

## 論文の内容の要旨

論文題目                      Stabilization and Functionalization of Bicelles  
(Magnetically Orientable Biomembrane Models) Using Tailor-designed Surfactants  
(界面活性剤の精密設計に基づくバイセル(磁場配向能を持つ平板状生  
体膜モデル)の安定化と機能化)

氏名                      松井 領市

### 【緒言】

膜タンパク質や膜作用物質の機能・膜内構造を詳細に分析する際、化学的なアプローチから構成された生体膜モデルが頻繁に用いられる。これまで利用されてきた生体膜モデルとして(単層/多層)ベシクルやミセル、ガラス基盤の細孔に配列された二重膜(黒膜)などが主に挙げられるが、それらの集合構造と生体膜との環境の違いが分析対象に影響を与えることが多く、試行錯誤を繰り返しながら最適な生体膜モデルを選ぶ必要がある。しかしながら、近年新たに、バイセルと呼ばれる均一分散した平板状脂質二重膜が報告された(Figure 1)。バイセルは、長鎖リン脂質に適切な界面活性剤を添加することにより、脂質二重膜の「へり」が界面活性剤で被覆された平板状の脂質二重膜会合体である。ミセルやベシクルと比較して、バイセルは脂質二重膜を持ちながらも均一系としての取り扱いが容易であり、加えて、磁場引加によりディスクを一義的に配向できるため、膜タンパク・膜内物質の研究、とりわけNMR解析における革新的ツールとなる。しかしながら、既往のバイセル構造は温度、濃度、塩強度、pHなどの因子が同時に揃った場合にのみ発現するため、その応用範囲が極度に制限される。加えて、これまでに用いられてきた界面活性剤は、バイセル形成のみを目的に市販品の中から選択されることが多く、ここに新たな機能を付与する試みは皆無に等しい。そこで本研究では、バイセル形成に用いる界面活性剤を合目的的に設計することにより、バイセルの安定化と機能化を目指した。

本研究では、バイセルを構成する既知の界面活性剤であるコール酸ナトリウムに注目した(Figure 2a)。コール酸ナトリウムの基本骨格である脂環ユニットは、片面にのみ3つの水酸基を有するため、片面は親水性、反対面は疎水性、というユニークな構造を持った界面活性剤となる。この親水面の水酸基を足場に望みの置換基を導入することにより、構造明確な界面活性剤を合目的的に設計することが可能となる。

### 【バイセル構造の安定化を実現する新規界面活性剤】

コール酸ナトリウムとリン脂質の混合物では、コール酸ナトリウムの疎水面が脂質膜のエッジ部に接し、親水面が水に向くよう集合する。これにより脂溶性の高いリン脂質を水から保護するように会合体を形成し、均一なバイセルを形成する。しかしながらコール酸ナトリウムの一部は、親水面同士を会合させた二量体を形成することで脂質膜内に入り込むことが知られている(Figure 2b)。このプロセスはバイセル構造を複雑にするとともに、バイセル不安定化の一因となっていると考え、3つの水酸基にオリゴエチレングリコール鎖を導入したコール酸ナトリウム誘導体を設計した。3本のオリゴエチレングリコール鎖の立体障害により、コール酸ナトリウムの二量化が妨げられるとともに、その末端を様々な置換基で修飾することで、界面活性の微調整が可能となる(Figure 2a, c)。この研究を通じ、バイセル形成用の最適な界面活性剤を分子設計する上で、新たな指針を得ることを目指した。

