

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600021

研究課題名(和文) ウイルス類似型抗菌ナノクラスターの機能探索

研究課題名(英文) antimicrobial activity of polyoxometalate clusters

研究代表者

並河 英紀 (NABIKI, HIDEKI)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：30372262

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)：本研究では、直径1 nm程度の金属酸化物クラスターであるポリオキシメタレート(POM)と細胞膜との相互作用に関する実験研究を行った。特定の条件下においては、POMが細胞膜と相互作用を行った結果、POMは細胞膜から脂質分子を奪い、POM-脂質複合体を形成することで抗菌活性を発現させることが観察された。このような挙動は、エンベロープウイルスが細胞から脂質分子を奪い複合構造を形成するのと非常に良く似た挙動であることが明らかとなった。さらに、この挙動は脂質分子膜の熱力学的安定性に対して強く依存する現象であることも明らかとなった。本研究では、これらの挙動に関して蛍光顕微鏡を用いた検証を行った。

研究成果の概要(英文)：We investigated the antimicrobial activity of polyoxometalate by micro- and nanoscopic imaging techniques. Imaging experiments revealed vigorous desorption of the lipid bilayer from solid substrate by the formation of POM-lipid assembly through a supramolecular-type assembly process in which electrostatic and hydrophobic interactions between the POM and lipid determines the efficiency and dynamics of assembly formation and thereby determines lipid desorption. Furthermore, maximum efficiency of lipid desorption was found at the phase transition temperature. This phase dependency was explained by the formation of a "leaky interface" between the gel and fluid domains, in which freedom in the conformational change of lipids during the formation of the POM–lipid assemblies becomes maximal.

研究分野：物理化学

キーワード：脂質二重膜 ポリオキシメタレート 自己組織化 細胞膜 クラスター

1. 研究開始当初の背景

直径数 nm の金属酸化物ナノクラスターであるポリオキシメタレート (POM) はアルツハイマー病原因ペプチドや癌化酵素など小分子に対して生理活性を示すことが既知であった一方、数桁もサイズの大きな細胞に対する活性は未知の領域であった。この背景の中、我々はモデル細胞 (ベシクル) と POM との相互作用について、ある種の POM が HIV やインフルエンザウイルスと類似した機構でベシクルを崩壊することを見出した。つまり、その発現機構はポア形成で説明される抗菌性ペプチド等とは異なるものであり、従来の抗菌性化合物とは機能・可能性が異なる新奇化合物であり、その結果として従来とは異なる領域への応用展開が期待される。しかしながら、その発現機構は未だ未解明であり、本研究にてベシクル崩壊に対する POM 及びベシクル組成依存性を系統的に検証することで抗菌機構の明確化を行うとともに、得られた知見に基づいて無機化合物ベースの新奇抗菌活性物質としての POM の可能性を発掘する本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

ベシクル崩壊効率に関して POM・脂質分子構造依存性を系統的に検討し、活性支配因子 (POM に関しては電荷とサイズ、ベシクルに関しては膜組成とサイズ) を明確化する。これらの実験的研究をもとにベシクル崩壊に関する分子機構の解明を行うだけでなく、生化学的視点からの研究として POM の抗菌活性を受けやすい細胞群を特定・提案することを目指す。

3. 研究の方法

POM によるベシクル崩壊の機構明確化ならびに、POM の抗菌活性を受けやすい細胞群の特定をめざし、以下の二つの研究を計画する。

研究課題 I 平面膜に対する POM 活性の評価を蛍光顕微鏡、表面圧測定より行い、崩壊の支配因子明確化ならびに機構解明を目指す。

研究課題 II 膜崩壊における膜構造・組成依存性を解析し、POM の活性を受けやすい膜構造 (細胞群) を特定する。

4. 研究成果

研究課題 I

ガラス基板に構築した平面脂質二重膜に対する POM の活性を蛍光顕微鏡にて検討した。まず、脂質二重膜が複数層スタッキングした脂質多層膜をガラス基板上へ構築した (図 1)。ここで、観察している膜が多層膜となっていることは、蛍光強度ヒストグラムに現れるピーク強度が量子化されていることから示される。コントロール実験として作成した単層脂質二重膜の蛍光強度はおよそ 30 程度であった。これに対し、0 分後の蛍光顕微鏡で観

