

研究種目：新領域開拓 研究期間：令和3年10月～令和6年3月
 研究課題名：単一脂質分子の分離分析法の創成(Establishment of the separation and analysis method for single lipid molecule)
 ラボ長
 所属：物質創成専攻 化学工学領域
 氏名：岡本行広

【研究目的】

脂質分子は生体内で重要な役割を担っており、生物学/診断において、その分離分析は重要な項目の一つとなっている。“脂質分子”とひとくくりにしても、構造が多様であり、体内には何万種も存在していると予想されている。このため、脂質の分離分析には「究極的には1分子レベルで、構造がわずかに異なる分子でさえ分離が可能」/「1分子レベルでの構造解析」が要求される。しかし、現行法のクロマトグラフィー(LC)/質量分析(MS)では、分離/分析不可能な分子が多く存在し、“脂質分子の機能を網羅的に解析するリポドミクス”の発展の障壁となっている。

申請者は、微小空間内の特性と電気泳動法を駆使した生体分子の分離法と、脂質ナノ膜場の特性を活用した分離法の研究を推進している。そこで、この実績・技術とナノ電極による単一分子解析の融合により、リポドミクス研究を加速させる『単一脂質分子の分離分析法』の確立を目的とする。

【研究成果】

(1)基板上脂質膜(supported lipid bilayer : SLB)の作製とその解析

電気泳動分離と電気化学検出/構造解析を融合するアプローチとして2通り考えられる。その一つとして、基板上脂質膜(SLB)を作製し、これを用いることを検討した。その前段階として、SLBの膜構造を走査型プローブ顕微鏡(SPM)により解析し、膜特性を蛍光プローブの二波長

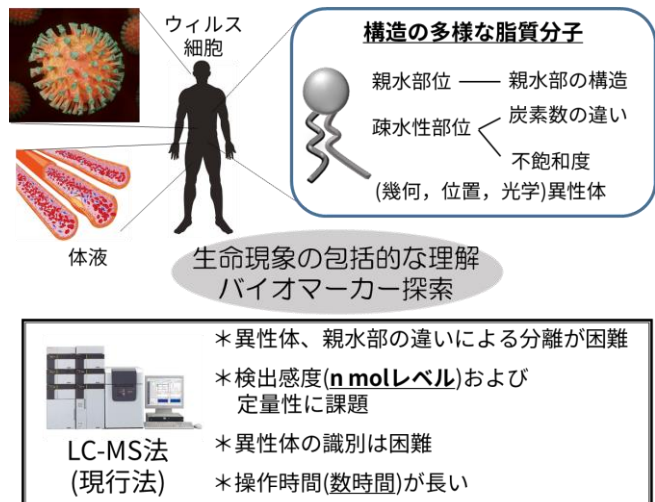


図1. リポドミクスの重要性和問題点

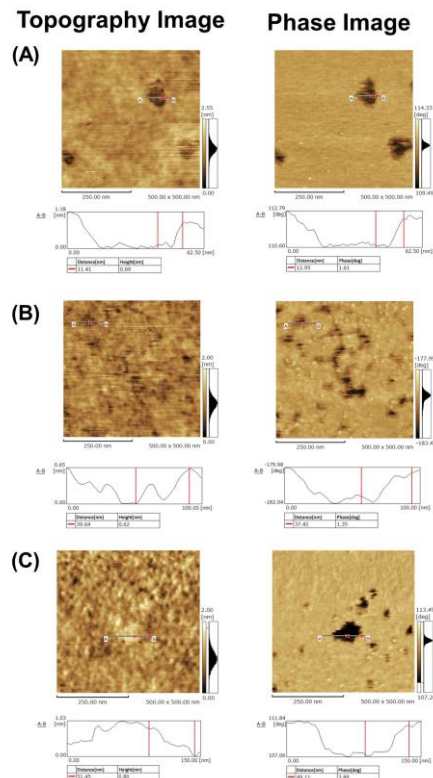


Fig.2 SPM images of SLB

測定により解析した。その結果、SPM 解析では、topography 画像と位相差画像解析により、相分離ドメインの種類、サイズ、形状、SLB の表面粗さを明らかとした。また、島構造が、ld 相から lo 相に転相する組成を明らかとした(Fig2)。一方、従

