

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25889039

研究課題名(和文)ベシクル膜による“アンサンブル型”分子認識・変換反応

研究課題名(英文)Design of Vesicle Membranes for Ensemble Effect-Like Recognition and Conversion Process

研究代表者

菅 恵嗣 (Suga, Keishi)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：00709800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：両親媒性分子が自己組織化したベシクル膜を活用して、膜場の特性解析ならびに膜表面における分子認識および変換反応について検討した。高感度で膜場の特性を解析手法として、脂質修飾金ナノ粒子(Au@PL)を開発し、従来法と比較して100倍程度のラマンスペクトル強度(表面増強ラマン)が得られた。蛍光プローブ法を組み合わせる事により、多種多様なベシクル膜の物理化学的な特性を定量的に解析可能となった。(ii)特定の基質分子を膜表面に分配させた場合、膜の表面環境が変化し変換反応が制御される可能性を明らかにした。環化付加反応、酵素反応についても、ベシクル膜上で反応プロセスを制御できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The self-assembled membranes of amphiphilic molecules were designed with phospholipid, cholesterol, fatty acid, surfactant, etc., and were applied to the molecular recognition and conversion processes. The phospholipid-modified Au nanoparticles (Au@PL) were developed for high-sensitive analysis of the dynamic behaviors of membranes. Au@PL showed the enhanced Raman spectra with >100-fold larger intensity. With fluorescent probe analysis, various kinds of vesicle membranes could be characterized. Using such a designed vesicle, the recognition and conversion processes carried out. In the case of 1,3-dipolar cycloaddition reaction, the hydrophobic substrate (BNO) and the hydrophilic substrate (EMI) were accumulated on the membrane, where the membrane surface was dehydrated due to the distribution of BNO. The relative reaction constant increased to 2.7-fold, indicating that the membrane surface can be applied to the recognition and conversion processes.

研究分野：自己組織系の物理化学

キーワード：リポソーム ベシクル 自己組織化 “協奏的”分子認識 表面増強ラマン RNA グアニジニウム 環化付加反応

## 1. 研究開始当初の背景

抗原-抗体や酵素-基質では、認識サイトに相互作用する官能基が集積化された“鑄型型”分子認識(従来型)として知られている。これに対して、本研究では、自己組織系を活用する事で複数の相互作用を“協奏的”に集積化させる“アンサンプル型”分子認識を目指す。自己組織系であるベシクル膜は、極性・非極性環境が約5 nmの膜界面(ナノ膜界面)に秩序高く凝縮された閉鎖系二分子膜構造を有し、脂質分子がナノ膜界面を自由拡散する過程において最安定な秩序構造を形成するという特徴がある。したがって、多成分から成る非対称かつ不均一な脂質二分子膜をデザインする事で、対象分子の“アンサンプル型”分子認識が実現可能である。

ベシクル膜の特性に着目した場合、(i)分子集合体としてのマクロな特性(system)、(ii)環境変化(熱、外来分子、etc.)に応答して膜特性を変化させる動的特性(dynamics)、(iii)膜を構成する脂質分子のミクロな特性(molecule)を有する。これまでに、リン脂質二分子膜であるリポソーム膜は、組成および温度を制御因子として、その物理化学的な膜特性(流動性、極性、不均一性)を制御可能である事を明らかにした[原著論文1]。さらに、リポソームは膜特性やナノドメインサイズに応じて、様々な分子を認識する事が報告されている。

以上より、ベシクル膜を最適にデザインすることで分子認識のための「場」として活用可能であり、さらにナノ膜界面における各種化学プロセス(変換反応)の制御が実現可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、“アンサンプル型”分子認識の「場」としての自己組織系(ベシクル膜)を設計し、ベシクル膜界面における変換反応を制御することである。本研究では、水中で極性-非極性環境がナノオーダー(約5 nm)で凝縮された脂質二分子膜界面(ナノ膜界面)に着目し、その物理化学的な特性解析に基づく分子認識機構、ならびにベシクル膜の疎水場を利用する変換反応の制御について、以下の検討項目に沿って研究を行う。

