

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750084
 研究課題名（和文） 膜作動性生理活性物質の作用機序解明のためのスラブ光導波路蛍光顕微鏡システムの開発
 研究課題名（英文） Development of slab optical waveguide fluorescent microscopy system for the study of heterogeneous chemical reactions of biochemical agents at lipid membrane.
 研究代表者
 堀田 弘樹 (HOTTA HIROKI)
 奈良教育大学・教育学部・准教授
 研究者番号：80397603

研究成果の概要（和文）：本研究代表者がこれまで開発を手掛けてきたスラブ光導波路蛍光顕微鏡システム(SOWG-FM)を用いた、膜作動性抗菌剤（グラミシジン S）による脂質膜破壊作用の観察を行った。同手法は、界面選択性が極めて高く、平面脂質膜の観察に最適な手法である。環境応答性蛍光色素の分配を利用した、独自の脂質膜の可視化技術により、脂質膜の状態を選択的・高感度に観察した。装置面の改良、実験方法の最適化を行い脂質膜観察の手法として確立した。グラミシジン S 類による膜破壊作用が観察でき、細菌を用いた抗菌活性との相関も得られた。

研究成果の概要（英文）：Slab optical waveguide fluorescent microscopy (SOWG-FM) system, which was developed by research representatives was applied to the observation of lipid membrane disruption by antibacterial agent, Gramicidin S (GS). The measurement system has an important advantage in the observation of planar lipid membrane stabilized on a glass surface because its high interfacial selectivity using an evanescent wave illumination. The research representative was developed a visualization method of the planar lipid membrane by an environmentally-responsive fluorescent dye. Lipid membrane disruption by GS and its analog were observed. The results showed good correlation with those antibacterial activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：化学センサー、界面反応計測

1. 研究開始当初の背景

液／液、または液／膜界面のような不均一反応場では、均一溶液相中とは異なる化学反応が（時に、より高効率に）起こることが期待され、新たな反応場として盛んに研究が進められている (Interfacial Nanochemistry, Kluwer, 2005 など)。特に脂質二分子膜を主たる構成成分とする生体膜と、水溶液との界

面は、液／膜界面の代表例であり、光合成や呼吸鎖等のエネルギー生成反応に関わる興味深い反応場として研究が進められている (光導波路分光法を利用した例 JACS 2006, 128, 2184.)。より深く現象を究明するには種々の計測法による多角的なアプローチが必要であり、多くの研究者がそれぞれ独自の手法開発に取り組んでいる。

本研究代表者らは最近、ガラス板表面に作製した脂質二分子膜/溶液界面で起こる化学反応を追跡するための新たな手法として、脂質膜近傍のみを選択的に光励起できるスラブ光導波路蛍光顕微鏡システム (Slab Optical Waveguide Fluorescent Microscopy, SOWG-FM, system, 図 1)を開発した(2010年 5 月分析化学討論会などで発表)。

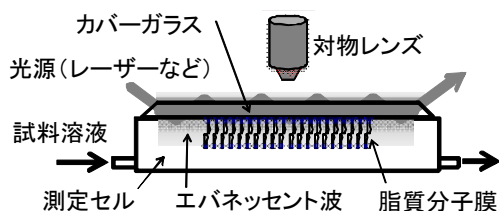


図1.スラブ光導波路を励起光源とする顕微鏡

図 1 の様に、ガラス薄板 (図ではカバーガラス) の中を光を多重全反射により透過させ (これをスラブ光導波路と呼ぶ)、その全反射の際にガラス表面に発生するエバネッセント波 (ガラス表面に 100 nm 程度の厚みで発生する) を励起光源として、特に吸着化学種に対して選択的に可視光励起を行う装置である。これを利用し、ガラス表面に作製した平面脂質膜内に存在する分子の分光検出を実現した。市販の共焦点顕微鏡や全反射顕微鏡と比較し、前者よりもより浅い領域 (1/10 ~ 1/100 程度) を、また後者よりも広い数 mm 四方の範囲を観察できる。また光学設計が容易であるため、"普通"の光学顕微鏡でエバネッセント照明が可能であることも本システムの利点である。これまで、疎水性環境 答 性 蛍 光 色 素 (NBD (4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) 誘導体) を用いた脂質膜内への分配挙動の観察 (=膜の可視化)、その膜に対する抗菌性物質の作用について検討を行ってきた。今後、生体膜への薬剤の浸透作用の評価、抗菌剤のケミカル・スクリーニング等への応用が期待できる重要な技術である。

