

## 数理物質科学研究科 博士論文の要約

専攻名 ナノサイエンス・ナノテクノロジー専攻  
学籍番号 201530096  
学生氏名 中澤暦  
学位名 博士(理学)  
指導教員 齋藤一弥

### 博士論文題目 Studies on Some Self-Assembled Systems of Biomolecules as Functional Materials

(機能性物質としての生体分子自己集合系の研究)

1. General Introduction
2. Effect of doped molecules on phase transitions of phospholipids and their photocontrol
3. Influences of nanoscale rippled structure at a lipid vesicle surface on macroscopic physical properties of vesicle dispersions
4. Supra-folding and unfolding of DNA nanostructures on polymeric substrates
5. General Conclusion

#### 1. General Introduction

生物に対する分子レベルでの物理的・化学的な理解が進んできたことにより、様々な学問領域で生体分子の特徴やシステムが注目されてきている。生体分子は高いエネルギー変換効率や巧妙な階層構造形成、正確な情報伝達などの特徴をもつが[1]、このような生体分子の特徴は現代社会に求められている特徴や機能を秘めているため、材料分野においても研究が進んできている。たとえば、生態系で情報伝達を担う DNA は、コンピュータへの応用が期待されており、すでに材料分野で研究開発が行われてきている[2]。また、分子モーターは非常に高いエネルギー変換効率を示すことからエネルギー問題を改善するシステムやナノロボットとして役立つことが期待されている。

これまでに材料分野において応用展開がなされてきた系に共通する点は、その特徴や現象が物理的・化学的に解明されている点である。つまり、生体分子の特徴を材料分野へ応用するためには、その特徴を分子レベルで物理的・化学的に理解し、物質科学的に取り扱えるようにすることが重要なのである。生体分子の特徴を本質的に理解することによって、生物のシステムの延長線上における応用展開のみならず、その物理をベースにした新しい応用アプローチにも繋げることができる事になる。

生体分子の特徴の中には、未だに応用に進んでいないものが多く存在する。また、理解が進んでいるにも関わらず、材料分野から注目されていない現象もいくつか存在する[3]。本研究では、これまでに材料の観点から注目されてこなかった生体分子の特徴を物理的・化学的に理解し、その応用可能性を材料分野に提示することを目的とする。本研究では、リン脂質と DNA をとりあげ、以下に示す三つの研究を行った。

## 2. Effect of doped molecules on phase transitions of phospholipids and their photocontrol

リン脂質は親水性のリン酸基と疎水性のアシル鎖をもつ両親媒性分子であり、生体膜の主要構成分子である。イオン濃度の調節など、生体膜における機能の多くは膜タンパク質によってもたらされているが[4]、膜融合や膜透過性などはリン脂質が相転移を起こすことが関係していると示唆されている[5]。等温環境にある生態系では脂肪酸やステロールなどの添加物が相転移の制御において重要な役割を担う[5, 6]。しかし、添加物の効果は各論的に研究されてきており、何が添加物効果を決定づけるかといった本質の理解には至っていない。本研究では、添加物の分子形状によって添加物効果を統一的に理解するとともに、そのメカニズムに立脚した脂質膜の相転移（＝凝集構造）の光制御を試みた。分子種による違いを避けるため、本研究では同一分子の幾何異性体（*trans*-stilbene, *cis*-stilbene (Fig. 1)）の比較により分子形状の効果を調べた。

