

植物ポリフェノール・クロロゲン酸とモデル生体膜の相互作用 Interaction of plant polyphenol chlorogenic acid with model biomembranes

熊川恵里¹, 矢島芳起¹, 高橋 浩^{1,*}

¹群馬大学 大学院 理工学府

〒371-8510 群馬県前橋市荒牧 4-2

Eri KUMAGAWA¹, Yoshiki YAJIMA¹, and Hiroshi TAKAHASHI^{1,*}

¹Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology,
Gunma University,

4-2 Aramaki, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

1 はじめに

生物は酸化ストレスに対抗するためにさまざまな抗酸化防御機構を発達させてきている。人間の場合では、内因性抗酸化酵素の利用と外因性抗酸化物質の食事からの摂取がある。

抗酸化物質であるポリフェノールの中で、食事による接種量が最も多いものの1つはクロロゲン酸 (CGA)[1]で、コーヒー豆、ジャガイモ、リンゴに豊富に含まれている。CGAには抗酸化作用だけでなく、抗肥満効果、抗炎症作用も持つ[2]ため、近年、医療食品業界で広く注目を集めている。

しかし、CGAの好ましくない効果も報告されている。赤血球が0.05 mg/gのCGA水溶液に曝露されると異常な構造変化(エキノサイトーシス)を引き起こすことが報告されている[3]。

CGAは、乳タンパク質[4]などの様々なタンパク質と結合する。また、リン脂質膜ともCGAは、相互作用することも報告されている。赤血球の形状変化は、CGAの赤血球タンパク質との結合、および赤血球のリン脂質二重層膜表面との相互作用によって誘発されたと推測されるが、その分子機構は不明のままである。

本研究では、リン脂質としてジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を使用し、この脂質に対するCGAの影響を、示差走査熱量計(DSC)測定、温度走査振動式密度計測定、および、X線回折(XRD)測定により相転移挙動および構造変化の観点から検討した[5]。得られた結果に基づいて、CGAのDPPC二重層膜からなるモデル生体膜への結合様式について議論する。

2 実験

試料 DPPC (>99%) の乾燥粉末試料は Avanti Polar Lipids から、CGA (>98%) は Combi-Blocks, Inc. から購入し特に精製せず、そのまま使用した。

DSC測定は、SEIKO DSC6100-Exstar6000 熱量計を用いて実施した。相転移に伴う比容積変化は、Anton Paar 社の振動式密度計 DMA-4500M を用いて決定した。XRD測定は、高エネルギー加速器研究機構(KEK)のフォトンファクトリー(PF)のBL-6A

にて実施した。全ての測定において、試料である脂質分散液の濃度は 20 mg/g に統一して行った。試料を多重層リポソーム (MLV) の形態とするために、脂質を水和分散させる際、特に超音波処理等を行わず、転移温度を挟んで試料温度を上げ下げすること、軽い振とう操作のみを行った。

3 結果および考察

最初に、CGAのDPPC-MLVの相転移挙動に対する影響をDSC測定で調べた。図1に結果を示したように、純粋なDPPCでは、35°C付近に観察された前転移は添加するCGA量の増加に伴い消失し、42°C付近に観察される主転移のピークは、ピーク温度自体はそれほど変化しないが、ピーク形状は徐々に幅広なものになった。

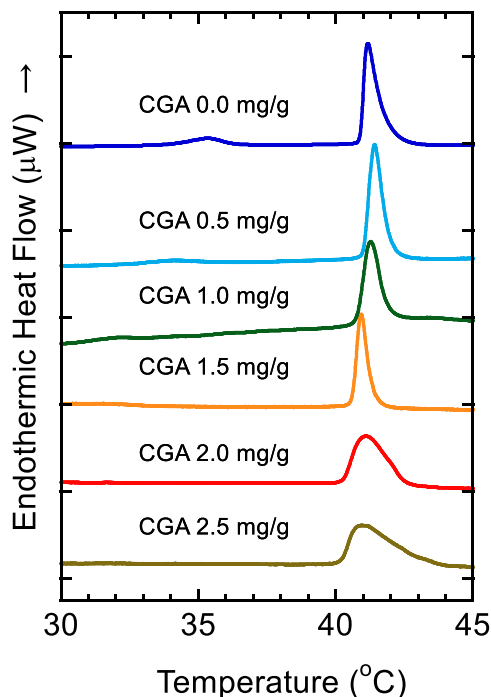


図1：様々なCGA濃度でのDPPC-MLV試料のDSCサーモグラム（昇温走査速度 1.0°Cmin⁻¹）。

DSC は温度の走査による測定であり、厳密には平衡状態ではない。したがって、DSC ピークの形状に関する議論は慎重に行う必要がある。

そこで、我々は温度を 1 点ずつ停止させて測定する振動式密度計を用いて相転移に伴う比容変化を求めた。そして、このデータを二状態モデルで解析し、主転移における van't Hoff エンタルピーを算出した。この van't Hoff エンタルピーを、DSC 測定によって得られる、温度走査速度には影響を受けない calorimetric エンタルピーの値で割ることで、協同単位 (cooperativity unit) を算出した。協同単位の大きさは、相転移中において協同的に振る舞う分子集団の大きさを表す指標である。

