

令和5年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：新領域開拓研究 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

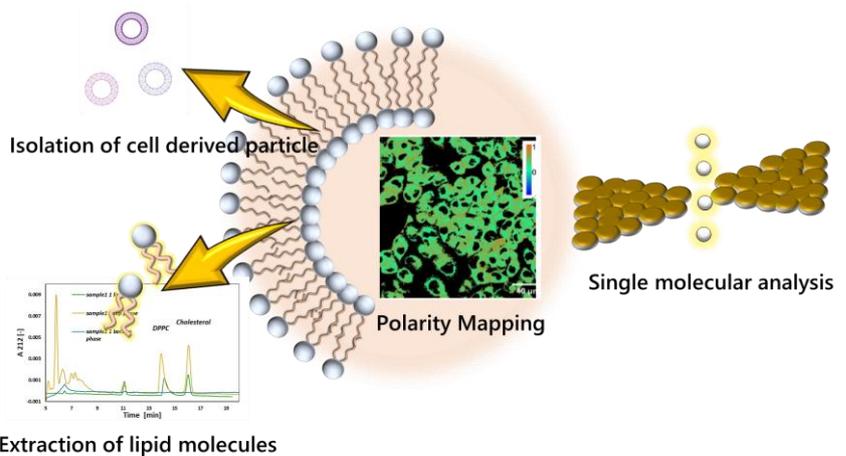
所属：物質創成専攻 化学工学領域

職位 准教授 氏名：岡本行広

研究成果：

(概要)

リポミクス研究を加速させる新規原理(脂質抽出, 脂質分子の解析)の創出を目指した研究を実施している. 今年度は, 昨年度までの研究を発展させる内容を実施した. 一つは, 細胞すべての脂質分子を抽出回収する手法. もう一つは, 特定の細胞内現象に関係する脂質小胞体を回収する手法である. 前者に関しては, 細胞膜を構成



する脂質分子の抽出を従来法より簡便に回収できる可能性を示唆する結果を得た. 後者についても, 脂質小胞体の回収およびその膜特性解析を可能することに成功した. また, 脂質分子の解析に関しても, 機械学習の手法の改良に取り組み, 昨年度と比較し, 性能の向上を実現した.

(本文)

【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

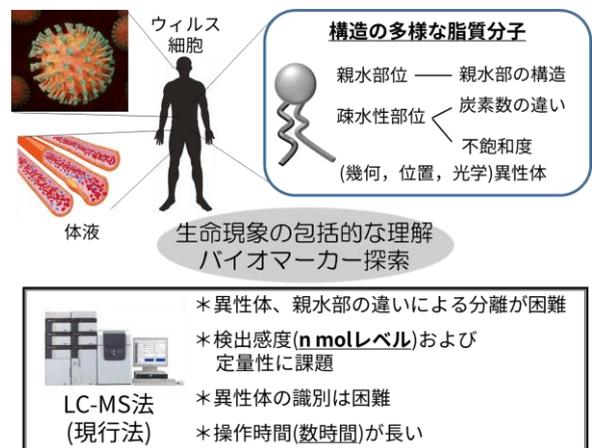


図1. リポミクスの重要性と問題点

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) 細胞由来/細胞膜由来の脂質分子の抽出を目指した研究

昨年度はモデル細胞(*giant unilamella vesicle (GUV)*)から子ベシクルを産生させ脂質の同定を行ってきた。今年度は、さらに研究を発展させ、生細胞からの脂質抽出を指向した研究を二通実施した。一つ目として、細胞が生産する脂質小胞体の回収および *in situ* での膜特性解析を試みた。その結果、特定の刺激に対して(Fig2)に示す脂質小胞体が生産され、これの回収に成功した。また、*in situ* での膜特性解析を二光子顕微鏡により実施し、脂質小胞体が高い疎水性を示すことを明らかにした。二つ目の取組として、細胞膜を構成する脂質分子の抽出に関する研究を実施した。従来法では、有毒な試薬を用いる点、微量な抽出液に濃縮し、ロスなく回収することが困難な点が問題となっている。そこで、各種抽剤と抽出条件を検討し、従来法を上回る性能を目指した。その結果、細胞モデルのリポソームを溶解し、高い回収率で脂質分子を抽出可能である結果を得ることに成功した(Fig3)。今後は、荷電脂質や無極性脂質などの各種脂質の抽出効率や選択性を評価する計画である。

