

好熱菌由来カロテノイド化合物の生体膜安定化効果の研究

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻

原 正 之

Polar carotenoids are known to stabilize lipid bilayer membranes. We investigated the membrane-stabilizing effect of three synthesized polar carotenoids, thermozeaxanthin (TZ), zeaxanthin-glucoside (ZG) and zeaxanthin (Z), using the fluorescent calcein-leakage measurement from the calcein-entrapped liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The addition of TZ stabilized the liposomal membranes composed of DPPC at pH values ranging from 4.0 to 10.0. The addition of three carotenoids, TZ, ZG and Z, stabilized the membrane at acidic and neutral pH values ranging from 4.0 to 7.5. The values of leakage were lower at 30 °C and highest at 40 °C and subsequently, gradually decreased at the higher temperature. The addition of TZ and Z stabilized the membranes, whereas, ZG destabilized the membranes at a temperature higher than 50 °C. In addition, the membrane-stabilizing effect of the carotenoids with the calcein-entrapped liposomes composed of lipids extracted from *Thermus thermophilus* were investigated. The addition of TZ resulted in stabilization of the membrane at all ranges of pH values. However, the addition of Z and ZG destabilized the membrane.

1. 緒 言

1・1 好熱菌 *Thermus thermophilus*

温泉等の高温水域に生育する好熱性の細菌類が、常温性のそれらに較べて、なぜ高い耐熱能を持つのかについては、これまでに多くの研究者が興味を持ち、核酸、蛋白質、脂質などの生体分子の熱安定化機構が研究されてきた。*Thermus thermophilus* は 50°C から 82°C（至適温度は 70°C から 75°C）で生育する代表的な好熱性細菌であり、グラム陰性・好気性の細菌である。この菌は古細菌または始原菌（archaea）と呼ばれるグループではなく真性細菌（eubacteria）に属している。生育温度だけを較べるならば、さらに高温で生育可能な菌も他に多く存在するが、*T. thermophilus* の利点としては、その発見以来、我が国や米国を中心として多くの研究者が微生物自体やその生産する蛋白質の耐熱性機構を研究するためのモデルとして用いてきたため、すでに多くの学問的知見が蓄積していることが上げられる。遺伝子操作を行うためのベクター系もすでに開発されているので、物質生産に適した組み替え体を作るなど、代謝工学的な研究にも極めて適した細菌であると言える。

1・2 好熱菌とカロテノイド

常温で生育する多くの真性細菌がリン脂質を多く含むの



Studies about the effect of carotenoids from thermophilic bacteria on the stability of biological membranes

Masayuki Hara

Department of Biological Science,
Graduate School of Science, Osaka
Prefecture University

に対して、*Thermus thermophilus* の脂質組成の特徴としては分岐脂肪酸を含む糖脂質等を含むことや^{1, 2, 3)}、膜中に黄色から橙色のカロテノイド類を含有していることが知られている^{4, 5)}。また、これらの糖脂質やカロテノイド類の含有量が菌の培養温度に依存して変わることなども報告されていることなどから、これらの脂質組成と菌の生体膜の耐熱性との関与が考えられてきた。

一般に長く伸びた共役二重結合を有するカロテノイド類は抗酸化剤として知られており、ラジカル補足剤（radical scavenger）としての働きを持つ場合が多いので、高温域で早く増殖する好熱菌において呼吸などの代謝活動に伴って生じる活性酸素を消去するのに、カロテノイド類が役立っているのではないかという可能性も考えられる。しかし、1995年にYokoyama等により本菌から図1に示すような、糖と脂肪酸を結合した特徴的な構造を持つ極性カロテノイドである thermozeaxanthin (TZ) が発見されたことにより、膜貫通型脂質として生体膜の熱安定化に寄与しているのではないかというモデルが提唱され、注目を集めるようになった^{6, 7)}。また、これに先立ち、TZ以外にも幾つかの極性カロテノイドが、膜貫通型脂質としてリベットの様にリン脂質膜に挿入され、細胞膜を安定する効果があるという説がNakatani等により提唱されていた⁸⁾。

