

リン脂質/ガングリオシドG_{D3} 混合単分子膜中への カフェ酸エステル類の分布と作用

戸泉 文江, 月川 健士, 横山 祥子

Distribution of Caffeic Acid Esters in Mixed
Phospholipid/Ganglioside G_{D3} Monolayer and their Interactions

Fumie TOIZUMI, Kenji TSUKIGAWA, Shoko YOKOYAMA

Abstract

The distribution of benzyl caffeate (BC), cinnamyl caffeate (CC) and phenethyl caffeate (PC) isolated from propolis in mixed dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/ganglioside G_{D3} (GD3) monolayer as a model of a tumor membrane, and the effects of the caffeic acid esters on the mixed DPPC/GD3 monolayer were observed by atomic force microscopy (AFM). BC distributed in the mixed DPPC/GD3 monolayer formed a clear percolation pattern. The effect of BC on the mixed DPPC/GD3 membrane was similar to those of known antitumor compounds, suggesting that BC might possess antitumor activity. The effect of PC on the mixed monolayer seems to be weaker than that of BC; however, on GD3 alone monolayer, the effect was similar to that of BC. It was suggested that the molecular size of the caffeic acid esters affected their activity on the mixed DPPC/GD3 monolayer.

Key words : caffeic acid esters, ganglioside G_{D3}, phospholipid, mixed monolayer, atomic force microscopy, antitumor activity

キーワード : カフェ酸エステル, ガングリオシド G_{D3}, リン脂質, 混合単分子膜, 原子間力顕微鏡法, 抗腫瘍活性

緒言

プロポリスは古来より民間薬として利用されてきたものであり、その成分研究も行われている。¹⁾ プロポリスの生理活性として、抗菌活性、抗炎症活性、抗酸化活性、抗腫瘍活性などが報告されている。²⁾ 我々は、カトマンズ産プロポリスの成分研究を行い、カフェ酸エステル類を単離した。³⁾ さらに、カトマンズ産プロポリスから単離したカフェ酸エステル類の生理活性を膜レベルで検討することを目的として、生体膜モデルとして Langmuir-Blodgett (LB) 膜と原子間力顕微鏡法 (Atomic force microscopy, AFM) を用いて研究を行ってきた。^{4,5)} その中で、カフェ酸フェネチルエステルが抗腫瘍活性を

有することをまず報告した。⁴⁾ ガングリオシドは膜表面層に存在し、細胞認識やシグナル伝達などに関与している糖脂質であり、ラフトにはガングリオシド G_{D1a} が多く存在する。⁶⁾ 一方、ガングリオシド G_{D3} (GD3) やガングリオシド G_{M3} (GM3) は腫瘍細胞中に多く発現する。⁷⁾ 我々は、カフェ酸エステル類が GD3 単分子膜と GM3 単分子膜に及ぼす影響を AFM を使って調べ、前報までに報告した。^{4,5)} その中で、Phenethyl caffeate (PC) と Benzyl caffeate (BC) は、Cinnamyl caffeate (CC) と比べて活性が強いことが示唆された。^{4,5)}

今回、生体膜により近づけた膜モデルとして、リン脂質/GD3 混合単分子膜を使って、カフェ酸エステル類の膜中への分布と作用を AFM で観察した。

実験

1. 試料

Benzyl caffeate (BC)、cinnamyl caffeate (CC) および phenethyl caffeate (PC) は、ネパール Kathmandu で採取されたプロポリスから先の報告³⁾で単離したものをを使用した。BC、CC、PCの構造式をChart 1に示す。