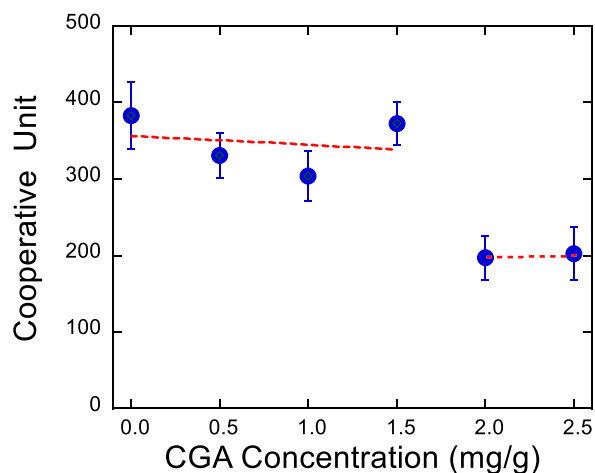


図 2 : 協同単位 (cooperativity unit) の CGA 濃度依存性。

図 2 は、添加して CAG 濃度を横軸に、協同単位をプロットしたものである。図 2 から分かるように、CAG 濃度が高くなると、協同単位の値が減少した。

この理由を探るために、次に DPPC-MLV の構造変化を小角 XRD 測定より検討した。測定は温度 25°C で実施した。その結果、CAG を ~0.5 mg/g 添加すると、DPPC MLV の繰り返し周期が増加し、さらに CGA を添加すると、ラメラ相関が完全に失われることがわかった。図 3 に代表的な結果を示した。CAG が存在しない場合は、鋭いブラック反射ピークが周期的な位置に観察され、多重層のラメラが規則正しく配列していることが分かった。一方、CAG を高濃度で添加すると、規則正しいラメラ構造が乱れて、幅広い散乱パターンのみが観察された。

また、広角 XRD 測定は、CGA の添加によって炭化水素鎖の 2 次元格子による回折ピークが、ほんのわずかにブロードになることを明らかにした。もし CGA のような大きな分子が DPPC 膜の炭化水素鎖領域に侵入したならば、その格子は破壊され、その結果、流動相で観察されるような幅広い散乱パターンのみが広角領域に生じるであろうと予測される。ま

た、そのような状況では、DSC で得られる主転移の転移エンタルピー値はより劇的に変化するはずである。しかし、実際の実験結果は、そうならなかった。したがって、CGA 分子は、DPPC 膜の内部には侵入せず、DPPC 二重層膜の表面に位置していると予想される。

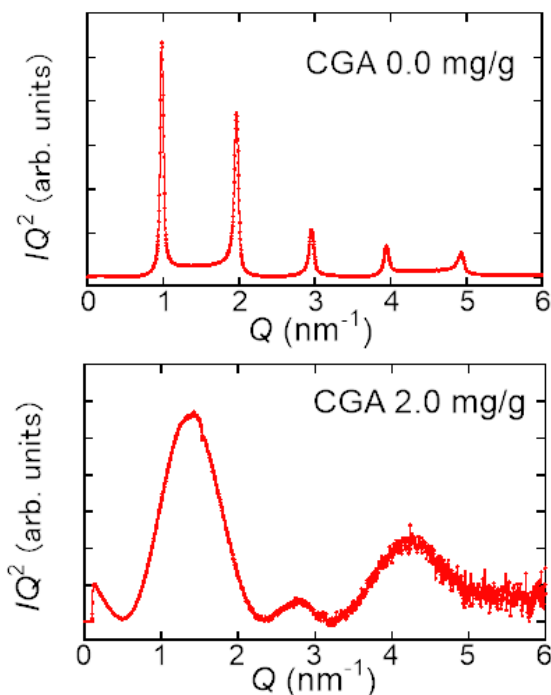


図 3 : 純粋な DPPC-MLV 試料と濃度 2.0mg/g の CGA 水溶液中の DPPC-MLV 試料の小角 XRD パターン (記録温度 : 25°C)。

これまでの結果を基に、CGA と DPPC 膜の相互作用について考えてみる。クロロゲン酸と名前にあるように酸で、本実験条件では CGA 分子は負に帯電した状態にある。負電荷を持った CGA 分子が DPPC 二重膜表面に結合すると仮定すると、その負電荷は、各二重層ラメラ間の反発相互作用につながり、各ラメラ間に広がる。結合する CGA 分子が増加することは、膜表面の電荷の数が増えて反発がより強くなる。最後には、各ラメラ間の相関が失われ、図 3 の下の図のようなパターンを与えることになる。このような状況では、DPPC 膜の各層は温度の上昇とともに独立してそれぞれ独立で炭素水素鎖が融解する相転移を起こると考えられる。したがって、協同単位は減少する。

4 まとめ

本研究で示された CGA 添加による DPPC-MLV 試料の構造変化、および協同単位の値の減少は、CGA 分子が負電荷を持つ状態で DPPC 二重層膜表面に結合している、と仮定することで合理的に解釈できる。

本研究の結果は、CGAによる人間の健康へのプラスの影響や赤血球膜の変形の原因などの分子基盤を理解するための基礎的な知見になりうると考える。

謝辞

放射光X線回折実験を行うにあたり、PF小角ビームラインスタッフのみなさまに大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。本研究は基盤研究(C) (19K03762) の助成を受けて実施された。

参考文献

- [1] M. R. Olthof *et al.*, *J. Nutr.* **131**, 66 (2011).
- [2] M. Naveed *et al.*, *Biomed. Pharmacother.* **97**, 67 (2018).
- [3] D. Bonarska-Kujawa *et al.*, *Mol. Membr. Biol.* **32**, 46 (2015).
- [4] J. Xu *et al.*, *Int. J. Biol. Macromol.* **136**, 804 (2019).
- [5] E. Kumagawa *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1865**, 184158 (2023).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp