

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06573

研究課題名(和文)フルオロフォビック効果による自発的膜タンパク質集積を用いた人工細胞膜構造体の創製

研究課題名(英文)Development of artificial cell membrane using fluorophobic effect

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：フルオロフォビック効果を利用した人工細胞膜構造体の創製を目指して、Dipalmitoylphosphatidylcholineの新規部分フッ素化アナログ脂質分子群Fn-DPPCについて、グラムスケールの化合物合成を行った。基本となる膜物性・構造を種々の物理化学的手法により明らかにするとともに、Fn-DPPC/DPPC二成分系混合膜の相図を作成した。

また、脂質膜に再構成した膜タンパク質バテクリオロドプシンの構造・機能の特徴を調べた。その結果、パーフルオロアルキル鎖長に強く依存した高次構造や光機能中間体の違いが見られた。二成分系混合脂質膜への再構成も試み、基礎的な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特異的な表・界面物性を示すパーフルオロアルキル基の特性を利用した新規部分フッ素化リン脂質を開発し、その際だった膜物性を明らかにした。さらに、膜タンパク質の再構成実験を行い、膜タンパク質生体機能発現の場となる安定な人工的な脂質膜構造体の基礎を築くことができた。

本研究で得られた成果は、さまざまな生体機能を担う新たな人工細胞膜構築の基盤技術の1つとなることが期待される。また、膜タンパク質再構成系への展開により、リガンドスクリーニング等の創薬研究においても一定の役割を果たす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For the development of artificial cell membranes by taking advantage of the fluorophobic effect, we performed the gram scale synthesis of several kinds of novel partially fluorinated analogs of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), Fn-DPPCs. We examined physical and structural properties of Fn-DPPC bilayer membranes with the use of various physicochemical techniques and constructed the phase diagram of the Fn-DPPC/DPPC binary systems. The structural and functional characteristics of a membrane protein bacteriorhodopsin (bR) reconstituted in the Fn-DPPC bilayer membrane were investigated. Significant differences in the higher-order structures and photointermediates of the reconstituted bR molecules strongly dependent on the perfluoroalkyl chain length were observed. We also tried to reconstitute bR molecules into the binary phospholipid bilayer membranes and obtained biophysical results on membrane proteins.

研究分野：生体分子科学

キーワード：リン脂質 膜タンパク質 フッ素化 境界脂質 フルオロフォビック効果 フルオロフィリック効果 脂質膜 相分離

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体膜において機能の発現を担う膜タンパク質は、生物の種類を問わず、それぞれの生物種がもつ全ての遺伝子のおよそ四分の一がコードされている。一方現代の創薬研究において、膜タンパク質は60%以上を占める主要なターゲットである。しかしながら、*in vitro* 実験では、膜タンパク質が不安定なため取扱いは容易ではなく、しばしば失活してしまうことが知られている。

(2) 炭化水素基の全ての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基 (C_nF_{2n+1}) を有する両親媒性分子は、一般的な非含フッ素両親媒性分子には見られない、際だった表・界面物性を示すことが知られている。近年、パーフルオロアルキル基を疎水鎖末端に部分的に導入したいくつかの界面活性剤が膜タンパク質の可溶化や結晶化において有用であることが報告され、膜タンパク質研究者の注目を集めている。

(3) リン脂質の2本の疎水鎖末端にパーフルオロアルキル基を導入した部分フッ素化リン脂質が最近開発され、パーフルオロアルキル基の鎖長依存的な膜物性を示すことが報告された。また、モデル膜タンパク質バクテリオドロプシンの再構成実験から、天然類似の高次構造と機能発現機構を示し、膜タンパク質の再構成基材として有用であることが示唆された。

(4) 上記の部分フッ素化リン脂質への膜タンパク質再構成実験や、部分フッ素化リン脂質と非含フッ素リン脂質からなる混合脂質膜の熱物性の測定から、部分フッ素化リン脂質によりもたらされるフルオロフォビック効果が、通常の生体分子を自発的に集積させる効果があることが強く示唆された。そこで、パーフルオロアルキル基をもつリン脂質を利用して、機能発現に必要な膜タンパク質やリン脂質分子を自発的に集積させた人工細胞膜を開発するという着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 生体膜に広く見られるリン脂質のアシル鎖長を考慮し、Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を基本構造とする、種々の長さのパーフルオロアルキル基を疎水鎖末端導入した部分フッ素化リン脂質群 (Fn-DPPC, 図1) をグラムスケールで合成する。

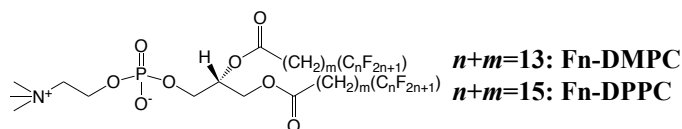


図1. 部分フッ素化リン脂質の化学構造

(2) 新規部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC 二分子膜の構造と熱物性を詳細に調べる。特に、フルオロフォビック効果を検討するために、部分フッ素化リン脂質と非含フッ素リン脂質の二成分系混合脂質膜の相図を作成し、脂質分子間の相互作用に関する知見を得る。