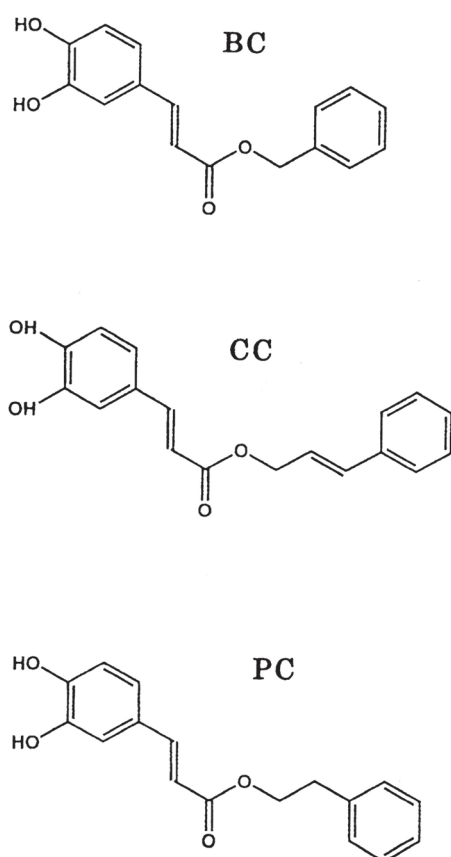


Chart1 カフェ酸エステル類 (BC, CC, PC) の構造式

Ganglioside G_{D3} (GD3) と L- α -dipalmitoylphosphatidyl choline (DPPC) はシグマ社製の特級品を用いた。水はスーパー Q システムの純水を用いた。

2. LB膜の作製

DPPC と GD3 をクロロホルム/メタノール (7:3) 混液に溶かして 1 mM 溶液とし、これを 25°C の水をはったトラフ上に展開して 10 分間静置し、気液界面で DPPC/GD3 混合単分子膜 ($X_{GD3}=0.2$) を形成させた。表面圧測定機 (協和界面科学製 HBM-A) で、膜圧 30 mN/m まで圧縮した後、垂直浸漬法でマイカ基板上に LB 膜として採取した。BC、CC、PC を取り込ませた DPPC/GD3 混合単分子膜は、DPPC、GD3 と各カフェ酸エス

テルをクロロホルム/メタノール (7:3) 混液に溶解させた溶液を気液界面に展開することで得た。

3. AFM測定

JEOL 製の原子間力顕微鏡 JSPM-5200 を使って、膜の表面状態を観察した。AFM の探針には、金でコーティングされたシリコン製の CSC38 マイクロカンチレバー (バネ定数 0.08 N/m, 長さ 250 μ m, 厚さ 1.0 μ m) を使用した。AFM の観察は、空气中でコンタクトモードで行った。

結果

1. DPPC/GD3 混合膜の表面状態

DPPC/GD3 混合単分子膜 ($X_{GD3}=0.2$) の AFM 画像を Fig. 1 に示す。膜圧 30 mN/m において、DPPC/GD3 混合膜は、かすかなパーコレーションパターンを示している。

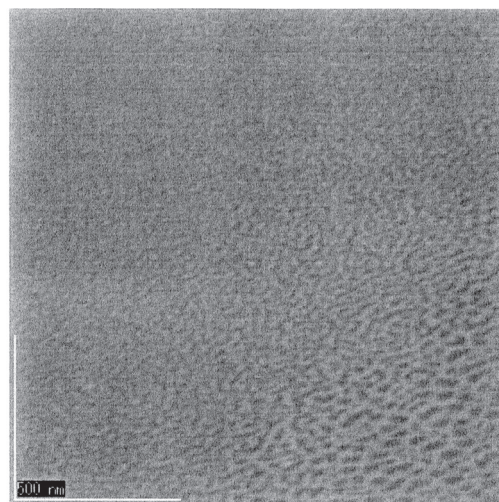


Fig.1 DPPC/GD3混合膜のAFM画像

2. DPPC/GD3 混合膜とカフェ酸エステル類の相互作用

2-1. DPPC/GD3 混合膜と BC の相互作用

DPPC/GD3 ($X_{GD3}=0.2$) に BC をモル分率で 0.1 添加した DPPC/GD3 膜の AFM 画像を Fig. 2 に示す。DPPC/GD3 混合膜だけの場合には、かすかなパーコレーションパターンを示していた (Fig. 1) のが、BC が入ること鮮明なパーコレーションパターンに変化した。さらに、BC は DPPC/GD3 混合膜中の GD3 に富む領域に分布し、パーコレーションパターンの溝を深くかつ太くした。これは、BC と DPPC/GD3 混合膜間の強い相互作用を示している。

