

博士論文

Molecular Engineering of Lipid Membranes
for Materials Science

(材料科学に向けた脂質膜の分子工学)

大竹 沙耶

【緒言】

脂質膜は細胞外膜や細胞内小器官の膜の基本構造として、あらゆる生物で観察される。主要な構成要素であるリン脂質は極性（親水性）の頭部と非極性（疎水性）の尾部を有する両親媒性分子であり（Figure 1a）、水中において、非極性の尾部同士を集合させ、極性の頭部を外側に向けるようにして自己集合体を形成する。そのため脂質膜において、水と接する膜表面層は親水的であるのに対し、内側には膜外物質から隔離された疎水的な環境が実現されている（Figure 1b）。またリン脂質同士は、構成分子が共有結合によって連結された高分子とは異なり、非共有結合的に相互作用しているため、膜上で自由に回転・拡散することができ、特徴的な流動性と弾性をもたらしている。加えて、脂質分子の集合体は周辺環境だけでなく形成プロセスにも大きく影響を受け、多様な形状の構造をとりうる。このような脂質膜の性質が、細胞膜における基本的なバリア機能、膜タンパク質の活動に伴う構造変化や再配置、周囲の環境に応じた柔軟な膜の変形・融合・分裂を可能にし、生命現象を支えている。

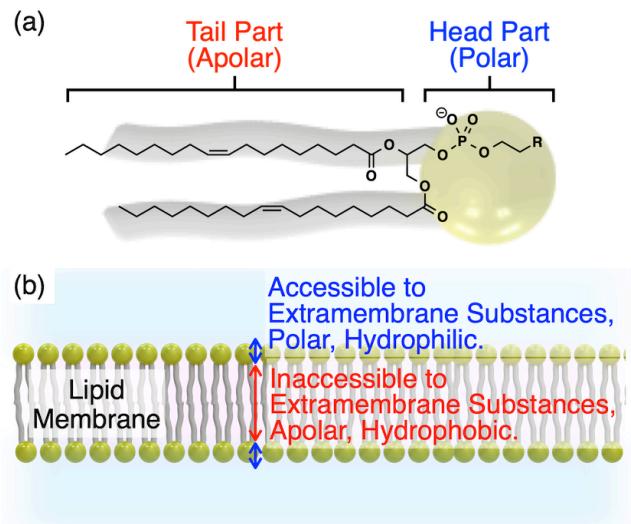


Figure 1. (a) Structure of amphiphilic phospholipid. (b) Schematic illustration of bilayer membrane.

それゆえ脂質膜は、構造と機能の両面で興味深い構造体であり、これまでも分子や分子集合体のデザインを含む“分子工学的アプローチ”によって、その応用が模索されてきた。例えば生体膜に対して、遺伝子工学や代謝標識、化学的手法により膜表面を修飾することで、その性質や外界物質との相互作用を改変及び制御することがきる^[1]。また、人工脂質膜は細胞のモデルやドラッグデリバリーのキャリア、バイオセンサーの足場等として広く利用されている^[2]。

本研究では、親水・疎水両方の性質を併せ持つ超分子集合体としての脂質膜に対して、構成分子の特性を理解し分子設計やサンプル調整条件に反映させることで、新しい機能や材料を開拓することに取り組んだ。本研究は以下の項目から構成される。

- 1) 細胞膜を修飾する両親媒性分子を開発し、光刺激によって膜の物質透過性を向上し膜不透過な物質の細胞内送達を達成した。
- 2) 脂質膜によって構築された特異な架橋構造を有するハイドロゲルを開発した。