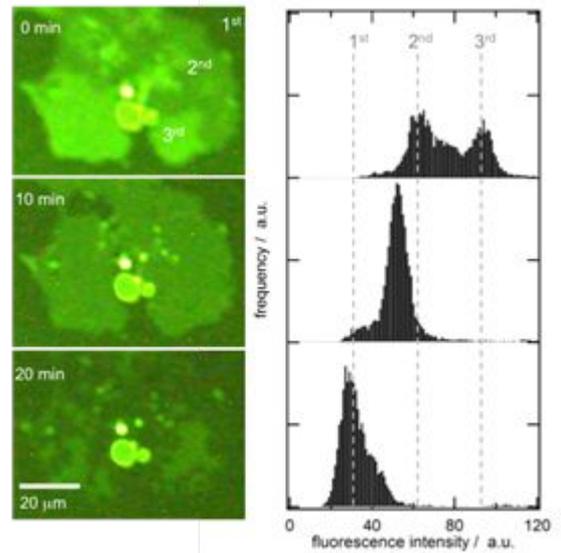


図 1. (左) POM 添加による積層二重膜の構造変化を捉えた蛍光顕微鏡写真。(右) 核時間における蛍光強度ヒストグラム。

察される大部分の領域の蛍光強度は単層膜の蛍光強度の 2 倍 (60 程度) 及び 3 倍 (90 程度) であった。ここで、2 倍の強度が観測されている領域では、基板に接触している最下層の脂質二重膜 (図中で 1st と示した領域) の上に第二層目の脂質二重膜 (図中で 2nd と示した領域) が重なり、その二つの二重膜からの蛍光が観測されるために単層膜の二倍の蛍光強度となって観測されている。同様に、第三層 (図中で 3rd と示した領域) が最外層として観測されている領域では、第三層の下に第二層および最下層の脂質二重膜が存在しているため、単層膜の三倍の蛍光強度が観測されていると考えられる。以上より、色素が添加された脂質二重膜が積層構造を形成しているとき、その蛍光強度は積層数に応じて量子化されることが分かる。また、このような積層構造を形成している際、最下層の二重膜はガラス基板による固定化のため安定化された状態にあることが知られている。一方、最下層の二重膜の上にスタッキングした積層膜は基板による影響を受けておらず、リポソームを構成している free-standing な脂質二重膜に近い状態にあると考えられる。つまり、積層膜における変化がリポソームで発現する現象に相関付けることができると考えられる。

この多層二重膜に対して POM を作用させた結果、ヒストグラム上では 10 分以内に単層膜の 3 倍強度を示す領域が消失し、約 2 倍の強度を示す領域のみが残った。この結果は、最外層の第三層が POM 添加により脱離し、基板上には単層膜上に第二層が積層した構造のみが残されていることを示唆している。更に、第二層の蛍光強度も本来の強度より低強度側へシフトしていることが分かる。本結果は、第二層あるいは最下層の脂質二重膜に存在する膜が部分的に脱離していることを示

唆する。しかしながら最下層の膜は第二層により覆われているため、最外層である第二層において部分的な脂質分子の脱離が発生し、顕微鏡では検出できない微細なポアが形成し面積平均としての蛍光強度が低下したものと推察される。さらに、20分後では第二層の膜も多くの領域において脱離した状態となっている。ヒストグラムからも第二層の大部分が脱離していることが分かる。また、最下層の膜の蛍光強度も本来の強度よりわずかに低下しており、10分後の第2層の膜と同様に部分的な脂質分子の脱離が誘起されていることが示唆される。以上の結果より、リポソームと類似の状態にあることが予想される積層膜は、POM 添加により安定な二重膜構造の維持が困難となり、最終的には膜が崩壊し水溶液中へ脱離することを蛍光顕微鏡により確認することに成功した。更に、脂質膜のエッジから連続的に膜崩壊が伝播する挙動も蛍光顕微鏡により捉えることにも成功した(図2)。

