

リン脂質 DPPC 膜における人工甘味料スクラロースによる指組ゲル相の誘導 The artificial sweetener sucralose induces the interdigitated gel phase in phospholipid DPPC bilayers

松本笑未香¹, Michael Postrado², 高橋 浩^{2,*}

¹群馬大学理工学部化学・生物化学科, 〒371-8510 群馬県前橋市荒牧 4-2

²群馬大学大学院理工学府 理工学基盤部門, 〒371-8510 群馬県前橋市荒牧 4-2

Emika MATSUMOTO¹, Michael POSTRADO², and Hiroshi TAKAHASHI^{2,*}

¹School of Science and Technology, Gunma University, 4-2 Aramaki, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

²Division 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

本研究では、人工甘味料スクラロースがモデル生体膜（リン脂質ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）から成る脂質二重層膜）の構造および相挙動へ与える影響を調べた。その動機は、スクラロースが免疫に影響を及ぼす可能性が示唆された[1]ためである。

スクラロースは、スクロース（ショ糖）の 3 つの水酸基を塩素に置換してつくられた合成甘味料で、1970 年代後半に開発され、砂糖の約 600 倍の甘さを持つ[2]。スクラロースは、体内でほとんど代謝・吸収されず、そのまま体外へ排出される[3]。腸内細菌への影響やその加熱分解物の毒性が懸念される一方、アメリカ食品医薬品局(FDA)による 1 日最大許容摂取量（5 mg/kg 体重）以下での摂取では、健康への悪影響はないとされ、安全と見なされている人工甘味料である[3]。

しかし最近、Zani ら[1]は、マウスに高用量のスクラロースを与えると T 細胞による免疫応答が抑制されることを報告した。これにより自己免疫疾患の軽減にスクラロースが寄与しうる可能性がでてきた。Zani らの研究[1]の培養細胞を用いた実験からは、スクラロースは T 細胞内には入り込まず、細胞膜脂質二重層に作用する可能性が示唆された。そのため、スクラロースが T 細胞膜の脂質ラフト形成やタンパク質の局在化を変えることで免疫応答を抑制する可能性が議論されている[4]。

スクラロースによる免疫応答抑制の分子メカニズムを明らかにするためには、スクラロースと生体分子との相互作用の知識は必要不可欠である。しかし、スクラロースとタンパク質の相互作用の研究は、複数報告されているが、脂質二重層との物理化学的相互作用の報告は極めて少ない。それでも、数少ない過去の研究から、スクラロースが DPPC 膜のゲル相

で脂質の炭化水素の充填密度を低下させる[5]ことや、スクラロースの微量添加では転移温度が、まず低下し、さらに濃度が増すと転移温度が逆に上昇に転じるという二相的挙動を示す[6]ことなどが報告されている。これらの結果から、論文[6]の研究者たちは、アルコール添加時と同様に、スクラロースの DPPC 膜への添加により、指組（インターディジテート型）ゲル相（ $L_{\beta}I$ 相）が誘導される可能性を指摘している。

これらの先行研究を受けて、本研究では、 $L_{\beta}I$ 相形成に注目し、DPPC 多層ベシクルを用いて、それに、スクラロースおよび対照のスクロース（ショ糖）を添加した、それぞれの系の示差走査熱量計（DSC）測定および X 線回折測定を行い、スクラロースがモデル生体膜（DPPC 膜）の構造と相挙動へどう影響するかを詳細に調べた[7]。先行研究では単層ベシクルを用いていたため前転移への影響が不明確であった。そこで、本研究では多層ベシクルを用いて実験し、前転移への影響も含めて検討することにした。さらに、スクラロース、および、スクロース水溶液の物性を、比較検討するために、蛍光プローブ Prodan を用いた蛍光測定も行った。