【研究 1】細胞内ドラッグデリバリーのための光応答性細胞膜修飾剤⁽¹⁾

核酸やタンパク質、ナノ粒子の細胞内導入は、遺伝子発現や代謝、シグナル伝達などの細胞現象を可視化し、また制御・調節するための有効なアプローチの一つである。しかしこれらの多くは細胞膜不透過であり、細胞内に効率的に導入するための技術が必要不可欠である。なかでも、光照射によって一時的に細胞膜に孔をあけるオプトポレーション^[3]は、光の性質に由来する高い時間空間分解能と生体への低侵襲性、さらには、あらゆる細胞・ゲスト物質に適用可能な汎用性を兼ね備えており、生体内への応用に有効である。しかし従来のオプトポレーションは光刺激として強力なパルスレーザーを必要とするため、その高いポテンシャルに反していまだ応用には遠い。その他に、光増感剤を利用して一重項酸素 (1O_2) などの活性酸素種を発生させ、細胞膜を酸化的に部分破壊する手法も存在する。 1O_2 は反応性が高く水中での寿命が極めて短いため、細胞膜中に局在できる疎水性の色素が光増感剤として用いられる。しかし、形質膜 (細胞の最も外側の膜) に対する酸化的オプトポレーションは細胞死に直結するとされ、成功例は報告されていなかった。

本研究では、蛍光色素ニトロベンゾオキサジアゾール (NBD) を有する両親媒性高分子で細胞膜を修飾することにより、高効率かつ低毒性なオプトポレーションを実現した。

(1) 細胞膜修飾剤の合成

蛍光色素 NBD が、親水性のポリエチレングリコール (PEG) 鎖と疎水性のオレイル基からなる両親媒性高分子 (Biocompatible Anchor for Membrane; BAM)^[4]に連結さ

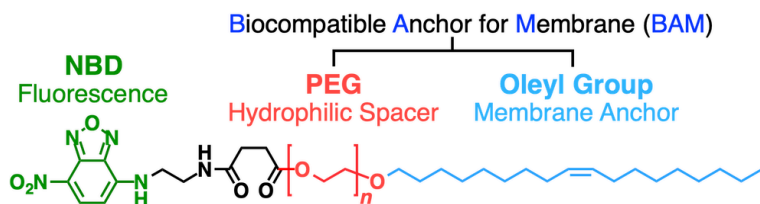


Figure 2. Molecular structure of cell membrane modifier NBD-BAM.

れた細胞膜修飾剤 NBD-BAM (Figure 2) を合成した。当初、膜の蛍光標識剤として NBD を分子設計に組み込んでいたが、細胞膜上で蛍光を発するのみならず、光刺激によって細胞膜の物質透過性を高め、外因性物質の取り込みを促進することを偶然発見した。

(2) 細胞膜修飾と量子ドットの細胞内導入

NBD-BAM を培養細胞に加えると細胞から NBD に由来する蛍光が観察されたことより、オレイル基の挿入を介して NBD-BAM が細胞膜上に局在していると考えられる。この細胞にレーザー光を照射し、洗浄後に量子ドットを加えると、細胞内から

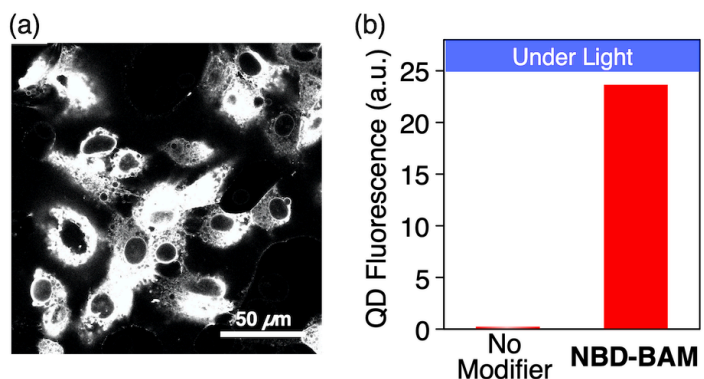


Figure 3. (a) A confocal laser scanning microscopy image of the cells taking up quantum dots (QDs) ($\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$). (b) Fluorescence intensities of QDs taken-up into cells.

