

ガングリオシド G_{D3} (GD3)単分子膜および リン脂質/GD3混合単分子膜中へのカフェ酸の分布と作用

戸泉 文江, 月川 健士, 横山 祥子

Distribution of Caffeic Acid in Ganglioside G_{D3} (GD3) Monolayer and
Mixed Phospholipid/GD3 Monolayer, and Their Interactions

Fumie TOIZUMI, Kenji TSUKIGAWA, Shoko YOKOYAMA

Abstract

The distribution of caffeic acid (CA) in ganglioside G_{D3} (GD3) monolayer and in mixed dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/GD3 monolayer as models of tumor membrane, and the effects of CA on the GD3 monolayer and the mixed DPPC/GD3 monolayer were observed by atomic force microscopy (AFM). CA distributed in the GD3 monolayer markedly changed the morphology of the GD3 monolayer from a flat and uniform surface to a percolated pattern. Furthermore, CA distributed in the mixed DPPC/GD3 monolayer clearly changed the morphology of the mixed DPPC/GD3 monolayer from an unclear percolated surface to a typical percolation pattern. The effects of CA on the GD3 membrane and the mixed DPPC/GD3 membrane were similar to those of benzyl caffeate and known antitumor compounds, suggesting that CA might possess antitumor activity.

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

キーワード : カフェ酸, ガングリオシド G_{D3} , リン脂質, 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、今日では生理活性物質の含有が顕著な健康補助食品として広く用いられている。^{1,2)} 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。¹⁻³⁾ プロポリスは、ミツバチがその行動圏にある種々の植物から採取した花粉や樹液などを自らの分泌物と混ぜ合わせた物質であることから、プロポリスの成分は地域や起源植物によって科学的な組成が異なるため多様であり、このことは同様に生理活性の差としても現れる。ヨーロッパ産と比べて成分研究が進んでいなかった南アジア産のプロポリスについて、我々は成分研究を行い、ネパール Kathmandu から採取されたプロポリスからカフェ酸エステル類を単離した。⁴⁾ さらに、単離したカフェ酸エステル類の抗腫瘍活性⁴⁾ を原子間力顕微鏡法 (Atomic force microscopy, AFM) を使って膜レベルで検討してきた。^{5,7)} その結果、カフ

ェ酸エステル類の抗腫瘍活性が示唆され、さらに Benzyl caffeate (BC) と Phenethyl caffeate (PC) は Cinmamy caffeate (CC) よりも活性が強いことが示唆された。^{5,7)}

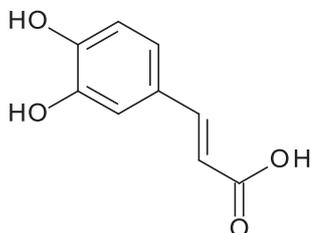
今回、エステル誘導体ではない基本化合物 Caffeic acid (CA) に着目してみた。カフェ酸はコーヒーにも含まれ、コーヒーを日常的に飲む人の群は、飲まない人の群と比べて肝癌発症率が低いというコホート研究も報告されている。⁸⁾ そこで、今回、カフェ酸 (CA) の抗腫瘍活性を膜レベルで検討することを目的に研究を行った。腫瘍モデル膜としては、ガングリオシド G_{D3} (GD3) 単分子膜と、リン脂質 /GD3 混合単分子膜を用いて、膜中への CA の分布と作用を AFM で観察した。

実験

1. 試料

Caffeic acid (CA)、Ganglioside G_{D3} (GD3) および 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。CA の構造式を下に示す。



2. LB 膜の作製

GD3 をクロロホルム / メタノール (7:3) 混液中に溶かして 1 mM 溶液として、これを 25℃ 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 GD3 の単分子膜を形成させた。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 Langmuir-Blodgett (LB) 膜として採取した。GD3/DPPC 混合単分子膜 ($X_{GD3} = 0.2$) も同様に LB 膜として採取した。CA を取り込ませた混合単分子膜は、CA、GD3、DPPC をクロロホルム / メタノール (7:3) 混液中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 μm , 厚さ 1.0 μm) を使用した。AFM の観察は、空気中でコンタクトモードで行った。

結果と考察

1. DPPC 膜への CA の影響

AFM 画像による DPPC 膜は平坦で均一であった。DPPC 膜が平坦で均一であることは、これまでに示されている。⁹⁾ 次に、DPPC に CA をモル分率で 0.1 および 0.2 含有させた LB 膜の AFM 画像を観察したが、膜面は平坦で均一であった。DPPC の LB 膜は正常膜モデルを表していて、このことから CA は正常膜には影響を与えないことが示唆された。同様な結果は、抗腫瘍活性化合物 OSW-1 が DPPC 膜に影響を与えないことが示されている。⁹⁾

2. GD3 膜への CA の作用

GD3 膜の AFM 画像は平坦で均一であった。これまで示されている画像⁹⁾と同様であり、画像の掲載は省略する。

次に、GD3 に CA をモル分率で 0.1 添加した GD3 膜の AFM 画像を Fig. 1 に示す。

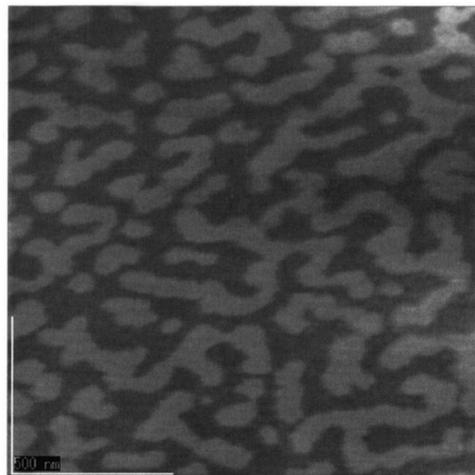


Fig. 1 CA を添加した GD3 膜の AFM 画像

GD3 単独では平坦で均一だった膜が、CA が入ることで GD3 膜がパーコレーションパターンに変化した。これは GD3 と CA との間の強い相互作用を示している。GD3 は腫瘍細胞に多く存在する糖脂質であり、¹⁰⁾ GD3 の LB 膜は腫瘍モデル膜を表している。CA が入ることで GD3 膜の状態が劇的に変化したことから、CA は腫瘍細胞に影響を与えそうなのが示唆される。同様な結果は、抗腫瘍活性化合物 OSW-1 が GD3 膜に分布した際に観察されている。⁹⁾

3. DPPC/GD3 混合膜への CA の作用

次に、より生体病態膜モデルに近づけた DPPC/GD3 混合膜で測定を行った。DPPC/GD3 混合単分子膜 ($X_{GD3} = 0.2$) の AFM 画像を Fig. 2 に示す。

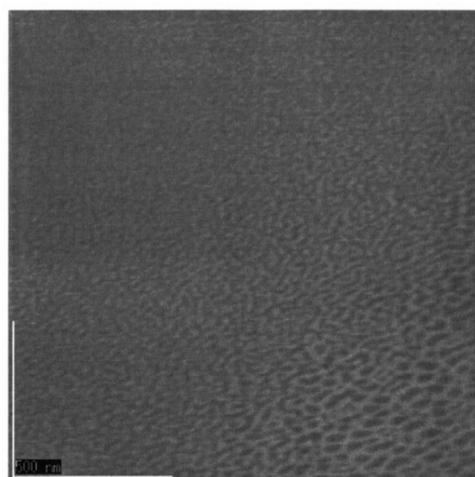


Fig. 2 DPPC/GD3 混合膜の AFM 画像

DPPC/GD3 混合単分子膜 ($X_{GD3} = 0.2$) は、膜圧 30 mN/m において、細かなパーコレーションパターンがかすかに見られるが、膜面の高さはそれほど変わらないものであった。DPPC/GD3 混合単分子膜の画像は、前報⁷⁾までのものと同様であった。

次に、DPPC/GD3 ($X_{GD3} = 0.2$) に CA をモル分率で 0.1 添加した DPPC/GD3 膜の画像を Fig. 3 に示す。

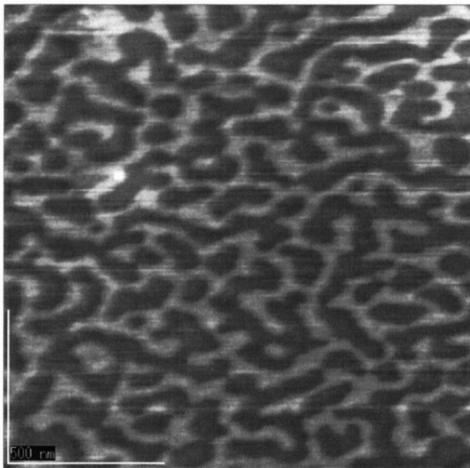


Fig. 3 CA を添加した DPPC/GD3 混合膜の AFM 画像

その結果、CA が入ることで、DPPC/GD3 膜は鮮明な典型的なパーコレーションパターンに劇変した。さらに、高低差に富むはっきりとしたパーコレーションパターンを示している。画像中、明るい部分は高さが高く、暗い部分は高さ低いことを表している。

CA は DPPC/GD3 混合膜中の GD3 に富む領域に分布し、CA と GD3 間の強い相互作用を示した。また、CA は、DPPC/GD3 混合膜の GD3 に富む領域全面にわたって分布している。前報⁷⁾で、カフェ酸エステルを DPPC/GD3 混合膜に添加した場合には、ドメインも見られたが、今回の CA を添加した場合にはドメインは観察されず、CA は混合膜中の GD3 に富む領域に様に分布して、膜面全体を典型的なパーコレーションパターンに変化させた。エステル構造の Benzyl caffeate (BC) と比べると、CA はベンジル基の側鎖分だけ分子構造が小さくなり、極性も高く、DPPC/GD3 混合膜中の GD3 に富む領域に分布しやすくなり、CA と GD3 の強い相互作用を引き起こしたものと考えられた。

以上の結果から、CA は、腫瘍細胞モデル膜である GD3 単独膜や 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

CA は、正常膜モデルである DPPC 単独膜に対しては全く影響を与えないことが確認された。次に、腫瘍モデル膜である GD3 膜に対しては、CA が膜中に分布して相互作用を引き起こすことにより、平坦で均一だった GD3 膜をパーコレーションパターンに変化させた。また、DPPC/GD3 混合膜に対しては、CA は混合膜中の GD3 リッチな領域に分布し、膜面を典型的なパーコレーションパターンに変化させた。

プロポリス成分であるカフェ酸エステル類は抗腫瘍活性があり、³⁾ 我々がこれまでに行ってきた膜レベルでの観察としての AFM 画像^{5,7)} では、腫瘍モデル膜に対してパーコレーションパターンが見られた。また、Inoue ら⁸⁾ のコホート研究の結果も合わせると、カフェ酸は、プロポリス成分ではないものの、⁴⁾ カフェ酸エステル類と同様に抗腫瘍活性がありそうなことが示唆された。

参考文献

- 1) Burdock G. A.: Review of the biological properties and toxicity of the propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363, 1998.
- 2) Bankova S. B., Tezuka Y., Kadota S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res*. 15: 561-571, 2001.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 戸泉文江, 月川健士, 横山祥子: ガングリオシド G_{M3} 混合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.
- 7) 戸泉文江, 月川健士, 横山祥子: リン脂質 / ガングリオシド G_{D3} 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. 19: 77-80, 2018.
- 8) Inoue M., Yoshimi I., Sobue T., Tsugane S.: Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. J. Natl. Cancer Inst. 97: 293-300, 2005.
- 9) Yokoyama S., Ohtsuka I., Takeda T., Sashida Y.: Distribution of an antitumor natural product OSW-1 in ganglioside G_{M3}-phospholipid membrane. Mater. Technol. 23: 54-58, 2004.
- 10) Eto Y., Shinda S.: Gangliosides occurred in tumor cells. Adv. Exp. Med. Biol. 152: 279-290, 1982.