1・3 カロテノイドの膜安定化効果

我々はこれまでに、様々なリン脂質2分子膜小胞（liposome）を作製してその性質を明らかにし、さらにはこれらをそのまま、またはハイドロゲルなどを組み合わせて薬剤の徐放に生体材料（biomaterial）として利用するための技術についての基礎的な研究を行ってきた。以前に、水溶性の蛍光色素 calcein を封入した liposome からの色素の漏出により脂質膜の安定性を評価する実験系を用いて、*T.*

thermophilus の菌体より抽出した TZ が脂質膜を安定化することを、実験的に証明した⁹⁾。TZ の研究を始めた当初は、Hoshino 等が遺伝子工学的に作製した *T. thermophilus* のカロテノイド大量生産株を 70°C 程度の温度で振とう培養し、生産するカロテノイドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等で精製、分取して実験に用いていた。しかし、この場合には脂肪酸の鎖長の揃った標品を大量に得ることが難しく、有る程度鎖長のばらついた混合物になりがちであった。今回の実験では脂肪酸の鎖長の揃った TZ¹⁰⁾ を用いて研究を行った¹¹⁾。

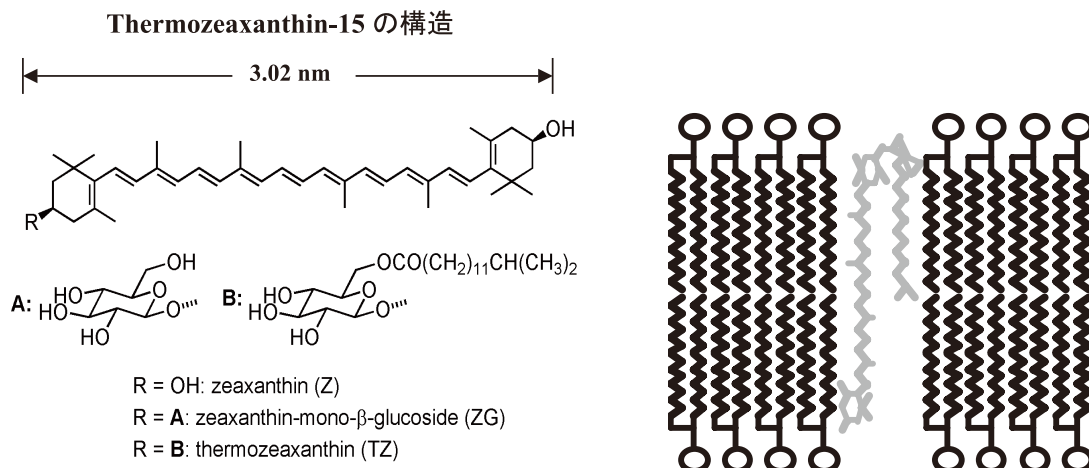
2. 実験

2・1 liposome の調製方法

Yamano 等が有機化学的に合成した thermozeaxanthin (TZ) およびその合成中間体である zeaxanthin (Z)、zeaxanthin-β-glucoside (ZG) を提供頂いて以後の実験に用いた¹⁰⁾。

liposome の調製方法は、以前に報告したものとほぼ同じである⁹⁾。脂質としては dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を用い、100 mM calcein (pH7.5) を含む liposome の調製を行った。まず水和法と凍結融解操作にて多重膜 liposome (MLV) を作製した後、孔径 100 nm の膜を用いた限外濾過により一枚膜 liposome とし、Sephacryl S-300 column ゲル濾過により外液の calcein を除去して 50 mM Tris HCl (pH7.5) に懸濁された一枚膜 (LUV) の calcein 封入 liposome 溶液を得た。

この方法で得られた一枚膜 liposome の粒径を動的光散乱測定法 (DLS-6000 AS, Othuka Electronics, Japan) で測定した。それぞれ control/liposome : 90.0±33.8 nm、Z/liposome: 1012.4±38.2 nm、ZG/liposome: 127.8±29.8 nm、TZ/liposome : 93.9 + 31.1 となっており、実験試料により多少のばらつきがあるものの、概ね 100 nm 前後の粒径を持っている事が確認された。



発見と構造決定: A. Yokoyama et al., *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 4901-4904.

有機化学合成: Y. Yamano et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2002) 2006-2013.

