

様式2

平成29年度 生体医歯工学共同研究実施報告書

受理年月日	
受理番号	2001

平成 29 年 3 月 20 日

生体医歯工学共同研究拠点 研究所長会議 議長 殿

共同研究代表者

所属機関 鈴鹿工業高等専門学校

職 名 准教授

氏 名 丹波 之宏

印

勤務先所在地 〒510-0294

三重県鈴鹿市白子町

電話番号 059-368-1748

FAX番号

E-mailアドレス : tamba@genl.suzuka-ct.ac.jp

下記により、共同研究の実施報告を致します。

記

研究題目	(和)高時間分解観測による脂質膜を破裂・損傷させる抗菌性物質の作用機構の解明 (英)Elucidation of the bursting process of lipid membrane induced by antibacterial substance with high time resolution		
研究領域	1. 生体材料に関する基礎・応用研究 2. 生体工学に関する基礎・応用研究 ③ 生体機能分子に関する基礎・応用研究 4. 化学・電気・機械・材料工学の生体応用研究		
研究期間	平成 29 年 6 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日		
研究組織			
氏名	所属機関・部局等	職名	役割分担
丹波 之宏 山崎 昌一	鈴鹿工業高等専門学校・教養教育科 静岡大学・電子工学研究所	准教授 教授	代表者 分担者(対応教員)
生体医歯工学共同研究拠点内対応教員	(共同研究をした教員名を記載) 静岡大学電子工学研究所 山崎 昌一 教授		

## 研究成果

ある種のペプチドや小分子は、脂質膜の構造変化を誘起し脂質膜に孔(ポア)を形成させる。これらの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かは医学・薬学、あるいは生命科学として興味深く、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。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つは外来物質が脂質膜に誘起するポアの直径が多の場合数十 nm～数 nm と微小であり、その構造の詳細が得難かったこと。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。そこで本研究では脂質膜に破裂を引き起こすと報告されている抗菌性物質に着目し、その脂質膜に誘起された巨大な損傷箇所、あるいは巨大なポア、の形成過程について高時間分解観測を行い、そのポアの力学的特性について解析した。

脂質膜に破裂を引き起こす抗菌性物質として今年度は緑茶由来のフラボノイドであり抗菌活性や抗酸化活性など多様な生理活性を持つエピガロカテキンガレート(EGCg)について、そのポア形成過程や脂質膜との相互作用をよく調べた。モデル脂質膜系として一般的な細胞と同サイズの大きさとなる直径 10 $\mu$ m 以上の巨大な中性の脂質膜ベシクル(PC-GUV)を用いた。また破裂の際の脂質の分布を明らかにするために GUV の脂質膜には蛍光ラベルしたリン脂質 TexasRed-DHPE を 0.4mol%含有させた。EGCg と脂質膜との相互作用は、マイクロピペットを用い 100 $\mu$ M の EGCg 水溶液で PC-GUV 近傍を満たすことを行い、その相互作用を蛍光顕微鏡および冷却 CMOS カメラにより 3msec の高時間分解で観測した。その観測結果を記す。EGCg との相互作用を始めた当初、GUV の脂質膜は一樣な蛍光輝度を示していた。しかし突然に輝度の低い領域が脂質膜上に出現し、その領域の急激な拡大、転じて減少する過程が観測された。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。すなわち、EGCg により脂質膜に先ず小さなポアが誘起され、その後ポアは成長を続け、転じて縮小した。次にポアの形成メカニズムを調べるため、コレステロール(chol)を 20mol%含む DOPC/chol(8/2)膜においても同様の測定を行った。EGCg により脂質膜にポアが誘起されるという点では、chol 含有膜も非含有膜も同様の結果であった。しかし EGCg と 5 分間相互作用させた際のポアの形成確率は chol 含有膜が非含有膜に比べ 4.2 倍小さかった。つまり chol は脂質膜中でのポア形成を妨げた。さらに、誘起されたポアの成長速度、縮小速度を定量的に調べたところ、何れも chol 含有膜の方が非含有膜に比べ高い数値を示した。一方、DOPC 膜と DOPC/chol(6/4)の脂質膜への EGCg の結合定数を測定したところ chol 含有膜の方が 3 倍大きな値を示した。

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延ばしポアを拡大する張力  $\sigma$  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  $\Gamma$ 、これら2つの要因により決定される。また脂質膜中の chol の存在は線張力  $\Gamma$  を増大させることが知られている。以上に基づけば、chol 含有膜における速いポアの成長は脂質膜に大きな張力  $\sigma$  が生じたことを示しており、また速いポアの収縮はその大きな線張力  $\Gamma$  に由来すると解釈できる。我々は、張力  $\sigma$  が EGCg の GUV への結合量に応じて増大する仮説を提示したが、これは今回示唆された chol 含有膜における高い張力  $\sigma$  の存在と一致する。

### 使用した設備・資料・試料等

試薬:

脂質として DOPC 25mg, DOPG 25mg, コレステロール 1g など

物品:

位相差蛍光対物レンズ 10 倍、サンプル管瓶、マイクロピペットホルダー  
およびボールジョイント

### 本研究成果に関連する論文発表状況

なし、論文準備中

次年度の共同研究継続の有無	① ・ 無	拠点内対応教員とご相談の上ご記入ください。
		継続の場合には次年度の研究計画をご記入願います。

**次年度の研究計画(継続の場合)**

今年度の研究成果により、EGCg の脂質膜への結合により脂質膜に引っ張り張力  $\sigma$  が発生することが示唆された。この原因としては、EGCg が GUV の表層に位置する単分子膜に結合することで、その単分子膜の面積が増大し、それにより GUV の内側の単分子膜が引っ張られたためと考えられる。しかし、これに対する実験的な確証は十分でない。そこで、次年度はマイクロピペットアスピレーション法を用い、EGCg の結合により脂質膜に生じた面積の変化量を測定し、EGCg の結合によるポア形成のメカニズムを明らかにする。一方、貴共同研究拠点の山崎教授のグループは、乳腺の分泌物に含まれる抗菌性ペプチド-ラクトフェリシン B が GUV の内部から非常に速い内容物の漏れ (33msec 未満) を誘起する事を見出した。本共同研究においては、これを上記した高時間分解観測系を用い調べ、速い内容物の漏れはラクトフェリシン B により脂質膜にポアが誘起されたためとの結果を得ている (平成28年度共同研究)。そこで、次年度は EGCg によるポア形成のメカニズムの探求に引き続き、あるいは平行し、ラクトフェリシン B により脂質膜に誘起されたポアの動的構造の詳細を、その形成初期段階から明らかにしていく。脂質膜の破裂、ポア形成といった事象は、抗菌性物質の作用機構の解明のみではなく、近年良く議論される細胞内への遺伝子導入といった面でも興味深い。本研究により得られる外来性物質が誘起するポアの形成メカニズムやその力学的安定性についての知見は応用面でも重要なものとなる。