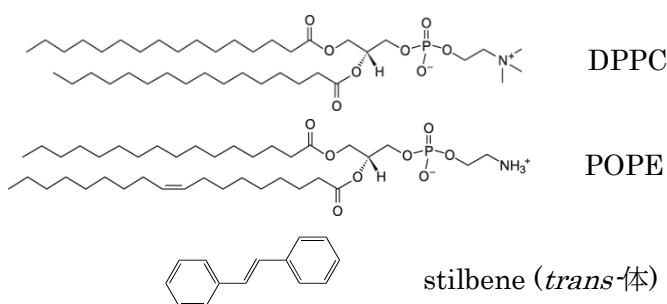


Figure 1 DPPC, POPE, stilbene の化学構造

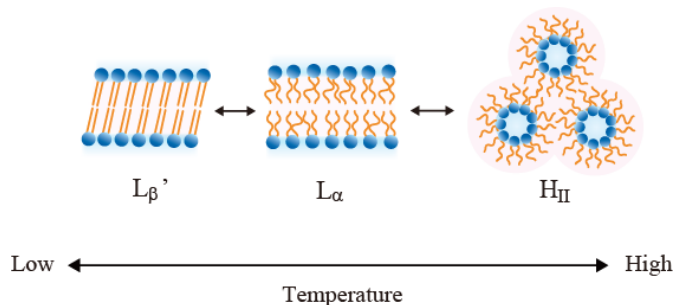
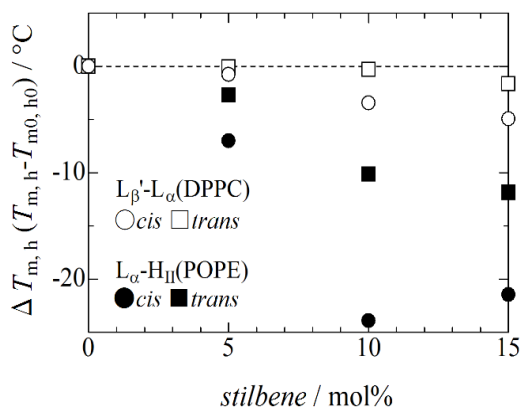


Figure 2 リン脂質の相転移

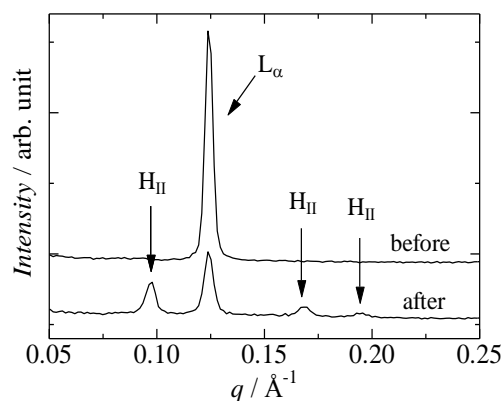
1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Fig. 1) の秩序だったゲル ( $L_{\beta}'$ ) 相から乱れた液晶 ( $L_{\alpha}$ ) 相への相転移 (Fig. 2) は、スチルベンの添加により相転移温度が低下した (Fig. 3)。  $L_{\beta}'$ - $L_{\alpha}$ 相転移温度は *trans*-体よりも *cis*-体の方が約 3 °C低かった。1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE) の  $L_{\alpha}$ 相から逆ヘキサゴナル ( $H_{II}$ ) 相への転移でも同様にスチルベン添加に伴って相転移温度が低下したが (Fig. 2, Fig. 3)、*trans*-体添加と *cis*-体添加の場合の相転移温度の差は約 10 °Cであり、DPPC の  $L_{\beta}'$ - $L_{\alpha}$ 相転移温度のそれよりも差が大きかった。  $L_{\beta}'$ - $L_{\alpha}$ 相転移と  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$ 相転移において、スチルベン添加による相転移温度の低下の原因を、脂質分子の状態および凝集構造の観点から調べた。  $L_{\beta}'$ - $L_{\alpha}$ 相転移では脂質のアシル基部分の乱れがスチルベンの添加によってより低温側から引き起こされており、棒状の *trans*-体添加の場合よりも嵩高い *cis*-体添加の場合の方がより低温側からアシル鎖が乱れ始めていた。  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$ 相転移でも同様の傾向がみられ、両相転移においてアシル基の乱れと転移温度の低下が関係していることが示された。  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$ 相転移において、スチルベンの添加は脂質のアシル基を乱す効果に加え、  $H_{II}$ 相の構造をも変化させており、嵩高い *cis*-体の方がその影響が大きかった。  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$ 相転移でより大きなスチルベンの添加効果が現れたのは、スチルベンの添加が脂質のアシル基の乱れと構造の両方に関係しているからであると考えられる。