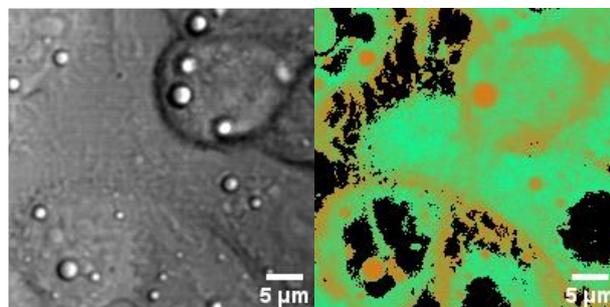


Fig.2 Cell derived lipid nanoparticles and its fluorescence imaging.

(2)電気化学検出による単一分子検出ならびに機械学習による脂質構造解析

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、昨年度とは異なる機械学習法を用いて脂質の単一分子検出ならびに構造解析を実施した。その結果、ある機械学習法の適用により、脂質分子の構造解析の識別率の向上に成功した。このため、現在は、昨年よりも難易度の高い、異なる異性体での構造解析に取り組んでいる段階である。

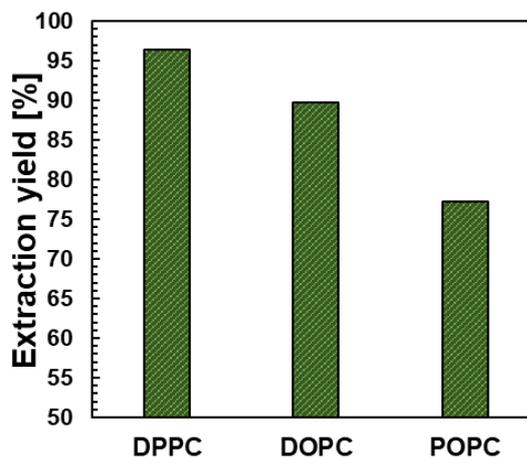


Fig. 3 Extraction yield of model lipids with molecular X

研究経費（R5年度）の内訳：

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
1,458,989 円	41,011 円	0 円	0 円	6,110 円	1,500,000 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））

麻野唱・基礎工学部・B4

発表論文等（令和6年3月31日現在）：

〔雑誌論文〕

1. Natsuimi Ito, Nozomi Morishita Watanabe, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Multiplicity of Solvent Environments in Lipid Bilayer Revealed by DAS Deconvolution of Twin Probes: Comparative Method of Laurdan and Prodan, *Biophysical Journal*, 122, 1–10, (2023).
2. Thaneeya Samwang, Nozomi Morishita Watanabe, Yukihiro Okamoto, Sira Srinives, Hiroshi Umakoshi: Study of Chemical Polymerization of Polypyrrole with SDS Soft Template: Physical, Chemical, and Electrical Properties, *ACS Omega*, 8(51), 48946-48957 (2023).
3. Engang Ciptawati, Hayato Takase, Nozomi Morishita Watanabe, Yukihiro Okamoto, Hadi Nur, Hiroshi Umakoshi: Preparation and Characterization of Biodegradable Sponge-like Cryogel Particles of Chitosan via the Inverse Lidenfrost (iLF) Effect, *ACS Omega*, 9(2), 2383-2390 (2024).
4. Thaneeya Samwang, Nozomi Morishita Watanabe, Yukihiro Okamoto, Hiroshi Umakoshi: Exploring the Influence of Morphology on the Bipolaron and Polaron Ratios and Conductivity in Polypyrrole in the presence of surfactants, *Molecules*, accepted (2024).

〔著書〕

岡本行広，キャピラリー電気泳動法・イオンクロマトグラフィーの分析テクニック～サンプルの種類や目的に応じた最適な条件設定のコツ～，第一章，第四節，2023，技術情報協会(分担執筆)

〔学会発表〕

Y. Okamoto, Preparation and Characterization of Cell Membrane Coated Materials, ISNM 2023 (Invited Speech) 他 数件

〔その他 解説記事〕

岡本行広，ぶんせき，2024，4，in press

外部資金獲得状況・申請状況：

萌芽研究，学術変革領域研究(A)，公益財団法人 立石科学技術振興財団研究助成(A)，豊田理研スカラー共同研究

参考となるHP等：

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