

平成 28 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：共同研究

研究期間：平成 28 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究課題名：脂質導入による膜特性評価と細胞死の誘導

ラボ長

所属：物質創成専攻化学工学領域

氏名：菅 恵嗣

研究成果（当初の研究目的と得られた結果を記載してください。図表を含め 3 ページ程度）：

本研究では、細胞膜に脂質分子を導入する事で脂質膜の物理化学的特性変化を誘導し、そのミクロ相分離挙動を制御する事で最終的に細胞機能を制御するための方法論の開発を目的としている(図 1)。H28 年度は、主にモデル細胞膜系における脂質分子構造と膜特性の関連について物理化学的な視点より解明を試みた。また、並行して細胞膜機能を制御するための脂質分子設計ならびに脂質分子の集合特性解析について検討した。

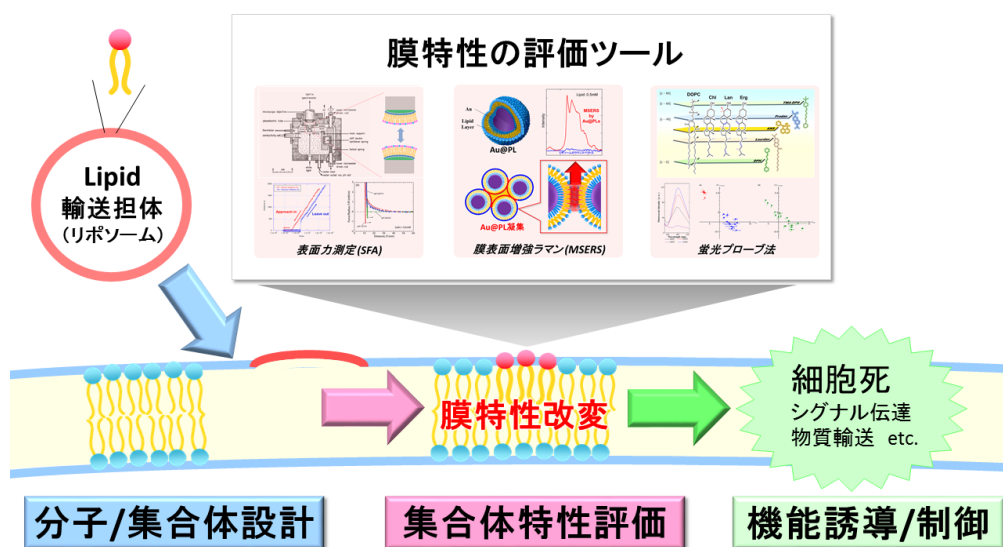


図 1 研究概念図

脂肪酸分子が脂質分子集合体特性に及ぼす影響（共同研究者：Tonya Kuhl 教授）

脂肪酸は炭素鎖長や不飽和度に応じて生体膜の物理化学的な特性(膜流動性, etc.)を制御する事が知られている。オレイン酸(C18:1)は植物に豊富に含まれる脂肪酸であり、脂質二分子膜に取り込まれ、膜特性に影響する事が報告されている。カルボキシ基(-COOH)の本来の pKa 値は 4.8 であるにもかかわらず、オレイン酸分子集合体における見かけの pKa 値は 8.0 となる。従って、集合体界面に働く“力”は脂肪酸分子間の相互作用により影響を受け、それらを正確に評価する事で各種の脂質二分子膜の表面特性を設計する事が可能と考えられる。また、Membrane Lipid Therapy において注目されているオレイン酸誘導體（例：2-hydroxyoleic acid）等の脂肪酸分子において、膜界面における分子の振舞いを理解する事は極めて重要といえる。