2. 研究の目的

生体膜のモデルである脂質二分子膜を用いて、膜作動性抗生物質であるグラミシジン S (GS) の膜との相互作用を観察する。GS は、図 2 のように 10 個のアミノ酸残基からなる天然の環状ペプチドである。

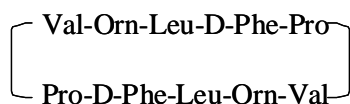


図 2. グラミシジン S

この GS の作用機構を解明することを、本研

究期間内での第一の目的とするが、将来的には、抗菌性物質に対するケミカル・スクリーニングの手法として適用可能であることを示したい。これにより細菌などを用いる生物試験と比較し、迅速に抗菌性物質の基礎化学特性が得られると期待できる。

本課題では、GS の反応を観察すると同時に、装置面での改良を進めていき、脂質膜/溶液界面を観察するための一般的な手法として測定システムの開発・完成を行う。

3. 研究の方法

(1) 脂質膜について

中性リン脂質である DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine, 図 3a) を用いて、ベシクルを超音波法にて作製し、それをベシクルフュージョン法にてガラス平面上に展開して、平面脂質膜を得る。

本検討では、DMPC に対して、一般的に膜が強固になることが知られているコレステロール (図 3b) を添加することで、コレステロールが膜の安定化にどの程度寄与しているのかを考察した。またこれにより、成膜過程の再現性向上も図った。

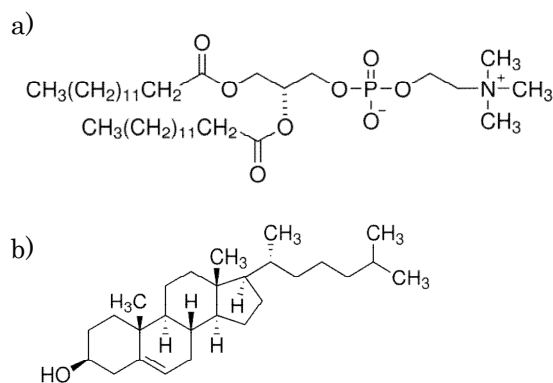


図 3. (a) DMPC、(b)コレステロールの構造

(2) 膜作動性抗菌剤について

GS による脂質膜破壊作用を明らかにするため native GS と合わせて 2 種類の GS 改変体を用いた。GS のフェニルアラニン(Phe)残基 2 つを、共にチロシン(Tyr)に変えた Tyr-GS と、おなじくアラニン(Ala)に変えた Ala-GS を用いて検討を進めた。前者の改変体 (Tyr-GS) は native と比べて親水性が増している。一方の Ala-GS は native と比較しフェニル基が無くなっている。これら 3 種類に加えて脂質膜を壊すことが知られている界面活性剤である TritonX-100 を合わせて比較・検討を行った。また、膜へのコレステロール添加による効果を調べた。

(3) 装置の改良

以上の実験を行う過程で、セルに改良点が見つかればすぐに改良を加え、誰でも容易に扱える構造のシステムとして完成させる。

4. 研究成果

(1) 脂質膜の作製

DMPC のベシクル溶液をガラス板上に展開して製膜した後、NBD のブチルアルキル誘導體 (NBD-C4) をセルに送液して脂質膜内に分配させた。このときの SOWG-FM 画像を図 4 に示す。

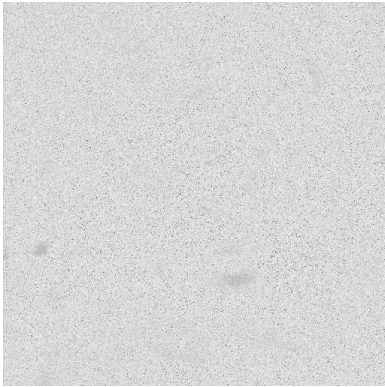


図 4. DMPC 膜の蛍光画像 (白いほど蛍光強度が強いことを示している)

NBD-C4 による蛍光が一様に観察されている。これは脂質膜がガラス上に均質に形成され、そこに NBD-C4 がほぼ均一に分配していることがわかる。この状態では、緩衝液のみを送液しても、変化せず、長時間にわたり蛍光強度の減衰は観察されなかった。

