

# 博士論文

二成分系および三成分系

混合リン脂質ベシクルを用いた

ゲニステインの可溶化と抗酸化能力の検討

金沢大学大学院 自然科学研究科  
物質化学専攻

学籍番号 : 1524022005  
氏名 : 山本隼也  
主任指導教員 : 太田明雄准教授  
提出年月 : 2019年1月

## 目次

1. 概説 .....	1
参考文献.....	5
2. リン脂質－コレステロール二成分ベシクルへのゲニステインの可溶化 .....	9
2.1 緒言 .....	9
2.2 実験手順 .....	11
2.2.1 試薬 .....	11
2.2.2 X線散乱測定.....	12
2.2.2.1 X線散乱測定用リン脂質ベシクルの調製.....	12
2.2.2.2 X線散乱測定 .....	12
2.2.3 抗酸化能力測定 .....	14
2.2.3.1 抗酸化能力測定用リン脂質ベシクルの調製.....	14
2.2.3.2 ABTS法.....	14
2.3 結果と考察.....	16
2.3.1 ゲニステインの最大可溶化量 .....	16
2.3.2 MLVのラメラ間隔に及ぼすゲニステインの効果 .....	22
2.3.3 抗酸化能力 .....	29
参考文献.....	38
3. 三成分ベシクルへのゲニステインの可溶化と抗酸化能力 .....	42
3.1 緒言 .....	42
3.2 実験手順.....	45
3.3 結果と考察.....	46
3.3.1 ゲニステインの最大可溶化量 .....	46

3.3.2 MLV のラメラ間隔に対するゲニステインの効果.....	54
3.3.3 抗酸化能力 .....	64
参考文献.....	74
4. 総括.....	77
謝辞 .....	80

## 1. 概説

ゲニステイン (Fig. 1a) は大豆やその製品に含まれるイソフラボンの一種であり、フィトエストロゲンの一種である。フィトエストロゲンは植物に含まれるエストロゲン作用を示す物質の総称である。ゲニステインはエストロゲンの一種の 17 $\beta$ -エストラジオール (Fig. 1b) との構造類似性から、エストロゲン作用を示す [1, 2]。ゲニステインは2つのエストロゲン受容体 ER $\alpha$ 、ER $\beta$  のどちらとも結合し、これらを活性化することができる [1]。また、その量によってエストラジオールの弱いアゴニスト、またはアンタゴニストとして作用する [2]。アゴニストとしての作用として、M. Heim らはゲニステインが骨髄間質細胞の骨芽細胞系へ関与して分化を増強させること、脂肪細胞の分化と成熟を ER 依存性メカニズムを介して減少させることを報告した [1]。さらに、C. Borrás らはゲニステインが数  $\mu$ M 程度の血漿濃度でエストロゲンと同様に長寿関連遺伝子の発現を調節することを報告した [3]。アンタゴニストとしての作用として、ゲニステインの ER $\beta$  との親和性が卵巣がんのリスクを減らしている可能性が示唆されている [4]。

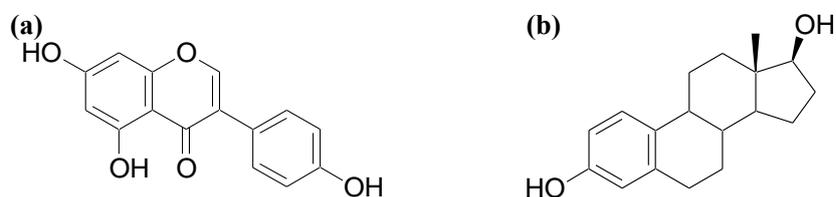


Fig. 1 ゲニステイン (a) と 17 $\beta$ -エストラジオール (b)

疫学調査により、イソフラボンの摂取の多い人の発がん率が、摂取の少ない人に比べて低いことが報告されており、ゲニステインの抗がん作用も注目されている [4, 5]。ゲニステインの抗がん作用のメカニズムの一つとして、細胞周期を G2M において停止させ、細胞分裂を阻害することが考えられている [2, 4, 5, 6]。また、ストレス反応関連遺伝子の発現を停止させ、アポトーシスから保護するストレスたんぱく質の誘導を阻害することや [4, 5, 6, 7]、さらに、抗血管新生作用や抗酸化作用も抗がん作用に関与することも指摘されている [4, 5]。

ゲニステインはそのポリフェノール構造に由来する抗酸化作用を示す。ゲニステインは電子移動に続く脱プロトン化により抗酸化反応を示すとされている (Fig. 2) [8]。A. Arora らはゲニステイン

の抗酸化反応のメカニズムを調べるために、2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitril) の熱分解によって生成したペルオキシラジカルとの反応生成物を調べ、すべての反応生成物がゲニステインの B リング上で修飾されたことを報告した [8]。T. A. Russin らは亜麻仁油の低温酸化に対するゲニステインの抗酸化能を測定し、バルクオイル系での酸化防止剤としての作用を報告した [9]。I. R. Record らはゲニステインが過酸化水素の効果的な除去剤であることを報告した [10]。このようにゲニステインは有用な作用を示す一方で、ゲニステインの水への溶解度は 10  $\mu\text{M}$  未満であり水溶性が非常に乏しいことが欠点の一つである [11, 12]。ゲニステインと同様に大豆に含まれるイソフラボンの一種であるダイゼイン (Fig. 3a) は、ゲニステインよりもヒドロキシ基が 1 つ少ないものの水溶性はゲニステインよりも高い [12]。これはゲニステインがヒドロキシ基とオキソ基間で分子内水素結合しているためである (Fig. 3b) [13]。

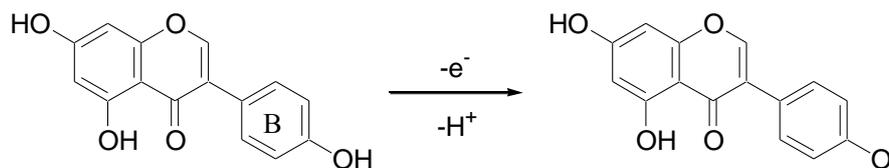


Fig. 2 ゲニステインによるラジカル消去機構 [8]

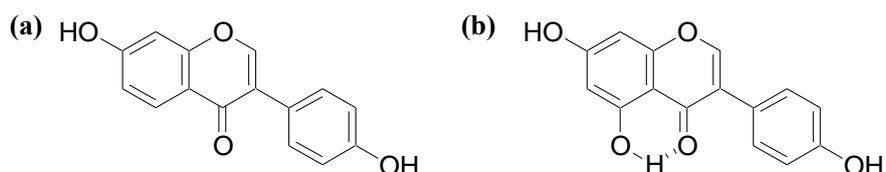


Fig. 3 ダイゼイン(a)とゲニステインの分子内水素結合(b)

本研究ではリン脂質ベシクルを使用してゲニステインを可溶化し、水溶性の乏しいゲニステインの水系での使用について検討した。リン脂質は親水基にリン酸エステルを有する複合脂質の総称であり、グリセロールを骨格にもつグリセロリン脂質と、スフィンゴシンを骨格に持つスフィンゴリン脂質に大別される。リン脂質が形成するリン脂質二重層は細胞膜の基本骨格であり、生体膜を再現するためのモデル膜としても利用されている。また、脂質二重層が閉じた構造のリン脂質ベシクル

は二重層中に疎水性物質を、内水相に親水性物質を内包できることから可溶化の手段としても有用である。ミセルやベシクルを形成する一般的な界面活性剤と比較すると、リン脂質は生体適合性が高く、ニュートラシューティカルズでもあることから、食品等への使用に適している。リン脂質二重層は温度によって二重層の特性が変化する。1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) が形成する二分子膜の各相状態を Fig. 4 に示す [14]。DPPC 二重層では、さまざまな温度や圧力の条件の下で、ラメラ結晶相(サブゲル相)、ラメラゲル相(ゲル相)、リップルゲル相、液晶相、指組構造ゲル相が観測される [14, 15, 16, 17]。これらの相のうち、指組構造ゲル相は通常的环境下では見られず、高圧下やアルコールなどの両親媒性物質存在下で見られる [14, 17]。また、最も低温側で見られるサブゲル相はゲル相からの転移に時間がかかるため、ゲル相、リップルゲル相、液晶相が通常の条件の下でよく見られる相である。ゲル相における脂質の炭化水素鎖はトランス型で密にパッキングした秩序高い構造を有し、流動性は低い [18]。温度が上がると一部の脂質の炭化水素鎖が融解して無秩序になり、ゲル相から二分子膜が波打つ構造のリップルゲル相に転移する(前転移)。リップルゲル相では一部の炭化水素鎖が融解して無秩序になった脂質が凹部に位置し、その他の脂質はゲル相の構造を保っている [15, 19]。さらに温度を上げると、脂質の炭化水素鎖がすべて融解してゴーシュ型が増え、秩序性が低下して流動性が増加した液晶相を形成する [14, 18]。この相転移温度を主相転移温度、または融解温度という。

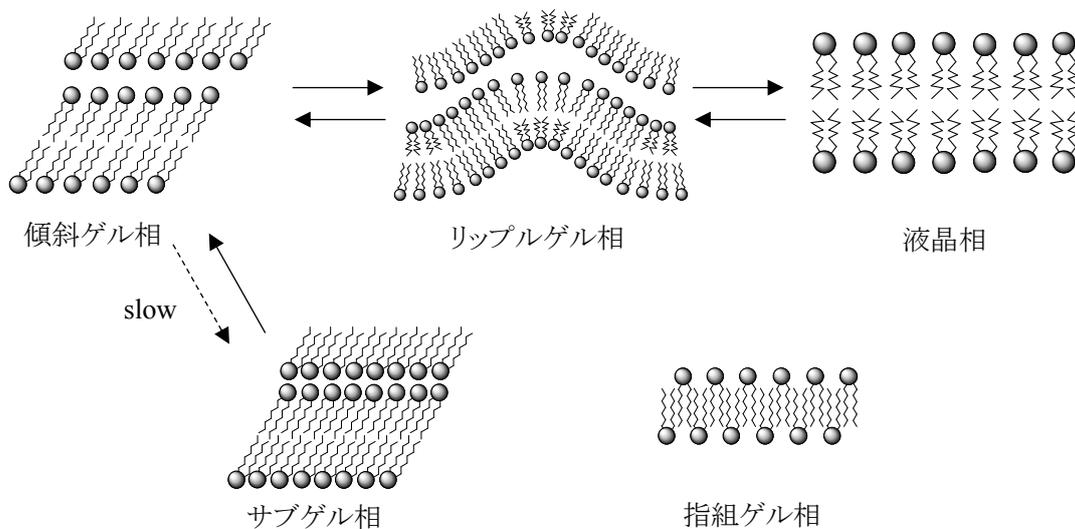


Fig. 4 DPPC が形成する二重層の構造と相転移 [14, 15, 19]

生体膜において、コレステロールも重要な役割を担っている。コレステロールは単独で二重層を形成することはないが、リン脂質二重層内に可溶化し、二重層特性を変化させる [20, 21, 22, 23, 24]。二重層に添加可能なコレステロールの量については、構成するリン脂質の親水基の影響が大きく、炭化水素鎖長の影響はみられないと報告されている [25]。コレステロールはリン脂質二重層の炭化水素鎖領域に埋め込まれ、ヒドロキシ基は極性頭部基領域に浸透し、リン脂質の親水基と水素結合を形成している [21, 26]。コレステロールが添加されたリン脂質二重層では分子占有面積が理想混合から予想される以上に減少する凝縮効果がみられる [20, 27, 28]。また、コレステロールはゲル相においては炭化水素鎖の結晶構造を破壊して流動性を高め、液晶相においては炭化水素鎖の屈曲を抑制して流動性を下げる [22]。また、コレステロールを含む二重層では相転移温度が消失し、ゲル相と液晶相の間の炭化水素の性質を有する秩序液体相がみられる [29]。

本研究では常温における水中でのゲニステインの効率的な利用を目的として、DPPC と 1,2-dioleoyl-sn -glycero-3-phosphocholine (DOPC)、コレステロールで形成されたリン脂質ベシクルによってゲニステインを可溶化し、その可溶化量とベシクルの構造、抗酸化能力について検討した。DPPC は炭素数 16 のパルミトイル鎖を 2 本有する両性の飽和グリセロリン脂質であり、DOPC は 1 つの二重結合を含むオレオイル鎖を 2 本有する同じく両性の不飽和グリセロリン脂質である。2 章では DPPC あるいは DOPC に異なる割合のコレステロールを添加した二成分脂質ベシクルにゲニステインを可溶化し、その可溶化量と抗酸化能力に対するコレステロールの影響を検討した。3 章では DPPC と DOPC、コレステロールからなる三成分脂質ベシクルを様々な組成で調製し、ベシクルの相状態や組成によるゲニステインの可溶化量と抗酸化能力への影響を検討した。

## 参考文献

- [1] M. Heim, O. Frank, G. Kampmann, N. Sochocky, T. Pennimpe, P. Fuches, W. Hunziker, P. Weber, I. Martin and I. Bendik, "The Phytoestrogen Genistein Enhances Osteogenesis and Represses Adipogenic Differentiation of Human Primary Bone Marrow Stromal Cells," *Endocrinology*, vol. 145, pp. 848-859, 2004.
- [2] V. Cappelletti, L. Fioravanti, P. Miodini and G. Di Fronzo, "Genistein Block Breast Cancer Cells in the G2M Phase of the Cell Cycle," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 79, pp. 594-600, 2000.
- [3] C. Borrás, J. Gambini, M. C. Gómez-Cabrera, J. Sastre, F. V. Pallardó, G. E. Mann and J. Viña, "Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB," *The FASEB journal*, vol. 20, pp. 1476-1481, 2006.
- [4] J.-Y. Lee, H. S. Kim and Y.-S. Song, "Genistein as a Potential Anticancer Agent against Ovarian Cancer," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol. 2, pp. 96-104, 2012.
- [5] M. Adjakly, M. Ngollo, J.-P. Boiteux, Y.-J. Bignon, L. Guy and D. Bernard-Gallon, "Genistein and Daidzein: Different Molecular Effects on Prostate Cancer," *Anticancer Research*, vol. 33, pp. 39-44, 2013.
- [6] Y.-I. Bi, M. Min, W. Shen and Y. Liu, "Genistein induced anticancer effects on pancreatic cancer cell lines involves mitochondrial apoptosis, G0/G1 cell cycle arrest and regulation of STAT3 signalling pathway," *Phytomedicine*, vol. 39, pp. 10-16, 2018.
- [7] Y. Zhou and A. S. Lee, "Mechanism for the Suppression of the Mammalian Stress Response by Genistein, an Anticancer Phytoestrogen From Soy," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, pp. 381-388, 1998.
- [8] A. Arora, S. Valcic, S. Cornejo, M. G. Nair, B. N. Timmermann and D. C. Liebler, "Reactions

- of Genistein with Alkylperoxyl Radicals," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 13, pp. 638-645, 2000.
- [9] T. A. Russin, J. I. Boye and Y. Arcand, "Antioxidant Properties of Genistein in a Model Edible Oil System," vol. 71, pp. 395-399, 2006.
- [10] I. R. Record, I. E. Dreosti and J. K. McInerney, "The antioxidant activity of genistein in vitro," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 6, pp. 481-485, 1995.
- [11] J.-G. Wu, J. Ge, Y.-P. Zhang, Y. Yu and X.-Y. Zhang, "Solubility of Genistein in Water, Methanol, Ethanol, Propan-2-ol, 1-Butanol, and Ethyl Acetate from (280 to 333) K," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 55, pp. 5286-5288, 2010.
- [12] G. Nan, J. Shi, Y. Huang, J. Sun, J. Lv, G. Yang and Y. Li, "Dissociation Constants and Solubilities of Daidzein and Genistein in Different Solvents," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 59, pp. 1304-1311, 2014.
- [13] W. L. Whaley, J. D. Rummel and N. Kastrapeli, "Interactions of Genistein and Related Isoflavones with Lipid Micelles," *Langmuir*, vol. 22, pp. 7175-7184, 2006.
- [14] H. Matsuki and S. Kaneshina, "Thermodynamics of Bilayer Phase Transitions of Phospholipids," *Netsu Sokutei*, vol. 33, pp. 74-82, 2006.
- [15] A. H. de Vries, S. Yefimov, A. E. Mark and S. J. Marrink, "Molecular structure of the lecithin ripple phase," *PNAS*, vol. 102, pp. 5392-5396, 2005.
- [16] M. Kinoshita, K. Ito and S. Kato, "Kinetics for the subgel phase formation in DPPC/DOPC mixed bilayers," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 163, pp. 712-719, 2010.
- [17] Y. Kurniawan, K. P. Venkataramanan, C. Scholz and G. D. Bothun, "n-Butanol Partitioning and Phase Behavior in DPPC/DOPC Membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, pp. 5919-5924, 2012.
- [18] M. J. de Lange, M. Bonn and M. Müller, "Direct measurement of phase coexistence in DPPC/cholesterol vesicles using Raman spectroscopy," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol.

146, pp. 76-84, 2007.

- [19] K. Honda and H. Kimura, "Theory of Formation of the Ripple Phase in Bilayer Membranes," *J. Phys. Soc. Jpn*, vol. 60, pp. 1212-1215, 1991.
- [20] B. De Kruyff, R. A. Demel, A. J. Slotboom, L. L. M. van Deenen and A. F. Rosenthal, "The effect of the polar headgroup on the lipid-cholesterol interaction: A monolayer differential scanning calorimetry study," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 307, pp. 1-19, 1973.
- [21] R. Bittman and L. Blau, "The Phospholipid-Cholesterol Interaction, Kinetics of Water Permeability in Liposomes," *Biochemistry*, vol. 11, pp. 4831-4839, 1972.
- [22] B. D. Ladbrooke, R. M. Williams and D. Chapman, "STUDIES ON LECITHIN-CHOLESTEROL-WATER INTERACTIONS BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY AND X-RAY DIFFRACTION," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 150, pp. 333-340, 1968.
- [23] H. Saito and W. Shinoda, "Cholesterol Effect on Water Permeability through DPPC and PSM Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, pp. 15241-15250, 2011.
- [24] P. R. Adhyapak, S. V. Panchal and A. V. R. Murthy, "Cholesterol induced asymmetry in DOPC bilayers probed by AFM force spectroscopy," *BBA - Biomembranes*, vol. 1860, pp. 953-959, 2018.
- [25] J. Huang, J. T. Buboltz and G. W. Feigenson, "Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1417, pp. 89-100, 1999.
- [26] A. Kessel, N. Ben-Tal and S. May, "Interactions of Cholesterol with Lipid Bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations," *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 643-658, 2001.

- [27] T. A. Daly, M. Wang and S. L. Regen, "The Origin of Cholesterol's Condensing Effect," *Langmuir*, vol. 27, pp. 2159-2161, 2011.
- [28] M. Alwarawrah, J. Dai and J. Huang, "A Molecular View of the Cholesterol Condensing Effect in DOPC Lipid Bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, pp. 7516-7523, 2010.
- [29] T. Miyoshi, M. Lönnfors, J. P. Slotte and S. Kato, "A detailed analysis of partial molecular volumes in DPPC/cholesterol binary bilayers," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1838, pp. 3069-3077, 2014.

## 2. リン脂質ーコレステロール二成分ベシクルへのゲニステインの可溶化

### 2.1 緒言

DPPC は炭化水素鎖に二重結合をもたない飽和リン脂質であり、DPPC 二分子膜のゲル-液晶相転移の主相転移温度が約 41°C である。したがって、室温ではゲル相のベシクルを形成するが、DPPC は親水基の実効面積が炭化水素鎖の断面積よりも大きいため、炭化水素鎖が十分に接近するために二重層平面に対して傾斜した傾斜ゲル相のベシクルを形成する [1]。温度を上げるにつれて波状のリプルゲル相ベシクルへと転移した後、主相転移温度で液晶相ベシクルに転移する。一方で、DOPC は 2 本の炭化水素鎖に 1 つずつ二重結合をもつリン脂質であり、相転移温度は-22°Cであることから、室温では液晶相ベシクルを形成する。

コレステロールを含む DPPC 二重層は秩序液体相を形成する。T. Miyoshi らは無秩序液体相(液晶相)、秩序液体相、固体相(ゲル相)の分子状態について調べ、秩序液体相の炭化水素鎖の状態が固体相と無秩序液体相の間であると報告した [2]。H. Reinl らは DPPC-Chol 二成分系の秩序液体相の温度変化に伴う構造変化を調査した。その結果、温度の上昇とともにコレステロール分子は二重層中心から界面付近へと追いやられることで二重層の秩序状態が変化し、DPPC アシル鎖の大部分のメチレンはトランス配座であるもののアシル鎖末端領域においてゴーシュ配座が増加することを報告した [3]。M. J. L. de Lange らは DPPC-Chol 二成分系の挙動についてラマン分光法により調べ、相共存のコレステロール濃度の上限として無秩序液体相ー秩序液体相でおおよそ 27 mol%、固体相ー秩序液体相でおおよそ 22 mol%であることを報告した [4]。DOPC とコレステロールについては、P. R. Adhyapak らはコレステロールが二重層の機械的強度を増大し、30 mol%以上のコレステロールを添加すると二重層リーフレットに対して非対称に分布することを報告した [5]。また、両リン脂質二重層において、コレステロールは疎水性コアに埋め込まれ、コレステロールのヒドロキシ基はリン脂質の親水基と水素結合し、親水基に接近するように極性頭部基領域に突き出る形で存在していることが報告されている [6, 7]。

細胞膜へのフラボノイド化合物の分配はその極性に準じ、非極性のフラボノイド化合物は疎水性コアに分配し、親水性フラボノイド化合物は頭部基と水素結合を形成すると考えられる [8]。M.

