緩和周波数を有するため、外部場刺激(例 2.5GHz交流電場)により、膜表面層特性を制御できることを示した。これに伴い、キラル分子であるマンデル酸の吸着挙動を交流電場印可により制御できる可能性を示した。(上記2件の研究成果は、現在、投稿準備中であるため、秘密保持の観点から図表は割愛した。)

以上のように交流電場を外部場とする場合、外部刺激応答性を制御できる可能性が示された。さらに、上記の知見に基づいて、基盤材料を活用するための、温度・電場といった外部場を印加するためのデバイス作製に成功し、電場や温度印加による膜構造の制御ならびに膜と分離対象物質との相互作用の制御にも成功した。膜ゆらぎクロマトグラフィの可能性が示された。

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)

Keishi Suga, Atsushi Tauchi, Takaaki Ishigami, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi, Preferential Adsorption of L-Histidine onto DOPC/Sphingomyelin/3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol Liposomes in the Presence of Chiral Organic Acids, *Langmuir*, **33** (15), 3831-3838 (2017)

Yukihiro Okamoto, Yusuke Kishi, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Induction of Chiral Recognition with Lipid Nano-Domains Produced by Polymerization, *Biomacromolecules*, **18** (4), 1180-1188 (2017)

Takeshi Ohtsu, Saki Shigenari, Makoto Yoshimoto, Hiroshi Umakoshi, Reactive bienzyme systems fabricated through immobilization of biotinylated glucose oxidase and peroxidase molecules onto neutralized avidin-conjugated liposomes, *Biochem. Eng. J.* **125**, 81-87 (2017)

Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Makoto Yoshimoto, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi, Characterization of Physicochemical Properties of Liposomes with Chlorophyll a, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **17**, 4888-4893 (2017)

Yukihiro Okamoto, Yusuke Tsujimoto, Hiroshi

Umakoshi, Electrophoretic Separation Method for Membrane Pore Forming Proteins in Multilayer Lipid Membranes, *Electrophoresis*, **37**, 762–768 (2016)

Takaaki Ishigami, Atsushi Tauchi, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Effect of Boundary Edge in DOPC/DPPC/Cholesterol Liposomes on Acceleration of L-Histidine Preferential Adsorption, *Langmuir*, **32** (24), 6011–6019 (2016)

Takaaki Ishigami, Kazuma Sugita, Keishi Suga, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi, High Performance Optical Resolution with Liposome Immobilized Hydrogel, *Colloid Surface B*, **136** (1), 256–261 (2015)

〔学会発表〕(計 10 件)

Hiroshi Umakoshi, Keishi Suga, “Membrane-on-Membrane” for Chiral Process, 化学工学会第 83 年会, 関西大学, 2018 年 3 月

馬越 大, 自己組織化膜を活用する Bio-Inspired 分離技術, INCEM TOKYO 2017, 東京ビックサイト, 2017 年 11 月

Yukihiro Okamoto, Yusuke Kishi, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Induction of chiral recognition with lipid nano-domains produced by polymerization for high performance chiral separation, HPLC 2017 PRAGUE, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic, June (2017)

岡本 行広, リピドナノテクノロジーによる分離法の創成, 龍谷大学, 2017 年 5 月

Yukihiro Okamoto, Yusuke Tsujimoto, Atsushi Tauchi, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Electrophoretic Separation of Biomolecules in Nano-Lipid Membrane, 2016 AIChE Annual Meeting, Hilton San Francisco Union Square, SF, USA, November (2016)

大津 豪志, 吉本 誠, 異種酵素が固定化されたリポソームを触媒とする逐次反応系の構築と特性, 第 48 回化学工学会秋季大会, 徳島大学, 2016 年 9 月

岡本 行広, 辻本 悠亮, 菅 恵嗣, 馬越 大, 脂質ナノ薄膜を分離場とする膜タンパク質の電気泳動分離法の開発, 第 23 回クロマトグラフィーシンポジウム, 山梨県立図書館, 2016 年 6 月

石上 喬晃, 菅 恵嗣, 岡本 行広, 馬越 大, リン脂質二分子膜界面を活用するアミノ酸不斉認識, 日本化学会第 96 春季年会, 同志社大学, 2016 年 3 月

岡本 行広, 辻本 悠亮, 菅 恵嗣, 馬越 大, 膜内在性タンパク質の新規分離法の開発, 膜シンポジウム 2015, 神戸大学, 2015 年 11 月

吉本 誠, 山田 純, リン脂質ベシクルの微小液滴内に隔離された酵素一分子の特性と応用, 化学工学会第 47 回秋季大会, 北海道大学, 2015 年 9 月

〔図書〕(計 2 件)

岡本 行広, マイクロ・ナノ空間/ナノ材料の特性を利用した分離分析法の創成, 東海化学工業会誌, **287**, 2-5 (2015)

岡本 行広, 脂質膜の曲率を利用した脂質ソーティング法, *ぶんせき*, 504 (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.membranome.jp/B-ICE/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

吉本 誠 (YOSHIMOTO, Makoto)
山口大学・創成科学研究科・准教授
研究者番号: 80322246

岡本 行広 (OKAMOTO, Yukihiro)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 50503918

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者