

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：54701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11685

研究課題名(和文)固定化モデル細胞膜を用いるバイオアッセイセンサ

研究課題名(英文)Bioassay sensor using immobilised model cell membranes

研究代表者

森田 誠一(Morita, Seiichi)

和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授

研究者番号：70332054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：モデル細胞膜の設計において、二分子膜を構成する脂質分子のアシル鎖の不飽和度は膜特性に大きく影響した。一方、極性基の違いはアシル鎖の炭素数が少ない場合は顕著な影響があったが、炭素数が多い場合はほとんど影響しなかった。脂質二分子膜とサンプル農薬との相互作用を脂質二分子でできた球状ベシクル内部から漏れ出す物質の漏出速度で評価したところ、相互作用の大きさは二分子膜の流動性や表面疎水性によって異なり、相互作用の大きさと農薬の毒性は部分的に一致した。併せて、二分子膜をセンサ電極に固定化するためのコラーゲンモデルペプチドの合成に成功し、電極上にコラーゲンの性質を保持したまま固定化できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデル細胞膜と対象農薬との相互作用が膜特性に依存することが分かり、複雑な機構を経て発現する生体に対する毒性を部分的にはあるが相関できたことから、これまで時間と手間がかかっていた化学物質のスクリーニングや環境評価を簡便に行える可能性が示された。また、コラーゲンモデルペプチドの固定化技術は、生体適合性が高く、機械的な強度の高い材料を電極上にその性質を保ったまま固定化できたことを示しており、他のバイオセンサ開発にも応用できる技術である。

研究成果の概要(英文)：The degree of unsaturation of the acyl chains of the lipids that consist of the bilayer membrane greatly affected the membrane properties. On the other hand, polar groups of lipids which had short acyl chains had a significant effect on membrane properties, but that of lipid which had long acyl chain had little effect. The interaction between the lipid bilayer membrane and the pesticides was evaluated by the release rate of the substance entrapped in the lipid bilayer vesicle. Their interaction was different by the fluidity and surface hydrophobicity of the bilayer membrane, and the interaction and the toxicity of the pesticide were partially correlated. Furthermore, we succeeded in synthesizing a collagen model peptide for immobilizing the bilayer membrane on the sensor electrode, and could immobilize it on the electrode while maintaining the properties of collagen.

研究分野：生体化学工学

キーワード：モデル細胞膜 脂質二分子膜 バイオアッセイ コラーゲン バイオセンサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の身の回りには無数の化学物質が存在し、その中には人体・生命にとって有害・有毒とされる物質も多い。これら化学物質の個々の濃度を高感度で検出すること自体は不可能では無いが、「個々の物質の濃度 有害性」である。なぜならば、複数の化学物質が協同的に毒性を高める例や長期間の蓄積によって毒性が顕在化する例が少なくないからである。

このような物質の「有害性」の評価においては、生物個体、単一細胞などの生物材料の生物応答を利用して、その生物作用量を分析値として「有害性」を評価するバイオアッセイが広く用いられているが、生物個体を用いる「個体毒性試験」では長い時間と多額の費用が、単一細胞を用いる「細胞毒性試験」では細胞の管理、取り扱いに専門的な知識と技術が必要とされている。したがって、生物材料を使わずに生物作用量をより迅速に、より簡便に評価できれば環境評価のための有用なツールになると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、化学物質が細胞に取り込まれ、細胞機能変化を起こし、それが組織、全身の機能障害へと発展する生体における化学物質の毒性発現過程の最初のプロセスとなる細胞膜と化学物質との相互作用に着目し、これを水晶振動子などの電極に固定化したモデル細胞膜としての脂質二分子膜の環境刺激応答性を利用して定量化、種々の化学物質などの環境負荷ならびに生体への影響を簡便、迅速に測定可能なバイオアッセイセンサの開発を目指した。そのために、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- (1) モデル細胞膜設計の指針となる脂質二分子膜の膜特性に与える因子の全般的な理解
- (2) モデル農薬-モデル細胞膜間の相互作用の定量と膜特性との関連
- (3) コラーゲンマトリクスによるセンサ電極への効率的なモデル細胞膜の固定化方法

### 3. 研究の方法

- (1) モデル細胞膜設計の指針となる脂質二分子膜の膜特性に与える因子の全般的な理解

アシル鎖の不飽和度および極性基の異なる 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE), および 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE) から 2 種類を混合した二分子膜ベシクルを調製し、膜流動性の指標として 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) による偏光度  $P$ , および表面疎水性の指標として 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) の蛍光強度  $I_{ANS}$  を調べた。さらに、二分子膜内での脂質分子の挙動を調べるために、DPH をラベリングした DPPC, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC), DPPE 二分子膜について 0.1 MPa-150 MPa の圧力範囲で時間分解蛍光異方性測定をおこなった。