Kuźdżał らは赤血球膜、DPPC、DMPC モデル細胞膜とゲニステインの相互作用を調べ、ゲニステインは頭部基領域に優先的に可溶化される一方で、ある程度のゲニステインは極性/無極性界面に存在し、疎水性コア領域には極少量のゲニステインのみがインターカレートされることを報告した。K. Cieřlik-Boczula らは DPPC 二重層においてゲニステインが極性頭部基と水素結合を形成し、脂質の配置を変更してパッキングを緩めることを報告した [9]。B. Pawlikowska-Pawłęga らはゲニステインが DPPC 二重層において極性頭部基を強く剛直化し、疎水性コアも硬化させること、DPPC の C-O-P-O-C セグメントとゲニステインのヒドロキシ基とで水素結合を形成することを報告した [10]。A. Arora らは 1-stearoyl-2-linoleoylphosphatidylcholine (SLPC) のラージユニラメラベシクル (LUV) へのフラボノイド類の膜流動性への影響と局在化を調べ、疎水性コアに分配し、この領域の流動性を大きく下げたことを報告した [11]。

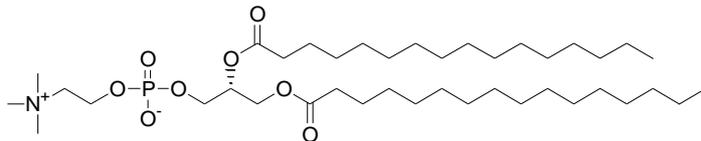
本章では 0%、10%、30% のコレステロールを含む DPPC、DOPC ベシクルに対するゲニステインの可溶化挙動を検討した。DPPC-Chol 二成分系ではコレステロール 0% のときはゲル相状態に、10% ではゲル-秩序液体相共存状態、30% では秩序液体相状態のベシクルを形成する [12, 13]。一方、DOPC-Chol 二成分系では、コレステロール濃度 0, 10% では無秩序液体相状態、30% では無秩序液体相-秩序液体相共存状態のベシクルを形成する [14]。以上のリン脂質-コレステロール二成分系に対して、ゲニステインの最大可溶化量とベシクル膜のラメラ間隔への影響、抗酸化能力を評価した。最大可溶化量は広角側の X 線散乱測定 (WAXS) により、ゲニステインが析出しているかどうかを調べることで評価した。ラメラ間隔は小角側の X 線散乱測定 (SAXS) によって求めた。抗酸化能力は ABTS ラジカルカチオンを使用した方法で評価した。

## 2.2 実験手順

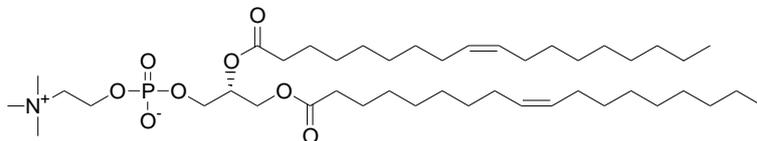
### 2.2.1 試薬

本研究にて使用した主な試薬の分子構造を以下に示した。

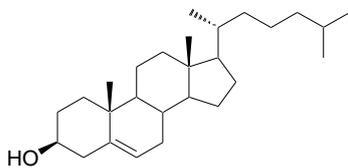
DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)



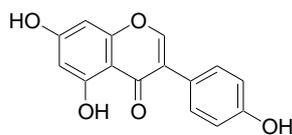
DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)



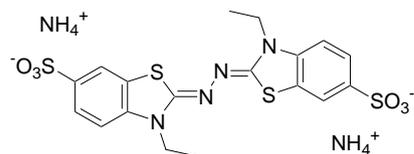
Cholesterol (Chol)



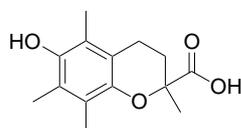
Genistein (Gen, 4',5,7-trihydroxyisoflavone)



ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt))



Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromen-2-carboxylic acid)



DPPC と DOPC は NOF corporation から購入した。コレステロールは和光純薬工業(富士フィルム和光純薬株式会社)から購入した。ゲニステインは東京化成工業から購入した。ABTS 法に使用した ABTS は東京化成工業から、過硫酸カリウムは和光純薬工業(富士フィルム和光純薬株式会社)から購入した。リン酸バッファー (0.1 M, pH=7.4) はナカライテスクから購入した。標準抗酸化物質として使用したトロロックスは、東京化成工業から購入した。

## 2.2.2 X 線散乱測定

### 2.2.2.1 X 線散乱測定用リン脂質ベシクルの調製

あらかじめメタノールに溶解した DPPC あるいは DOPC とコレステロール、ゲニステインを試験管内でそれぞれ適量を混合することで、最終濃度として総脂質濃度(リン脂質とコレステロールの総濃度)  $C_L = 1.4 \text{ mM}$ 、ゲニステイン濃度  $C_G = 0 \sim 0.7 \text{ mM}$  になるように各組成のサンプルを準備した。また、脂質濃度  $C_L$  とゲニステイン濃度  $C_G$  の比を  $X_G = C_G/C_L$  と定義し、今回の実験では  $X_G = 0 \sim 0.5$  の範囲で検討を行った。ロータリーエバポレーターにより DPPC の主相転移温度を十分に超える  $50^\circ\text{C}$  でメタノールを除去することで、試験管内壁に混合薄膜が形成された。有機溶媒が残っているとベシクルの形成がうまくいかないため、完全にメタノールを除去するためにさらに 1 時間  $50^\circ\text{C}$  で減圧乾燥させた。このようにして準備した脂質薄膜に蒸留水を加え、 $50^\circ\text{C}$  でボルテックスすることで試験管内壁の薄膜が水和され、脂質二重層が何層も重なったマルチラメラベシクル (MLV) 分散液を調製した。

### 2.2.2.2 X 線散乱測定

X 線散乱測定では MLV 分散液を直径 1 mm のキャピラリーへ移し、キャピラリー内に分散したベシクルに対して X 線を照射し、その散乱 X 線から構造を解析する。キャピラリー内にはごく少量の分散液しか入らないため、十分な強度の X 線回折強度を得るためには、ベシクル分散液の密度を高める必要がある。そのため、まず調製された MLV 分散液を遠心分離器に供することでベシクル

を沈降させ、MLV 分散液の濃縮処理を施した。これをキャピラリーに移しとり、さらに遠心処理によりキャピラリーの底にベシクルの沈殿層を形成させた。このベシクル沈殿層部位に X 線を照射することで目的の X 線散乱パターンを測定した。なおこのサンプルとは別に、濃縮処理を施していない希薄なベシクル分散液に対し長時間の X 線照射した X 線回折パターンを測定し、両者を比較したところ、回折ピークの位置に変化が無いことを確認した。よって全ての X 線散乱測定に使用したベシクルサンプルは、同様な濃縮処理を施して測定を行った。X 線散乱の測定には Nano-viewer (リガク)を使用した。X 線源には銅の特性 X 線(CuK $\alpha$ : $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) を使用し、測定は室温 25°C の環境の下で行った。サンプルとイメージングプレート間の距離を調整することで散乱ピークの回折角度を変化させることができ、その距離を広げるほど小角側の回折パターンを観測できるようになる。本実験でのカメラ長は、700 mm (SAXS)、85 mm (WAXS) の 2 種類を用いて測定した。散乱 X 線はイメージングプレートに転写され、イメージング読み取り装置(RAXIA-Di, リガク)で 2 次元像をパソコンへ取り込み、装置付属の解析ソフトウェア(2DP, リガク)を用いて解析した。データの解析により次式で示す散乱ベクトル  $q$  に対する散乱 X 線強度の関係が得られる。

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda$$

$\theta$  は格子面と X 線のなす角、 $\lambda$  は X 線の波長( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) である。X 線は次式の Bragg 条件を満たす場合に回折が生じる。

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

$n$  は整数、 $d$  は格子面間隔を表す。上記 2 式より、格子面間隔は次式から求められる。

$$d = 2\pi/q$$

MLV の X 線散乱測定では WAXS 測定から隣接する脂質分子のアシル鎖間距離に関するデータを、SAXS 測定からは水和層を介した二重層間の間隔(ラメラ間隔)に関するデータをそれぞれ得た。

### 2.2.3 抗酸化能力測定

#### 2.2.3.1 抗酸化能力測定用リン脂質ベシクルの調製

抗酸化能力の測定においては、内側の二重層に可溶化したゲニステインとより外側の二重層に可溶化したゲニステインでは、バルク中の物質との反応速度に違いが生じることが推測される。そのため、抗酸化能力測定においては一枚膜のスモールユニラメラベシクル (SUV) として使用した。本実験では十分な量のゲニステインを可溶化するように X 線散乱測定用のベシクルよりも一桁高い脂質濃度を設定した。まず、 $C_L = 14 \text{ mM}$ 、 $C_G = 0 \sim 1.0 \text{ mM}$ となるように 2.2.2.1 で述べた方法を用いて MLV 分散液を調製した。SUV 分散液は、調製された MLV 分散液を DPPC の主相転移温度以上の  $50^\circ\text{C}$  で 10 分間超音波処理することで調製した。

#### 2.2.3.2 ABTS 法

抗酸化能力は R.Re ら [15]の方法を基に測定した。ABTS 法では  $\lambda = 734 \text{ nm}$  に吸収極大をもつ ABTS ラジカルカチオンを利用する。まず、同じ体積の  $7 \text{ mM}$  の ABTS 水溶液と  $2.45 \text{ mM}$  の過硫酸カリウム水溶液を混合し、16 時間以上暗所に静置することで ABTS ラジカルカチオン水溶液を調製した。ABTS ラジカルカチオンは  $\lambda = 734 \text{ nm}$  に吸収極大をもつため、ラジカル消去による ABTS ラジカルカチオンの減少に伴う吸光度の減少から抗酸化能力を評価することができる [16]。ABTS の反応機構は Fig. 1 に示した通りである。吸光度の測定は U-2900 (日立) を使用し、測定波長範囲は  $480 \sim 880 \text{ nm}$ 、スキャン速度は  $2700 \text{ nm/min}$ 、測定温度は  $30^\circ\text{C}$  で行った。スキャン速度の都合により  $5 \text{ nm}$  刻みのデータが得られたため、 $\lambda = 735 \text{ nm}$  の吸光度を参照した。ABTS ラジカルカチオンは時間の経過とともに減少するため、測定前に基準となる濃度、 $\lambda = 735 \text{ nm}$  における吸光度が  $0.70 \pm 0.02$  になるようにリン酸バッファー ( $0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ) で希釈して使用した。なお、ラジカルカチオンの吸光度の減少はリン酸バッファーによる希釈直後より起り始めるため、総量が  $1980 \mu\text{L}$  になるように上記の溶液をガラスセル内で調製後、その 1 分後に吸光度測定を行い、この吸光度を始点のデータとして扱った。さらに 1 分後に抗酸化能力評価を行う SUV 分散液あるいはゲニステインのメタノール溶液をそれぞれ  $20 \mu\text{L}$  加え、1 分毎に添加 6 分後までの吸光度を測定し

た。得られた $\lambda = 735 \text{ nm}$ における吸光度の値から、次式を用いて阻害度 (% inhibition) を計算した。

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

$A_0$  はゲニステインを含まない系における吸光度、 $A$  はゲニステインを含む系における吸光度である。なお、長時間測定すると空気中の酸素との反応の影響が無視できなくなるため、本研究ではほぼ反応が平衡に達する 6 分後の吸光度を使用した。得られた阻害度をゲニステイン濃度に対してプロットすることで、阻害度が 50%となるゲニステイン濃度 (IC 50) を求めた。さらに標準抗酸化物質であるトロロックスに対する抗酸化能力の比(トロロックス当量抗酸化能力:TEAC)を次式から計算した。

$$TEAC = IC 50_{\text{trolox}} / IC 50_{\text{genistein}}$$

なお、トロロックスの IC50 は過去の報告から  $9.8 \mu\text{M}$  とした [17]。

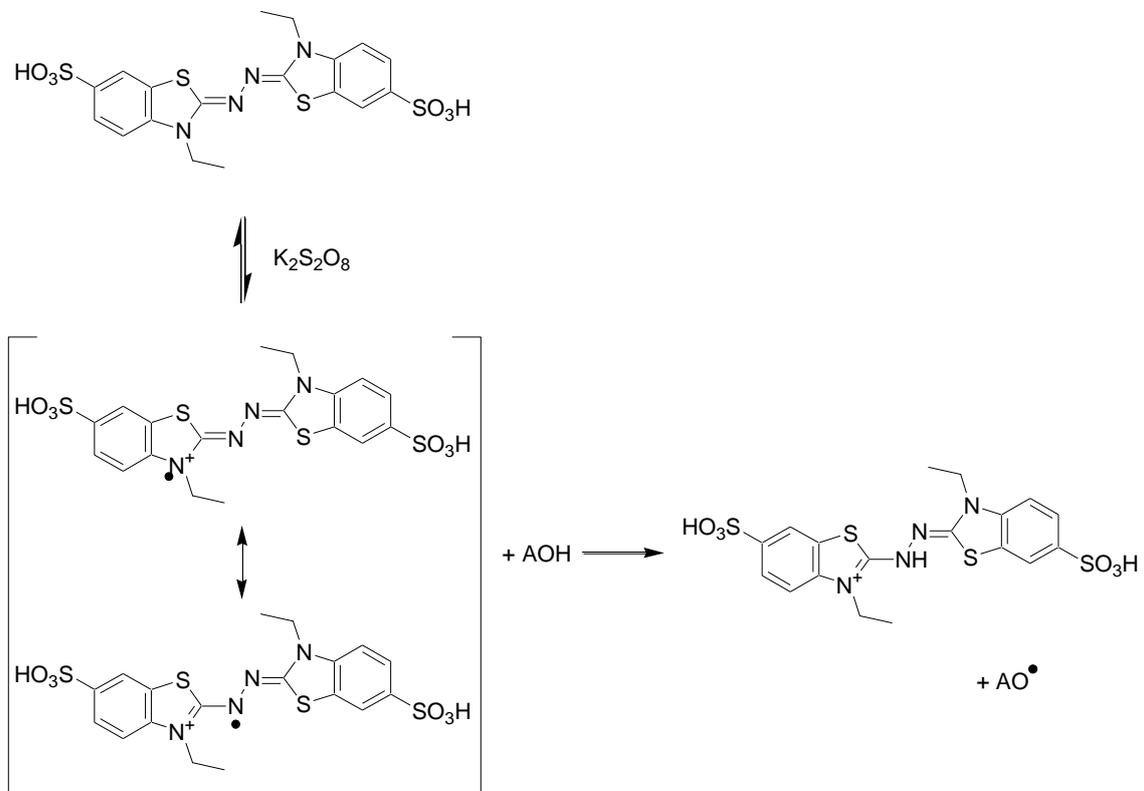


Fig. 1 ABTS ラジカルカチオンの反応機構 [16]

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 ゲニステインの最大可溶化量

Fig. 2 にゲニステインの WAXS プロファイルを示した。このプロファイルからゲニステインの結晶由来のピークが確認された。ゲニステインを可溶化した MLV において、これらのピークの存在はゲニステインの結晶構造の存在を示唆するため、これらのピークの有無からゲニステインの最大可溶化量を見積もった。

Figs. 3~5 に DPPC-Chol 二成分系 MLV の WAXS プロファイルを示し、Fig. 3 にはコレステロールが存在しない DPPC-Chol 0% の MLV の WAXS プロファイルを示した。 $q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$  付近にアシル鎖領域の構造に由来する強いピークが得られた。このピークはアシル鎖の配向秩序が反映され、秩序の高いゲル相ではシャープなピークが得られるが、無秩序な液晶相ではブロードなピークがみられる。この系ではシャープなピークが得られたことから、ゲル相の存在が示唆された。 $X_G \geq 0.2$  において  $q = 1.1, 1.8 \text{ \AA}^{-1}$  付近にピークが見られ、ゲニステインの析出が確認できた。Fig. 4 は DPPC-Chol 10% MLV の WAXS プロファイルである。おなじく  $q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$  付近にアシル鎖に由来するシャープなピークが得られ、ゲル相の存在が示唆された。 $X_G \geq 0.2$  において、ゲニステインの結晶由来のピークが確認された。Fig. 5 は DPPC-Chol 30% MLV の WAXS プロファイルであるが、このプロファイルからは  $q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$  のピークはブロードであり、このベシクルはゲル相ではなく液晶相として存在していることが示唆された。ゲニステインのピークは  $X_G \geq 0.1$  においてみられることから、このベシクルにはゲニステインはほとんど可溶化されていないことが示唆される。

Figs. 6~8 に DOPC-Chol 二成分系 MLV の WAXS プロファイルを示し、Fig. 6 にはコレステロールが存在しない DOPC-Chol 0% MLV の WAXS プロファイルを示した。 $q = 1.5 \text{ \AA}^{-1}$  付近のアシル鎖ピークはブロードであり、液晶相であることが示唆された。 $q = 1.1, 1.8 \text{ \AA}^{-1}$  付近のゲニステインピークは  $X_G = 0.5$  で確認された。Fig. 7 は DOPC-Chol 10% MLV の WAXS プロファイルである。こちらにも同様にブロードなアシル鎖ピークより液晶相であることが示唆された。また、ゲニステインのピークは  $X_G \geq 0.4$  で確認された。Fig. 8 は DOPC-Chol 30% MLV の WAXS プロファイルであるが、アシル鎖のピークは殆ど確認できない程度に小さくブロードになった。ゲニステインの結晶ピークは

$X_G \geq 0.3$ で見られた。

Table 1 に WAXS 測定から求めたゲニステインの最大可溶化量を示した。DPPC-Chol 二成分系 MLV へのゲニステインの可溶化量は、脂質濃度の 20%未満と総じて低かったのに対し、DOPC-Chol 二成分系 MLV では脂質濃度の 30~50%とより多くのゲニステインを可溶化した。これらの差は DPPC 系 MLV と DOPC 系 MLV でのゲニステインの可溶化部位が異なることに起因すると思われる。ゲニステインの可溶化部位について、飽和リン脂質を用いた研究では極性頭部基領域に多く可溶化されると報告されている [9, 10, 18]。その一方で、不飽和リン脂質を用いた研究では疎水性コアに分配されると報告されている [11]。これらの報告から、パッキングの緩い DOPC ベシクルではゲニステインが疎水性コアに可溶化できるのに対し、密にパッキングした DPPC ベシクルでは疎水性コアに可溶化できないため最大可溶化量に差が生じたと考えられる。また、どちらのリン脂質ベシクルにおいても、コレステロールの添加はゲニステインの可溶化量を減少させた。コレステロールは疎水性コアに埋め込まれ、ヒドロキシ基は極性頭部基領域へ突き出すように二重層内に存在している [6, 7] ため、添加されたコレステロールがゲニステインの可溶化部位を占有し、ゲニステインを脂質膜から排除しているのではないかと考えられる。

