

解 説

脂質膜のナノディスク化技術と 熱測定への応用

安原 主馬^{a, b}

^a 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 物質創成科学領域
^b 奈良先端科学技術大学院大学 デジタルグリーンイノベーションセンター

(受取日：2021年4月30日，受理日：2021年5月31日)

Lipid Nanodisc Technology and Its Application to Thermal Analysis

Kazuma Yasuhara^{a, b}

^a Division of Materials Science, Graduate School of Science and Technology,
Nara Institute of Science and Technology
^b Center for Digital Green-innovation, Nara Institute of Science and Technology

(Received Apr. 30, 2021; Accepted May 31, 2021)

Biomembranes play important roles not only as a cross-wall to compartmentalize the cytoplasmic components, but also as an interface for various biological functions such as material transport, signal transduction, and energy production. The interplay of phospholipid bilayers and membrane proteins in the biomembranes contributes to realizing sophisticated cellular functions. To investigate the physicochemical nature of lipid bilayers and the mechanism of membrane-related function, various model membrane systems have been developed so far. Lipid nanodiscs, which are aqueous assemblies encompassing the smallest lipid bilayers inside, have attracted much attention in recent years. Compared to conventional vesicles, lipid nanodiscs have several advantages such as uniform small size, dispersion stability in aqueous solution, and easy preparation. Taking advantage of these features, lipid nanodiscs have been applied to the analysis of membrane-associated molecules including membrane proteins. Previously, several preparation methods of lipid nanodisc have been developed, including bicelles formed by the mixture of phospholipids with different hydrophobic chain lengths, complexation of lipid membranes with membrane scaffold proteins, and fragmentation of membranes by amphiphilic polymers. In this paper, we review these strategies for nanodisc formation and discuss the physicochemical properties of nanodiscs based on the analysis of differential scanning calorimetry (DSC).

Keywords: Lipid nanodisc, Bicelle, Amphiphilic polymer, Lipid bilayer, Differential scanning calorimetry.

1. はじめに

生体膜は、細胞やその小器官を形作るための隔壁としてのみならず、物質輸送やシグナル伝達、エネルギー生産といった生命活動の根幹に係わる重要な役割を担っている。生体膜は、リン脂質が形成する二分子膜と膜タンパク質から構成され、両者が複合体を形成し、連携することで高度な細胞機能を実現している。¹⁾ 脂質膜のもつ物理化学的性質や、機能発現のメカニズムを探るために、これまで単純な脂質組成によって自発的に形成されるベシクルや平面二分子膜、Langmuir 単分子膜といった様々なモデル膜系が用いられてきた。脂質ナノディスクは、近年注目を集めている脂質分子の集合体であり、最小の脂質二分子膜を内部に有する。これまで最も一般的にモデル膜として用いられてきたベシクルと比較して、脂質ナノディスクは均一な集合

体が得やすく、水溶液中での分散安定性が高いといった特徴を有する。また、脂質ナノディスク粒子径は数十ナノメートルと小さいため、各種の分光学的測定において、バックグラウンドノイズを低減できるといったメリットも有する。これらの特徴を生かして、膜タンパク質の解析や、ドラッグキャリアとして脂質ナノディスクの応用が行われてきた。これまで、いくつかの脂質ナノディスク形成手法が開発されており、疎水鎖長の異なるリン脂質の混合によって形成されるバイセル、膜骨格タンパク質と脂質膜の複合化、両親媒性ポリマーによる膜の断片化といったアプローチがある。本稿では、それぞれのナノディスク形成手法について概説するとともに、示差走査熱量分析 (DSC) によるナノディスクの物性評価に関して、これまでの我々の研究事例を中心に紹介する。

2. リン脂質および合成脂質によるバイセル形成

バイセル (Bilayered-Micelle) は、ディスク形状を有する脂質分子の集合体であり、疎水鎖長の大きく異なる2種類のリン脂質を混合することによって自発的に形成される。バイセルを形成する脂質の組成として、1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine (DMPC, **1**) と 1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine (DHPC, **2**) の混合系が最も一般的に知られており、長鎖リン脂質である DMPC がバイセルの平面部分を構成し、短鎖リン脂質の DHPC が縁取り部分を形成する (Fig.1)。²⁾ DHPC 以外にも、PEG 修飾リン脂質³⁾ やコール酸誘導体の界面活性剤である 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO)⁴⁾ を長鎖リン脂質と組み合わせることでバイセルが形成できることも知られている。バイセルの大きさは脂質組成比を変化させることで制御可能であり、その大きさに依存して外部磁場に応答することが知られている。大きなバイセルは外部磁場に沿って配向する一方で、小型のバイセルは水溶液中で高速にタンブリングするため、磁場に対して等方的に振る舞う。この特徴を生かして、多くの膜タンパク質や生理活性分子の NMR を利用した解析がこれまで精力的に進められてきた。⁵⁾