- (2) モデル農薬-モデル細胞膜間の相互作用の定量と膜特性との関連

モデル細胞膜とサンプル農薬の相互作用の指標として、カルセイン放出量を測定した。水溶性蛍光物質カルセインはベシクル内に高濃度で封入された状態では自己消光しているが、ベシクル外へ放出されて希釈されると蛍光を発するためこれを相互作用による膜透過性の変化として測定した。具体的には、カルセインを封入した DPPC/DOPC 二分子膜ベシクルを調製、サンプル農薬存在下でのカルセイン放出量  $RF$  の経時変化を測定した。これを、1 次速度式と仮定して、放出速度定数  $k$ , および最大放出量  $RF_{max}$  を求め、既報に示された各サンプル農薬の半致死濃度  $LC_{50}$  との相関を調べた。

- (3) コラーゲンマトリクスによるセンサ電極への効率的なモデル細胞膜の固定化方法

最終的なパッケージングのために電極表面上に効果的にモデル細胞膜を固定化する必要が考えられた。そのために生体材料と強度があり親和性の高いコラーゲンペプチドのマトリクスを固定化の基材として利用できないか検討した。Fmoc-(Pro-Pro-Gly)<sub>7</sub>-OH を合成し、さらにジメチルスルホキシド中で縮合剤を用いてチアゾリジンとカップリングさせ、金電極への結合能を有するモデルコラーゲン Fmoc-(Pro-Pro-Gly)<sub>7</sub>-TAL を得た。種々の濃度で Fmoc-(Pro-Pro-Gly)<sub>7</sub>-TAL を水晶振動子微量天秤 (QCM) 電極上に固定化し、サンプルコラーゲン (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> との会合形成能を比較した。

### 4. 研究成果

- (1) モデル細胞膜設計の指針となる脂質二分子膜の膜特性に与える因子の全般的な理解

リン脂質の疎水性アシル鎖の不飽和度と極性基の膜流動性および表面疎水性に与える影響を調べた (図 1)。DPPC/DOPC 系二分子膜においては不飽和結合が増加するにつれ流動性は大きく (偏光度  $P$  は小さく) なり、それに伴い表面疎水性 ( $I_{ANS}$ ) は大きくなった。これは、不飽和結合の屈曲構造により二分子膜内部のアシル鎖間の疎水性相互作用が小さくなり、構成分子の二分子膜内での運動が促進された結果、極性基付近 (二分子膜表面) において疎水性部位の露出が顕著になったことに対応すると考えられる。一方、PC は極性基間に水分子を介した間接的な水

素結合を形成するのに対して、PE は直接水素結合を形成するため、PE の増加は表面疎水性、流動性ともに減少させると考えられる。アシル鎖の炭素数が 14 の DMPC/DMPE 系二分子膜では、表面疎水性、流動性ともに大きく減少したが、アシル鎖の炭素数が 16 の DPPC/DPPE 系二分子膜では、アシル鎖の寄与が大きく、流動性、表面疎水性ともにほとんど影響を与えなかった。時間分解蛍光異方性から得られた、二分子膜内での分子間距離に相関されるオーダーパラメータ  $S$  (小さいほど間隔広い) や回転拡散係数  $D_w$  (大きいほど運動性高い) から確認できた (図 2)。炭素鎖長 16 の DPPC、同 18 の DSPC および DPPE を比較すると、 $S$  の値は極性基の小さな DPPE のみが大きな値を取ったが、 $D_w$  は DSPC のみが大きな値をとった。このことは、炭素鎖長が長い脂質分子においては、自身の回転運動に加え、炭化水素鎖内の C-C 結合の回転による影響が大きいと考えられた。

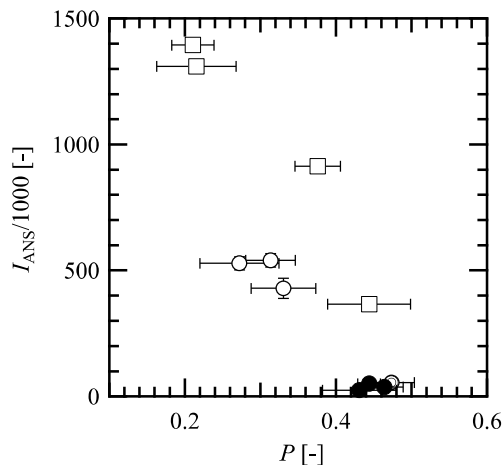


図 1 二分子膜ベシクルの流動性と疎水性の関係 (25 °C)。□: DPPC, ○: DPPC/DOPC, △: DPPC/DPPE, ●: DMPC/DMPE。

