

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590036

研究課題名（和文） センサーを用いた細胞膜と薬物の相互作用研究の新展開

研究課題名（英文） New development of studies on the interaction between cell membranes and drugs using sensors

研究代表者

勝 孝 (KATSU TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40112156

研究成果の概要（和文）：イオンセンサーや酸素電極などの電気化学センサーを利用して、カチオン性ポルフィリンやキサントレン系色素がいかに関細胞膜を光不活性化するかを解明した。また、カリウムイオンセンサーを利用した細胞膜の透過性変化の測定を通じて、溶血活性の低い膜作用性抗菌ペプチドの創製、マストパランなどのヒスタミン遊離物質の細菌、赤血球及び肥満細胞に対する膜透過性増大作用の比較研究及びグラム陰性菌の外膜透過性を亢進させる物質の探索などを進めた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed how cationic porphyrins and xanthene dyes photoinactivated cell membranes using electrochemical sensors, such as ion sensor and oxygen electrode. Furthermore, we applied a K^+ sensor to cell membrane permeability assay and advanced (1) the development of antimicrobial peptides with low hemolytic activity; (2) the comparative study of the membrane-permeabilizing activities of mastoparans and related histamine-releasing agents in bacteria, erythrocytes, and mast cells; and (3) the investigation of new substances that enhance the outer membrane of Gram-negative bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：センサー、カチオン性ポルフィリン、キサントレン系色素、光不活性化、グラミジンSアナログ、マストパラン、抗原虫薬、膜透過

1. 研究開始当初の背景

電気化学センサーや光技術を用いる様々なセンサーのなかで、私たちはこれまでイオンを識別するセンサー（イオンセンサー）の開発と応用を中心に研究を進めてきた。イオンセンサーは溶液の色・濁りにまったく影響を受けないことから、細胞懸濁液中での薬物作用の検討に有力な測定法となる。例えば、カリウムイオンセンサーを用いて、非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs）には細胞膜のカリウムイオン透過性を増大させる作用があり、抗潰瘍薬として知られているゲラニルゲラニルアセトンがNSAIDsによる細胞膜のカリウムイオン透過性増大作用を保護することを見出した。私たちは、さらに、カリウムイオンセンサーと分光法とを組み合わせて、薬物が細胞膜に開けたチャンネルサイズを定量することにも成功した。これらの研究を通じてセンサー法が細胞膜を標的とする薬物の作用を解明するために有用なツールになることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、細胞膜を標的とする薬物の作用機構の解析にセンサー法を応用し、センサー法を生物科学領域への新しい研究手法として確立していくことを目的としている。具体的には、色素による細菌の光不活性化機構の解明及び溶血活性の低い膜作用性抗菌ペプチドの創製などに向けて研究を進めた。

3. 研究の方法

カリウムイオンセンサー、酸素電極及びテトラフェニルホスホニウムセンサーを用いて、色素が細胞膜機能に及ぼす影響を膜透過性変化、呼吸阻害及び膜電位変化の観点から検討した。また、カリウムイオンセンサーを用いて、薬物の細菌に対する膜透過性亢進作用を評価し、溶血活性の低い膜作用性抗菌ペプチドを創製した。さらに、マストパランなどのヒスタミン遊離物質の細菌、赤血球及び肥満細胞に対する膜透過性増大作用の比較研究及びグラム陰性菌の外膜透過性を亢進させる物質の探索をカリウムイオンセンサーを用いて

進めた。

カリウムイオンセンサーはバリノマイシンをイオノフォアとして、またテトラフェニルホスホニウムセンサーは[3,5-ビス(2-メトキシヘキサフルオロ-2-プロピル)フェニル]ホウ酸ナトリウムをイオン交換体として用いて作製した。酸素電極はバイオット社（東京）のポーラロ式のものを用いた。

