

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

1. 初期の研究目標と実際の研究推進

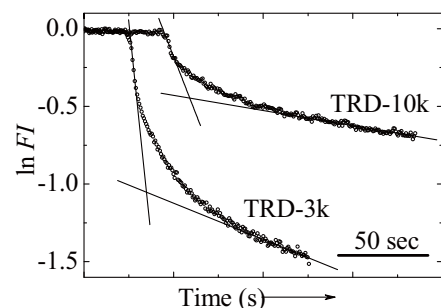
外来物質との相互作用により生じる非平衡状態での生体膜/脂質膜のトポロジー変化を実験的に研究し、そのキネティックスパスウェイやメカニズムを解明することを目的として2種類の研究をおこなった。研究(1)では、単一巨大リポソーム(GUV)法の実験方法や解析方法を改良し、抗菌ペプチドのマガイニン2 (Mag) の脂質膜中でのポア(小孔)形成のダイナミクスやメカニズムを明らかにすることが初期の目標であった。実際の実験結果は、単一GUV法を用いて、抗菌ペプチド・Magが誘起する巨大リポソーム(GUV)からの種々の大きさの蛍光プローブの膜透過の速度を研究し、脂質膜中のポア(小さな孔)の大きさやその時間変化の情報を得ることに成功し、Mag によるポア形成のキネティックスパスウェイを明らかにした¹⁾。研究(2)では、生体脂質膜のキュービック (Q)相の構造安定性に対する静電相互作用の効果の解明やQ相の構造制御のための方法論の開発のために、静電相互作用による生体膜の液晶 (L_α)相とQ相の間の相転移のキネティクスなどを放射光を用いて研究することが初期の目標であった。実際の実験結果は、低いpHによる生体脂質膜の L_α 相からQ相への相転移のキネティックスパスウェイを解明した²⁾。

2. 研究成果

2-1. 抗菌ペプチド・Mag の脂質膜中でのポア形成のキネティックスパスウェイ

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³⁾。最近この単一 GUV 法を用いて Mag と脂質膜の相互作用を研究し、Mag の脂質膜中でのポア形成の速度が、膜界面での Mag 濃度により決定されることを見出した⁴⁾。本研究ではそのポア形成のキネティックス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Magの相互作用を研究し、蛍光プローブの膜透過(漏れ)の速度の解析から Mag 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%の膜透過が起こる濃度の Mag 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%)の膜透過しか誘起されなかった。一方、Mag 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) の膜透過は 2 相性を示した。つまり初期の一過性の急速な少量の膜透過とそれに続く遅い膜透過が観察された。GUV 内



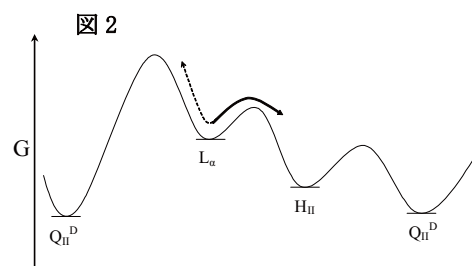
(図 1) 4 μ M Mag が誘起する TRD 10k や TRD 3k の GUV からの膜透過。これらの蛍光プローブを含む GUV 内部の蛍光強度の対数の時間変化を示す。

部の蛍光強度の対数の時間変化(図 1)の解析から、初期状態の膜透過速度定数と最終的な定常状態の膜透過速度定数を求めることができた。これらの結果は、Mag 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。初期状態の膜透過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 $7 \mu\text{M}$ Mag のときのポア半径は 24 nm)。そのポア半径は Mag 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、Mag 濃度や GUV の半径の増加とともに増大した。また定常状態の膜透過の実験結果から、 $7 \mu\text{M}$ Mag のときの最終的な定常状態のポア半径は、 1.4 nm 以上 3.5 nm 以下であることがわかったが、この値は中性子散乱から求めた平衡状態のポア半径 (1.9 nm) と一致する。この結果と膜透過速度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が Mag 濃度とともに増大することが示唆された。以上の結果は、Mag 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、Mag のポア形成の新しいメカニズムを提案した。

2-2. 低い pH により誘起される生体脂質膜の L_α 相から 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、最終 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⁾。本研究では、SPring-8 や PF の放射光を用いて、この相転移のキネティクスを研究した²⁾。

中性の緩衝液中で作成した 20%DOPS/80%MO-MLV の懸濁液と低い pH の緩衝液を急速に混合し、その後の膜の構造変化を放射光により調べた。水溶液の最終 pH が 2.6 以上 2.9 以下の場合の相転移では、まず 2-10 秒以内に L_α 相がヘキサゴナル II (H_{II} 相)に変化し、その後 15-30 分以内に H_{II} 相が Q^{224} 相に相転移することを見出した。相転移の速度は水溶液の pH に依存した。後半の過程である H_{II} 相から Q^{224} 相への相転移の速度定数を特異値分解法により決定した。これらの結果は、現時点では以下のように解釈できる。この領域の pH では、自由エネルギーから考えれば Q^{224} 相がもっとも安定であるが、 L_α 相から Q^{224} 相への活性化エネルギーが L_α 相から H_{II} 相へのそれに比べて大きいために(図 2 参照)、最初に L_α 相から H_{II} 相への相転移が急速に起こり、その後 H_{II} 相から Q^{224} 相への相転移がゆっくり起こったと考えられる。



<参考文献>

1. Y. Tamba, H. Ariyama, V. Levadny, and M. Yamazaki, *J. Phys. Chem. B*, 114, 12018-12026, 2010.
2. M. M. Alam, T. Oka, N. Ohta, and M. Yamazaki, *Submitted for publication*.
3. M. Yamazaki, *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 7, 121-142, 2008.
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