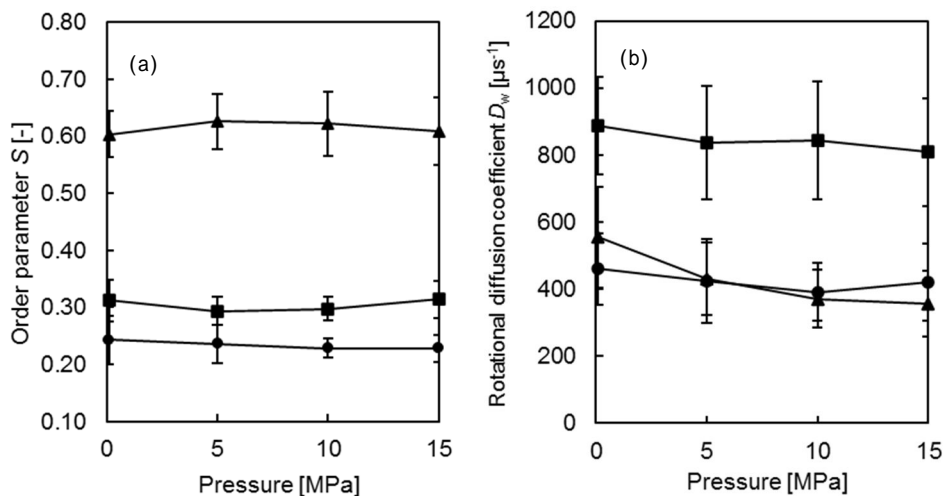


図 2 DPH を用いた脂質二分子膜の蛍光異方性値から決定したオーダーパラメーター  $S$  および回転拡散係数  $D_w$  の圧力依存。(a) オーダーパラメーター, (b) 回転拡散係数。□: DPPC, ●: DSPC, ○: DPPE。

## (2) モデル農薬-モデル細胞膜間の相互作用の定量と膜特性との関連

DPPC/DOPC 系において、サンプル農薬存在下でのカルセイン放出量  $RF$  を測定した (図 3)。膜流動性の小さい DPPC 二分子膜は全体的に  $RF$  が小さい。DPPC/DOPC = 3/1 の場合加えると膜流動性の増加によって  $RF$  は増加したが、それ以上の割合で DOPC を加えると、逆に  $RF$  の値が小さくなってしまい、表面疎水性の増加が障壁となっている可能性があった。また、 $RF$  の経時変化を 1 次の速度過程とみて求めた、放出速度定数  $k$ 、および  $RF_{max}$  をサンプル農薬の毒性  $LC_{50}$  と比較した。残念ながら、今回の検討の範囲内では  $LC_{50}$  と良い相間を示す膜組成やパラメータ

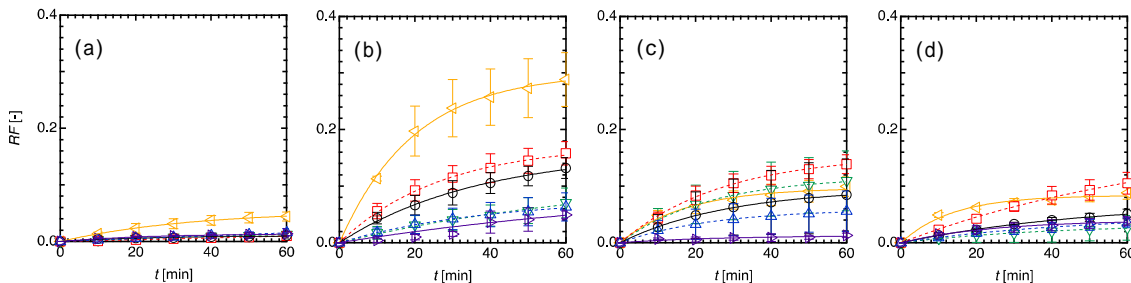


図 3 DPPC/DOPC 系二分子膜におけるカルセイン放出量の経時変化。(a) DPPC, (b) DPPC/DOPC=3/1, (c) DPPC/DOPC=2/1, (d) DPPC/DOPC=1/1。●: クロピリフォス, ○: フルオメツロン, ■: イミダクロピリド, □: ピリミカーブ, △: プレトリン, ▷: キザロホップ。