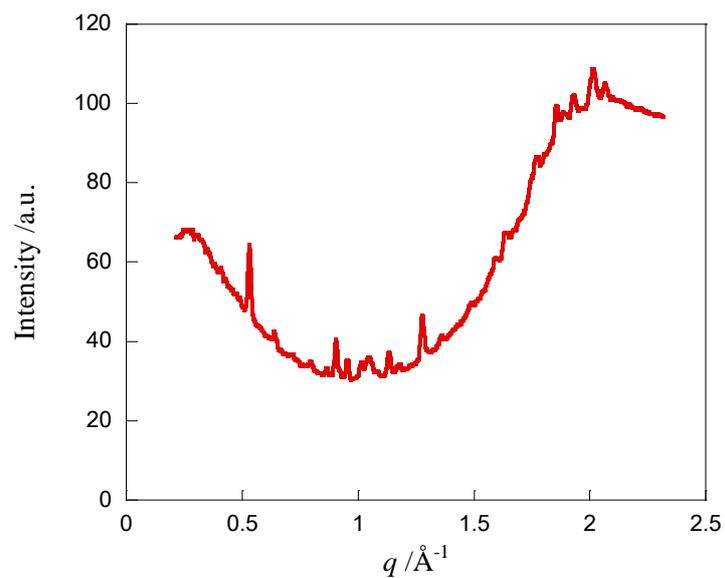


Fig. 2 ゲニステインの WAXS プロファイル

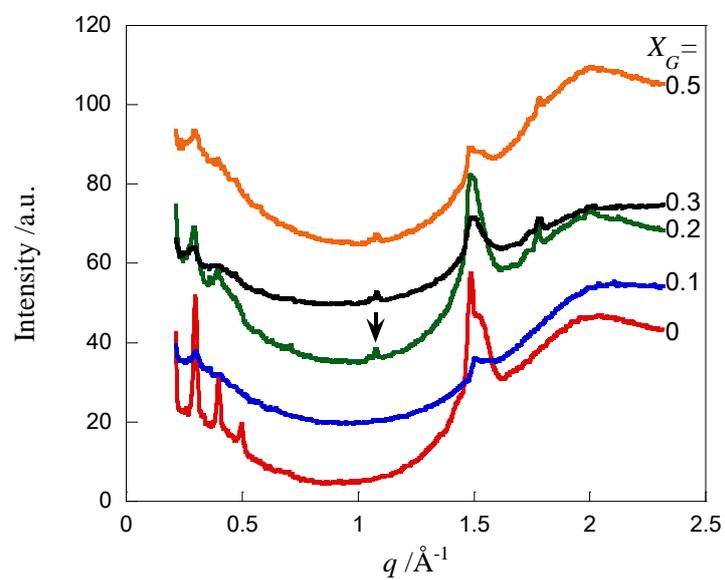


Fig. 3 DPPC-Chol 0% MLV の WAXS プロファイル

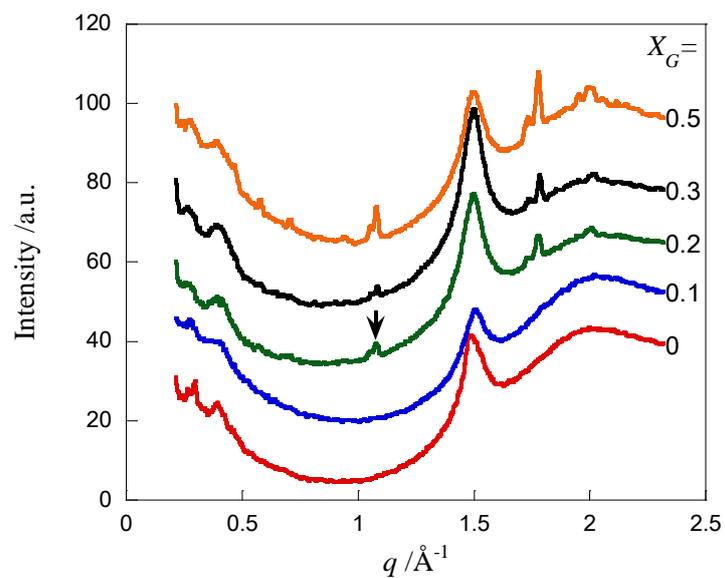


Fig. 4 DPPC-Chol 10% MLV の WAXS プロファイル

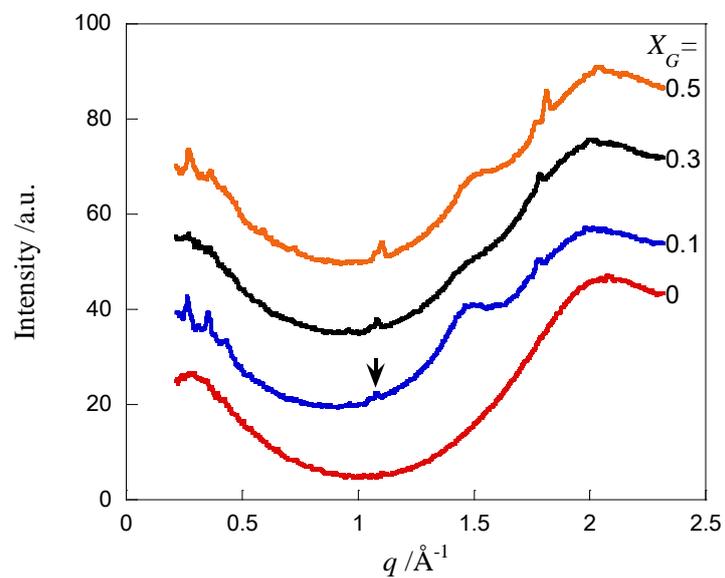


Fig. 5 DPPC-Chol 30% MLV の WAXS プロファイル

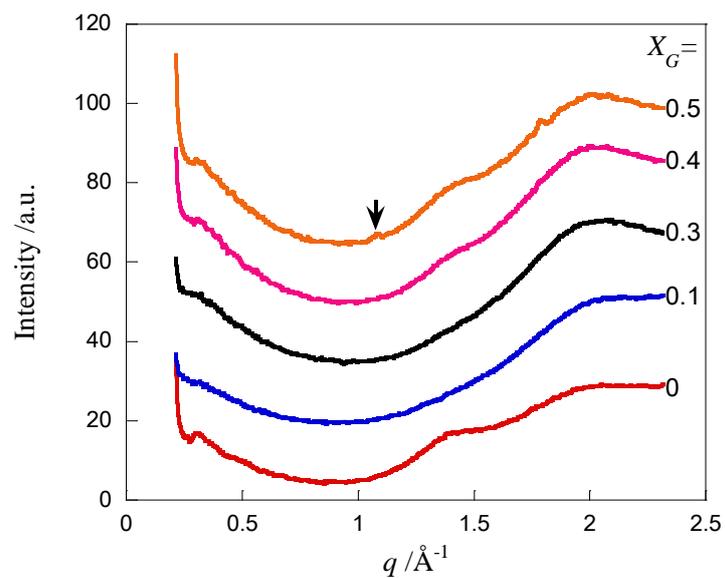


Fig. 6 DOPC-Chol 0% MLV の WAXS プロファイル

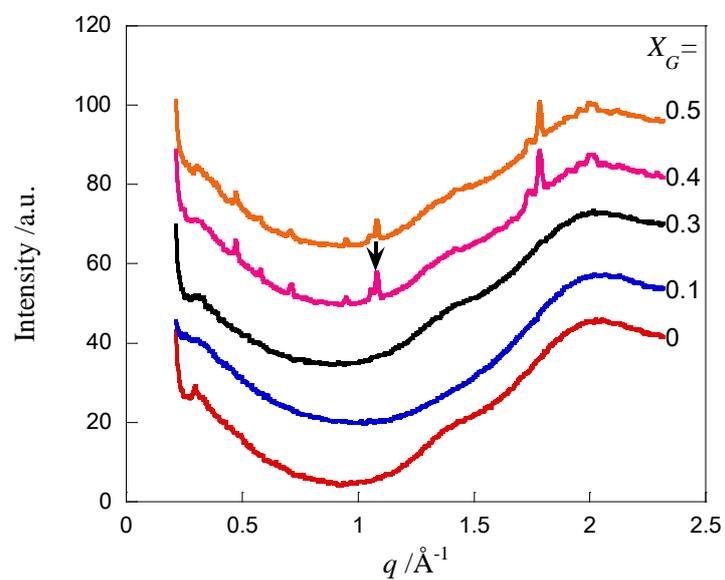


Fig. 7 DOPC-Chol 10% MLV の WAXS プロファイル

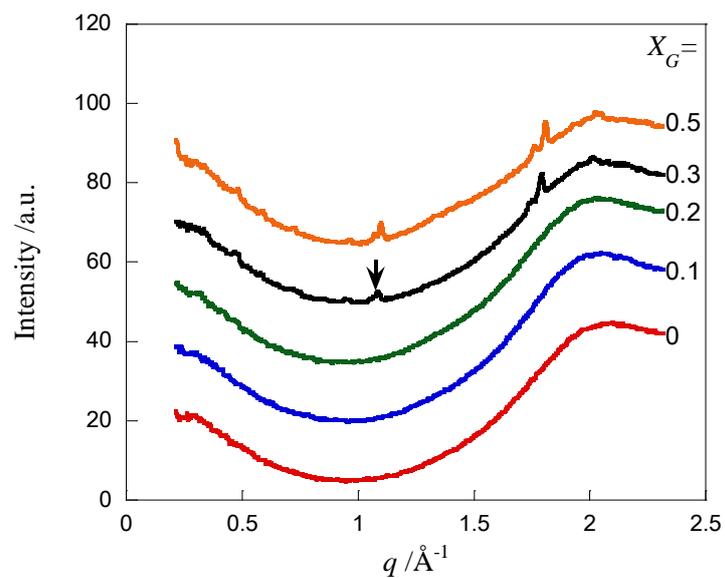


Fig. 8 DOPC-Chol 30% MLV の WAXS プロファイル

Table 1 各 MLV 系へのゲニステインの最大可溶化量(総脂質濃度比)

	DPPC 系 MLV	DOPC 系 MLV
0% cholesterol	~20%	~50%
10% cholesterol	~20%	~40%
30% cholesterol	~10%	~30%

### 2.3.2 MLV のラメラ間隔に及ぼすゲニステインの効果

Figs. 9~11 に DPPC-Chol 二成分系 MLV の SAXS プロファイルを示し、Fig. 9 にはコレステロールが存在しない DPPC-Chol 0% MLV の SAXS プロファイルを示した。 $q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$ 付近にシャープな第一ピークがみられ、その 2 倍の $q = 0.2 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に第二ピークがみられた。整数倍の位置にピークがみられるのはラメラ構造特有のピークであることから、MLV の形成が確認された。ゲニステインが添加されてもピーク的位置に変化はなかった。Fig. 10 は DPPC-Chol 10% MLV の SAXS プロファイルである。 $X_G = 0$ ではピークの分離が確認され、2つのラメラ間隔を有することからこの系では2種類の相状態が共存していると判断される。しかしながらゲニステインが添加されるとピークが1種類になり、相分離状態が解消され、ピーク位置は $X_G$ によって変化した。Fig. 11 は DPPC-Chol 30% MLV の SAXS プロファイルであるが、全てのプロファイルにシャープなラメラピークが確認でき、ゲニステインの添加による変化もみられなかった。

Figs. 12~14 に DOPC-Chol 二成分系 MLV の SAXS プロファイルを示し、Fig. 12 にはコレステロールが存在しない DOPC-Chol 0% MLV の SAXS プロファイルを示した。どのプロファイルにもシャープなラメラピークが確認され、ゲニステインの添加によるピーク位置の変化もみられなかった。Fig. 13 は DOPC-Chol 10% MLV の SAXS プロファイルである。この系でもシャープなラメラピークが確認され、ゲニステインの影響もみられなかった。Fig. 14 に示した DOPC-Chol 30% MLV においても、シャープなラメラピークが確認でき、ゲニステインの添加による影響も見られないことがわかった。

Figs. 15, 16 に $X_G$ に対するラメラ間隔を、DPPC-Chol 二成分系 MLV と DOPC-Chol 二成分系 MLV 系に対しそれぞれ示した。それぞれのラメラ間隔の値は Table 2, 3 にもまとめている。Fig. 15 に示した DPPC-Chol 二成分系 MLV の $X_G$ -ラメラ間隔プロットから、Chol 10% MLV 以外ではゲニステインはラメラ間隔に殆ど影響を与えていないと判断される。Chol 10% MLV ではゲニステインの添加により相が均一になった。一方でコレステロールによる影響を見ると、Chol 濃度が 0~10% の間において、コレステロール添加に伴う著しいラメラ間隔の増大と相状態の変化がみられた。ラメラ間隔の小さい相は、コレステロールが存在しない DPPC MLV 系とラメラ間隔が一致するため、コ

レステロールが豊富に存在できるラメラ間隔の大きな相状態とコレステロールがより少ない状態の元の DPPC ベシクル相に近い相状態に分離したと考えられる。DPPC 二重層への少量のコレステロールの添加は、DPPC の傾斜した密な充填を乱して無秩序で傾斜のない相を形成することが報告されていることから [19, 20]、ここで確認されたラメラ間隔の増大は、アシル鎖の傾斜-非傾斜転移によるものと考えられる。Chol 濃度が 10~30%ではコレステロール添加に伴うラメラ間隔の減少がみられた。これは秩序液体相への相転移に伴う二重層の厚さの減少や、二重層間の水層の厚さの減少などが理由として考えられる。一方、Fig. 16 に示した DOPC-Chol 二成分系 MLV の  $X_G$ -ラメラ間隔プロットでは、コレステロールの有無にかかわらず、ゲニステインによるラメラ間隔への影響は見られなかった。また、コレステロールが増加するとラメラ間隔は単調増加した。これはコレステロールによって炭化水素鎖の秩序が増加し、二重層の厚さが増加したためと考えられる。ゲニステインがコレステロールと比べてラメラ間隔にほとんど影響を与えないのはその可溶化の形態によるものと考えられる。コレステロールは二重層平面に対して垂直に配向し、脂質との水素結合によらず、疎水性相互作用によって炭化水素鎖に直接影響を与える [21, 22]。一方で、ゲニステインは脂質頭部基との水素結合の形成により可溶化するため、炭化水素鎖への影響が小さい [9]。また、分子動力学シミュレーションによれば、ゲニステインは二重層平面に対して平行になるように配向することが示されている [23]。これらの炭化水素鎖への影響の違いがラメラ間隔に与える影響の違いの一因であると考えられる。

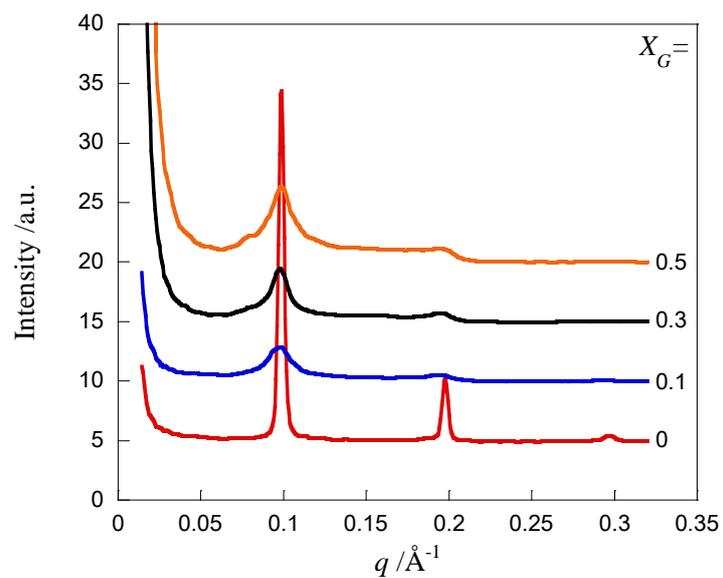


Fig. 9 DPPC-Chol 0% MLV の SAXS プロファイル

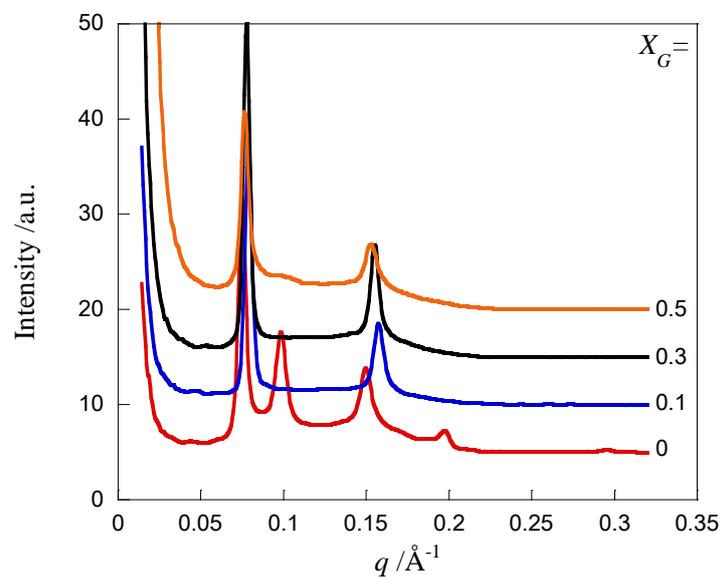


Fig. 10 DPPC-Chol 10% MLV の SAXS プロファイル

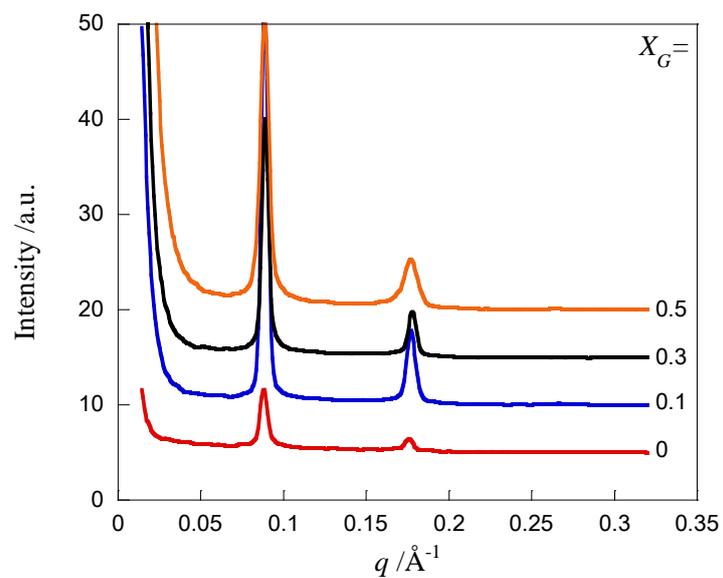


Fig. 11 DPPC-Chol 30% MLV の SAXS プロファイル

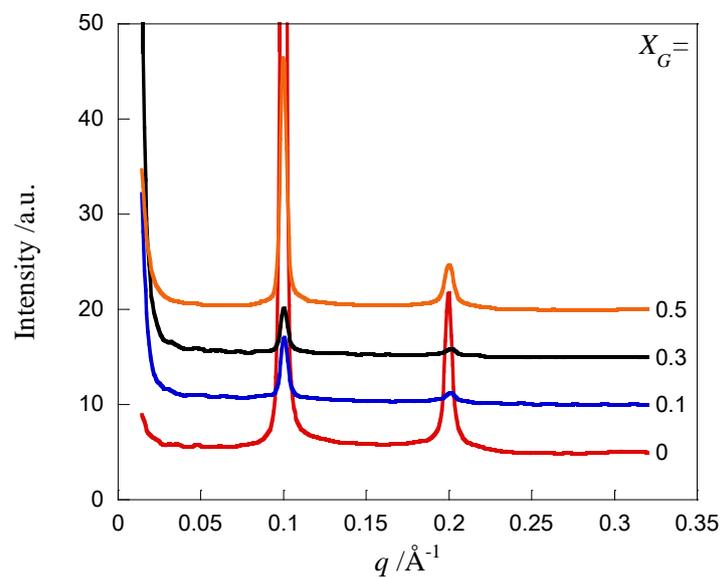


Fig. 12 DOPC-Chol 0% MLV の SAXS プロファイル

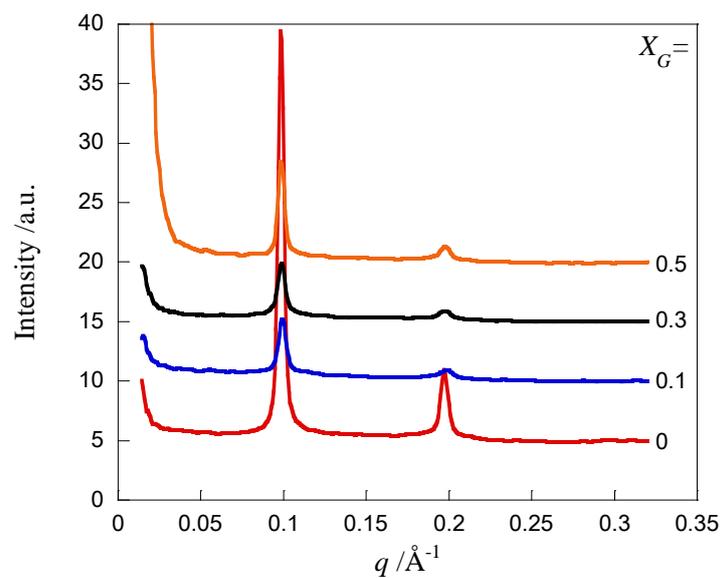


Fig. 13 DOPC-Chol 10% MLV の SAXS プロファイル

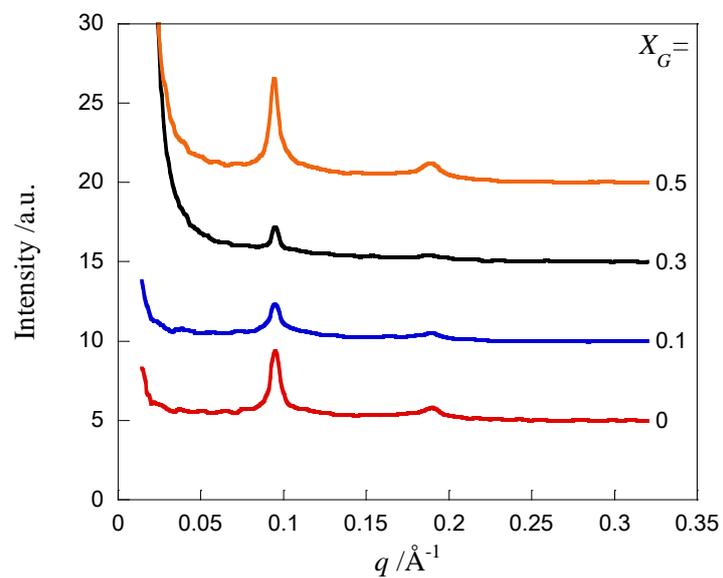


Fig. 14 DOPC-Chol 30% MLV の SAXS プロファイル

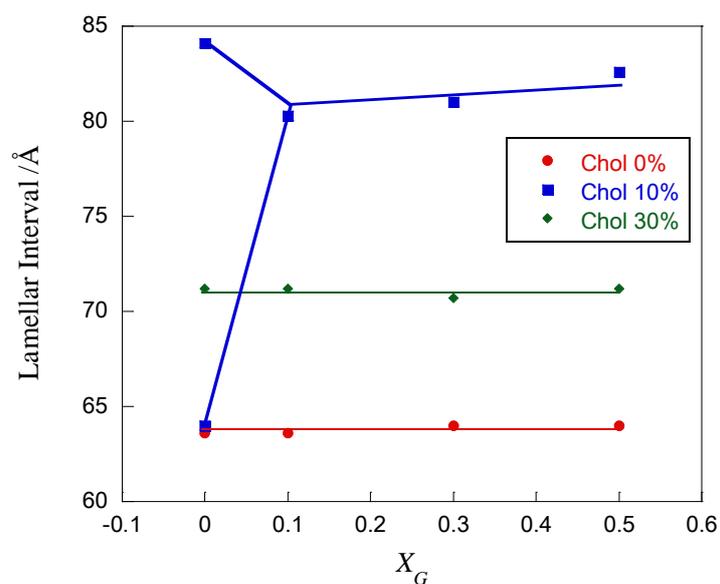


Fig. 15 DPPC-Chol 二成分 MLV 系におけるゲニステイン濃度  $X_G$  に対するラメラ間隔の変化

Table 2 DPPC-Chol-二成分 MLV 系のラメラ間隔

$X_G$	Chol 0%	Chol 10%	Chol 30%
0	63.6 Å	84.1 Å/64.0 Å	71.2 Å
0.1	63.6 Å	80.3 Å	71.2 Å
0.3	64.0 Å	81.0 Å	70.7 Å
0.5	64.0 Å	82.6 Å	71.2 Å

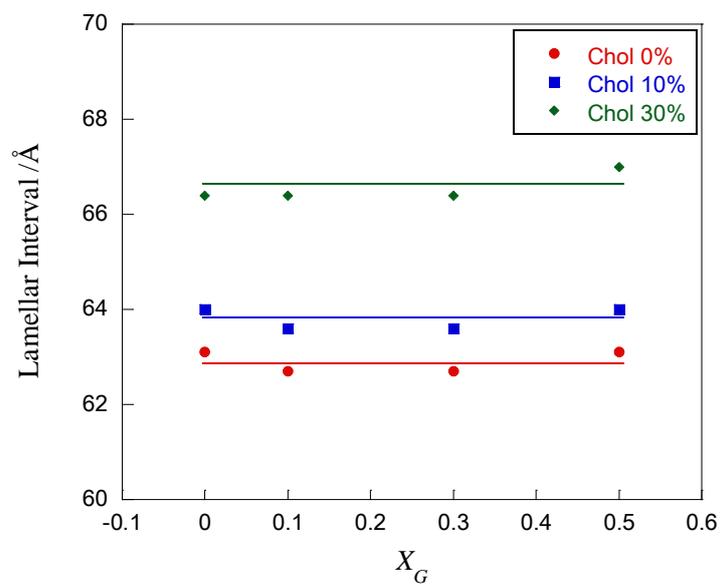


Fig. 16 DOPC-Chol 二成分 MLV 系におけるゲニステイン濃度  $X_G$  に対するラメラ間隔の変化

Table 3 DOPC-Chol 二成分 MLV 系のラメラ間隔

$X_G$	Chol 0%	Chol 10%	Chol 30%
0	63.1 Å	64.0 Å	66.4 Å
0.1	62.7 Å	63.6 Å	66.4 Å
0.3	62.7 Å	63.6 Å	66.4 Å
0.5	63.1 Å	64.0 Å	67.0 Å

### 2.3.3 抗酸化能力

Fig. 17 にゲニステインを可溶化した DPPC-SUV 系に対し、ABTS ラジカルカチオン添加 6 分後の吸収スペクトルの変化を示した。ゲニステインの濃度増加とともに ABTS ラジカルカチオン吸収スペクトルの減少がみられた。そこで各ゲニステイン濃度のサンプルに対し、波長 735 nm の吸光度を一分毎にプロットすることで、ABTS ラジカルカチオン吸光度の経過時間変化をそれぞれ Figs. 18~24 に描画した。

Fig. 18 にゲニステインを抗酸化物質として用いた際の波長 735 nm の吸光度の経時変化を示した。メタノールに溶解したゲニステイン 20  $\mu\text{L}$  を緩衝液 1980  $\mu\text{L}$  に加えて希釈液を調製した場合、ゲニステインの水への溶解度 (5.8  $\mu\text{M}$ , 303 K [24]) を超える 10  $\mu\text{M}$  においても、沈殿の形成は見られなかったことから、この系をゲニステインの単分散系として扱った。吸光度の時間変化から最初の 1 分間で大部分のゲニステインが反応し、6 分後にはほぼ平衡に達していることが予想される。

Fig. 19 にコレステロールが存在しない DPPC-Chol 0% SUV 系での吸光度の経時変化を示した。ゲニステイン単分散系と比較すると最初の 1 分間での吸光度の減少が小さかったが、6 分後にはほぼ平衡に達した。Fig. 20 には DPPC-Chol 10% SUV 系での吸光度の経時変化を示した。この系においても 6 分で平衡に達した。Fig. 21 に DPPC-Chol 30% SUV 系での吸光度の経時変化を示した。ゲニステイン濃度が 3~10  $\mu\text{M}$  での値がほとんど変化しておらず、吸光度の大小関係もゲニステイン濃度に従っていないことから、この濃度ではゲニステインの可溶化限界を超えていると考えられる。同様に Fig. 22 に DOPC-Chol 0% SUV 系、Fig. 23 に DOPC-Chol 10% SUV 系、Fig. 24 に DOPC-Chol 30% SUV 系における ABTS ラジカルカチオンの吸光度の経時変化をそれぞれ、Figs. 22~24 に示したが、これらの系ではコレステロール濃度によらずほぼ同様な結果を示した。