- (i) 非対称・ナノドメインを有するベシクル膜のデザインおよび特性解析・高感度膜特性解析ツールの開発
- (ii) ナノ膜界面におけるキラル分子の認識機構の解明
- (iii) ベシクル膜を活用する認識・変換プロセスの制御

## 3. 研究の方法

- (i) 非対称・ナノドメインを有するベシクル膜

のデザインおよび特性解析・高感度膜特性解析ツールの開発：各種脂質分子(phosphocholine (PC), コレステロール(Ch), 脂肪酸(FA), 界面活性剤(AOT), etc.)を構成材料として、不均一ベシクル膜の創成を目指す。ここでは、脂質分子の構造と膜中における配置に着目し、自己組織系としての体系的な理解を目標とする。新たな調製法としてマイクロチャネル乳化法や Post-化学修飾(例：Methyl- $\beta$ -cyclodextrin による Ch 引き抜き)に取り組み。ベシクル膜の特性評価手法について、これまでの研究で確立した物理化学的な膜特性(膜流動性、膜極性、疎水性、ナノドメイン形成)を評価する手法に加えて、新たに Langmuir-Blodgett 膜法(以下 LB 膜)、表面増強ラマン分光解析(SERS)による分子レベルでの解析に取り組み。特に、高感度ラマン検出を目指すためには、表面増強ラマン分光解析(SERS)の手法確立が必要不可欠である。ここでは、金属ナノ粒子(100 nm)をベシクル膜に提示させ、ナノ粒子間でのラマン散乱光の増幅がねらいである。ベシクル膜デザインならびに SERS 手法を基盤として、続く研究段階へと展開する。

(ii) ナノ膜界面におけるキラル分子の認識機構の解明：各種膜特性解析手法を利用して、ベシクル膜界面における“アンサンプル”型分子認識機構について検討する。これまでに、リポソーム膜表面層における一本鎖 RNA 分子の相互作用機構を明らかにしている。脂質膜への分子結合深さに関して、膜の深度方向に対する配向深さの異なる蛍光プローブ(Laurdan: 約1 nm; DPH: 約2 nm)を利用する事で、基質分子の相互作用に伴うミクロな膜環境の変化を解析可能である。ベシクル膜を最適にデザインする事で、ナノドメインに認識のための官能基を集積化させ、さらに膜の疎水場において強い水素結合を誘導できれば、ナノ膜界面における“アンサンプル型”分子認識が実現可能である。

(iii) ベシクル膜を活用する認識・変換プロセスの制御：1,3-Dipolar cycloaddition 反応や相間移動触媒反応では、水に対する溶解度の異なる基質の接触が反応進行の鍵である。ベシクル膜の疎水場に疎水性基質を、さらに四級アンモニウム基を膜表面層に固定化することで、親水性基質をナノ膜界面に集積化させ、水溶媒中でも効率的な変換反応が達成可能である。さらに基質を異なるドメインで認識し、温度制御による相転移を利用して基質同士を混合(ナノ相転移)、ベシクル膜の疎水場にて反応を進行させる事で、不斉合成や縮重合反応の制御も可能と考えられる。疎水性基質 Benzonitril oxide ( $\log P = 1.82$ )と親水性基質 N-Ethylmaleimide ( $\log P = -0.18$ )における cycloaddition 反応に注目し、四級アンモニウム基を触媒分子とする反応制御に取り組み。さらに詳細な基質認識機構やベシクル膜デ

ザインによる反応促進を目指す。また、生体分子にみられるリン酸-グアニジニウム相互作用を利用して、ベシクル膜上における酵素反応プロセスの制御や、核酸分子の認識・高次構造制御についても検討する。