バイセルは均一なディスク状の分子集合体を形成する一方で、その形成条件は限られており、温度や塩濃度等の周辺環境の変化によって容易に他の集合体 (ベシクル等) へと構造転移する。⁶⁾ 筆者らは、リン脂質バイセルにおける構造の不安定性を克服したバイセル系を構築するために、表面にセラミック様のシロキサン (Si-O-Si) 骨格を導入し

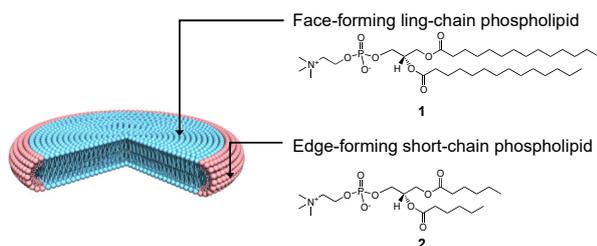


Fig.1 Schematic image of a bicelle and the chemical structures of bicelle-forming phospholipids.

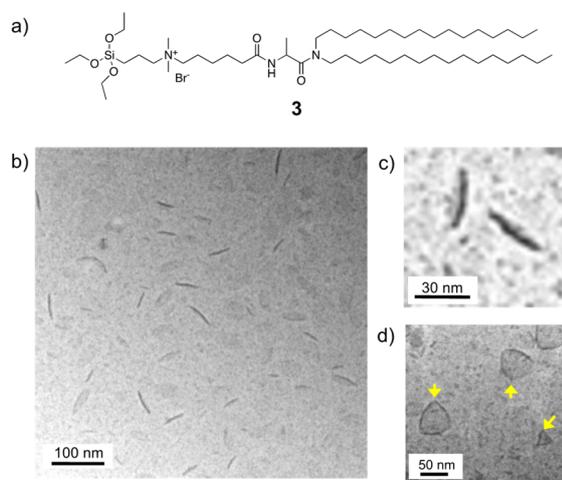


Fig.2 (a) Chemical structure of the synthetic lipid for the organic-inorganic hybrid bicelle. Cryo-TEM images of organic-inorganic hybrid bicelles. (b) wide-angle image, (c) magnified image, (d) after sonication. Images are modified from reference. ⁷⁾

た有機-無機ハイブリッドバイセルをこれまでに開発した。⁷⁾ 有機-無機ハイブリッドバイセルは、親水性頭部にトリエトキシシリル基を有する長鎖脂質分子 (Fig.2, 化合物 **3**) と **2** の混合脂質を用いて形成することができる (Fig.2(a))。トリエトキシシリル基は、ゾル-ゲル反応によって分子間架橋されたシロキサン骨格を形成する。すなわち、水中での自発的な加水分解と重縮合により、脂質分子間が架橋された無機のネットワーク構造を形成する。**3** と **2** を 7:2 のモル比で混合し、水中に分散させた試料の cryo-TEM 観察を行ったところ、直径 40 nm 程度のディスク状分子集合体が確認された (Fig.2(b))。縁取り方向に配向したバイセルから見積もった膜厚は約 5 nm であり、個々のバイセルは一層の脂質二分子膜から形成されていることが示唆された (Fig.2(c))。また、得られた試料に対して超音波照射を行ったところ、割れたナノディスクに由来すると考えられる角のある粒子が観察された (Fig.2(d))。リン脂質バイセルのように非共有結合のみによってナノディスク形成される場合は、外部からの機械刺激によって集合体が破壊されても円形のディスク構造が再構成される。一方で、本系においては、平面部分がシロキサン骨格によって架橋されているために脂質分子が解離せず、超音波照射によって構造欠陥に沿って割れた後はディスクが再構成されなかったと考えられる。

有機-無機ハイブリッドバイセルは、従来のリン脂質バイセルがディスク構造を維持できない条件下でも、安定にその構造を保持することができる。ここでは、有機-無機ハイブリッドバイセルの安定性を評価したいいくつかの例を紹介する。乾燥状態におけるバイセルの構造安定性を評価するために、マイカ基板上にキャストした試料を用いて大気中での原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行った (Fig.3)。1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine (DPPC) と **2** の混合脂質によって形成された従来のリン脂質バイセルは、その構造が崩壊し、不定型な凝集体が形成された (Fig.3(a))。その一方で、有機-無機ハイブリッドバイセルは、崩壊すること無く水溶液中と同様にディスク構造を維持していることが確認された (Fig.3(b))。また、有機-無機ハイブリッドバイセルは、界面活性剤による可溶化にも耐性を有し、3 等量の Trion X-100 (TX-100) を添加しても崩壊しない (Fig.4)。シロキサン骨格の導入によって、バイセルの熱安定性についても大きく向上することがわかっている。⁸⁾ 一般的に、リン脂質のみによって形成されるバイセルは、面部分を構成する長鎖脂質のゲル-液晶相転移温度より高温側ではベシクルへと構造が転移するため、ディスク構造が形成される温度範囲が限定されている。一方で、有機-無機ハイブリッドバイセルは、**3** のゲル-液晶相転移温度 (23 °C) よりも遙かに高い温度条件下でもディスク構造を維持できることが確認された (Fig.5)。以上より、我々はバイセルに分子

