

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：54101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25800239

研究課題名(和文) 外来物質により脂質膜に誘起される孔の動的な構造

研究課題名(英文) Visualization of pore formation process in phosphatidylcholine membrane of giant unilamellar vesicle induced by epigallocatechin gallate

研究代表者

丹波 之宏 (Tamba, Yukihiro)

鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：50436911

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)：外来物質が脂質膜に誘起する孔(ポア)の動的な構造は、その直径の小ささから不明な点が多い。一方、エピガロカテキンガレート(EGCg)は巨大な脂質膜ベシクル(GUV)の破裂を誘起し、その際、脂質膜に生じたポアの直径は数micro-mと巨大であった。そこでEGCgと脂質膜の相互作用を単一GUV法を用いて調べた。高時間分解能をもつ測定系により、まずEGCgによって脂質膜に小さなポアが誘起され、そのポアが時間とともに拡大、転じて収縮する過程が詳細に明らかになった。ポアの動的構造を解析したところ、EGCgの誘起したポアは脂質膜にはたらく力学を基にした古典的なモデルでよく説明しうることが判った。

研究成果の概要(英文)：Studies of the interaction of Epigallocatechin gallate (EGCg) with lipid membrane of single giant unilamellar vesicles (GUVs) showed that EGCg induced bursting of GUVs. In this report, to clarify the mechanism of EGCg-induced bursting of GUVs, we investigated the process of the bursting of GUVs with a high time-resolution of 3 ms using single GUV method. The result indicates that the interaction of EGCg with a DOPC-GUV induces a small pore in the membrane. The size of a pore changed over time; at the beginning of the pore formation the pore size increased, and then the pore decreased to a smaller size. EGCg also induced a pore in DOPC membrane containing cholesterol (chol). Analysis of these structural changes of a pore showed that the both growth velocity and closure velocity of pore in the presence of chol are larger than those in the absence of chol. On the basis of these results, we propose a hypothesis on the mechanism of EGCg-induced pore formation.

研究分野：生物物理学

キーワード：GUV 生体膜 脂質膜 ポア形成 ポアの動的構造

1. 研究開始当初の背景

ある種のペプチドなどの外来物質は標的細胞の細胞膜に結合し、その膜に小孔(ポア)を空ける。外来物質がどのようなメカニズムで生体膜のバリア機能を破壊し膜中にポアを形成するのか、またどのような構造のポアを誘起するのには興味深く、その脂質膜との相互作用の研究が活発に行われてきたが未だ不明な点が多い。

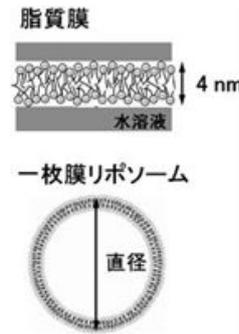
一般に外来物質と生体膜/脂質膜の相互作用の研究は、直径数百 nm 程度の脂質膜の袋状の構造体、リポソームあるいはベシクル(LUV)を多数含む懸濁液を用いて蛍光分光法などの測定により行われる。しかし、この方法では多数の LUV についての集団平均の測定となるため、リポソーム 1 個の構造や物理量の変化といった素過程の情報は得ることができない。例えば、蛍光プローブを内包した LUV の懸濁液へ抗菌性のペプチドを加えると、LUV 内部から外部への蛍光プローブの拡散(蛍光プローブの漏れ)が観測される。しかし、LUV から漏れが起こる原因には膜構造の攪乱や膜中でのポア形成など様々なものが考えられ、その原因を特定することは困難である。そのため、LUV 懸濁液法を脂質膜に誘起されたポア構造の探求といった研究に用いるには限界がある。しかし近年、直径 10 μm 以上の巨大なリポソーム(GUV)を利用した方法論である単一 GUV 法が、脂質膜と外来物質の相互作用の研究に有用である事が示された。例えば単一 GUV 法を用いることで、抗菌性ペプチド-マガニン 2 による脂質膜中でのポア形成や、エピガロカテキンガレート(EGCg)が誘起する脂質膜構造の破壊といった 1 つ 1 つのリポソームでおこる素過程を明らかにする事が初めて可能になった。これにより申請者はマガニン 2 によるポア形成の速度定数の導出[2]や、ポア形成の速度定数のマガニン 2 の脂質膜への結合量依存性を求めることに成功した[1]。そこで本研究では単一 GUV 法を用いて、外来物質が脂質膜に誘起するポアの動的構造を詳細に明らかにする。

[1] *J. Phys. Chem. B*, 113, 4846-4852 (2009)

[2] *Biochemistry*, 44, 15823-15833 (2005)

2. 研究の目的

従来このような研究に困難があった点は次の 2 点にある。1 つはマガニン 2 などの外来物質が脂質膜に誘起するポアの直径が多くの場合数十 nm ~ 数 nm と微小であり、その構造の詳細が得難かったこと[3]。もう 1 つは、ポア形成の初期段階が 33 ms 以下で起きるなど非常に高速であったため通常の計



測方法ではポアの動的構造を捉えきれなかった事があげられる。一方、申請者は単一 GUV 法を用いてポリフェノール的一种である茶カテキン・エピガロカテキンガレート(EGCg)と脂質膜の相互作用の研究を行い、EGCg により GUV の破裂が誘起され、その際には脂質膜中に直径数 μm の巨大なポアが出現する事を見出した[4]。すなわち、EGCg を外来物質とすることで上記した困難のうちポアの大きさについては解決できる。そこで、本研究では非常に高速で起こる EGCg の誘起する破裂の過程、すなわち脂質膜に形成されたポアの動的構造を、その形成初期段階から明らかにする。これにより外来物質が誘起するポア形成の構造安定性に関して新たな知見を得ることを目指す。

[3] *J. Phys. Chem. B*, 114, 12018 (2010)

[4] *Biophys. J.*, 92, 3178-3194 (2007)

3. 研究の方法

蛍光標識された脂質である Texas Red-DHPE を含有させた GUV の脂質膜を蛍光顕微鏡により数 ms の時間分解能でイメージングする測定系を作り上げた。カメラには高解像度・高速撮影が可能な冷却 CMOS カメラを用いた。次いで、中性のリン脂質であるジオレオイルフォスファタイジルコリン(DOPC)膜の GUV と EGCg の相互作用を調べた。相互作用は、マイクロピペットアスピレーション法を用い、GUV 近傍の水溶液を EGCg 水溶液に置換する事でいった。単一 GUV 法では、GUV 一個の構造や物理量の変化を、多くの“一個の GUV”に対して測定し、それらの物理量を統計的に解析することで生体膜の構造・機能・ダイナミクスを明らかにする。GUV の脂質膜に形成されたポアの動的構造を多くの GUV について解析し、ポアの成長速度や収縮速度の分布を調べた。さらにコレステロール(chol)を含有した DOPC 膜についても同様に調べた。

4. 研究成果

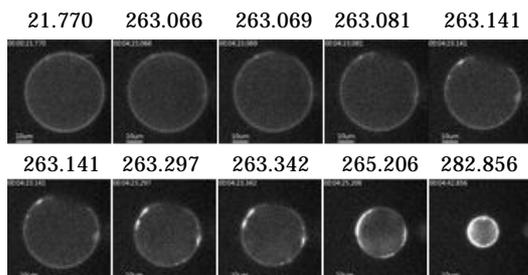
(1) 測定系の構築

本研究では EGCg などの外来物質が誘起する脂質膜中のポア構造、すなわち脂質膜の分布を計測する必要がある。そのため、EGCg と脂質膜の相互作用の観測に先立ち、通常用いられる位相差顕微鏡による観測系ではなく蛍光ラベルした脂質膜を蛍光顕微鏡により観測する系を作り上げた。まず観測に使用した冷却 CMOS カメラの量子効率の波長依存性を考慮し蛍光ラベルした脂質として TexasRed-DHPE を選択し、これを GUV の脂質膜に混合させた。一般に脂質膜中の蛍光プローブの含有量が高いほど、脂質膜を蛍光顕微鏡で観測した際のコントラストは良くなる。しかしそれと相反して、調べたい脂質膜の物性が変わってしまう。そのため今回含有させた TexasRed-DHPE の含有量は一般的な観察で用いられる程度に低濃度に抑

