

平成 29 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 29 年 4 月～平成 30 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

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。H29 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、分子のデザイン指針を確立させた (図 1)。H30 において細胞毒性への影響などを検討する予定である。

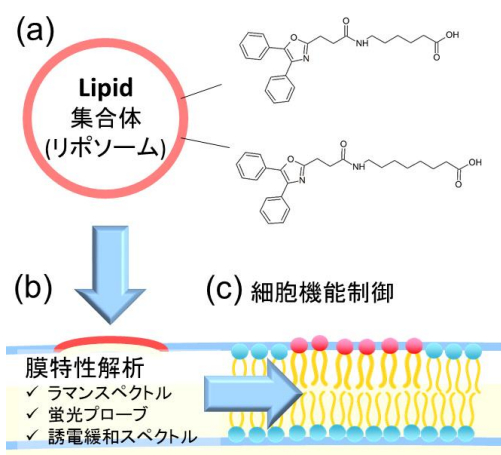


図 1 研究概念図。(a)脂質を自己組織化させ、膜融合によりターゲットに導入。(b)各種分光解析による膜特性評価。(c)細胞機能 (例：細胞死) の制御を目指す。[基礎工学部要覧に掲載]

脂質膜場におけるステロール誘導体の相互作用挙動 (共同研究者：Tonya Kuhl 教授)

生体系において、細胞膜の物理化学的特性は各種のステロール分子によって制御されている。例えば、動物細胞の膜流動性はコレステロール分子によって制御され、細胞膜中よりコレステロールを除去すると各種の物質取り込み機構が抑制される事が知られている。一方、植物細胞においてエルゴステロールが主として膜特性の制御を担うと考えられるが、その詳細については未だ検討が十分ではない。共同研究者 T. Kuhl らとの研究成果として、エルゴステロール分子が飽和リン脂質と相転移温度以上において特異的に相互作用する事を明らかにした。このメカニズムに基づくと、植物細胞が高温条件下においてもその膜特性を維持可能である事を説明できる。概ねの実験データはそろっており、現在成果を投稿論文にまとめている。将来的には、エルゴステロールの化学構造から発想した脂質分子を設計し、高温条件下においても効果的に膜特性を制御する方法論へと発展させたいと考えている。

薬剤分子のリアルタイム観察を目的とする脂質型蛍光プローブの開発 (共同研究者: 林啓太講師)

ドラッグデリバリーシステム(DDS)において、薬剤分子の薬効と同様、体内動態を詳細に観察する事は重要な課題である。蛍光プローブは、細胞膜の可視化や薬剤分子の追跡に大変便利である。本研究では、集合体を形成すると発光特性の変化する Pyrene 分子に着目し、Pyrene-脂肪酸複合体を合成し、細胞への取り込み挙動ならびに細胞毒性を評価した (図 2)。Pyrene-脂肪酸脂質は水中では 100nm 程度の粒子状固体を形成した。これら集合体をマウス由来マクロファージ様細胞 (J774.1)ならびにマウス由来直腸がん細胞(Colon 26)に添加して細胞毒性を調べた結果、脂肪鎖の長い P-C22 は相対的に強い細胞毒性を示す事が明らかとなった。Pyrene 自体の細胞毒性は低いため、脂肪鎖構造が主に効いていると考えられる。本研究で採用した合成手順はシンプルであるが、各種の機能性分子(薬剤, プローブ)を疎水化し自己集合体させるための有力な方法論である。以上の研究成果は ACS Omega (2018)誌に掲載が決定している。

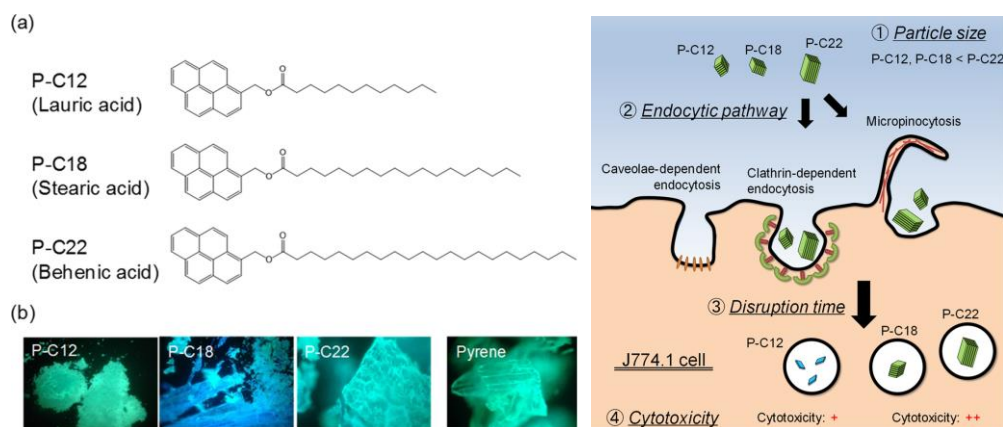


図 2 Pyrene-脂肪酸複合体の設計ならびに細胞系への応用. (左図) Pyrene-脂肪酸複合体の構造(a)ならびに集合体の写真(b). (右図)集合体の細胞への取り込み挙動.