(3) モデル膜タンパク質バクテリオドロプシン (bR) の部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC への再構成実験を行い、膜タンパク質の構造・機能・安定性に対する、パーフルオロアルキル基の影響を明らかにする。部分フッ素化リン脂質と非含フッ素リン脂質の二成分系混合脂質膜への再構成も試み、膜タンパク質の分配挙動を調べる。

3. 研究の方法

(1) 既に報告済みの Fn-DMPC の合成法にならって、種々のパーフルオロアルキル基を導入した部分フッ素化パルミチン酸を用いて、部分フッ素化リン脂質群 Fn-DPPC を合成した。得られた化合物は ODS カラムを用いて精製し、NMR と質量スペクトルにより最終生成物を確認した。

(2) 新規部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC 二分子膜の構造と熱物性の解析には、示差走査熱量測定 (DSC) や放射光 X 線回折 (XRD) 測定等の物理化学的方法を用いた。放射光 X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構の放射光実験施設フォトンファクトリー BL-6A および BL-10C において実施した。Fn-DPPC/DPPC 二成分系リン脂質膜懸濁液を様々な混合比で調製し、得られた DSC 曲線から相図を作成した。

(3) 再構成に用いるモデル膜タンパク質 bR は、培養した高度好塩菌 *H. salinarum* から既報に従い精製を行うことによって、紫膜断片の懸濁液試料として得られた。界面活性剤 Triton X-100 により紫膜断片中の bR を可溶化し、さらに Fn-DPPC 脂質膜懸濁液を混合後、バイオフィーズを

用いて界面活性剤を除去することにより、bR を部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC 二分子膜に再構成したプロテオリポソーム（以下、bR/Fn-DPPC と表記する）を得た。

(4) 調製したプロテオリポソーム bR/Fn-DPPC 中の bR の高次構造・光サイクル・安定性を、紫外・可視吸収 (UV-Vis), 可視円二色性 (CD), およびナノ秒レーザーフラッシュホトリシス等の分光学的手法を用いて詳細に調べた。

4. 研究成果

(1) 高純度で新規部分フッ素化リン脂質群 Fn-DPPC のグラムスケールの合成に成功した。

(2) Fn-DPPC 脂質膜の熱物性を調べるため、懸濁液の DSC 測定を行った。その結果、 $n=4$ では $24.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n=6$ では $39.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $n=8$ では $71.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ に、それぞれゲル-液晶相転移に対応すると考えられる吸熱ピークが観測された。基準となる非含フッ素リン脂質 DPPC (転移温度: $41.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) に対して、部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC の転移温度のパーフルオロアルキル鎖長依存性は、既に報告済みである Fn-DMPC のそれに類似していることが明らかになった。すなわち、短いパーフルオロプロチル基 ($n=4$) の導入は転移温度の著しい低下を誘起するのに対し、 $n=6$ では温度低下が抑制され非含フッ素リン脂質とほぼ同等に、さらに $n=8$ に伸長すると劇的な転移温度の上昇が見られ、非常に安定な脂質膜を形成すると考えられる。相転移の熱力学量についても、再現性の良い実験データを得ることができ、考察をさらに進めている。

(3) 様々な混合比で調製した部分フッ素化リン脂質 Fn-DPPC と非含フッ素リン脂質 DPPC の二成分系混合脂質膜の DSC 測定を行った。図 2 に F8-DPPC/DPPC 等量混合の場合の DSC 曲線を示す。DPPC 脂質膜由来および F8-DPPC 脂質膜由来と考えられる吸熱ピークが、それぞれ $42.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ に観測されることから、それぞれの脂質に富むドメインが混合膜中に形成されていると考えられる。また、得られた様々な混合比からなる試料の DSC 曲線から相図を作成した。得られた相図を基に、部分フッ素化リン脂質と非含フッ素リン脂質の相互作用に関する半定量的な評価をさらに進めており、部分フッ素化リン脂質のフルオロフォビック効果がある程度定量的に取り扱う基礎が築けると期待される。

