

単一 GUV 法により解明された 抗菌性物質による生体膜のトポロジー変化のダイナミクス

静岡大学・創造科学技術大学院

山崎昌一

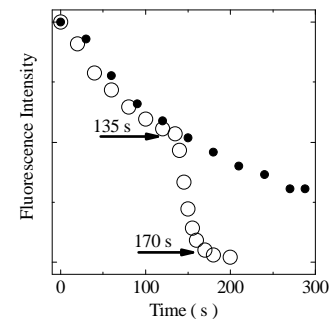
【はじめに】 生体系のソフトマターの典型例である生体膜や脂質膜は、外来物質との相互作用の結果、膜自身が電場や応力などを発生して非平衡状態に達し、膜のトポロジー変化や構造変化を起こすことが多い。膜融合や膜分裂、膜中のポア（孔）形成、リポソームの破壊などはそれらの重要な例であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。従来の生体膜/脂質膜のリポソームの研究では小さな直径(50–500 nm)のリポソーム(SUVやLUV)や多重層リポソーム(MLV)がたくさん存在する水溶液を用いた研究が蛍光分光法、ESR、光散乱やX線小角散乱などにより行われてきたため、物理量の集団平均の測定が行われ、多くの情報が失われてきた。一方、直径が 5–10 μm 以上の生体膜/脂質膜 1 枚から作られたリポソームは、巨大リポソームまたは巨大単一膜ベシクル(GUV; Giant Unilamellar Vesicle)と呼ばれ、緩衝液中の 1 個の GUV を光学顕微鏡で観察することが可能であるために、膜の弾性率測定や細胞骨格との相互作用の研究に用いられてきた。我々は最近、1 個の GUV の構造や物理量の変化をリアルタイムで測定し、それらの物理量を多くの“1 個の GUV”に対して測定して統計的な解析をすることにより、生体膜/脂質膜の構造・機能を新しい視点から研究する方法（単一巨大リポソーム法（単一 GUV 法））を提案し、研究を展開している[1-7]。従来、細菌を殺す活性を持つ抗菌性ペプチドや抗菌活性のある低分子と生体膜の相互作用は、蛍光物質を含む小さな直径のリポソームの懸濁液にそれらの物質を加えたときの蛍光物質の漏れ（リポソーム内部から外部への拡散）を測定することにより評価されてきた。このような蛍光物質の漏れの原因はいろいろあり（たとえばリポソームの強い会合や膜融合、リポソームの破壊、膜中でのポア(穴)の形成)、この測定だけでは原因は特定されない。本研究では、単一 GUV 法を用いて、抗菌性ペプチドのマガイニン 2 と抗菌活性があるカテキンと脂質膜の相互作用を研究した。

【結果と考察】 我々が現在行っている単一 GUV 法の実験では、蛍光位相差顕微鏡下で 1 個の GUV を選択し、その近傍へ脂質膜と相互作用させたい物質の水溶液を含むマイクロピペット（先端が 10 μm 程度のガラス製毛细管）をマイクロマニピュレーターで近づけ、静かに物質の水溶液を加えた。物質と脂質膜が相互作用した結果生じる GUV 内の物質の外への漏れの測定は、蛍光ラベルした物質(蛍光プローブ)を含む GUV を作成し、1 個の GUV 内部の蛍光強度の時間変化を測定することによっておこなった。

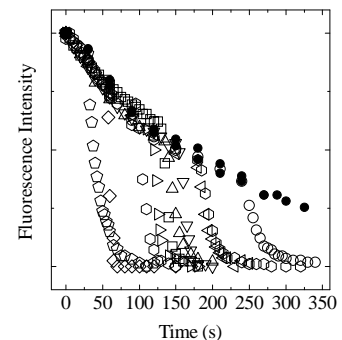
アフリカツメガエルの抗菌性ペプチドであるマガイニン 2 の細菌を殺すメカニズムの研究も、従来は蛍光物質を含む LUV の集団を用いて行われてきた。その結果、マガイニン 2 が脂質膜と相互作用することにより、溶液全体での蛍光物質の漏れ（つまり多くの LUV からの漏れの総和）が時間とともに緩やかに増大する（20 分程度の測定時間の間）ことが見出されていた。マガイニン 2 と脂質膜の相互作用を解明するために、負電荷を持つ DOPG と正味の電荷がない DOPC の混合膜の GUV とマガイニン 2 の相互作用を単一 GUV 法で調べた[4]。1mM のカルセイン(分子量 623 の蛍光プローブ)を含む 50%DOPG/50%DOPC-GUV の近傍

