

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：54701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12283

研究課題名(和文)固定化モデル細胞膜の刺激応答性を利用するバイオアッセイセンサ

研究課題名(英文)Bioassay sensor using stimuli-response of immobilized 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂質二分子膜の球状ベシクルに封入した蛍光物質の放出速度を農薬存在下で測定し、放出速度パラメータ(放出速度定数, 放出初速度)を算出した。リン脂質アシル鎖の不飽和度の異なる二分子膜から得られた放出速度パラメータを用いて、6種の農薬の毒性を予測する重回帰式を求めることができた。さらに、この脂質二分子膜-農薬間相互作用の熱的分析を行い、相互作用の様態を推測することができた。また、アシル鎖に分岐鎖を有する二分子膜の基礎物性を測定し、新たなモデル細胞膜設計の指針を得た。一方、脂質二分子膜の固定化については、電極上でのゲルへの包埋を検討したが有用なゲル素材の選定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

限定的ではあるが、脂質二分子膜-農薬間の相互作用に基づく農薬毒性の予測式が得られたことにより、生物や細胞を用いない簡便な毒性評価法を提示できた。また、熱分析によって溶解度の小さい農薬と分子集合体である脂質二分子膜との結合に関する熱力学パラメータを測定できたことは、農薬の二分子膜への分配位置や相互作用の解明に成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The release kinetics of fluorescent substances encapsulated in spherical vesicles of lipid bilayers were measured in the presence of pesticides, and release kinetic parameters (release rate constant, initial rate of release) were calculated. Using the release kinetic parameters obtained from the bilayers with different degrees of unsaturation of the phospholipid acyl chains, we were able to obtain multiple regression equations to predict the toxicity of the six pesticides. Furthermore, thermal analysis of the interactions between the lipid bilayers and the pesticides was performed to infer the nature of the interactions. We also measured the basic properties of bilayers with branched acyl chains, and obtained guidelines for the design of new model cell membranes. On the other hand, for the immobilization of lipid bilayers, we investigated their embedding in gels on electrodes, but were unable to select an effective gel material.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：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 環境評価 バイオセンサー 熱分析

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、その数は日々増え続けていた。化学物質の中には生命・人体にとって有害・有毒とされるものも多く、化学物質の毒性を定量的に評価する必要があった。生体における化学物質の毒性発現は、多くの現象が複雑に係わっており、吸収、代謝、分配を経て標的細胞に至った化学物質が細胞毒性を発現、これが、器官の機能不全や全身毒性の発現に発展していく。このため、「毒性」の評価は、生物個体、単一細胞などの生物材料の生物応答を利用するバイオアッセイが広く用いられていた。しかしながら、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を必要とし、単一細胞を用いる「細胞毒性試験」では単一細胞が変異しやすく、細胞の管理、取り扱いには専門的な知識と技術が必要であった。したがって、生きている生物材料を使わずに生物作用量に相当する変化をより迅速に、より簡便に評価できれば毒性評価のための有用なツールになりうると考えられた。

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毒性を簡便、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、以下の項目を検討した。

- (1) 農薬-モデル細胞膜間の相互作用の定量と毒性との関連
- (2) 農薬-モデル細胞膜間の相互作用の熱力学的な解明
- (3) バイオアッセイセンサに適した効率的なモデル細胞膜の固定化方法の開発
- (4) 分岐鎖脂肪酸の導入による新たなモデル細胞膜創成

3. 研究の方法

- (1) 農薬-モデル細胞膜間の相互作用の定量と毒性との関連

先行研究(科研費 18K11685)で行った 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) とアシル鎖の異なる 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) の混合リポソームを用いた 6 種の農薬 (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) 存在下におけるカルセイン放出アッセイに加えて、極性基を変化させた 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) の混合リポソームを用いたカルセイン放出アッセイを行った。放出速度は 1 次過程として次の速度式で近似し、速度パラメータを算出した。

$$RF(t) = RF_{\max}[1 - \exp(-kt)] \quad (1)$$

- (2) 農薬-モデル細胞膜間の相互作用の熱力学的な解明

農薬存在下における脂質二分子膜の相転移挙動(相転移温度、相転移エンタルピー)の変化を示差走査熱量 (DSC) 測定により調べ、農薬の物理化学的特性との関連を調べた。また、より直接的な測定として等温滴定熱量 (ITC) 測定を行った。農薬水溶液に脂質二分子膜懸濁液を滴定にしたときの熱分析曲線から独立結合モデルで結合の平衡定数 K_a 、ならびに結合エンタルピー ΔH を求め、そこから結合の自由ギブズエネルギー ΔG ならびに結合エントロピー ΔS を算出し相互作用の様態を調べた。