共同研究者である Kuhl 教授の研究室において、表面力測定(Surface Force Apparatus, SFA)に基づ

き DPPC/オレイン酸膜界面に働く相互作用力について検討を行った(図 2)。異なる pH 条件において DPPC/オレイン酸膜を調製し、静電相互作用力ならびに疎水性相互作用力をそれぞれ評価し、mica 基板上に作成した DPPC/オレイン酸膜における分子の振舞いについて検討した。NaNO₃ buffer (pH 5.8)では静電斥力はみられず、オレイン酸分子は全く電離していないことが明らかとなった。一方、phosphate buffer (pH 7.4)では静電斥力が観察され、さらに接着力も観察された。AFM 観察において、膜欠陥の程度は NaNO₃ buffer と同様であり、膜間の接着力は暴露した疎水場同士の相互作用に起因すると考えられる。静電斥力解析より、mica 基板上に作成した 7:3 DPPC/オレイン酸膜におけるオレイン酸分子の pKa 値は 9.1 と推察された。以上より、自己組織化膜における分子間相互作用はオレイン酸分子の電離挙動に影響し、周囲の pH に応じて膜表層の表面電荷密度が変動する事を明らかにした。効率良く脂質分子を細胞膜へ導入するためには、表面電荷密度の精密な解析が必要不可欠である。本研究において確立した表面特性解析手法に基づき、脂質膜-脂質膜間の相互作用における支配的な相互作用力を明確にできると期待される。

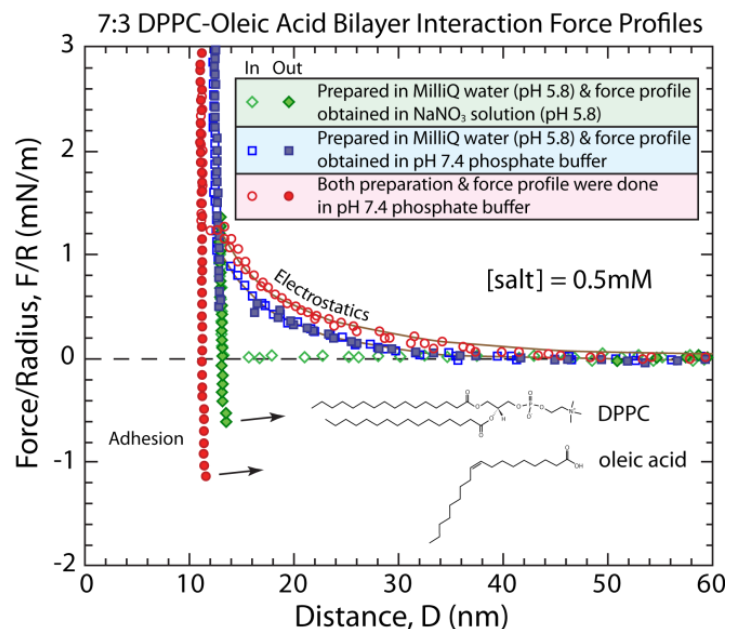


図 2 SFA 測定による DPPC 膜中におけるオレイン酸分子の電離状態の評価

膜表層に吸着した外部分子がもたらす協奏的効果（共同研究者：林啓太講師）

細胞系において、細胞膜表層は多種多様な分子が行き交う場であり、膜表層特性(膜流動性、表面電荷密度、etc.)は分子吸着(認識)を制御するための鍵因子といえる。ここでは、薬剤・抗酸化剤として知られる Resveratrol (Res)の機能について、膜特性の視点から検討を行った。不飽和脂質膜(DOPC リポソーム)に Res を添加する事で、膜表層が秩序的に変化し、特に膜表層が脱水とされる事を明らかにした。ここに過剰量の H₂O₂ を添加したところ、Res 共存下では脂質酸化が抑制される結果を得た(図 3)。従来では Res 分子自身がラジカル捕捉剤として考えられてきたが、本研究では、Res によって誘導される膜特性変化が水溶性ラジカル分子の膜透過を抑制している事がわかった。これにより、Res に関して経験的に知られていた抗酸化作用の中には、膜特性変化によるシナジー効果が含まれている可能性を明らかにした。

一般的な薬物送達戦略では、送達量を確保するための研究開発が重要視されがちであるが、本来の Membrane Lipid Therapy の概念に基づくと、“触媒的な”効果をもたらす脂質の役割を明らかにする事こそが重要である。本研究で得られた成果により、脂質膜の物理化学的な特性を改変する事で、分子本来の機能に加え、集合体(=膜)特性によって各種の物質移動と反応が制御され得る可能性が示唆された。即ち、脂質膜に導入した分子がもたらす“膜特性”を明らかにする事で、目標とする「細胞(膜)の機能制御」が着実に達成できると考えている。