4. 研究成果

(1) 色素による細胞膜の光不活性化機構の解明：カチオン性ポルフィリン及びキサンテン系色素の細菌および赤血球膜に対する光不活性化作用を詳細に検討した。その結果、カチオン性ポルフィリンによる細菌の光不活性化は、主に呼吸阻害による膜電位低下が引き金になっていることが明らかにされた。一方、キサンテン系色素による光不活性化は、一部の色素では呼吸阻害が見られたものの、主に膜透過性亢進による膜電位低下が引き金になることを明らかにした。色素間による作用の違いは、細胞質膜中での色素の存在位置に起因する可能性が大きいことが、赤血球の形態変化の観察から示唆された。これらの研究成果は、Analytical Sciences誌 (Vol. 26, No. 10) のHot Articleとして、また研究成果を示すイラストがPhotochemical & Photobiological Sciences誌の2011年7月号の表紙に掲載された。現在、構造類似の一連のポルフィリン（プロトポルフィリン、メソポルフィリン、デュエテロポルフィリン、ヘマトポルフィリンなど）の細菌および赤血球膜に対する作用を詳細に比較検討している。

(2) 溶血活性の低い膜作用性抗菌ペプチドの創製：抗生物質グラミシジンSは細菌膜の透過性を増大し、強力な抗菌作用を示すものの、赤血球膜にも作用して溶血活性を示すため、溶血活性の低いグラミシジンSアナログの創製を目指して研究を進めた。合成したアナログの細菌に対する膜透過性亢進作用は、細胞質からのカリウムイオンの流出をカリウムイオンセンサーを用いて評価し、溶血作用と比較した。その結果、グラミシジンSのβ-ターン部位のフェニルアラニン残基を、側鎖にピ

リジル基をもつ親水性非天然アミノ酸に置換したペプチドが溶血活性を抑え、細菌膜の透過性を選択的に増大させることを見出した。

(3) 塩基性両親媒性構造をもつマストパランなどのヒスタミン遊離物質の細菌、赤血球及び肥満細胞に対する膜透過性増大作用の比較研究：カリウムイオンセンサーを用いて、ヒスタミン遊離物質の細菌、赤血球及び肥満細胞に対する膜透過性増大作用を系統的に検討した。その結果、ヒスタミン遊離活性が強いものは黄色ブドウ球菌に対して強い膜透過性増大作用をもち、酸性リン脂質との相互作用が強い塩基性両親媒性物質は、ラット腹腔肥満細胞からヒスタミン分泌後に、すぐに肥満細胞形質膜の透過性を増大させることを見出した。ヒスタミン分泌後には、ホスファチジルセリンが細胞膜表面に出現することはよく知られており、今回の結果は酸性リン脂質と強い相互作用を示す両親媒性物質は細菌膜のみならず肥満細胞形質膜の透過性も増大できることを示した。また、これらの物質は、赤血球膜の透過性変化（溶血）を引き起こす濃度で、赤血球の形態をエキノサイト（外方突出）型に変形させた。したがって、今回検討した塩基性両親媒性物質は、細胞膜外層に優先的に蓄積することにより膜構造を不安定化させ、膜透過性変化を引き起こすものと考えられた。

(4) グラム陰性菌の外膜透過性を亢進させる物質の探索：外膜透過性が増大すると、細胞質膜の透過性変化を引き起こす薬物（クロシジンAなど）が細胞質からカリウムイオンを流出させることを利用して、既存の医薬品の外膜透過性亢進能をカリウムイオンセンサーを用いて検討した。その結果、ジミナゼン、ペンタミジンなどの抗原虫薬に外膜透過性を増大させる作用があることを見出した。外膜透過性増大作用に対する構造活性相関の検討は、今後、グラム陰性菌に対する新しい抗菌薬をデザインする上で有用な情報を与えるものと期待している。

(5) その他、センサーの応用研究として、酸素電極を用いたスーパーオキシドアニオンの新規定量法を開発した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計8件）

① 勝 孝、駒越圭子、増田和文、加藤久登、井上 剛、センサーを用いる薬物作用の *in situ* モニタリング、分析化学、査読有、Vol. 62、No. 2、2013、pp. 121-130、DOI:10.2116/bunsekikagaku.62.121

② Makoto Ando, Rie Kamei, Keiko Komagoe, Tsuyoshi Inoue, Keiichi Yamada, Takashi Katsu, In situ potentiometric method to evaluate bacterial outer membrane-permeabilizing ability of drugs: Example using antiprotozoal diamidines, Journal of Microbiological Methods, 査読有, Vol. 91, No. 3, 2012, pp. 497-500, DOI:10.1016/j.mimet.2012.09.033