2 実験

2.1 試料

リン脂質 DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)、スクラロース (1,6-dichloro-1,6-dideoxy- β -D-fructofuranosyl 4-chloro-4-deoxy- α -D-galactopyranoside) (>98%) およびスクロース（ショ糖）は、それぞれ、油化産業（株）、東京化成工業（株）および富士フイルム和光純薬（株）から購入し、それらは、精製せずにそのまま使用した。使用した純水は、ミリポア社の超純水作製装置を用いて準備した。蛍光プローブ、N,N-dimethyl-6-

propionyl-2-naphthylamine (Prodan)は、Thermo Fisher Scientific 社から購入した。

2.2 X線回折

X 線回折測定は、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) の小角散乱ステーション BL6A で行った。使用した X 線の波長は、BL-6A で 0.15 nm で、カメラ長では約 900 mm であった。正確なカメラ長は、標準サンプル：ベヘン酸銀の測定データから決定した。

2.3 示差走査熱量計(DSC)測定

測定は、SEIKO DSC6100-Exstar6000 熱量計を用いて実施した。温度走査速度は、1.0°C/min で行った。

2.4 蛍光測定

キセノンアークランプを装備した RF5300 蛍光分光光度計 (島津製作所) を用いて、スクロースおよびスクラロース溶液中の Prodan の定常状態の蛍光発光スペクトルを測定した。励起波長 360 nm、室温で、370 nm から 650 nm まで 1 nm ごとにスペクトルを記録した。Prodan を含まないスクロースとスクラロース溶液のスペクトルも測定し、これらはバックグラウンドとして試料の蛍光スペクトルから差し引いた。

3 結果および考察

DSC の結果、完全水和した DPPC 二重層膜からなる多重層ベシクルは 35.7°C に前転移 (ゲル相→リップルゲル相)、41.9°C に主転移 (リップルゲル相→液晶相) を示したが、スクラロースを添加するとこれらの転移挙動が大きく変化した。スクラロース濃度 25 mM 以下では、前転移・主転移温度ともに低下し、特に前転移の減少が顕著であった。一方 50 mM を超えると前転移ピークは消失し、主転移温度は逆に上昇、転移エンタルピーもやや増加した。対照的に、スクロースは、この濃度範囲内では、主転移には、ほとんど影響を及ぼさなかった。

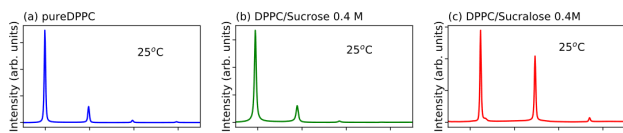


図1：温度 25°C における小角 X 線回折プロファイル。(a) DPP/純水系、(b) DPPC/スクロース系、(c) DPPC/スクラロース系。糖濃度は、(b)、(c) どちらも 0.4M。

温度 25°C で実施した X 線回折 (小角領域 (図1)、広角領域 (図2)) 測定では、0.4 M のスクラロース存在下で DPPC 多重層ベシクルのラメラ間距離 (d -spacing) は、DPP/純水系の約 6.4nm から約 5.1 nm と短縮し (図1(c))、さらに炭化水素鎖が整然とした 2 次元六方格子を形成する様子が確認された

(図2(c))。これらの結果は、スクラロースにより通常のゲル (L_{β}) 相が消失し、 L_{β} I 相が形成されたことを強く示唆している。

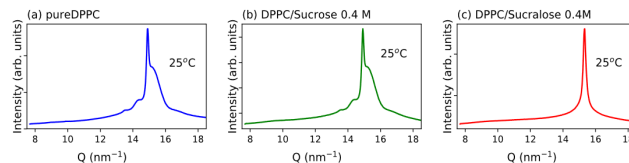


図2：温度 25°C における広角 X 線回折プロファイル。(a) DPP/純水系、(b) DPPC/スクロース系、(c) DPPC/スクラロース系。糖濃度は、(b)、(c) どちらも 0.4M。