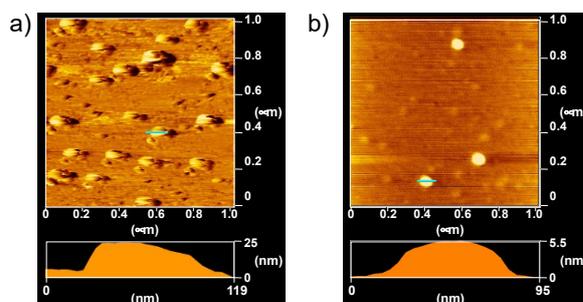


Fig.3 Tapping mode AFM images and height profiles of (a) phospholipid bicelles and (b) organic-inorganic hybrid bicelles in dry condition. Images are modified from reference. ⁷⁾

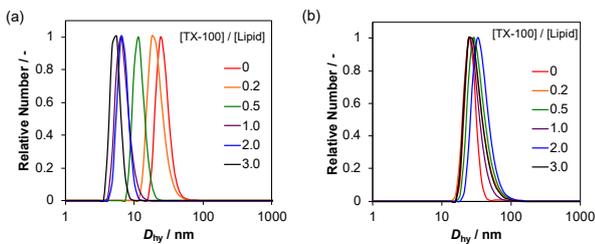


Fig.4 Solubilization of (a) phospholipid and (b) organic-inorganic hybrid bicelles by Triton X-100 (TX-100) confirmed by DLS. Images are modified from reference.⁷⁾

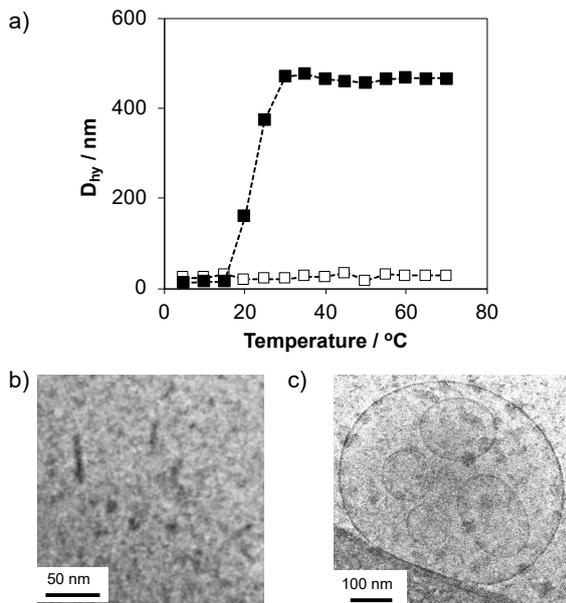


Fig.5 (a) Temperature dependence of the hydrodynamic diameter (D_{hy}) of phospholipid bicelles (filled square) and organic-inorganic hybrid bicelles (open square), Cryo-TEM images of the lipid assemblies at 60°C for the mixture of organic-inorganic (b) hybrid bicelle and (c) phospholipid bicelle. Images are modified from reference.⁸⁾

間架橋されたシロキサン骨格を導入することによって、従来のリン脂質のみで構成されたバイセルにおける安定性の課題を解決することに成功した。有機-無機ハイブリッドバイセルは、ユニークな形状を有する脂質膜のナノ粒子として今後の展開が期待される。

3. 膜骨格タンパク質によるナノディスク形成

生体内においても、ディスク構造を有する脂質二分子膜とタンパク質の複合体が存在する。体内でのコレステロール輸送を担う高密度リポタンパク質 (HDL) は、輸送プロセスにおける初期過程において、ディスク状の分子集合体を形成することが古くから知られている。⁹⁾ Sligar らは、HDL を形成するアポリポタンパク質 A-I (Apo A-I) の構造を改変し、脂質ナノディスク形成に特化した膜骨格タンパク質 (Membrane Scaffold Protein, MSP) を開発した。¹⁰⁾ MSP は、複数個の α -ヘリックスから構成されており、個々の α -ヘリックスにおいて、片面に疎水性のアミノ酸残基が、反対側には親水性のアミノ酸残基が局在した両親媒構造を形成している。この両親媒性 α -ヘリックスが脂質二分子膜の疎水性コア部分が露出した端部を覆うことで、ディスク構造を安定化する (Fig.6)。また、最近では α -ヘリックスの数が異なる MSP 変異体を用いる事で、幅広いサイズのナノディスクが形成できる手法も報告されている。¹¹⁾ 加えて、

全長の MSP だけでなく、より短い Apo A-I の断片ペプチドおよびそのオリゴマーを用いてもナノディスクが形成できることが知られている。¹²⁾ このことから、タンパク質を骨格としたナノディスクの形成においては、両親媒性の α -ヘリックスが基本単位であるといえる。MSP ナノディスクは、これまでに構造が未知であったものも含め、多様な膜タンパク質の解析に適用が可能であるため、現在大きな注目を集めている。¹³⁾ 特に、MSP 自身の変性温度 (約 90 °C) を超えない範囲では、膜タンパク質-MSP ナノディスク複合体は高い熱安定性を示す。一方で、MSP ナノディスクは室温付近で調製できるものの、膜タンパク質を変性させる懸念のある界面活性剤¹⁴⁾ の使用が不可欠であり、透析等の複雑な過程を必要とするといった課題もある。