スチルベンの *trans*-*cis* 異性化は光により誘起できる。そこで、相転移温度の高い *trans*-体添加の試料を *cis*-体へ異性化させることにより、等温での光誘起相転移の実現を試みた。 DPPC の  $L_{\beta}'$ - $L_{\alpha}$ 相転移は、  $L_{\beta}'$ 相中でのスチルベンの光異性化効率が低いために光により誘起されなかった。一方で、 POPE の  $L_{\alpha}$ 相におけるスチルベン異性化効率は約 60%と高収率であったことから、  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$ 相転移はスチルベンの *trans*→*cis* 光異性化により光誘起された (Fig. 4)。しかし、照射後の試料には *trans*-体が約 40% 残存しており、系は  $H_{II}$ 相と  $L_{\alpha}$ 相の共存状態であった。

二章では、リン脂質の相転移に対する添加物効果を添加物の分子形状により理解することができることを示し、さらに光異性化による添加物の分子形状の変化を用いて相転移を光で誘起することにも成功した。実際の生体膜において、 $L_{\beta}'-L_{\alpha}$ 相転移は膜透過性と、 $L_{\alpha}-H_{II}$ 相転移は膜融合のプロセスと関係していることが示唆されている。本研究では後者でしか光制御が達成されなかったものの、両相転移の光刺激による動的制御は、透過性の制御を通じた薬物投与システム (DDS) や人工膜融合などへの応用が期待される。



**Figure 3** *cis*-stilbene、または *trans*-stilbene を添加した DPPC、POPE の相転移温度 ( $T_m$ ,  $T_h$ ) の純系からの変化量

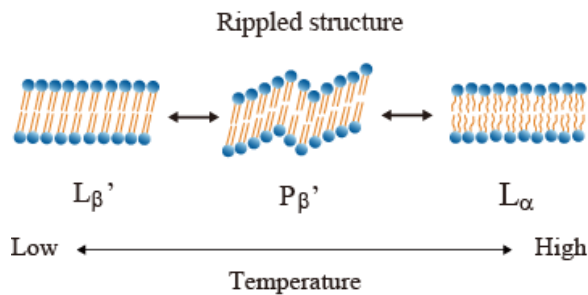


**Figure 4** *trans*-Stilbene を 10 mol% 添加した POPE における紫外線照射前後の小角 X 線回折測定結果 (55 °C)

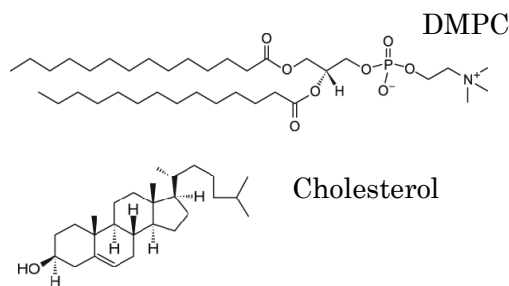
### 3. Influences of nanoscale rippled structure at a lipid vesicle surface on macroscopic physical properties of vesicle dispersions

飽和 PC 脂質はゲル ( $L_{\beta}'$ ) 相と液晶 ( $L_{\alpha}$ ) 相の間の温度領域でリップルゲル ( $P_{\beta}'$ ) 相を発現する (Fig. 5)。 $P_{\beta}'$ 相は二重膜が数十ナノメートルの周期で静的に波打った構造をもち[7]、その構造的特徴、相挙動、構造形成のメカニズムなどが精力的に研究されてきた。しかし、この波打ち構造の材料分野への応用は検討されてこなかった。マイクロスケールでは、表面の凹凸やしわなどが物質のマクロな物理量を変化させることにより機能性表面として働くことが知られている[8]。リン脂質二重膜の表面に現れるナノスケールの波打ち構造もマクロな物理量を変化させる効果があると予想される。本研究では、脂質膜ベシクル分散液のマクロなせん断粘度におよぼす膜表面のナノスケールの波打ち構造の影響について調べ、また波打ち構造の周期の変調についても試みた。