Ozaprozin 誘導体の設計ならびに自己集合挙動の制御 (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、自己集合させるための分子設計を行った。ここでは、疎水鎖末端にカルボキシル基(-COOH)を導入し、溶液の pH に応じて集合挙動の制御をねらう。疎水基を C6, C8, C12 と変化させ、pH 滴定法により集合挙動を評価した。Oxaprozin 分子そのものは水への溶解度が低いものの、Oxp-C6 はアルカリ条件において分散性の高いミセルを形成する事を明らかにした。一方、Oxp-C8, Oxp-C12 の場合、エマルジョン状の集合体を形成し、pH 7 以下では繊維状の結晶を形成した (図 3)。また、Oxp-C8 分子においては融点が著しく低下し(T_m : 55°C), 結晶はアモルファス状であると考えられる。研究目標であるベシクル状分子集合体の設計には至っていないものの、炭素鎖長ならびに pH 制御により各種の Pro-drug 分子の集合挙動を制御できる可能性を見出した。最終年度において、さらなる分子の最適化、ベシクル状集合体の調製、ならびに細胞毒性などを検討する予定である。

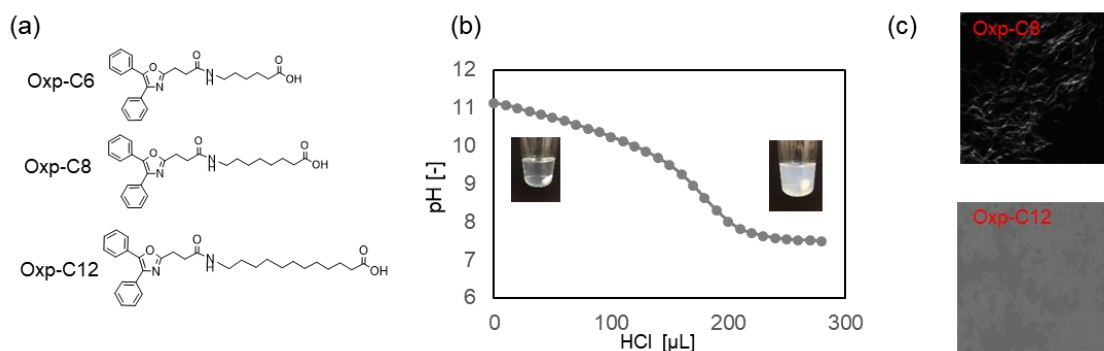


図 3 (a) Oxaprozin 誘導体の構造. (b) Oxp-C6 の pH 滴定. pH>8 では溶液は透明でミセル状集合体を形成. (c) Oxp-C8 および Oxp-C12 の繊維 (pH = 7.4).

キーワード：自己組織化，エルゴステロール，膜特性，脂肪酸，Prodrug，細胞機能，細胞毒性

研究経費（H29年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
139,776 円	790,224 円	0 円	0 円	0 円	930,000 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））

Tham Thi Bui・大阪大学大学院基礎工学研究科・D2

韓 瑾・大阪大学大学院基礎工学研究科・D1

発表論文等（平成 29 年 3 月 26 日現在）

[雑誌論文]

1. 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 Surface B*, **152** (1), 269-276 (2017)
2. Jin Han, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Multi-Level Characterization of the Membrane Properties of Resveratrol-Incorporated Liposomes. *J. Phys. Chem. B*, **121** (16), 4091-4098 (2017)
3. Nozomi Watanabe, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi. Comparison of Physicochemical Membrane Properties of Vesicles Modified with Guanidinium Derivatives. *J. Phys. Chem. B*, **121** (39), 9213-9222 (2017)

4. Yui Hiramure, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Jin Matsumoto, Koichiro Shiomori. Preparation and Characterization of Poly-N-isopropylacrylamide Cryogel containing Liposomes and Their Adsorption Properties of Tryptophan. *Solvent Extr. Res. Dev., Jpn*, **25** (1), 37-46 (2018)
5. Keishi Suga, Yoko Otsuka, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi. Gel Phase-Like Ordered Membrane Properties Observed in Dispersed Oleic Acid/1-Oleoylglycerol Self-Assemblies: Systematic Characterization Using Raman Spectroscopy and a Laurdan Fluorescent Probe. *Langmuir*, **34** (5), 2081-2088 (2018)
6. Keita Hayashi, Yuma Mitsuyoshi, Toshiyuki Kamei, Toshinori Shimanouchi, Keishi Suga, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi. Design of pyrene-fatty acid conjugates for real-time monitoring of drug delivery and controllability of drug release. *ACS Omega*, in press (2018)

[著書]

1. 菅 恵嗣, 膜表面増強ラマン分光法の開発～金ナノ粒子を活用する高感度脂質膜分析～ [特集: 若手注目研究], *C & I Commun.*, **43** (1), in press (2018)