図1 実験に用いた3種のカロテノイドとTZのリン脂質2分子膜への挿入モデル

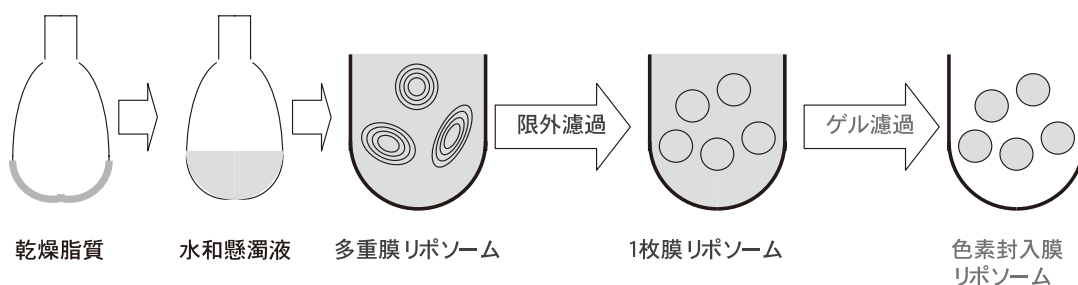


図2 Calcein 封入 DPPC-liposome の調製方法

TZ:DPPC = 1:100 に混合した脂質をナス型フラスコにて減圧乾燥し、100 mM calcein (pH 7.5) 水溶液に懸濁して 10 mg lipid/ml とした。この懸濁液の凍結融解を 5 回行い、フィルター (孔径 100 nm) で限外濾過して粒径を揃えた後 Sephacryl S300 カラムでゲル濾過を行ってリポソーム外液のカルセインを除き、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に懸濁された Calcein 封入 DPPC-liposome を得た。

2・2 蛍光色素を用いた膜安定性評価

Calcein は本来強力な蛍光 (Ex 488nm, Em 517nm) を発する蛍光色素であるが、高濃度では自己消光して蛍光を発しない。Calcein が liposome の外部に漏出して希釈された場合にのみ蛍光を発するので、Calcein 封入 liposome 懸濁液の蛍光を測定することで liposome 膜を横切る Calcein の漏出量を測定することが可能で、これが膜安定性の指標となる。懸濁液の蛍光強度の初期値を F_0 、ある条件での蛍光強度値を F' 、0.03% (w/v) Triton X-100 を溶液に添加して全ての liposome が溶解した後の封入 calcein 全量に基づく蛍光強度値を F_t とすると、以下の関係式により漏出量を計算できる。

$$\text{漏出量 (\%)} = (F' - F_0) / (F_t - F_0)$$

漏出量の数値が高いほど、liposome 膜が不安定化して色素の漏出が促進されていると解釈できる。Liposome 調製時に TZ をあらかじめ DPPC に対してモル比で 1% 添加しておく、TZ 添加 liposome となるので、非添加の場合と比較して TZ の膜安定化効果を調べることができる。

2・3 好熱菌の脂質

DPPC ではなく *T. thermophilus* 由来の脂質を用いた Calcein 封入 liposome を作製する場合には、Hoshino 等により作製されたカロテノイド欠損株である *T. thermophilus* HB27Crt2 株を 70℃ にて振とう培養し、菌体をリゾチーム処理した後に抽出した粗脂質を用いて、先述の方法と同様に Calcein 封入 liposome を作製した。

3. 結果

3・1 DPPC-liposome

Calcein 封入 DPPC-liposome を用いて様々な pH 条件での calcein 漏出を測定した (図 4 (A) - (E))。図 3 に示

された測定原理によると、漏出した calcein による蛍光強度の経時的な増加のみで、現象は起きないはずであるが、実際には図 4 の (B), (D), (E) 等に見られるように、バックグラウンドレベルの漸次的な減少が起きる場合がある。この原因として、漏出した calcein が希釈された状態では経時的に退色するのではないかと考え、その程度を確認するために calcein 水溶液の蛍光強度の時間経過を測定した (図 4 (F))。

一般に DPPC-liposome 膜の安定性は pH に依存しており、酸性および塩基性 pH では、やや縦軸の数値が大きくなる傾向がみられた。これは脂質の荷電の変化などによる違いと思われる。図 4 の時間経過のグラフでは、測定値の点が control より下にあれば、膜が安定化されていると解釈できることになる。