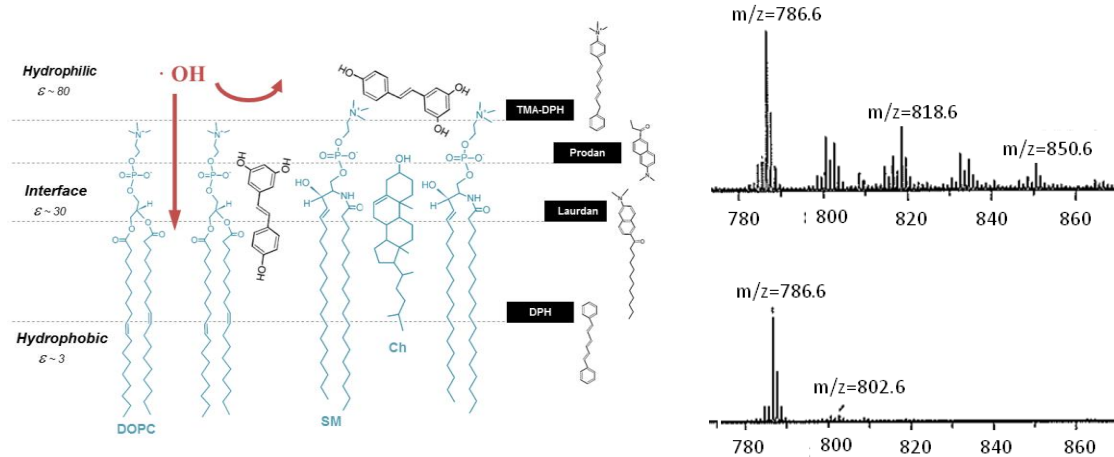


図3 (左)脂質膜中における Res 分子の局在. (右)DOPC 脂質(Mw.786)の酸化における Res 共存効果. (上)Res 非共存系, (下)Res 共存系.

自己組織化する Prodrug 分子設計 (共同研究者：林啓太講師)

抗炎症作用剤の一種である Oxaprozin を疎水化し、自己集合する分子設計を行った。合成した分子の NMR 解析結果より目的生成物が得られていることが裏付けられ、概ね合成手法は確立できたといえる。ミセルを形成する誘導体(図4)について、大量合成を現在行っており、今後、その集合体特性ならびに細胞への取り込み、抗炎症作用について評価する予定である。また次年度の計画として、膜特性を劇的に変化させる両親媒性分子をカップリングさせる分子として選定し、膜融合や分解後に誘導される膜特性と細胞機能の相関について明らかにしていく。

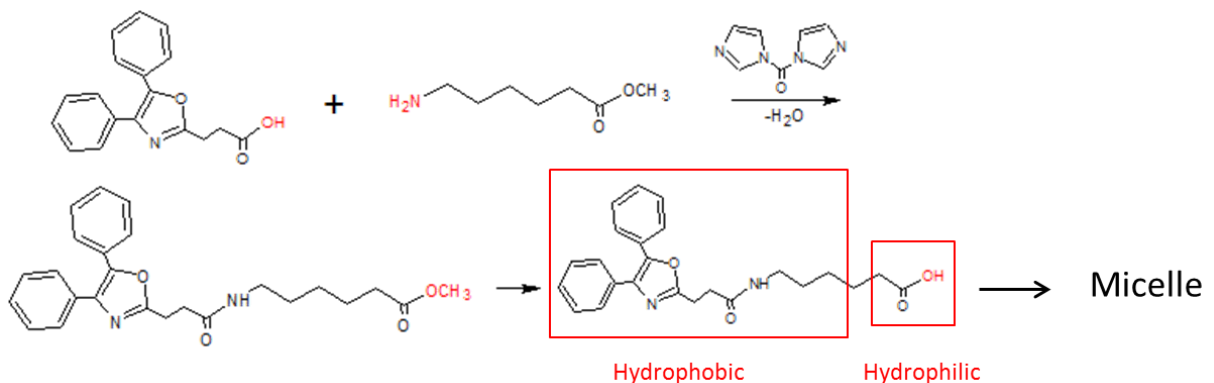


図4 自己組織化する Prodrug 分子の合成手順

キーワード：自己組織化，ベシクル，膜特性，脂肪酸，Prodrug，細胞機能，マイクロ相分離

研究経費（H28年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0円	687010円	352553円	0円	85437円	1125000円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

