

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14478

研究課題名（和文）脂質キュービック相の高分子化による構造安定化と膜タンパク質との複合化

研究課題名（英文）Structural stabilization of lipid cubic phase by polymerized networks toward fabrication of immobilization platform for membrane proteins

研究代表者

尾本 賢一郎 (Omoto, Kenichiro)

長崎大学・工学研究科・助教

研究者番号：40820056

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）：本研究では、膜タンパク質を天然の状態のまま担持できる安定な高分子材料の開発を指向し、脂質キュービック相の脂質二分子膜に高分子架橋を施した「架橋脂質キュービック相」の開発を目指した。本目的を達成するために、親水性末端にアルコキシシリル基を有する有機ケイ素脂質の含水条件下での自己組織化・縮合挙動について評価した。結果として有機ケイ素脂質が、ゾル-ゲル反応の進行に伴い、表層がシロキサン架橋により覆われた脂質二分子膜からなる「架橋脂質キュービック相」を時間発展的に形成することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質キュービック相を安定な膜タンパク質固定化媒体として活用するには、脂質二分子膜と水チャンネルの秩序構造からなるナノ構造を固定化する手法の開発が必要である。本研究では、親水性末端にアルコキシシリル基を有する有機ケイ素脂質を含水条件下で自己組織化・縮合させることで、脂質同士がシロキサンネットワークにより高分子架橋された「架橋脂質キュービック相」を構築できることを見出した。本研究で得られた知見は、脂質分子同士の重合反応により脂質キュービック相の形成を誘起する新しい手法を示すものであり、膜タンパク質を固定化可能な安定な高分子材料の開発への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this work, a lipid cubic phase composed of lipid bilayers encompassing polymerized networks was developed as a stable polymer material that can immobilize membrane proteins without denaturation. The self-organization and condensation behaviors of an organosilane lipid in an aqueous condition were studied. It was revealed that the organosilane lipid developed a "cross-linked lipid cubic phase" consisting of lipid bilayers covered by siloxane networks in a time-evolving manner as the sol-gel reaction proceeded.

研究分野：超分子化学

キーワード：脂質キュービック相 有機-無機ハイブリッド リオトロピック液晶 超分子化学 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固定化酵素を筆頭に、膜タンパク質の生体機能を活用したバルク材料の開発が探究されており、膜タンパク質を天然の状態のまま安定に担持できる固定化媒体が求められている。しかしながら、可溶性タンパク質と比較して、膜タンパク質の固体材料への応用技術は大きく遅れている。その理由として、膜タンパク質は、脂質二分子膜に取り込まれた状態においてのみフォールディング構造を維持可能で、水中や固体状態では容易に変性してしまい、化学吸着や物理吸着による固定化媒体への担持が困難であることが挙げられる。よって、膜タンパク質の生体機能を活かしたバルク材料を開発するためには、まず、膜タンパク質のフォールディングを可能にする固定化媒体の開発が必要であり、解決すべき課題である。

膜タンパク質の固定化媒体として、脂質二分子膜と水チャンネルからなるリオトロピック液晶「脂質キュービック相」が注目されている。脂質キュービック相は、脂質の濃厚水和物からなる高粘性のリオトロピック液晶であり、湾曲した脂質二分子膜と数 nm 径の水ナノチャンネルが秩序的に入り組んだマイクロ相分離構造を有し、その脂質二分子膜中に膜タンパク質を天然の状態のまま取り込むことができる、といった特徴を有し、膜タンパク質の結晶化溶媒などとして広く活用されている。しかしながら脂質キュービック相は、乾燥や温度変化などの周辺環境により、そのナノ構造が容易に崩壊するといった構造脆弱性の課題を有しており、膜タンパク質固定化媒体としての活用範囲が大きく限られる。そのため、脂質キュービック相を、安定な膜タンパク質固定化媒体として活用するには、まず、その脂質二分子膜を安定に維持する手法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、膜タンパク質を天然の状態のまま担持できる安定な高分子材料の開発を指向し、脂質キュービック相の脂質二分子膜に高分子架橋を施した「架橋脂質キュービック相」の開発を目指した。「架橋脂質キュービック相」の構造や形成過程、物性を詳細に評価し、「架橋脂質キュービック相」の膜タンパク質固定化媒体としての活用可能性を見出すことを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

研究代表者が所属する研究機関ではこれまでに、有機-無機ハイブリッド構造による脂質二分子膜の構造安定化に関する研究を行ってきた。その過程で、親水性末端にアルコキシシリル基を有する有機ケイ素脂質が、水中で自己組織化・ゾルゲル反応により縮合することで、シロキサン架橋により構造保持された脂質二分子膜を有する有機-無機ハイブリッドベシクル「セラソーム」を形成し、それが通常のベシクルと比して驚異的な構造安定性を示すことを明らかにしてきた (Jun-ichi Kikuchi and Kazuma Yasuhara, *Advances in*

