

膜透過プロセスの解明に向けた 環境応答性分子の開発とリアルタイム検出法の確立

佐藤 浩平^{*1} 石垣 侑祐^{*2} 宮田 潔志^{*3}

Development of Environment-responsive Probes and Establishment of Real-time Detection Methods for Elucidating Membrane Permeation Processes

Kohei SATO^{*1}, Yusuke ISHIGAKI^{*2} and Kiyoshi MIYATA^{*3}

Elucidating the mechanism of transmembrane material permeation process at the molecular level remains one of the most critical unsolved challenges in life sciences. While computational approaches have proposed various mechanisms, experimental validation has been severely limited due to the difficulty of observing the permeation process in real time. In this study, we aimed to reveal the comprehensive picture of membrane dynamics by integrating the expertise of three distinct fields: organic chemistry, biochemistry, and molecular spectroscopy. We successfully developed a library of 18 giant, dicationic π -conjugated molecules and screened them using DOPC liposomes. Surprisingly, specific artificial molecules efficiently integrated into the lipid bilayer. Furthermore, using time-resolved photoluminescence (TRPL) spectroscopy, we quantitatively detected the enhancement of emission intensity upon membrane insertion. This cross-disciplinary approach not only established a foundational technique for tracking membrane permeation but also fostered significant educational exchange among 13 students. Future work will focus on integrating highly luminescent complexes and microfluidic systems to achieve complete spatiotemporal mapping of membrane dynamics.

1. 研究背景と目的

生命科学および創薬化学において、投与された薬剤等の物質が体内の細胞内部に取り込まれ効果を発揮する際の細胞膜透過プロセスは、極めて重要な鍵を握る現象である。しかし、分子が膜表面に付着し、内部に潜り込み、最終的に透過して細胞内へと至る一連のメカニズムは、分子レベルでは現在も大部分が未解明のままである。

抗菌性分子などの作用機序に関しても、分子動力学シミュレーション等を用いて計算科学的手法によって様々なメカニズムの妥当性が検証されてはいるものの、実験的にそれを裏付ける決定打に欠けているのが現状である。その最大の理由は、複雑な膜透過プロセスにおける各段階（水和・脱水和、脂質分子との相互作用の変化など）を、極めて短い

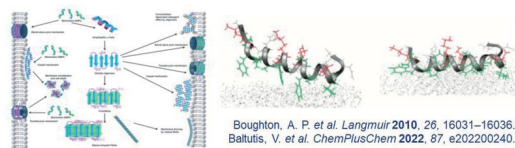
タイムスケールで詳細に追跡・解析するための実験的手法がそもそも確立されていない点にある（図1）。

本研究では、この生命科学における重大な未解決問題に挑むため、有機化学、生命科学、分子分光学という3つの異なる専門分野を融合した研究を展開する。物質の膜透過プロセスを実験的手法で詳細に調べ、その全容を解明することを目的とした。具体的には、①各段階の環境変化に鋭敏に応答してシグナルを出力できるプローブ分子の設計・合成、②複雑な巨大分子であっても細胞膜に導入できる膜モデルへの分子導入技術の確立、③微小なシグナルも逃さず検出する時間分解分光計測技術の確立の3要素を統合し、膜ダイナミクスの完全解明に向けた基盤を構築する（図2）。

物質の細胞膜透過～生命の根幹を担うプロセス～



薬が細胞に取り込まれるとき「細胞膜を透過」する



分子レベルのメカニズムは大部分が未解明（実験自体が極めて困難）

図1 本研究の背景.

2026年3月1日 受理

豊田理研スカラー共同研究 Phase1

^{*1} 関西学院大学大学院理工学研究科化学専攻

^{*2} 北海道大学大学院理学研究院化学部門

^{*3} 九州大学大学院理学研究院化学部門

最終目標：実験的手法に基づいた膜透過プロセスの全容解明

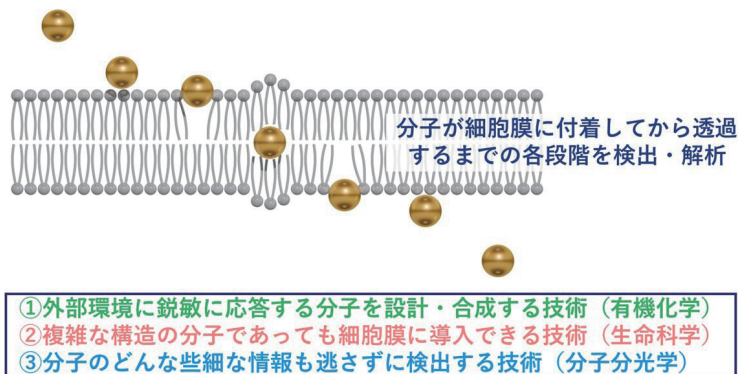


図2 本研究の目的.

