

外来物質との相互作用や外場による生体膜のトポロジー変化のダイナミクスとメカニズム

静岡大学創造科学技術大学院・教授 山崎昌一

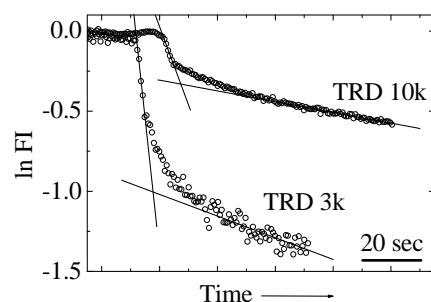
抗菌ペプチドのマガイニン2が誘起する巨大リポソーム (GUV) からの種々の大きさの蛍光プローブの漏れを解析し、脂質膜中のポア (小さな孔) の大きさやその時間変化の情報を得ることに成功し、マガイニン2によるポア形成のキネティックパスウェイを考察した。また、低い pH により生体膜の液晶相からキュービク相への相転移のキネティクスを放射光施設の強力な X線装置を用いて研究し、予備的な実験データを得ることに成功した。

1. 抗菌ペプチドマガイニン2の脂質膜中でのポア形成のキネティックパスウェイ¹⁾

我々が開発した単一 GUV 法を用いると、ペプチドなどの外来物質と1個の GUV の相互作用にともなう GUV の物理量の時間変化を測定し、その結果を多くの“1個の GUV”を用いて統計的に解析することにより、素過程の詳細な解析ができる^{2,3)}。最近この単一 GUV 法を用いてマガイニン2と脂質膜の相互作用を研究し、マガイニン2の脂質膜中でのポア形成の速度が、膜界面でのマガイニン2濃度により決定されることを見出した⁴⁾。本年度はそのポア形成のキネティックパスウェイを解明するために、種々の大きさの蛍光プローブを含む50%ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)/50%ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)-GUV とマガイニン2の相互作用を研究し、蛍光プローブの漏れ速度の解析からマガイニン2が形成するポアの大きさの評価やポアの大きさの時間変化を研究した¹⁾。

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 ($R_{SE} = 5.0$ nm) や FITC-BSA ($R_{SE} = 3.5$ 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) ($R_{SE} = 2.7$ nm) や Texas-Red dextran 3k (TRD 3k)

($R_{SE} = 1.1$ 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1) の解析から、初期状態の漏れ速度定数と最終的な定常状態の速度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げるが、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。初期状態の漏れ速度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



(図1) $4 \mu\text{M}$ 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。

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、3.5 nm 以下であることが推定される。この結果と漏れの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にマガイニン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。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した。

2. 低い pH により誘起される 2 分子膜液晶(L_{α})相からキュービック(Q)相への相転移のキネティクス

我々は生体膜の L_{α} 相と Q 相の間の相転移が静電相互作用により起こることを初めて見出し、その後系統的な研究を進めてきた⁵⁾。最近、中性で L_{α} 相を形成する 20%ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS)と 80%モノオレイン(MO)の混合膜の多重層リポソーム(20%DOPS/80%MO-MLV)の水溶液の pH を下げていくと、pH が 2.9 以下のときに L_{α} 相から Q 相(Q^{224} 相)への相転移が 1 時間以内に起こることを発見した⁶⁾。本年度は、SPRING-8 や PF のような放射光施設の強力な X 線装置を用いて、この相転移のキネティクスを研究した。

20%DOPS/80%MO-MLV を中性で作成し、遠心でペレットを作成した後に、低い pH の緩衝液と混合してけん濁液を作成し、その後の膜の構造変化を調べた。pH2.4 のときは、5 分後には Q^{224} 相の強いピークと H_{II} 相の小さなピークが出現した。その後、時間とともに Q^{224} 相のピーク強度は増加し、 H_{II} 相のピーク強度は減少した。次に遠心をしないで同様の実験を行った。つまり、20%DOPS/80%MO-MLV を中性で作成し、10 倍量の低い pH の緩衝液と混合してけん濁液を作成し、その後の膜の構造変化を調べた。水の含量が多いために散乱 X 線のピーク強度は小さかったが、相を同定するには十分な S/N があった。pH2.4 のときは、4 分後には Q^{224} 相の弱いピークと H_{II} 相の大きなピークが出現し、その後時間とともに Q^{224} 相のピーク強度は増加し、 H_{II} 相のピーク強度は減少した。1 時間後には H_{II} 相のピーク強度は非常に小さくなった。現時点では H_{II} 相の出現については 2 通りの可能性がある。まず 1 番目は、試料調整の都合で、脂質膜にクロロホルムがわずかに残っている可能性があり、そのために H_{II} 相が出現した可能性である。2 番目は、この相転移においてはまず L_{α} 相が H_{II} 相に相転移し、その後 Q^{224} 相に相転移した可能性である。この点については今後の実験で明らかにしたい。現時点で実験結果から明確に言えることは、この条件の下では 4 分以内に L_{α} 相から Q^{224} 相への相転移がかなり起こっており、その速度は脂質濃度に依存するという点である。

<参考文献>

1. H. Ariyama, Y. Tamba, V. Levadny, and M. Yamazaki, *Proc. IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS 2009)*, 208-213, 2009.
2. M. Yamazaki, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 7, 121-142, 2008.
3. Y. Tamba, M. Yamazaki, et al., *Biophys. J.* 92, 3178-3194, 2007
4. Y. Tamba, and M. Yamazaki, *J. Phys. Chem. B*, 113, 4846-4852, 2009
5. M. Yamazaki, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 9, 163-209, 2009
6. Y. Okamoto, M. Yamazaki, et al., *Langmuir*, 24, 3400-3406, 2008.