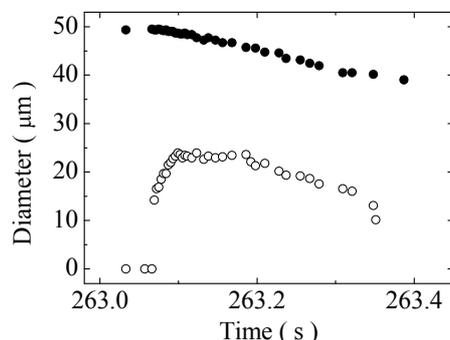
えた。また、蛍光プローブはその励起状態において化学的な反応性が高くなり、徐々に退色していく。これを防ぐため、想定している5分間程度の観測で退色が十分無視できるほどに励起光の光量を十分に落とした。一方、本実験系では、高時間分解能の計測に伴い毎秒 Gbyte 程度の大容量データが発生する。これには高速な読み書きが可能なソリッドステートドライブ (SSD) を複数用いたディスクグループを構築し対応した。なお SSD の書き込み回数には制限があるが、故障した場合には素早く SSD を交換できるように留意した。また本実験系では露光時間の短さ、脂質膜中の蛍光プローブの含有量の低さ等から、脂質膜の観測のためにコントラストを極端に上げる必要がある。そのため水銀ランプの 60Hz ノイズ、すなわち CMOS センサーの画素読み出し方向に沿った輝度差が問題となった。この問題には水銀ランプおよびその電源の機種を選定することで対処し、ノイズが無視できる実験系を構築した。

(2) 外来物質が脂質膜に誘起するポアの動的構造

上記した測定系を用いて EGCg が脂質膜に誘起するポアの観測を試みた。EGCg と脂質膜の相互作用はマイクロピペットを用い DOPC-GUV の周辺の溶液を EGCg 水溶液に置換することで行った。下にその蛍光観測の結果を示す。



画像の上にある数字は、EGCg との相互作用を開始してからの秒数である。輝度の高さは、脂質膜に含まれる蛍光プローブ TexasRed によるもので脂質膜の分布を示している。GUV は様々な形状をとるが、測定では球形の GUV と EGCg との相互作用を調べた。EGCg と GUV の相互作用を開始後、脂質膜は一様に分布し、測定に用いた対物レンズの被写界深度に由来して円形状に輝度の高い分布がみられた。また相互作用の開始から 263.066 s 後までは、GUV の外周に輝点を確認される他に目立った変化は見られなかった。ところが、その 3 ms 後の 263.069 s 後、突然、脂質膜中に蛍光強度の弱い領域が出現した。その領域は急激に拡大し、転じて縮小した。以前の結果と合わせると、この蛍光強度の低い領域は脂質膜に形成された孔 (ポア) と考えられる [先に記した文献 4]。すなわち、EGCg により脂質膜に小さなポアが誘起され、その後ポアは DOPC 膜においては



数十 ms の間成長を続け、転じて縮小した。一方、ポアが成長しきると GUV の膜上に輝度の高い領域が現れ始めた。これは、EGCg と脂質膜の複合体だと考えられる [4]。複合体の成長とともに GUV は小さくなり始め、GUV は最終的には小さな脂質の塊となった。以上の GUV とポアの直径の経時変化をグラフに示した (●, GUV の直径; ○, ポアの直径)。このグラフからポアの成長速度、閉速度を求め、多数の GUV についての統計値を評価した。続いて GUV の脂質膜にコレステロール (chol) が含まれる場合についても同様の方法で EGCg と脂質膜の相互作用を調べた。その結果を記す。EGCg の脂質膜への結合量はコレステロールの有無によって有意差がないにもかかわらず、chol 存在下では EGCg により GUV の破裂や収縮が誘起される確率は著しく減少した。一方、高時間分解観測の結果、破裂の際には chol を含有しない脂質膜の場合と同様に、まず脂質膜中に小さなポアが形成され、それが急激に成長し、その後、収縮に転じるという観測結果を得た。得られたポアの動的構造を chol 含有膜と非含有膜について比較した。ポアの成長速度の平均値は、chol 含有膜の方が非含有膜に比べ速かった。また、ポアの収縮速度に関しても chol 含有膜の方が非含有膜に比べ、大きな値を示した。すなわち、chol は EGCg による脂質膜の破裂を防ぐが、一度破裂すると、非含有膜に比べ chol 含有膜の方が激しく破裂するという結果を得た。また、上記の測定系を他の外来性物質と脂質膜の相互作用の計測にも用いた。酸化グラフェンは、sp² 炭素の単原子シート (グラフェン) に様々な酸素官能基が付加した誘導体である。この酸化グラフェンが脂質膜を破裂させ、その際には膜中にポアを誘起することを見出した。このポアの動的構造はまだ調査中であるが、外来物質が誘起したポアの動的構造に対して貴重な知見を与えるものと期待される。

(3) ポア形成のモデル

GUV に脂質膜を引き伸ばす様な外力を加えると一過性のポアが脂質膜中に形成されることは良く知られており、形成されたポアの安定性についての詳細な力学的解析がなされている。古典的なポア形成モデルによれば、ポアの安定性は脂質膜を引き伸ばし

アを拡大する張力 と、ポアの縁の不安定性によりポアを閉じようとする線張力、これら2つの要因により決定され、ポア半径を r とすればポアのエネルギー U は次式で示される。

$$U = 2\pi r\Gamma - \pi r^2\sigma$$

このポア形成の古典的モデルに基づき、EGCgの誘起したポアの形成メカニズムに対して次のような仮説を提唱した。まず、EGCgがGUVの外側の単分子膜に結合し、その面積の増大を引き起こす。これは実験的にも確かめられている[4]。その結果、脂質膜の内側の単分子膜は引き延ばされ、膜に働く引っ張り張力が生じる。これによりポアの形成確率は増大する。さて、ここで線張力のchol依存性は良く知られており、cholの存在により線張力は増大する。従ってchol存在下では、非存在下に比べより大きな引っ張り張力がポア形成のために必要となる。従ってポア形成の直後は引っ張り張力が支配的に働きポアを成長させるが、これはchol存在下でポアが形成された際により速いポアの成長をもたらす。一方、今回の測定で観測されたポアの収縮は、ポアの成長とともに引っ張り張力が減少したと考えられる。すなわちポア収縮においては、線張力が支配的な力となる。よってchol存在下では大きな線張力によりポアはchol非含有膜に比べより速い速度を持って収縮する。以上の仮説は、本研究で得られた測定結果と良く一致する。

抗菌性物質などの外来物質が脂質膜に誘起するポアの動的構造や、その力学的安定性はほとんど明らかにされてこなかった。本研究プロジェクトではEGCgが脂質膜に誘起する破裂を高時間分解観測をもって詳細に明らかにし、EGCgにより誘起されたポアをその形成初期段階から明らかにした。さらに単一GUV法を用いてポアの動的構造を調べ、これがポア形成の古典的モデルによって良く説明される事を示した。これらの結果は外来物質が脂質膜に誘起するポアの形成メカニズムを考える上で貴重な知見を与える。また、本研究プロジェクトにより開発した測定系は、他の外来物質によるポア形成のメカニズムや脂質膜の安定性を調べる上で有用な測定手法となる。

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 1件)

1. Md. Zahidul Islam, Jahangir Md. Alam, Yukihiko Tamba, Mohammad Abu Sayem Karal and Masahito Yamazaki
The Single GUV Method for Revealing the Functions of Antimicrobial, Pore-Forming Toxin, and Cell-Penetrating Peptides or Proteins

Phys. Chem. Chem. Phys., **16**, 15752-15767, 2014 (査読有)

[学会発表](計 7件)

招待講演

1. Yukihiko Tamba, Masahito Yamazaki
Visualization of pore formation process in phosphatidylcholine membrane of giant unilamellar vesicle induced by epigallocatechin gallate
9th International Symposium on Nanomedicine, (ISNM2015)
Sansui Hall at Mie University, Tu, 12 Dec. 2015

国内学会

2. Yukihiko Tamba, Masahito Yamazaki
Visualization of the EGCg-induced bursting of single giant unilamellar vesicles at higher time resolution
日本生物物理学会第52回年次大会、2014年9月26日、札幌(札幌コンベンションセンター)

3. 丹波之宏、山崎昌一
エピガロカテキンガレートが脂質膜巨大リポソームの構造安定性に及ぼす影響
第11回日本カテキン学会 年次学術大会、2014年11月22日、東京(昭和大学・旗の台キャンパス)

4. Gento Nakagawa, Yoshiaki Okamoto, Ryugo Tero, Yukihiko Tamba
Graphene oxide induced structural transformation of single giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine membranes
日本生物物理学会第53回年次大会、2015年9月14日、金沢(金沢大学・角間キャンパス)

5. 丹波之宏、山崎昌一
エピガロカテキンガレートが脂質膜に誘起する孔の動的構造
日本物理学会第71回年次大会、2016年3月22日、仙台(東北学院大学・泉キャンパス)

その他国内発表 2件

[その他]

ホームページ等:

<http://researchmap.jp/read0101559/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹波之宏 (YUKIHIRO TAMBA)
鈴鹿工業高等専門学校・教養教育科・准教授
研究者番号 : 50436911