Z, ZG, TZ の 3 種類のカロテノイドの添加による DPPC-liposome 膜安定化効果の程度を、図 4 の時間経過のグラフより 10 分 (概ね、calcein 漏出の初期速度を表すと考えられる)、および 200 分 (概ね、calcein 漏出の到達定常値を表すと考えられる) における蛍光強度の数値について纏めた結果を表 1 に示す。表 1 では不等号または等号により膜安定化効果の強さの順序を表示してある。これらの結果より、TZ は pH4.0-10.0 の比較的広い pH 領域において膜を安定化し、Z および ZG も少なくとも pH4.0-7.5 の pH 領域では膜安定化効果を示すことが明らかとなった。

次に、Calcein 封入 DPPC-liposome を用いて様々な温度での膜安定化効果を調べた。各温度で 30 分間インキュベーションし、calcein 漏出量を調べた結果を図 5 に示す。DPPC の相転移温度を超えると急に calcein 漏出量が増えること、相転移温度以上ではほぼ同程度であることが判る。これは相転移により脂質の膜の流動性が大きく変化する為と思われる。

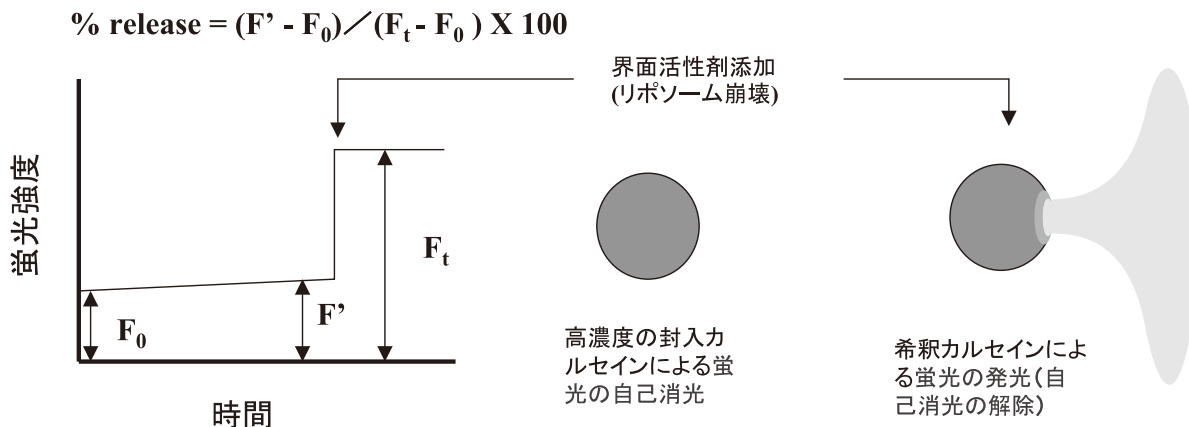


図 3 Calcein 封入 liposome を用いた膜安定性の評価方法の原理

カルセイン封入リポソームを上記の緩衝液に希釈して各種の条件にてインキュベーションした後、カルセインの漏出を蛍光の自己消光解除により測定した (励起波長 488nm 発光波長 517nm)。各試料ごとの封入カルセイン量の違いを補正するために、界面活性剤を添加してリポソームを完全に崩壊させた場合のカルセイン放出量を 100% として放出の程度を表示した。