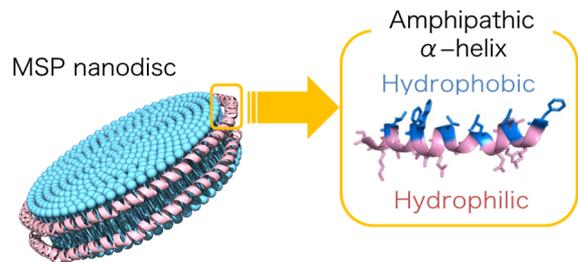


Fig.6 Schematic image of a lipid nanodisc formed with a membrane scaffold protein and its amphipathic α -helix.

4. 合成両親媒性ポリマーによるナノディスク形成

ナノディスクを自発形成できる合成高分子もこれまでにいくつか開発されている (Fig.7)。合成高分子を用いたナノディスク形成手法は、先述のタンパク質を用いたものと比較して、(1) 安価に大量合成ができること、(2) 機能性官能基 (蛍光発色団など) の修飾が容易であること、(3) 調製が簡便であり、界面活性剤を用いることなく、自発的にナノディスクが形成できる、(4) 観測対象となる膜タンパク質と異なる分子骨格であるため、分光学的シグナルのオーバーラップや、主鎖骨格に起因する相互作用が抑制できることといった多くのアドバンテージがある。Watts らは、スチレン-マレイン酸共重合体 (SMA, Fig.7, 化合物 4) を用いたナノディスクの形成を報告している。¹⁵⁾ SMA は両

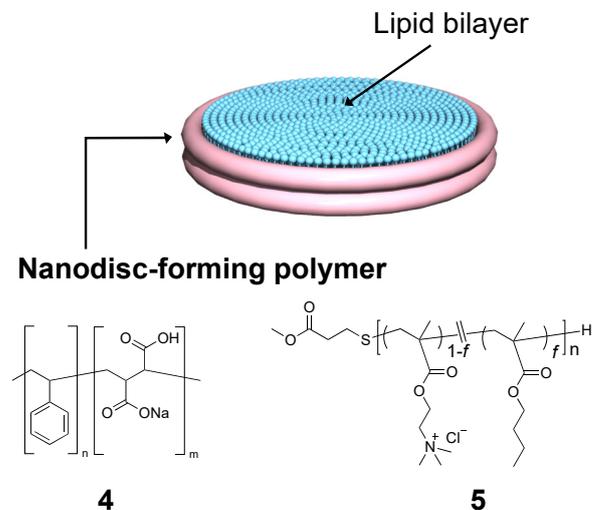


Fig.7 Schematic image of a lipid nanodisc formed with synthetic amphiphilic polymers and the chemical structures of nanodisc-forming polymers.

親媒性の高分子であり、リン脂質ベシクルや天然の細胞膜に添加するだけで自発的にナノディスクを形成する。疎水基としてジイソブチレン基を導入した類似のポリマー (DIBMA) も SMA と同様にナノディスクが形成できることが知られており、SMA に存在するスチレンに由来する紫外域の吸収 (280 nm) を低減できる特徴がある¹⁶⁾ Ramamoorthy らは、さまざまな親水基を導入したスチレン-マレイン酸共重合体の誘導体をこれまでにデザインしており、目的に応じて異なる表面電荷を有するナノディスクが形成可能である。¹⁷⁾ これらの特徴を生かして、これまでに SMA は、多くの膜タンパク質の解析に適用されてきている。¹⁸⁾

我々はこれまでに、SMA と異なる分子骨格として、両親媒性のメタクリレートランダムコポリマーを用いたナノディスク形成技術を開発した (Fig.7, 化合物 5)。¹⁹⁾ ポリメタクリレートは様々な重合方法がこれまでに確立しており、SMA を分子骨格としたナノディスク形成ポリマーと比較して、モノマー組成や分子量を自在に制御できること、またポリマー末端に機能性官能基を定量的に導入できるといった優位性がある。ナノディスクを形成するポリマーの設計にあたって、親水性モノマーユニットとして、メタクロイルコリンクロリドを、疎水性ユニットとしてメタクリル酸ブチルを導入した。ポリマーの合成は、アゾビスイソブチリロニトリル (AIBN) を開始剤として、重合度を制御するために、3-メルカプトプロピオン酸メチルを連鎖移動剤としてそれぞれ用いた。ポリマーの分子構造とナノディスク形成の相関を評価するために、重合度および両モノマーの組成比の異なる種々のポリマーを合成し、ライブラリ化した。200 nm の粒径に調整した DMPC ベシクルを用いて、室温でポリマーと混合することで膜の破壊について評価した。すなわち、膜の破壊に伴う溶液の濁度減少を指標として、個々のポリマーの有する膜の断片化能について評価を行った (Fig.8)。合成したライブラリの中で、ポリマー濃度の増加に従って濁度が減少するものとそうでないものが見られた。すべてのポリマーについてスクリーニングを行った結果から、脂質二分子膜を自発的に断片化するためには、