2. 環境応答性プローブ分子の設計とライブラリ構築

細胞膜の透過プロセスをシグナルとして取り出すためには、従来の市販型低分子蛍光プローブでは成し得ないような、自らの構造変化や周辺環境（極性や張力など）の変化を光学特性の変化として敏感にアウトプットできる新規分子が必要である。本研究では、構造有機化学の専門性を存分に活かし、外部刺激に応答して物性を変化させるユニークな分子群の設計を行った。具体的には、剛直な π 共役骨格（アントラセン環など）を基盤としてその両端にカチオン性部位を配置した構造を基本骨格として採用したり、ヘリカルなアクリジニウムを設計・合成した。 π 骨格の長さ、置換基の有無（*tert*-ブチル基など）、および対イオン（ BF_4^- など）を系統的に変化させることで、現時点で総計18種類にも及ぶ多様な分子ライブラリの構築に成功した。

3. 細胞膜モデルへの網羅的導入検証と構造活性相関

次に、合成した18種類の分子群が実際に細胞膜へと導入されるかを検証した。哺乳類細胞の細胞膜モデルとして汎用的に用いられるリン脂質であるDOPC（ジオレオイルホスファチジルコリン）を用いてリポソーム（人工細胞膜）を作製し、各プローブ分子を添加した後、蛍光顕微鏡観察による網羅的なスクリーニングを実施した。実験の結果、ライブラリのうち特定の5種類の分子において、細胞膜への効率的な導入と、それに伴う発光の発現が明確に確認された（図3）。このような剛直かつ超巨大な人工分子が生体膜に導入されるという事実は、従来の生命科学の直感では想像しにくい意外な発見であった点も強調したい。

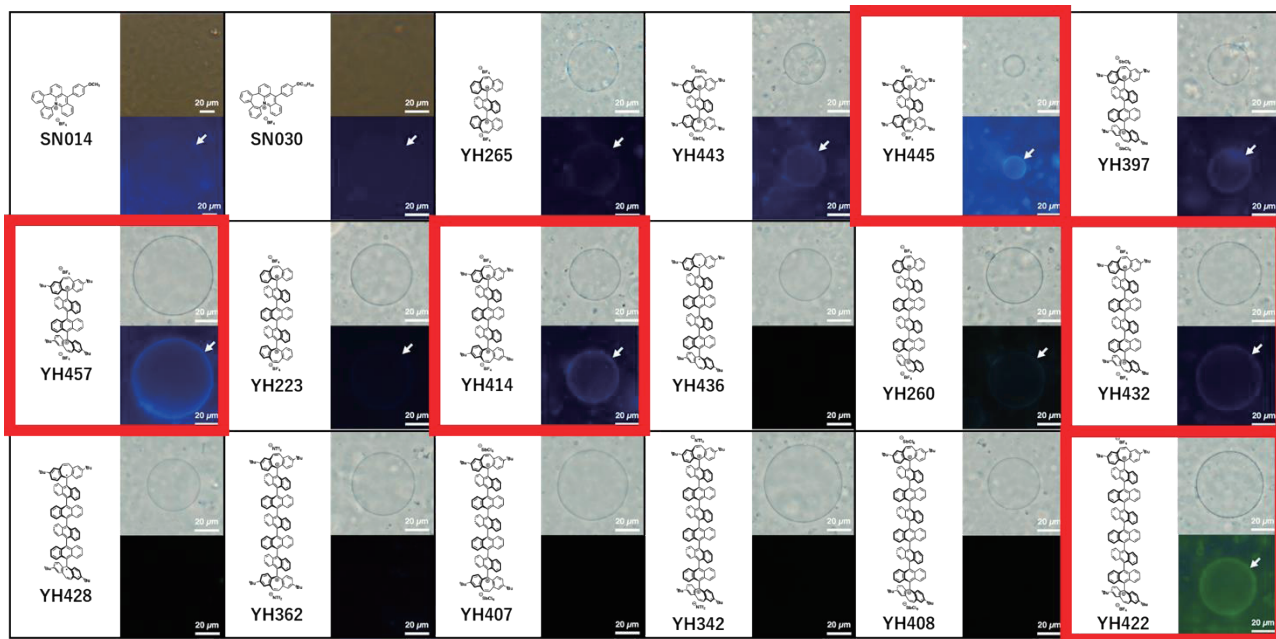


図3 石垣により構築された分子ライブラリと、佐藤が蛍光顕微鏡で検証した膜導入実験の結果。赤枠が導入が確認できた分子。

さらに、これら網羅的なスクリーニング結果と分子構造を詳細に照らし合わせた結果、2つのジカチオン性部位の間に発光性部位 (π 骨格) が挟まれた分子構造が、優れた膜導入効率と環境応答性を高い次元で両立するための鍵となることを見出した。特筆すべきは、膜に導入された分子の一つ (YH422 = DTA6) が全長 (約 3.3 nm) であり、この長さが脂質二重膜の厚みとほぼ完全に一致していた点である。これは、分子が膜を貫通するような特異な配置を取り得ることを示唆しており、膜の厚み方向のダイナミクスに関する詳細な情報を抽出できる可能性を示唆している。以上、本検討を通じて本研究の基盤となる分子設計指針の確立へと至った。

4. 時間分解発光分光による膜導入ダイナミクスのリアルタイム検出

膜に導入されたプローブ分子が、実際にどのような環境変化 (水和・脱水和、極性の変化、分子構造の固定化など) を経験しているかを定量的に評価するため、独自に構築した時間分解発光分光 (TRPL: Time-Resolved Photoluminescence) 装置を用いた計測を試みた。本検討では、2つのジカチオン性部位の間に挟まれた発光性部位の数 (アントラセンユニット数) をシステムチックに変化させた分子群 (DTA1、DTA2、DTA3 など) を比較対象として用いた。高感度な光計測を実現するため、エクストルーダーを用いて粒子径を 100 nm に均一化したリポソーム溶液を作製し、リポソーム特有の光散乱の影響を抑制した上で、標的分子添加前後の発光寿命および発光スペクトルの変化を追跡した。

図 4 に、DTA1 から得られた時間分解発光スペクトルのカラーマッピングを示す。溶液中 (図 4a) では微弱な発光しか示さないプローブ分子が、リポソーム膜への導入に伴って発光強度を著しく増強させる様子を定量的に計測することに成功した (図 4b)。さらに同様の検証を DTA1、DTA2、DTA3 などに対しても行ったところ、分子サイズ (ユニット数) に応じて膜導入時の発光量に明確な差異が生じることも明らかとなった (図 5)。具体的には、アントラセンユニット数の少ない DTA1 に比べ、ユニット数の多い DTA3 の方が、膜導入時の発光量が圧倒的に大きくなることが判明した。これは、分子が膜のどの深さまで入り込み、どのような配置を取っているかを、分子の骨格長と発光特性の相関から特定できる可能性が拓けたことを意味している。また、DOPC のような室温で流動性の高い柔軟な膜だけでなく、比較的剛直性が高い POPC (パルミトイルオレイルホスファチジルコリン) 膜、融点が室温以上でありより剛直な DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) 膜に対しても、同程度の規模で膜導入が起こり得ることが時間分解分光から実証された。TRPL から得られる蛍光寿命の延長やスペクトルの変化は、プローブ分子が水溶液中から膜内部の疎水的な環境へ移行する際の脱水和プロセスや、巨大な π 骨格が膜内で受ける物理的な圧力によるねじれ角の変化 (構造の固定化) を敏感に反映していると考えられる。

蛍光顕微鏡による蛍光強度の観察のみでは、発光強度の変化がもたらされた理由が膜に導入された分子の密度によるものか、周辺環境の変化による発光性能の変化を切り分けて議論することができない。しかし、ストリークカメラを検出に用いた TRPL によりスペクトルの時間変化を詳細に計測することで、溶液中に分散した状態の分子と膜内の分子の環境の違いを鋭敏にプローブできることがわかった。

図 4 に、DTA1 から得られた時間分解発光スペクトルのカラーマッピングを示す。溶液中 (図 4a) では微弱な発光しか示さないプローブ分子が、リポソーム膜への導入に伴って発光強度を著しく増強させる様子を定量的に計測することに成功した (図 4b)。さらに同様の検証を DTA1、DTA2、DTA3 などに対しても行ったところ、分子サイズ (ユニット数) に応じて膜導入時の発光量に明確な差異が生じることも明らかとなった (図 5)。具体的には、アントラセンユニット数の少ない DTA1 に比べ、ユニット数の多い DTA3 の方が、膜導入時の発光量が圧倒的に大きくなることが判明した。これは、分子が膜のどの深さまで入り込み、どのような配置を取っているかを、分子の骨格長と発光特性の相関から特定できる可能性が拓けたことを意味している。また、DOPC のような室温で流動性の高い柔軟な膜だけでなく、比較的剛直性が高い POPC (パルミトイルオレイルホスファチジルコリン) 膜、融点が室温以上でありより剛直な DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) 膜に対しても、同程度の規模で膜導入が起こり得ることが時間分解分光から実証された。TRPL から得られる蛍光寿命の延長やスペクトルの変化は、プローブ分子が水溶液中から膜内部の疎水的な環境へ移行する際の脱水和プロセスや、巨大な π 骨格が膜内で受ける物理的な圧力によるねじれ角の変化 (構造の固定化) を敏感に反映していると考えられる。

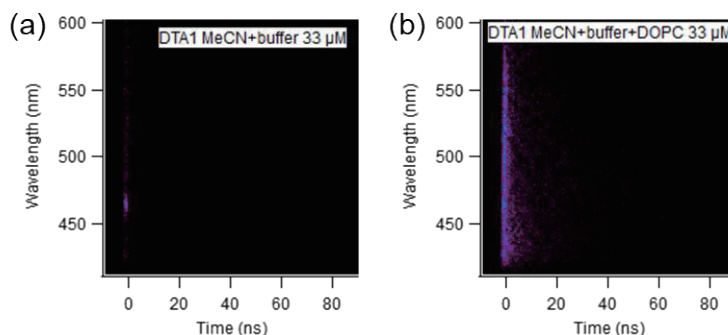


図 4 宮田により計測された時間分解発光の二次元マッピング表示。

(a) バッファ溶液中の DTA1, (b) モデル生体膜存在下での DTA1 からの発光。

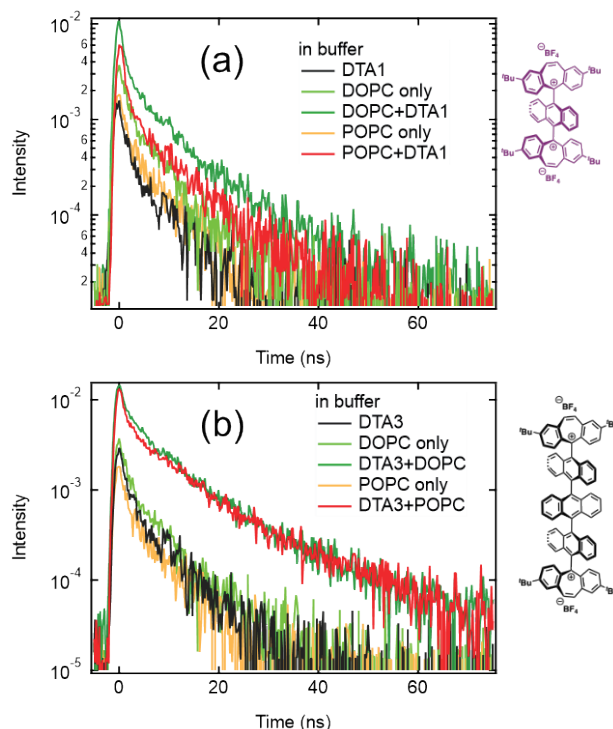


図 5 時間分解発光の環境依存性. 溶液/膜存在下の比較. 膜は DOPC と POPC の二種類の結果を表示している。

(a) DTA1, (b) DTA3.