DPPC または 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) を水に分散させてでき

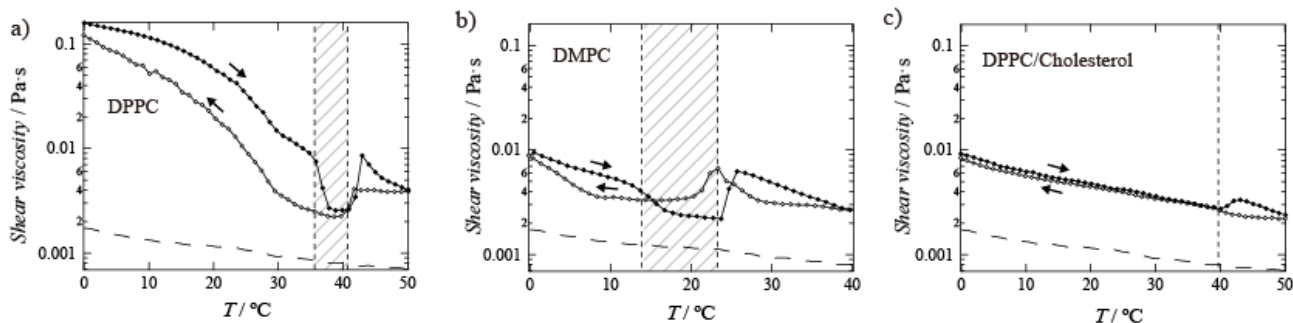


**Figure 5** 飽和 PC 脂質の相転移



**Figure 6** DMPC と Cholesterol の化学構造

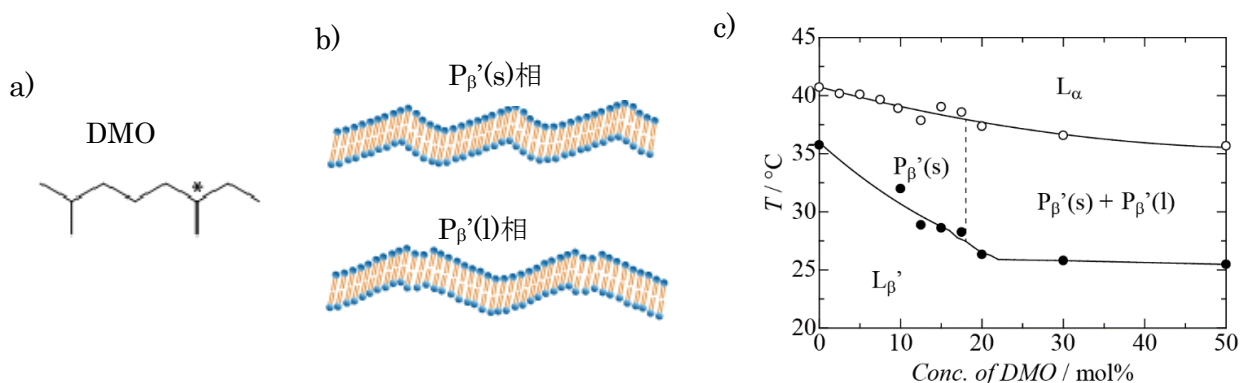
たベシクル懸濁液は、加熱に伴い  $L_{\beta}'$ 相 $\rightarrow$  $P_{\beta}'$ 相 $\rightarrow$  $L_{\alpha}$ 相の順に相転移を起こすが (Fig. 5)、どちらの試料においても  $P_{\beta}'$ 相で著しいせん断粘度の低下が見られた (Fig. 7)。DPPC に Cholesterol を 20 mol% 添加することにより  $P_{\beta}'$ 相の発現を抑制すると粘度の低下が見られなかったことから、せん断粘度の著しい低下は  $P_{\beta}'$ 相特有の現象であることが示された。せん断粘度の低下の原因について検討を行ったところ、ベシクル表面の波打ち構造のミスマッチによるベシクル間の凝集の抑制により引き起こされている可能性が示された。



**Figure 7** (a) DPPC、(b)DMPC、(c)DPPC + 20 mol%Cholesterol 懸濁液のせん断粘度の温度依存性 ( $P_{\beta}'$ 相の温度領域を網掛けで表示、 $\rightarrow$ は加熱または冷却を示す。破線は純水のせん断粘度。)