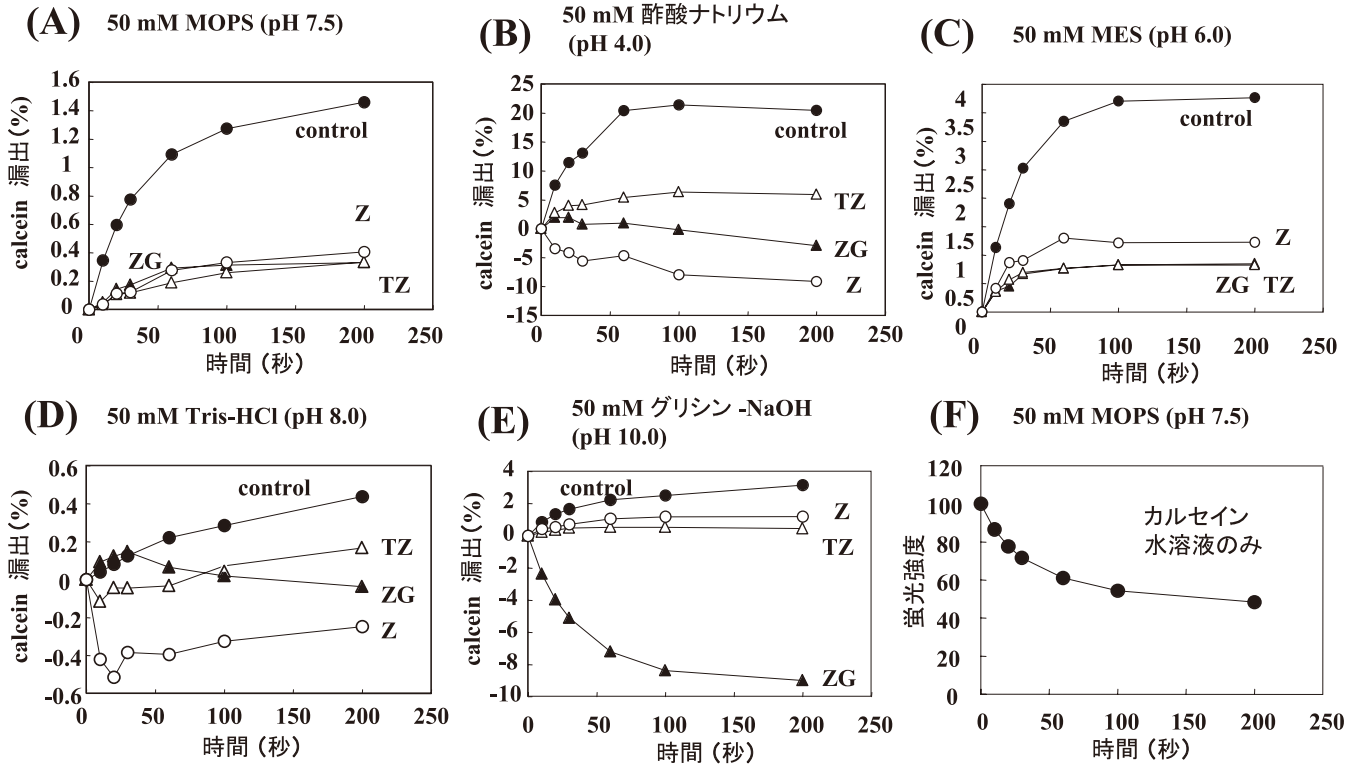


図4 Calcein 封入 DPPC liposome を用いた膜安定性の評価試験の時間経過 (A)-(E)、および希釈後の calcein 自体の蛍光強度の経時変化 (F)。カロテノイドを添加しない control (●)、DPPC に対して Z (○)、ZG (▲)、TZ (△) をそれぞれモル比で 1% 添加した liposome を、25°C で上記の各緩衝液中でインキュベーションし、calcein 漏出を測定した。control に較べて漏出量が少ないほど、膜が安定化されたと推測される。

表1 カロテノイドによる DPPC-liposome 膜安定化効果のまとめ

	50 mM Na-acetate (pH 4.0)	50 mM MES (pH 6.0)
カルセイン漏出量の 順番 (10分後の値)	Z>ZG>TZ>C	TZ>ZG>Z>C
カルセイン漏出量の 順番 (200分後の値)	Z>ZG>TZ>C	TZ>ZG>Z>C
	50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM Glycine/NaOH (pH 10.0)
カルセイン漏出量の 順番 (10分後の値)	Z>TZ>C>ZG	ZG>TZ>Z>C
カルセイン漏出量の 順番 (200分後の値)	Z>ZG>TZ>C	ZG>TZ>Z>C
	50 mM MOPS (pH 7.5)	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
カルセイン漏出量の 順番 (10分後の値)	TZ=Z>ZG>C	TZ>ZG>Z=C
カルセイン漏出量の 順番 (200分後の値)	ZG>TZ>Z>C	TZ>ZG>Z>C