#### 4. 研究成果

金ナノ粒子(100 nm)表層にリン脂質を担持させる事により(Au@PL), 従来の 100 倍以上の高感度でラマン分光解析が可能である事を明らかにした。Au@PL より得られたラマンスペクトルを解析する事で、ベシクル膜の相状態や脂質パッキング密度を解析できる。また、多種多様な組成のベシクル膜について、膜流動性(DPH 解析)ならびに膜極性(Laurdan 解析)を体系的に行う事で、膜の相状態や相分離挙動について定量的な解析が可能となった。これらの手法を活用し、脂肪酸ベシクル(Oleic Acid)や界面活性剤ベシクル(AOT)についても特性解析を行い、従来のリン脂質ベシクルとの特性の違いを明らかにした。また、新たなベシクル調製法として、マイクロチャネル乳化法や超臨界逆相蒸発法についても取り組み、上記手法で調製した DMPC ベシクルが、従来の薄膜水和法のベシクルと同等の膜特性を維持している事を確認した。

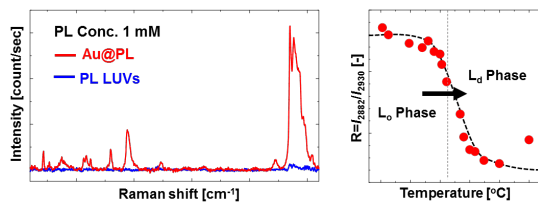


図 1 .(左図)Au@PL によるラマン強度の増大。(右図)Au@PL によるベシクル膜相転移挙動の解析。

基質認識を最適化するためのベシクル膜デザインについて検討を行った。(i)疎水性基質 BNO の場合、正電荷ベシクル(DOTAP)を利用する事で基質の分配を促進させる事を明らかにしている。このとき、BNO 分配に伴って膜表面が脱水和され、環化付加反応が促

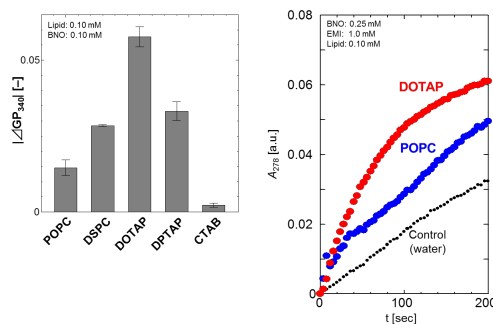


図 2 .(左図)BNO 基質分配に伴うベシクル膜の脱水和。(右図)正電荷ベシクル DOTAP による環化付加反応の促進効果。

進された。膜表面の脱水和と反応促進について相関性が得られたため、基質分配により協奏的に認識点が構築され、反応が制御される可能性を見出した。

生体系でみられるリン酸-グアニジニウム相互作用を利用して、ベシクル膜表面における酵素反応の制御、グアニジニウム基修飾ベシクルによる RNA 分子の認識について検討を行った。ミトコンドリア膜にみられるカルジオリピン脂質(CL)は 1 つの分子内に 2 つのリン酸基を有する。CL 修飾ベシクルを調製し、イソクエン酸脱水素酵素(ICDH)の反応プロセスについて検討した。ICDH の吸着に伴って膜表面の脱水和が観察された。これは ICDH がアルギニン側鎖を含むからであると考えられる。一方、CL を多量に含むベシクルでは膜上で ICDH 高次構造の変性が誘導され、酵素活性の減少がみられた。CL 分子は膜上で流動的な液晶相を形成する。ICDH の分配ならびに酵素活性制御において、不均一な CL ベシクル膜を設計し、膜の相分離挙動を制御する事が重要である。また、グアニジニウム基を修飾した脂質分子を合成し、リン脂質ベシクル膜に修飾した場合、tRNA 分子の認識が可能である事を明らかにしている。