③ Hisato Kato, Keiko Komagoe, Yuka Nakanishi, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, Xanthene dyes induce membrane permeabilization of bacteria and erythrocytes by photoinactivation, Photochemistry and Photobiology, 査読有, Vol. 88, No. 2, 2012, pp. 423-431, DOI:10.1111/j.1751-1097.2012.01080.x

④ Keiichi Yamada, Makoto Kodaira, Shun-suke Shinoda, Keiko Komagoe, Hiroyuki Oku, Ryoichi Katakai, Takashi Katsu, Ichiro Matsuo, Structure-activity relationships of gramicidin S analogs containing (β -3-pyridyl)- α , β -dehydroalanine residues on membrane permeability, MedChemComm, 査読有, Vol. 2, No. 7, 2011, pp. 644-649, DOI:10.1039/c1md00081k

⑤ Keiko Komagoe, Hisato Kato, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, Continuous real-time monitoring of cationic porphyrin-induced photodynamic inactivation of bacterial membrane functions using electrochemical sensors, Photochemical & Photobiological Sciences, 査読有, Vol. 10, No. 7, 2011, pp. 1181-1188, DOI:10.1039/c0pp00376j

⑥ Satoshi Nakao, Keiko Komagoe, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, Comparative study of

the membrane-permeabilizing activities of mastoparans and related histamine-releasing agents in bacteria, erythrocytes, and mast cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有, Vol. 1808, No. 1, 2011, pp. 490-497, DOI:10.1016/j.bbamem.2010.10.007

⑦ Hisato Kato, Keiko Komagoe, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, *In situ* monitoring of photodynamic inactivation of the membrane functions of bacteria using electrochemical sensors, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 26, No. 10, 2010, pp. 1019-1021, DOI:10.2116/analsci.26.1019

⑧ Keiko Komagoe, Hiroaki Takeuchi, Tsuyoshi Inoue, Takashi Katsu, Application of an oxygen electrode to evaluate superoxide anion-scavenging ability, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 26, No. 8, 2010, pp. 903-906, DOI:10.2116/analsci.26.903

〔学会発表〕(計11件)

① 加藤久登、中西由佳、駒越圭子、井上 剛、齋藤啓太、増田和文、片岡洋行、勝 孝、光活性化されたポルフィリンの細胞膜に対する作用、日本薬学会第133年会、2013年3月29日、横浜

② 安藤 誠、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、アミジノ基を2コ有する医薬品による大腸菌の外膜透過性増大作用、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012年11月15日、京都

③ 加藤久登、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、キサントレン系色素による細菌の光不活性化機構、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、札幌

④ 安藤 誠、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、カリウムセンサー法による外膜透過性増大物質の探索、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、札幌

⑤ 加藤久登、駒越圭子、中西由佳、松山佳澄、井上 剛、勝 孝、キサントレン系色素による細菌および赤血球膜機能の光不活性化、

第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011年11月24日、岡山

⑥ 安藤 誠、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、カリウムセンサーを用いた大腸菌外膜の透過性測定方法の開発と応用、第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2011年11月12日、高松

⑦ 逸見理代、加藤久登、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、光照射したポルフィリン会合体の細胞膜に対する作用、第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2011年11月12日、高松

⑧ 松山佳澄、中西由佳、加藤久登、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、キサントレン系色素による細胞膜の光不活性化、第50回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2011年11月12日、高松

⑨ 加藤久登、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、カチオン性ポルフィリンによる細菌膜の光不活性化機構、第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2011年9月13日、箱根

⑩ 駒越圭子、加藤久登、井上 剛、勝 孝、カチオン性ポルフィリンによる細菌膜機能の光不活性化の*in situ*モニタリング、日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡

⑪ 加藤久登、駒越圭子、井上 剛、勝 孝、ポルフィリン及びキサントレン系色素による細菌の光不活性化、第49回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2010年11月7日、米子

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝 孝 (KATSU TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40112156

(2) 研究分担者

山田 圭一 (YAMADA KEIICHI)

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70323334