量子ドット由来の蛍光が観察された (Figure 3a)。ここで用いた量子ドットは 4.7 nm の粒径をもち、表面が負に帯電しているため、同じく負電荷を帯びている細胞膜を透過することはできない。事実、非修飾細胞は量子ドットをほとんど取り込まなかったが、NBD-BAM で修飾した細胞を照射した場合は、非修飾細胞の 100 倍以上の蛍光強度が観察された (Figure 3b)。エンドサイトーシスなどのエネルギー依存的な物質取り込みが阻害される低温 (4 °C) 下でも同様に量子ドットの取り込みが見られることから、量子ドットは形質膜を直接透過していることが示唆された。また、膜不透過性のタンパク質も同様の方法で細胞内に導入できることを確認した。これらの結果から、NBD-BAM が細胞膜 (形質膜) に対して高いオプトレーション活性を示すことを見出した。NBD-BAM を利用したオプトレーションは非常に効率が高く、光刺激としてレーザー光よりも強度の低いキセノンランプを用いることも可能である。

(3) 取り込みメカニズムの検討

上述の現象に着目し、NBD-BAM が物質の細胞内取り込みを促進するメカニズムを調べるための検討を行った。まず、 $^1\text{O}_2$ 検出プローブを用いた実験から、水中で NBD-BAM に光を照射すると $^1\text{O}_2$ が発生することを発見した。一方、非プロトン性溶媒中では $^1\text{O}_2$ がほとんど発生しないことも明らかになった。すなわち、NBD-BAM は細胞膜上で強い蛍光と $^1\text{O}_2$ 発生を両立させていることが示唆された。また、分子動力学計算によって人工脂質二重膜上における NBD-BAM の動態をシミュレーションした結果、オレイル基を介して膜上に固定化された NBD が膜内部と細胞外の水層とを動的に往来し、両層に分配されることが明らかになった (南スイス応用科学芸術大学との共同研究)。したがって、細胞膜内部の非プロトン性環境にある NBD は主として蛍光発光する一方で、細胞膜外の水層にある NBD は $^1\text{O}_2$ 発生を増感剤として働いていると推測される (Figure 4)。異なる PEG スパースを有する修飾剤との比較から、この特異な NBD の局在は適度な長さの親水性の PEG 鎖によってもたらされることが示されている。

このように、適度な親水性と分子長を有する修飾剤を開発し、細胞膜内外の“プロトン性/非プロトン性”という環境の違いを利用することで、光励起された NBD の強い蛍光とオプトレーション活性を両立させることに成功した。

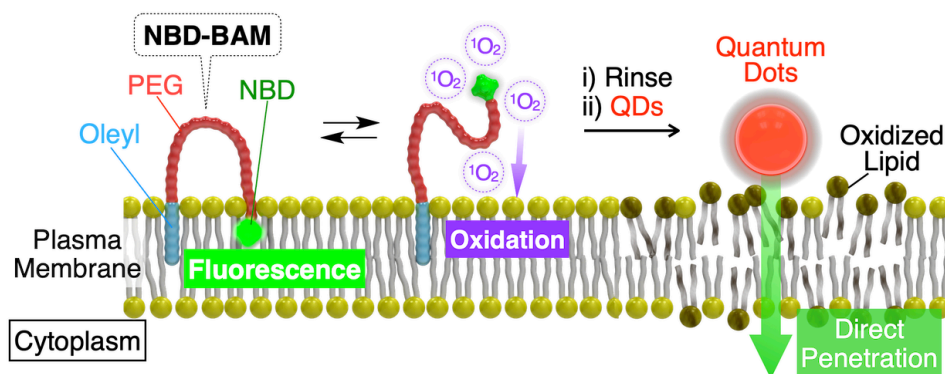


Figure 4. Schematic illustration of the proposed mechanism of optoporation using NBD-BAM.

【研究 2】連続的なリン脂質膜から成るボロノイ構造⁽²⁾

自然界ではしばしば美しい幾何学模様が自発的に現れる。その一つであるボロノイ構造は、ランダムに配置された点に対して、それを含む区画（セル）のすべての地点がその点に最も近くなるように分割された二次元平面や三次元空間として数学的に定義されている。三次元ボロノイ構造は、視覚的な美しさに加え、形状の不規則性に由来する特徴的な機械的物性を有することが計算及び実験により示されており⁶⁾、材料としての応用例も報告されてきた。しかし、これまでのところ作製方法や原料は限定的であり、静的な構造しか報告されていなかった。分子の自己集合というボトムアップ的なアプローチによるボロノイ構造の構築は、これまでと異なる性質の構造体を実現することが期待されるとともに、対称中心を持たない構造の形成は難しいとされていることから、化学者にとって興味の対象であった。しかし、外界から隔離された多数の空間の集合から成るボロノイ構造 (Figure 5a) は、構成分子を十分に提供し続けることが難しく、分子集合による構築は達成されていなかった。

本研究では、グアニジニウム (Gu^+) イオンを頭部に有するリン脂質 DOPEGu (Figure 5b) の自己集合により、三次元ボロノイ構造 (Figure 5a) が形成することを偶然発見した。この美しい構造体は、二次元の脂質膜から成るマイクロメートルスケールの多面体が面を共有する形で 3 次元的に多数連なってできたものである。さらにこの特異な自己組織化構造は、わずか 0.1 wt% の脂質分子しか含まないにも関わらずゲルとしての明確な力学特性を示した。この脂質分子の量は、これまでに報告された脂質のみから成る架橋構造のハイドロゲルの中では最も小さく⁷⁾、一次元ファイバーの架橋構造により構成される従来の超分子ゲルと比べても極めて低い値である。

(1) 構造の顕微鏡観察

DOPEGu を用いて逆相遠心法⁸⁾によりリポソーム（人工脂質膜小胞）の調整を試みたところ、多角形の区画が互いに接着しているような構造が位相差顕微鏡により観察された (Figure 6a)。形成した構造に脂溶性色素を加えて共焦点顕微鏡により観察したところ、色素が境界領域を浸透してい

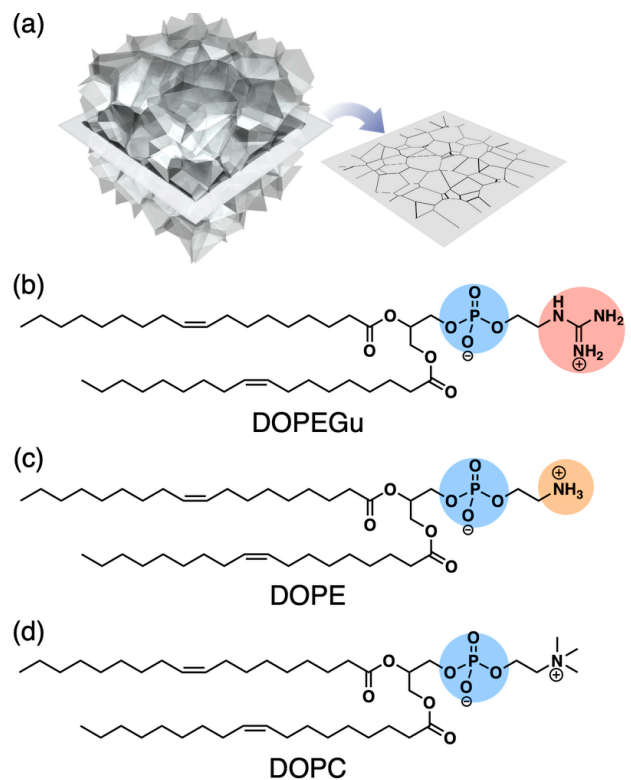


Figure 5. (a) Schematic illustration of three-dimensional (3D) Voronoi structure and its cross section. (b, c, d) Molecular structures of (b) 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolguanidine (DOPEGu), (c) 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), and (d) 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC).