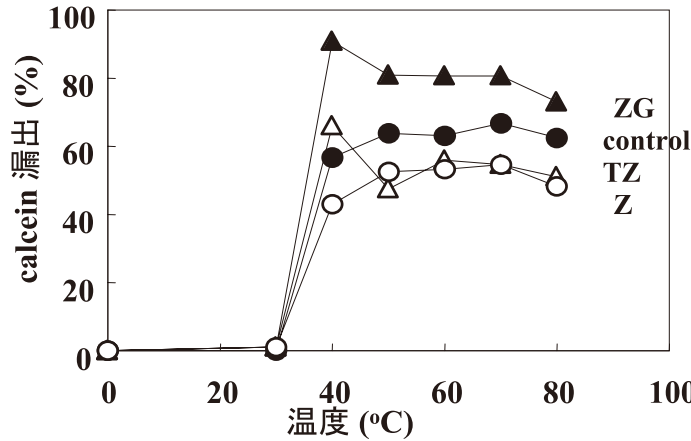


図5 Calcein 封入 DPPC liposome を用いた膜安定性の温度依存性。
 カロテノイドを添加しないcontrol (●)、DPPCに対してZ (○)、ZG (▲)、TZ (△)をそれぞれモル比で1%添加した liposome を、各温度で30分間インキュベーションし、calcein 漏出を測定した。control に較べて漏出量が少ないほど、膜が安定化されたと推測される。DPPCの相転移温度を超えると著しく膜が不安定になる。高温でもTZ = Z > Control > ZGの順番で安定化効果あり。

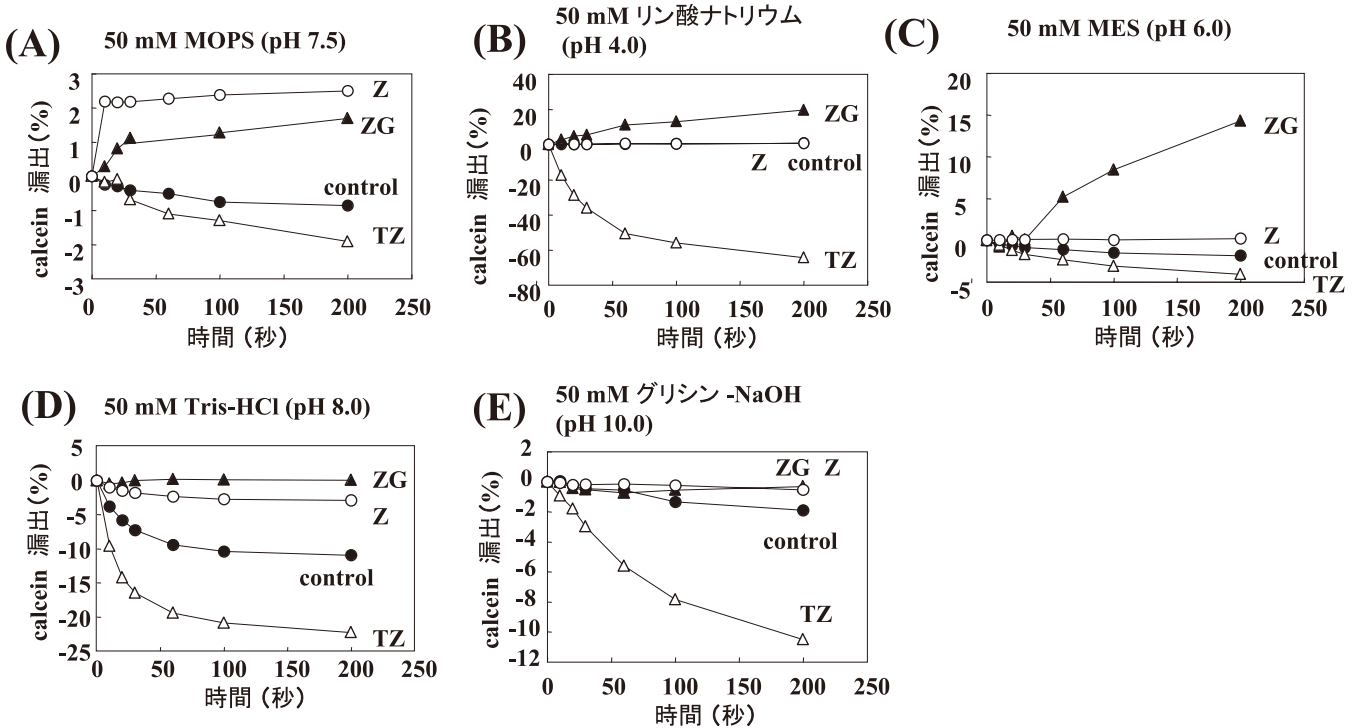


図6 Calcein 封入 *Thermus thermophilus* 脂質 liposome を用いた膜安定性の時間経過 (A)-(E)。
 カロテノイドを添加しないcontrol (●)、脂質に対してZ (○)、ZG (▲)、TZ (△)をそれぞれ概算モル比で1%添加した liposome を、25°Cで上記の各緩衝液中でインキュベーションし、calcein 漏出を測定した。control に較べて漏出量が少ないほど、膜が安定化されたと推測される。膜安定化効果は概ねTZ > Control > Z > ZGの順で、TZは膜を安定化するがZおよびZGは逆に不安定化する傾向が見られた。