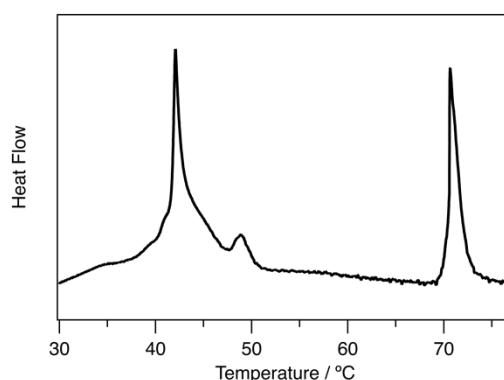


図 2. F8-DPPC/DPPC(1:1)の DSC 曲線

(4) モデル膜タンパク質 bR を用いて再構成実験を試みると、紫色の懸濁液が得られ、非常に高い収率で Fn-DPPC 脂質膜に bR を再構成することができた。得られたプロテオリポソーム (bR/Fn-DPPC) のキャラクタリゼーションを UV-Vis および可視 CD により行った。図 3 に示すように、非含フッ素リン脂質に類似した吸収極大波長および CD パターンを示し、天然紫膜に類似した構造をもつことが示唆された。さらに、レーザーフラッシュホトリシスにより光機能中間体の特徴を調べると、bR/F8-DPPC の方が天然紫膜に近い振る舞いを示した。二成分系混合膜への再構成をさらに行ったところ、bR 分子の特徴的な分配挙動が見られた。このことは、高部分フッ素化リン脂質を利用した膜タンパク質の自己集積を基盤とする要素技術の実現が可能であることを示している。

<参考文献>

- H. Takahashi et al., Stability of the two-dimensional lattice of bacteriorhodopsin reconstituted in partially fluorinated phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1861 (2019) 631–642.