Figs. 18~24 で得られた吸光度変化をもとに、各媒体中のゲニステイン濃度に対して阻害度をプロットした。Fig. 25 にゲニステイン単分散系でのゲニステイン濃度-阻害度プロットを示した。阻害度が 100%に近づくと変化が直線的では無くなることから、IC 50 は 5  $\mu\text{M}$  までの値から次の近似式を用いて内挿によって求めた。

$$y = m_1 + m_2(1 - \exp(-m_3x))$$

$m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  はそれぞれフィッティングパラメーターである。特に断りのない限り、IC 50 を求める際にはこの近似式を使用した。Fig. 26 に DPPC-Chol 二成分 SUV 系でのゲニステイン濃度－阻害度プロットを示した。コレステロール濃度が 0, 10%の系では、測定範囲において 50%を超える阻害度が得られたため、内挿操作によって IC 50 を算出した。コレステロール濃度 30%の系については阻害度が 50%に到達せず、3  $\mu\text{M}$  以上で頭打ちになっていたことから、新たに 0.5  $\mu\text{M}$  のデータを加え、1  $\mu\text{M}$  以下のデータを用いた直線近似によって外挿値を使用した。Fig. 27 に DOPC-Chol 二成分 SUV 系でのゲニステイン濃度－阻害度プロットを示した。すべての系で阻害度が 50%を超えたため、内挿値から IC 50 を算出した。

求めた IC 50 と TEAC をゲニステインの抗酸化能力の指標として Table 4 に示した。単分散系におけるゲニステインの IC 50 と TEAC はそれぞれ 2.27  $\mu\text{M}$ 、4.32 であった。この抗酸化能力はアスコルビン酸(ビタミン C)の約 4 倍である (TEAC=1.05) [15]。まずコレステロールを含まないベシクル系において DPPC と DOPC 系とを比較すると、それぞれ TEAC は 4.73、2.93 であった。このことから DOPC ベシクル系では単分散系を上回る抗酸化能力を示すものの、DPPC 系ではその抗酸化能力が低下していることが分かる。単分散系ではゲニステインは自由に拡散することができるため、バルク中の ABTS ラジカルカチオンとの衝突は比較的容易であると予想される。一方でベシクルに可溶化されていえるゲニステインはそのベシクル内での拡散に留められることから、ABTS との衝突も制限されることが考えられる。その一方でベシクルは比較的疎水性の高い ABTS とゲニステインとの衝突の場を提供しているとも考えられるため、流動性の高い DOPC ベシクルに可溶化されたゲニステインは、単分散系を上回る抗酸化能力を呈することができたのではないかと考えられる。次にコレステロールの影響を検討したところ、DOPC-Chol 二成分系 SUV においてコレステロールの増加とともに TEAC が 4.73 から 4.41 へ低下した。これはコレステロールの添加によってベシクル膜の流動性が低下し、可溶化したゲニステインとバルク中の ABTS ラジカルカチオンの衝突頻度が減少したことで抗酸化能力が低下したと考えられる。同様に DPPC-Chol 二成分系 SUV と DOPC-Chol 二成分系 SUV での抗酸化能力の差も、ゲル相と液晶相の違いに伴うベシクル膜の流

動性の影響であると考えられる。DOPC 系とは異なり DPPC-Chol 二成分系 SUV ではコレステロールの増加とともに TEAC が 2.93 から 3.62 に向上した。この系で二分子膜がゲル相から秩序液体相へ変化し、流動性が増加するため、膜内に可溶化されたゲニステインの抗酸化能力の向上に影響を及ぼしたものと考えられる。

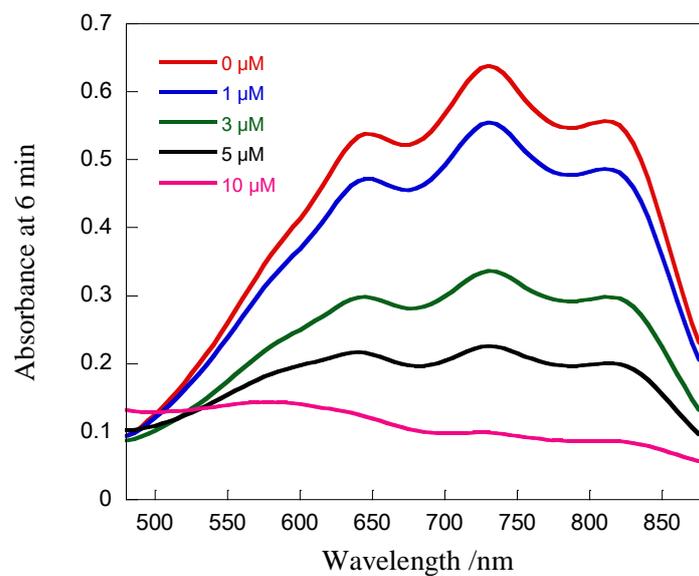


Fig. 17 DPPC-SUV 系における ABTS ラジカルカチオン吸収スペクトルの  
ゲニステイン濃度の影響

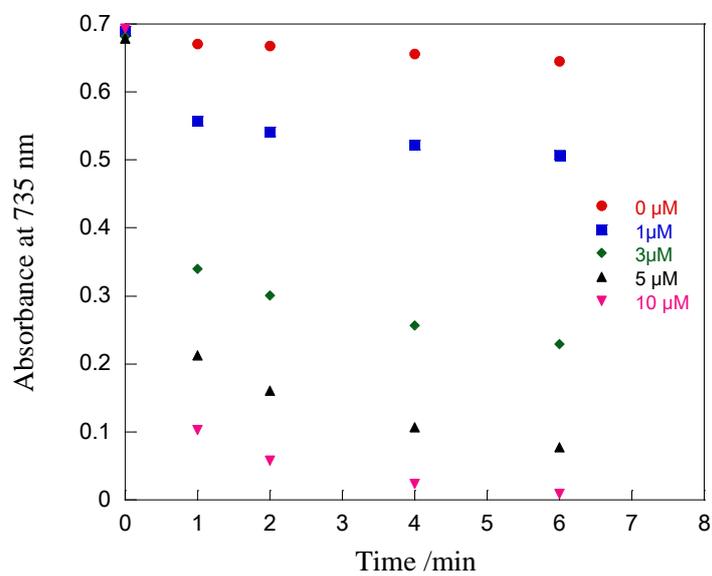


Fig. 18 ゲニステイン単分散系における波長 735nm の吸光度の経時変化

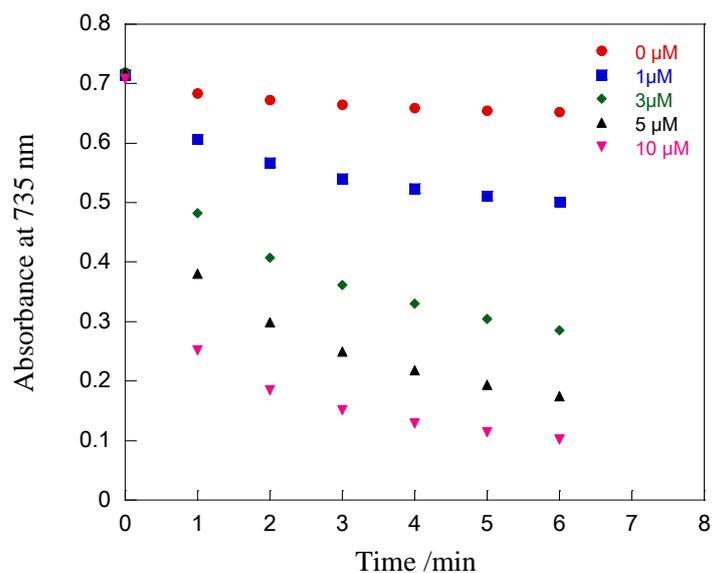


Fig. 19 DPPC-Chol 0%二成分 SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

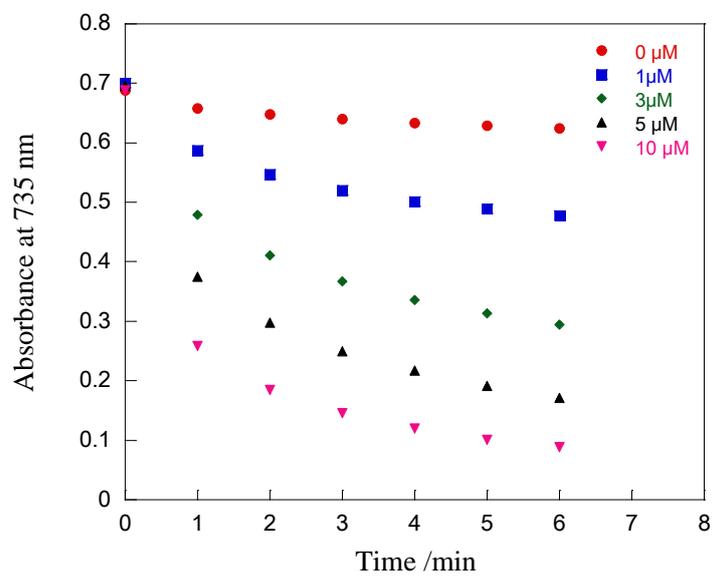


Fig. 20 DPPC-Chol 10%二成分 SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

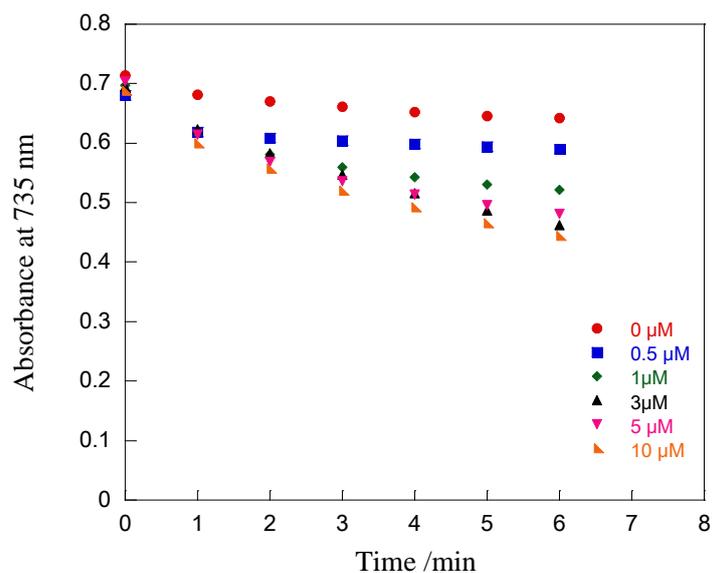


Fig. 21 DPPC-Chol 30%二成分 SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

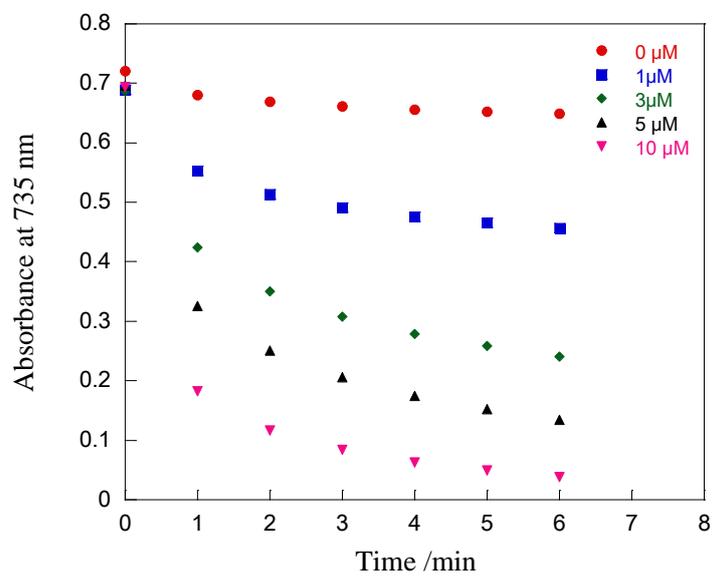


Fig. 22 DOPC-Chol 0%二成分 SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

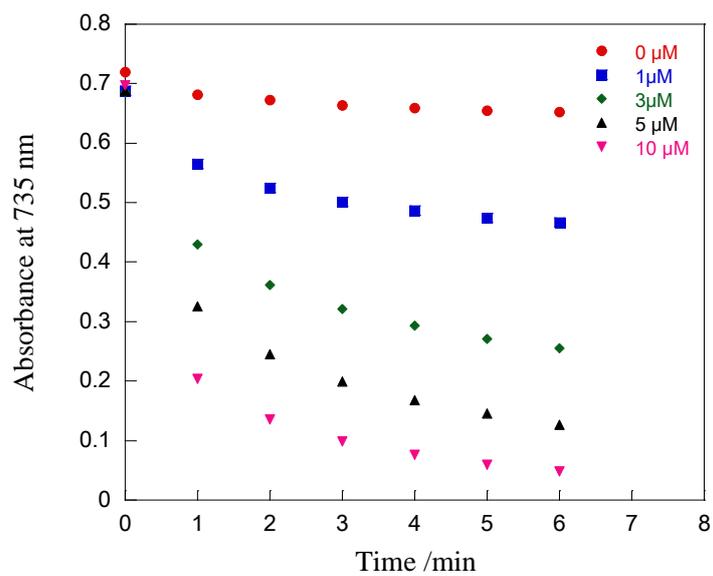


Fig. 23 DOPC-Chol 10%二成分 SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

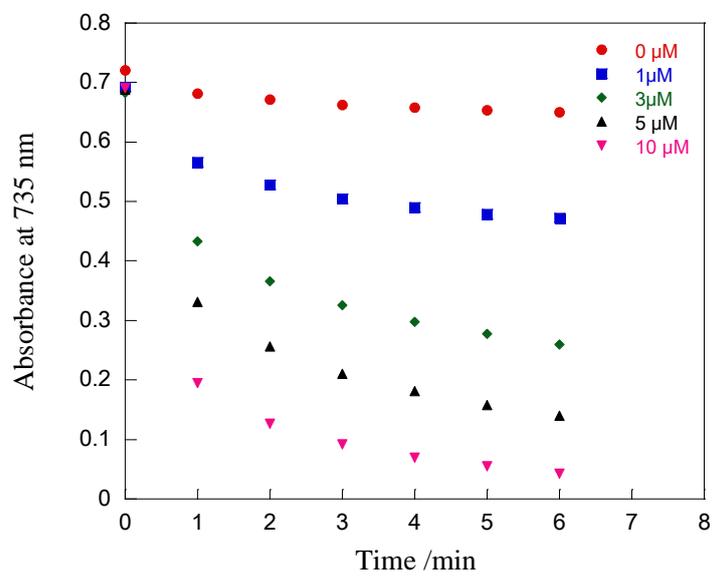


Fig. 24 DOPC-Chol 30%二成分 SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

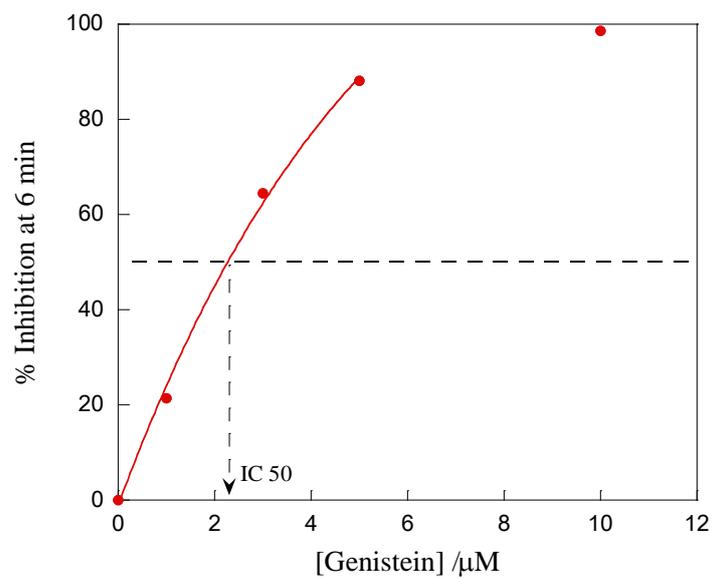


Fig. 25 ゲニステインの単独系の阻害度プロット

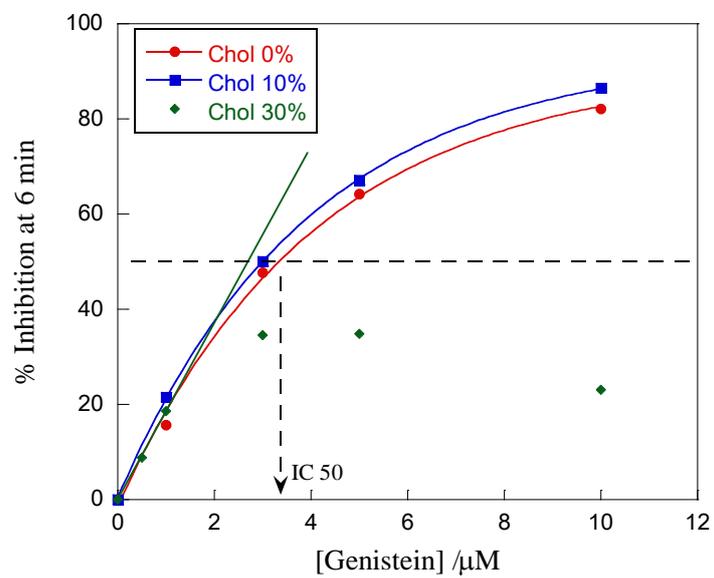


Fig. 26 DPPC-Chol 二成分 SUV 系の阻害度プロット

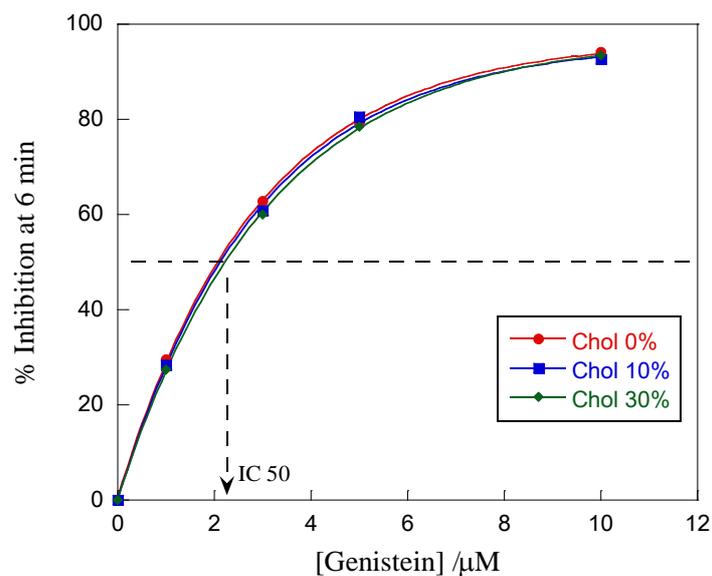


Fig. 27 DOPC-Chol 二成分 SUV 系の阻害度プロット

Table 4 各系におけるゲニステインの抗酸化能力の比較。(単位は  $\mu\text{M}$ )

	単分散系		DPPC-Chol SUV		DOPC-Chol SUV	
	IC 50	TEAC	IC 50	TEAC	IC 50	TEAC
	2.27	4.32				
Chol 0%			3.34	2.93	2.07	4.73
Chol 10%			3.00	3.27	2.12	4.62
Chol 30%			(2.71)	(3.62)	2.22	4.41

トロロックスの IC 50: 9.8  $\mu\text{M}$

## 参考文献

- [1] H. Matsuki and S. Kaneshina, "Thermodynamics of Bilayer Phase Transitions of Phospholipids," *Netsu Sokutei*, vol. 33, pp. 74-82, 2006.
- [2] T. Miyoshi, M. Lönnfors, J. P. Slotte and S. Kato, "A detailed analysis of partial molecular volumes in DPPC/cholesterol binary bilayers," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1838, pp. 3069-3077, 2014.
- [3] H. Reinl, T. Brumm and T. M. Bayerl, "Changes of the physical properties of the liquid-ordered phase with temperature in binary mixtures of DPPC with cholesterol," *Biophysical Journal*, vol. 61, pp. 1025-1035, 1992.
- [4] M. J. de Lange, M. Bonn and M. Müller, "Direct measurement of phase coexistence in DPPC/cholesterol vesicles using Raman spectroscopy," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 146, pp. 76-84, 2007.
- [5] P. R. Adhyapak, S. V. Panchal and A. V. R. Murthy, "Cholesterol induced asymmetry in DOPC bilayers probed by AFM force spectroscopy," *BBA - Biomembranes*, vol. 1860, pp. 953-959, 2018.
- [6] A. Kessel, N. Ben-Tal and S. May, "Interactions of Cholesterol with Lipid Bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations," *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 643-658, 2001.
- [7] E. Drolle, N. Kučerka, M. I. Hoopes, J. Katsaras, M. Karttunen and Z. Leonenko, "Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1828, pp. 2247-2254, 2013.
- [8] P. I. Oteiza, A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. I. Keen and C. G. Fraga, "Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface?," *Clinical & Developmental Immunology*, vol. 12, pp. 19-25, 2005.

- [9] K. Cieřilk-Boczula, J. Maniewska, G. Gryniewicz, S. Szeja, A. Koll and A. B. Hendrich, "Interaction of quercetin, genistein and its derivatives with lipid bilayers - An ATR IR-spectroscopic study," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 2012, pp. 64-69, 2012.
- [10] B. Pawlikowska-Pawłęga, L. E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron and W. I. Gruszecki, "Localization and interaction of genistein with model membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1818, pp. 1785-1793, 2012.
- [11] A. Arora, T. M. Byrem, M. G. Nair and G. M. Strasburg, "Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 373, pp. 102-109, 2000.
- [12] J. Juhasz, F. J. Sharom and J. H. Davis, "Quantitative characterization of coexisting phase in DOPC/DPPC/cholesterol mixtures: Comparing confocal fluorescence microscopy and deuterium nuclear magnetic resonance," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1788, pp. 2541-2552, 2009.
- [13] J. H. Davis, J. J. Clair and J. Juhasz, "Phase Equilibria in DOPC/DPPC-d62/Cholesterol Mixtures," *Biophysical Journal*, vol. 96, pp. 521-539, 2009.
- [14] K. Suga and H. Umakoshi, "Detection of Nanosized Ordered Domains in DOPC/DPPC and DOPC/Ch Binary Lipid Mixture Systems of Large Unilamellar Vesicles Using TEMPO Quenching Method," *Langmuir*, vol. 29, pp. 4830-4838, 2013.
- [15] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 26, pp. 1231-1237, 1999.
- [16] S. de Oliveira, G. A. de Souza, C. R. Eckert, T. A. Silva, E. S. Sobral, O. A. Fávera, M. J. P. Ferreira, P. Romoff and W. J. Baader, "Evaluation of antiradical assay used in determining the

antioxidant capacity of pure compounds and plant extract," *Quim. Nova*, vol. 37, pp. 497-503, 2014.

- [17] G. Anjani, "A Study of Encapsulation and Antioxidant Properties of Genistein in Caseinate and Liposome Systems," Kanazawa University, 2014.
- [18] M. Kuźdzał, O. Wesołowska, J. Štrancar and K. Michalak, "Fluorescence and ESR spectroscopy studies on the interaction of isoflavone genistein with biological and model membranes," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 164, pp. 283-291, 2011.
- [19] T. T. Mills, J. Huang, G. W. Feigenson and J. F. Nagle, "Effect of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers," *Gen. Physico. Biophys.*, vol. 28, pp. 126-139, 2009.
- [20] S. Lee, D.-W. Jeong and M. C. Choi, "Vertical order of DPPC multilayer enhanced by cholesterol-induced ripple-to-liquid ordered (LO) phase transition: Synchrotron X-ray reflectivity study," *Current Applied Physics*, vol. 17, pp. 392-397, 2017.
- [21] B. De Kruyff, R. A. Demel, A. J. Slotboom, L. L. M. van Deenen and A. F. Rosenthal, "The effect of the polar headgroup on the lipid-cholesterol interaction: A monolayer differential scanning calorimetry study," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 307, pp. 1-19, 1973.
- [22] S. Bhattacharya and S. Haldar, "Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1467, pp. 39-53, 2000.
- [23] M. Raghunathan, Y. Zubovski, R. M. Venable, R. W. Pastor, J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, "Structure and Elasticity of Lipid Membranes with Genistein and Daidzein Bioflavonoids Using X-ray Scattering and MD Simulations," *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, pp. 3918-3927, 2012.
- [24] J.-G. Wu, J. Ge, Y.-P. Zhang, Y. Yu and X.-Y. Zhang, "Solubility of Genistein in Water, Methanol,

Ethanol, Propan-2-ol, 1-Butanol, and Ethyl Acetate from (280 to 333) K," *J. Chem. Eng. Data*,  
vol. 55, pp. 5286-5288, 2010.

### 3. 三成分ベシクルへのゲニステインの可溶化と抗酸化能力

#### 3.1 緒言

2章では DPPC-Chol または DOPC-Chol の二成分ベシクルにゲニステインを可溶化させ、リン脂質の不飽和度による影響と、コレステロールによる影響を中心に検討したが、本章では DPPC-DOPC-Chol の三成分ベシクルにゲニステインを可溶化させた系について検討する。

DPPC への DOPC の添加は DPPC 二重層の秩序性を減少させる。T. T. Mills らは DPPC への少量の DOPC またはコレステロールの添加によって、DPPC の傾斜した密なパッキングを乱し、無秩序で傾斜のない相が形成することを報告した [1]。また、M. Kinoshita らはゲル相より低温でみられるサブゲル相について、DOPC がゲル相を不安定にして、加熱時にサブゲル相からリップルゲル相へ転移することを報告した [2]。

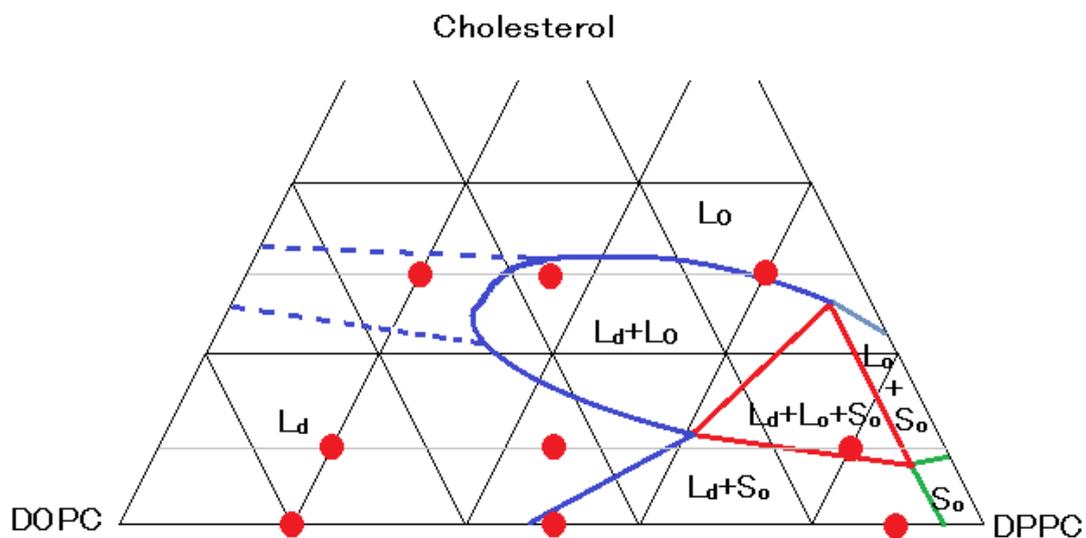
飽和リン脂質と不飽和リン脂質、コレステロールからなる三成分二重層は、細胞膜における脂質ラフトの存在から、特に秩序液体相と無秩序液体相の共存領域について研究されている。N. Bezlyepkina らは飽和リン脂質卵黄スフィンゴミエリン (eSM) と不飽和リン脂質 DOPC、コレステロールからなる三成分ベシクルにおいて、秩序液体相-無秩序液体相混合領域でのタイラインを調査した [3]。また、DPPC と DOPC、コレステロールからなる三成分二重層の相図についても複数の報告がされている [4, 5, 6]。

無秩序液体相と秩序液体相の共存系において、二重層の厚さは秩序液体相の方が増大する傾向にある。これに関して、J. V. Bleecker らは炭化水素鎖長の短い飽和リン脂質と長い不飽和リン脂質とコレステロールからなる秩序液体相-無秩序液体相においても、すべての系で二重層の厚さは秩序液体相の方が増大することを報告した [7]。また、P. Cicuta らは DPPC-DOPC-Chol のジャイアントユニラメラベシクル (GUV) において液体ドメインの拡散について調べ、粘性の高い秩序液体相では膜支配、粘性の低い無秩序液体相ではバルク支配で拡散が起きることを報告した [8]。

異なるリン脂質を含む二重層では、コレステロールとの相互作用にも差が生じる。B. de Kruijff らは、炭化水素鎖にオレオイル鎖を持つリン脂質とステアロイル鎖を持つリン脂質が共存する系では、コレステロールはオレオイル鎖を持つリン脂質と優先的に会合することから、コレステロールは液晶

相において優先的に相互作用を示すということを報告した [9]。K. J. Fritzscheingらは、DOPC-eSM-Chol および DOPC-DPPC-Chol 三成分二重層における脂質とコレステロールとの相互作用について調べ、eSM とコレステロールの間には優先的な相互作用が見られたが、DPPC とコレステロールの間にはそのような傾向が見られないことを報告している [10]。

本章では、DPPC-DOPC-Chol の組成比が異なるベシクルにゲニステインを可溶化し、コレステロールや相状態の影響について検討した。ベシクルの組成比は、報告されている DPPC-DOPC-Chol の相図 [4, 11]を参考にし、2 章で検討したコレステロール 0%、10%、30%において異なる相状態をまたぐように決定した。Scheme 1 に DPPC-DOPC-Chol 三成分系における相図を示し [4, 11]、今回検討を行ったベシクル組成を赤丸で示した。また、Table 1 に各組成比におけるベシクルの相状態をまとめた。DPPC が 20%含まれるベシクルではコレステロールが 0%、10%では無秩序液体相を形成する [4, 11]。コレステロールが 30%では K. Suga らは秩序液体相と無秩序液体相の不均一系になると報告している [11]。DPPC と DOPC を等モル含むベシクルではコレステロール無添加の系ではゲル相と無秩序液体相の混合系を形成する [4, 11]。コレステロールの組成が 10%になると無秩序液体相のみになり、更に 30%まで増加すると無秩序液体相と秩序液体相の混合系を形成する [4, 11]。DPPC に対し DOPC が 10%含まれるベシクルでは、コレステロールが含まれない場合には、ゲル相と無秩序液体相の混合系を形成する [4, 11]。コレステロールが 10%に増加するとゲル相と無秩序液体相、秩序液体相の 3 相混合系を形成する [4, 11]。コレステロールが 30%まで増加すると秩序液体相のみを形成する [4, 11]。



Scheme 1 DPPC-DOPC-Chol 三成分系における相図。実線は J. H. Davis らにより報告された境界であり [4]、破線は K. Suga らにより報告された  $L_d+L_o$  相の境界を示す [11]。3 章で使用したベシクルの組成を赤丸で示した。 $(S_o$ :ゲル相、 $L_d$ :無秩序液体相、 $L_o$ :秩序液体相)

Table 1 各組成における相状態。 $(S_o$ :ゲル相、 $L_d$ :無秩序液体相、 $L_o$ :秩序液体相)

$X_{Chol}$	$X_{DPPC} = 0.2$	$X_{DPPC} = X_{DOPC}$	$X_{DOPC} = 0.1$
0	$L_d$	$L_d + S_o$	$L_d + S_o$
0.1	$L_d$	$L_d$	$L_d + L_o + S_o$
0.3	$L_d + L_o$	$L_d + L_o$	$L_o$

### 3.2 実験手順

リン脂質ベシクルは 2 章と同様に調製した。X 線散乱測定に使用したベシクルは、最終濃度として脂質全濃度 (DPPC 濃度  $C_{DPPC}$  + DOPC 濃度  $C_{DOPC}$  + Chol 濃度  $C_{Chol}$ )  $C_L = 1.4$  mM、ゲニステイン濃度  $C_G = 0 \sim 0.7$  mM になるように調製し、 $X_G = C_G/C_L = 0 \sim 0.5$  の範囲で検討を行った。また、抗酸化能力測定に使用したベシクルは、最終濃度として  $C_L = 14$  mM、 $C_G = 0 \sim 1.0$  mM になるように調製した。総脂質濃度に占めるそれぞれの脂質の比を  $X_{DPPC} = C_{DPPC}/C_L$ 、 $X_{DOPC} = C_{DOPC}/C_L$ 、 $X_{Chol} = C_{Chol}/C_L$  とそれぞれ定義して、 $X_{DPPC} = 0.2$ 、 $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ 、 $X_{DOPC} = 0.1$  のそれぞれに対して、 $X_{Chol} = 0, 0.1, 0.3$  となるベシクルで検討を行った。選択した組成比は Scheme 1 に示した通りであり、各組成比で形成される相は Table 1 に示した。 $X_{DPPC} = 0.2$  の系において、 $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.8, X_{Chol} = 0$  および  $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.7, X_{Chol} = 0.1$  のベシクルは無秩序液体相のみを形成するが、 $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.5, X_{Chol} = 0.3$  のベシクルは無秩序液体相と秩序液体相が共存する不均一相を形成する。 $X_{DPPC} = X_{DOPC}$  の系においては、 $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5, X_{Chol} = 0$  のベシクルはゲル相と無秩序液体相が共存する相を形成するが、 $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45, X_{Chol} = 0.1$  のベシクルでは無秩序液体相のみを形成する。さらに  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35, X_{Chol} = 0.3$  のベシクルでは秩序液体相と無秩序液体相の不均一相を形成する。 $X_{DOPC} = 0.1$  の系では、 $X_{DPPC} = 0.9, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0$  のベシクルはゲル相と無秩序液体相の不均一相を形成する。さらに  $X_{DPPC} = 0.8, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.1$  のベシクルではゲル相と秩序液体相、無秩序液体相の三相が共存する。 $X_{DPPC} = 0.6, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.3$  のベシクルでは秩序液体相のみが形成される。これらの系について、WAXS 測定によって各 MLV へのゲニステインの最大可溶化量を、SAXS 測定により MLV のラメラ間隔に対する影響を測定した。また、ABTS 法によって各 SUV 系での抗酸化能力を評価した。各測定方法については 2 章に示したとおりである。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 ゲニステインの最大可溶化量

Figs. 1~3 に、 $X_{DPPC} = 0.2$  に固定して調製した MLV の WAXS プロファイルを示した。Fig. 1 は  $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.8$ ,  $X_{Chol} = 0$  における MLV の WAXS プロファイルに相当する。ゲニステイン濃度に相当する  $X_G$  の値にかかわらず、アシル鎖のブロードなピークが  $q = 1.4$  付近に確認できた。また、 $X_G \geq 0.4$  では  $q = 1$  付近と  $q = 1.8, 2.0$  付近にゲニステインの結晶由来の回折ピークが確認でき、可溶化されていない過剰なゲニステインの存在を確認した。Fig. 2 に示した  $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.7$ ,  $X_{Chol} = 0.1$  における MLV の SAXS プロファイルにおいても、 $X_G \geq 0.4$  の濃度において、同じく  $q = 1$  付近と  $q = 1.8, 2.0$  付近に過剰なゲニステイン結晶ピークが確認できる。一方でリン脂質のアシル鎖のピークはブロードであり、液晶相であることが示唆された。Fig. 3 に示した  $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.5$ ,  $X_{Chol} = 0.3$  における MLV では、 $X_G \geq 0.3$  のゲニステイン濃度においてゲニステインの析出が確認され、リン脂質のアシル鎖のピークもすべてブロードであった。

Figs. 4~6 には、DPPC と DOPC の組成比が一致する ( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ ) 条件にて調製した MLV の WAXS プロファイルを示した。Fig. 4 は、 $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5$ ,  $X_{Chol} = 0$  における MLV の WAXS プロファイルに相当する。このプロファイルにおいてリン脂質のアシル鎖間のスタッキングを示すピークは比較的尖った形状をしており、二分子膜がゲル相として存在することを示唆している。また、過剰なゲニステインの存在を示す結晶ピークは、 $X_G \geq 0.4$  の濃度において確認された。Fig. 5 に  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45$ ,  $X_{Chol} = 0.1$  における MLV の WAXS プロファイルを示した。この系ではリン脂質のアシル鎖間のピークはブロードであり、この脂質組成ではゲル相状態の消失が示唆された。ゲニステインの析出は、 $X_G \geq 0.3$  において確認された。同様に  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35$ ,  $X_{Chol} = 0.3$  における MLV の WAXS プロファイルを Fig. 6 に示した。この系でもゲニステインの析出は  $X_G \geq 0.3$  の濃度において確認された。また、Fig. 5 と同じくリン脂質のアシル鎖間のピークもブロードであった。

次に、 $X_{DOPC} = 0.1$  に固定して調製したベシクル系について検討する。Fig. 7 に  $X_{DPPC} = 0.9$ ,

$X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0$  における MLV の WAXS プロファイルを示した。リン脂質のアシル鎖間由来のピークはシャープであり、二分子膜はゲル相として存在していることが確認できる。ゲニステインの結晶ピークは、 $X_G = 0.2$  のゲニステイン濃度において  $q = 1.0$  付近に小さいながらも確認できた。Fig. 8 に示した  $X_{DPPC} = 0.8, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.1$  における MLV の WAXS プロファイルでも、シャープなリン脂質のアシル鎖間ピークが確認でき、ゲル相状態のベシクルの存在が示唆された。ゲニステインの結晶ピークは、 $X_G \geq 0.2$  の濃度において確認された。さらにコレステロール組成が増加した、 $X_{DPPC} = 0.6, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.3$  における MLV の WAXS プロファイルを Fig. 9 に示した。ゲニステインの析出を示すゲニステインの結晶由来のピークは  $X_G = 0.1$  の濃度においてすでに出現しており、この脂質組成においてはゲニステインをほとんど可溶化できていないことがわかった。リン脂質のアシル鎖間のピーク強度は強いもののブロードであることから、ベシクルはゲル相状態としては存在していないことが示唆された。

以上の結果に加え、2 章の結果を含めた DPPC-DOPC-Chol 三成分ベシクル系におけるゲニステインの可溶化量を Table 2 にまとめた。リン脂質である DPPC と DOPC の組成に関わらず、総じてコレステロールの添加によってゲニステインの可溶化量が減少する傾向にあることが示唆された。飽和リン脂質を用いたベシクル系では、ゲニステイン分子はゲニステインのヒドロキシ基とリン脂質のリン酸基との間に水素結合を形成することで安定化するため、その可溶化されたゲニステインの大部分は極性頭部基領域と極性-非極性領域に存在していることが報告されている [12, 13, 14]。飽和リン脂質系とは逆に、不飽和リン脂質を用いたベシクル系では、ゲニステインは極性基領域というよりはアシル鎖領域の疎水性コアに分配すること報告されている [15]。一方、コレステロールは炭化水素領域にインターカレートし、コレステロール分子のヒドロキシ基はリン脂質のリン酸基やエステル部位といった極性頭部基との間に水素結合を形成し、極性頭部基に近接している [16, 17, 18, 19, 20]。したがって、コレステロールとの可溶化部位の競合によってゲニステインの可溶化量が減少したと考えられる。また、リン脂質組成における DPPC の割合 ( $X_{DPPC}$ ) が増加するにつれて、ゲニステインの可溶化量は減少していた。これは DPPC の増加に伴い、ベシクルの疎水性コアにおいてゲニステインの可溶化が制限され、その結果ゲニステインの可溶化量が減少したのでは

ないかと考えられる。

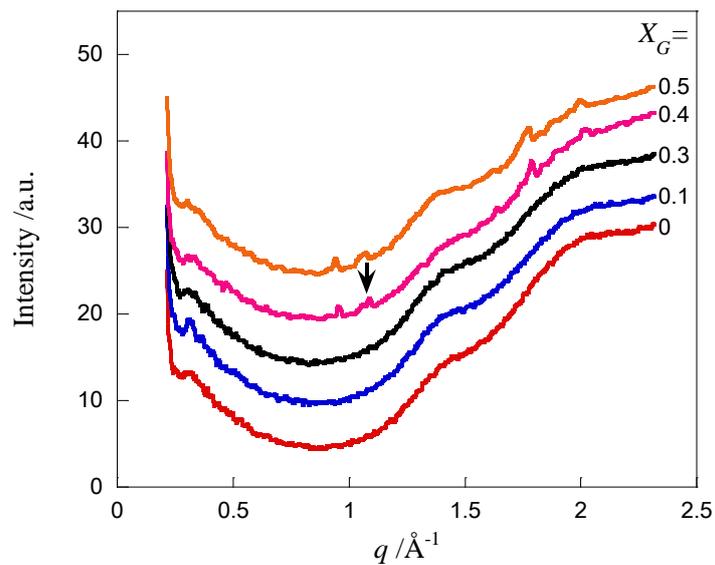


Fig. 2 MLV ( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.8, X_{chol} = 0$ ) の WAXS プロファイル

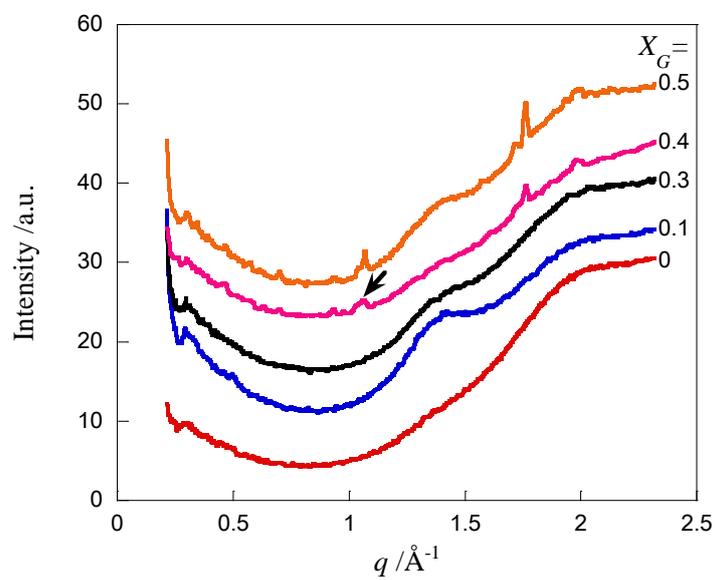


Fig. 3 MLV ( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.7, X_{chol} = 0.1$ ) の WAXS プロファイル

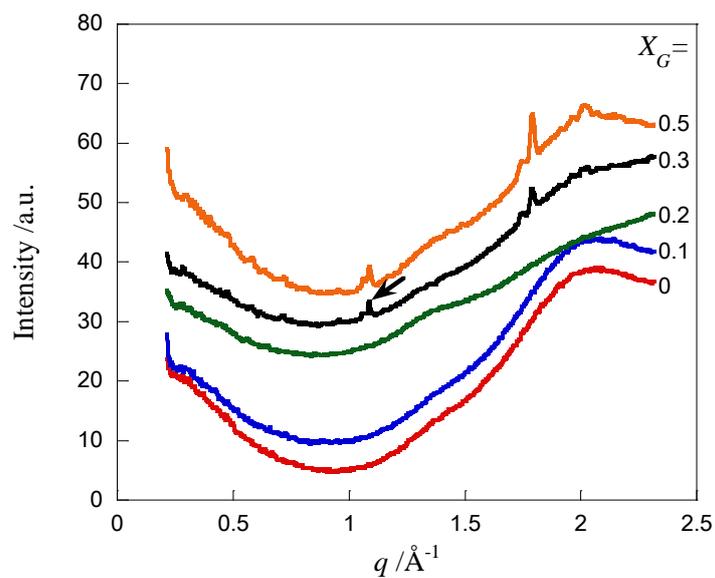


Fig. 4 MLV ( $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.5$ ,  $X_{chol} = 0.3$ ) の WAXS プロファイル

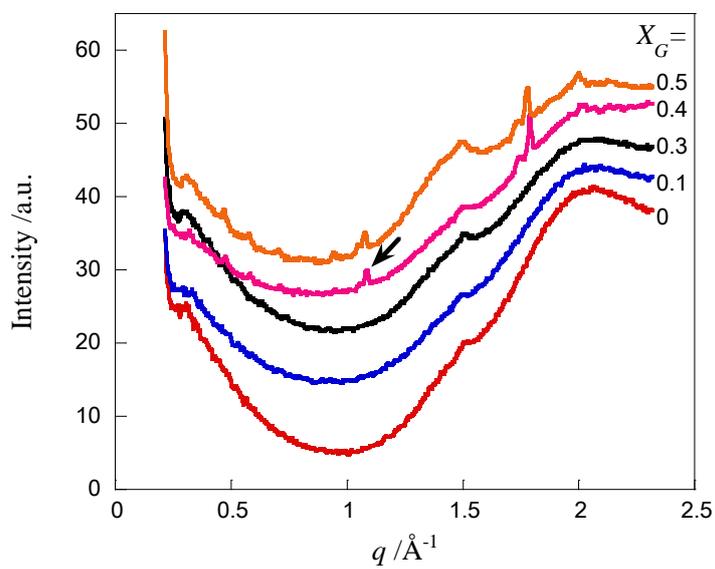


Fig. 5 MLV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5$ ,  $X_{chol} = 0$ ) の WAXS プロファイル

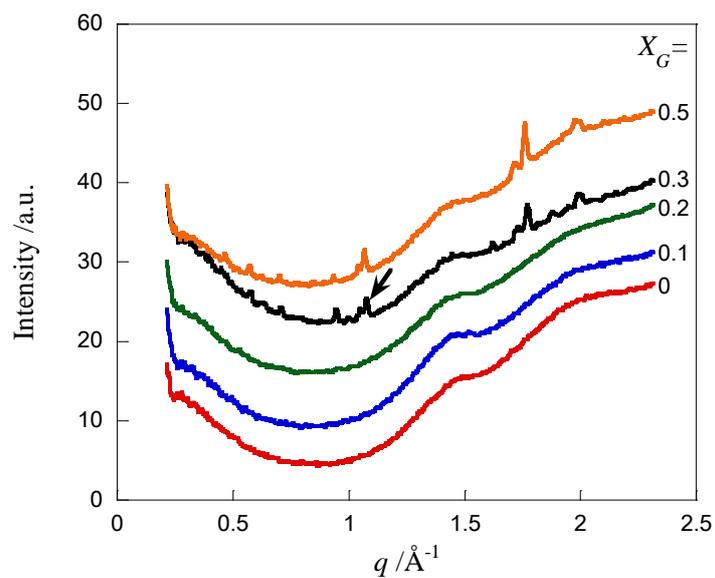


Fig. 6 MLV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45$ ,  $X_{chol} = 0.1$ ) の WAXS プロファイル

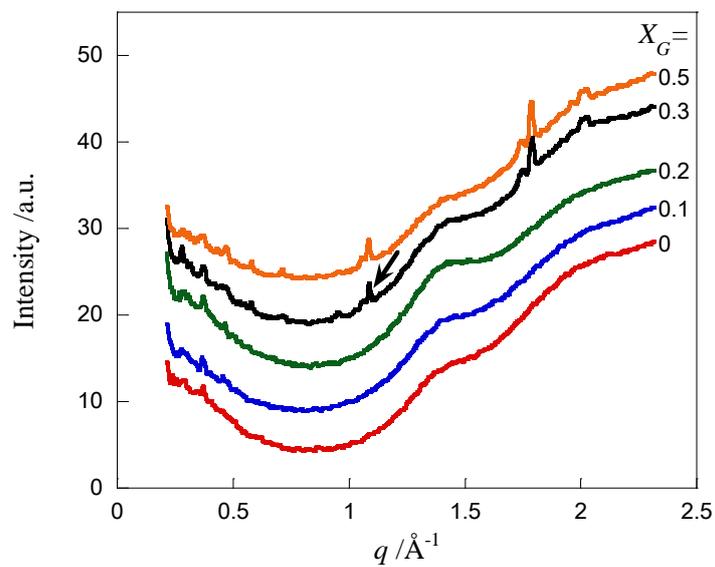


Fig. 7 MLV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35$ ,  $X_{chol} = 0.3$ ) の WAXS プロファイル

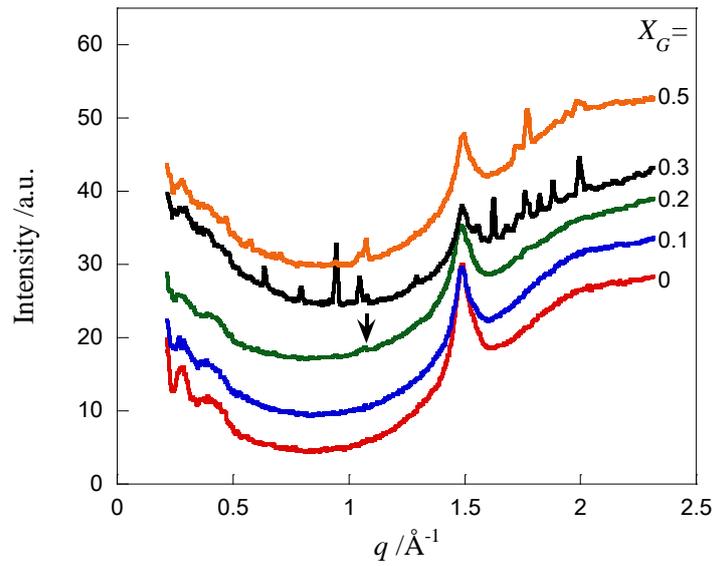


Fig. 8 MLV ( $X_{DPPC} = 0.9$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{chol} = 0$ ) の WAXS プロファイル

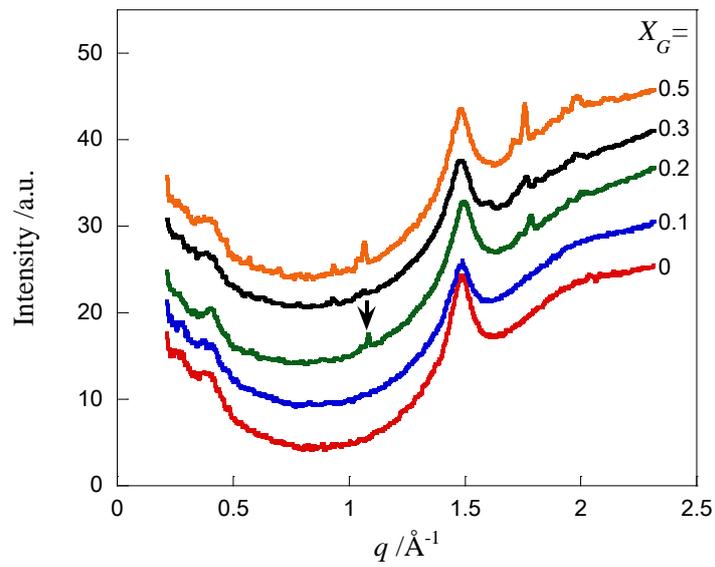


Fig. 9 MLV ( $X_{DPPC} = 0.8$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{chol} = 0.1$ ) の WAXS プロファイル

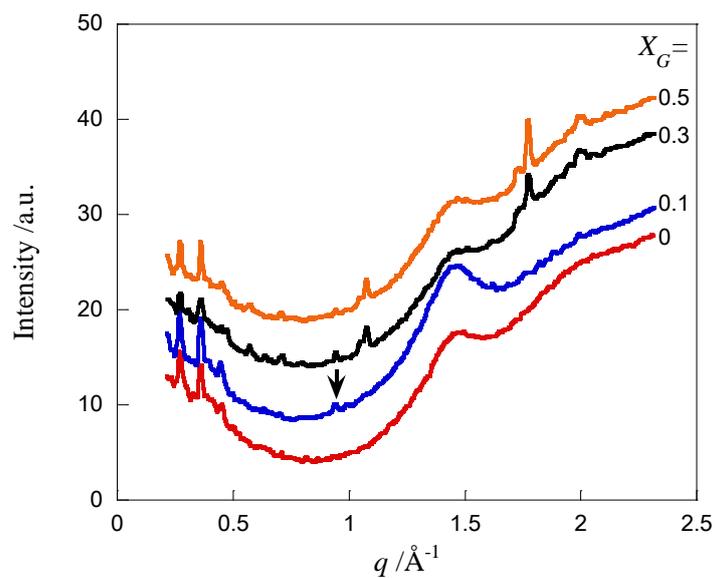


Fig. 10 MLV ( $X_{DPPC} = 0.6$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{Chol} = 0.3$ ) の WAXS プロファイル

Table 2 各 MLV へのゲニステインの可溶化量(総脂質濃度比)

$X_{Chol}$	$X_{DPPC} = 0$	$X_{DPPC} = 0.2$	$X_{DPPC} = X_{DOPC}$	$X_{DOPC} = 0.1$	$X_{DOPC} = 0$
0	~50%	~40%	~40%	~20%	~20%
0.1	~40%	~40%	~30%	~20%	~20%
0.3	~30%	~30%	~30%	~10%	~10%

### 3.3.2 MLV のラメラ間隔に対するゲニステインの効果

Figs. 10~12 に、DPPC の組成を  $X_{DPPC} = 0.2$  に固定して調製した MLV の SAXS プロファイルを示した。Fig. 10 は  $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.8$ ,  $X_{chol} = 0$  における MLV の SAXS プロファイルに相当する。ゲニステイン濃度に関わらず、第一ピークの 2 倍の散乱ベクトルの位置に第二ピークがみられることからラメラ構造の存在が確認できた。ゲニステインの添加によるピークの変化がないことから、ゲニステインの可溶化は、この MLV のラメラ間隔に影響を与えていないものと考えられる。次に Fig. 11 に  $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.7$ ,  $X_{chol} = 0.1$  における MLV の SAXS プロファイルを示した。これらのプロファイルにおいてもシャープなラメラピークが得られ、ゲニステインの添加による変化も見られなかった。同様に Fig. 12 に  $X_{DPPC} = 0.2$ ,  $X_{DOPC} = 0.5$ ,  $X_{chol} = 0.3$  における MLV の SAXS プロファイルを示した。この系においても比較的明瞭なラメラピークが各プロファイルに存在し、ゲニステインの添加によるピーク位置の変化も確認されなかった。

次に DPPC と DOPC の組成比が一致した条件 ( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ ) において調製した MLV の SAXS プロファイルを示した。Figs. 13~15 に示した。Fig. 13 に  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5$ ,  $X_{chol} = 0$  における MLV の SAXS プロファイルを示した。これらのプロファイルにもシャープなラメラピークが確認でき、ゲニステインの添加によるラメラ間隔の変化もみられなかった。同じく Fig. 14 に示した  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45$ ,  $X_{chol} = 0.1$  における MLV の SAXS プロファイルにおいても、ゲニステインの添加によるラメラの存在を示すピーク形状の変化や、ラメラ間隔の変化は見られなかった。  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35$ ,  $X_{chol} = 0.3$  における MLV の SAXS プロファイルを示した。この系でもラメラピークが確認されたが、ゲニステインの添加によって第一ピークの幅が若干広がり、第二ピークの広角側に新たなピークを確認することができた。

Figs. 16~18 に DOPC の組成を  $X_{DOPC} = 0.1$  に固定して調製した MLV の SAXS プロファイルを示した。Fig. 16 は  $X_{DPPC} = 0.9$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{chol} = 0$  における MLV の SAXS プロファイルである。この系ではシャープなラメラピークが見られず、ゲニステインを添加してもピーク形状に大きな変化はなかったが、ピークの位置が広角側にシフトする傾向にあることがわかった。少量の DOPC が添加された DPPC ベシクル二重層はリップルゲル相を示すと報告されていることから [2]、この脂

質組成におけるベシクル二分子層はリップルゲル相状態として存在していることが考えられる。Fig. 17には、 $X_{DPPC} = 0.8$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{Chol} = 0.1$  における MLV の SAXS プロファイルを示している。ゲニステインが可溶化されていないベシクルにおいて、第一ピークの右側  $q = 0.1$  付近に小さなショルダーが見られることから、ベシクル膜が二相共存状態にあることが示唆される。一方でゲニステインを添加すると若干のピークシフトが見られることから、ラメラ間隔が減少する傾向にあることがわかる。Fig. 18 に示した  $X_{DPPC} = 0.6$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{Chol} = 0.3$  における MLV の SAXS プロファイルでは、一種類のシャープなラメラピークのみが確認でき、ゲニステインの添加によってラメラ間隔は殆ど影響を受けないものと考えられる。

Figs. 19~21 に、各脂質組成における MLV のラメラ間隔とゲニステインの添加による変化をまとめた。Fig. 19 に示した DPPC 組成を  $X_{DPPC} = 0.2$  に固定した MLV のラメラ間隔の変化を見ると、この系においてゲニステインの可溶化はラメラ間隔にほとんど影響を与えていないことがわかる。一方でコレステロール組成  $X_{Chol}$  の増加に対しては、ベシクルのラメラ間隔が単調的に増加する傾向にあることがわかった。Fig. 20 には DPPC と DOPC の組成を固定した条件 ( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ ) で調製した MLV のラメラ間隔の変化を示している。コレステロール組成  $X_{Chol} = 0, 0.1$  の条件ではゲニステインの可溶化はラメラ間隔に影響を与えていないが、 $X_{Chol} = 0.3$  までコレステロール組成が増加するとゲニステインの添加によりベシクル膜の相分離が誘発され、そのラメラ間隔はそれぞれ  $X_{Chol} = 0, 0.1$  でのラメラ間隔に類似していることがわかる。Fig. 21 は DOPC 組成を  $X_{DOPC} = 0.1$  に固定した MLV のラメラ間隔の変化を示している。コレステロールが存在しない場合 ( $X_{Chol} = 0$ ) では、複数のラメラを示しているものと考えられる各面間隔は、どれもゲニステインの添加に伴って減少傾向にあった。最も大きな間隔のラメラに着目すると、コレステロールの増加に伴ってラメラ間隔がより顕著に減少していた。これはコレステロールの添加によって DPPC アシル鎖のゴーシュ配座の増加に伴い、ベシクル膜自体の厚みが減少したのではないかと考えられる。また、秩序液体相形成による脱水もラメラ間隔の減少に寄与している可能性がある [11]。

このようにベシクル膜のラメラ間隔はコレステロール組成に対し影響を受けやすい傾向にあることから、各コレステロール組成  $X_{Chol}$  に対し Table 3 から 5 に測定したすべての系のラメラ間隔をそれ

それぞれまとめた。Table 3 は  $X_{chol} = 0$  における結果をまとめているが、この系においてゲニステインの可溶化によってラメラ間隔が影響をうけているのは、DPPC に僅かな DOPC が存在する  $X_{DOPC} = 0.1$  の系列のみであり、その他の系列では大きな影響を受けることはないと考えられる。 $X_{chol} = 0.1$  の結果 (Table 4) からは、同じく DPPC に組成が偏っている、 $X_{DOPC} = 0, 0.1$  の 2 つの系列においてラメラ間隔に対しゲニステインの可溶化の影響がみられた。更に Table 5 に示した  $X_{chol} = 0.3$  の結果を見ると、DPPC と DOPC の組成が等しい、 $X_{DPPC} = X_{DOPC}$  の系列のみにおいてゲニステインの可溶化の影響が確認できる。ゲニステインの可溶化によるベシクルのラメラ間隔の変化は、Scheme 1 に示した相図において相境界に近い組成で見られた。そのため、ゲニステインは単なる可溶化物ではなくベシクルの構成要素として寄与し、相図の境界線を変動させていると考えられる。

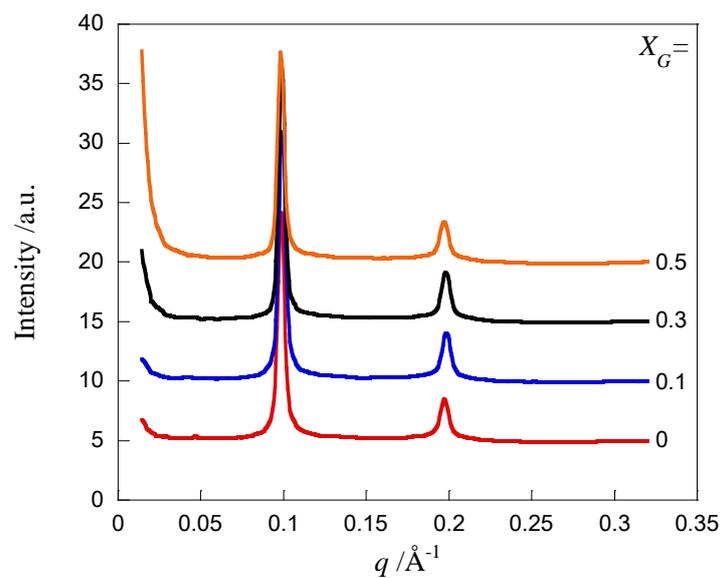


Fig. 11 MLV ( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.8, X_{chol} = 0$ ) の SAXS プロファイル

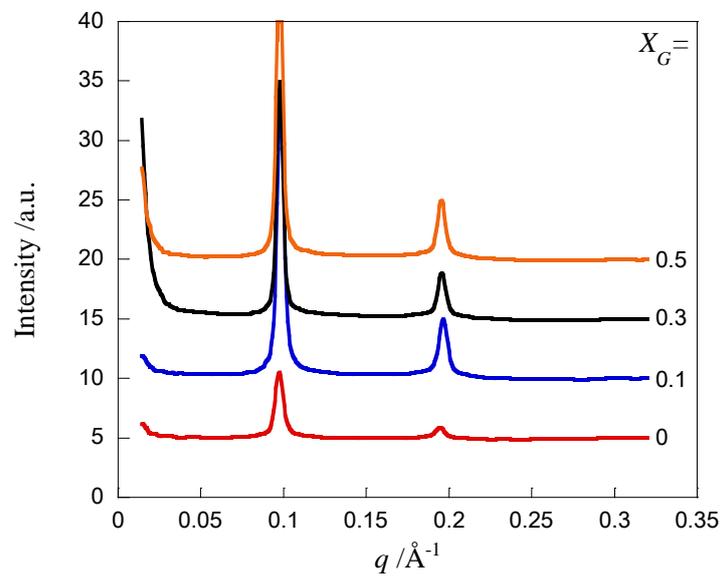


Fig. 12 MLV ( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.7, X_{chol} = 0.1$ ) の SAXS プロファイル

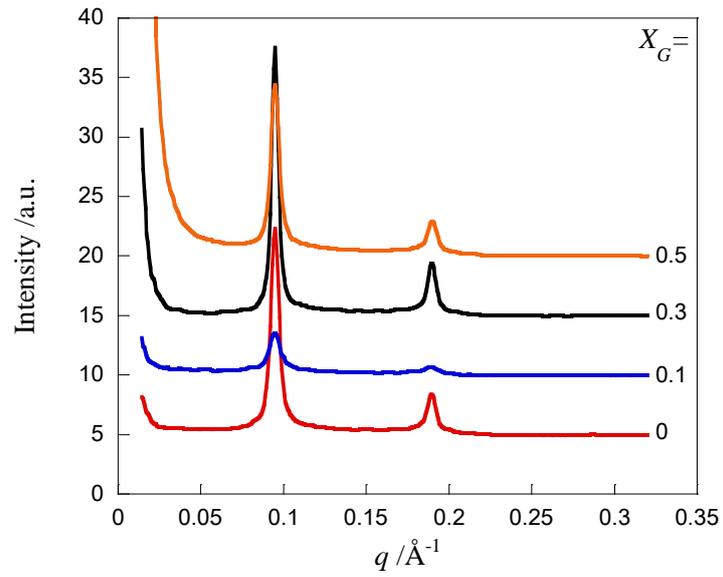


Fig. 13 MLV ( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.5, X_{Chol} = 0.3$ ) の SAXS プロファイル

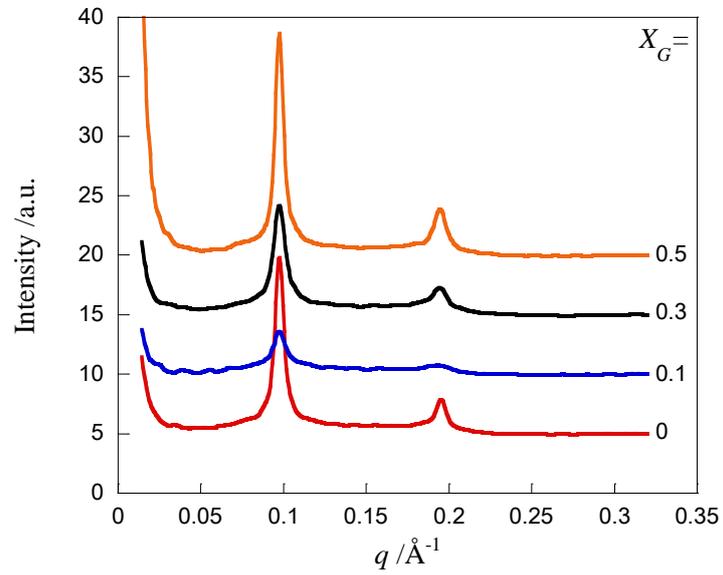


Fig. 14 MLV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5, X_{Chol} = 0$ ) の SAXS プロファイル

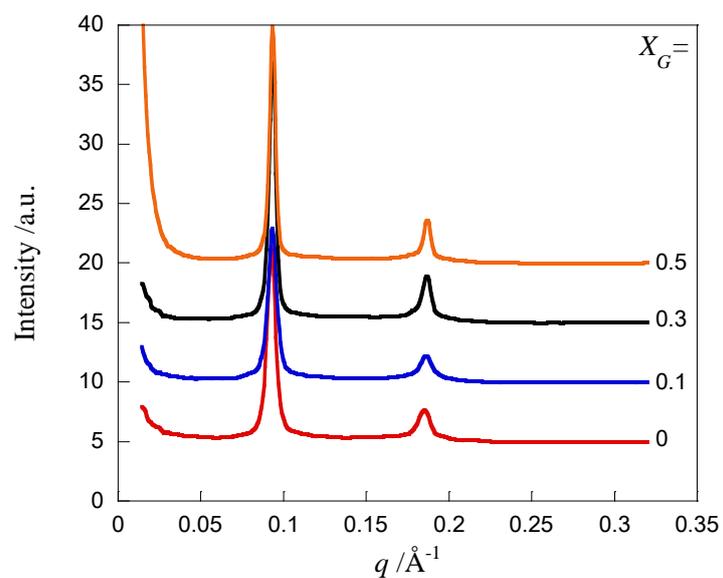


Fig. 15 MLV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45$ ,  $X_{Chol} = 0.1$ ) の SAXS プロファイル

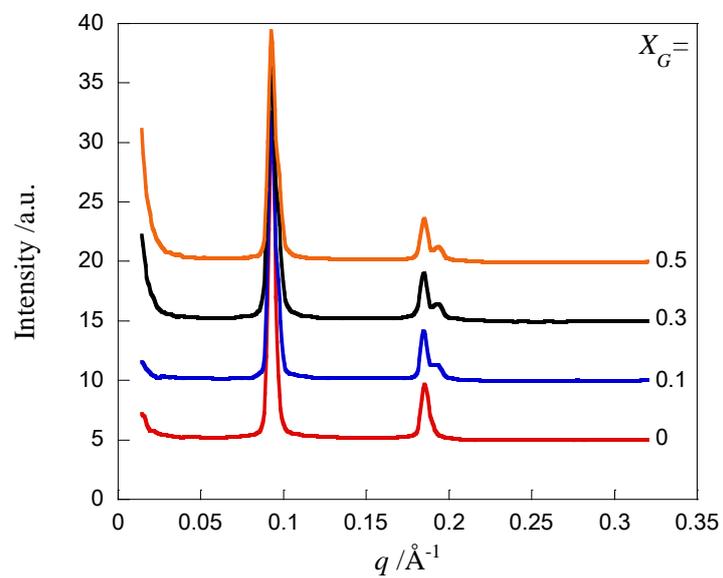


Fig. 16 MLV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35$ ,  $X_{Chol} = 0.3$ ) の SAXS プロファイル

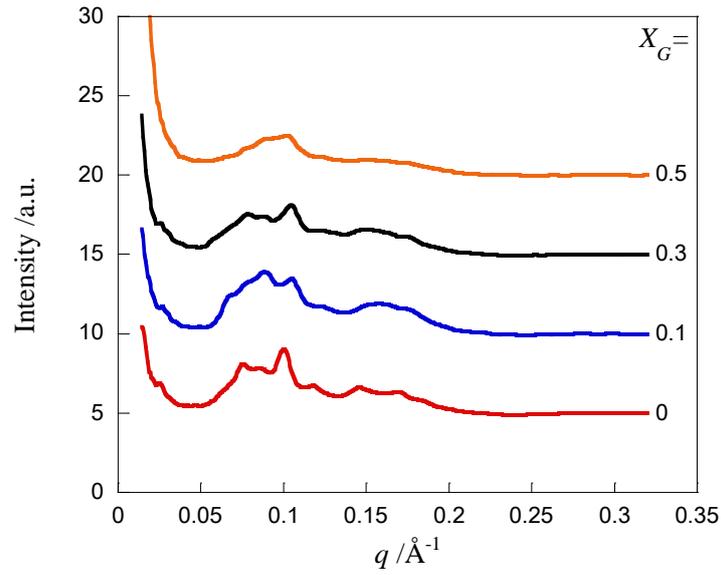


Fig. 17 MLV ( $X_{DPPC} = 0.9$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{Chol} = 0$ ) の SAXS プロファイル

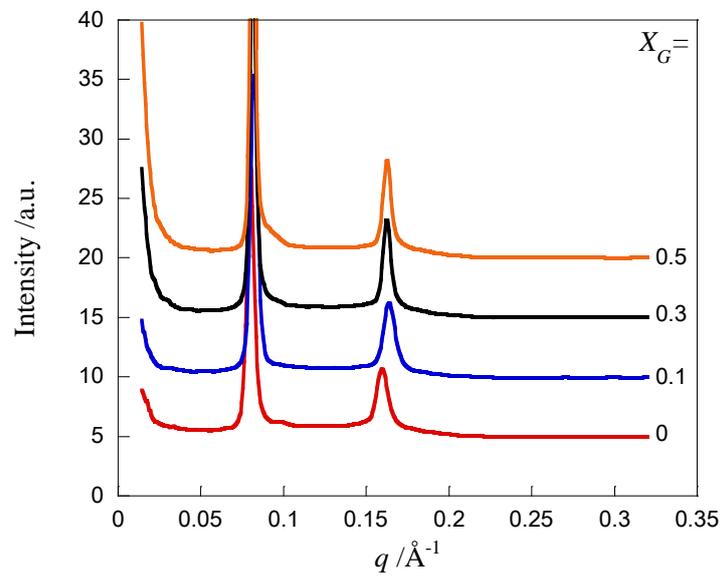


Fig. 18 MLV ( $X_{DPPC} = 0.8$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{Chol} = 0.1$ ) の SAXS プロファイル

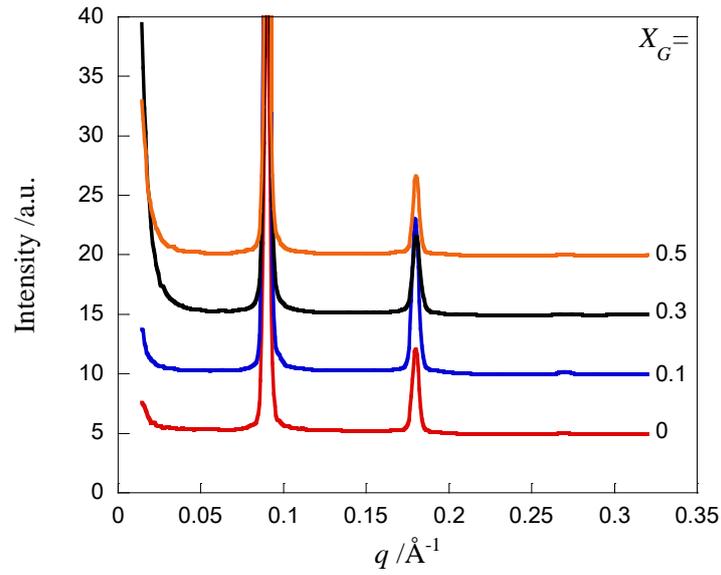


Fig. 19 MLV ( $X_{DPPC} = 0.6$ ,  $X_{DOPC} = 0.1$ ,  $X_{chol} = 0.3$ ) の SAXS プロファイル

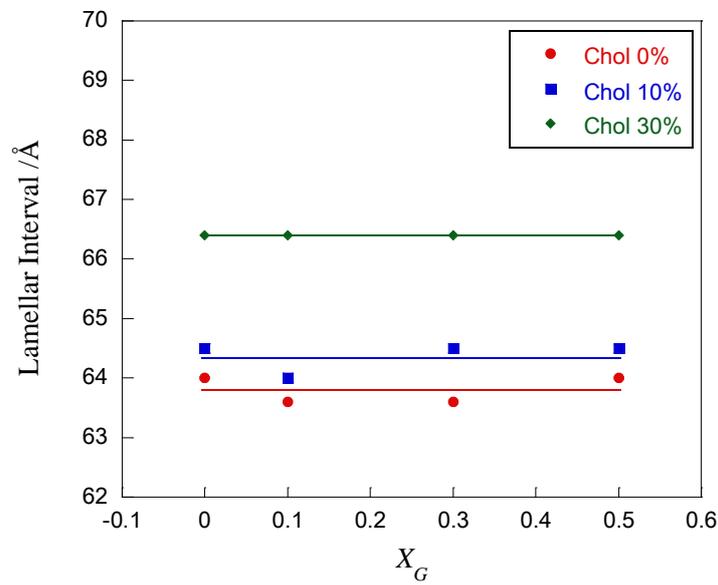


Fig. 20  $X_{DPPC} = 0.2$  における MLV ラメラ間隔に対するゲニステイン濃度の影響

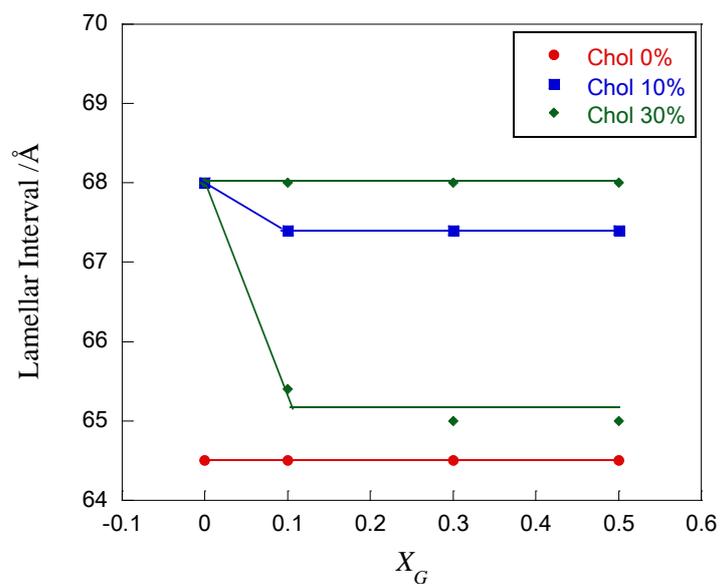


Fig. 21  $X_{DPPC} = X_{DOPC}$  における MLV ラメラ間隔に対するゲニステイン濃度の影響

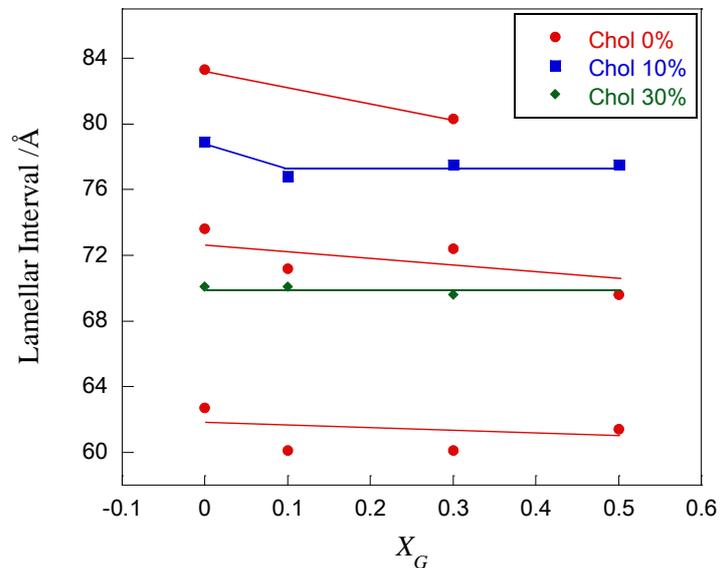


Fig. 22  $X_{DOPC} = 0.1$  における MLV ラメラ間隔に対するゲニステイン濃度の影響

**Table 3 MLV ( $X_{Chol} = 0$ ) のラメラ間隔(Å)**

$X_G$	$X_{DPPC} = 0$	$X_{DPPC} = 0.2$	$X_{DPPC} = X_{DOPC}$	$X_{DOPC} = 0.1$	$X_{DOPC} = 0$
0	63.1	64.0	64.5	83.3/73.6/62.7	63.6
0.1	62.7	63.6	64.5	-/71.2/60.1	63.6
0.3	62.7	63.6	64.5	80.3/72.4/60.1	64.0
0.5	63.1	64.0	64.5	-/69.6/61.4	64.0

**Table 4 MLV ( $X_{Chol} = 0.1$ ) のラメラ間隔(Å)**

$X_G$	$X_{DPPC} = 0$	$X_{DPPC} = 0.2$	$X_{DPPC} = X_{DOPC}$	$X_{DOPC} = 0.1$	$X_{DOPC} = 0$
0	64.0	64.5	68.0	78.9	84.1 / 64.0
0.1	63.6	64.0	67.4	76.8	80.3
0.3	63.6	64.5	67.4	77.5	81.0
0.5	64.0	64.5	67.4	77.5	82.6

**Table 5 MLV ( $X_{Chol} = 0.3$ ) のラメラ間隔(Å)**

$X_G$	$X_{DPPC} = 0$	$X_{DPPC} = 0.2$	$X_{DPPC} = X_{DOPC}$	$X_{DOPC} = 0.1$	$X_{DOPC} = 0$
0	66.4	66.4	68.0	70.1	71.2
0.1	66.4	66.4	68.0/65.4	70.1	71.2
0.3	66.4	66.4	68.0/65.0	69.6	70.7
0.5	67.0	66.4	68.0/65.0	69.6	71.2

### 3.3.3 抗酸化能力

ABTS ラジカルカチオンの吸光度をさまざまなゲニステイン濃度で調製した各ベシクル系において測定することで、各ゲニステイン濃度におけるラジカル阻害度を算出した。Fig. 22 に  $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.8, X_{Chol} = 0$  の SUV 系での吸光度の経時変化を示した。最初の 1 分間で反応が急速に進み、6 分後にはほぼ平衡に達した。Fig. 23 に示した  $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.7, X_{Chol} = 0.1$  の SUV 系および Fig. 24 に示した  $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.5, X_{Chol} = 0.3$  の SUV 系においても、最初の 1 分間の吸光度の急激な減少が起きた後、6 分後にはほぼ平衡に達した。同様に Fig. 25 に  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5, X_{Chol} = 0$  SUV 系、Fig. 26 に  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45, X_{Chol} = 0.1$  SUV 系、Fig. 27 に  $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35, X_{Chol} = 0.3$  SUV 系における ABTS ラジカルカチオンの吸光度の経時変化をそれぞれ、Figs. 25~27 に示したが、これらの系でもコレステロール濃度によらずほぼ同様な結果を示した。Figs. 28~30 に  $X_{DOPC} = 0.1$  の SUV 系の ABTS ラジカルカチオンの吸光度の経時変化を示し、Fig. 28 には  $X_{DPPC} = 0.9, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0$  の SUV 系、Fig. 29 には  $X_{DPPC} = 0.8, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.1$  の SUV 系の吸光度変化をそれぞれ示した。これらの系においてもゲニステインの濃度増加に伴って吸光度が大きく減少し、6 分後にはほぼ平衡に達した。一方で Fig. 30 に示した  $X_{DPPC} = 0.6, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.3$  の SUV 系の吸光度の経時変化では、ゲニステイン濃度が 5, 10  $\mu\text{M}$  における値がほとんど変化していないため、この濃度ではゲニステインの可溶化限界を超えていると考えられる。

Figs. 22~30 で得られた吸光度変化をもとに、各媒体中のゲニステイン濃度に対して阻害度をプロットした。まず Fig. 31 に DPPC 組成を  $X_{DPPC} = 0.2$  に固定した SUV 系におけるゲニステイン濃度 vs 阻害度プロットを示した。ゲニステイン濃度の増加につれ、すべての系において阻害度は 100% 近くまで到達した。IC 50 はすべてのデータを用いた回帰曲線の内挿操作によって求めた。Fig. 32 に DPPC と DOPC の組成が等しい ( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ ) SUV 系におけるゲニステイン濃度 vs 阻害度プロットを示した。Fig. 31 と同様にすべての系において、ゲニステイン濃度の上昇とともに阻害度は 100% 近くまで到達したことから、IC 50 はすべてのデータからの内挿操作によって求めた。Fig. 33 には DOPC 組成を  $X_{DOPC} = 0.1$  の固定した SUV 系のゲニステイン濃度 vs 阻害度プロット

トを示している。この系統ではコレステロール組成  $X_{Chol} = 0.3$  の場合を除いて、ゲニステイン濃度の上昇につれ阻害度が 100% 近くまで到達した。コレステロール組成  $X_{Chol} = 0.3$  では WAXS 測定から得られた溶解度の結果より予測されたように、ゲニステイン濃度が 10  $\mu\text{M}$  に到達するまでに可溶化限界に到達することから、阻害度が頭打ちとなった。よって IC 50 は  $X_{Chol} = 0.3$  の系以外ではすべての測定データの内挿値から、 $X_{Chol} = 0.3$  の系では 5  $\mu\text{M}$  以下の測定データの内挿値からそれぞれ求めた。

このようにして決定された各系において可溶化されたゲニステインの IC 50 と TEAC を Table 6 に示した。DPPC 組成を  $X_{DPPC} = 0.2$  に固定した系列では、抗酸化能力はコレステロールの増加とともに減少した。同様の傾向は DOPC 組成を  $X_{DOPC} = 0.1$  に固定した系列においてもみられたが、その減少傾向は DOPC 組成を  $X_{DOPC} = 0.1$  に固定した系列の方がより大きかった。一方で DPPC と DOPC の組成が等しい  $X_{DPPC} = X_{DOPC}$  の系列では、コレステロール組成  $X_{Chol} = 0 \sim 0.1$  範囲では抗酸化能力が減少したが、コレステロール組成  $X_{Chol} = 0.1 \sim 0.3$  の間では逆に抗酸化能力が向上した。コレステロール組成  $X_{Chol} = 0.3$  の系は SAXS 測定でゲニステインによるベシクル膜の相分離が確認された系であることから、この抗酸化能力の向上は2種類の相状態が共存することによる影響であると予想される。さらに 2 章で検討したリン脂質-コレステロール二成分系の結果を含めた各ベシクル系におけるゲニステインの TEAC を Table 7 にまとめた。DOPC の割合の多い  $X_{DPPC} = 0, 0.2$  ではコレステロールの増加による抗酸化能力の低下がみられたものの、それでもメタノールに溶解したゲニステイン系よりも高い抗酸化能力を示した。これらの系は液体無秩序相状態にあることからゲニステインは流動性が高い環境下に可溶化しており、可溶化したゲニステインとバルク中の ABTS ラジカルカチオンの接近が容易であるため、ゲニステインの抗酸化能力の向上に寄与したものと考えられる。一方で DPPC の割合の多い  $X_{DOPC} = 0.1$  では、コレステロールが存在しない  $X_{Chol} = 0$  の系では、メタノールに溶解したゲニステインや DPPC および DOPC 単独系ベシクルに可溶化されたゲニステインよりも抗酸化能力は向上していた。しかしながら更にコレステロールの割合を上げていくとその抗酸化能力は低下し、コレステロール組成  $X_{Chol} = 0.3$  ではメタノールに溶解したゲニステインや DOPC 単独系ベシクルに可溶化されたゲニステインよりも低くなっ

た。 $X_{DOPC} = 0.1$ の系列では $X_{Chol}$ の増加に伴って無秩序液体相状態の中に秩序液体相状態が形成されていき、 $X_{Chol} = 0.3$ では秩序液体相のみになっていると考えられる [5]。したがって、無秩序液体相よりも流動性の低下した秩序液体相に可溶化したゲニステインは、その抗酸化能力が低下したと考えられる。DPPC と DOPC の組成が等しい系列( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ )では、コレステロールが存在しない $X_{Chol} = 0$ においてゲル相と液体無秩序相が共存しているが、コレステロール組成 $X_{Chol} = 0.1$ では液体無秩序相の単独相に転移し、コレステロール組成 $X_{Chol} = 0.3$ では無秩序液体相と秩序液体相がそれぞれ共存していると考えられる [5]。相状態の異なる2種類のベシクル膜の相境界は、3次元の界面領域と同様に分子の吸着が促進されることから [21]、ゲニステイン分子もこのような相境界に優先的に可溶化することでその抗酸化能力の高さに寄与しているのではないかと考えられる。最後に $X_{DPPC} = 0$ と $X_{DPPC} = 0.2$ の系列を比較すると、総じてリン脂質混合系である $X_{DPPC} = 0.2$ の系列のベシクルに可溶化されたゲニステインの抗酸化能力の方が高いことがわかる。これらの系列では二相共存状態の有無による違いはないものの、単純に異種のリン脂質が隣接していることがゲニステインの抗酸化能力を高める要因であるのではないかと考えられる。

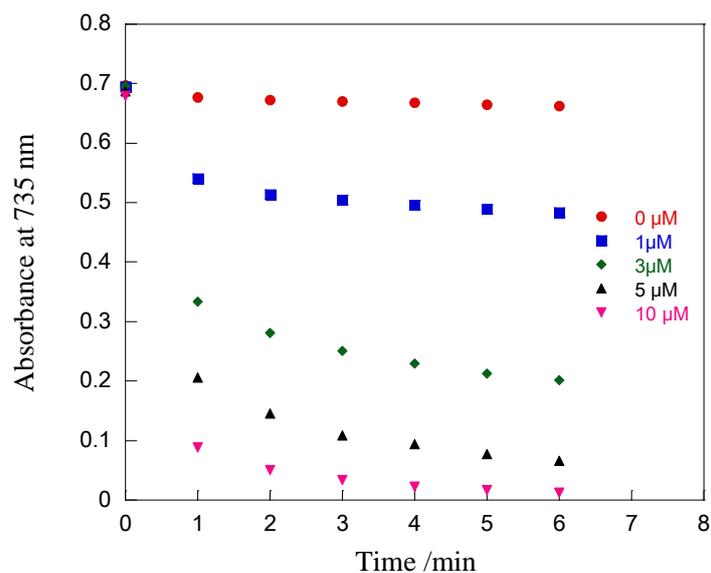


Fig. 22 三成分( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.8, X_{chol} = 0$ ) SUV系における  
波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

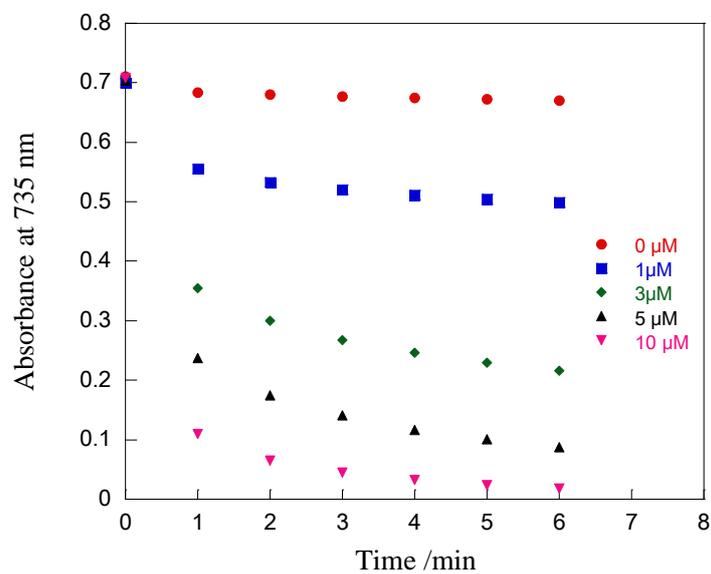


Fig. 23 三成分( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.7, X_{chol} = 0.1$ ) SUV系における  
波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

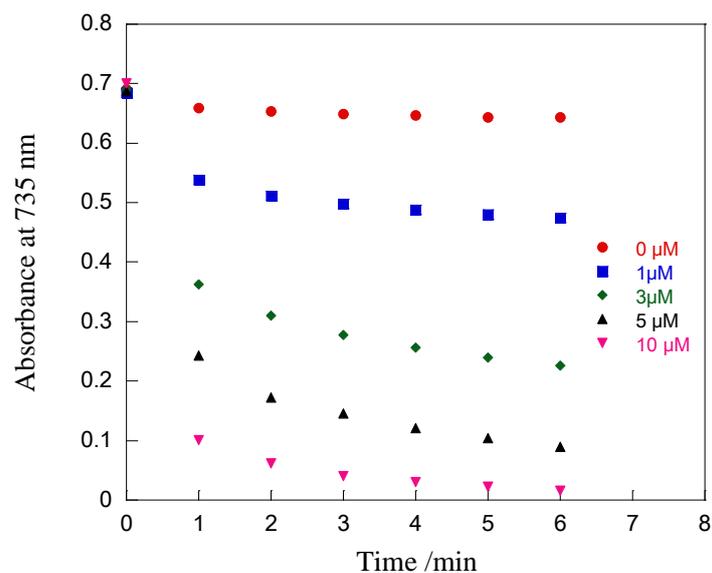


Fig. 24 三成分( $X_{DPPC} = 0.2, X_{DOPC} = 0.5, X_{chol} = 0.3$ ) SUV系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

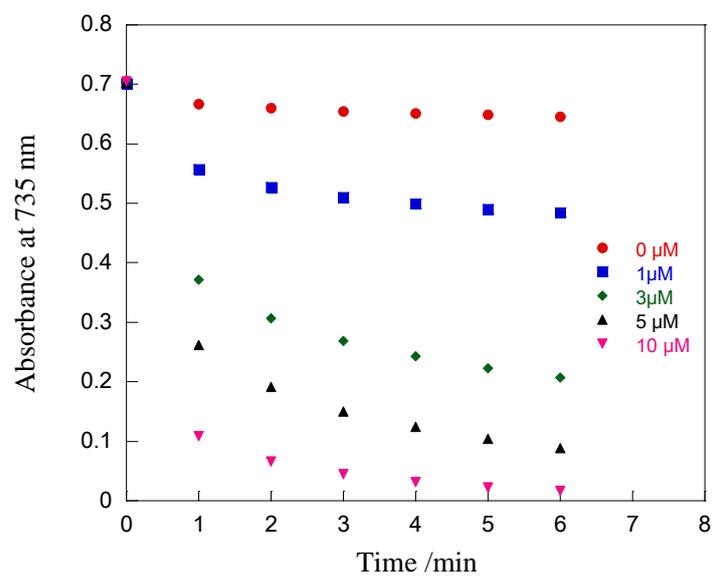


Fig. 25 三成分( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.5, X_{chol} = 0$ ) SUV系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

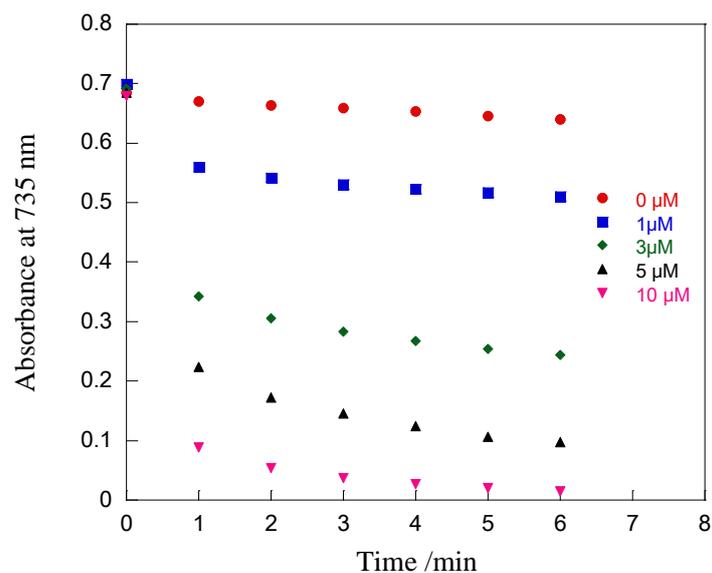


Fig. 26 三成分( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.45$ ,  $X_{Chol} = 0.1$ ) SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

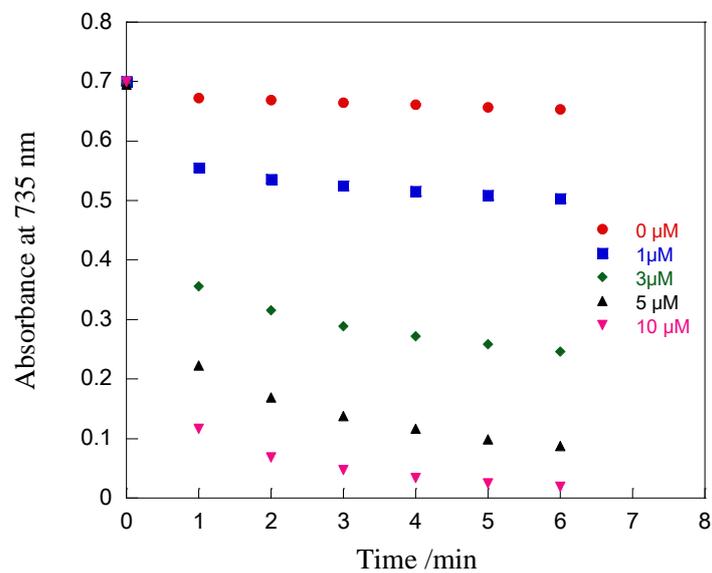


Fig. 27 三成分( $X_{DPPC} = X_{DOPC} = 0.35$ ,  $X_{Chol} = 0.3$ ) SUV 系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

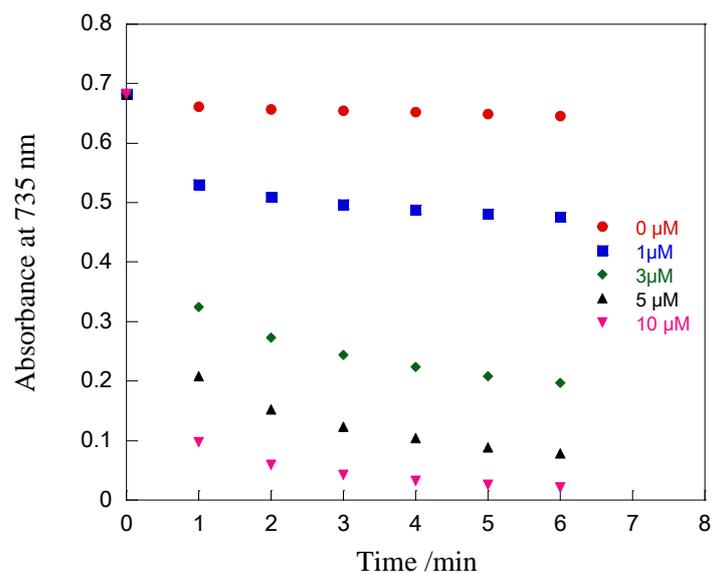


Fig. 28 三成分( $X_{DPPC} = 0.9, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0$ ) SUV系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

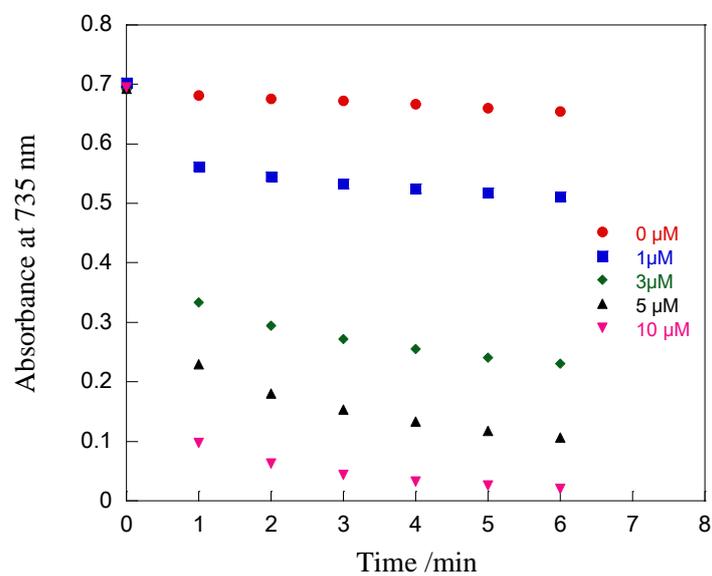


Fig. 29 三成分( $X_{DPPC} = 0.8, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.1$ ) SUV系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

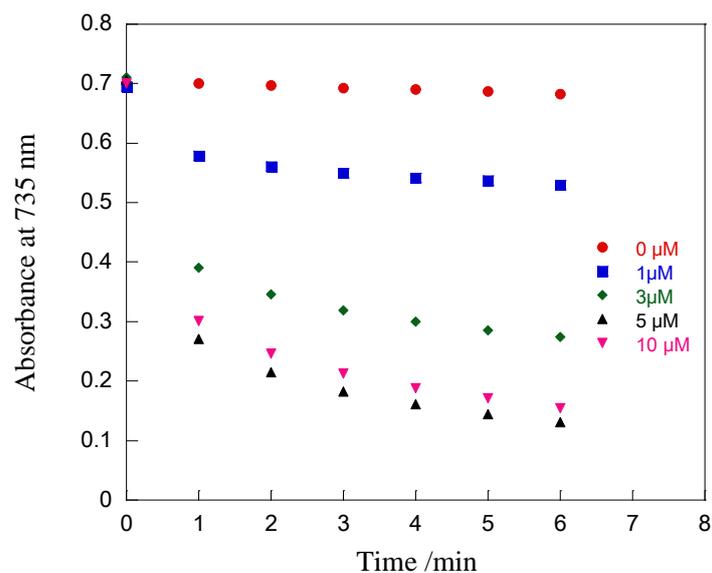


Fig. 30 三成分( $X_{DPPC} = 0.6, X_{DOPC} = 0.1, X_{Chol} = 0.3$ ) SUV系における波長 735 nm の吸光度の経時変化に及ぼすゲニステイン濃度の影響

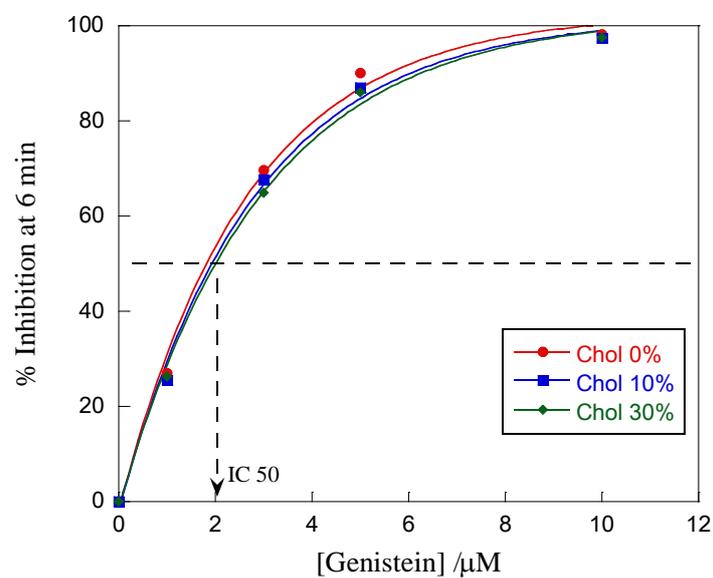


Fig. 31 SUV ( $X_{DPPC} = 0.2$ ) の ABTS ラジカルカチオン阻害度プロット

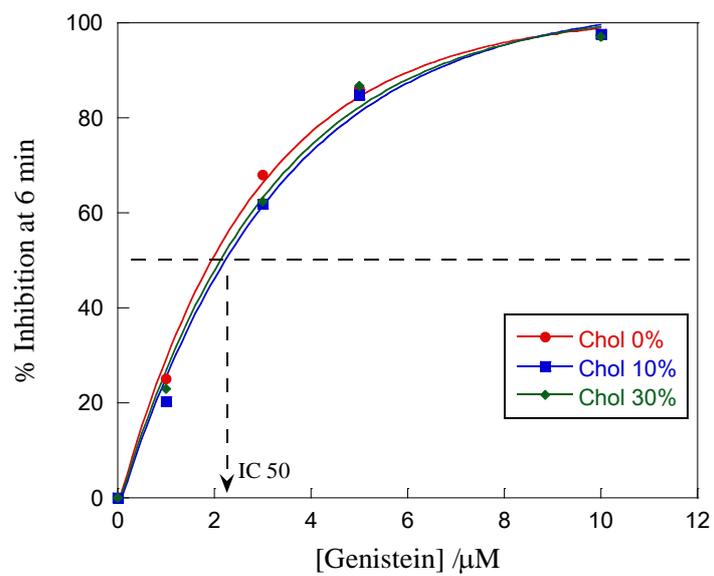


Fig. 32 SUV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ ) の ABTS ラジカルカチオン阻害度プロット

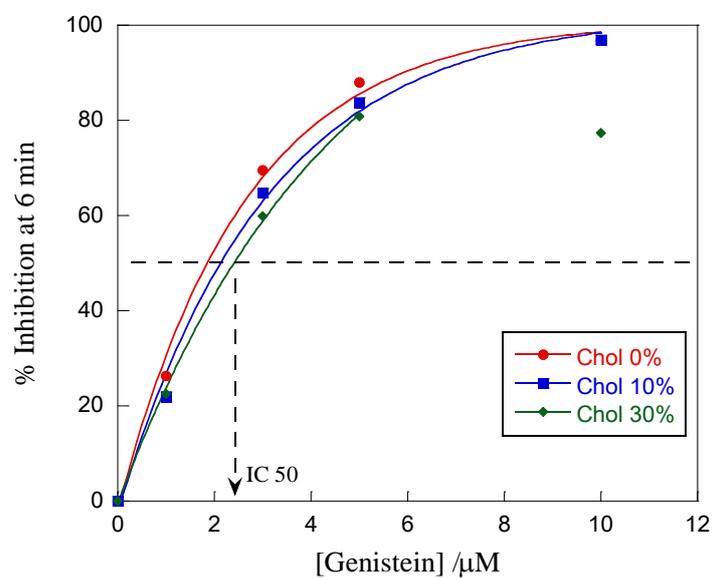


Fig. 33 SUV ( $X_{DOPC} = 0.1$ ) の ABTS ラジカルカチオン阻害度プロット

**Table 6** ABTS 法を用いた各ベシクル系におけるゲニステインの IC 50 ( $\mu\text{M}$ ) と TEAC

$X_{Chol}$	in SUV ( $X_{DPPC} = 0.2$ )		in SUV ( $X_{DPPC} = X_{DOPC}$ )		in SUV ( $X_{DOPC} = 0.1$ )	
	IC 50	TEAC	IC 50	TEAC	IC 50	TEAC
0	1.82	5.38	1.95	5.03	1.85	5.30
0.1	1.93	5.08	2.23	4.39	2.13	4.60
0.3	2.00	4.90	2.13	4.60	2.41	4.07

トロロックスの IC 50:  $9.8 \mu\text{M}$

**Table 7** 各ベシクル系におけるゲニステインの TEAC の比較

$X_{Chol}$	$X_{DPPC} = 0$	$X_{DPPC} = 0.2$	$X_{DPPC} = X_{DOPC}$	$X_{DOPC} = 0.1$	$X_{DOPC} = 0$
0	4.73	5.38	5.03	5.30	2.93
0.1	4.62	5.08	4.39	4.60	3.27
0.3	4.41	4.90	4.60	4.07	(3.62)

## 参考文献

- [1] T. T. Mills, J. Huang, G. W. Feigenson and J. F. Nagle, "Effect of cholesterol and unsaturated DOPC lipid on chain packing of saturated gel-phase DPPC bilayers," *Gen. Physico. Biophys.*, vol. 28, pp. 126-139, 2009.
- [2] M. Kinoshita, K. Ito and S. Kato, "Kinetics for the subgel phase formation in DPPC/DOPC mixed bilayers," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 163, pp. 712-719, 2010.
- [3] N. Bezlyepkina, R. S. Gracià, P. Shchelokovskyy, R. Lipowsky and R. Dimova, "Phase Diagram and Tie-Line Determination for the Ternary Mixture DOPC/eSM/Cholesterol," *Biophysical Journal*, vol. 104, pp. 1456-1464, 2013.
- [4] J. H. Davis, J. J. Clair and J. Juhasz, "Phase Equilibria in DOPC/DPPC-d62/Cholesterol Mixtures," *Biophysical Journal*, vol. 96, pp. 521-539, 2009.
- [5] J. Juhasz, F. J. Sharom and J. H. Davis, "Quantitative characterization of coexisting phase in DOPC/DPPC/cholesterol mixtures: Comparing confocal fluorescence microscopy and deuterium nuclear magnetic resonance," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1788, pp. 2541-2552, 2009.
- [6] P. Uppamoochikkal, S. Tristram-Nagle and J. F. Nagle, "Orientation of Tie-Line in the Phase Diagram of DOPC/DPPC/Cholesterol Model Biomembranes," *Langmuir*, vol. 26, pp. 17363-17368, 2010.
- [7] J. V. Bleecker, P. A. Cox, R. N. Foster, J. P. Litz, M. C. Blosser, D. G. Castner and S. L. Keller, "Thickness Mismatch of Coexisting Liquid Phases in Noncanonical Lipid Bilayers," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, pp. 2761-2770, 2016.
- [8] P. Cicuta, S. L. Keller and S. L. Veatch, "Diffusion of Liquid Domains in Lipid Bilayer Membranes," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, pp. 3328-3331, 2007.

- [9] B. De Kruyff, R. A. Demel, A. J. Slotboom, L. L. M. van Deenen and A. F. Rosenthal, "The effect of the polar headgroup on the lipid-cholesterol interaction: A monolayer differential scanning calorimetry study," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 307, pp. 1-19, 1973.
- [10] K. J. Fritzsching, J. Kim and G. P. Holland, "Biochimica et Biophysica Acta," *Probing lipid-cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol model lipid rafts with DSC and <sup>13</sup>C solid-state NMR*, vol. 1828, pp. 1889-1898, 2013.
- [11] K. Suga and H. Umakoshi, "Detection of Nanosized Ordered Domains in DOPC/DPPC and DOPC/Ch Binary Lipid Mixture Systems of Large Unilamellar Vesicles Using TEMPO Quenching Method," *Langmuir*, vol. 29, pp. 4830-4838, 2013.
- [12] B. Pawlikowska-Pawłęga, L. E. Misiak, B. Zarzyka, R. Paduch, A. Gawron and W. I. Gruszecki, "Localization and interaction of genistein with model membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1818, pp. 1785-1793, 2012.
- [13] K. Cieślak-Boczula, J. Maniewska, G. Gryniewicz, S. Szeja, A. Koll and A. B. Hendrich, "Interaction of quercetin, genistein and its derivatives with lipid bilayers - An ATR IR-spectroscopic study," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 2012, pp. 64-69, 2012.
- [14] M. Kuźdzał, O. Wesołowska, J. Štrancar and K. Michalak, "Fluorescence and ESR spectroscopy studies on the interaction of isoflavone genistein with biological and model membranes," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 164, pp. 283-291, 2011.
- [15] A. Arora, T. M. Byrem, M. G. Nair and G. M. Strasburg, "Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 373, pp. 102-109, 2000.
- [16] R. Bittman and L. Blau, "The Phospholipid-Cholesterol Interaction, Kinetics of Water Permeability in Liposomes," *Biochemistry*, vol. 11, pp. 4831-4839, 1972.

- [17] A. Kessel, N. Ben-Tal and S. May, "Interactions of Cholesterol with Lipid Bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations," *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 643-658, 2001.
- [18] S. Bhattacharya and S. Halder, "Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1467, pp. 39-53, 2000.
- [19] T. A. Daly, M. Wang and S. L. Regen, "The Origin of Cholesterol's Condensing Effect," *Langmuir*, vol. 27, pp. 2159-2161, 2011.
- [20] E. Drolle, N. Kučerka, M. I. Hoopes, J. Katsaras, M. Karttunen and Z. Leonenko, "Effect of melatonin and cholesterol on the structure of DOPC and DPPC membranes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1828, pp. 2247-2254, 2013.
- [21] T. Ishigami, A. Tauchi, K. Suga and H. Umakoshi, "Effect of Boundary Edge in DOPC/DPPC/Cholesterol Liposomes on Acceleration of L-Histidine Preferential Adsorption," *Langmuir*, vol. 32, pp. 6011-6019, 2016.

#### 4. 総括

本研究では有用な作用を示すが水に不溶であるゲニステインを、二成分あるいは三成分のリン脂質ベシクルによって可溶化し、各 MLV におけるゲニステインの最大可溶化量やラメラ間隔に対する作用、各 SUV に可溶化したゲニステインの抗酸化能力について、コレステロールやリン脂質組成による影響を中心に検討した。

2 章において、室温で炭化水素鎖の秩序性が高く、膜流動性の低いゲル相を形成する飽和リン脂質 DPPC と、室温で炭化水素鎖が無秩序であり、膜流動性の高い液晶相を形成する不飽和リン脂質 DOPC の 2 種類のリン脂質を使用した。それぞれのリン脂質に対して、コレステロールを総脂質濃度の 0%、10%、30%になるように添加し、それぞれのベシクルにおけるゲニステインの最大可溶化量とラメラ間隔への影響、抗酸化能力について検討した。ゲニステインの最大可溶化量は WAXS 測定によりゲニステインの結晶ピークの有無から判断した。どちらのリン脂質ベシクルにおいてもコレステロールが増加するとゲニステインの最大可溶化量は減少した。これはコレステロールがベシクルの疎水性コアに埋め込まれ、ヒドロキシ基を親水基と水素結合を形成して可溶化しているのに対し、ゲニステインも親水基と水素結合することで可溶化しているため、コレステロールがゲニステインの可溶化部位を占有することでゲニステインが排除されたと考えられる。一方、DOPC ベシクルは DPPC ベシクルに比べてより多くのゲニステインを可溶化した。これは密にパッキングした DPPC 二分子膜に比べてパッキングの緩い DOPC 二分子膜では、疎水性コア領域への可溶化によってより多くのゲニステインが可溶化できると考えられる。

MLV のラメラ間隔は SAXS 測定により求めた。ラメラ間隔はゲニステインの影響はほとんど見られず、コレステロールにより大きく変化した。DOPC-コレステロール二成分 MLV ではコレステロールの増加に従ってアシル鎖の秩序性の向上に伴うラメラ間隔の単調増加が見られた。一方で、DPPC-コレステロール二成分 MLV では、コレステロールが 10%添加されると、コレステロールを豊富に含むラメラ間隔の広い相と、コレステロールの乏しい相に分離した。このラメラ間隔の著しい増加は、コレステロールの添加によって DPPC 炭化水素鎖の傾斜が解消されたためである。また、この系でのみゲニステインがラメラ間隔に作用し、ゲニステインの添加によって相を均一にした。コレ

ステロール 30%系では、0%系と 10%系の中間のラメラ間隔を示した。

各 SUV 系における抗酸化能力は波長 734 nm に吸収極大を有する ABTS ラジカルカチオンの吸光度の減少から評価された。抗酸化能力は DPPC ベシクル系ではゲニステインの単分散系よりも総じて低くなり、DOPC ベシクル系では単分散系よりも総じて高くなった。これは二分子膜中に可溶化したゲニステインとバルク中の ABTS ラジカルカチオンとの衝突頻度が影響していると考えられる。単分散系においてゲニステインは自由に拡散できるのに対し、ベシクルに可溶化したゲニステインは膜内での拡散に限定される。しかしながら、DOPC ベシクルにおいて単分散系の抗酸化能力を上回ったのは、比較的疎水的な ABTS ラジカルカチオンが二分子膜中に浸透することで、二分子膜が衝突の場として働いた可能性がある。この際、流動性の高い DOPC 二分子膜では拡散が起きやすく、抗酸化能力の向上に寄与したと考える。一方、DPPC 二分子膜は流動性が低く拡散が起きにくいいため、抗酸化能力が低くなったと考えられる。DOPC 系において膜流動性を低下させ、DPPC 系においては膜流動性を向上させるコレステロールが、DOPC 系において抗酸化能力を低下させ、DPPC 系においては抗酸化能力を向上させていることから、膜流動性の寄与が示唆される。

二成分系ベシクルにおける結果を踏まえて、DPPC-DOPC-コレステロール三成分系の検討も行った。三成分系ベシクルではその組成比によって相状態が大きく変化する。コレステロール濃度を 2 章と同じ 0%、10%、30%としたときに異なる相状態をまたぐように DPPC を 20%に固定した系、DOPC を 10%に固定した系、DPPC と DOPC の組成比が等しい系を用いて 2 章と同様に検討した。二成分系と同様にコレステロール増加によるゲニステインの最大可溶化量の減少が見られた。また、DPPC の割合が増加するほどゲニステインの最大可溶化量が減少した。これはパッキングが密である DPPC が増加することで、疎水性コア領域に可溶化していたゲニステインが可溶化できなくなるためであると考えられる。

MLV のラメラ間隔に対して、コレステロールの影響は大きく、ゲニステインの影響は限定的であった。コレステロールは DOPC の組成比が多い系ではラメラ間隔を増大させ、DPPC の組成比が多い系では減少させた。一方、DPPC と DOPC の組成比が等しい系ではラメラ間隔はコレステロール

10%系にかけて増加した後、30%系で相分離が起きた。ゲニステインがラメラ間隔に作用した系は、相図において相境界に近い組成であるため、ゲニステインが単なる可溶化物としてではなく、ベシクルの構成要素として寄与することで、相図の境界線が変動したと考えられる。

各系における抗酸化能力はコレステロール無添加の系では DOPC 系を超える抗酸化能力を示した。DOPC を含む系ではコレステロールが添加されると、抗酸化能力が低下した。これはアシル鎖の秩序性の増加に伴って膜流動性が減少したためだと考えられる。DPPC の多い DOPC10%ベシクルではコレステロールの増加によって抗酸化能力が大きく減少した。これはコレステロールの増加に伴って流動性の高い無秩序液体相が消失するためであると考えられる。

以上をまとめると、ベシクルへのゲニステインの可溶化量は DPPC の増加によって減少し、コレステロール増加によっても減少する。また、ゲニステインがベシクルの構成要素として寄与していると考えられることから、三成分系相図とは相の境界線が異なると思われる。DOPC を含むベシクルへ可溶化したゲニステインは単分散系を上回る抗酸化能力を示す。DPPC と DOPC の混合によって可溶化ゲニステインの抗酸化能力は向上したが、コレステロールの添加は抗酸化能力を減少させた。本研究で考察した抗酸化作用のプロセスから、ベシクルに可溶化したゲニステインは、ベシクル膜へ分配する脂溶性のラジカル種を効率的に除去できると考えられる。さらに、ABTS ラジカルカチオンのような水溶性のラジカル種に対しても単分散系を上回る抗酸化能力を示したことから、リン脂質ベシクルはゲニステインを水中で使用するための優れた可溶化剤であるといえる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学自然科学研究科の太田明雄准教授に心から厚く御礼申し上げます。

同じく金沢大学自然科学研究科の浅川毅教授、浅川雅准教授、長谷川浩教授、山下哲准教授には研究成果の審議を頂き、ご助言とご指導賜りましたこと深く御礼申し上げます。

さらに金沢大学理工学域物質化学類応用化学コース界面化学研究室で勉学を共にした学生の皆様に感謝いたします。

最後にこれまで多くの面で援助して下さった両親をはじめ、曾祖母、祖父母、叔父、弟に深く御礼申し上げます。