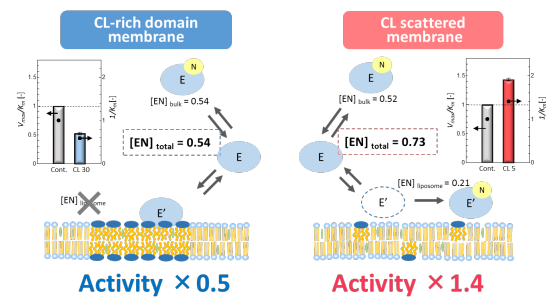


図 3 .(左図)CL-20mol%ベシクルによる ICDH 酵素活性の阻害効果。(右図)CL-5mol%ベシクルによる ICDH 酵素活性の促進効果。

以上の成果について、後述の 5. 主な発表論文等において成果報告を行った。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)  
 Keishi Suga, Tomohiro Yoshida, Haruyuki, Ishii, Yukihiro Okamoto, Daiusuke Nagao, Mikio Konno, Hiroshi Umakoshi, Membrane Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Sensitive Detection of Molecular Behavior of Lipid Assemblies. Analytical Chemistry, in press (2015)

Hye Sung Cho, Junsoo Kim, Keishi Suga, Takaaki Ishigami, Hyunchul Park, Jung Won Bang, Soonmin Seo, Mansoo Choi, Pahn-Shick Chang, Hiroshi Umakoshi, Ho-Sup Jung and

Kahp-Yang Suh, Microfluidic Platforms with Monolithically Integrated Hierarchical Apertures for the Facile and Rapid Formation of Cargo-Carrying Vesicles, Lab on a Chip, 15, 373-377(2015)

Fumihiko Iwasaki, Keishi Suga, Dai Kondo, Hiroshi Umakoshi, Partitioning of Hydrophobic Molecules to Liposome Membranes Can Induce Variations of their Micro-Polarity and Micro-Viscosity, Solvent Extr. Res. Dev., Jpn., 22, 79-85 (2015)

Keishi Suga, Tomoya Yokoi, Dai Kondo, Keita Hayashi, Seiichi Morita, Yukihiko Okamoto, Toshinori Shimanouchi, Hiroshi Umakoshi, Systematical Characterization of Phase Behaviors and Membrane Properties of Fatty Acid/Didecyldimethylammonium Bromide Vesicles, Langmuir, 30, 12721-12728 (2014)

〔著書・総説・解説記事〕(計4件)

菅 恵嗣, リポソームを活用する生体分子の分離・反応の制御～RNA分子の「識別」ならびに「変換」～ [特集: 若い芽], 分離技術, 44, 37-42 (2014)

菅 恵嗣, リポソーム膜界面におけるナノドメインの評価ならびに単鎖RNAの分子認識, C & I Commun., 39, Interface 5, 1-3 (2014)

菅 恵嗣, リポソームを活用する生体分子の分離・反応の制御～RNA分子の「識別」ならびに「変換」～, 分離技術, 44 (2), 37-42 (2014)

馬越 大, 菅 恵嗣, 石上 喬晃, 杉田 一馬, 岡本 行広, Membranome: 自己組織化膜を『場』として活用する化学工学, 大阪大学低温センターだより, 161, 1-4 (2014)

〔招待講演・依頼講演〕(計2件)

菅 恵嗣, リポソーム膜界面を「場」とする認識・変換反応の制御, 化学工学会「材料・界面部会」自己組織化分科会 第2回自己組織化プロセスサロン, 関西大学セミナーハウス, 2014年1月

菅 恵嗣, Membranome を基盤とする Bio-Inspired 化学工学 ～リポソーム膜を活用する生体分子の認識・機能制御を目指して～, 最先端光計測とライフサイエンスの近未来 -バイオ・ラマン 2017-, 愛媛大学, 2013年8月

〔学会発表〕(計36件)

〔図書〕(計1件)

菅 恵嗣, 岡本 行広, 馬越 大, リポソーム包埋ハイドロゲルの調製と応用, ゲルテクノロジーハンドブック(NTS 出版), 第4章(4), 674-681 (2014)

〔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〕

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

菅 恵嗣 (SUGA, Keishi)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 00709800

(2)研究分担者

該当しない

(3)連携研究者

該当しない