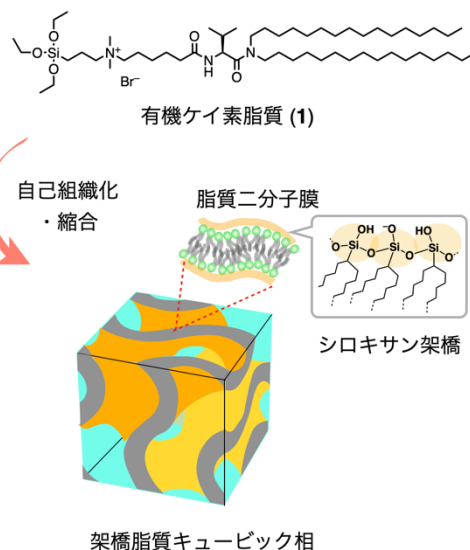


Figure 1. 有機ケイ素脂質 (1) の自己組織化と縮合による架橋脂質キュービック相の構築の概念図。

Biomimetics, *INTECH*. Rijeka. 2010, 231-250.)。本研究では、原料として同様の有機ケイ素脂質を活用し、それを高濃度の水溶液状態で縮合させることで、表層がシロキサン架橋により覆われた脂質二分子膜からなる「架橋脂質キュービック相」の構築を検討した (Figure 1)。各種測定を用いてゾル-ゲル反応の進行や、それに伴う脂質集合構造の変化を追跡することで、シロキサン架橋が「架橋脂質キュービック相」の構造特性に与える効果を評価した。

4. 研究成果

「架橋脂質キュービック相」は、有機ケイ素脂質 (1) と水の混合物 ([1]=90w/w%) をガラスキャピラリーの中に封入し、それを 60 °C で加熱処理することにより構築した。サンプル中におけるゾル-ゲル反応の進行を追跡するために、キャピラリー中のサンプルを取り出し、CDCl₃ 中で ¹H NMR 測定を実施したところ、加熱処理を 2 日間実施した時点で、脂質のトリエトキシシリル基が加水分解により消費されていることが確認された。また、加熱処理後のサンプルの MALDI-TOF mass 測定を実施したところ、脂質ユニットの繰り返し構造に相当する複数のピークがスペクトル上に等間隔で検出された (Figure 2)。さらに、加熱処理後のサンプルの固体 ²⁹Si NMR 測定からは、一級、二級、三級シロキサンに帰属されるシグナルが積分比 5.7:36.9:57.4 で確認された。以上の結果から、1 を含水条件において加熱処理することでゾル-ゲル反応が進行し、分岐シロキサン構造を有する脂質オリゴマーが形成されることが示唆された。

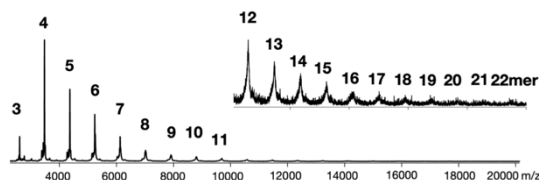


Figure 2. 加熱処理 (60 °C for 2 days) した有機ケイ素脂質 (1) と水の混合物 ([1] = 90 w/w%) のMALDI-TOF massスペクトル。

ゾル-ゲル反応の進行に伴うナノ構造の変遷を評価するために、有機ケイ素脂質 (1) と水の混合物 ([1] = 90w/w%) について、偏光顕微鏡観察を実施した。結果として、1 と水とを混合した直後のサンプルが光学的等方性を示す一方で (Figure 3, 0 h)、60 °C での加熱処理を続けることで、サンプル中に複屈折を示すドメインが出現した後 (Figure 3, 4 h ~ 1day)、最終的には再度光学的に等方な状態に収束することが確認された (Figure 3, 2 days 以降)。

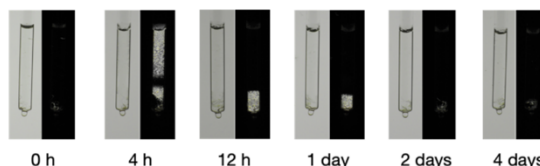


Figure 3. 有機ケイ素脂質 (1) と水の混合物 ([1] = 90 w/w%) の偏光顕微鏡画像 (60 °C) の経時変化 (左: 偏光板なし、右: crossed-Nicolé images)。

さらに、X線回折実験により、有機ケイ素脂質 (1) と水の混合物 ([1] = 90w/w%) が形成するナノ構造を評価した (Figure 4)。結果として、1 と水とを混合した直後のサンプルについては、Figure 4a に示すようにブロードなスペクトルが得られ、周期的な液晶構造は確認できなかった。一方で、60 °C での加熱処理を続けることで、ラメラ構造の形成を示唆する鋭利な回折 (Figure 4b) が出現したのち、最終的にはジャイロイド構造 ($a=9.7$ nm) の空間群 *Ia3d* に帰属できる特徴的な回折が出現することが確認さ