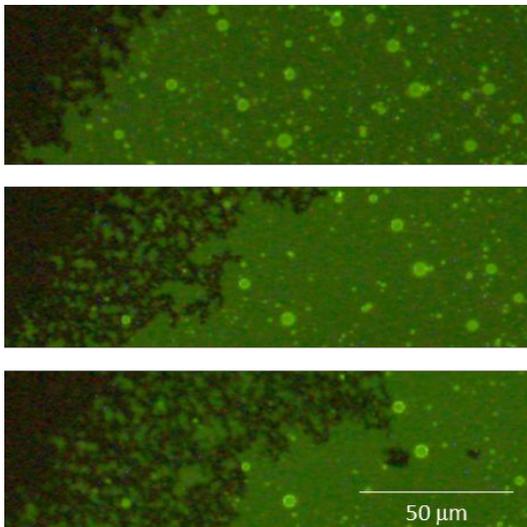


図2. 脂質膜のエッジ領域(図に左側)から膜が崩壊し脱離する様子を捉えた蛍光顕微鏡写真。

研究課題 II

これまでに、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)を用いた場合、その相転移温度の24℃付近でPOMによる高い膜崩壊活性が見られ、膜流動性の特異的寄与が示唆されている。そこで本研究では、DMPCよりも流動性が高く、室温付近に相転移温度を持たないL- α -ホスファチジルコリン(Egg PC)を使用し、膜崩壊活性と膜の流動性の関連性を検討した。実験では、カバーガラス上にEgg PCと蛍光標識脂質分子(NBD-PE)の混合二重膜を作製した。POMとして種々の濃度のH4[SiW12O40]水溶液を添加し、その後の膜の構造変化などを蛍光顕微鏡で観察した。また、光退色後蛍光回復法を用いて膜内脂質分子拡散性の評価を行った。

10~40℃の様々な温度にてEgg PC膜にPOMを添加した結果、膜の端であるエッジ領

域から脂質分子が脱離し膜が崩壊する挙動が見られた。エッジは熱力学的に不安定であるため、POMによる脂質分子脱離が誘起されやすいことが原因だと考えられる。また、POMを添加しない0 μ Mにおける拡散係数は、温度低下に伴い低下した(図3)。これは一般的に知られている膜流動性の温度依存性に一致する。一方、POM存在下での拡散係数は、いずれの温度領域においても0 μ M条件下より同程度低下したが、特異的な変化を示す温度は存在しなかった。この拡散係数低下は、脂質分子の部分的な脱離による膜への欠陥導入や、POM吸着による脂質分子の拡散阻害によるものと考えられる。また、Egg PCではDMPCで見られた膜内部からの顕著な崩壊は見られなかった。DMPCは相転移温度付近でミクロな相分離構造を形成し、その相界面に熱力学的に不安定なleaky interfaceを形成する一方、本実験条件より低い温度に相転移温度を持つEgg PCではleaky interfaceを形成しなかったことが原因だと考えられる。以上、本研究より、POMと膜との相互作用は特定の温度で活性を示すのではなく、エッジやleaky interfaceなど熱力学的に不安定な領域から優先的に発現することが明らかとなり、POM-脂質膜間相互作用の発現因子を実験的に確認することに成功した。

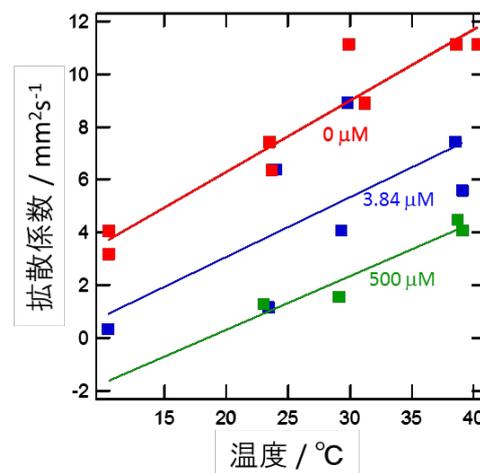


図3. 各種POM濃度条件下におけるEgg PC膜の拡散係数。POM濃度の増加に伴い、拡散係数が低下していることが分かる。

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5件)

H. Nabika, A. Sakamoto, R. Tero, T. Motegi, D. Yamaguchi, K. Unoura, "Imaging Characterization of Cluster-Induced Morphological Changes of a Model Cell Membrane", J. Phys. Chem. C, in press.

並河英紀, "金属酸化物クラスターと細胞膜", 化学と工業, 68(5), 430-432

(2015).

T. Motegi, B. Takimoto, H. Nabika, K. Murakoshi, "Molecule Manipulation at Electrified Interfaces using Metal Nanogates", *Electrochemistry*, 82(9), 712-719 (2014).

T. Motegi, H. Nabika, Y. Fu, L. Chen, Y. Sun, J. Zhao, K. Murakoshi, "Effective Brownian Ratchet Separation by a Combination of Molecular Filtering and Self-Spreading Lipid Bilayer System", *Langmuir*, 30(25), 7469-7501 (2014).