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

- (3) バイオアッセイセンサに適した効率的なモデル細胞膜の固定化方法の開発

ゼラチンゲルへのリポソーム包埋による固定化を行い、その安定性およびカルセイン放出アッセイに与える影響について検討した。

- (4) 分岐鎖脂肪酸の導入による新たなモデル細胞膜創成

分岐鎖の位置が異なる 13-methyltetradecanoic acid (iso C15:0) および 12-methyltetradecanoic acid (anteiso C15:0) を混合したリポソームを調製し、時間分解蛍光異方性測定と DSC 測定により膜特性に与える影響を調査した。また、1-palmitoyl-(12S-methylmyristoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (16:0-a15:0 PC) についても影響を調べた。

4. 研究成果

- (1) 農薬-モデル細胞膜間の相互作用の定量と毒性との関連

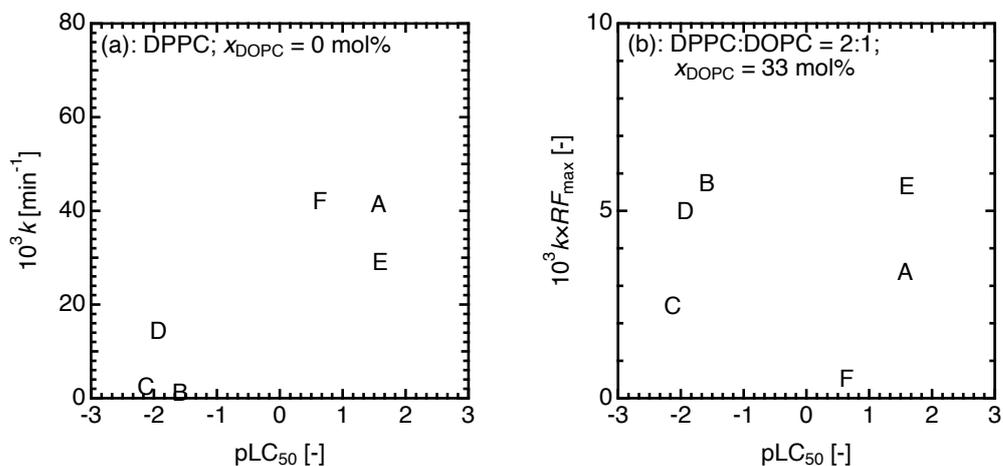


図1 カルセイン放出速度パラメーターと LC₅₀ の関係; (a) DPPC における k , (b) 33 mol% DOPC における $k \times RF_{\max}$,