表面構造によるマクロな物理量の変化は、構造の配向方向やパターンに依存する[9]。本研究では、周期の変調についても検討を行った。飽和 PC 脂質は、加熱時 ( $L_{\beta}'$ 相 $\rightarrow$  $P_{\beta}'$ 相) には周期約 14 nm 程度の波打ち構造を形成する  $P_{\beta}'(s)$ 相をとるが、冷却時 ( $L_{\alpha}$ 相 $\rightarrow$  $P_{\beta}'$ 相) には周期が二倍の  $P_{\beta}'(l)$ 相を経由する (Fig. 8b) [10]。  $P_{\beta}'(l)$ 相は準安定であるため通常は徐々に  $P_{\beta}'(s)$ 相へ緩和してしまうが、枝分かれアルカンである 2,6-(-)-dimethyloctane (DMO) を DPPC に 20 mol%以上添加すると  $P_{\beta}'(l)$ 相が安定相として発現することが示された。

三章では、リン脂質のナノスケールの波打ち構造が凝集抑制効果をもつ機能性表面として働く可能性を示し、また周期の変調にも成功した。波打ち構造はリン脂質の自己組織化により形成されることから、自己修復が可能な表面構造に応用できる可能性がある。また、微細加工技術では困難なナノスケールの表面構造を容易に作成できる強力な構造モデルとなることも期待される。



**Figure 8** (a)DMO の化学構造、(b)  $P_{\beta}'(s)$ 相と  $P_{\beta}'(l)$ 相の構造、(c)DPPC/DMO/水系の相図

#### 4. Supra-folding and unfolding of DNA nanostructures on polymeric substrates

塩基対間の水素結合の規則性により相補的な鎖と選択的に結合する DNA の特異性は、産業で脚光を浴び、バイオ測定やセンサーなどの仕組みに用いられている。近年では、その特異的な結合能を活かして、ナノスケールの正確な構造体やナノロボットをつくる材料に利用されつつある[11]。DNA には規則的な水素結合能以外にも物理的・化学的に理解が為されてきている性質があるものの[3]、それらの応用展開はあまり行われていない。本研究では特異的な水素結合能以外の DNA の特徴を応用に繋げることを目指す。そこで、Ecole Normale Supérieure の Baigl 教授らの研究に着目した。Baigl 教授らはカチオン性ポリマー基板上に吸着した DNA のナノ構造体がかたちを変える現象を発見した（論文投稿準備中）。かたちの変化がナノ構造体の設計に依存しないとされていることから、DNA に本来備わ

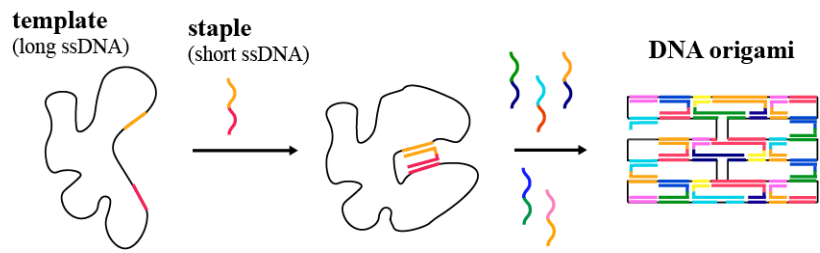


Figure 9 DNA origami の形成機構

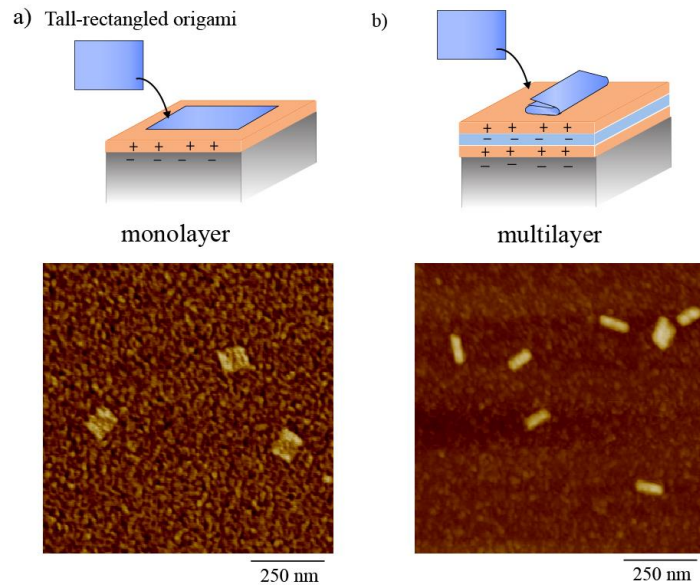


Figure 10 (a)PLL の monolayer、(b)PLL-staples-PLL の multilayer 上における DNA origami の AFM 像 (大気中)

る特徴により引き起こされていると考えられる。本研究では DNA ナノ構造体のかたちの変化のメカニズムと、そのメカニズムに立脚したかたちの制御を試みた (Baigl 教授との共同研究)。

先行研究にならい、長い一本鎖 DNA を塩基 30 配列程度の短い一本鎖 DNA (staple) と混成させて意図的な構造へと折りたたんだナノ構造体：“DNA origami”を作成した (Fig. 9) [12]。Poly-L-lysine (PLL) のモノレイヤーのポリマー基板上に吸着させた origami は、設計した通りのかたちであったが、PLL-staple-PLL のマルチレイヤー上では、origami が小さく折り畳まれたかたち (超折り畳み構造) へと変化した (Fig. 10)。これは先行研究と同様の結果である。本研究ではさらに、基板上的超折り畳み構造をした origami に heparin を添加することで、origami を元の開いた長方形のかたちへと戻すことに成功した (Fig. 11)。一般的に、DNA は PLL との静電的な相互作用によって coil 状態から凝縮した globule 状態へ転移することが知られている[13]。この凝縮 (globule) 状態の DNA は heparin などのアニオン性ポリマーの添加によって元の coil 状態へと戻る[13]。本研究の origami の超折り畳み-展開は、DNA が globule→coil 転移を引き起こす条件とよく似ている。つまり、DNA origami の超折り畳みおよび展開は、origami を形作る DNA 鎖の coil-globule 転移に基づいて引き起こされている可能性がある。



四章では、DNA の水素結合能以外の特徴を利用して、DNA origami のかたちの可逆的な制御を実現した。本研究で見出した制御方法は、系を問わず DNA 全般に適用できるものであり、ナノロボットの駆動力や、バイオセンサーのスイッチングなどへの利用が期待される。

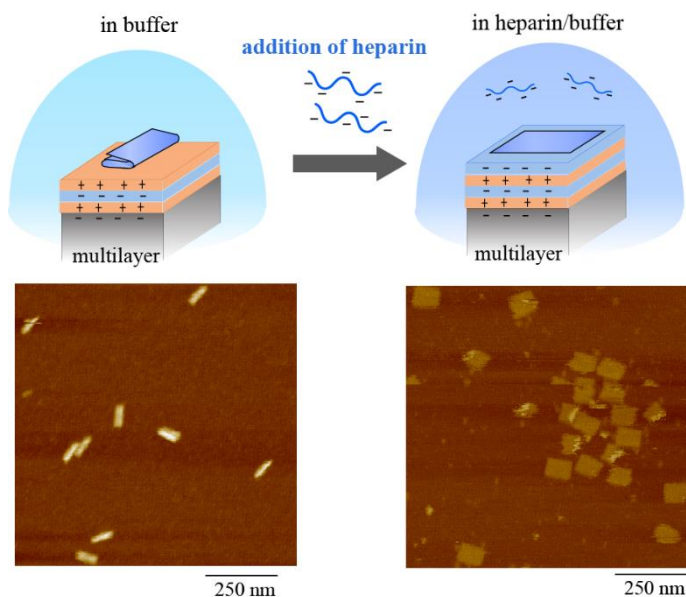
## 5. General Conclusion

本研究で行った三つの研究は、どれも材料やシステムの新しい特徴として生体分子を利用するボトムアップ的な流れを促進するものであると期待される。すなわち、二章でのリン脂質の相転移に対する添加物の効果を使った動的な構造制御は DDS や膜融合の技術と繋がり、三章のリン脂質におけるナノスケールの表面構造は機能

性表面としての利用が期待される。四章では、DNA において水素結合能と共立できる DNA ナノ構造体のかたちの制御方法を見出した。本研究の実験対象であるリン脂質と DNA は、それらの生態系における役割がそれぞれ非特異的、特異的と異なる。特異性は、材料分野における生体分子の有用性と密接に関わっていると考えられる。リン脂質に対する添加分子の効果は、高い収率と正確性という意味では弱いものであり、むしろ相分離・共存によって添加物のような異物が混入しても出来る限り元の状態を保つような傾向がみられた。一方で、遺伝情報を正確に伝える役割がある DNA は、構造形成や環境応答性が非常に正確かつ敏感であり、今回の origami の研究において、origami の形成から超折り畳み→展開の制御に至るまで高収率かつ正確であった。したがって、ナノマシンやセンサーなどの機敏性と正確性が求められる材料には DNA やタンパク質といった特異性のあるものがふさわしく、非特異的な生命現象を司るリン脂質は、構造形成の観点からは十分利用できるものの、たとえば刺激応答性の系を構築する際には特異性のある分子とのコンビネーションなどの工夫が必要となるだろう。長い道のりによって達成されるモノづくりとその先の社会革命のきっかけとなることを期待したい。

## 参考文献

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the cell: fifth Ed.*, Newton Press; New York, **2010**.
- [2] L. M. Adleman, *Science*, **1994**, *266*, 1021.
- [3] T. A. Waigh, *Applied Biophysics: A molecular Approach for Physical Scientists*, John Wiley & Sons; England, **2007**.
- [4] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry: 3rd ed.*, John Wiley & Sons; New York, **2004**.
- [5] H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J. P. Slotte, *Prog. Lipid Res.* **2002**, *41*, 66.
- [6] R. B. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag; New York,



**Figure 11** PLL–staples–PLL の multilayer 上における Heparin 添加前後での DNA origami の AFM 像（緩衝液中）

1989.

- [7] H. W. Meyer, W. Richter, *Micron* **2001**, *32*, 615.
- [8] B. Bhushan, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 66.
- [9] S. Martin, B. Bhushan, *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *474*, 206.
- [10] M. Rappolt G. Rapp, *Eur. Biophys. J.* **1996**, *24*, 381.
- [11] M. R. Jones, N. C. Seeman, C. A. Mirkin, *Science.* **2015**, *347*, 840.
- [12] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [13] A. Gonzalez-Perez, R. S. Dias, *Front Biosci.* **2009**, *E1*, 228.

#### 投稿論文

##### 本学位論文に含まれるもの

1. K. Nakazawa, M. Hishida, S. Nagatomo, Y. Yamamura, K. Saito, “Interplay between Phase Transition of DPPC Bilayer and Photoisomerization of Doped Stilbene Molecule”, *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 1352.
2. K. Nakazawa, M. Hishida, S. Nagatomo, Y. Yamamura, K. Saito, “Photoinduced Bilayer-to-Nonbilayer Phase Transition of POPE by Photoisomerization of Added Stilbene Molecules”, *Langmuir* **2016**, *32*, 7647.
3. K. Nakazawa, Y. Kawata, M. Hishida, Y. Yamamura, K. Saito, “Reduction of Shear Viscosity in Phospholipid Vesicle Dispersions by Self-Organized Ripple Structures of Vesicle Surfaces”, *Chem. Lett.*, DOI:10.1246/cl.170959.
4. K. Nakazawa, V. Jallet, C. Rossi-Gendron, S. Rudiuk, M. Hishida, K. Saito, and D. Baigl, *in preparation*.

##### 本学位論文に含まれないもの

5. M. Hishida, A. Endo, K. Nakazawa, Y. Yamamura, K. Saito, “Effect of *n*-alkanes on lipid bilayers depending on headgroups”, *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *188*, 61.