

トピックス

単一GUV法による抗菌ペプチドのポア形成の研究

山崎昌一 静岡大学創造科学技術大学院統合バイオサイエンス部門

1. はじめに

抗菌ペプチドは、無脊椎動物、脊椎動物や植物などが細菌や真菌などの微生物を殺すことにより自分自身を防御するために生産するペプチドであり、現在では500種類以上存在する¹⁾。これらの抗菌ペプチドが細菌などを殺すときの直接のターゲットは微生物の細胞膜の脂質膜領域と考えられている。実際、抗菌ペプチドはリジンやアルギニンを多く含むため強く正に荷電しているため、細胞膜の外側に負に荷電した脂質が多い細菌などの細胞膜に強く結合することができる。結合後、ポア（小さな孔）を形成するなどして細胞膜に障害を与え、細菌などを殺す。しかし膜への障害の与え方はいくつかの説があり、そのメカニズムは不明である²⁾。

従来、抗菌ペプチドなどの外来物質と脂質膜の相互作用の研究は、小さな直径（100-500 nm）の一枚膜リポソーム（LUV; Large Unilamellar Vesicle）が多く存在する懸濁液を用いて蛍光分光法などの種々の物理的測定法により行われてきたが、それらは物理量の集団平均の測定であるので多くの情報が失われてきた（LUV懸濁液法）。われわれは、外来物質と生体膜の相互作用の新しい研究方法として、直径10 μm以上の一枚膜の巨大リポソーム（GUV; Giant Unilamellar Vesicle）を用いた単一巨大リポソーム法（単一GUV法）をはじめて提案し、従来のLUV懸濁液法では得られない新しい質の情報を得られることを示した³⁾。単一GUV法では、1個のGUVとペプチドなどの外来物質との相互作用の結果生じるGUVの構造や物理量の変化を、種々の光学顕微鏡を用いてリアルタイムで測定し、同じ実験を多くの「1個のGUV」に対して行い、1個のGUVの物理量やその変化の統計的な解析をする。単一GUV法により、膜融合⁴⁾や膜分裂⁵⁾、抗菌物質によるリポソームの破壊⁶⁾、抗菌ペプチドのポア形成^{7),8)}など1個のリポソームで起こる1つ1つの事象（event）が観測でき、その事象を構成するいくつかの素過程を分離して明らかにすることがはじめて可能になり、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

に求めることがはじめて可能になった。ここでは、抗菌ペプチド・マガニン2（Mag）と脂質膜の相互作用を単一GUV法で研究して現在までに明らかになったことを紹介する。

2. マガニン2のポア形成の速度定数の決定⁷⁾

正味の負電荷をもつジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）と電気的に中性のジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）の混合膜のGUVとMagの相互作用を調べた。まず、低分子の蛍光プローブのカルセイン（半径 $R=0.7$ nm）を内部に含む60%DOPG/40%DOPC-GUVを1個選び、その近傍へマイクロピペットで各種濃度のMagを含む緩衝液を添加し続け、その間のGUV内部の蛍光強度やGUVの形や構造を蛍光位相差顕微鏡でリアルタイムで観測・解析した。1個のGUVの近傍に3.0 μMのMagを加えると、最初GUV内部の蛍光強度はほぼ一定であったが、添加を始めて174秒後から急激に減少し226秒後には蛍光強度は0になった（図1a2）。この結果は、Magが脂質膜中にポアを形成して、そこからカルセインがGUV外部へ急速に漏れたことを示している。同様の実験を多くの「1個のGUV」を用いて行ったところ、どのGUVでも蛍光強度の急激な減少が始まれば、30秒程度で蛍光強度がほぼ0になったが、それぞれのGUVの蛍光強度の急激な減少、つまりMagによるポア形成は確率過程的に起こった（図1b）。ポア形成の速度定数 k_p は、調べたすべてのGUVの中でポアが形成されず漏れが起こっていないGUVの割合 P_{inact} の時間変化から求めることができる（図2）。 k_p は、Magの水溶液中濃度の増加とともに増大した。

3. マガニン2の膜表面濃度とポア形成の関連⁹⁾

Magのポア形成の速度定数は膜の表面電荷密度に大きく依存した。たとえば、30%DOPG/70%DOPC-GUVと60%DOPG/40%DOPC-GUVを比較すると、同じ速度定数を与えるMagの水溶液中濃度は前者は後者の約50倍だった（図3a）。蛍光の実験とポアソンボルツマン理論を用いてMagの膜表面への固有の結

The Single GUV Method Reveals the Antimicrobial Peptide-induced Pore Formation in Lipid Membranes

Masahito YAMAZAKI

Integrated Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University

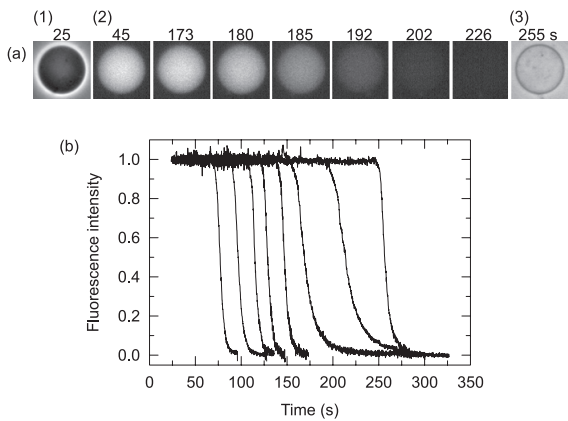


図 1 3 μM マガイニン 2 が誘起する 60% DOPG/40% DOPC-GUV からのカルセインの漏れ。(a) (2) GUV の蛍光顕微鏡像。(1) (3) 位相差顕微鏡像。バーは 10 μm 。(b) いくつかの“1 個の GUV”の蛍光強度の時間依存性。1 本の曲線は 1 個の GUV の結果を示す。文献 8 より転載。