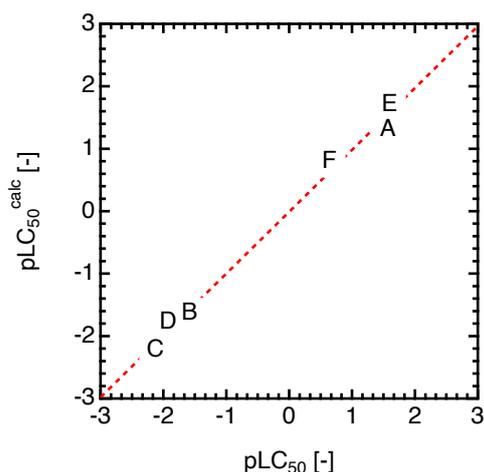


図2 LC₅₀ の予測値と実測値の関係

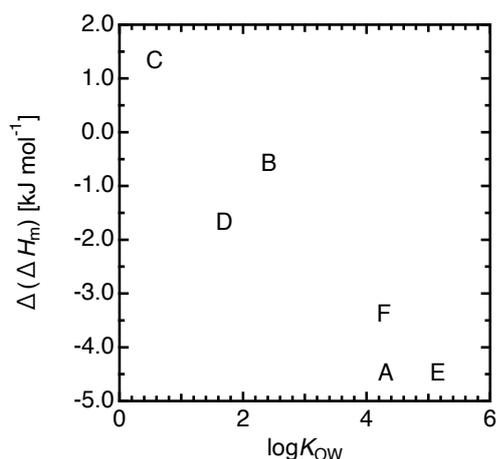


図3 主転移エンタルピーの変化量と農薬疎水性の関係

DPPG/DPPC 混合リポソームを用いて農薬存在下でのカルセイン放出アッセイを行ったが、DPPG (0–50 mol%) 混合がカルセイン放出速度に与える影響は見られなかった。DPPC/DPPG 混合リポソームは表面に負電荷を有するが、DPPC と DPPG はアシル鎖が共通である。農薬とリポソームの相互作用には、表面電荷の寄与は小さく、脂質分子同士の疎水性相互作用が大きく、農薬との相互作用が小さかったものと考えられる。先行研究 (科研費 18K11685) で得られた DPPC/DOPC 混合リポソームの農薬存在下におけるカルセイン放出速度は (1) 式で近似できた。得られた速度パラメータの中で DPPC リポソームにおける放出速度定数 k^0 は調査した農薬を毒性 (半致死濃度 LC₅₀) の小さいグループと大きなグループに分けた。また、33 mol% DOPC リポソームにおける放出初速度 $k^{33} \times RF_{\max}^{33}$ はそれぞれのグループ内で毒性に依存する傾向を示した。この二つのパラメータを用いて次の重回帰式を適用すると実測値との間に良い相関が得られた (図 2)。

$$pLC_{50} = -2.6546 + 3.362U(k^0) + 177.69(k^{33} \times RF_{\max}^{33}) \quad (4)$$

ここで、 $U(k^0)$ は、 $U(k^0) = 0$ ($k^0 < 20 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)、 $U(k^0) = 1$ ($k^0 > 20 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) と定義する閾値関数である。

(2) 農薬-モデル細胞膜間の相互作用の熱力学的な説明

DPPC に種々の農薬を混合して調製したリポソームの DSC 測定を行うと、前転移の消失の他、主転移温度の低温化あるいは主転移エンタルピーの現象が観測された。例えば、主転移エンタルピーの変化量は、部分的に序列の逆転があるものの農薬の疎水性に依存して減少量が大きく (図 3)、農薬が DPPC 二分子膜内部に分配して、膜の秩序構造を攪乱し、相転移に要するエネルギーを減少させていると考えられた。一方、ITC 測定では、一部の農薬でフィッティングが収束せず熱力学パラメータを得ることができなかつたものの、DPPC および 33 mol% DOPC どちらの二分子膜においても、ほとんどの農薬においてエンタルピー項と比較して、エントロピー項の寄与が大きく、農薬と脂質二分子膜の相互作用はエントロピー駆動型すなわち疎水性相互作用が駆動力となっていることが示唆された (図 4)。一方、疎水性の大きな農薬ほど相互作用しや

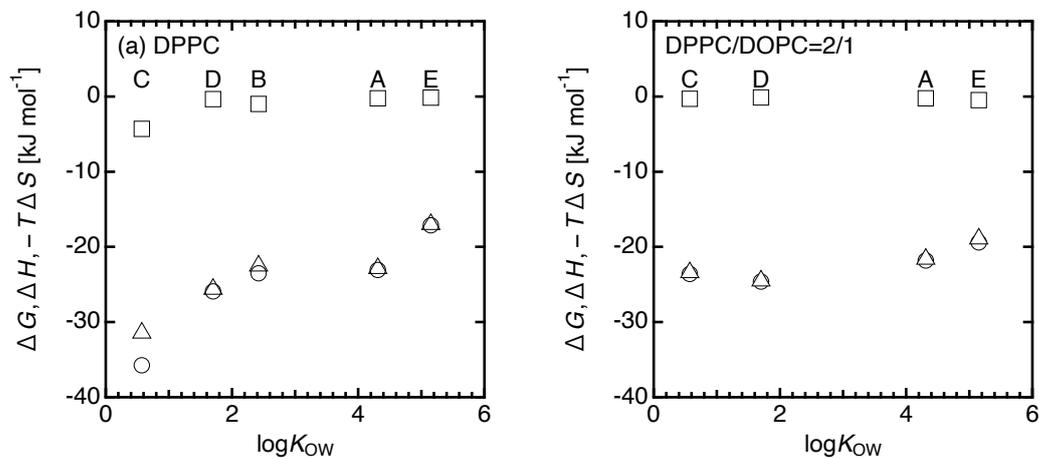


図4 (a) DPPC, (b) 33 mol% DOPC における二分子膜-農薬間相互作用の熱力学的パラメータと農薬疎水性の関係;
○: ΔG , □: ΔH , Δ : $-T\Delta S$