(1) 適切な親疎水性モノマーの比率(疎水性モノマーの割合が 0.4~0.6 程度)と、(2) 適切な分子量範囲 (3,000~9,000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ 程度) が存在することが明らかになった (Fig.8(c))。高い膜の断片化活性を示すポリマーを対象として、ポリマー・脂質複合体の動的散乱 (DLS) 測定を行ったところ、流体力学的直径 (D_{hy}) が 20 nm 程度の均一な粒子の形成が確認された (Fig.9(a))。また、透過型電子顕微鏡によってポリマー・脂質複合体の観察を行ったところ、直径約 10~20 nm のディスク形成が確認された (Fig.9(c))。縁方向に配向したナノディスクを対象にナノディスクの膜厚を見積もったところ、5.5 nm であったことから、個々のナノディスクは 1 層の脂質二分子膜から形成されていることが示唆された (Fig.9(d))。重合度から想定されるポリマーの長さは、ナノディスクの周長と比較して顕著に短いことから、ナノディスクの縁取り部分は、単一のポリマー鎖ではなく、複数の分子が会合して形成していると考えられる。これに基づいて、ポリマーと脂質の濃度比を変化させた場合のディスクサイズを DLS によって評価したところ、ポリマー量を増加することでより小さなナノディスクが得られることも明らかになった (Fig.9(b))。また、ポリマーを用いて形成したナノディスクは、リン脂質のゲル-液晶相転移温度よりも高温条件であっても構造を維持可能であり、高い熱安定性を有する。

続いて、メタクリレートランダムコポリマーによって形成されたナノディスクを用いた生体分子と脂質膜との相互作用について分光学的な評価を行った例について紹介する。

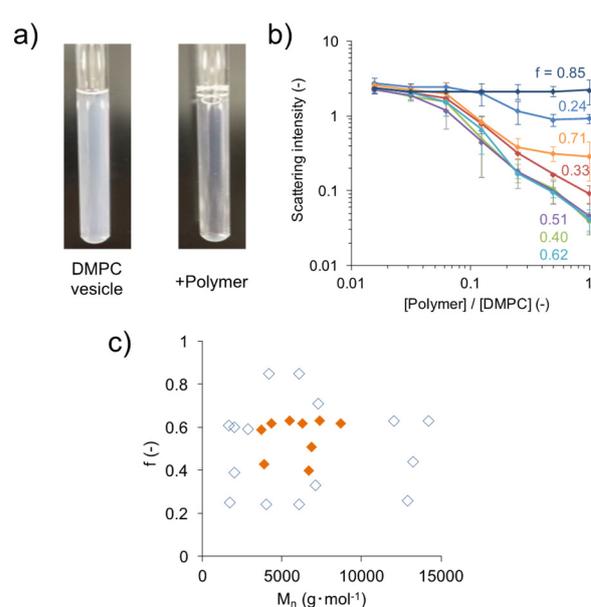


Fig.8 (a) Disruption of DMPC vesicles observed from the scattering measurement of the vesicle solutions in the presence of polymers. (b) Effect of the hydrophobic : hydrophilic ratio (f) on the disruption of vesicles. (c) Effect of the hydrophobic fraction (f) and number-averaged molecular weight (M_n) of polymers on the nanodisc formation. The nanodisc-forming polymers are indicated by filled orange diamonds. Images are modified from reference.¹⁹⁾

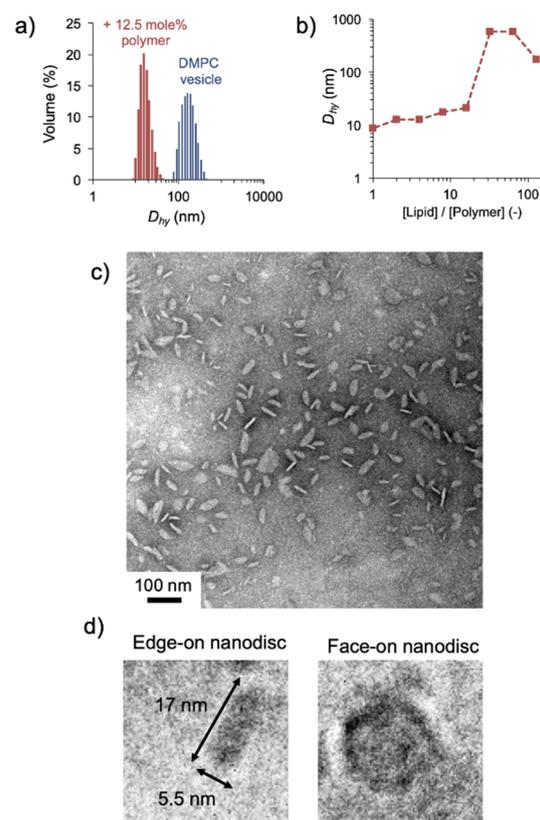


Fig.9 (a) DLS profiles of monodispersed lipid nanodiscs formed with the polymer and DMPC vesicles. (b) Tuning of the nanodisc size depending on the lipid/polymer ratio. (c) Negative-stain TEM image of the nanodisc formed with the polymer. (d) Magnified image of the edge-on and face-on nanodiscs acquired by cryo-TEM. Images are modified from reference.¹⁹⁾