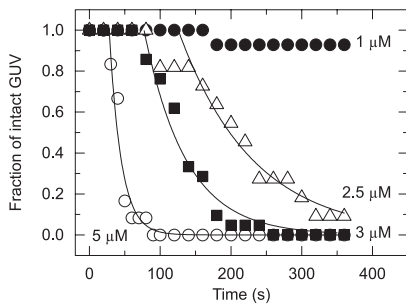


図 2 ポアが形成されていない 60% DOPG/40% DOPC-GUV の割合の時間変化からのポア形成速度定数の導出。(○) 5, (■) 3, (△) 2.5, (●) 1 μM マガイニン 2。文献 8 より転載。

合定数を求め、水溶液中の濃度を膜表面濃度（膜界面における Mag と脂質のモル比） X_b に変換すると、膜の表面電荷密度にかかわらず、 $X_b = 70 \text{ mmol/mol}$ 以上で X_b の増加とともに k_p が増大することがわかった（図 3b）。このことは、膜に結合した Mag の膜表面濃度がポア形成の速度を決めていることを示す。

4. ポアを介しての漏れ速度定数の決定とマガイニン 2 のポア形成の時のポアの大きさの時間変化⁹⁾

GUV の蛍光強度の時間変化の解析から、ポアを介しての漏れ速度定数を求めることができる。Mag が誘起するポアからの種々の大きさの蛍光プローブの漏れを調べた結果、平均分子量 $M_w = 10\text{k}$ の Texas-Red dextran (TRD) 10k ($R = 2.7 \text{ nm}$) や $M_w = 1.5\text{k}$ の TRD 3k ($R = 1.4 \text{ nm}$) 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（図 4）。この結果は、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、最終的に安定なポアに変

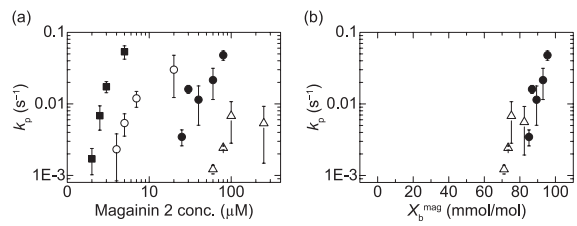


図 3 マガイニン 2 のポア形成の速度定数と水溶液中濃度 (a) および膜表面濃度 (b) の関係。■: 60% DOPG, ○: 50% DOPG, ●: 40% DOPG, △: 30% DOPG。文献 8 より転載。

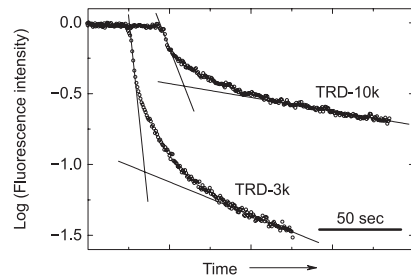


図 4 GUV 内部の蛍光強度の対数の時間変化の解析から初期状態の漏れと定常状態の漏れ速度定数の決定。文献 9 より転載。

化することを示唆している。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はじめての情報を与え、それに基づいて Mag のポア形成のメカニズムの仮説を提案した⁹⁾。

今後メカニズムを確定するためには、まだ多くの素過程の実験データや理論の構築が必要である。メカニズムの妥当性を判断するためには、その理論による種々のペプチドの抗菌活性の予測と実際の細菌を殺す活性の相関を調べる必要がある。

文 献

- 1) Zasloff, M. (2002) Nature **415**, 389-395.
- 2) Melo, M. N. *et al.* (2009) Nature Rev. Microbiology **8**, 1-5.
- 3) たとえば, Yamazaki, M. (2008) Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes **7**, 121-142. (2008) 膜 **34**, 126-132.
- 4) Tanaka, T. *et al.* (2004) Langmuir **20**, 5160-5164.
- 5) Tanaka, T. *et al.* (2004) Langmuir **20**, 9526-9534.
- 6) Tamba, Y. *et al.* (2007) Biophys. J. **92**, 3176-3194.
- 7) Tamba, Y., Yamazaki, M. (2005) Biochemistry **44**, 15823-15833.
- 8) Tamba, Y., Yamazaki, M. (2009) J. Phys. Chem. B. **113**, 4846-4852.
- 9) Ariyama, H. *et al.* (2010) J. Phys. Chem. B. **114**, 12018-12026.

山崎昌一（やまざき まさひと）

静岡大学創造科学技術大学院・統合バイオサイエンス部門教授、(兼任) 理学部物理学科教授
 京都大学大学院理学研究科生物物理学専攻博士後期課程 (理博)、カリフォルニア大学サンディエゴ校研究員などを経て現職。
 研究内容: 生体膜の生物物理
 E-mail: spmyama@ipc.shizuoka.ac.jp
 URL: <http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~spmyama>