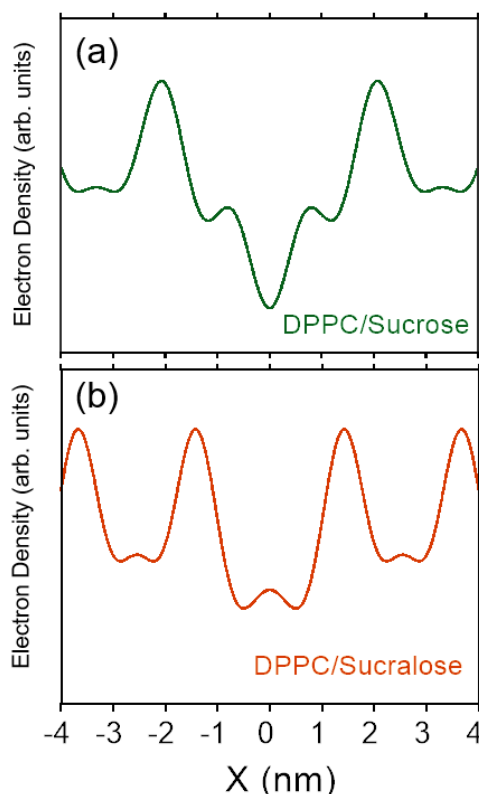


図3：図2の小角 X 線回折のラメラ反射強度から計算した(a) DPPC/スクロース系と(b) DPPC/スクラロース系の電子密度分布。スクラロース系では、純粋は DPPC やスクロース系と比較して、膜厚が短くなっていることが分かる。

そこで、さらに、確証を得るために、ラメラ反射強度から膜面の法線方向の電子密度分布を計算した (図3)。この電子密度プロファイルの解析から、スクラロース存在下ではリン酸基間距離 (dp -p) が約 2.84 nm に短縮し、 L_{β} I 構造の形成が裏付けられた (図3)。一方、スクロースでは純水中 DPPC とほぼ同じ構造を維持していた。

蛍光プローブ Prodan による測定では、スクロース溶液では濃度依存性が見られなかったが、スクラロ

ース溶液では濃度増加に伴い蛍光スペクトルがブルーシフトし、わずかに疎水性が増すことが示唆された。この結果からは、スクラロース溶液が水よりはわずかに疎水的環境を提供し、それにより DPPC 二重層膜に $L_{\beta}I$ 相が誘起される可能性が考えられる。

4 まとめ

スクラロースは DPPC 二重膜の相挙動および構造に顕著な影響を及ぼし、一定濃度以上で $L_{\beta}I$ 相を形成させることが分かった。一方、スクロースには、そのような効果は一切検出されず、両者の物理化学的性質の違いが DPPC 二重層膜への作用差に繋がることが明らかになった。本研究は、モデル系でなされたものであるため、スクラロースが免疫系に及ぼす影響の分子メカニズムを解明するには、より実際の生体膜に近い系での実験が必要である。しかしながら、スクラロースがスクロースとはまったく異なる方法で DPPC と相互作用するという発見は興味深いものである。

謝辞

本研究は、高木秀彰博士をはじめとする PF 小角散乱ビームラインスタッフの皆様による多大な協力があつてこそ出来た成果です。関係者に対して感謝申し上げます。

参考文献

- [1] F. Zani et al., *Nature* **615**, 705–711 (2023)
- [2] M. R. Jenner, The Uses and Commercial Development of Sucralose. In *Advances in Sweeteners*; T. H. Grenby, Ed., Chapman & Hall, London (1996)
- [3] B. A. Magnuson, A. Roberts, and E. Nestmann, E. R. *Food Chem. Toxicol.* **106**, 324–355 (2017)
- [4] N. Kränkel, U. Rauch-Kroehnert, *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, 377 (2023)
- [5] M. Barker and A. Kennedy, *Colloids Surf. B* **152**, 214–219 (2017)
- [6] E. R. Pennington, C. Day, J. M. Parker, M. Barker, and A. Kennedy, *J. Therm. Anal. Calorim.* **123**, 2611–2617 (2016)
- [7] E. Matsumoto, M. Postrado, and H. Takahashi, *P.J. Phys. Chem B.* **128**, 9745–9755 (2024).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp