

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

戸泉 文江 月川 健士 横山 祥子

Effects of Caffeic Acid Esters Isolated from Propolis on Ganglioside G_{D3} Monolayers

Fumie TOIZUMI, Kenji TSUKIGAWA, Shoko YOKOYAMA

Abstract

The distribution of benzyl caffeate (BC), cinnamyl caffeate (CC) and phenethyl caffeate (PC) isolated from propolis in ganglioside G_{D3} (GD3) monolayer as a model of a tumor membrane, and their effects of the caffeic acid esters on the GD3 monolayer were observed by atomic force microscopy (AFM). BC and PC distributed in the GD3 monolayer markedly changed the morphology of the GD3 monolayer from a flat surface to a percolated pattern, whereas CC distributed in the GD3 monolayer exhibited a broken percolation pattern. The effects of BC and PC on the GD3 membrane were similar to those of known antitumor compounds, suggesting that BC and PC may possess antitumor activity. The activity of CC seems to be weaker than that of BC and PC.

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

キーワード : カフェ酸エステル、プロポリス、ガングリオシド G_{D3}、原子間力顕微法、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)}。

プロポリスの成分として、フラボン類、アルデヒド類、カルコン類など200種類以上の物質、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³⁾。抗腫瘍活性を有する成分としては、カフェイン酸フェネチルエステル、アルテピリンCなどの化合物が明らかにされている⁴⁾。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摂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、このことは同時に生理活性の差としても現れる。ヨーロッパ産に比べて成分研

究がすす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、カフェ酸エステル誘導体、フラボノイド誘導体、ケイヒ酸誘導体を単離した⁵⁾。

今回、Kathmandu産プロポリスから単離したカフェ酸エステル類の抗腫瘍活性を膜レベルで検討することを目的として研究を行った。我々はこれまでに生体膜モデルとしてLangmuir-Blodgett (LB) 膜を使って、原子間力顕微法 (Atomic force microscopy, AFM) で膜の表面状態⁶⁾ および膜中への薬物の分布と作用⁷⁾ を直接的に観察している。ガングリオシドは膜の表層に存在し、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⁸⁾、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) は腫瘍細胞中に多く発現する^{9, 10)}。そこで、腫瘍のモデル膜としてGD3のLB膜に、Kathmandu産プロポリスから単離したカフェ酸エステル

類を添加して、カフェ酸エステル類の作用を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⁵⁾で単離したものを使用した。BC、CC、PCの構造式をChart 1に示す。