#### (i) 末端残基の違いによるバイセルの安定性の変化

二重膜モデルとして一般的に用いられるリン脂質であるジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC; Figure 2a)を用い、界面活性剤として疎水性および嵩高さの異なる末端残基(R)を導入した化合物群SC-Rを、DMPC/SC-R = 5:1、重水80% w/vの条件にて混合し、それぞれバイセルを形成する温度範囲を<sup>31</sup>P NMRにて確認した(Figure 3)。低温領域では、いずれの界面活性剤もリン脂質との混合ミセルを形成するため、0 ppm付近にシャープなシグナルが観察される。界面活性剤の選択が適切な場合、一定温度以上においては、磁場配向した脂質膜に特徴的なピーク(-10 ppm付近)を与え、このピークの存在を以てバイセル形成を確認した。結果としてSC-OnC<sub>4</sub>またはSC-OrC<sub>4</sub>の二種を用いた場合、室温から90 °Cという前例のない広い温度範囲においてバイセルを形成できることが判明した。加えて、このような安定なバイセルを形成する2種の界面活性剤は、オリゴエチレングリコール鎖末端置換基の剛直性や疎水性を絶妙にコントロールすることによって得られることが明らかとなった。

上記のなかで最も安定なバイセルを与えたSC-OtC<sub>4</sub>および基本骨格であるコール酸ナトリウムを界面活性剤として選び、得られるバイセル (DMPC/SC-OtC<sub>4</sub> = 5:1、DMPC/コール酸ナトリウム = 4.2:1、ともに重水80% w/v) の磁場配向能力を<sup>2</sup>H NMRを用いて比較した (Figure 4)。バイセルとの相互作用により、溶媒である重水の異方的配向が誘起されたとき、重水のスペクトルは四極子分離を起し、2本に分裂する。また、分裂の大きさは重水の配向度に依存するため、バイセルの配向度、バイセルが周辺分子の配向を誘起する能力について見積もることができる。コール酸ナトリウムを用いたバイセルは30~50 °Cにおいてのみ四極子分離を引き起こすが、それ以外の温度範囲においてはバイセルを形成しない。それに対し、コール酸に改変を加えたSC-OtC<sub>4</sub>系においては23 °Cから90 °C以上に渡る広い温度範囲において四極子分離が起こった。また、30 °Cにおける四極子分離を比較すると、SC-OtC<sub>4</sub>系 (24 Hz) はコール酸ナトリウム系 (9 Hz) より大きな値を与えた。以上より、長鎖親水基の導入、および末端に嵩高い残基の導入、という単純な改変によって、室温から90 °C以上に渡る広範な温度範囲において系全体を配向する能力の高いバイセルを形成できることが明らかになった。

(ii) SC-OtC<sub>4</sub>を用いたバイセルの希薄条件への耐性、および脂質汎用性

一般的なバイセルは、希薄条件においてはその配向能力を失ったり、ベシクルへと転移したりする。しかしながら、DMPC/SC-OtC<sub>4</sub> = 5:1にて構成されたバイセルは、重水含有率を95% w/vまで濃度を下げても崩壊することなく、広い温度範囲においてバイセルを形成することが判明した。希薄条件でも配向能が保持されているため、タンパク質や水溶性小分子化合物などのNMR構造解析において、測定対象に与える影響を最小限に抑えることができる。次に、SC-OtC<sub>4</sub>を用いたバイセルの脂質一般性についても検討した。1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン (POPC) は二重結合を有する脂肪酸を持つため、相転移温度が低く、脂質二重膜の流動性を増大させる。特にPOPCとDMPCの等量混合物は、生体膜をより良く模倣した脂質膜を与えるが、既往の界面活性剤を用いてこれをバイセル化した場合、極めて狭い温度範囲 (10~15 °C) においてしか、配向性バイセルは形成できない。しかしながら、SC-OtC<sub>4</sub>を界面活性剤に用いたところ、配向性バイセルが安定に維持される温度範囲 (10~25 °C) が飛躍的に拡大した。とりわけ室温においても利用可能であるため、SC-OtC<sub>4</sub>/POPC/DMPC系バイセルは有用な生体膜モデルを提供すると考えられる。加えて、用いるリン脂質を相転移温度の低いジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC) に置き換えることで、配向性を有する温度範囲を5 °Cから90 °C以上にまで広げることが判明した。これは、事実上の「全温度範囲」をカバーすることができる初めての配向性バイセルである。