Tonya Kuhl・University of California, Davis, Department of Chemical Engineering

林 啓太・奈良工業高等専門学校物質化学工学科

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

韓 瑾・大阪大学大学院基礎工学研究科・M1

発表論文等（平成29年3月31日現在）

[雑誌論文]

1. James Kurniawan, Keishi Suga, Tonya Kuhl. Interaction Forces and Membrane Charge Tunability: Oleic Acid Containing Membranes in Different pH Conditions. *BBA-Biomembranes*, 1859, 211–217 (2017)
2. Keishi Suga, Atsushi Tauchi, Takaaki Ishigami, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Preferential Adsorption of L-Histidine onto DOPC/Sphingomyelin/3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]cholesterol Liposomes in the Presence of Chiral Organic Acids. *Langmuir*, in press (2017)
3. Keita Hayashi, Hideka Iwai, Toshiyuki Kamei, Kaede Iwamoto, Toshinori Shimanouchi, Sakiko Fujita, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi. Tailor-made Drug Carrier: Comparison of Formation-dependent Physicochemical Properties within Self-assembled Aggregates for an Optimal Drug Carrier. *Colloids Surf. B*, 152, 269-276 (2017)
4. Fumihiko Iwasaki, Sandra Luginbuhl, Keishi Suga, Peter Walde, Hiroshi Umakoshi. Fluorescent Probes Study of the AOT Vesicle Membrane and their Alteration upon Addition of Aniline or the Aniline Dimer p-Aminodiphenylamine (PADPA). *Langmuir*, 33 (8), 1984-1994 (2017)
5. Keita Hayashi, Hideka Iwai, Toshiyuki Kamei, Ayako Kato, Yusuke Murata, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi. Characterization of Sorbitan Surfactant-based Vesicles at the Molecular Scale Using NMR: Effect of Acyl Chain Length vs. Phospholipid Composition. *Colloids Surf. B*, 144, 33-37 (2016) (selected as a cover)
6. James Kurniawan, João Ventrici, Gregory Kittleson, Tonya L. Kuhl. Interaction Forces between Lipid Rafts. *Langmuir*, 33, 382–387 (2017)
7. Fumihiko Iwasaki, Keishi Suga, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Characterization of DDAB/Cholesterol Vesicles and Its Comparison with Lipid/Cholesterol Vesicles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, in press (2017)

[著書]

1. 菅 恵嗣, 馬越 大. ソフトマター界面の秩序構造を活用するキラル医薬品/RNA の分離 [特集: 吸着分離材のメゾスケールデザイン]. *分離技術*, 4, 357-362 (2016)

[学会発表]