き、全体が蛍光標識されることが明らかになった (Figure 6b)。さらに、サンプル調整時に親水性色素を加えたところ各区画の内部から蛍光が観察される一方、末端アルキンを有するエーテルを加えたところ境界領域からラマンのシグナルが観察された。(東大工学系研究科電気系工学専攻小関研究室との共同研究)。これらの結果は、ボロノイ構造が脂質膜とエーテルを含む連続

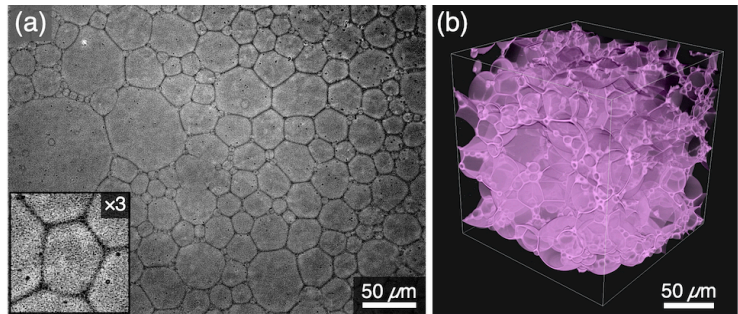


Figure 6. (a) Phase contrast microscopy images of samples obtained by using DOPEGu. (b) Side view of 3D image of confocal laser scanning microscopy ($\lambda_{ex} = 552 \text{ nm}$) of DOPEGu hydrogel after addition of hydrophobic dye.

的な疎水領域とそれに区画分けされた水層から構成され、その界面において脂質分子が極性部を区画内部の水層に向けて膜を形成していることを示唆している。また、第一級アンモニウム (NH_3^+) イオンを頭部に有する脂質分子 1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DOPE; Figure 5c) も同様の条件下で三次元ボロノイ構造を形成したが、ヘッドグループとして第四級アンモニウムイオンを有する脂質 1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC; Figure 5d) は個々に分離した球状のベシクルを形成した。

(2) 構造形成のメカニズム

さらに、これら脂質分子の自己集合挙動について解析を進めた。脂質の濃厚水分散液の小角 X 線散乱 (SAXS) 測定を行ったところ、ボロノイ構造を形成する DOPEGu、DOPE のサンプルからは $1:\sqrt{3}:2$ の比の位置にピークが観察された (Figure 7a)。これは逆ヘキサゴナル層に特徴的なピーク比であり、DOPC が形成するラメラ構造由来の比 ($1:2:3:\dots$) とは異なる。このような集合体形成の性質には、脂質分子頭部の相互作用が影響していると考えられる。赤外分光スペクトル測定からも示されるように、 Gu^+ と NH_3^+ はリン酸イオンと水素結合を形成することが可能であり、それらを頭部に有する DOPEGu と DOPE では隣接する脂質分子の頭部カチオンとリン酸エステル間に塩橋が形成されうる。このような集合体挙動が、単なるベシクルではな