に $4\mu\text{M}$ のマガイニン 2 をマイクロピペットから静かに加えると、最初 GUV 内部の蛍光強度は退色によりゆるやかに減少したが、135 秒から急激に減少し、200 秒後には蛍光強度は 0 になった (図 1 ○)。そのときの GUV の位相差像から、GUV の構造は破壊されずに、GUV 内部のスクロースが外部に漏れてコントラストが減ったことがわかる。この結果は、マガイニン 2 が脂質膜中にポア (小孔) を形成して、そこからカルセインやスクロースが急速に漏れたことを直接的に示している。一方、同じ条件下で蛍光強度の急激な減少が見られない GUV も存在した (図 1 ●)。このことは、マガイニン 2 と GUV をある時間相互作用させたときに、カルセインが完全に漏れている GUV と全く漏れていない GUV が存在することを示すので、調べたすべての GUV の中でカルセインが完全に漏れている GUV の確率 P_L が定義できる。同様の実験を他の多くの“1 個の GUV”で行うと、蛍光強度の急激な減少が時間的にランダムに起こることがわかり (図 2)、ポア形成が確率過程的に起こったことを示す。調べたすべての GUV の中でカルセインが完全に漏れている GUV の確率 P_L は相互作用の時間の増加とともに、かつマガイニン 2 の濃度とともに増大した。またポアが形成され

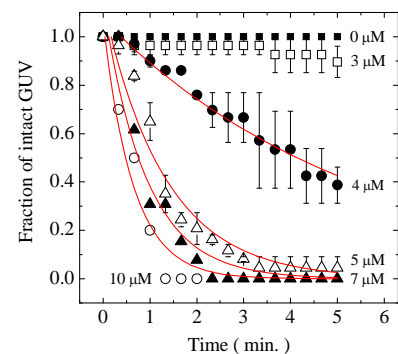
< 図 1 >



< 図 2 >



< 図 3 >



ていない GUV の割合は図 3 のように指数関数的に減少し、ポア形成が 2 状態転移 (ペプチドが膜界面に結合した状態から膜に挿入して膜にポアを形成した状態への転移) で起こることが示唆された [4]。さらにポア形成の速度定数が導出され、マガイニン 2 の濃度とともに増加することがわかった [4]。

一方、カテキンの中で最も抗菌活性が高いエピガロカテキンガレート (EGCg) と脂質膜の相互作用を単一 GUV 法で調べた [5]。EGCg も LUV と相互作用して内部の蛍光物質を漏らすことが知られていた。我々は、低濃度の EGCg が 1 個の GUV 内部からのカルセインの漏れを誘起することを見出した。EGCg と 1 個の GUV の相互作用を詳細に調べた結果、EGCg の臨界濃度で GUV が破裂をし、その後 GUV の脂質膜が折れたため、脂質膜と EGCg の小さな複合体を形成することを明らかにした。この EGCg による 1 個の GUV の破裂の統計的な解析により、GUV の破裂が 1 次反応に従って起こることが明らかになった

以上より、単一 GUV 法は、抗菌性物質と脂質膜との相互作用で起こる現象を可視化し、その素過程を明らかにするとともに、多くの 1 個の GUV の結果を統計的に解析することにより素過程の速度定数などを定量的に求めることが原理的に可能であることが示された [4, 5, 7]。

【参考文献】

- (1) *Langmuir*, 20, 5160, 2004, (2) *Langmuir*, 20, 9526, 2004, (3) *e-J. Surface Sci. and Nanotech.* 3, 218, 2005, (4) *Biochemistry*, 44, 15823, 2005, (5) *Biophys. J.* 92, 3176, 2007, (6) *Langmuir*, 23, 720, 2007, (7) *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Elsevier, in press, 2007