1. Keishi Suga, Kei Akizaki, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Quantitative Monitoring of Microphase Separation Behaviors in Cationic Liposomes Using Multiple Fluorescent Probes. *2016 AIChE Annual Meeting*, Hilton San Francisco Union Square, SF, USA, Nov 13th-18th (2016) (Oral) [国際会議]
2. Keishi Suga, Tomohiro Yoshida, Yukihiro Okamoto and Hiroshi Umakoshi. Membrane Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (MSERS): Sensitive Analysis for Molecules at Lipid Membrane Interfaces. *2016 AIChE Annual Meeting*, Hilton San Francisco Union Square, SF, USA, Nov 13th-18th (2016) (Poster) [国際会議]
3. 菅 恵嗣, Tham Thi Bui, 明崎 慧, 岡本 行広, 馬越 大. Multi-Focal Characterization for Micro-Phase Separation Behavior of Liposome Membrane. *第97回日本化学会春季年会*, 慶應義塾大学, 神奈川, 2017年3月16日-19日 (Oral)
4. 渡邊 望美, 菅 恵嗣, 馬越 大. Characterization of Membrane Properties of Guanidinium-Modified Liposome and Its Interaction with Nucleic Acid. *第97回日本化学会春季年会*, 慶應義塾大学, 神奈川, 2017年3月16日-19日 (Oral)
5. Han Jin, Keishi Suga, Okamoto Yukihiro, Umakoshi Hiroshi. Resveratrol Can Alter the Membrane Properties of Model Cell Membranes and Its Anti-Oxidation Effect. *化学工学会第82年会*, 芝浦工業大学, 東京, 2017年3月6日-8日 (Poster)
6. 渡邊 望美, 菅 恵嗣, 岡本 行広, Slotte J. P., 馬越 大. Sphingomyelin 脂質の不飽和度が脂質膜相転移挙動に及ぼす影響. *化学工学会第82年会*, 芝浦工業大学, 東京, 2017年3月6日-8日 (Poster)
7. 菅 恵嗣, 東江 慶信, 岡本 行広, 馬越 大. M β CD による脂質膜外膜からのコレステロール抽出挙動の評価. *化学工学会第82年会*, 芝浦工業大学, 東京, 2017年3月6日-8日 (Oral)
8. 菅 恵嗣, 馬越 大. ソフトマター界面の秩序構造を活用するキラル医薬品/RNA の分離, *第22回関西地区分離技術講演会*, 大阪市立大学, 大阪, 2016年12月9日 [依頼講演]
9. Han Jin. Alteration of Membrane Properties Caused by Molecule Insertion and Application in Therapy. 3rd "Gathering of International Students in Chemical Engineering", Kobe University, Kobe, Hyogo, Dec. 7th (2016) (Poster)
10. 菅 恵嗣, James Kurniawan, Tonya L. Kuhl. DPPC/オレイン酸膜界面に働く表面力に及ぼす pH の影響. *膜シンポジウム2016*, 関西大学, 大阪, 2016年12月1日-2日 (Oral)
11. Tham Thi Bui, 菅 恵嗣, 岡本 行広, 馬越 大. Interaction behaviors of sterol molecules in unsaturated phospholipid membranes analyzed by fluorescent probes and langmuir monolayer. *膜シンポジウム2016*, 関西大学, 大阪, 2016年12月1日-2日 (Poster)
12. 韓 瑾, 菅 恵嗣, 岡本 行広, 馬越 大. Hierarchical Characterization of Resveratrol-Incorporated Liposomes. *膜シンポジウム2016*, 関西大学, 大阪, 2016年12月1日-2日 (Poster)

[その他] 投稿中の学術論文

1. Jin Han, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Hierarchical Characterization of the Membrane Properties of Resveratrol-Incorporated Liposomes. *J. Phys. Chem. B*, under revision (2017)
2. Keishi Suga, Yoshinobu Higashie, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Membrane Property Analyses for Cholesterol Exclusion Behaviors from Fluid Membranes by Adding Methyl- β -Cyclodextrin. *Langmuir*, under revision (2017)
3. Keishi Suga, Yoko Otsuka, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Characterization of Aqueous Cubosome Composed of Oleic Acid/Monoolein by Raman and Fluorescence Spectroscopies. *J. Phys. Chem. B*, submitted (2017)

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金等を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

1. 菅 恵嗣. 協奏的な分子認識に伴う自己組織系のマイクロ・マクロ特性評価 (代表者: 菅 恵嗣), 若手研究 B (16K18279), H28-H30, 計 320 万円
2. 菅 恵嗣. 膜表面増強ラマンを活用する膜表在分子センサーの開発 (代表者: 菅 恵嗣), 東京工業大学基金による研究助成, H28, 計 30 万円
3. 菅 恵嗣. 抗酸化物質から成る Cubosome の開発およびマイクロ・メソ・マクロ特性の評価 (代表者: 菅 恵嗣), 第 27 回コスメトロジー研究助成, H28-H29, 計 100 万円

参考となるHP等

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