#### 【界面活性剤の重合によるバイセル構造の安定化】

従来のバイセルの研究では、界面活性剤の設計を通じてバイセルを機能することで、生体膜モデルや配向剤としての有用性を高める試みが行われてこなかった。本研究では、バイセル機能化の一例としてコール酸ナトリウムの分子設計自由度を利用し、メタクリルアミド基を持つ重合性界面活性剤SC-M<sub>1</sub>およびSC-M<sub>3</sub>を新たに設計・合成した (Figure 5)。これらを界面活性剤として用いることによりバイセルを形成し、系内で界面活性剤を重合することで、バイセルを熱的・速度論的に安定化する新たな方法論の提案を目指した。

(i) 重合によるバイセル安定化のNMRによる検証

バイセルの系内重合を行うために、まずは重合性界面活性剤 (SC-M<sub>1</sub>、SC-M<sub>3</sub>) を用いてバイセルを形成する必要がある。DMPCとSC-M<sub>1</sub>およびSC-M<sub>3</sub>を重水中にてDMPC/SC-M<sub>1</sub>/SC-M<sub>3</sub> = 80:19:1、重水比90% w/vで混合した系を<sup>31</sup>P NMRおよび<sup>2</sup>H NMRで確認した。配向性を有するバイセルとなっている温度範囲は25~40 °Cの間のみであり、それより低温側では配向性のない混合ミセルを与え、高温側では白色沈殿を生じ不溶性のベシクルとなっていることが判明した (Figure 6a)。

上記の混合物を40 °Cに置くことで配向性バイセルを形成し、ここにK<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (モノマーに対して0.01等量) を開始剤、TMEDAを還元剤として添加することにより、界面活性剤のラジカル重合を行った。<sup>31</sup>Pおよび<sup>2</sup>H NMRスペクトルより、重合により得られた混合物は25 °Cから90 °C以上において配向性を有するバイセルを形成していることが明らかとなった (Figure 6)。重合前と比較すると、重合後の混合物においては、バイセルの高温領域における安定性が飛躍的に向上している。加えて、重合後のバイセルは従来のバイセルとは異なり、20 °C以下においても混合ミセルへと転移せずに脂質二重膜構造を維持できる。

界面活性剤の系内重合は、バイセルの熱安定性のみならず、配向剤としての能力も向上させることが分かった。<sup>2</sup>H NMRスペクトルにおいて、重合後の混合物は26 °Cから90 °Cまでの広範な温度範囲において四極子分離が確認され、40 °Cにおいても25 Hzという、実用面において十分な四極子分離を与えた。生体分子に関する近年のNMR構造解析においては、サ

ンプルの性質や測定の目的に応じて、高温から低温まで多様な温度条件での測定が必要とされており、本バイセルはこれらの要求に応えるものである。

(ii) 界面活性剤の重合によるバイセル同士の融合の抑制

従来のバイセルにおいて、バイセル同士は常に融合と解離を繰り返しながら存在していることが知られている。そのため2種類の異なるバイセル同士を混合するとバイセル同士が融合し、2つの系を平均化した新たな系が生成するため、生体膜モデルとしてバイセルを利用した場合には複雑な実験モデルを作ることができないのが現状である (Figure 7a)。本研究では、脂質膜の「へり」に位置する界面活性剤の重合により、界面活性剤の解離平衡を遅延させ、バイセル同士の融合を抑制することを期待し、以下の実験を行った。