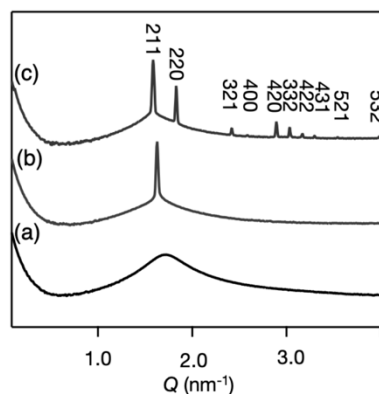


Figure 4. 有機ケイ素脂質 (1) と水の混合物 ([1] = 90 w/w%) のX線回折 ($\lambda = 1 \text{ \AA}$ at 60 °C). 加熱処理開始後 (a) 0時間、(b) 13時間、(c) 6日後。

れた (Figure 4c)。

以上の結果から、有機ケイ素脂質 (1) 水の混合物に加熱処理を施した結果、ゾル-ゲル反応による脂質のオリゴマー化が進行し、それに伴い、ラメラ構造の形成過程を経て脂質キュービック相が時間発展的に形成されることが示された。ゾル-ゲル反応による脂質分子間の架橋が進行することで、脂質頭部同士が近接した状態で固定され、親水性末端の占有体積が減少した結果、負のガウス曲率を有する脂質キュービック相が時間発展的に形成されたと考察することができる。本研究で得られた知見は、脂質分子同士の重合により脂質キュービック相の形成を誘起する新しい手法を示すものであり、膜タンパク質を固定化可能な、安定な高分子材料の開発への展開が期待される。

本研究で得られたこれらの成果は、次頁に記載する査読付きの学术论文として、*Chemical Communications* 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Omoto Kenichiro, Aoyama Shota, Galica Tomasz, Nishibori Eiji, Katao Shohei, Yasuhara Kazuma, Rapenne Gwenael	4. 巻 51
2. 論文標題 Thermally responsive morphological changes of layered coordination polymers induced by disordering/ordering of flexible alkyl chains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 17967 ~ 17972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2DT03142F	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 該当する

1. 著者名 Kariya Miki, Omoto Kenichiro, Nomura Kaoru, Yonezawa Kento, Kamikubo Hironari, Nishino Toshio, Inoie Tomomi, Rapenne Gwenael, Yasuhara Kazuma	4. 巻 60
2. 論文標題 Lipid cubic phase with an organic-inorganic hybrid structure formed by organoalkoxysilane lipid	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2168 ~ 2171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC05167F	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 刈谷 未来, 尾本 賢一郎, 安原 主馬, Rapenne Gwenael
2. 発表標題 有機ケイ素脂質を用いた有機-無機ハイブリッド脂質キュービック相の形成
3. 学会等名 日本化学第103会春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenichiro Omoto, Shota Aoyama, Tomaz Galica, Eiji Nishibori, Kazuma Yasuhara, Gwenael Rapenne
2. 発表標題 Thermally responsive morphological change of layered coordination polymer induced by melting of flexible alkyl chains
3. 学会等名 錯体化学第72回討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾本 賢一郎, 青山 翔太, Tomasz Galica, 西堀 英治, Rapenne Gwenael
2. 発表標題 長鎖アルキルを有する層状配位高分子の結晶形状変化を伴う多形転移
3. 学会等名 第19回ホスト-ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Miki Kariya, Kenichiro Omoto, Kazuma Yasuhara, Yugo Hayashi, Hironari Kamikubo, Gwenael Rapenne
2. 発表標題 Formation of lipid cubic phase by organic-inorganic hybrid lipid
3. 学会等名 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青山 翔太, 尾本 賢一郎, Tomasz Galica, 西堀 英治, Rapenne Gwenael
2. 発表標題 長鎖アルキルを有する層状配位高分子の構築と結晶形状変化
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 青山 翔太, 尾本 賢一郎, Tomasz Galica, 西堀 英治, Rapenne Gwenael
2. 発表標題 長鎖アルキル鎖を有する配位高分子結晶の構築と異方的伸縮運動
3. 学会等名 令和3年度 日本結晶学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 K. Yasuhara, K. Omoto, T. Nishino, G. Rapenne (Ed. O. Azzaroni, K. Ariga)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 589
3. 書名 Concepts and design of materials nanoarchitectonics	

1. 著者名 Yoshinori Yamanoi, Kenichiro Omoto, Toyotaka Nakae, Masaki Nishio (Ed. Masako Kato, Kazuyuki Ishii)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 265
3. 書名 Soft Crystals	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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		
フランス	CEMES, Universite du Toulouse, CNRS		