3・2 *T. thermophilus* 由来脂質 -liposome

以上の実験は全て DPPC-liposome を用いて行ったが、*T. thermophilus* は糖脂質などを含むことがすでに報告されているため、同菌の細胞 (菌体) から抽出した脂質を用いて TZ 等の膜安定化効果を検証しないと本来の役割を検証

したことになるのではないかと批判を受ける可能性もある。このため、*T. thermophilus* から抽出した粗脂質を用いて Calcein 封入 liposome を作製し、同様の膜安定性評価を行った結果を図6に示す。DPPC-liposome の場合とは異なり、TZの添加は全ての pH 領域で liposome 膜

安定化効果を示すが、ZやZGはその添加により、しばしば逆に膜を不安定化させる傾向が認められた。

4. 考 察

4・1 実験結果の考察

カロテノイド主骨格の両端部にOH基を有する zeaxanthin (Z) 等の極性カロテノイドが膜貫通型脂質として、リン脂質膜の安定化に寄与することは、Nakatani 等により報告されている⁸⁾。また、カロテノイド以外の膜貫通型脂質としては、古細菌(始原菌)由来の脂質が報告された例もある¹²⁾。我々は以前に *T. thermophilus* から抽出した TZ がリン脂質膜を安定化させる効果を持つことを、calcein 封入 liposome を用いて初めて実験的に示したのであるが、今回の研究はさらに膜安定化効果の分子メカニズムを詳細に検討するため TZ だけでなく、Z および ZG の合成標品を用いて実験を行った。

一般にリン脂質からなる liposome 膜の安定性は DPPC 等のような単一組成の脂質よりも大豆、卵黄、大腸菌など天然物から抽出・精製した脂質を用いた liposome の方が高いことが多い⁹⁾。おそらく様々な鎖長の脂肪酸を含む膜の方が、熱的な揺らぎに対して安定なのではないかと思われる。今回の実験では化学合成した TZ に対して脂肪酸の鎖長の揃った DPPC を先ず実験に用いた。天然の PC を用いて calcein 封入 liposome を作成した場合には、カロテノイドを添加しない liposome でも、室温(25℃)で、200分程度の時間ではほとんど calcein の漏出が起こらないため、同様の膜安定化試験を行うことが困難であった。

今回の研究で、TZ は DPPC-liposome においても *T. thermophilus* 由来脂質 liposome においても、良好な膜安定化効果を示したが、ZG 等は膜の安定化に効果のある場合と、逆に不安定化させる効果のある場合が明らかになった。この結果はどちらかと言うと意外なものであったが、図1に示した構造式からも判るように、ZG はそもそも疎水性のカロテノイド主骨格の片側の末端にグルコースが付いた構造を持っているので、界面活性剤として作用してもおかしくない構造を有している。このため、脂質膜に対しては界面活性剤として作用し不安定化する場合もあるのかも知れない。

今回の実験では DPPC に対するモル比で1%程度の極めて少量の TZ を脂質に加えただけであるにも関わらず、顕著な liposome 膜安定化効果を示しているため、TZ は図1のモデルに示されたような膜貫通型の脂質として強力な安定化効果を発揮しているものと結論できる。

4・2 TZ の産業への利用の可能性

Liposome は、生体膜を構成する脂質や膜蛋白質の機能や物理化学的な性質を研究するための実験系として生物科

学、生物物理学的研究分野で用いられるほか、患部に必要な薬剤を効率よく投与するための選択的薬物送達系(DDS: drug delivery system)や、薬剤の血液中の滞留時間を延長するための徐放技術(CR: controlled release)の担体として、すでに細胞への遺伝子導入系(非ウイルスベクター)、医薬品(抗ガン剤等)、化粧品(各種の生理活性物質)、などに利用されている。