DMPC/SC-M<sub>1</sub>/SC-M<sub>3</sub>の混合系において、界面活性剤のモル比を上げる (DMPC/界面活性剤 = 0.5) と、サイズが小さく、配向性を持たないバイセルとなる (Figure 7b(ii))。この混合物 (DMPC/界面活性剤比 = 0.5) と、配向性バイセルを与える前述の混合物 (DMPC/界面活性剤比 = 5, Figure 7b(i)) とを40℃にて混合した。混合直後、40℃における<sup>31</sup>P NMRスペクトルを確認すると、0 ppm付近にのみシャープなピークが観測された (Figure 7b(iii))。2種類のバイセルは混合し、リン脂質/界面活性剤比が平均化され結果、全体が配向性を持たないバイセルに転移したものと考えられる (Figure 7a)。配向性を持たないバイセル (DMPC/界面活性剤 = 0.5) に関しても、配向性バイセルの場合と同様の手法で、その初期構造を保ったまま系内重合を行うことが出来る (Figure 7c(ii))。系内重合した二種類のサンプルを用い、上記と同様の混合実験を行い、混合物の<sup>31</sup>P NMRスペクトルを追跡した。その結果、重合前のバイセルとは対照的に、重合後のバイセルは融合を起こさないことが明らかとなった。すなわち、0 ppm付近と-10 ppm付近に、それぞれサイズの異なるバイセルに対応する特徴的なピークが明確に確認され (Figure 7c(iii))、これらのピーク形状は一日後も維持された。以上の事実から、界面活性剤の重合によって、バイセルの速度論的安定性を向上させることが判明した。複数成分が共存する生体膜モデルを構築する上で、本バイセルが有用なコンポーネントとなることが期待される。

(iii) 重合バイセルの特異な集合構造

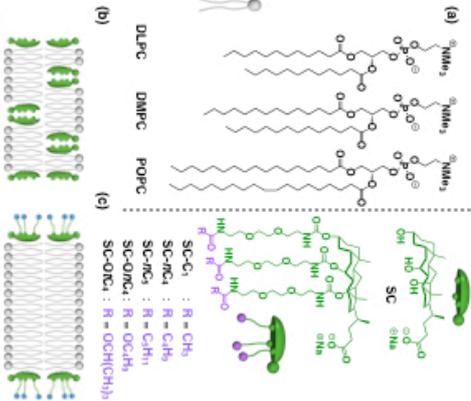
配向性バイセル (DMPC/SC-M<sub>1</sub>/SC-M<sub>3</sub>=80:19:1) について、小角X線散乱解析 (SAXS) を行うことで、重合前後のバイセルの集合構造を調べた (Figure 8a)。重合前、重合後のいずれの場合においても、脂質二重膜構造に特有のブロードな散乱ピークが $q = 0.06 \sim 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ に観察された。この散乱に加え、重合前のバイセルは、二重膜間のスタックに由来する弱い回折ピーク (面間隔 6.2 nm) を示し、この回折もまた、一般的なバイセルでしばしば観察される。一方、重合後のバイセルでは、小角領域 ( $q = 0.03 \text{ \AA}^{-1}$ ) に強い回折ピークが観察され、これは極めて広い面間隔 (19.8 nm) でバイセルが配列していることを示す (Figure 8b)。また、これらの回折ピークの半値幅解析から、重合前のバイセルは系中で平均2枚以下の膜同士のみがスタックしているのに対し、重合後は膜同士が平均13枚スタックしたドメインを有する、前例のない高秩序の集合構造を取ることが明らかになった。バイセル間の間隔が水和されより広く保たれているため、幾重にも脂質二重膜が密に折り重なった多重ベシクルや従来のバイセルと比較して、脂質二重膜モデルとしてより理想的に振る舞うものと考えられる。

【結言】

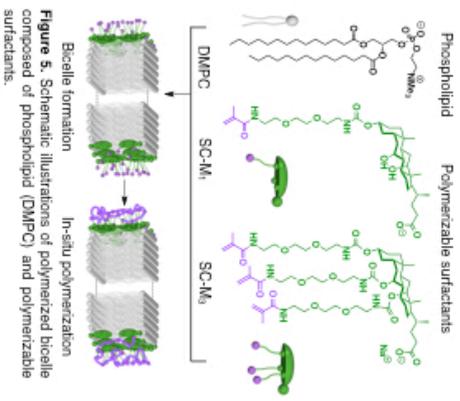
本研究において、脂環ユニットの表裏にそれぞれ親水面・疎水面を同時に有するコール酸の特異な性質を利用し、戦略的に界面活性剤を設計することで、従来不安定と見なされてきたバイセルを飛躍的に安定化させることに成功した。また、これまで全く行われてこなかった「界面活性剤の重合」という新たなアプローチにより、従来のバイセルでは実現し得なかった熱的・速度論的安定性、および特異な集合構造をバイセルに付与することに成功した。これらの新たなコンセプトにより、バイセルの生体膜モデルとしての実用性・汎用性を向上させることを実証した。