来法では、二光子顕微鏡などの特殊な装置のみが SLB の蛍光解析を可能としていた。しかし、この場合、高額な特殊な装置が必要であった。今回、可視域の蛍光プローブと蛍光二波長の ratio 測定により、二光子顕微鏡を不要として、SLB の膜特性(疎水性度合い)ならびに相状態の解析に成功した(Fig.3)。

(2)油水電気泳動に関する研究

脂質分子は一般的に水に不溶である。このため、脂質分子の電気泳動分離を実施するためには、脂質分子を溶解可

能であり、かつ導電性を有する溶液を見出す必要がある。そこで、有機溶媒と水溶液(詳細は特許申請を考慮しているため割愛)を各種選定し、その溶解性ならびに導電性を評価した。その結果、特定の組み合わせにより、親水性物質ならびに疎水性物質の両方を溶解し、良好な電気伝導性を示す溶液を見出すことに成功した(Fig. 4)。現在は、脂質分子に関して、同様の研究を実施しており、脂質分子への適用が可能と判別した段階で、電気泳動分離を実施する予定である。

(3)電気化学検出による単一分子検出

ナノ電極検出による単一分子検出に関しては、本年度は、基礎検討ならびに原理検証のため、各種脂肪酸に関して単一分子の検出ならびに構造解析に取り組んだ。その結果、(特許出願のため詳細は割愛)各種脂肪酸の単一分子検出ならびに、構造の特定に成功した。今後は、混合物中での単一分子検出や構造の特定を実施するとともに、単一脂質分子検出ならびに構造解析のメカニズムに関して研究を実施する予定である。

キーワード：脂質分子、電気泳動、リポドミクス、単一分子分離分析

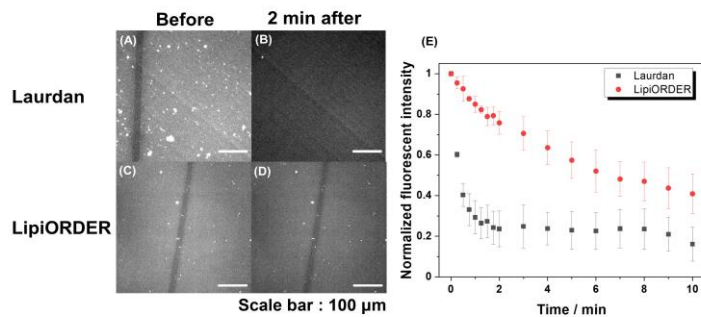


Fig.3 Fluorescence images of SLB and comparison of photostability of two probes.



Fig. 4 Pictures of hydrophobic and hydrophilic molecules dissolved solution for electrophoresis.

共同研究者等

(1) 共同研究者 (氏名・所属)

大城敬人・阪大産業研究所・准教授

(2) 研究協力者 (氏名・所属・学年 (学生の場合))

濱口海都・基礎工学研究科・M2

発表論文等 (令和4年3月31日現在)

[雑誌論文]

(1) Yukihiro Okamoto, Kaito Hamaguchi, Mayo Watanabe, Nozomi Watanabe and Hiroshi Umakoshi: Analysis of Phase Separated Planar Lipid Bilayer Membrane by Scanning Probe Microscope and Solvatochromic Fluorescence Probes, Membranes, *submitted*.

(2) 田口翔悟・岡本行広・菅恵嗣・Ho-Sup Jung・馬越大: バイセルを用いた基板上脂質二分子膜の調製および膜特性の評価, 化学工学論文集, *under revision*

[著書] なし

[学会発表]

(1) 岡本 行広・蓮沼 陽一郎・坂井 健太・湊元 幹太・渡邊 望美・馬越 大: カルジオリピン含有リポソームへの交流電場効果の解析, 化学工学会第87年会, 2022.3.16(水) - 3.18(金), 神戸大学 鶴甲第1キャンパス / オンライン

(2) 岡本 行広・蓮沼 陽一郎・坂井 健太・湊元 幹太・渡邊 望美・馬越 大: カルジオリピン含有巨大ベシクルの相状態解析と膜特性の制御法, 日本化学会 第102春季年会(2022) 2022年3月23日(水) ~ 26日(土) オンライン開催

参考となるHP等

<https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/0aa160470f7712f5.html>