(2) GS 類により脂質膜破壊の観察

続いて GS 類を溶解した水溶液を送液した際に観察された蛍光強度変化を図 5 に示す。図 4 に示すような SOWG-FM 画像全体の輝度平均値をとっている。

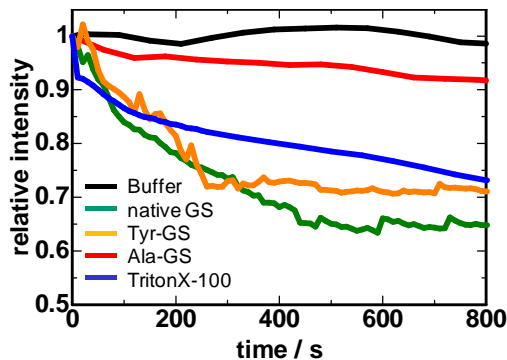


図 5. GS 類送液に伴う蛍光強度変化 (DMPC 膜内に NBD-C4 を分配させ可視化している、縦軸は試料送液直前の蛍光強度を 1 とした相対強度)

GS 改変体は 1 mM、TritonX-100 は 5% 水溶液で送液した (全て pH 7.0 緩衝液中)。

native GS (図中 緑線)、Tyr-GS (同 黄色) を送液時に、時間経過に伴い大きく蛍光強度が減少していることが分かる。この変化は、中性界面活性剤である TritonX-100 の送液による変化 (図中 青線) と同様であった。TritonX-100 に両親媒性分子を溶解させる作用があることはよく知られており、native GS、Tyr-GS が、それと同様に脂質分子膜をガラス表面からはぎ取ったことが分かった。一方、緩衝液のみの送液 (図中 黒線) ではほとんど輝度変化はなく、Ala-GS (図中 赤線) ではそれと比べてやや減少傾向が観察されていることが分かる。以上の結果から、GS の膜破壊作用において Phe 残基のフェニル基が重要な役割を担っていることが示唆された。

また、このとき添加する GS 類の濃度を变化させた際の結果を以下 図 6 に示す。

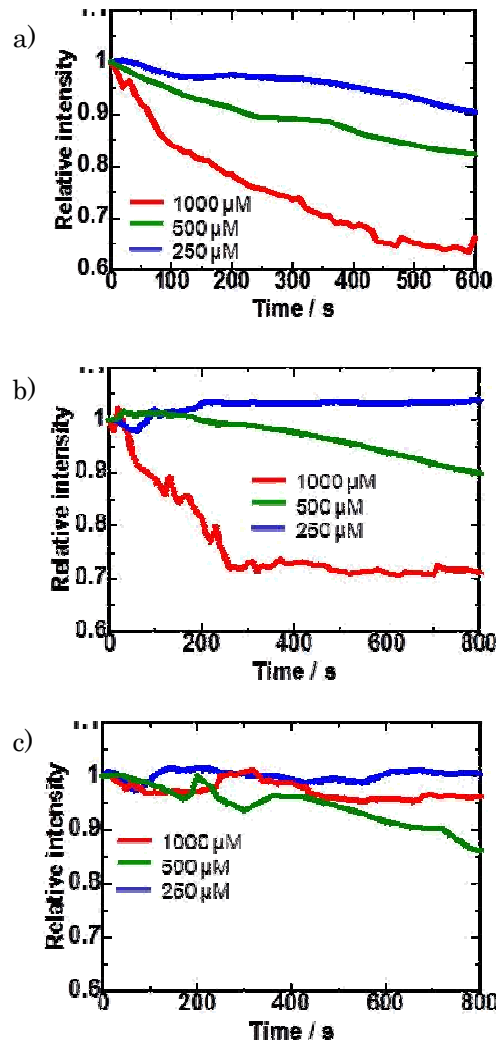


図 6. GS 類の濃度変化に伴う膜破壊作用 (a) native GS、(b) Tyr-GS、(c) Ala-GS

GS類を各 250 ~1000 μM の濃度で送液したものである。native GS、Tyr-GS では、濃度を高くするに伴い蛍光強度の減衰の割合が大きくなっており、これらの物質が脂質膜破壊に関与していることが、十分に示された。その一方で、Ala-GS では添加により強度の多少の減少が観察されているものの、濃度依存性があまり大きくないことから、膜破壊に係る活性は決して高くないものと考えられる。

続いて、脂質膜の安定化に寄与することが知られているコレステロールを DMPC 膜に添加し、同様の実験を行った。図 7 にコレステロール添加量 (DMPC とのモル分率) による膜形成の割合を示す SOWG-FM 図を示す。