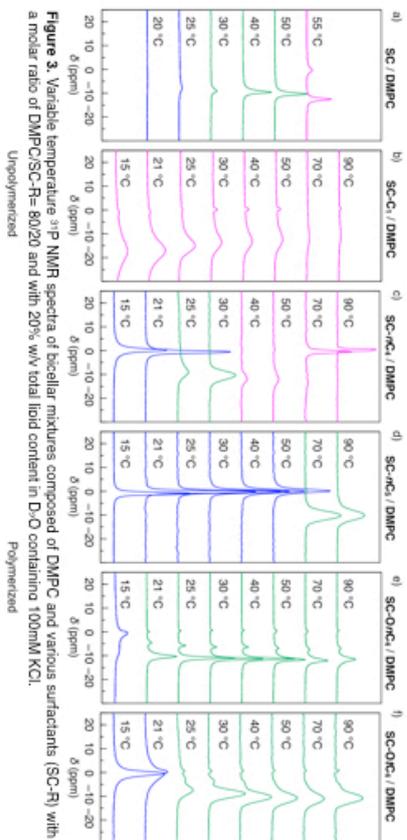
**Figure 1.** Schematic illustration of membrane models. (a) Micelle, that doesn't have bilayer, (b) vesicle, that has curved bilayer, (c) bicoelle, that has flat bilayer.



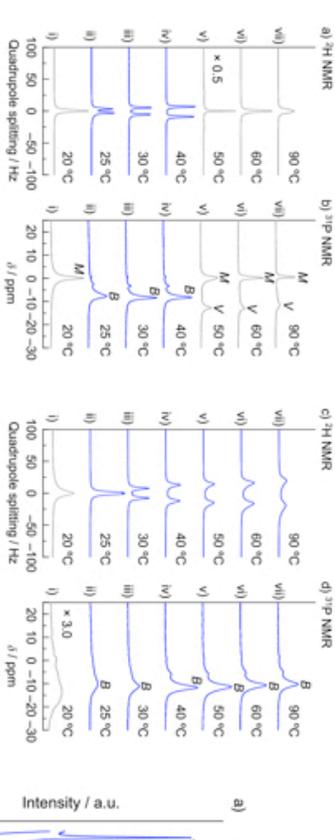
**Figure 2.** (a) Molecular structures of phospholipids, and surfactants. (b) Schematic illustrations of proposed structure of bilayers made from DMPC/sodium cholate. (c) Proposed structure of bicoelles made from DMPC/SC-Rs.



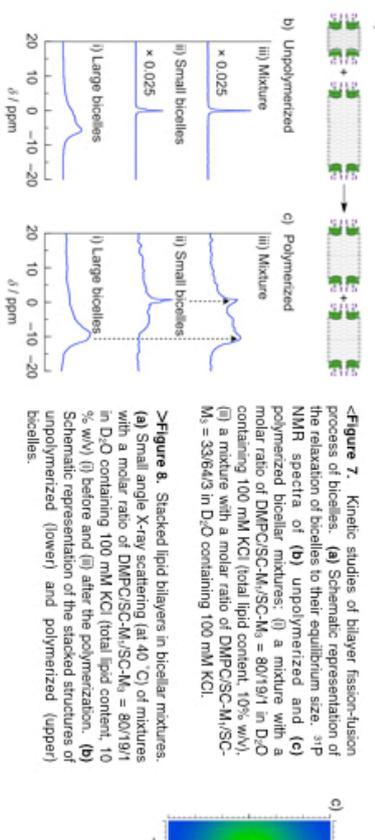
**Figure 5.** Schematic illustrations of polymerized bicoelle composed of phospholipid (DMPC) and polymerizable surfactants.