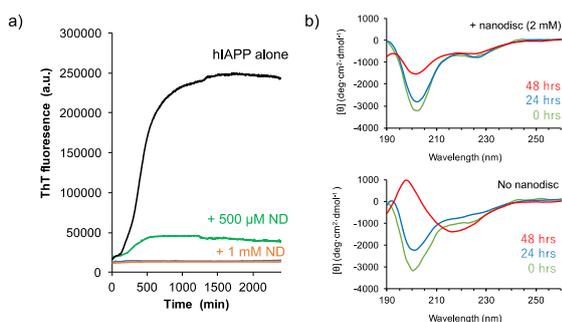


Fig.10 (a) Formation of hIAPP amyloid fibrils evaluated by the Thioflavin T (ThT) fluorescence experiments in the absence and in the presence of the nanodiscs. (b) CD spectra of human-IAPP in the presence (upper) and absence (lower) of the nanodiscs. Images are modified from reference.¹⁹⁾

ここでは、生体内で線維状のオリゴマーを形成することで、様々な疾病を引き起こしていると考えられるアミロイドタンパク質を評価の対象とした。はじめに、2型糖尿病の発症に関与していると指摘されているヒト膵島アミロイドポリペプチド (hIAPP) を対象としてナノディスクとの相互作用を評価した。¹⁹⁾ hIAPP と脂質膜の親和性は、ホスファチジルグリセロールをはじめとする負電荷脂質の添加によって向上することが知られている。²⁰⁾ したがって、ここでは DMPC と 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycero-rol) (sodium salt) (DMPG) を 9:1 の比で混合した脂質を用いてナノディスクを形成した。アミロイド線維にインターカレートすることで強い蛍光を発する色素であるチオフラビン T (ThT) を用いて、hIAPP のアミロイド形成を評価した (Fig.10(a))。hIAPP 単独では、15 時間程度の静置によって ThT 蛍光強度が上昇し、アミロイド線維の形成が確認された。一方で、ナノディスクを添加した場合は ThT 蛍光の上昇が確認されなかったことから、アミロイド線維の形成を阻害することが示唆された。また、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定によって hIAPP の形成する二次構造について評価を行ったところ、静置前ではナノディスク共存下、非共存下のいずれの場合においても、 α -ヘリックス構造を形成していることを確認した (Fig.10(b))。一方で、48 時間静置後においては、ナノディスク添加の有無に依存して CD スペクトルに大きな差異が確認された。ナノディスク非共存下では、アミロイド線維の形成に伴う β シート構造への転移が見られた一方で、ナノディスク共存下においては、長時間の静置後であっても α -ヘリックス構造を維持していることがわかった。ここで見られたアミロイド線維の形成阻害は、ナノディスクに特徴的な挙動であると考えられる。すなわち、個々のナノディスクが有する表面積は微小であるため、同一ナノディスク上に結合することのできる hIAPP 分子の数は制限される。その結果、ナノディスク上ではある程度以上の hIAPP の会合は進行せず、小さな会合体がトラップされるために、結果としてより大きな会合体であるアミロイド線維の形成には至らなかったと考えられる。同様のナノディスクによるアミロイド線維の形成阻害は、アルツハイマー病に関連するアミロイド β (A β) の場合にも確認された。²¹⁾ また、神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた *in vitro* の毒性試験において、ナノディスクによるアミロイド線維の形成阻害が起こることで、細胞生存率が顕著に上昇し、A β の毒性を大きく低減できる事がわかった。したがって、ナノディスクは、膜と結合するペプチドやタンパク質の作用機構を明らかにするツールとしての利用だけでなく、それ自身が生理活性をもったナノ粒子としての応用も期待される。

5. DSC によるナノディスクの評価

脂質二分子膜は、周辺環境の違いに応じて様々な集合体の形態をとることが知られている。DSC は、温度変化に起因する脂質二分子膜の相転移を高感度に評価することのできる手法としてこれまで幅広く用いられてきた。²²⁾ ここでは、ナノディスク中に取り込まれた脂質二分子膜の相転移挙動について DSC を用いて評価した事例を紹介する。

