

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あっても分離が可能」/「1分子レベルでの構造解析」が可能な原理が要求される。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するうえ、リポドミクスで要求される濃度域の定量は困難であり、“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。

(1) 単一細胞の分離同定を指向した単一細胞の膜特性解析法に関する研究

昨年度までに、一般的な顕微鏡システムで、平面二分子膜の相状態を解析可能とすることに成功した(図2)。今年度は、単一細胞の分離同定、そして、細胞からの脂質分子の抽出を可能とする手法の確立を目指した。この際、単一細胞の分離同定に関しては、腫瘍細胞と正常細胞で異なる物性をダイナミックな環境下で同定可能とすることを目指した。図2はモデル細胞である giant unilamellar vesicle (GUVs)を用いて研究を実施したものである。その結果、子ベシクルおよび親ベシクルの分離後、それぞれの膜特性の解析を達成するに至った。今後は、本技術を、実細胞において適用し、細胞種の同定分離へと展開していく予定である。

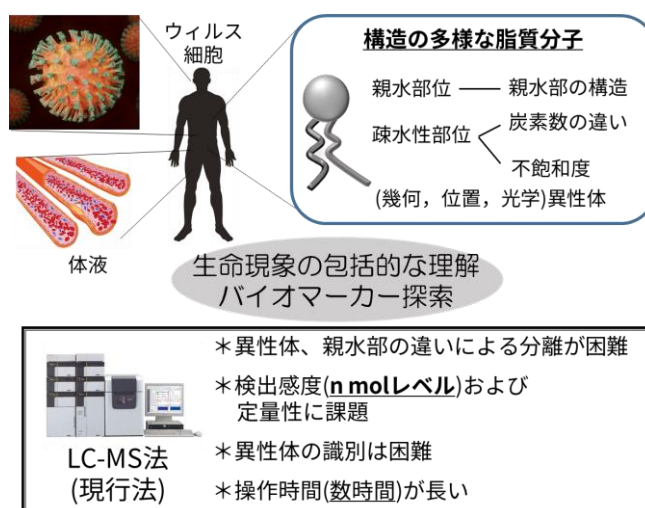


図1. リポドミクスの重要性と問題点

(2) 単一細胞からの分子抽出に関する研究

細胞からの脂質抽出を行う際には、まず、細胞を溶解後、脂質分子のみを抽出する必要がある。この際、従来法では、有毒な試薬を用いるうえ、振盪などの操作が必要である。そこで、今年度は、昨年に見出したエマルジョンを用いて、細胞溶解ならびに脂質分子の抽出効率を検討した。その結果、モデル細胞(リポソーム)を用いた検討では、リポソームを崩壊させ(図3)、脂質分子として抽出可能であることを実証した。そして、脂質分子の濃縮率は、組成により多少のばらつきはあったが、概ね1.5倍を達成した。今後は、さらに条件検討を実施し、抽出の効率化(時間、回収率、濃縮率)を検討していく計画である。



Fig.2 Fluorescence images and analysis of single GUV

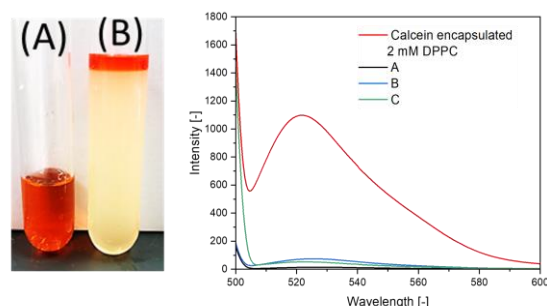


Fig. 3 Confirmation of artificial cells dissolution with nanoemulsion (A-C).

(3) 電気化学検出による単一分子検出

昨年度まで、ナノ電極検出による単一分子検出の基礎検討ならびに原理検証を行った。今年度は、各種リン脂質分子の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)各種リン脂質の単一分子検出ならびに、構造の特定に成功した(図4)。さらに、混合物中での単一分子検出や構造の特定が可能であることを実証した、そして、昨年度の脂肪酸分子の測定結果から、単一脂質分子検出ならびに構造解析において、重要となる化学構造を明らかにした。その結果、本手法は、脂質分子において有用な構造変化を一分子レベルで解析可能であるため、今後は、実細胞から抽出した分子の単一分子検出を検討していく計画である。

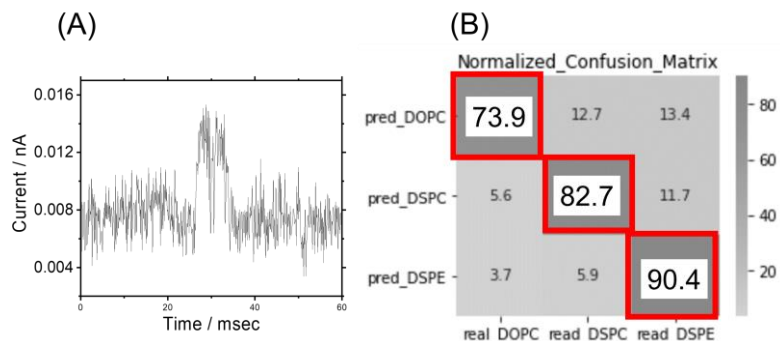


Fig.4 (A)Single molecular detection by nanopore electrode and identification of detected lipid molecules by machine learning.

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

研究経費（R4 年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
789,861 円	442,367 円	158,030 円	0 円	159,742 円	1,550,000 円

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））

イ・ジョンフ・基礎工学研究科・M1

発表論文等（令和 5 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* **2022**, *12*, 770(11pages).

<https://doi.org/10.3390/membranes12080770>

(2) Hayato Takase, Koichiro Shiomori, Yukihiro Okamoto, Nozomi Watanabe, Hideki Matsune, Hiroshi Umakoshi: Micro Sponge Ball: Preparation and Characterization of Sponge-like Cryogel Particles via Inverse Leidenfrost Effect, *ACS Applied Polymer Materials*, *4*(10), 7081-7089 (2022)

〔著書〕

(1) 岡本行広, キャピラリー電気泳動法の測定原理と装置活用のコツ, キャピラリー洗浄での留意点, 「キャピラリー電気泳動のデータ解析と分析テクニック」, (技術情報協会), in press

(2) 岡本 行広, ヤヌス粒子の熱泳動に対する基材表面の効果, ぶんせき, in press

〔学会発表〕

1. 岡本 行広, 濱口 海都, 渡邊 真与, 渡邊 望美, 馬越 大, 相分離平面脂質膜のマイクロ/マクロスケール解析法の開発, 膜シンポジウム 2022, 兵庫(神戸), 2022 年 11 月 9 日~10 日
2. 岡本 行広, 濱口 海都, 電気泳動法によるナノクラスターとの側方間相互作用解析に関する研究, 第 42 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 山形(鶴岡), 2022 年 10 月 26~10/28
3. 大城 敬人, 岡本 行広, 谷口正輝, リピドミクス解明に向けた 1 分子トンネル計測法の開発, 日本分析化学会第 71 年会, 岡山, 2022 年 9 月 14 日~16 日
4. 岡本 行広, イジョンフ, 大城敬人, ナノポア解析のため脂質抽出法の開発, 第 83 回分析化学討論会(富山), 2023 年 5 月 20 日~21 日

〔その他〕 特になし

参考となる HP 等

<https://rd.iai.osaka-u.ac.jp/ja/Oaa160470f7712f5.html>