[学会発表]

1. Keishi Suga, Fumihiko Iwasaki, Ryota Ito, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Development of Achiral Surfactant Assemblies for Chiral Selective Alkylation Process in Aqueous Media, 11th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST17), Heaundae Grand Hotel, Busan, Korea, Nov 9th-11th (2017) (Oral) [国際会議]
2. Tham Thi Bui, Keishi Suga, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Physicochemical Behaviors of Biological Sterols in Model Cell Membranes, 11th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST17), Heaundae Grand Hotel, Busan, Korea, Nov 9th-11th (2017) (Poster) [国際会議]
3. Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi: Development and Characterization of Fatty Acid Assembly ~ From Nano Capsule to Hierarchical Gel ~, 2017 Agricultural Biotechnology Symposium (Theme: Delivery and Controlled Release of Food Bioactives), Center for Food and Bioconvergence (CFB), Seoul National University, Seoul, Korea, Nov 9th (2017) [依頼講演]
4. Jin Han, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Partitioning Behaviors of Polyphenolic Compounds onto Model Biomembranes, 21st International Solvent Extraction Conference (ISEC 2017), Seagaia Convention Center, Miyazaki, Japan, Nov 5th-Nov 9th (2017) (Poster) [国際会議]
5. Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi: Detection of Nano-Sized Ordered Domains Formed on Large Unilamellar Vesicles, International Seminar on Biophysics and Chemical Biology of Biomembrane and Lipid Bilayers, Nambu Yoichiro Hall, Toyonaka, Japan, Oct 9th-10th (2017) (Poster) [国際会議]
6. Tham Thi Bui, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi: Investigation of the Roles of Sterol Derivatives in Regulating the Properties of Phospholipid Bilayer Systems, International Seminar on Biophysics and Chemical Biology of Biomembrane and Lipid Bilayers, Nambu Yoichiro Hall, Toyonaka, Japan, Oct 9th-10th (2017) (Poster) [国際会議]
7. Jin Han, Keishi Suga, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umaokshi: Multi-Level Characterization of the Membrane Properties of Resveratrol-Incorporated Liposomes, International Seminar on Biophysics and Chemical Biology of Biomembrane and Lipid Bilayers, Nambu Yoichiro Hall, Toyonaka, Japan, Oct 9th-10th (2017) (Poster) [国際会議]

8. 韓 瑾, 菅 恵嗣, 林 啓太, 岡本 行広, 馬越 大: 自己組織化する Pro-Drug 分子の開発ならびに集合特性解析, 化学工学会第 49 回秋季大会, 名古屋大学, 愛知, 2017 年 9 月 20-22 日 (Poster)
9. 菅 恵嗣, 川上 良介, 吉田 智洋, 岡本 行広, 馬越 大: 膜表面増強ラマン分光法の開発～金ナノ粒子を活用する高感度脂質膜分析～, 第 68 回コロイドおよび界面化学討論会, 神戸大学, 兵庫, 2017 年 9 月 6-8 日 (Oral) [若手口頭講演賞]
10. 韓 瑾, 菅 恵嗣, 林 啓太, 岡本 行広, 馬越 大: モデル生体膜における Resveratrol の分配挙動ならびに抗酸化機能の評価, 分離技術会 2017 年会, 明治大学, 神奈川, 2017 年 5 月 26-27 日 (Poster)

[その他] 投稿予定の学術論文

1. Tham Thi Bui, Keishi Suga, Tonya L. Kuhl, Hiroshi Umakoshi. Preferential Interaction between Ergosterol and Saturated Phosphocoline above Phase Transition Temperatures. *under preparation* (2018)
2. Jin Han, Keishi Suga, Keita Hayashi, Hiroshi Umakoshi. Synthesis of Fatty Acid-Modified Oxaprozin Derivatives and Their Assembly Behaviors in Aqueous Solution. *under preparation* (2018)
3. Shogo Taguchi, Keishi Suga, Keita Hayashi, Makoto Yoshimoto, Yukihiro Okamoto, Hidemi Nakamura, Hiroshi Umakoshi. Characterization of Ordered Phases in DMPC/DHPC Assemblies That Stabilize Chlorophyll a Aggregates in Diluted Conditions, *Langmuir*, *submitted* (2018)
4. Keishi Suga, Yoko Otsuka, Kengo Yoshida, Hiroshi Umakoshi. Smart Preparation of Polydiacetylene Hydrogel Based on Self-Assembly of Tricosadiynoic Acid and 1-Oleoylglycerol (Monoolein), *J.Chem. Eng. Jpn.*, *submitted* (2018)

[特別講演]

1. Tonya L. Kuhl 教授 (カリフォルニア大学デービス校) による特別講演: “Direct Force Spectroscopy - Colloidal Science of Biological Membranes” 2018 年 1 月 30 日開催.

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. 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 50 万円

参考となるHP等

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