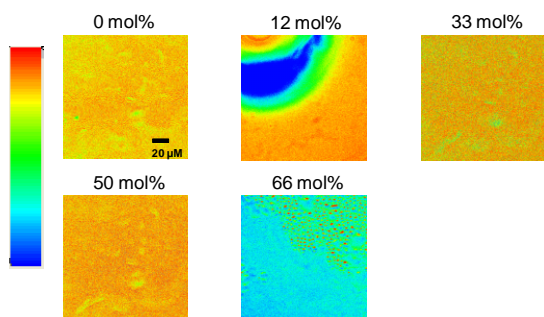
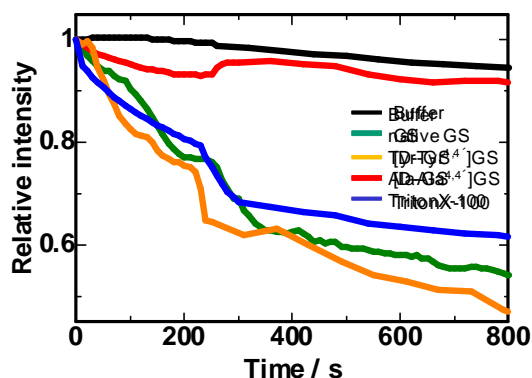


図 7. コレステロール添加量による膜の状態変化。左端のバーは上に行くほど蛍光強度が高いことを示している。

図 7 に示されるように、コレステロール濃度が 12mol%程度と低い状態であると一様の膜が形成されていないことが分かる。また反対に、66mol%とコレステロール濃度が高いとガラス板上に膜を形成しない事も分かった。この状態ではおそらく水溶液中に分散して存在しているものと考えられるが、今回の実験からは明らかではない。これらの中間的な濃度条件下 (33、または 50mol%) においては、一様に膜が形成されていることが分かる。コレステロールを含まない条件 (0mol%) と比較し、やや蛍光強度が高くなっているのは、膜の疎水性が増し、蛍光色素 NBD-C4 の分配比がやや高くなったためではないかと予想される。以上の結果を踏まえて、以降の実験はコレステロール濃度 33、または 50mol% の条件下で行った。

図 8 にコレステロール濃度 33mol% と 50mol% における GS 類の添加による脂質膜破壊に伴う蛍光強度変化を示す。

a) 33 mol%コレステロール



b) 50 mol%コレステロール

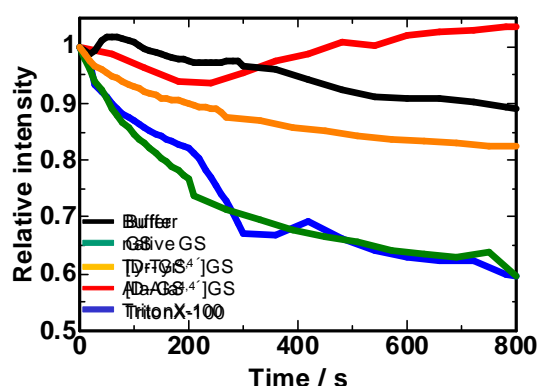


図 8. コレステロール添加膜への GS 類添加に伴う脂質膜破壊の様子

コレステロール濃度 33mol%では、native GS、Tyr-GS、TritonX-100 の 3 つが大きく輝度を減少させており、先に図 5 に示したコレステロール無添加の結果との大きな違いは観察されなかった。しかし一方で、コレステロール濃度 50mol%においては、Tyr-GS の添加においてのみ、強度の減少幅が小さくなった。今回の結果では、native GS、TritonX-100 共にコレステロールの添加による影響が観察されておらず、Tyr-GS のみその影響が見られている。この結果が意味していることは、現在の所、十分に解析できていないが、コレステロールの添加により多少なりとも、脂質膜が GS による膜破壊の影響を受けにくくしていることが伺える。

(まとめ)

GS が脂質膜を破壊する様子を、本代表者が開発した SOWG-FM システムにより観察する事ができた。膜破壊には、Phe 残基のフェニル基の存在が重要であることが示唆され、それが中性リン脂質である DMPC 膜を破壊することから、疎水的な相互作用により

脂質膜に陥入しているのではないかという仮説が考えられた。しかしガラス表面からはぎ取られた脂質分子がどのような状態で水中に溶解（分散）しているかは、今回の実験からでは分からない。

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)

[学会発表] (計1件)

堀田弘樹・櫻井貴裕・吉原利忠・飛田成史・角田欣一、脂溶性抗酸化剤クルクミンの脂質膜/水溶液界面での電子移動、日本分析化学会第60年会、2011年9月14日～16日、名古屋大学)。

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 弘樹 (HOTTA HIROKI)

奈良教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：80397603

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：