

抗菌性ペプチドによる脂質膜中のポア形成の素過程とそのメカニズム： 単一 GUV 法による研究

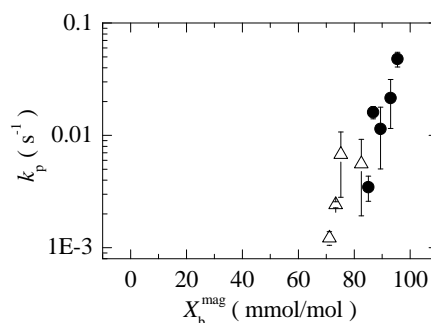
静岡大学・創造科学技術大学院 丹波之宏、有山弘高、Victor Levadny、山崎昌一

【はじめに】

細菌を殺す活性を持つ抗菌性ペプチドと脂質膜の相互作用の研究は、従来小さな直径(50–200 nm)のリポソーム(LUV)がたくさん存在する水溶液を用いた研究が蛍光分光法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。我々は、ペプチドなどの物質との相互作用による 1 個の巨大リポソーム(GUV)の構造や物理量の変化をリアルタイムで測定し、それらの物理量の変化を多くの“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]。この単一 GUV 法を用いて、他の方法を用いて最も良く研究されている抗菌性ペプチドであるマガイニン 2 と脂質膜の相互作用の研究を行い、1 個のリポソームにおける膜中のポア(小さな孔)形成とその後のポアを介してのリポソーム内物質の漏れを分離して測定することができ、ポア形成の速度定数を求められることを示した[4,7]。今回のシンポジウムでは、単一 GUV 法を用いたマガイニン 2 のポア形成の最近の研究から解明されたポア形成の特性やその素過程に基づいて、そのポア形成のメカニズムについて議論する。

【結果と考察】

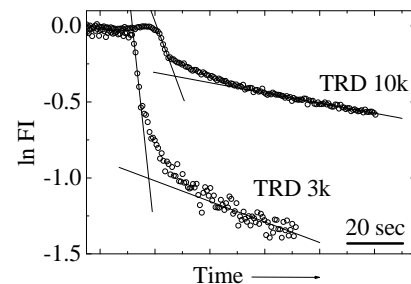
マガイニン 2 のポア形成のメカニズムを解明するために、脂質膜の表面電荷密度がポア形成に与える効果を単一 GUV 法により研究した。正味の負の電荷を持つジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)と正味の電荷が 0 のジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)の混合膜の GUV(DOPG/DOPC-GUV)を作成し、膜内での DOPG と DOPC の比率を変えることにより(30–60 mol% DOPG)、GUV 膜の表面電荷密度を制御し、マガイニン 2 との相互作用を調べた。その結果、すべての種類の GUV で、GUV の破壊や変形を伴わずに急速な蛍光プローブ・カルセインの漏れのみを観測し、マガイニン 2 が脂質膜中にポアを形成することがわかった。マガイニン 2 のポア形成の速度定数 k_p は、漏れが起こっていない GUV の確率 P_{intact} の時間変化を解析することによって求めた。種々の GUV についてポア形成の速度定数 k_p を求めた結果、同じ速度定数になる水溶液中のマガイニン 2 の濃度は、膜の表面電荷密度が小さくなるにつれて大きく増大し、同じ表面電荷密度の場合は水溶液中の塩濃度が大きくなるにつれて増大した。GUV 膜とマガイニン 2 の静電相互作用をポアッソン-ボルツマン方程式に基づいて考え、また蛍光分光光度計を用いてマガイニン 2 の脂質膜への結合定数を実験的に求めることにより(30%DOPG と 40%DOPG の GUV のみ)、脂質膜界面に結合したマガイニン 2 の濃



(図 1) ●, △ はそれぞれ 40%DOPG/DOPC-GUV, 30%DOPG/DOPC-GUV を表す。

度（膜界面におけるマガイニン2と脂質のモル比） X_b を求めることに成功した。それを用いて上記の実験結果の水溶液中のマガイニン2濃度を X_b に変換したところ、膜の表面電荷密度にかかわらず、 $X_b = 70 \text{ mmol/mol}$ ところから急激に k_p が増大し、 k_p の X_b 依存性はほぼ同じであることがわかった（図1）。このことは、膜に結合したマガイニン2の膜界面での濃度が、ポア形成の速度を決めていることを示す。

次に、種々の大きさの蛍光プローブを含む50%DOPG/50%DOPC-GUVとマガイニン2の相互作用を研究し、それらの蛍光プローブの漏れの解析からマガイニン2が脂質膜中に形成するポアの大きさの評価やポアの大きさの変化を研究した。高感度EM-CCDカメラを用いることにより、蛍光プローブの退色がほとんどない程度まで入射光を減衰してGUVの蛍光の時間変化を測定することが可能になった。カルセインの場合であれば100%の漏れが起こる濃度のマガイニン2を用いたときに、Texas-Red dextran 40k ($R_{SE} = 5.0 \text{ nm}$) や FITC-BSA ($R_{SE} = 3.5 \text{ nm}$) の場合は一過性（10秒以下）の急速な少量（全体の10-20%）の漏れしか誘起されなかった。一方、マガイニン2が誘起するTexas-Red dextran 10k (TRD 10k) ($R_{SE} = 2.7 \text{ nm}$) や Texas-Red dextran 3k (TRD 3k) ($R_{SE} = 1.1 \text{ nm}$) の漏れは2相性を示した。つまり初期の一過性の急速な少量の漏れとそれに続く遅い漏れが観察された。GUV内部の蛍光強度の対数の時間変化（図2）の解析から、初期状態の漏れの数定数と最終的な定常状態の数定数を求めることができた。これらの結果は、マガイニン2は最初脂質膜に大きなポアを一過的にあけるが、その後ポアの半径は時間とともに小さくなり、最終的には安定な小さな半径のポアに変化することを示している。初期状態の漏れの数定数の理論的な解析よりポアの半径が求められた（たとえば半径 $5 \pm 1 \mu\text{m}$ のGUVの場合は $4 \mu\text{M}$ マガイニン2のときのポアの半径は 24 nm ）。そのポアの半径はマガイニン2濃度が同じ場合は蛍光プローブの種類によらず同じであったが、蛍光プローブ濃度やGUVの半径の増加とともに増大した。また、最終的な定常状態のポアの半径は、 2.7 nm 以上 3.5 nm 以下であることがわかった。この結果と数定数の解析から得られるポアの有効面積から、最終的な定常状態のポアの数もマガイニン2濃度とともに増大することが示された。以上の結果は、マガイニン2の脂質膜中でのポア形成のキネティックパスウェイに関する初めての情報を与える。



（図2） $4 \mu\text{M}$ マガイニン2が誘起するTRD 10k やTRD 3k のGUVからの漏れ。これらの蛍光プローブを含むGUV内部の蛍光強度の対数の時間変化を示す。

以上の結果に基づいて、マガイニン2のポア形成の新しいメカニズムを提案する。

【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) *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, Vol.7, Elsevier, pp 121-142, 2008, (7) *J. Phys. Chem. B.*, 113, 4846, 2009