画像中、明るい部分は高さが高く、暗い部分は高さが低いことを表している。

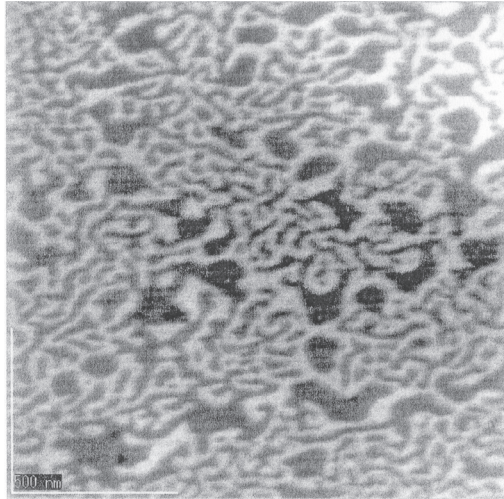


Fig.2 BCを添加したDPPC/GD3混合膜のAFM画像

2-2. DPPC/GD3 混合膜と PC の相互作用

DPPC/GD3 ($X_{GD3}=0.2$) に PC をモル分率で 0.1 添加した DPPC/GD3 膜の AFM 画像を Fig. 3 に示す。DPPC/GD3 膜に PC が入ることで、パーコレーションパターンが少しははっきりした。また、部分的に大きなドメインと小さなドメインが散剤している。

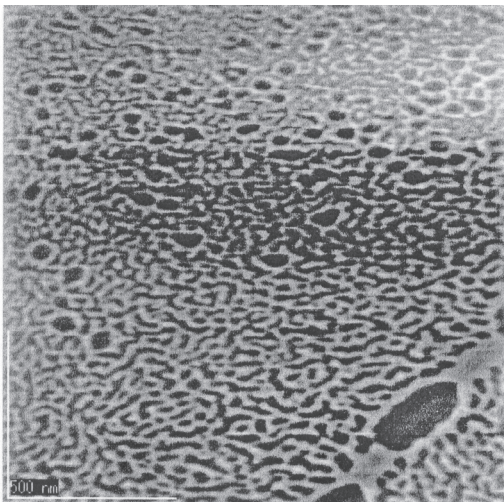


Fig.3 PCを添加したDPPC/GD3混合膜のAFM画像

2-3. DPPC/GD3 混合膜と CC の相互作用

DPPC/GD3 ($X_{GD3}=0.2$) に CC をモル分率で 0.1 添加した DPPC/GD3 膜の AFM 画像を Fig. 4 に示す。DPPC/GD3 膜に CC が入ることで、比較的是っきりしたパーコレーションパターンを示した。また、部分的に

大きなドメインも存在した。

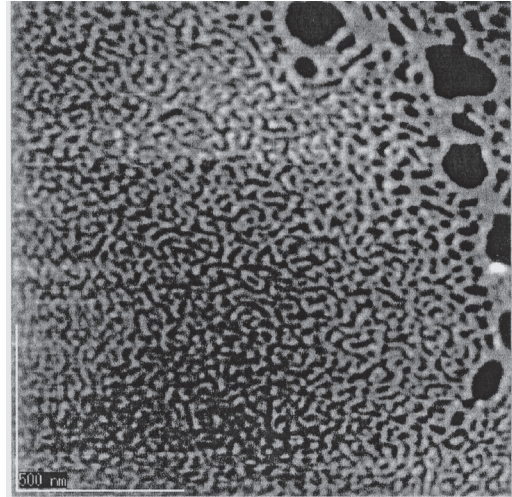


Fig.4 CCを添加したDPPC/GD3混合膜のAFM画像

考察

1. DPPC/GD3 混合膜に対するカフェ酸エステル類の活性の違い

カフェ酸エステル類は DPPC 単独膜に対しては影響を与えず、平坦で均一な膜面のままであり、GD3 単独膜に対しては平坦で均一だった膜面をパーコレーションパターンにさせることがこれまでの研究から明らかにされている。⁴⁾ DPPC/GD3 混合膜に対しては、混合膜表面のかすかなパーコレーションパターンを、カフェ酸エステル類が入ることによって、はっきりとしたパーコレーションパターンに変化させた。