これらの成果は、これまで計算科学でしか推測できなかった膜透過という複雑な動的プロセスを、発光特性の動的な変化を介してリアルタイムかつ精密に捕捉できる可能性を明確に示すものである。将来的には、本計測系に溶液を高速で混合するフローシステムを組み合わせ、分子が細胞膜に出会ってから生じる変化をミリ秒以下の時間スケールで追跡できる計測システムを構築する予定である。分子が膜表面に付着し、内部へ潜り込み、透過していく一連の現象を計測する手法へと発展させたい。

5. 異分野融合の実践と若手人材・学生の交流

本研究は単なるサンプルの受け渡しに留まらず、有機化学・生命科学・分子分光学という全く異なるバックグラウンドを持つ研究室が、実験手技や視点を密に共有しながら進行した点に大きな特徴がある。実際に、Phase 1 の期間中に各大学の学生や若手研究者を交えた合同実験および交流会を実施した。総勢 13 名が一堂に会し、脂質フィルムからのリポソーム作製技術（エクストルーダーを用いたリポソームサイズ均一化など）、合成されたばかりの新規化合物の取り扱い、最先端の超高速レーザー分光測定に至るまで、佐藤・石垣・宮田はもちろん、各研究グループの学生ともチームワーク良く協働しながら実験を進めた。全メンバーが顔を合わせながら進めたため、それぞれの実験の現場における各分野の暗黙知を効率的に共有する機会を設けることができた(図 6)。このような直接的な技術交流は、研究を当初の想定以上のスピードで推進させる原動力となっただけでなく、次世代のサイエンスを担う学生たちに対し、自身の専門領域を超えた俯瞰的な視野と異分野融合の真の醍醐味を伝える極めて有意義な教育的効果を生み出したと考えている。



図6 学生も交えた実験・交流の様子。

6. 結論と今後の展望

本研究を通じ、生体膜透過プロセスを実験的に解明するための「プローブ分子の設計指針」および「分光学的なリアルタイム検出基盤」を確立することに成功した。人工的に設計された巨大 π 系分子がサイズに依存して膜導入の効率に変化することを見出し、特に脂質二重膜の厚みに合致するほど巨大な分子でも膜に導入される現象を見出したことは、膜と分子の相互作用のダイナミクスを理解し、将来的に化学的なアプローチから膜の流動性や機能を能動的に制御するための大きな一歩である。

今後は、さらなるプローブ分子の高感度化を目指し、優れた発光特性を有する強発光性錯体（ホウ素錯体やアルミニウム錯体など）を組み込んだ新規分子群の合成へと展開する。さらに、生命科学の観点からはバクテリア由来の脂質やホモキラリシティの起源に迫るキラル脂質モデルへの拡張、分光計測の観点からは溶液を高速で混合するフローシステムとレーザー分光を組み合わせた高時間分解計測系の構築などといった展開を予定している。これらの要素技術を統合することで、最終的にはプローブ分子が膜を透過していく一連の現象の時空間マッピングを達成し、生命科学の根幹に関わる新たなパラダイムを創出する。

REFERENCES

- 1) (a) R. Sasaki, K. Sato, K. V. Tabata, H. Noji and K. Kinbara, *J. Am. Chem. Soc.*, **143** (2021) 1348; (b) K. Sato, R. Sasaki, R. Matsuda, M. Nakagawa, T. Ekimoto, T. Yamane, M. Ikeguchi, K. V. Tabata, H. Noji and K. Kinbara, *J. Am. Chem. Soc.*, **144** (2022) 11802; (c) Y. Itoh, S. Chen, R. Hirahara, T. Konda, T. Aoki, T. Ueda, I. Shimada, J. J. Cannon, C. Shao, J. Shiomi, K. V. Tabata, H. Noji, K. Sato and T. Aida, *Science*, **376** (2022) 738.
- 2) (a) Y. Hayashi, S. Suzuki, T. Suzuki and Y. Ishigaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **145** (2023) 2596; (b) S. Nakamura, S. Kawaguchi, Y. Nishimura, T. Harimoto, J. Hasegawa, T. Suzuki and Y. Ishigaki, *Chem. Commun.*, **62** (2026) 4268.
- 3) (a) R. K. Koninti, K. Miyata, M. Saigo and K. Onda, *J. Phys. Chem. C*, **125** (2021) 17392; (b) A. Takada, E. Hisamura, K. Yamaoka, T. Ogawa, K. Onda, K. Albrecht and K. Miyata, *J. Phys. Chem. C*, **128** (2024) 18820; (c) Y. Ishii, T. Ogawa, K. Onda, H. Miyagishi, Y. Ashikari, A. Nagaki, S. Asano and K. Miyata, *ChemRxiv*, 2025, DOI: 10.26434/chemrxiv-2025-llsk.