Sligar らは、MSP ナノディスク中におけるリン脂質のゲル-液晶相転移挙動に着目し、膜骨格タンパク質と脂質分子の相互作用について議論している。²³⁾ リン脂質として、DMPC および DPPC を用いて形成したナノディスクの DSC サーマグラムでは、リン脂質単独で形成されたベシクルと比較して、ゲル-液晶相転移に対応する吸熱ピークの高温シフトが確認された。これは、脂質二分子膜がナノディスク内に取り込まれることで、ベシクルと比べて密に充填され、低温相であるゲル相がより安定化されたためであると考えられている。また、ナノディスクは、ベシクル単独の場合と比較して、顕著に小さな van't Hoff エンタルピーを示したことから、ナノディスク中においては、相転移における脂質分子の協同性が低下することが明らかになった。²⁴⁾ より大きなナノディスクが得られる MSP を用いて同様に検討を行ったところ、相転移温度に変化はみられなかったものの、転移エンタルピーが上昇する結果が得られた。このことは、ナノディスクのサイズが大きくなることで、相転移に関与する脂質分子の割合が増加することを示唆している。すなわち、MSP ナノディスクの縁取り部では、タンパク質と接している boundary lipid が存在し、ナノディスク中心部の脂質分子と比較して大きく攪乱を受けているために、ゲル-液晶相転移におけるエンタルピーへの寄与が小さくなったと考えられる。

我々の開発した両親媒性メタクリレートランダムコポリマーを用いて形成したナノディスクについても、DSC による脂質二分子膜の物性評価を行った (Fig.11)。はじめに、DMPC ベシクル単独の DSC 測定を行ったところ、14 °C 付近に小さな吸熱ピークおよび 23 °C 付近にシャープな吸熱ピークをそれぞれ観測した。低温側ピークは前転移と呼ばれ、ラメラゲル相からリップルゲル相への転移に対応し、高温側のピークはリップルゲル相から液晶相への転移に対応し、主転移と呼ばれる。ここへポリマーを添加することで、前転移が消失し、主転移ピークの形状がポリマー濃度

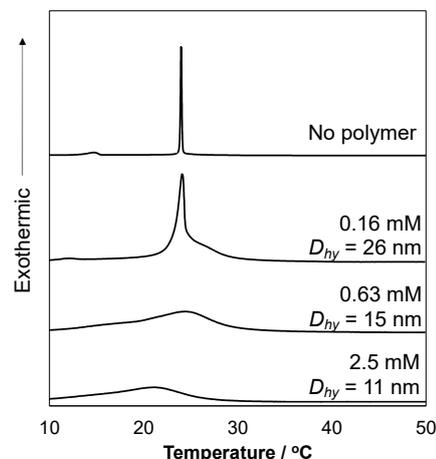


Fig.11 Effect of the polymer concentration on the DSC thermograms for DMPC-polymer complexes. The concentration of polymer and corresponding hydrodynamic diameter (D_{hy}) of nanodiscs were shown in the figure. The thermograms were acquired at a scan rate of 30 °C. The thermogram for DMPC alone indicated as 'No polymer' was scaled to 1/10. [DMPC] = 10 mM.

の上昇に従って徐々に変化する様子が観察された。具体的には、ベシクルとナノディスクが共存することが確認されているポリマー濃度 0.16 mM ([DMPC]/[ポリマー] = 64:1) においては、主転移のピークがわずかにブロード化したのと同時に、高温側 (25 °C 付近) にショルダーピークが新たに出現した。均一にナノディスクのみが形成されるポリマー濃度 0.63 mM ([DMPC]/[ポリマー] = 16:1) の条件では、ベシクルに対応するシャープな吸熱ピークが消失し、ブロードなピークのみ 25 °C 付近に観察された。さらにポリマー濃度を 2.5 mM まで上昇すると、吸熱ピークはよりブロード化し、低温側へシフトする様子が観察された。MSP ナノディスクの場合を参考にこれらの結果について解釈すると、ポリマーによって形成される脂質ナノディスクは以下の特徴を有していると考察できる。(1) ナノディスク中であっても、ゲル-液晶相転移を明瞭に示したことから、脂質二分子膜構造はポリマーによる攪乱を受けても、完全に破壊されることなく保持されている。(2) ナノディスクの主転移に対応する吸熱ピークはベシクルと比較して顕著にブロードになったことから、相転移における脂質分子の協同性が低下していることがわかる。このことは、ポリマーの結合によって、特にナノディスクの縁取り部に脂質分子のパッキングが乱されていることに起因すると考えられる。

(3) 大きなナノディスクが形成される条件では、主転移の高温シフトみられた。大きな攪乱を受けるナノディスクの縁取り部とは対照的に、中心部では脂質分子同士がより強く相互作用することで、ゲル相の膜が安定化される。(4) 小さなナノディスクが形成される高ポリマー濃度の条件下においては、主転移の温度が低下する。このことは、小さなナノディスクにおいては、ポリマーと接触する縁取り部分を形成する脂質分子の割合が増えるために、二分子膜がより大きく攪乱され、脂質分子が密にパッキングする必要のあるゲル相が不安定化される。以上より、DSC 測定によって得られるゲル-液晶相転移挙動に注目することで、ナノディスク中に形成された脂質二分子膜の特徴が明らかになった。