BC は、DPPC/GD3 混合膜のパーコレーションパターン中の GD3 リッチな領域に分布し、BC と GD3 間の強い pull-up 効果で混合膜のパーコレーションパターンを鮮明にし、膜面全体にわたって存在するドメイン部分を形成した。

これに対して、PC と CC では、パーコレーションパターンが細かく、かつドメインも部分的に点在している。これらのことから、DPPC/GD3 混合膜に対しては、3 種のカフェ酸エステル類の中では、BC が最も強い相互作用を示している。GD3 は腫瘍細胞膜に多く存在する糖脂質であり、⁷⁾ BC が最も強く腫瘍細胞に影響を与えそうなことが示唆された。

BC, CC, PC の構造式は Chart 1 に示されるようによく似てはいるが、分子構造が一番小さいのが BC である。DPPC/GD3 混合膜に対しては、混合膜中の GD3 リッチな狭い領域にカフェ酸エステル類が分布して作用を及

ばすという観点から、分子構造が一番小さいBCが最も強い相互作用を及ぼしたものと思われる。

GD3単独膜に対しては、BCとPCが強い相互作用力を示したが、⁴⁾ DPPC/GD3混合膜に対しては、BCが最も強い相互作用力を示すことが明らかになった。

分子構造の大きさ、分子の極性と疎水性の強弱、膜中への分布状態、分子の配向の仕方などが、膜への相互作用力に影響を与えることが考えられている。構造活性相関に関しては、抗酸化化合物の配糖体の違いによって抗酸化活性に差が出ることも報告されている。⁸⁾

以上の結果から、BCはDPPC/GD3混合膜と強い相互作用力があり、腫瘍細胞に影響を与えそうなことが示唆された。

結論

カフェ酸エステルのBC、CC、PCは、腫瘍モデル膜のDPPC/GD3混合膜に対して相互作用を引き起こし、DPPC/GD3混合膜をはっきりとしたパーコレーションパターンに変化させた。また、混合膜中のGD3リッチ部分に分布したBCとの間の強いpull-up効果が見られた。DPPC/GD3混合膜に対しては、カフェ酸エステル類の中ではBCが最も強い相互作用力を示し、腫瘍細胞に影響を与えそうなことが示唆された。これまでに報告²⁾されているプロポリス成分の各種腫瘍細胞に体する細胞毒性と合わせて、本研究のAFM画像からBCの抗腫瘍活性が示唆された。一方、GD3単独膜に対しては強い相互作用力を示したPCは、DPPC/GD3混合膜に対しては、BCに比べて活性が弱いことが示唆された。作用する膜の違いによって、それぞれ最適な分子サイズがあ

ることも示唆された。

参考文献

- 1) Bankova S. B., Tezuka Y., Kadita S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.* 15: 561-571, 2001.
- 2) 門田重利, 手塚康弘: プロポリス成分CAPEおよびその類縁体の癌転移抑制活性に関する研究. *ミツバチ科学*. 25: 107-112, 2004.
- 3) 戸泉文江, Shrestha S. P., 竹田忠紘, 横山祥子: ネパール産プロポリスの成分研究. *J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare*. 14: 183-187, 2013.
- 4) 戸泉文江, 月川健士, 横山祥子: プロポリス成分カフェ酸エステル類がガングリオシドG_{D3}単分子膜に及ぼす影響. *J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare*. 17: 77-80, 2016.
- 5) 戸泉文江, 月川健士, 横山祥子: ガングリオシドG_{M3}単分子膜中へのカフェ酸エステル類の分布と作用. *J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare*. 18: 63-66, 2017.
- 6) Maggio M., Ariga T., Sturtenat J. M., Yu R. K.: Distribution of gangliosides in mammalian membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 818: 1-12, 1985.
- 7) Eto Y., Shinda S.: Gangliosides occurred in tumor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 152: 279-290, 1982.
- 8) 戸泉文江, 横山祥子: Apigeninの抗酸化活性に及ぼす配糖体の影響. *J. of Kyushu Univ. of Health and Welfare*. 15: 99-102, 2014.