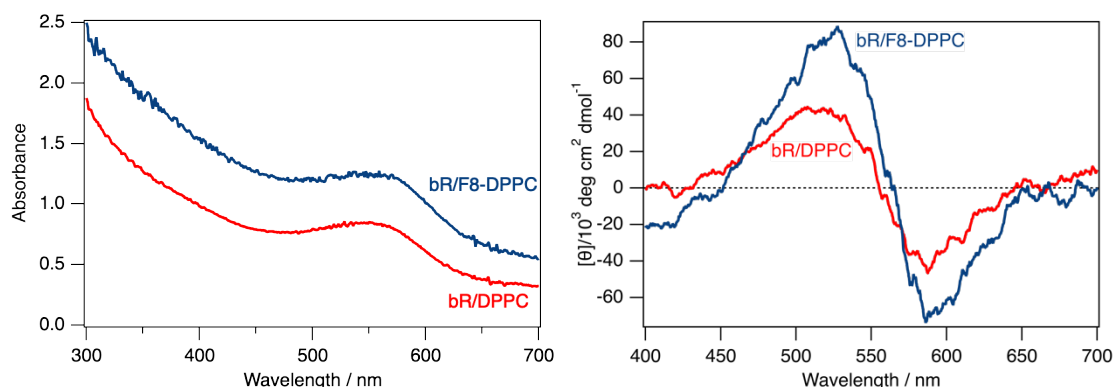


図 3. bR を再構成したプロテオリポソームの UV-Vis スペクトル (左) と可視 CD スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Mami, Murai Yuka, Morita Kohei, Kikukawa Takashi, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Yokoyama Yasunori, Amii Hideki, Sonoyama Masashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Comparison of functionality and structural stability of bacteriorhodopsin reconstituted in partially fluorinated dimyristoylphosphatidylcholine liposomes with different perfluoroalkyl chain lengths	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183686 ~ 183686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2021.183686	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Karasawa Morise, Yokoyama Yasunori, Takiguchi Kingo, Takahashi Hiroshi, Kikukawa Takashi, Sonoyama Masashi, Takenaka Koshi	4. 巻 90
2. 論文標題 Pore Size Distributions Related with Spontaneous Purple Membrane Stacking in Porous Hydrogels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 103801 ~ 103801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7566/JPSJ.90.103801	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iizuka Yutaro, Owada Ryuji, Kawasaki Takayasu, Hayashi Fumio, Sonoyama Masashi, Nakamura Kazuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Toxicity of internalized polyalanine to cells depends on aggregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02889-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchida Naoyuki, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Sonoyama Masashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Membrane properties of amacrocyclic tetraether bisphosphatidylcholine lipid: Effect of a single membrane-spanning polymethylene cross-linkage between two head groups of ditetradecylphosphatidylcholine membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183569 ~ 183569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2021.183569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Yasunori, Yano Shunsuke, Kurita Riku, Karasawa Morise, Tanaka Hikaru, Takahashi Hiroshi, Kikukawa Takashi, Sonoyama Masashi, Takenaka Koshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Effects of salt and gel network structures on purple membrane stacking in hydrogels immobilized with poly(vinyl alcohol)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 014701 ~ 014701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0032546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 園山正史
2. 発表標題 部分フッ素化リン脂質を用いた膜タンパク質研究の展開
3. 学会等名 バイオインタラクション研究会 第16回ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 真琴・林 史夫・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 アクチノバクテリア門の細菌がもつ新規ロドプシン群の探索
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷 理紗子・林 史夫・園山 正史
2. 発表標題 Effect of lipid environments on the ATPase activity of ABC transporter MsbA
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉澤 慎吾・菊川 峰志・林 史夫・園山 正史
2. 発表標題 Effect of acidity and salt concentration on functional properties of Na ⁺ pump rhodopsin from <i>Indibacter alkaliphilus</i>
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地 莉緒・林 史夫・井上 圭一・園山 正史
2. 発表標題 Quaternary structure and photocycle of archaerhodopsin-3 (AR3) reconstituted in phospholipid bilayer membrane
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 真琴・林 史夫・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 A novel family of microbial rhodopsin present in terrestrial bacteria of Actinobacteria
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋本 佳那子・川原 るい・土田 直之・高木 俊之・高橋 浩・網井 秀樹・園山 正史
2. 発表標題 Effects of partial fluorination of phospholipids bearing a single membrane-spanning chain on membrane properties
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蟻坂 知佳・宮崎 真也・高木 俊之・高橋 浩・網井 秀樹・園山 正史
2. 発表標題 Analysis of membrane properties of partially fluorinated diether phospholipid membrane
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原 由佳・山本 愛理・林 史夫・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 A comparative study of oligomeric states and photocycle of proteorhodopsin in phospholipid bilayer membranes and detergent micelles
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並木 葉月・徳留俊・野村舞・林史夫・井上裕介・杉山成・松岡茂・村田道雄・園山正史
2. 発表標題 A comparative study of ligand-binding properties between fatty acid-binding proteins FABP3 and FABP7
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 麻美・村井 裕佳・森田 康平・菊川 峰志・高木 俊之・高橋 浩・横山 泰範・網井 秀樹・園山 正史
2. 発表標題 Comparison of functionality and structural stability of bR in partially fluorinated DMPC vesicles with varied perfluoroalkyl chain lengths
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地 莉緒・林 史夫・井上 圭一・園山 正史
2. 発表標題 リン脂質二重膜に再構成したアーキロドプシン-3(AR3)の四次構造と光 サイクル
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 真琴・林 史夫・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 アクチノバクテリア門の細菌がもつ新規ロドプシン群の探索
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 嶋本 佳那子・川原 るい・土田 直之・高木 俊之・高橋 浩・網井 秀樹・園山 正史
2. 発表標題 擬環状エーテル型脂質の部分フッ素化が膜物性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原 由佳・山本 愛理・林 史夫・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 リン脂質二分子膜及び可溶化状態におけるプロテオロドプシンの多量体構造や光サイクルの比較研究
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 並木 葉月・徳留俊・野村舞・林史夫・井上裕介・杉山成・松岡茂・村田道雄・園山正史
2. 発表標題 脂肪酸結合タンパク質 FABP3 と FABP7 におけるリガンド結合特性の網羅的な解析
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西 瀬蓮・高木 俊之・高橋 浩・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 三重結合を有するリン脂質の膜特性と膜タンパク質への影響
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川原亜依・高木俊之・高橋浩・下赤卓史・長谷川健・網井秀樹・園山正史
2. 発表標題 一本の疎水鎖末端をフッ素化した新規部分フッ素化リン脂質の膜物性
3. 学会等名 第10回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺脇明芳・並木葉月・徳留俊・林史夫・井上裕介・杉山成・松岡茂・村田道雄・園山正史
2. 発表標題 ヒト由来脂肪酸結合タンパク質FABP4の網羅的なリガンド結合特性
3. 学会等名 第10回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川原亜依・高木俊之・高橋浩・下赤卓史・長谷川健・網井秀樹・園山正史
2. 発表標題 一本の疎水鎖末端をフッ素化した新規部分フッ素化リン脂質の合成と膜物性
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masashi Sonoyama
2. 発表標題 Partially Fluorinated Phospholipid Membrane
3. 学会等名 58th Annual Meeting of Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 真琴・林 史夫・菊川 峰志・園山 正史
2. 発表標題 アミノ酸配列解析による陸生細菌由来新規ロドプシンの探索
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉澤 慎吾・菊川 峰志・林 史夫・園山 正史
2. 発表標題 ナトリウムポンプロドプシン NaR のイオン輸送における五量体形成の重要性
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 理紗子・林 史夫・園山 正史
2. 発表標題 ABC トランスポーターMsbA の活性に対する機能場の影響
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤紋音・徳留俊・林史夫・菊川峰志・白石充典・園山正史
2. 発表標題 Nanodiscに単離したバクテリオロドプシン三量体の光サイクルと安定性
3. 学会等名 日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野真琴・林史夫・菊川峰志・園山正史
2. 発表標題 特異的なC末端を有する新規ロドプシン群の発見
3. 学会等名 日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	高木 俊之 (Takagi Toshiyuki) (10248065)	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 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	ベルリン自由大学			