6. おわりに

本稿では、混合脂質によって形成されるバイセルおよび膜骨格タンパク質および両親媒性ポリマーを用いたナノディスクを取り上げ、その形成方法と評価について述べた。ナノディスクは、従来のモデル膜系と比較して簡便に均一かつ安定な脂質二分子膜を得ることができる。この特徴を生かした分析手法が近年進歩しており、膜タンパク質をはじめとする脂質膜に作用する生体分子に関する理解が急速に進みつつある。またナノディスクは、モデル膜としての利用に留まらず、ドラッグキャリア等の新しいバイオマテリアルとしての利用が期待されている。特に、両親媒性ポリマーを用いたナノディスクは、他のナノディスク系にない多くの優位性があり、潜在的に高いポテンシャルを有している。本稿で示したように、DSC 等の熱分析手法を用いることで形成されたナノディスクの詳細な特徴を明らかにすることが可能である。今後は、分子構造の異なるナノディスク形成ポリマーを対象に解析を進めることで、ポリマー骨格の違いが与える脂質二分子膜の物性に対する影響についてより詳細に検討し、天然の細胞膜が有する物性をそのまま維持したナノディスク系を実現したい。

謝 辞

本研究の一部は、Prof. A. Ramamoorthy (米・University of Michigan) との共同研究により実施しました。本研究は科

学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 (No. 25650053) 挑戦的研究 (萌芽, No. 17K19353) の助成をうけて実施したものです。

文 献

- 1) R. B. Gennis, *Biomembranes: molecular structure and function*, Springer-Verlag, (1989).
- 2) R. S. Prosser, F. Evanics, J. L. Kitevski, and M. S. Al-Abdul-Wahid, *Biochemistry*, **45**, 8453 (2006).
- 3) E. Johansson, C. Engvall, M. Arfvidsson, P. Lundahl, and K. Edwards, *Biophys. Chem.*, **113**, 183-192 (2005).
- 4) M. Li, H. Morales, J. Katsaras, N. Kucerka, Y. Yang, P. Macdonad, and M. Nieh, *Langmuir*, **29**, 15943-15957 (2013).
- 5) U. H. N. Durr, M. Gildenberg, and A. Ramamoorthy, *Chem. Rev.*, **112**, 6054-6074 (2012).
- 6) L. van Dam, G. Karlsson, and K. Edwards, *Biochim. Biophys. Acta* **1664**, 241-256 (2004).
- 7) K. Yasuhara, S. Miki, H. Nakazono, A. Ohta, and J. Kikuchi, *Chem. Commun.* **47**, 4691-4693, (2011).
- 8) K. Yasuhara, H. Hayashi, and J. Kikuchi, *Chem. Lett.* **41**, 1223-1225 (2012).
- 9) T. M. Forte, A. V. Nichols, E. L. Gong, S. Lux, and R. I. Levy, *Biochim. Biophys. Acta*, **248**, 381-386 (1971).
- 10) H. Bayburt, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar, and S. G.; *Nano Lett.* **2**, 853-856 (2002).
- 11) I. G. Denisov, Y. V. Grinkova, A. A. Lazarides, and S. G. Sligar, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3477-3487 (2004).
- 12) Y. Zhao, T. Imura, L. j. Leman, L. K. Curtiss, B. E. Maryanoff, and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13414-13424 (2013).
- 13) I. G. Denisov and S. G. Sligar, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 4669-4713.
- 14) A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105-117b (2004).
- 15) M. C. Orwick, P. J. Judge, J. Procek, L. Lindholm, A. Graziadei, A. Engel, G. Gröbner, and A. Watts, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 4653-4657 (2012).
- 16) A. O. Oluwole, B. Danielczak, A. Meister, J. O. Babalola, C. Vargas, and S. Keller, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 1919-1924 (2017).
- 17) T. Ravula, N. Z. Hardin, G. M. Di Mauro, and A. Ramamoorthy, *Eur. Polym. J.*, **108**, 597-602 (2018).
- 18) J. M. Dorr, S. Scheidelaar, M. C. Koorengel, J. J. Dominguez, M. Schafer, C. A. van Walree, and J. A. Killian, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, **45**, 3-21 (2016).
- 19) K. Yasuhara, J. Arakida, T. Ravula, S. K. Ramadugu, B. R. Sahoo, J. Kikuchi, and A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 18657-18663 (2017).
- 20) X. Zhang, J. R. St. Clair, E. London, and D. P. Raleigh, *Biochemistry*, **56**, 376-390 (2017).
- 21) B. R. Sahoo, T. Genjo, M. Bekier, S. J. Cox, A. K. Stoddard, M. Ivanova, K. Yasuhara, C. A. Fierke, Y. Wang, and A. Ramamoorthy, *Chem. Commun.* **54**, 12883-12886 (2018).
- 22) 松木均, 金品昌志, 熱測定 **33**, 74-82 (2006).
- 23) I. G. Denisov, M. A. McLean, A. W. Shaw, Y. V. Grinkova, and S. G. Sligar, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 15580-15588 (2005).
- 24) A. W. Shaw, M. A. McLean, and S. G. Sligar, *FEBS Lett.*, **556**, 260-264 (2004).



安原 主馬
Kazuma Yasuhara
E-mail: yasuhara@ms.naist.jp