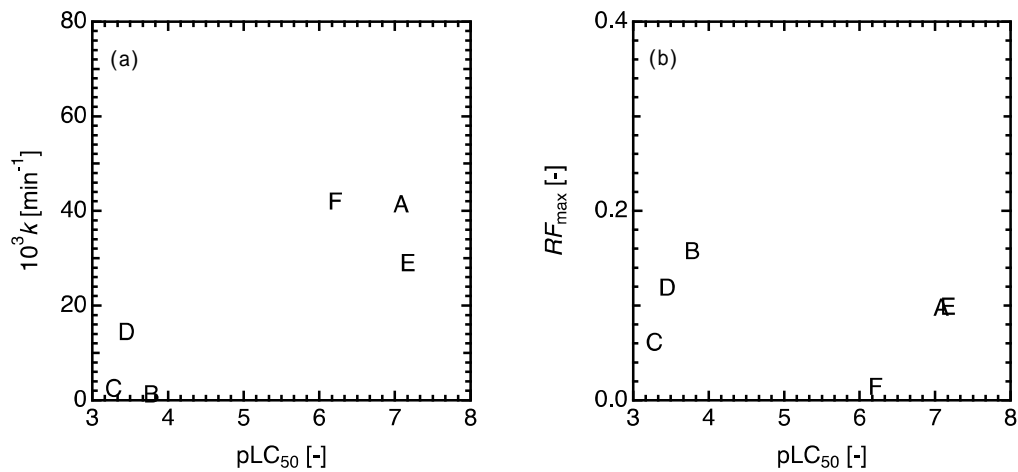


図4 放出速度パラメーターとLC50の関係。;(a) DPPC における  $k$ , (b) DPPC/DOPC=2/1 における  $RF_{max}$ , A: クロピリフォス, B: フルオメツロン, C: イミダクロピリド, D: ピリミカーブ, E: ピレトリン, F: キザロホップ。

を特定するには至らなかった。しかしながら, DPPC 二分子膜における  $k$  の値が  $pLC_{50}$  ( $= -\log LC_{50}$ ) の小さいグループと大きいグループに大別できていること (図 4a), また, DPPC/DOPC=2/1 の  $RF_{max}$  がそれぞれのグループ内での毒性の序列を表現できている (図 4b)。したがって, モデル細胞膜の組成には検討の余地が多いものの, 複数の膜組成のモデル細胞膜を組み合わせることで化学物質の毒性を評価できる可能性は示された。

### (3) コラーゲンマトリクスによるセンサ電極への効率的なモデル細胞膜の固定化方法

コラーゲンモデルペプチド Fmoc-(Pro-Pro-Gly)<sub>7</sub>-OH は固相法により収率 88% で, チアゾリジンとのカップリングは収率 56% (純度 92%) で行うことができた。種々の濃度の Fmoc-(Pro-Pro-Gly)<sub>7</sub>-TAL 溶液に水晶振動子微量天秤 (QCM) 浸漬すると濃度によって固定化されるペプチドの量が異なり, 固定化距離 (固定化密度) を制御できることが明らかとなった (図 5)。種々の固定化距離で Fmoc-(Pro-Pro-Gly)<sub>7</sub>-TAL を固定化した QCM 電極をサンプルコラーゲン (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> 溶液に浸したところ質量の増加が確認された, この質量増加は過熱洗浄するとほぼ 0 となったことからコラーゲン特有の三重らせんの会合体を形成したものと考えられた。一方で, 固定化距離が小さいと会合体の形成量が減少しており, 固定化ペプチド同士による会合体の形成が確認できた (図 6)。以上より, 電極上で効果的に会合体を形成させる最適な固定化密度を求めることができた。

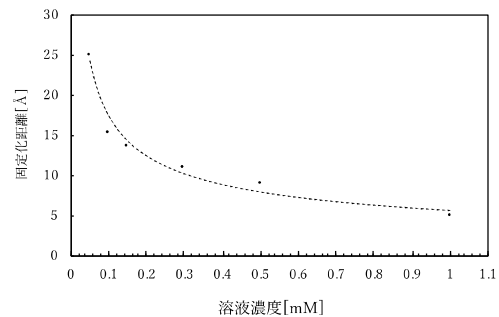


図5 溶液濃度と固定化距離の関係

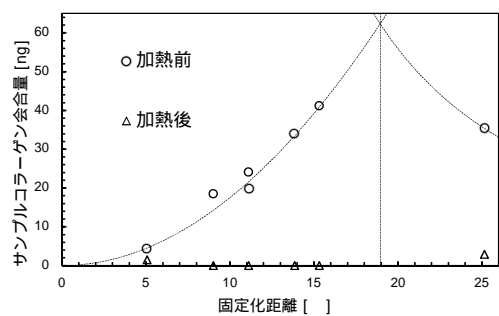


図6 固定化距離と会合量の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤 操太 , 児島 隆史 , 岸川 史歩 , 土井 正光
2. 発表標題 コラーゲンセンサの作製
3. 学会等名 第26回 高専シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 茉莉花 , 堺 千夏 , 森田 誠一
2. 発表標題 モデル細胞膜を利用するバイオアッセイセンサ
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(岡山大会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土井 正光  (Doi Masamitsu)  (30217608)	和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・教授   (54701)	
研究分担者	西本 真琴  (Nishimoto Makoto)  (70609057)	和歌山工業高等専門学校・生物応用化学科・准教授   (54701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------