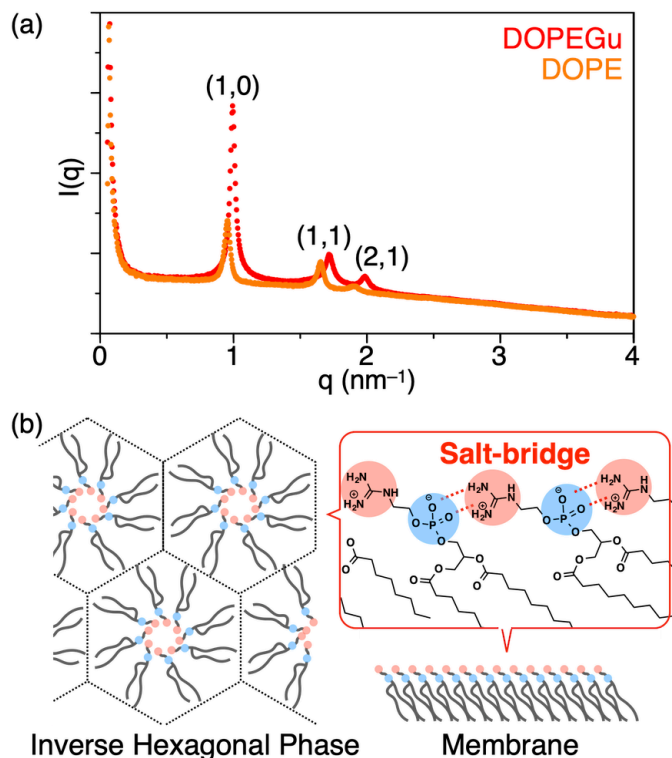


Figure 7. (a) Small angle X-ray scattering (SAXS) profiles of the concentrated dispersions of DOPEGu (red) and DOPE (orange). (b) Schematic illustration of inverse hexagonal phase and single layer of DOPEGu stabilized by salt-bridge.

くポロノイ構造の形成を可能にし、さらに隣接脂質分子間の塩橋結合が構造の保持に寄与していると考えられる (Figure 7b)。

(3) 重合による構造の固定

ポロノイ構造は速度論的に得られたものであり、徐々に構造がくずれる。そこで構造保持を促進するため、脂質とエーテルからなるネットワーク領域にモノマーと光重合開始剤を導入し、重合により構造を固定することを試みた。適度な疎水性と分子量を有するメタクリル酸ブチル (BMA) をモノマーとして少量混合して同様に構造を形成し、LED 光源で紫外光 (365 nm) を照射することで、照射なしのサンプルと比べて構造の保持時間を延長することに成功した。

【結言】

本研究では、脂質膜をターゲットとし、分子工学的な手法を用いて新しい機能や材料の開拓に挑戦した。研究 1 では、細胞膜を修飾することで光刺激による膜透過性の制御を可能にし、膜不透過な物質の細胞内輸送へと応用した。研究 2 では、脂質の分子集合により連続的な脂質膜から成るポロノイ構造を構築し、種々の解析によりゲルとしてのレオロジーや詳細な構造を明らかにした。このように、両親媒性分子の構造や集合体形成条件をデザインすることで、生体内の細胞膜や人工の脂質膜を扱った研究の可能性を拡大することができる。本研究で示した脂質膜の分子工学をさらに発展させることで、医療をはじめとする様々な分野で応用されうる新しい材料の創出につながると期待される。

【発表論文】

- (1) Otake, S.; Okuro, K.; Bochicchio, D.; Pavan, G. M.; Aida, T. Nitrobenzoxadiazole-Appended Cell Membrane Modifiers for Efficient Optoporation with Noncoherent Light, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2068–2073.
- (2) Otake, S.; Okuro, K.; Itoh, Y.; Ishida, Y.; Spratt, S. J.; Miura, K.; Ozeki, Y.; Hikima, T.; Aida, T. *to be submitted*.

【参考論文】

- [1] Custódio, C. A. et al., *ChemNanoMat* **2016**, *2*, 376–384. [2] Allen, T. M. et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 36–48. [3] Xiong, R. et al., *Adv. Phys.: X* **2016**, *1*, 596–620. [4] Kato, K. et al., *BioTechniques* **2003**, *35*, 1014–1021. [5] Buwalda, S. J. et al., *J. Controlled Release* **2014**, *28*, 254–273. [6] Tang, L. et al., *Acta Mech.* **2014**, *225*, 1361–374. [7] Talló, K. et al., *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 161–167. [8] Tsumoto, K. et al., *Colloids Surf., A* **2018**, *546*, 74–82.