すく、全体的な相互作用の安定性を表す $-\Delta G$ が大きくなるという予想に反して $-\Delta G$ の値は農薬の疎水性が大きくなるにつれて小さくなった。このことは、DPPC 二分子膜において特に顕著で相互作用に伴い膜の攪乱による系全体の不安定化が生じているものと考えた。

(3) バイオアッセイセンサに適した効率的なモデル細胞膜の固定化方法の開発

カルセイン放出アッセイは蛍光測定を行う必要があるため、オンタイム、オンサイトモニタリングに適しているとは言いがたく、電極反応を利用したセンシングを検討した。そのためにカルセインに代わる電気化学プローブの探索と二分子膜固定化のための生体由来ゲルであるゼラチンゲルへのリポソームの包埋を試みた。カルセイン封入リポソームをゼラチンに封入したところ静置条件では 24 h 程度までリポソームを包埋できていたが、カルセインの放出量の増加も観測され、ゼラチンが二分子膜の膜透過性に影響を与えていることが分かった。

(4) 分岐鎖脂肪酸の導入による新たなモデル細胞膜創成

DPPC 二分子膜への iso C15:0 の添加では、主相転移温度の上昇が確認された。また、時間分解偏光解消法による解析から、iso C15:0 は液晶相において脂質分子間隔を狭め、運動性を抑制することが分かった。一方、anteiso C15:0 の添加にともなう主転移温度の変化はなかった。さらに、液晶相において脂質分子間隔を変えてはいなかったが、脂質分子の運動性は低下させていることが明らかになった。これはメチル分岐鎖の違いによるものと考えられた。リン脂質である 16:0-a15:0 PC についても脂肪酸 anteiso C15:0 を添加した場合と同様の効果が得られた。アシル鎖に不飽和結合を有するリン脂質を加えた場合とは異なり、液晶相における脂質二分子膜の安定化が見込まれ、農薬との相互作用において差別化に期待が持てる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morita Seiichi, Sakai Chinatsu, Sakamoto Marika, Nishimoto Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluating pesticide ecotoxicity using a stimuli-response model in liposomes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCIS Open	6. 最初と最後の頁 100082 ~ 100082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jciso.2023.100082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Kentaro, Ueno Hiroto., Numa Yu, Morita Seiichi., Nishimoto Makoto	4. 巻 322
2. 論文標題 Effects of fatty acid from deep-sea microorganisms on lipid bilayer membrane fluidity under high pressure: comparison of branched-chain and polyunsaturated fatty acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 E3S Web of Conferences	6. 最初と最後の頁 01019 ~ 01019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1051/e3sconf/202132201019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fuji Sota, Tanaka Kotaro, Kishikawa Shiho, Morita Seiichi, Doi Masamitsu	4. 巻 133
2. 論文標題 Quartz crystal microbalance sensor for the detection of collagen model peptides based on the formation of triple helical structure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 168 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 瀧口莉央, 中屋新太郎, 森田誠一
2. 発表標題 脂質二分子膜と疎水性物質の相互作用の熱力学的的検討
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木守菜々子, 糸川聖菜, 森田誠一
2. 発表標題 電気活性物質と脂質二分子膜を用いるバイオアッセイセンサ
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Miura, Hiroto Ueno, Yu Numa, Seiichi Morita, Makoto Nishimoto
2. 発表標題 Effects of Fatty Acid on Lipid Bilayer Membrane Fluidity under High Pressure: comparison of Branched-Chain and Polyunsaturated Fatty acid,
3. 学会等名 International Seminar on Fish and Fisheries (ISFFS) 2021, (Bogor and Bali (Virtual), Indonesia) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sota Fuji, Hoka Maeda, Shiho Norimura, Seiichi Morita, Masamitsu Doi
2. 発表標題 Fabrication of collagen sensor based on the formation of triple helical structure
3. 学会等名 第27回高専シンポジウム(オンライン)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seiichi Morita, Rio Takiguchi, Shintaro Nayaka, Chinatsu Sakai, Marika Sakamoto, Yusuke Miyamoto, Makoto Nishimoto
2. 発表標題 Evaluation of pesticide-lipid bilayer interactions for the assessment of toxicity
3. 学会等名 13th International congress on Membrane and Membrane Processes (ICOM2023) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------