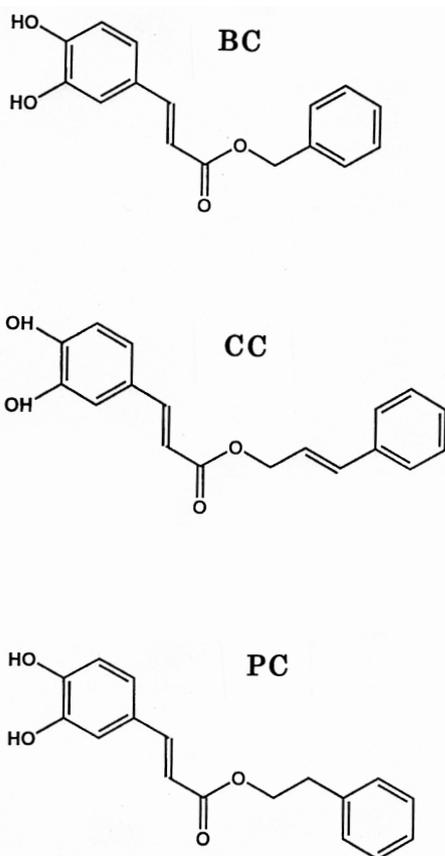


Chart 1 カフェ酸エステル類 (BC, CC, PC) の構造式

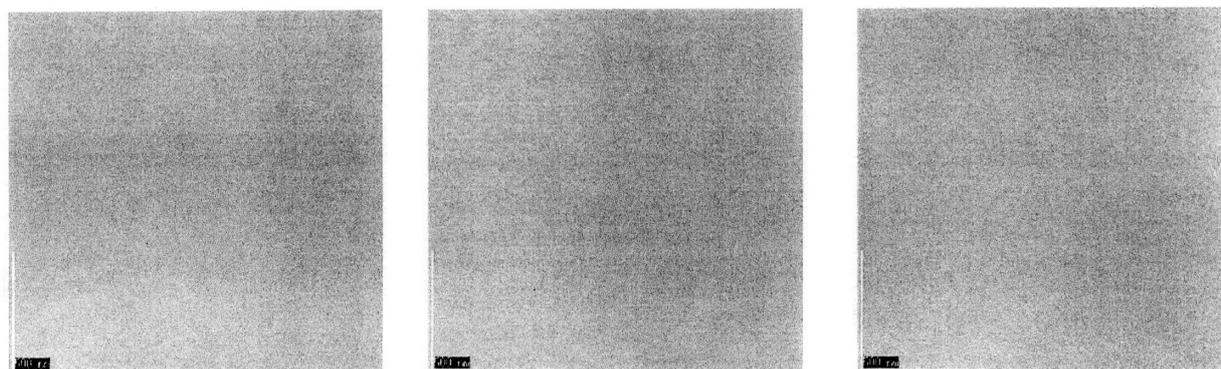


Fig. 1 DPPC膜にBC (左), CC (中央), PC (右) を添加したAFM画像

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

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30mN/mまで圧縮した後、垂直浸漬法でマイカ基板の上にLB膜として採取した。BC、CC、PCを取り込ませたGD3膜は、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。DPPCのLB膜、各カフェ酸エステルを取り込ませたDPPCのLB膜も同様に得た。

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0.08N/m, 長さ250 μ m, 厚さ1.0 μ m) 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膜へのカフェ酸エステル類の影響

AFM画像によるDPPC膜は平坦で均一であった。DPPC膜の画像はこれまでの報告⁷⁾で示しているのので、ここでは省略する。

次に、DPPCにBC、CC、PCをモル分率で0.1含有させたLB膜のAFM画像をFig. 1に示す。

BC、CC、PCを含ませたDPPC膜も平坦で均一であった。DPPCのLB膜は正常膜モデルを表しており、このことからBC、CC、PCは正常膜には影響を与えないことが

示唆される。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⁷⁾。

2. GD3膜へのカフェ酸エステル類の作用

GD3膜のAFM画像は平坦で均一であった。これまでに示されている画像^{7, 10)}と同様であり、画像の掲載は省略する。

次に、GD3にBC、PC、CCをモル分率で0.1添加したGD3膜のAFM画像をFigs. 2-4に示す。

GD3単独では平坦で均一だった膜が、BCとPC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(Figs. 2 and 3)。これはGD3とBC間、およびGD3とPC間の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^{9, 10)}、GD3のLB膜は腫瘍モデル膜を表している。BCとPCが入ることでGD3膜の状態が劇的に変化したことから、BCとPCは腫瘍細胞に影響を