H. Nabika, D. Yamaguchi, K. Unoura, "Interaction between nanoclusters and lipid bilayer membrane surface", *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.* 35(8), 404-408 (2014).

〔学会発表〕(計 21 件)

小林大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, 金属酸化物クラスターの電荷に依存した脂質単分子膜の配向変化、「ゆらぎと構造」第 2 回若手勉強会、2016/3/11、千葉。

坂本彩; 鈴木好; 鶴浦啓; 並河英紀, 脂質二重膜と無機酸化物クラスターの相互作用に対する膜構造依存性、「ゆらぎと構造」第 2 回若手勉強会、2016/3/11、千葉。

今野博行; 小林大樹; 矢野成和; 二階堂由莉; 東海林由憲; 川井貴裕; 野々村美宗; 鶴浦啓; 並河英紀, ポリオキソメタレート抗菌活性評価、本農芸化学会年会、2016/3/27、札幌。

小林大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, 金属酸化物クラスターによる脂質二重膜内分子の配向性変化の誘起、錯体化学若手の会勉強会・日本化学会東北支部山形地区講演会、2015/10/31、山形。

小林大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, 金属酸化物クラスターが誘起するモデル細胞膜の構造変化、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、2015/9/12、鹿児島。

Nabika, H., Activity of metal oxide clusters at biological membrane interface, Young Symposium in CSJ Tohoku Branch, 2015/9/12, Hirosaki.

小林大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, ポリオキソメタレートによる脂質単分子膜内での分子再配向の誘起、第 13 回ナノ学会、2015/5/13、仙台。

坂本彩; 鶴浦啓; 並河英紀, ポリオキソメタレートの脂質二重膜崩壊活性における相状態依存性、第 13 回ナノ学会、2015/5/13、仙台。

坂本彩; 茂木俊憲; 手老龍吾; 鶴浦啓; 並河英紀, 脂質二重膜と金属酸化物クラスターの相互作用に関する温度依存性、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、2015/9/12、鹿児島。第 66 回コロイドお

よび界面化学討論会、2015/9/12、鹿児島。

並河英紀, 金属酸化物クラスターが誘起する自己組織化膜の構造変化：細胞膜への活性探索、日本金属学会東北支部、2015/12/7、山形。

並河英紀, 金属酸化物クラスターとモデル生体膜の界面相互作用と生理活性機能への展開、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、2015/9/12、鹿児島。

並河英紀, Activity of metal oxide clusters at biological membrane interface, 平成 27 年度化学系学協会東北大会、2015/9/12、弘前。

並河英紀, 化学者はどこまで自然に迫ることができるのか？～自然の自己組織化機構の理解と利用～、第 22 回理工学研究科セミナー、2015/5/26、山形。

並河英紀, 金属酸化物クラスターのモデル細胞膜崩壊機能の発現と制御、第 32 回無機分析化学コロキウム、2015/6/5、仙台。

並河英紀, 細胞膜を標的とした生理活性ナノクラスターの設計、ライフサイエンスワールド・第 12 回アカデミックフォーラム、2015/5/15、東京。

山口大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, ポリオキソメタレート化合物とモデル細胞膜との相互作用の定量的評価、理工学セミナー、2014/9/24、米沢。

山口大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, 無機酸化物クラスターと脂質二重膜の相互作用に関する顕微鏡解析、CSJ 化学フェスタ 2014、2014/10/14、東京。

山口大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, 無機クラスターによる脂質二重膜への欠陥の導入および崩壊過程に関する顕微鏡解析、平成 26 年度化学系学協会東北大会、2014/9/5、米沢。

山口大樹; 鶴浦啓; 並河英紀, 無機クラスターと脂質二重膜の相互作用に関する顕微鏡解析、第 65 回コロイドおよび界面化学討論会、2014/9/20、東京。

並河英紀, 構造が規定されたナノクラスターによるモデル細胞膜崩壊機能の発現と制御、日本薬学会九州支部主催特別講演会、2014/11/21、長崎。

21 並河英紀, 微小空間での非平衡場がもたらす特異現象、第 33 回物理化学コロキウム、2014/9/20、米沢。

〔図書〕(計 1 件)

H. Nabika, K. Unoura, "Interaction Between Nanoparticles and Cell Membrane" in *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*, A. Grumezescu Ed., Elsevier 2015 (in press).

(1)研究代表者

並河英紀 (NABIKI, Hideki)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：30372262