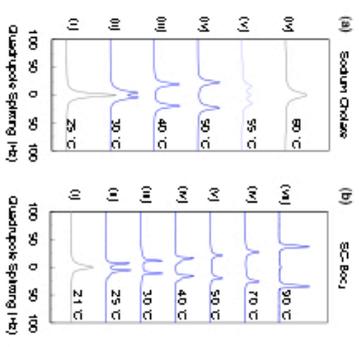
**Figure 3.** Variable temperature  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of bicellar mixtures composed of DMPC and various surfactants (SC-R) with a molar ratio of DMPC/SC-R=80/20 and with 20% w/v total lipid content in  $\text{D}_2\text{O}$  containing 100mM KCl.



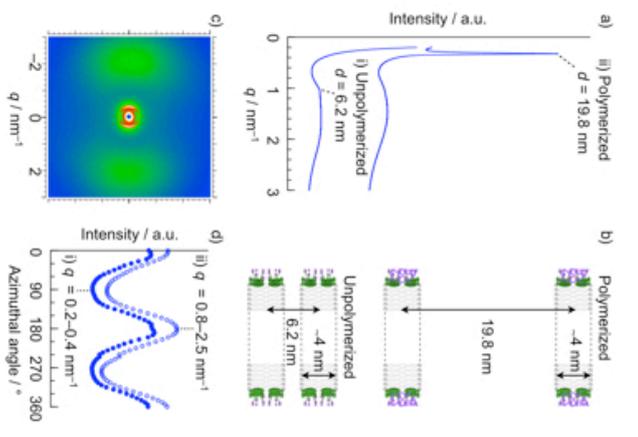
**Figure 6.** Variable temperature NMR spectra of bicellar mixtures composed of DMPC and polymerizable surfactants (SC-M, and SC-M<sub>2</sub>) with a molar ratio of DMPC/SC-M/SC-M<sub>2</sub> = 80/19/1 before and after the polymerization. (a)  $^1\text{H}$  NMR spectra and (b)  $^{31}\text{P}$  quadrupole splitting of the mixtures with 10 % w/v total lipid content in  $\text{D}_2\text{O}$  containing 100 mM KCl. In  $^{31}\text{P}$  NMR spectra, M, B, and V indicate signals assignable to micelles, bicoelles, and vesicles, respectively.



**Figure 7.** Kinetic studies of bilayer fission-fusion process of bicoelles. (a) Schematic representation of the relaxation of bicoelles to their equilibrium size.  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of (b) unpolymerized and (c) polymerized bicellar mixtures: (i) a mixture with a molar ratio of DMPC/SC-M/SC-M<sub>2</sub> = 80/19/1 in  $\text{D}_2\text{O}$  containing 100 mM KCl (total lipid content, 10 % w/v) (i) before and (ii) after the polymerization. (b) Schematic representation of the stacked structures of unpolymerized (lower) and polymerized (upper) bicoelles.



**Figure 4.** Temperature-dependent  $^1\text{H}$  quadrupole splittings of bicellar systems composed of (a) DMPC/sodium cholate with molar ratio of DMPC/sodium cholate=4/21, and (b) DMPC/SC-Bocs with molar ratio of DMPC/SC-Bocs=5/1.



**Figure 8.** Stacked lipid bilayers in bicellar mixtures. (a) Small angle X-ray scattering (at 40 °C) of mixtures with a molar ratio of DMPC/SC-M/SC-M<sub>2</sub> = 80/19/1 in  $\text{D}_2\text{O}$  containing 100 mM KCl (total lipid content, 10 % w/v) (i) before and (ii) after the polymerization. (b) Schematic representation of the stacked structures of unpolymerized (lower) and polymerized (upper) bicoelles.