今回の calcein 封入 liposome のように、水溶性の薬剤を内部に封入して用いることもあるが、水に不溶性の疎水性の薬剤を懸濁させる素材として用いる場合もある。どちらにしても、liposome の安定性は薬剤の患部への到達効率や放出速度を決めるものなので、膜の安定性を制御することは重要な課題である。liposome の安定化技術は、これまでも研究されてきた。天然の脂質を用いて安定な liposome を調整できる脂質を選択するだけでなく、分子設計に基づく特殊な脂質の合成、脂質分子間の化学架橋や、liposome の膜表面に高分子を付加して被覆する安定化方法など、様々な技法が発明されてきている。これらの方法は確かに膜の安定化技術として有効であるが、化合物の安全性については未確認のものも多い。我々が研究対象とした TZ はこれまでも食品に添加されてきた天然のカロテノイド色素と類似の構造を一部持った化合物であり、今後、DDS や CR の素材として医薬品や食品への利用が期待される化合物である。今回の実験では、有機化学的に合成された TZ を実験に用いたが、Hoshino 等により遺伝子組み替え技術を用いた TZ 大量生産株もすでに作られているので、将来的には微生物を用いた大量生産も可能と思われる^{4, 5)}。

5. 総 括

我々は、TZ がその存在菌である *T. thermophilus* 由来脂質 liposome においても、良好な膜安定化効果を示すことを実験的に示した。TZ が天然物由来の安全な膜安定化剤として、各種の liposome に添加され、DDS などに利用されることを期待している。

謝 辞

本研究ならびに関連の研究を遂行するにあたり、財団法人コスメトロジー研究振興財団より研究助成を賜りましたこと、ならびに山野由美子(神戸薬大)、伊藤允好(神戸薬大)、苑輝卿(山東医科大)、三宅淳(産総研)、星野貴行(筑波大)、横山昭裕(東ソー)の各先生を含めた共同研究者の皆様へ御協力頂いたことを、感謝の意を込めて付記させていただきます。

(参考文献)

- 1) Pask-Hughes R.A., Shaw N.: Glycolipids from some extreme thermophilic bacteria belonging to the genus

- Thermus, J. Bacteriol., 149, 54-58, 1982.
- 2) Oshima M., Yamakawa T. : Chemical structure of a novel glycolipid from an extreme thermophilic, *Flavobacterium thermophilum*, Biochemistry, 13, 1140-1146, 1974.
 - 3) Ray P.H., White D.C., Brock T.D. : Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 108, 227-235, 1971.
 - 4) Hoshino T., Yoshino Y., Guevarra E.D., Ishida S., Hiura T., Fujii R., Nakahara T. : Isolation and partial characterization of carotenoid underproducing and overproducing mutants from an extremely thermophilic *Thermus thermophilus* HB27, J. Ferment. Bioeng., 77, 131-136, 1994.
 - 5) Hoshino T., Fujii R., Nakahara T. : Overproduction of carotenoid in *Thermus thermophilus*, J. Ferment. Bioeng. 77, 423-424, 1994.
 - 6) Yokoyama A., Sandmann G., Hoshino T., Adachi K., Sakai M., Shizuri Y. : Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters from thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*, Tetrahedron Lett. 36, 4901-4904, 1995.
 - 7) Yokoyama A., Shizuri Y., Hoshino T., Sandmann G. : Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*, Arch. Microbiol. 165, 342-345, 1996.
 - 8) Lazrak, T., Milon A., Wolff G., Albrecht A.M., Mische M., Ourisson G., Nakatani Y. : Comparison of the effects of inserted C40- and C50-terminally dihydroxylated carotenoid on the mechanical properties of various phospholipid vesicles, Biochim. Biophys. Acta 903 (1987) 132 - 141.
 - 9) Hara M., Yuan H., Yang Q., Hoshino T., Yokoyama A., Miyake J. : Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters, Biochim Biophys Acta 1461, 147-154, 1999.
 - 10) Yamano Y., Sakai Y., Hara M., Ito M. : Carotenoids and related polyenes. Part 9.1 Total synthesis of thermozeaxanthin and thermocryptoxanthin and the stabilizing effect of thermozeaxanthin on liposomes, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2006-2013, 2002.
 - 11) Hara M., Yamano Y., Sakai Y., Kodama E., Hoshino T., Itoh M., Miyake J. : Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: Zeaxanthin, xeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin, Materials Science and Engineering C 28, 274-279, 2008.
 - 12) Elferink M.G.L., del Wit, J.G., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. : Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids, 1994, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1193 (2), pp. 247-254