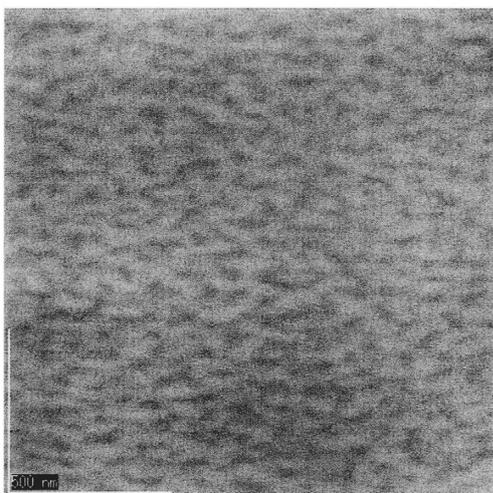


Fig. 2 BCを添加したGD3膜のAFM画像

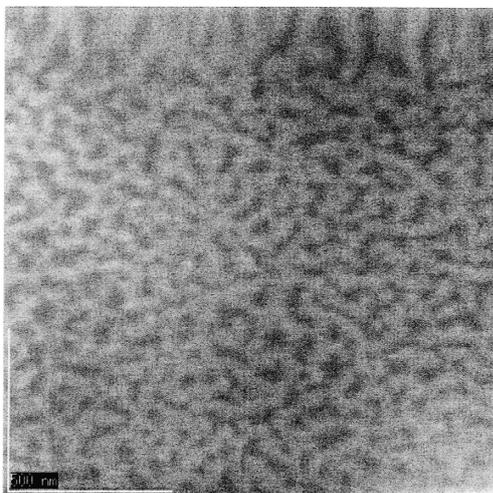


Fig. 3 PCを添加したGD3膜のAFM画像

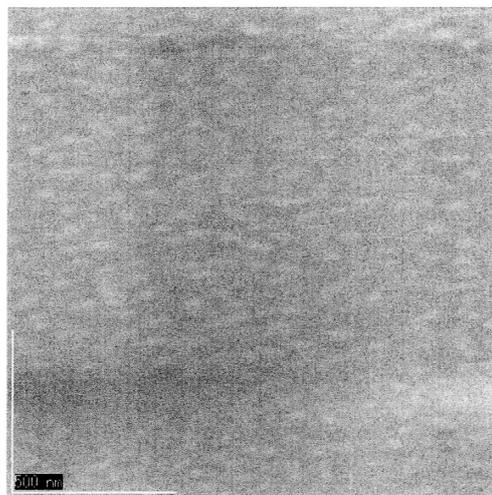


Fig. 4 CCを添加したGD3膜のAFM画像

与えそうなことが示唆される。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⁷⁾。

一方、CCをGD3に添加した膜(Fig. 4)では、CCがGD3膜中に分布はしているもののパーコレーションパターン化には至っていない。CCはBCやPCと比べるとGD3との相互作用力が弱いことがうかがわれる。BC、CC、PCの構造式はChart 1に示されるようによく似ているが、CCはPCに比べてエステル基の炭素数が1つ多くなっている。さらに、エステル基中に二重結合をもつものは3者のうちCCだけである。このわずかな構造の違いが、GD3膜との相互作用力の違いとして生じたものと思われる。分子構造の大きさと、分子の極性と疎水性の強弱が、膜中への分布状態、分子の配向の仕方などに影響を与え、それによってGD3の糖鎖への相互作用力に違いが出たのではないかと考えられる。構造活性相関に関しては、抗酸化化合物が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¹¹⁾。

以上の結果から、BCとPCはGD3と強い親和性があり、腫瘍細胞に影響を与えそうなことが示唆された。

CCはGD3膜に対してはBCとPCよりも相互作用力が弱かったが、膜をGD3以外の膜に変えた場合には相互作用力がどうなるかなど、今後検討していきたい。

結論

カフェ酸エステルのBCとPCは、腫瘍モデル膜であるGD3膜に対して相互作用を引き起こし、GD3膜の平坦で均一だった膜面をパーコレーションパターンに変化させた。このことから、BCとPCはGD3と強い親和性があり、

腫瘍細胞に影響を与えそうなことが示された。これまでに報告⁴⁾されているプロポリス成分の各種腫瘍細胞に対する細胞毒性を会わせて、本研究のAFM画像からBCとPCの抗腫瘍活性が示唆された。一方、CCはGD3膜中に分布はしているものの明確なパーコレーションパターン化は引き起こさなかった。CCは、BCとPCに比べて活性が弱いことが示唆された。

参考文献

- 1) Burdock G. A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347-363, 1998.
- 2) Bankova S. B., Tezuka Y., Kadita S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res*. 15: 561-571, 2001.
- 3) 滝野慶利, 持田俊二: プロポリス, その化学成分を生理活性. *ミツバチ科学*. 3 : 145-152, 1982.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Ohtsuka I., Toizumi F., Yokoyama S.: Surface states of gangliosides G_{D1a} and G_{T1b}/saturated- and unsaturated-phospholipids/cholesterol monolayers. *Mater. Technol*. 29: 197-201, 2011.
- 7) Yokoyama S., Ohtsuka I., Takeda T., Sashida Y.: Distribution of an antitumor natural product OSW-1 in ganglioside G_{M3}-phospholipid membranes. *Mater. Technol*. 23: 54-58, 2004.
- 8) Maggio M., Ariga T., Sturtenat J. M., Yu R. K.: Distribution of gangliosides in mammalian membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 818: 1-12, 1985.
- 9) Eto Y., Shinda S.: Gangliosides occurred in tumor cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 152: 279-290, 1982.
- 10) Yokoyama S., Ohtsuka I., Hada N., Jin Y., Takeda T., Sashida Y., Mimaki Y.: Change in morphology of ganglioside G_{D3} monolayers by adding a new glycocluster 4TS-MP: Comparison between 4TS-MP and OSW-1. *Mater. Technol*. 24: 248-252, 2006.
- 11) 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.